



**T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**AKCİĞER KANSERLİ HASTALARDA ENDOPLAZMİK
RETİKULUM MOLEKÜLER ŞAPERONLARI GRP78, GRP94,
KALRETİKÜLİN VE KALNEKSİN GEN İFADELERİNİN
KLİNİK VERİLERLE KARŞILAŞTIRILMASI**

GÜNTÜLÜ AK

DOKTORA TEZİ

**DANIŞMAN
PROF. DR. HASAN VEYSİ GÜNEŞ**

**Eskişehir
2021**



T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**AKCİĞER KANSERLİ HASTALARDA ENDOPLAZMİK
RETİKULUM MOLEKÜLER ŞAPERONLARI GRP78, GRP94,
KALRETİKÜLİN VE KALNEKSİN GEN İFADELERİNİN
KLİNİK VERİLERLE KARŞILAŞTIRILMASI**

GÜNTÜLÜ AK

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
PROF. DR. HASAN VEYSİ GÜNEŞ

Eskişehir
2021

KABUL VE ONAY SAYFASI

Güntülü AK'ın Doktora Tezi olarak hazırladığı “Akciğer Kanserli Hastalarda Endoplazmik Retikulum Moleküler Şaperonları GRP78, GRP94, Kalretikülin ve Kalneksin Gen İfadelerinin Klinik Verilerle Karşılaştırılması” başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirilerek “**KABUL**” edilmiştir.

Tarih:

04 / 02 / 2021

Üye: Prof.Dr.Hasan Veysi GÜNEŞ

Üye: Prof.Dr.Muzaffer METİNTAŞ

Üye: Prof.Dr.Didem TURGUT COŞAN

Üye: Prof.Dr.Müjgan Özdemir ERDOĞAN

Üye: Prof.Dr.Ayşe Gaye TOMATIR

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ... / ... / 2021 tarih ve ... / ... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof.Dr.Selma METİNTAŞ
Enstitü Müdürü

TEŐEKKÖR

Tez hocam sayın Prof.Dr.Hasan Veysi Güneş, akademik yaőamımın her aşamasında destek olan sayın Prof.Dr.Muzaffer Metintaş, doktora eğitimim sırasında desteklerini esirgemeyen sayın Prof.Dr.Hülyam Kurt ve Prof.Dr.Didem Turgut Coşan ile tezimin kurgusundan analiz, yorum ve yazımına kadar her aşamasında katkı sağlayan sayın Prof.Dr.Selma Metintaş hocalarıma, doktora programında birlikte çalıőtıđım arkadaşlarıma, bu süreçte her zaman destek olan eőim Gökhan Ak ve kızım Zekiye'ye őükranlarımı sunarım.

Güntülü AK

04.02.2021

ÖZET

Başlık: Akciğer kanserli hastalarda endoplazmik retikulum moleküler şaperonları GRP78, GRP94, kalretikülin ve kalneksin gen ifadelerinin klinik verilerle karşılaştırılması.

Giriş: Akciğer kanseri dünya genelinde tüm kanserler içinde erkeklerde en sık, kadınlarda ikinci sırada görülen kanserdir. Hastaların çoğu tanı sırasında lokal ileri / ileri evre hastalığa sahip olup küratif tedavi şansları yoktur. Son yıllarda akciğer kanserinin moleküler mekanizmaları ve bu mekanizmalar üzerinden hedefe yönelik tedavi geliştirme çalışmaları hız kazanmıştır. Endoplazmik retikulum protein sentezi ve işleme başta olmak üzere birçok fonksiyona sahiptir. Kanserde endoplazmik retikulumda katlanmamış protein miktarı artmakta, ortaya çıkan durum endoplazmik retikulum stresi olarak adlandırılmaktadır. Endoplazmik retikulum stresinde görev alan moleküler şaperonların akciğer kanserinin klinik verileri ve sağ kalımı ile olan ilişkisi belirsizdir.

Amaç: Bu çalışmada akciğer kanserli hastalarda endoplazmik retikulum stresinde rol alan GRP78, GRP94, kalneksin, kalretikülin gen ifade seviyeleri ile protein seviyelerinin klinik veriler ve sağ kalım ile ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: Çalışma iki aşamadan oluşmaktadır: 1. aşamada tümör dokusunda RT-PCR ile GRP78, GRP94, kalneksin, kalretikülin gen ifade seviyeleri, 2. aşamada ise serumda ELISA ile protein seviyeleri tespit edilip klinik veriler ve sağ kalım ile ilişkisi değerlendirilmiştir. Verilerin karşılaştırılmasında parametrik testler (t-testi ve One-way ANOVA) kullanılmıştır. Parametreler arasındaki ilişkiyi göstermede Pearson korelasyon testi yapılmıştır. Sağ kalım analizlerinde Kaplan – Meier metodu kullanılmıştır.

Bulgular: Birinci aşamadaki 52 hastanın yaş ortalamaları 65.13 ± 9.62 yıl, kadın/erkek oranı 5/47 olarak saptanmıştır. Hastaların GRP78, GRP94, kalneksin, kalretikülin gen ifade seviyelerinin yaş, cins, aktif sigara içiciliği, ko-morbidite, evre ve metastaz durumuna göre değişmediği görülmüştür. GRP94 ve kalneksin gen ifade seviyeleri küçük hücreli akciğer kanserinde adenokarsinom ve skuamöz hücreli karsinoma göre daha düşük bulunmuştur ($p=0.005$ ve $p<0.001$). Çalışmanın ikinci aşamasındaki 140 hastanın yaş ortalamaları 64.37 ± 9.11 yıl, kadın/erkek oranı 14/126 olarak saptanmıştır. GRP78, GRP94, kalneksin, kalretikülin protein seviyeleri akciğer kanserli hastalarda kontrol grubuna göre daha yüksek ve birbirleriyle korelasyon gösterdiği saptanmıştır (tümü için $p<0.001$). Sağ kalım analizinde ise şaperonlar

arasından yalnızca kalretikülin sağ kalımla ilişkili bulunmuştur. Kalretikülin ≥ 250.52 ng/ml olan hastalarda ortanca sağ kalım daha yüksek saptanmıştır (16 aya karşın 8 ay; $p=0.009$). Histopatolojik alt tip, metastaz ve kemoterapi cevabına göre düzeltme yapıldıktan sonra da kalretikülinin sağ kalım üzerinde etkili olduğu görülmüştür [HR (%95CI): 1.659 (1.098-2.506); $p=0.016$].

Sonuç: Kalretikülinin prognoz üzerindeki histopatolojik alt tip, metastaz ve kemoterapi cevabından bağımsız etkisi hedeflenebilmesi halinde akciğer kanserli hastaların daha geniş bir grubunun tedavisinde etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar kelimeler: Akciğer kanseri, endoplazmik retikulum stresi, GRP78, GRP94, kalneksin, kalretikülin.

SUMMARY

Title: Clinical comparison of ER molecular chaperones GRP78, GRP94, calreticulin and calnexin gene expression in lung cancer patients.

Introduction: Lung cancer is the most common cancer in men and the second in women among all cancers worldwide. Most patients have locally advanced/advanced-stage disease at diagnosis, and there is no chance of curative treatment. Studies on molecular mechanisms of lung cancer and targeted therapy development through these mechanisms have gained momentum. Endoplasmic reticulum has many functions, mainly protein synthesis and processing. In cancer, the amount of unfolded protein in the endoplasmic reticulum increases and the condition that occurs is called endoplasmic reticulum stress. The relationship of molecular chaperones involved in endoplasmic reticulum stress with the clinical data and lung cancer survival is unclear.

Objective: We aimed to investigate the relationship between clinical data and survival with gene expression and protein levels of GRP78, GRP94, calnexin, and calreticulin which play a role in endoplasmic reticulum stress in lung cancer patients.

Methods: The study consisted of two stages: 1) the gene expression levels of GRP78, GRP94, calnexin, and calreticulin were determined by RT-PCR in the tumor tissues; 2) protein levels were determined by ELISA in the sera, and their relationship with clinical data and survival was evaluated. Parametric tests (t-test and One-way ANOVA) were used to compare the data. Pearson's correlation test was performed. Kaplan-Meier method was used for survival analysis.

Results: The mean age of 52 patients in the first stage was 65.13 ± 9.62 years, and the female/male ratio was 5/47. GRP78, GRP94, calnexin, calreticulin gene expression levels of the patients didn't differ according to age, gender, current smoking, comorbidity, stage and metastasis. The gene expression levels of GRP94 and calnexin were lower in small cell carcinoma than adenocarcinoma and squamous cell carcinoma ($p=0.005$ and $p<0.001$). In the second stage of the study, the mean age of 140 patients was 64.37 ± 9.11 years, and the female/male ratio was 14/126. The protein levels of GRP78, GRP94, calnexin, and calreticulin were higher and correlated with each other in patients with lung cancer than the control group ($p<0.001$). In the survival analysis, among the chaperones, only calreticulin was associated with survival. Median survival was higher in patients with calreticulin ≥ 250.52 ng/ml (16 vs 8 months; $p=0.009$). The

effect of calreticulin on survival persisted even after adjustment for histopathological subtype, metastasis and chemotherapy response [HR (95%CI): 1.659 (1.098-2.506); p=0.016].

Conclusions: The effect of calreticulin on prognosis, independent of histopathological subtype, metastasis and chemotherapy response, suggests that it may be effective in the treatment of lung cancer patients if it can be targeted.

Key words: Lung cancer, endoplasmic reticulum stress, GRP78, GRP94, calnexin, calreticulin.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET	iv-v
SUMMARY	vi-vii
İÇİNDEKİLER.....	viii-ix
TABLO DİZİNİ	x-xi
ŞEKİL DİZİNİ	xii
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiii-xiv
1. GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2. 1. Akciğer Kanseri.....	3
2. 1. 1. Tanım ve epidemiyoloji.....	3
2. 1. 2. Etyoloji.....	4
2. 1. 3. Önleme ve tarama.....	5
2. 1. 4. Klinik bulgular ve tanı.....	5
2. 1. 5. Histopatoloji.....	6
2. 1. 6. Evreleme.....	7
2. 1. 7. Tedavi.....	8
2. 1. 8. Prognoz.....	8
2. 2. Endoplazmik Retikulum Stresi.....	9
2. 2. 1. Endoplazmik retikulum yapı ve fonksiyonları.....	9
2. 2. 2. Endoplazmik retikulumda protein katlanması ve oligomerizasyon...11	
2. 2. 3. Endoplazmik retikulumda protein yıkımı, endoplazmik retikulum stresi ve katlanmamış protein cevabı.....	13
2. 2. 4. Isı şoku proteinleri.....	16
2. 2. 5. GRP78 / GRP94.....	18
2. 2. 6. Kalneksin / kalretikülin.....	22
2. 2. 7. Kanserde endoplazmik retikulumda protein katlanması.....	24
3. GEREÇ ve YÖNTEMLER.....	28
3. 1. Çalışma Populasyonu.....	28
3. 2. Kullanılan Cihazlar, Malzemeler ve Kimyasallar.....	29

3. 3. Deneysel Çalışmalar.....	30
3. 3. 1. Total RNA izolasyonu.....	30
3. 3. 2. cDNA'nın elde edilmesi.....	32
3. 3. 3. RT-PCR yöntemi ile gen ifadelerinin belirlenmesi.....	32
3. 3. 4. DeltaCt değerlerinin hesaplanması.....	36
3. 3. 5. Protein seviyelerinin belirlenmesi.....	37
3. 4. İstatistiksel Analiz.....	37
4. BULGULAR.....	39
4. 1. GRP78, GRP94, Kalneksin ve Kalretikülin Gen İfadeleri.....	39
4. 2. GRP78, GRP94, Kalneksin ve Kalretikülin Protein Seviyeleri.....	48
5. TARTIŞMA.....	63
5. 1. Akciğer Kanserli Hastalarda GRP78, GRP94, Kalneksin ve Kalretikülin Seviyeleri.....	64
5. 2. GRP78, GRP94, Kalneksin ve Kalretikülinin Akciğer Kanserli Hastaların Klinik-Patolojik Özellikleri ile İlişkisi.....	70
5. 3. GRP78, GRP94, Kalneksin ve Kalretikülinin Prognoz Üzerine Etkisi.....	75
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	82
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	85
EK-1 ETİK KURUL KARARI.....	95
ÖZGEÇMİŞ.....	98

TABLO DİZİNİ

Tablo 2.1. İki farklı ökaryotik hücre zarının rölatif miktarları.....	10
Tablo 3.1. cDNA reaksiyonu.....	32
Tablo 3.2. cDNA protokolü.....	32
Tablo 3.3. Forward ve reverse primer dizileri.....	33
Tablo 3.4. PCR reaksiyonu.....	33
Tablo 3.5. PCR protokolü.....	33
Tablo 4.1. Gen ifadesi değerlendirilen akciğer kanserli hastaların demografik ve klinik özellikleri.....	39
Tablo 4.2. Çalışma grubunun RT-PCR ile GRP78, GRP94, kalneksin ve kalretikülin gen ifade seviyeleri.....	41
Tablo 4.3. Çalışma grubunun GRP78, GRP94, kalneksin ve kalretikülin gen ifade seviyeleri arasındaki korelasyon değerleri.....	41
Tablo 4.4. Akciğer kanserli hastaların yaş gruplarına göre GRP78, GRP94, kalneksin ve kalretikülin gen ifade seviyelerinin karşılaştırılması.....	42
Tablo 4.5. Akciğer kanserli hastaların cinsiyete göre GRP78, GRP94, kalneksin ve kalretikülin gen ifade seviyelerinin karşılaştırılması.....	43
Tablo 4.6. Akciğer kanserli hastaların aktif sigara içme durumlarına göre GRP78, GRP94, kalneksin ve kalretikülin gen ifade seviyelerinin karşılaştırılması.....	43
Tablo 4.7. Akciğer kanserli hastaların komorbidite durumlarına göre GRP78, GRP94, kalneksin ve kalretikülin gen ifade seviyelerinin karşılaştırılması.....	44
Tablo 4.8. Akciğer kanserli hastaların histopatolojik alt tiplerine göre GRP78, GRP94, kalneksin ve kalretikülin gen ifade seviyelerinin karşılaştırılması.....	45
Tablo 4.9. Akciğer kanserli hastaların evrelerine göre GRP78, GRP94, kalneksin ve kalretikülin gen ifade seviyelerinin karşılaştırılması.....	46
Tablo 4.10. Akciğer kanserli hastaların metastaz durumlarına göre GRP78, GRP94, kalneksin ve kalretikülin gen ifade seviyelerinin karşılaştırılması.....	47
Tablo 4.11. Akciğer kanserli hastaların GRP78, GRP94, kalneksin ve kalretikülin gen ifade seviyelerinin düzeyine göre sağ kalım sürelerinin karşılaştırılması.....	48
Tablo 4.12. GRP78, GRP94, kalneksin ve kalretikülin protein seviyeleri değerlendirilen akciğer kanserli hastaların klinik özellikleri.....	49

Tablo 4.13. Çalışma grubunun ELISA ile GRP78, GRP94, kalneksin ve kalretikülin protein seviyelerinin karşılaştırılması.....	51
Tablo 4.14. Akciğer kanserli hastaların GRP78, GRP94, kalneksin ve kalretikülin protein seviyeleri arasındaki korelasyon değerleri.....	52
Tablo 4.15. Akciğer kanserli hastaların yaş gruplarına göre GRP78, GRP94, kalneksin ve kalretikülin protein seviyelerinin karşılaştırılması.....	53
Tablo 4.16. Akciğer kanserli hastaların cinsiyete göre GRP78, GRP94, kalneksin ve kalretikülin protein seviyelerinin karşılaştırılması.....	54
Tablo 4.17. Akciğer kanserli hastaların aktif sigara içme durumlarına göre GRP78, GRP94, kalneksin ve kalretikülin protein seviyelerinin karşılaştırılması.....	55
Tablo 4.18. Akciğer kanserli hastaların ko-morbidite durumlarına göre GRP78, GRP94, kalneksin ve kalretikülin protein seviyelerinin karşılaştırılması.....	56
Tablo 4.19. Akciğer kanserli hastaların histopatolojik alt tiplerine göre GRP78, GRP94, kalneksin ve kalretikülin protein seviyelerinin karşılaştırılması.....	57
Tablo 4.20. Akciğer kanserli hastaların evrelerine göre GRP78, GRP94, kalneksin ve kalretikülin protein seviyelerinin karşılaştırılması.....	58
Tablo 4.21. Akciğer kanserli hastaların metastaz durumlarına göre GRP78, GRP94, kalneksin ve kalretikülin protein seviyelerinin karşılaştırılması.....	59
Tablo 4.22. Akciğer kanserli hastaların GRP78, GRP94, kalneksin ve kalretikülin protein seviyelerine göre sağ kalım sürelerinin karşılaştırılması.....	61
Tablo 4.23. Hastaların sağ kalımına etki eden değişkenlerin çoklu regresyon modeli.....	61

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 2.1. Endoplazmik retikulum stresi ve katlanmamış protein cevabı.....	15
Şekil 2.2. Endoplazmik retikulum stresi ve katlanmamış protein cevabının birinci yolak üzerinden şematizasyonu.....	16
Şekil 2.3. Kanserde endoplazmik retikulum stresi ve katlanmamış protein cevabı.....	26
Şekil 3.1. RNA izolasyonu.....	31
Şekil 3.2. Deneylein yapılma aşaması.....	34
Şekil 3.3. Aktin, GRP78, GRP94, kalneksin ve kalretikülin amplifikasyon eğrileri.....	34
Şekil 4.1. Çalışmanın ikinci aşamasında yer alan çalışma grubunun sağ kalım eğrisi.....	60
Şekil 4.2. Akciğer kanserli hastaların serum kalretikülin seviyelerine göre Kaplan-Meier sağ kalım eğrisi.....	62

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

ALK	:	Anaplastic lymphoma kinase
ATF6	:	Activating transcription factor 6
BiP	:	Binding immunoglobulin protein
CHOP	:	CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein
cDNA	:	Complementary DNA
C _T	:	Cycle threshold
DC	:	Dendritic cell
EDEM	:	Endoplazmik retikulum bozunmasını artıran α -mannozidaz benzeri protein
EGFR	:	Epidermal growth factor receptor
EIF2A	:	Eukaryotic translation initiation factor 2A
ELISA	:	Enzyme-linked immunosorbent assay
ER	:	Endoplazmik retikulum
ERAD	:	Endoplazmik retikulum ile ilişkili bozunma
ESOGÜ	:	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
GA	:	Güven Aralığı.
GRIM-1	:	Gene associated with retinoid-interferon-induced mortality-1
GRP78	:	Glucose-regulated protein 78
GRP94	:	Glucose-regulated protein 94
HACBP	:	High-affinity calcium-binding protein
HSP	:	Heat shock protein
HSPA5	:	Heat shock protein family A (Hsp70) member 5
HR	:	Hazard ratio
IGF	:	Insülin-like growth factor
IQR	:	Inter Quantile Range
IRE1 α	:	Inositol-requiring enzyme 1 α
KHAK	:	Küçük hücreli akciğer kanseri
KHDAK	:	Küçük hücreli dışı akciğer kanseri
MHC	:	Major histocompatibility complex
PDI	:	Protein disülfid izomeraz
PERK	:	Protein kinase R-like ER kinase
PI3K/AKT	:	Phosphoinositide-3-kinase–protein kinase B/Akt

PIMT	:	Protein-l-isoaspartate (d-aspartyl) O-methyltransferase
ROC	:	Receiver operating characteristic
RT-PCR	:	Real time polymerase chain reaction
SD	:	Standard deviation
SE	:	Standard error
TGF	:	Transforming growth factor
UDP	:	Uridin difosfat
UPR	:	Unfolded protein response
XBP1	:	X-box binding protein 1

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Akciğer kanseri dünya genelinde kanser ölümlerinin başında gelmektedir. Tütün ve tütün ürünleriyle olan etyolojik ilişkisi nedeniyle görülme sıklığı artmaya devam etmektedir (Ferlay vd., 2018; Bray vd., 2018). Hastaların üçte ikisi lokal ileri / ileri evrede tanı almakta, bu nedenle küratif tedavi şansı bulamamakta ve palyatif sitotoksik tedaviler almaktadır. Evreleme ve tedavi ajanlarına yönelik çabalara rağmen lokal ileri / ileri evredeki hastaların (3B – 4B arasındaki) prognozu kötü olup beş yıllık sağ kalım yüzdeleri %26 ile 0 arasında değişmektedir (Goldstraw vd., 2016). Batı Avrupa ve Amerika Birleşik Devletleri'nde rapor edilen mortalitedeki azalma, tütün ve tütün ürünlerinin bırakılmasından kaynaklanmaktadır (Jeon vd., 2018; Siegel, Miller & Jemal, 2020).

Tütün ve tütün ürünleriyle mücadelenin yanında tedaviye yönelik çalışmalar da hız kesmeden devam etmektedir. Son dekatlarda akciğer kanserinin moleküler patogenezi temelinde tedavi geliştirme çalışmalarının arttığı ve bu çabaların bir kısmından sonuç alındığı görülmektedir. Burada amaç, hastalığın ilerlemesine neden olan moleküler yolları yavaşlatarak akciğer kanserini kronik bir hastalığa dönüştürmek ve yaşam süresini olabildiğince uzatmaktır. Küçük hücreli dışı akciğer kanserinde (KHDAK), özellikle adenokarsinomda, hedefe yönelik tedavilerle daha iyi sonuçlar sağlanmıştır. Ancak bu sürücü mutasyonlar hastaların yaklaşık %15-20'sinde bulunmaktadır. Özellikle küçük hücreli akciğer kanserinin (KHAK) bu tedavilerin kapsamı dışında kaldığı görülmektedir (Tanvetyanon & Bepler, 2020). Benzer şekilde akciğer kanserinin tedavisinde immünoterapideki gelişmeler de yüz güldürücü olmakla birlikte henüz istenilen düzeyde hastayı kapsamamaktadır (Ruiz-Cordero & Devine, 2020). Kısacası akciğer kanserinin günümüzde geniş hasta gruplarına hitap eden bir tedavisi olmayıp moleküler yollar ve bu yollarda etki gösterebilecek yeni terapötik ajanlara yönelik çalışmalara gereksinim vardır.

Endoplazmik retikulum (ER) başta protein sentezi ve işleme olmak üzere birçok hücresel süreçte rol alan önemli bir hücre içi organelidir (Phillips & Voeltz, 2016). Normalde ER'de polipeptitlerin yaklaşık üçte biri doğru şekilde katlanamamaktadır. Yanlış katlanmış polipeptidler, oligomerik grupların fazla alt birimleri veya yanlış bir şekilde birleştirilmiş oligomerler kalite kontrol sistemleri tarafından hedeflenerek bozunurlar. Yanlış katlanmış glikoproteinler önce tanınırlar, daha sonra sitoplazmaya dönük ER zarı boyunca yerleştirilirler, ubiquitile edilirler ve ardından sitoplazmada

proteazom tarafından bozunurlar (Schubert vd., 2000). Böylece yanlış katlanmış proteinlerin birikmesi önlenmiş olur.

Proteinleri düzgün bir şekilde katlama veya kalite kontrolünde başarısız olanları atma kapasitesi aşılsa, ER lümeninde yanlış katlanmış proteinler birikmeye başlar. Bazı durumlarda, ER lümeninde katlanmamış veya yanlış katlanmış protein miktarı artar ve ER dengesi bozulur. Ortaya çıkan bu durum ER stresi olarak adlandırılır (Luo & Lee, 2013; Ron & Walter, 2007). ER stresi oluşuktan sonra hücrede dengeyi tekrar sağlamak ve bu durumdan en az zararla kurtulmak için katlanmamış protein cevabı (*unfolded protein response*-UPR) denilen ve bazı hücre içi sinyal yollarının aktivasyonunu sağlayan süreç aktif hale gelir (Ron & Walter, 2007; Hetz, 2012). UPR evrimsel olarak korunmuş bir kalite kontrol mekanizmasıdır (Rozpedek vd., 2016). Bu mekanizma ile, protein translasyonunun geçici olarak durdurulması, proteinlerin katlanma kapasitesini artıran ER moleküler şaperonları ve enzimlerinin indüklenmesi, yanlış katlanmış proteinleri atma veya parçalama işlemini başlatmak için sinyal molekülleri kaskadının aktive edilip ER dengesinin eski haline getirilmesi sağlanmaya çalışılır (Walter & Ron, 2011; Brodsky & Skach, 2011). Bu başarılmazsa hücre apoptoza gidecektir.

Kanserleşme sürecinde hücrenin mikroçevresinde meydana gelen değişiklikler ER stresine ve UPR'ye neden olmaktadır. Kanser hücrelerinin apoptozdan kaçtığı, yani UPR'nin sonlandırıcı etki yerine, anjiyogenez, metastaz ve kemorezistans gibi tümörün büyümesine katkı sağlayan aşamalarda rol aldığı görülmektedir. Her yıl bir buçuk milyondan fazla kişinin ölümüne neden olan akciğer kanserinde ER stresi ve UPR'de rol alan moleküllerin ve yolların açığa çıkarılması, hastaların klinik verileriyle ilişkilendirilmesi ve kilit yollarda görev alan moleküllerin hedeflenmesi tedavide yeni umutlar vaderebilir.

Bu çalışmada akciğer kanserli hastalarda ER moleküler şaperonları, glukozla düzenlenen protein 78 (*glucose-regulated protein 78* - GRP78 veya *binding immunoglobulin protein*-BİP), glukozla düzenlenen protein 94 (*glucose-regulated protein 94* - GRP94), kalneksin ve kalretikülünün tümör dokusunda *real time polymerase chain reaction* (RT-PCR) ile gen ifadeleri ve serumda *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) ile protein seviyeleri belirlenerek hastaların klinik verileri ve sağ kalımları ile ilişkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2. 1. Akciğer Kanseri

2. 1. 1. Tanım ve epidemiyoloji

Akciğer kanseri, hava yollarından veya akciğer parankiminden kaynaklanan malignitelerin genel adı olup bronş kanseri olarak da adlandırılmaktadır. Akciğer kanseri KHDAK ve KHAK olmak üzere iki histopatolojik alt tipe ayrılır. Tüm akciğer kanserlerinin %95'ini KHDAK ve KHAK, kalan %5'ini de diğer hücre tipleri oluşturur. Bu ayrım çok genel bir ayrım olmakla birlikte evreleme, tedavi ve prognoz için yol gösterici olma özelliğini korumaktadır.

Yıllar içinde akciğer kanseri vaka sayıları ve göreceli sıklığı artmıştır. Yakın zamandaki verilere göre yılda 2.093.876 yeni vaka ile tüm kanserlerin %11.6'sını, 1.761.007 ölüm ile kanser ölümlerinin %18.4'ünü oluşturmaktadır (Ferlay vd., 2018; Bray vd., 2018). Dünya genelinde erkeklerde en sık görülen kanser türüdür ve kanser ölümlerinin başında gelmektedir. Kadınlarda da sigara içme oranındaki artışa paralel olarak yıllar içinde vaka sayıları artarak erkeklere yaklaşmış, tüm dünyada meme kanserinden sonra en sık görülen ve ölüme neden olan kanser olarak rapor edilmiştir (Ferlay vd., 2018; Bray vd., 2018). Erkeklerde en yüksek yaş standardize insidans hızı yaklaşık 50 / 100.000 ile doğu Avrupa'da, kadınlarda ise yaklaşık 30 / 100.000 ile Kuzey Amerika'dadır (Bray vd., 2018). Amerika Birleşik Devletleri'nde akciğer kanserine bağlı ölümlerin son yıllarda azalma gösterdiği bunun da sigara içimindeki azalmaya bağlı olduğu belirtilmiştir (Jeon vd., 2018; Siegel vd., 2020).

Ülkemizde akciğer kanserinin görülme sıklığı genel dünya popülasyonuna ve sigara içiminin yoğun olduğu gelişmekte olan ülkelere benzerdir. Sağlık Bakanlığı 2016 yılı verilerine göre akciğer kanseri tüm yaş gruplarında erkeklerde %22.1'lik oranla birinci, kadınlarda %5.4'lük oranla beşinci sıradadır. Erkeklerde yaş standardize insidans hızı 57.7 / 100.000, kadınlarda 9.8 / 100.000 olarak rapor edilmiştir (Kara & Keskinçilic, 2019). Etiyolojideki yeri ve önemi iyi bilinen tütün ve tütün ürünlerinin kullanılması tüm çabalarına rağmen ülkemizde oldukça yüksek oranlardadır. Bu durum bize önümüzdeki dekatlar boyunca sorunun devam edeceğini göstermektedir.

Akciğer kanserinin görülme sıklığı hem erkeklerde hem de kadınlarda yaşla birlikte artmakta, 6'ncı ve 7'inci dekatlarda en yüksek değerlere ulaşmaktadır (National Cancer Institute). Elli yaşın altındaki hasta oranı %10'un altındadır (Ak vd., 2007). Dünya genelinde akciğer kanseri insidansı erkeklerde kadınlardan daha yüksektir. Ancak,

ülkelerin gelişmişlik derecesi insidans hızları üzerinde etkilidir. Gelişmiş ülkelerde her iki cinste birbirine yakın insidans hızları görülürken gelişmekte olan ülkelerde tütün ve tütün ürünlerinin kullanımındaki artışa paralel olarak kadınlarda akciğer kanserinin görülme sıklığında artış söz konusudur.

2. 1. 2. Etiyoloji

Akciğer kanserinin en önemli nedeni şüphesiz tütün ve tütün ürünlerine maruz kalmaktır. Bunların başında da sigara gelmektedir. Sigara dumanının akciğer kanserine neden olabileceği ilk kez 1912'de öne sürülmüştür (Adler, 1912). O tarihten bu yana çok sayıda bilimsel veriyle sigara ve akciğer kanseri arasındaki ilişki doğrulanmış olmasına karşın birçok toplumda sigarayı azaltma çabalarının yetersiz kaldığı görülmektedir.

Olguların en az %90'ında neden sigaradır. Uzun süreli sigara kullananlarda akciğer kanserinin göreceli riski hiç sigara kullanmayanlardan 10 – 30 kat daha fazladır. Hiç sigara içmeyenlerde yaşam boyu akciğer kanseri gelişme riski %1 veya daha düşük iken, uzun süreli içicilerde bu oran %30 civarındadır (Samet, 1991; Samet, Wiggins, Humble & Pathak, 1988). Sigaraya başlama yaşı, sigara içme süresi – şekli, içilen sigara sayısı ile tütün ve sigara tipi riski etkilemektedir. Aynı şekilde çevresel sigara dumanı maruziyeti (pasif sigara içicilik) de akciğer kanseri riskini artırmaktadır (Mattson, Pollack & Cullen, 1987; Harris, Thun, Mondul & Calle, 2004).

Esrar veya kokainin akciğer kanseri riskiyle ilişkisi tam olarak açık değildir. Buna karşın, çoğunlukla sigarayı bırakmak isteyenlerin tercih ettiği elektronik sigara hakkında kanser riskini artırdığına dair şüpheler bulunmakta, araştırmalar devam etmektedir (Tang vd., 2019).

Akciğer kanserinin gelişmesinde tütün ve tütün ürünlerinden sonra en önemli risk faktörleri mesleksel ve çevresel karsinojenlerdir (Alberg, Brock, Ford, Samet & Spivack, 2013). Bu grup içinde en iyi bilinenler asbest ve radondur. Bunun dışında krom, arsenik, bis(klorometil) eter, formaldehid, berilyum, kadmiyum, silika, nikel, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, vinil klorid, iyonize radyasyon gibi etkenler ile akciğer kanseri riski artmakta ve bu etkenler ile sigara birlikteliği sinerjistik etki göstermektedir. Ayrıca pişirme ısıtmadan çıkan duman, hava kirliliği ve dizel egzozu da bu grupta iyi bilinen faktörlerdir. Bu faktörler ve daha birçok faktör Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı tarafından akciğer kanseri riskini artıran grup I karsinojenler olarak sınıflandırılmaktadır.

Bunların dışında diğer malign hastalıklar nedeniyle radyoterapi uygulanan, kronik obstrüktif akciğer hastalığı ve diğer bazı benign akciğer hastalığı tanısı olan, birinci

derece akrabalarında akciğer kanseri öyküsü olan kişilerde de akciğer kanseri riskinin arttığı bilinmektedir.

2. 1. 3. Önleme ve tarama

Akciğer kanserinin önlenmesinde en etkin yöntem sigaranın bırakılmasıdır. Sigaranın bırakılması ile akciğer kanseri riski sigarasız geçen zamana bağlı olarak önemli ölçüde azalmaktadır (Jha vd., 2013). Yapılan çalışmalarda 15 yıldan daha uzun süredir sigarayı bırakmış olanlarda riskin %80 – 90 oranında azaldığı gösterilmiştir (Peto vd., 2000). Buna karşın risk hiç sigara içmeyenlere göre daha yüksektir. Ayrıca akciğer kanseri tanısından sonra sigaraya devam edilmesi tedavi direnci, nüks, kötü prognoz ve ikinci bir akciğer kanseri gelişme riski ile de ilişkilidir.

Bugüne değin yapılan çalışmalarda β karoten, vitamin E, retinoidler ve N-asetilsistein ve izotretinoin, aspirin, selenyum, prostasiklin analogları (*iloprost*), siklooksijenaz-2 inhibitörleri (*celecoxib*), anetol ditioleton, inhale steroidler, pioglitazon, myoinozitol, çay özü, metformin kullanımının akciğer kanseri riskini azalttığına dair herhangi bir veri elde edilememiştir. Kesin olmamakla birlikte bazılarının kanser riskini artırabileceği de öne sürülmüştür (Tanvetyanon & Bepler, 2008). Benzer şekilde B6 ve B12 vitaminlerinin kanser riskini artırdığı savı da henüz netlik kazanmamıştır. Akciğer kanseri riskini azalttığı öne sürülen yeşil sebze ve meyveden zengin diyetler ile artırdığı öne sürülen kırmızı et veya işlenmiş etten fakir diyetlerin etkisi de tartışılan konular arasında yer almaktadır.

Akciğer kanserinin erken teşhisi için günümüzde geniş kabul gören bir tarama yöntemi yoktur. Daha eski yıllarda riskli grupların balgam sitolojisi ve direkt grafi ile taranmaları, çok sayıda çalışmaya konu olmasına karşılık mortaliteyi azalttıkları gösterilemediğinden önerilmemektedir. Düşük doz bilgisayarlı tomografi ile riskli grupların taranması 2010 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan bir çalışma ile gündeme gelmiş, mortaliteyi %20 azalttığı öne sürülmüş, ancak farklı popülasyonlarda yapılan çalışmaların çelişkili sonuçları nedeniyle henüz dünya genelinde kabul gören bir uygulama haline gelmemiştir (National Lung Screening Trial Research Team vd., 2011).

2. 1. 4. Klinik bulgular ve tanı

Akciğer kanserli hastaların büyük bir çoğunluğu tanı anında bir veya daha fazla semptom ve/veya bulguya sahiptir. Az sayıda hasta semptomatik olup, başka nedenle yapılan tetkiklerde tespit edilebilir. Semptom ve bulguların nedeni tümörün lokal, intratorasik yayılımı, ekstratorasik (metastatik) yayılımı veya paraneoplastik etkilerine

bağlı olabilir. En sık saptanan semptomlar arasında öksürük, göğüs ağrısı, dispne, hemoptizi, ses kısıklığı, kemik ağrısı, ateş, iştahsızlık, halsizlik, kilo kaybı, konfüzyon, nöropatik ağrı vb. yer almaktadır. Fizik muayenede ise lokalize ronküs, plevral sıvı bulguları, supraklavikuler lenfadenomegali, kaşeksi, hepatomegali, Horner Sendromu, vena kava superior sendromu bulgularının saptanması akciğer kanseri şüphesini artırmaktadır (Ak, 2014).

Tümörün santral ya da periferik yerleşimli olmasına göre semptomlar farklılık gösterebilir. Santral yerleşimli veya endobronşial komponenti olan lezyonlarda semptom ve bulgular daha belirgin olup başlıcaları arasında öksürük, nefes darlığı, hırıltı ve hemoptizi gelmektedir.

Akciğer kanseri şüphesi genellikle tümörün neden olduğu semptom ve bulgulara eşlik eden anormal radyografik bulgular ile oluşur. Böyle bir hastada tanısal işlemlere mümkün olan en kısa sürede başlanmalıdır. Klinik değerlendirme sonrası tanıda ilk başvuru tetkik akciğer grafisidir. Hastaların çoğunun akciğer grafisinde anormal bulguya rastlanır. Akciğer grafisini üst batını içine alan kontrastlı toraks bilgisayarlı tomografi izler. Klinik ve radyolojik değerlendirme sonrası akciğer kanseri klinik tanısına ulaşılır. Bundan sonraki basamakta uygun olan lezyondan biyopsi alınarak histopatolojik tanıya ulaşmak yer almaktadır. Biyopsi yeri seçiminde etkinlik ve komplikasyon riski birlikte değerlendirilerek en uygun yöntem seçilir. Akciğer kanseri tanısı için balgam sitolojisi, bronkoskopik teknikler, transtorasik iğne biyopsileri, torasentez, plevral biyopsi, torakoskopi, cerrahi biyopsiler kullanılan başlıca yöntemlerdir (Ak, 2014).

Bu yöntemler ile primer tümörden, lenf nodundan, plevra / perikard sıvısı gibi vücut sıvılarından veya uzak metastazlardan histopatolojik ve sitolojik incelemeler için örnek almak mümkündür. Örnek temininde tanı ve evrelemeye fırsat sağlayacak, komplikasyon riski düşük işlemler tercih edilmelidir. Alınan örnek alt tip ayırımı ve gittikçe yaygınlaşan ve tedaviyi yönlendirmede etkili olan immünohistokimyasal boyamalar ve moleküler analizler için yeterli miktar ve kalitede olmalıdır.

2. 1. 5. Histopatoloji

Akciğer kanserinin histopatolojik alt tiplerine göre sınıflandırılması hastalığın tedavisi ve prognozu hakkında önemli bilgiler sağlar. Yukarıda da değinildiği gibi akciğer kanserlerinin yaklaşık %95'i KHDAK veya KHAK olarak sınıflandırılır. Diğer hücre tipleri geriye kalan %5'lik kısmı oluşturur. Ancak son zamanlarda kanser moleküler biyolojisindeki gelişmeler bu sınıflamanın yetersiz olduğunu, özellikle hedefe yönelik

tedavilere ışık tutması bakımından daha ayrıntılı bir değerlendirmenin gerektiğini göstermektedir.

Son yıllarda tüm dünyada sigaradaki değişikliklerin akciğer kanserinin histopatolojik alt tiplerini etkilediği görülmektedir. Daha önceleri en sık görülen alt tip skuamöz hücreli karsinom iken günümüzde adenokarsinom sıklığının artarak gelişmiş ülkelerde en sık saptanan histopatolojik alt tip olduğu, KHAK sıklığının ise benzer oranda kaldığı görülmektedir. Ülkemizde 2016 yılında yayınlanan yaklaşık 12 bin hastanın histopatolojik alt tip dağılımına bakıldığında hastaların %79.3'ünün KHDAK, %16.3'ünün KHAK olarak tanı aldığı, KHDAK'li hastaların %47.1'inin adenokarsinom, %37.7'sinin skuamöz hücreli karsinom, %13.6'sının ayırt edilemediği ve %1.6'sının büyük hücreli karsinom tanısı aldığı belirtilmiştir (Kara & Keskinlik, 2019). Altı binden fazla hastanın takip edildiği kliniğimizde ise yıllar içinde adenokarsinom sıklığının arttığı ancak halen en sık görülen alt tipin skuamöz hücreli karsinom olduğu tespit edilmiştir (Ak vd., 2017). Dünya verilerine benzer şekilde bizim serimizde de KHAK'nin görülme sıklığında belirgin bir farklılık olmamıştır. Bunun yanında dünya genelinde sigara içmeyenlerde ve kadın hastalarda en sık saptanan histopatolojik alt tip adenokarsinomdur.

Dünya Sağlık Örgütü 1981'de geliştirmiş olduğu 'Akciğer Tümörleri Sınıflandırması'nı 2015'te yeniden düzenlemiş ve bazı önerilerde bulunmuştur. Bu öneriler immunohistokimya kullanılması, moleküler testler için örneklerin korunması, küçük biyopsi ve sitoloji örnekleri için yeni öneriler, adenokarsinom için farklı bir yaklaşım, büyük hücre alt tipinin yalnız rezeksiyon materyallerinde ifade edilmesi, skuamöz hücreli karsinomun alt tiplerinin yeniden belirlenmesi, nöroendokrin tümörlerin bir kategoride gruplandırılması ve nadir görülen bazı özel tümörlerin tanımlanması ve sınıflandırılması vb. düzenlemeleri içermektedir (Travis vd., 2015). Akciğer adenokarsinomu ile ilgili patolojik sınıflama ise uluslararası platformda göğüs hastalıkları uzmanları, onkologlar, patologlar, radyologlar, moleküler biyologlar ve göğüs cerrahlarından oluşan bir panel tarafından daha önce 2011 yılında yapılmıştı (Travis, vd. 2011).

2. 1. 6. Evreleme

Evreleme tedavi seçimi ve prognoz üzerindeki etkisi nedeniyle akciğer kanserli bir hastanın yönetiminde önemli bir basamaktır. Ayrıca hekimler ve araştırmacılar arasında ortak bir dil kullanılmasını da sağlar. Akciğer kanserinde ilk olarak 1946'da Deniox tarafından geliştirilen ve *the Union for International Cancer Control* ve *the American*

Joint Committee on Cancer tarafından benimsenen TNM sınıflandırması kullanılmaktadır. Bu evreleme sistemi hastalığın anatomik yayılımı bazında olup ‘T’ primer tümörün boyutu ve/veya yayımını; ‘N’ bölgesel lenf nodlarının tutulumunu ve ‘M’ uzak metastazı tanımlar. Akciğer kanseri evrelemesi genel olarak iki şekilde yapılabilir: klinik ve patolojik evreleme (Goldstraw, 2009). Klinik evreleme tedavi öncesi elde edilen verilere dayanır. Patolojik evreleme ise tedaviden önce elde edilen verilerle birlikte ameliyat sonrası yapılan histopatolojik değerlendirmeye dayanır. Patolojik evreleme sağ kalımla daha uyumludur ancak akciğer kanserli hastaların çoğu ileri evrede tanı aldığından patolojik evreleme sınırlı sayıda hastada yapılabilmektedir.

Akciğer kanserinin evrelemesi geniş bir veri tabanı kullanılarak yeniden düzenlenmiş olup 2017 yılından bu yana 8. versiyonu kullanılmaktadır (Goldstraw vd., 2016). Bir sonraki düzenleme için veri toplanmaya devam edilmektedir.

Hastaların büyük bir çoğunluğu, yaklaşık yarısı ileri evrede tanı almaktadır. Bakanlık verilerine göre hastaların yaklaşık %55’i metastatik hastalığa sahiptir. Kliniğimizde takip edilen hastalarda ise tanı anında metastatik hasta oranı %45-50 civarındadır (Ak, Metintas S, Yilmaz, Bogar & Metintas M, 2017).

2. 1. 7. Tedavi

Akciğer kanserinin tedavisi histopatolojik alt tip, evre ve hastanın performans durumu, ko-morbiditeleri, kardiyak ve pulmoner rezervine göre planlanmaktadır. Bu tedavi uygulamaları cerrahi, kemoterapi, radyoterapi, hedefe yönelik tedaviler, immünoterapi veya kombine yaklaşımları içermektedir. Hastaların yaklaşık üçte ikisi tanı anında lokal ileri – ileri evre hastalığa sahip olduğu için cerrahi tedavi şansına sahip değildir. Bu nedenle hastaların önemli bir kısmı aslında palyatif olarak tedavi edilmektedir. Moleküler ve immünoterapi alanındaki gelişmeler akciğer kanseri tedavisinin yönünü değiştirmiştir. Ancak hedefe yönelik tedaviler ile immünoterapiler belirli hasta gruplarında etki göstermektedir. Bu nedenle daha geniş hasta gruplarında etkili olabilecek yeni tedavi arayışları devam etmektedir.

2. 1. 8. Prognoz

Maalesef tüm çabalara rağmen akciğer kanserinin sağ kalımı kötüdür. Sağ kalımı iyileştirmeye yönelik çabalar hem tütün kontrolü hem de tedavi açısından hız kesmeden devam etmektedir. Ancak daha önce de değinildiği gibi mortalitedeki azalma daha çok tütün kontrolü ve buna bağlı insidanstaki azalma ile ilişkilendirilmektedir (Jeon vd., 2018;

Siegel vd., 2020). Tütün kontrolüne yönelik çalışmaların yanında, son yıllarda hedefe yönelik tedaviler ve immünoterapi sağ kalımın iyileştirilmesi adına ümit vadetmektedir.

Bugüne değin başlıca tümör, hasta ve çevre ile ilişkili olmak üzere yüzlerce prognostik faktör rapor edilmiştir. Akciğer kanserinin son derece heterojen klinik özelliklerinden dolayı prognostik alt grupların oluşturulması kaçınılmazdır. Şüphesiz en önemli ayırım KHDAK ve KHAK olmak üzere tümör histolojisi bazındadır.

Prognostik ayırakta bir diğer önemli faktör hastalığın yaygınlığı, yani evresidir. Klinik evreleme dikkate alındığında 5 yıllık sağ kalım oranları evre IA1'de %92, IA2'de %83, IA3'te %77, IB'de %68, IIA'da %60, IIB'de %53, IIIA'da %36, IIIB'de %26, IIIC'de %13, IVA'da %10 ve IVB'de %0'dır (Goldstraw vd., 2016).

2. 2. Endoplazmik Retikulum Stresi

2. 2. 1. Endoplazmik retikulum yapı ve fonksiyonları

ER bakteriler ile memelilerin eritrosit ve trombositleri hariç tüm canlı hücrelerde sitoplazma içinde uzanan kesecik ve kanalcıklar halindeki zarla kuşatılmış organellerdir. Ökaryotik hücrelerdeki membranla sınırlı en büyük hücre içi kompartmandır. Plazma zarının 30 katına kadar yüzey alanına sahip olan ER, hücredeki toplam zar miktarının yarısından fazlasını oluşturur. Kesecik ve kanalcıklar birbiriyle bağlantılı olup dış nüklear zar ile devam ederler. Bölmeler de iç ve dış nüklear zar arasındaki boşluk ile devam eder (Goyal & Blackstone, 2013; Chen, Novick & Ferro-Novick, 2013). Böylece ER ve nüklear zar ER lümeni veya ER sisternal boşluğu denen, toplam hücre volümünün %10'undan fazlasını oluşturan tek bir internal boşluk oluştururlar (Tablo 2.1) (Alberts vd., 2015).

ER, protein sentezi ve işleme, lipid sentezi, çekirdeğin bölümlere ayrılması, kalsiyum (Ca²⁺) depolama ve salımı, bileşiklerin detoksifikasyonu ve lipid transferi ve diğer organellere sinyal verme dahil olmak üzere birçok temel hücresel işlevi gerçekleştirir (Phillips & Voeltz, 2016). Ayrıca Golgi aygıtının, peroksizomların ve lipid damlacıklarının biyogenezinde rol oynar ve mitokondrinin bölünmesine yardımcı olur. Tüm hücresel proteinlerin yaklaşık üçte biri ER'nin lümenine aktarılır veya ER zarlarına entegre edilir. ER, bu proteinlerin bir kısmını kendi işlevleri için tutar, bazıları bozulur ve bazıları da hücre içindeki diğer bölmeleri hedeflemek için salgı yolağına aktarılır.

Tablo 2.1. İki farklı ökaryotik hücre zarının rölatif miktarları.

Zar tipi	Toplam hücre zarı yüzdesi	
	Karaciğer hepatosit	Pankreatik ekzokrin hücre
Plazma zarı	2	5
Granüllü ER zarı	35	60
Granülsüz ER zarı	16	<1
Golgi cisimciği zarı	7	10
Mitokondri		
Dış zar	7	4
İç zar	32	17
Çekirdek		
İç zar	0.2	0.7
Salgı vezikülü zarı	Belirlenmemiş	3
Lizozom zarı	0.4	Belirlenmemiş
Peroksizom zarı	0.4	Belirlenmemiş
Endozom zarı	0.4	Belirlenmemiş

(Alberts vd., 2015).

Granüllü ER protein sentezi, katlanması ve parçalanması için özelleşmiş alanlar olup sitoplazmik yüzeyi ribozomlarla süslenmiştir. Hücrelerin protein sentezinin önemli bir kısmı burada gerçekleşir. Ribozomlardan yoksun granülsüz-düzgün yüzeyli ER, ilaç metabolizması (hepatositler), steroid sentezi (endokrin hücreler) veya kalsiyum alımı ve salınmasında rol alan enzim yollarına ayrılmıştır. Hem içeren zar proteinlerinin sitokrom P450 ailesi, granülsüz ER'de bulunur. Bu enzimler, endojen steroidleri, kanserojen bileşikler, yağda çözünen ilaçları ve çevresel ksenobiyotikleri detoksifiye etmek için bir elektron transfer işlemi kullanır. ER'nin lümeni, ER'den hücrenin dışına gönderilen proteinleri stabilize etmeye yardımcı olan disülfür bağı oluşumunu destekleyen oksitleyici bir ortamdır (Chen vd., 2013).

Hücrelerin işlevlerine göre granüllü ya da granülsüz ER oranı değişebilmektedir. Proteinlerin üretimi, depolanması ve düzenlenmiş salgılanmasının sağlandığı hücreler granüllü ER açısından zengindir. Bunun tersine, granülsüz ER, kasılmayı kontrol etmek için Ca^{2+} 'yı saklama ve salma gereksinimleri nedeniyle steroid hormonlarını sentezleyen endokrin hücrelerde ve kas hücrelerinde bol miktarda bulunur.

2. 2. 2. Endoplazmik retikulumda protein katlanması ve oligomerizasyon

Salgı proteinleri ve ER, Golgi cisimciği, lizozom, endozom ve plazma zarı için belirlenen proteinlerin neredeyse tamamı önce sitozolden ER'ye girer. ER lümeninde katlanırlar ve oligomerize olurlar, disülfid bağları oluşur ve N-bağlı oligosakkaritler bağlanır (Dobson, 2003; Pearl & Prodromou, 2006).

Yeni oluşan polipeptitler, Sec61 translokon aracılığıyla ER çift katmanı boyunca yer değiştirdikten sonra, ER lümenine çıkarlar ve çok sayıda proteinle etkileşime girerler. Bu proteinler sinyal dizisini çıkarır, oligosakkaritleri ekler ve disülfür bağı oluşumunu ve oligomerizasyonu katalize ederek doğrudan katlama yapar. Böyle bir faktör olan Hsp70 şaperon BiP, protein iç kısmında normalde sekestre olan hidrofobik bölgelerle etkileşime girerek katlanmamış polipeptitleri bağlar. Bu etkileşimler, yeni sentezlenen proteinlerin toplanmasını önler ve katlanmalarını teşvik eder. BiP bağlanma döngüleri de polipeptidin ER lümenine hareketini saptırır, ancak geri döndürmez. Oligosakaril transferaz adı verilen başka bir enzim, uygun bir sekans bağlamında bir asparagin tespit edildiğinde büyüme zincirine çekirdek şekerleri ekler. Dördüncü bir enzim olan protein disülfid izomeraz (PDI), disülfid bağlarının oluşumuna izin veren sisteinler üzerindeki sülfhidril grupları arasındaki disülfid değişimini katalize eder. Disülfür bağları oluşturmak için oksitleyici eşdeğerler, flavin adenin dinükleotidden, PDI'nın aktif bölgesinde bir çift sisteini oksitleyen bir ER zar proteininin iki çift sisteininden akar. PDI daha sonra, doğru disülfidler oluşana kadar polipeptit substratları ile karışık disülfidleri oluşturup kırarak disülfid bağlarının doğru oluşumuna aracılık eder. Katlama ve birleştirme faktörleri, ER'deki yaşam süreleri boyunca proteinlerle etkileşime girer (Braakman & Bulleid, 2011).

ER ile bağlantılı olarak sentezlenen çoğu protein, kovalent olarak eklenmiş karbonhidratlara sahip glikoproteinlerdir. Proteinin ER'ye translokasyonu sırasında asparajin kalıntılarına bir sınıf oligosakarit eklenir. Bu asparajin veya N-bağlı oligosakaritler, polipeptitten 3 nm uzanabilen esnek hidratlanmış dallar oluşturur. Bu polar oligosakkaritler, proteinleri daha hidrofilik hale getirir ve kümelenme olasılığını azaltır. Topaklaşmadan kaçınarak, proteinin doğru katlanma olasılığı daha yüksektir. Doğru bir şekilde katlandıktan sonra, protein ER'den ayrılabilir ve şekerlerin daha fazla modifiye edilebileceği sekretuar yol boyunca hareket edebilir. Salgılanan proteinlerde bulunan oligosakkaritlerin çeşitliliği, hücre dışındaki işlevleri için de çok önemlidir.

Önceden oluşturulmuş oligosakaritler, asparajin kalıntılarına eklenir. Bu öncüller 14 şekerden (üç glukoz, dokuz mannoz ve iki N-asetil glukozamin) oluşur. ER zarına dolikol fosfat ile bağlanırken aşamalı bir şekilde sentezlenirler. Oligosakarit öncüsünün bir araya getirilmesi yedisi ER'nin sitoplazmik yüzünde yedisi de lümeninde olmak üzere 14 ayrı transfer reaksiyonunu içerir. Bu sürecin ortalarında, glikolipid sitoplazmanın karşısından ER'nin lümenine doğru döner. ER lümenine döndüğünde, oligosakariltransferaz enzimi, tam oligosakaridi dolikolden, yeni oluşan polipeptid üzerindeki asparajin yan zincirlerine aktarır. Bu dizi, translokondan ER lümenine 12 ila 14 kalınlık bir mesafe ortaya çıktıktan sonra tanınır.

Çekirdek oligosakarit eklendikten sonra glikoprotein, tamamen katlanmış durumuna ulaşmasına yardımcı olan bir modifikasyon döngüsü başlatır. Bu kalneksin döngüsü, glukosidazlar I ve II, çekirdek glikanın ilk iki glukoz kalıntısını çıkardığında başlar. Elde edilen monoglukozile transmembran veya çözünür proteinler, ER lümeninde bir tip I transmembran protein olan kalneksin'e bağlanır. Monoglukosilatlı çözünür proteinler ayrıca kalneksin benzeri ER lümeninde çözünür bir protein olan kalretiküline bağlanır. Her ikisi de baklagillerden şeker bağlayıcı lektin proteinleri ile ilişkili monomerik, kalsiyum bağlayıcı proteinlerdir. Kalneksin veya kalretiküline bağlanma, glikoproteinlerin toplanmasını önler ve bunları, PDI ile yakından ilişkili bir tiyol-disülfid oksidoredüktaz olan ERp57'ye glikoproteine maruz bırakır. Kalneksin ve kalretiküline bağlı ERp57, protein katlanması sırasında molekül içi disülfür bağı değişimini katalize eder.

Glukosidaz II, çekirdek glikan üzerinde kalan glukoz kalıntısını çıkardığında, glikoprotein kalneksin / ERp57'den salınır. Glikoprotein, çözünür bir enzim olan üridin difosfat (UDP) -Glc: glikoprotein glukosiltransferaz tarafından tanınmadığı sürece artık ER'yi terk etmekte serbesttir. Glukosiltransferaz, eksik katlanmış glikoproteinleri reglukosilatlar, bu nedenle döngüde katlama sensörü olarak işlev görür. Glukosiltransferaz ile reglukosile edildiğinde glikoprotein, kalneksin veya kalretiküline başka bir bağlanma döngüsünden geçer. Glikoprotein, uygun şekilde katlanana ve oligomerize olana kadar döngüde kalır ve bu noktada salgı yoluna girer. Protein düzgün bir şekilde katlanamaz veya oligomerize olmazsa, ER'den ayrıştırıldığı sitoplazmaya yer değiştirerek döngüden çıkarılır. Döngüye katılım, örneğin glukosidazların hareketini bloke ederek engellenirse, katlama verimliliği düşer. Bu durumda glikoprotein, proteinin

doğru bir şekilde katlanmasına yardımcı olmak için kalneksin döngüsü ile iş birliği yapan BiP ile birleşebilir.

ER'ye transfer edilen birçok polipeptit, ER'den ayrılmadan önce bir araya gelen multiprotein komplekslerinin alt birimleridir. Her polipeptit ayrı bir ribozom üzerinde sentezlendiğinden ve bir kompleksi oluşturan zincirlerin sentezi dengesiz olabileceğinden, BiP ve diğer şaperonların, hidrofobik yüzeyleri koruması ve dışa aktarılmadan önce alt birim etkileşimlerini sağlaması gerekir. Örneğın şaperonlar, antijenik peptitlerin ER'deki ana histo-uyumluluk kompleksi tip I proteinlerine yüklenmesinde kritik bir rol oynar. Bu şaperonlar, aynı zamanda, hücre yüzeyi reseptörlerini ve salgılanan proteinleri, yine ER'ye alınan ve onları erken aktive edebilen potansiyel ligandlara bağlanmaktan korur.

2. 2. 3. Endoplazmik retikulumda protein yıkımı, endoplazmik retikulum stresi ve katlanmamış protein cevabı

ER'nin mükemmel işleyen protein katlama işlevine rağmen, ER'ye yer değiştiren tüm polipeptitlerin üçte biri doğru şekilde katlanamamaktadır. Yanlış katlanmış polipeptitler, oligomerik grupların fazla alt birimleri veya yanlış bir şekilde birleştirilmiş oligomerler kalite kontrol sistemleri tarafından hedeflenirler ve ER'den atılmak yerine bozunur. ER ile ilişkili bozunma (ERAD) olarak adlandırılan bozunma süreci, ER'de kurtarılamayan, yanlış katlanmış proteinlerin birikmesini önler (Romisch, 2005; Hampton & Sommer, 2012). Yanlış katlanmış glikoproteinler tanınır, sitoplazmaya dönük ER zarı boyunca yeniden yerleştirilir, ubiquitile edilir ve ardından sitoplazmada proteazom tarafından bozunur (Schubert vd., 2000).

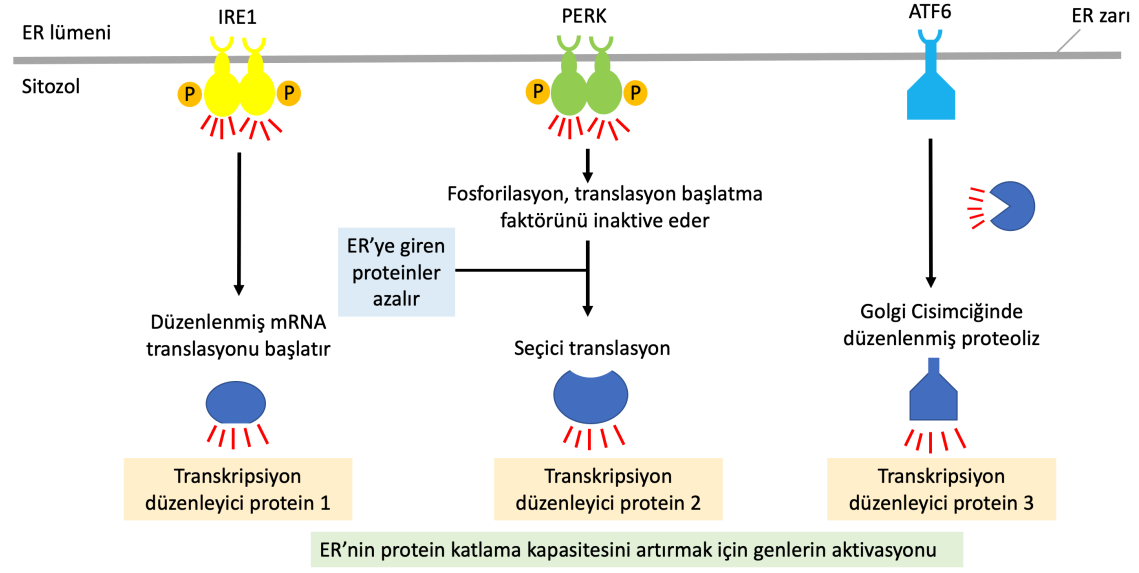
ERAD mekanizması, yanlış katlanmış veya birleştirilmemiş glikoprotein alt birimlerini gerçek katlama ara maddelerinden ayırır. ER'deki mannosidazların konsantrasyonu düşüktür, bu nedenle çekirdek oligosakaridin terminal mannozlarının, hemen katlanırlarsa yeni sentezlenmiş proteinlerden kesilmesi olası değildir. Öte yandan, katlanma uzatılırsa, çekirdek oligosakaritten uç glukoz ve mannoz kalıntıları kaybolur ve bu onları, "ER bozunmasını artıran α -mannozidaz benzeri protein" (EDEM) adı verilen zara bağlı bir ER proteini için bir substrat yapar. EDEM, glikoproteini sitoplazmaya çıkarılmak üzere retrotranslokasyon kanalına yönlendirir. Sec61, retrotranslokon için bir adaydır, ancak bu yolun doğası ve mekanizması hala araştırılmaktadır. Sitoplazmadaki Bag6 kompleksi, proteazomlar tarafından ubiquitine olana ve bozunana kadar bu proteinlerin toplanmasını önler. Bazen sinyal dizili proteinler ER'ye yer değiştiremez ve

sitoplazmaya yanlış yerleştirilir. Bu, sinyal dizisinde mutasyonlar, belirli stresler veya translokasyonlarının uygun olmaması söz konusuysa gerçekleşebilir (Schubert vd., 2000; Hedge & Ploegh, 2010).

Proteom ve homeostaz kelimelerinin birleştirilmesiyle oluşturulan proteostasis, hücredeki polipeptitlerin biyogenez, katlanma, taşınma ve bozunmasının koordineli kontrolü ile sürdürülen genel bir protein sağlığı durumudur. Proteinleri düzgün bir şekilde katlama veya kalite kontrolünde başarısız olanları atma kapasitesi aşılsa, ER lümeni yanlış katlanmış proteinleri biriktirmeye başlayacaktır. Birçok fizyolojik veya patolojik durumlarda, ör. besin eksikliği, hipoksi, Ca^{+2} kaybı, glikozilasyon ve disülfid bağının oluşmasındaki bozukluklar, oksidatif stres, viral ve bakteriyel enfeksiyonlar, ER lümeninde katlanmamış veya yanlış katlanmış protein miktarı artar ve ER dengesi bozulur. Bu durumda ortaya çıkan ve hücrenin işlevini ve hayatta kalmasını tehdit eden hücresel cevap ER stresi olarak adlandırılır (Luo & Lee, 2013; Ron & Walter, 2007). ER stresi, protein yükü ER'nin proteinleri katlama ve parçalama kapasitesini aştığında oluşur ve ER içerisinde katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinlerin birikmesi ile kendini gösterir. ER stresi oluşuktan sonra hücrede dengeyi tekrar sağlamak ve bu durumdan en az zararla kurtulmak için UPR denilen ve bazı hücre içi sinyal yollarının aktivasyonunu sağlayan süreç aktif hale gelir (Ron & Walter, 2007; Hetz, 2012). UPR ile öncelikle hücrenin hayatta kalması sağlanmaya çalışılır. UPR evrimsel olarak korunmuş bir kalite kontrol mekanizmasıdır (Rozpedek vd., 2016). Bu mekanizma ile, protein translasyonunun geçici olarak durdurulması, proteinlerin katlanma kapasitesini artıran ER moleküler şaperonları ve enzimlerinin indüklenmesi, yanlış katlanmış proteinleri atma veya parçalama işlemini başlatmak için sinyal molekülleri kaskadının aktive edilip ER dengesinin eski haline getirilmesi sağlanmaya çalışılır (Walter & Ron, 2011; Brodsky & Skach, 2011). Tüm bunları sağlayamayan ve dengeye yeniden ulaşamayan bir hücre apoptoza gider. (Alberts vd., 2015; Güneş, 2013; Walter & Ron, 2011; Hetz & Papa, 2018; Chevet, Hetz & Samali, 2015). Mayada UPR, lipid sentezi, protein translokasyonu, protein katlanması, glikozilasyon ve degradasyonun yanı sıra Golgi aparatına aktarma ve geri alma dahil ER fonksiyonunun tüm yönleriyle ilgili 300'den fazla geni etkinleştirir.

UPR, memelilerde ER'deki stresi algılayan ve buna yanıt veren üç tane tek geçişli transmembran ER proteini ile başlatılır: *Activating transcription factor 6* (ATF6); *inositol-requiring enzyme 1 α* (IRE1); ve *protein kinase R-like ER kinase* (PERK) (Hetz, 2012; Kaufman, 1999). Bu proteinlerin her biri farklı bir mekanizmaya sahiptir, her biri ER işlevi için gerekli proteinlerin üretimini düzenleyen sinyal yollarını başlatır (Şekil

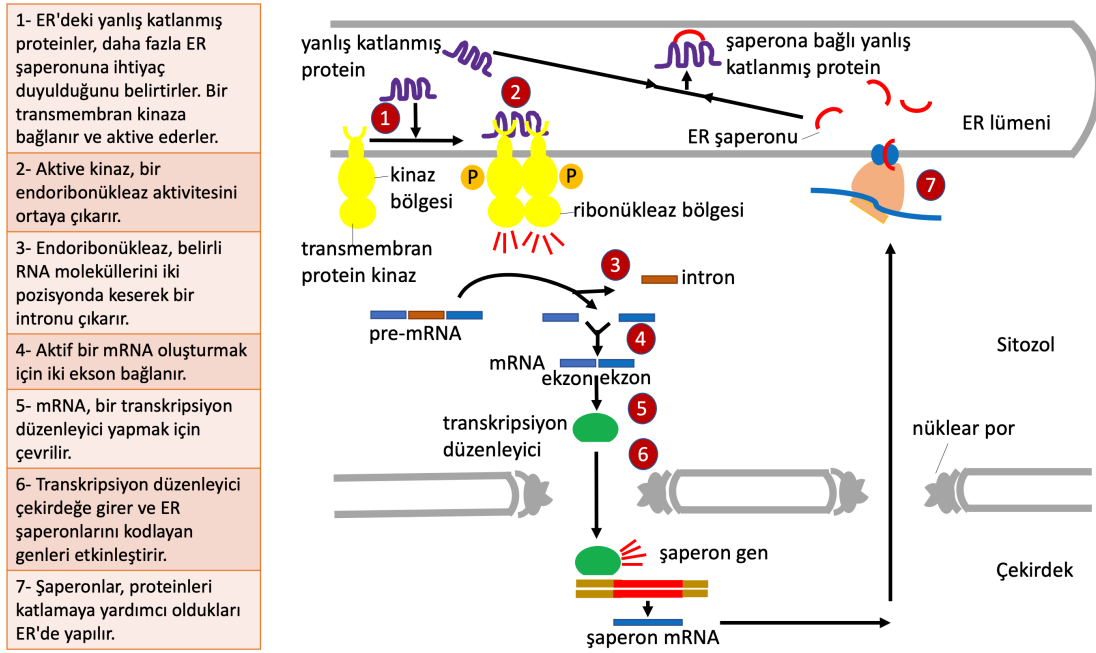
2.1). Bu, hücrelerin, talebe bağlı olarak protein katlanmasını teşvik etmek için ER'nin kapasitesini ayarlamasına izin verir.



Şekil 2.1. Endoplazmik retikülüm stresi ve katlanmamış protein cevabı. (Alberts vd., 2015'den yararlanılarak çizilmiştir.).

Bu proteinler yanlış katlanmış proteinleri tespit edebilen bir ER lümenal alana sahiptirler. ER, normal koşullar altında çalışırken, IRE1a, PERK ve ATF6'nın lümenal alanları şaperonların bağlanmasıyla monomerik ve inaktif halde tutulur. Yani, normal koşullar altında ER lümenindeki BiP konsantrasyonu, katlanmamış proteinlerin konsantrasyonunu aşar, bu nedenle üç ER transmembran proteininin, ATF6, IRE1 ve PERK lümen alanlarına bağlanmak için serbest BiP mevcuttur. BiP ile bu etkileşimler ER'de ATF6'yı tutar ve IRE1 ve PERK'in dimerizasyonunu engelleyerek onları inaktif tutar.

ER'nin lümenindeki katlanmamış proteinler BiP'in tümüne bağlanırsa, IRE1 dimerleşmekte serbesttir. Bu, IRE1'in sitoplazmik alanının endoribonükleaz aktivitesini etkinleştirerek, *X-box binding protein 1* (XBP1) için haberci RNA'dan (mRNA) küçük bir intronu, bir bZIP (temel lösin fermuar) alanı içeren transkripsiyon faktörü çıkarmasına izin verir. Bu intronun çıkarılması, XBP1'in translasyonel okuma çerçevesini değiştirir ve mRNA'nın ER proteinleri için genlerin güçlü bir transkripsiyonel aktivatörünü kodlamasına izin verir (Şekil 2.2).



Şekil 2. 2. Endoplazmik retikülüm stresi ve katlanmamış protein cevabının birinci yolak üzerinden şematizasyonu. (Alberts vd., 2015'den yararlanılarak çizilmiştir.).

Benzer şekilde, ER lümeninde serbest BiP olmadan PERK, ökaryotik translasyon başlatma faktörü 2'yi (*eukaryotic translation initiation factor 2-EIF2*) dimerize eder ve fosforile eder. Bu, AUG kodon tanıma sıklığını azaltır ve birçok mRNA'da translasyon başlatma hızını yavaşlatır.

Bununla birlikte, hücre hayatta kalmasına ve ER işlevlerine katılan birçok protein için mRNA'lar tercihen bu koşullar altında çevrilir. Birikmiş katlanmamış proteinler BiP'yi ATF6'dan salgılar ve ER transmembran proteininin Golgi aygıtına taşınmasına neden olur. Burada S1P ve S2P proteazları tarafından bölünür ve sitoplazmaya çözünür fragman salar. Fragman, XBP1 dahil olmak üzere hedef genlerin transkripsiyonunu etkinleştirdiği yer olan çekirdeğe hareket eder.

Kısacası UPR'nin ilk hedefi, protein katlama talebini azaltıp, kapasiteyi artırarak ER dengesini eski haline getirmek ve hücrenin işlevselliğini korumaktır. Bununla birlikte, bu düzeltici önlemler dengeyi eski haline getirmek için yetersiz kalırsa, hücre yıkımı gerçekleşir ve bu durum sonlandırıcı UPR olarak adlandırılır (Shore, Papa & Oakes, 2011).

2. 2. 4. Isı şoku proteinleri

Bazı proteinler kendi olgun yapılarındaki düzenlenmelerini kendiliklerinden sağlayabilirler. Kendi kendine birleşme kapasitesine sahip bu proteinler başlangıçta

sentezlendiği halden aktif hale geçebilmek için kıvrılırlar ancak bu kapasiteye sahip olmayanlar belli yapıda kalırlar ve son aktif hallerine ulaşamazlar. Böylelikle yanlış şekilde kıvrılmış olurlar. Yanlış şekilde kıvrılmış bu proteinlerin uygun şekil almasını sağlayan yardımcı proteinlere şaperon denir. Proteinler sentezlendikten sonra ribozomdan ayrılıp sitozole geçerken kıvrılmamıştır. Süreçte proteinlerin sentezlenmiş kısımları birbirleriyle temasa geçerek kıvrılmaya başlarlar. Şaperonlar bu proteinlerin rastgele değil doğru şekilde kıvrılmalarını sağlar (Güneş, 2013).

Isı şoku proteinleri (*heat shock protein*–HSP), hücrenin hayatta kalabilmesi ve büyümesi için gerekli hücre proteinleri için moleküler koruyucular (şaperon) olarak çalışan, ayrıca sayısız hücre koruyucu rolü olan, evrimsel olarak iyi korunmuş bir protein ailesidir (Alberts vd., 2015; Güneş, 2013; Lindquist & Craig, 1988).

Bu grup proteinler ilk önce ısıdaki ani yükselişin ardından ifadesi artan bir dizi protein olarak tanımlanmışlardır. Hipoksi, iskemi, anoksi, UV ışınlarına ve kimyasallara maruz kalma (anti-kanser kemoterapi dahil), nikotin, cerrahi stres, beslenme yetersizlikleri (glukoz yoksunluğu), duygusal ve mekanik stres, mekanik yaralanmalar, viral ajanlar veya toksik radikallere ve kanserojenlere maruz kalma gibi çeşitli metabolik ve çevresel hareketlerin ardından da bu proteinlerin seviyesinin yükseldiği ortaya konulmuştur. Bu proteinler, moleküler ağırlıklarına göre 6 alt kategoriye ayrılırlar; küçük HSP'ler (15–30 kDa), HSP40, HSP60, HSP70, HSP90 ve büyük HSP100 (Tan, Ong & Rhodes, 2016). Yüksek molekül ağırlıklı HSP'ler ATP'ye bağımlı bir şekilde işlev gösterirken, daha küçük olanları ATP'den bağımsızdır.

HSP'nin moleküler şaperon rolü onları hücrenin hayatta kalmasının önemli bir parçası haline getirir. İn vivo protein sentezi büyük ölçüde moleküler şaperonlar tarafından desteklenir. Şaperonlar bunu başlangıçta polipeptidlerin doğru şekilde katlanmasını kolaylaştırarak, spesifik olmayan etkileşimler sonucunda proteinlerin toplanmasını önleyerek ve proteinlerin translokasyonunu hücre içinde doğru lokalizasyona yönlendirerek yaparlar. Stres koşulları sırasında, bir protein hasar görürse, moleküler şaperonlar onların tekrar katlanmalarını kolaylaştırarak veya onarılamayacak şekilde hasar görmüş olan proteinleri parçalayarak dengeyi sağlayabilir (Young, Agashe, Siegers & Hartl, 2004).

Isı şoku proteinleri sürekli olarak ifade edilir veya stres koşulları altında artar ve hücre içinde farklı bölmelerde bulunurlar. HSP90 hücrelerde her zaman bol miktarda ifade edilirken, HSP70 ifadesi normal koşullar altında çok düşük seviyelerde olup,

antikanser ilaçlar ve oksidatif stres gibi stresler tarafından indüklenir (Schmitt, Gehrman, Brunet, Multhoff & Garrido, 2007). Hücrelerin çeşitli stres koşullarına maruz kalması, protein metabolizmasında dengesizliğe neden olur. Bu fenomen, hücrelerin dengesi üzerindeki stresin zararlı etkisine hızlı ve kesin olarak cevap verme yeteneği üzerinde bir tehdit oluşturmaktadır. Bu sorunun üstesinden gelmek için ısı şoku proteinleri üretilir. HSP ifadesinin koordine edilmiş aktivasyonu, ısı şoku tepkisi olarak bilinir. Stres koşullarına tepki olarak ısı şok proteinlerinin indüklenebilir ifadesi, öldürücü moleküler hasara neden olacak şiddetli stresten hücreleri korumada çok önemlidir. Birçok araştırma moleküler şaperonların kanser fenotiplerini korumadaki rolünü desteklemektedir. HSP'nin aşırı ifade edilmesi, kanser hücrelerinin hayatta kalabilmesi için temel bir gerekliliktir.

2. 2. 5. *GRP78 / GRP94*

HSP'ler arasında en yaygın olarak incelenenlerin bazıları HSP90 ve HSP70 aileleridir. Bu iki ailenin önemli üyeleri; Isı şoku proteinleri 70 ve ısı şoku proteinleri 90 (HSP70 / 90), glukozla düzenlenmiş proteinlerdir. Sitoplazmada bulunan diğer HSP'lerin aksine GRP'ler çoğunlukla ER'de bulunur (Tan vd., 2016). GRP'ler diğer HSP'lerden farklı olarak hipertermi ve oksidatif strese kolayca cevap veremezler, ancak azaltma koşullarına (ör., anoksi) ve ER'nin normal işlevini kesintiye uğratan koşullara karşı cevap verirler. Hücre stresi genellikle yanlış katlanmış proteinlerin birikimi ile sonuçlandığı için, GRP ifadesi katlanmamış protein cevabı için bir belirteç olarak kullanılmıştır. GRP'ler, moleküler şaperonlar olarak işlev görür ve proteinlerin katlanmasını ve montajını kolaylaştırır ve ayrıca yanlış katlanmış proteinleri yıkıma yönlendirir. GRP'ler ayrıca Ca^{+2} bağlama kabiliyetleri nedeniyle ER ve mitokondrinin fizyolojik ve patolojik koşullar altında bütünlüğünü ve homeostazını korumada önemli bir rol oynamaktadırlar. En geniş araştırılmış GRP'lerden ikisi, HSP70 ailesinden GRP78 ve HSP90 ailesinden GRP94'tür. GRP'lerin başlangıçta sadece ER'de bulunduğu düşünülürken, yakın geçmişte, bunların diğer hücrel bölgelere nakil edilebileceği ve salgılanabileceği gösterilmiştir. Moleküler koruyucu rollerine ek olarak, çoğalma, invazyon, apoptoz, inflamasyon ve bağışıklığı kontrol eden diğer işlevlere de sahiptirler.

GRP78 (*HSP Family A (Hsp70) Member 5-HSPA5*) 78 kDa ağırlığında majör bir ER şaperonudur (Shiu, Pouyssegur & Pastan, 1977). GRP78 bir ER lümen şaperonudur ve asıl görevi ER proteinlerini katlamak ve işleme tabi tutmak, ER Ca^{+2} bağlamak ve ER dengesini devam ettirmektir (Wang, Wey, Zhang, Ye & Lee, 2009; Li & Lee, 2006;

Pfaffenbach & Lee, 2011). GRP78 korunmuş bir ATPaz alanı ve katlanmamış bölgedeki hidrofobik kalıntılarla proteinlerin bağlanmasını sağlayan bir peptid bağlayıcı alana sahiptir. Katlanmamış protein substratlarının işlenmesi, GRP78 ile birlikte GRP94 ve diğer proteinlerden oluşan büyük bir çoklu protein kompleksi içinde gerçekleşir.

GRP78 ayrıca yaygın olarak BiP, immünoglobülin ağır zincir bağlama proteini, olarak da adlandırılır. BiP'nin başlangıçta pre-B hücrelerinin immünoglobülin ağır zincirlerine bağlandığı bulunmuştur. Isı şoku protein ailesi (HSP70) ile ilgili proteinlerin analizi ve BiP'ye karşı bir antikor kullanılması yoluyla, BiP'nin daha önce bildirilen GRP78 ile özdeş olduğu keşfedilmiştir. Ayrıca, BiP'nin B hücreleri ile sınırlı olmadığı da saptanmıştır.

Daha önce belirtildiği üzere GRP78 birçok işleve sahiptir, ancak en iyi tanımlanmış rolü protein biyosentezidir. Bir şaperon proteini olarak GRP78, yeni sentezlenmiş peptidlerin montaj, katlama ve taşınmaları konularında önemli rol oynamaktadır. GRP78 öncelikli olarak ER'de bulunmakla birlikte, hücre yüzeyi, sitozol, mitokondri ve nükleus gibi ER dışındaki kompartmanlarda da yerleşebilir ve salgılanabilir. Buralarda yeni moleküller ile birleşip hücre büyüme ve sinyal iletiminde yeni etkiler gösterebilir.

GRP78 hücre proliferasyonu için önemli bir moleküldür. Bunun nedeni büyüme faktör salgılanması ve/veya büyüme faktörü reseptörünün olgunlaşması GRP78'in ER şaperon fonksiyonuna bağlı olabilir. Bir diğer bulgu, ER stresi hücre yüzeyine GRP78'in yerleşmesini artırır, kanser hücreleri gibi belirli hücre tipleri multifonksiyonel reseptör olarak görev yapan hücre yüzey GRP78'i ifade ederler (Podack & Racz, 2007). Hücre yüzey GRP78'inin bir fonksiyonu *phosphoinositide-3-kinase-protein kinase B/Akt* (PI3K/AKT) sinyalini artırarak çoğalmayı ve sağ kalımı artırmaktır.

GRP78 UPR'de görev alan ve hücre büyümesi, farklılaşma, apoptoz ve sinyal iletimini düzenleyen, ATF6, PERK ve IR1alfa olarak bilinen 3 önemli enzime bağlıdır ve UPR'nin ana düzenleyicisi rolündedir. Normal koşullarda, yani stres söz konusu değilken GRP78 bu yolları inaktif halde tutar (Luo & Lee, 2013). ER stresi durumunda GRP78 seviyesi yanlış katlanmış proteinlerin toplanması ve GRP78'e bağlanması sonucu gittikçe azalır, bu enzimler salınır ve aktif hale geçerler. Daha önce bahsedildiği gibi, başlangıçta bu durum şaperonların transkripsiyonu artırılarak, translasyon azaltılarak, protein katlanması ve ERAD artırılarak düzeltilmeye çalışılır. Ancak beklenen durum gerçekleşmediğinde otofaji ve bazı durumlarda apoptoz gerçekleşir. Diğer taraftan stres

koşullarında GRP78 ER'den sitoplazmaya geçer ve zar temaslı hale gelir, hücre yüzeyli GRP78 adını alır. UPR sinyalleri ER zarından sitozol ve nükleusa iletilir.

GRP78 sentezi ER fonksiyonunu ve dengesini bozan çeşitli çevresel ve fizyolojik stres koşulları tarafından uyarılabilir. Kısmi bir GRP78 ifadesi normal organ dengesini sürdürebilmek için yeterlidir ancak tümör progresyonu için GRP78'in daha yüksek seviyelerde olması gerekir. GRP78 seviyesi akciğer kanserinin de içinde bulunduğu birçok solid tümörde yüksektir (Wang vd., 2009; Lee, 2007; Uramoto vd., 2005; Wang vd., 2005; Zheng vd., 2008; Dong vd., 2008; Langer, Feith, Siewert, Wester & Hoefler, 2008; Gonzalez-Gronow, Selim, Papalas & Pizzo, 2009). Ayrıca tümörün agresifliği ve nüksü ile de ilişkilidir (Luo & Lee, 2013; Rozpedek vd., 2016). GRP78 solid tümörlerde kanser hücrelerini hipoksi ve beslenme yetersizliğine karşı korur. GRP78'in ana fonksiyonlarından biri stresin indüklediği apoptoza karşı koruma yapmasıdır. GRP78, ER'de lokalize olan pro-apoptotik bileşenlere bağlanır ve onları inaktif hale getirir, ayrıca UPR'nin apoptotik koluna aracılık eden *CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein* (CHOP)'un indüksiyonunu baskılar.

GRP78 kanserin kemoterapiye dirençli olmasında da rol oynamaktadır. Bu ana şaperon proteininin ifadesindeki artış tümör hücrelerinin uyku haline geçmelerine ve ilaçlara karşı dirençli olmalarına neden olmaktadır (Ranganathan, Zhang, Adam & Aguirre-Ghiso, 2006). GRP78'in ilaç direncini nasıl uyardığı tam olarak bilinmemekle birlikte olası iki mekanizma (1) hem UPR pro-survival kolunun hem de Akt / PI3K yolağının reseptör aracılı aktivasyonunun sinerjistik etkisi (2) Akt / PI3K yolağının aktivasyonu, UPR'nin pro-apoptotik etkisine karşı hücrenin hayatta kalmasına neden olur (Roller & Maddalo, 2013; Tan vd., 2016).

Tedavi direncinin gelişmesine katkıda bulunan bir başka durum hipoksidir. Hipoksi, solid tümörlerin gelişimi ve ilerlemesi ile eşzamanlı olarak tümör kütlesinde hakim durumdadır. Tümör hücrelerinin büyüme hızı kan kaynağından daha fazladır ve bu durum glukoz açlığı, hipoksi ve oksidatif stres gibi durumlara neden olur. Bu durum bir dizi iç içe geçmiş sinyal yollarını aktifleştirerek, hücre döngüsünün durması, tümöre ilaç girişinin azalması ve gen transkripsiyon aktivitesinde değişiklik, anjiyojenez ve metastaza katkıda bulunur ve dolayısıyla kanser hücrelerinin kemoterapötik ajanlara karşı direncini arttırır.

Hücre yüzeyinde GRP78'in aşırı ifade edilmesi kanserde tedavi cevabıyla ilişkili bulunduğu göre, hücre yüzeyindeki GRP78'i hedefleyip konsantrasyonunu azaltmaya

yönelik girişimlerde bulunmak apoptozu artırarak, hücre proliferasyonunu ve koloni oluşmasını azaltarak, PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağını aşağı yönde düzenleyerek hem kendi başına hem de kemoradyoterapilerin etkinliğini artırıp tedavi sonuçlarını ve dolayısıyla sağ kalımı iyileştirebilecekleri düşünülebilir. (Xie vd., 2016; Dadey vd., 2017).

GRP94, HSP90B1 geni tarafından kodlanan, 94 kDa moleküler boyutta glukozla düzenlenen bir proteindir. Aynı zamanda gp96, ERp99, HSP90b1 veya endoplazmin olarak da bilinir. ER lümeninde en bol bulunan proteindir. HSP90 protein ailesine özgü alan yapısına sahip olan GRP94, bir N-uç bölgesi, bir asidik bağlanma bölgesi, bir orta bölge ve bir C-uç bölgesi olmak üzere 4 bölge içerir (Rong & Yang, 2018). C-uç bölgesi GRP94'ün dimerizasyonunu sağlarken, N-uç bölgesi tipik ATP bağlayan bölgedir. N-uç bölgesi ayrıca antijenik yapıların bağlanmasına aracılık eder (Argon, Bresson, Marzec & Grimberg, 2020)

GRP94, Toll-like reseptör, Wnt ko-reseptör, integrinleri içeren birçok reseptör ve salgı proteinleri için gerekli bir şaperondur. GRP94 yüklenmiş protein kargosunun oligomerizasyonu için dimer formunda bir platform sağlar. GRP94 salgı ve zar proteinlerinin katlanması ve montajını yönlendiren bir şaperon olmakla birlikte proteinler arasında çok seçicidir. Protein katlama ve işlemenin ötesinde bazı fonksiyonlarla ER için önemli bir role sahiptir. GRP94 adeta bir immün şaperon gibi işlev görmektedir. GRP94, *major histocompatibility complex* (MHC) sınıf I molekül aracılı antijen sunumunu kolaylaştırarak ve makrofajlar, *dendritic cell* (DC)'ler, T hücreleri ve B hücreleri dahil immünitelerde rol alan çeşitli hücrelerin olgunlaşmasını ve aktivasyonunu indükleyerek immün cevapta önemli bir rol oynar (Schroder & Kaufman, 2005). Bu nedenle, GRP94'ün antitümör yanıt verebileceği beklenebilir.

Toll-like reseptör, Wnt ko-reseptör, integrinler ile olan ilişkisinin yanında insülin-like growth factor (IGF)'ün de matürasyon ve sekresyonunu kontrol eder. Bunlar birçok kanser için mitojenik ve hayatta kalma faktörleri olarak bilinir. GRP94'ün aşırı ifade edilmesi birçok kanser türünde ileri evre ve kötü sağ kalım klinik bulguları ile koreledir. Ayrıca kanserin agresif seyri ve metastatik davranışı ile de ilişkili olabileceği gösterilmiştir (Dejeans vd., 2012). Bu nedenle birçok kanser türünde terapötik hedef olabileceği düşünülebilir.

Akciğer kanseriyle ilgili bazı çalışmalara bakıldığında GRP78 mRNA ve protein ifade seviyesinin tümör içeren dokuda içermeyen dokuya, ileri evre hastalıkta erken

evreye göre daha yüksek olduğu, ancak yaş, cins ve histopatolojik alt tiplerle ilişkili olmadığı saptanmıştır (Sun vd., 2012). Bir başka çalışmada GRP78 ve GRP94 mRNA ve protein seviyelerinin kanser dokusunda normal dokuya göre daha yüksek olduğu, tümörün farklılaşma derecesi ve evresi ile uyumlu olduğu ancak histopatoloji ile uyumlu olmadığı tespit edilmiştir (Wang vd., 2005).

Ayrıca yapılan çeşitli çalışmalarda bu iki proteinin akciğer kanserinde kemoterapi yanıtı ile de ilgili olabileceği gösterilmiştir (Zhang vd., 2009; Ahmad, Hahn & Chatterjee, 2014; Lin, Wang, Liu & Chen, 2011).

2. 2. 6. Kalneksin / Kalretikülin

Bazı proteinler ER’de uygun bir şekilde katlanabilmek için N–bağlı glikozilasyona gerek duyarlar. Kalneksin ve kalretikülin aktiviteleri için Ca^{+2} ’a ihtiyaç duyan iki ER şaperon proteinidir. Bu şaperonlar karbohidrat bağlayan proteinlerdir (veya lektinler). Katlanması tamamlanmamış proteinlerdeki oligosakkaritlere bağlanırlar ve onları ER’de tutarlar. Diğer şaperonlara benzer şekilde katlanmamış proteinlerin kalıcı olarak bir araya gelmelerini önlerler. Kalneksin ve kalretikülin tek bir terminal glikoz içeren N–bağlı oligosakkaridleri tanımaktadır ve bu nedenle, proteinleri yalnızca öncül oligosakkaridleri üzerindeki üç glukozdan ikisi, ER glukozidazlar tarafından glukoz düzeltme sırasında çıkarıldıktan sonra bağlarlar. Üçüncü glukoz çıkarıldığında glikoprotein şaperonundan ayrılır ve ER’yi terk edebilir. Bir glikozil transferaz yalnızca katlanmamış proteinlere tutunmuş olan oligosakkaridlere glukoz ekler. Böylece katlanmamış bir protein katlanma işlemi tamamlanana kadar devamlı surette glikozidaz ile glukoz düzeltme ve glikozil transferaz ile glukoz ilave edilme döngülerine girer (Alberts vd., 2015).

Kalneksin ve kalretikülin yeni sentezlenmiş glikoproteinlerin katlanma ve kalite kontrolünden sorumlu olan, ER’de lokalize iki önemli lektin, klasik olmayan şaperonlardır (Alberts vd., 2015). Kalneksin, bir tip I integral zar proteinidir. Kalneksinin sitoplazmik kuyruğu ayrıca protein katlanmasını etkileyebilir ve sitoplazmik moleküller ile etkileşime girer, fosforilasyon, sumoilasyon ve palmitoilasyon da dahil olmak üzere posttranslasyonel modifikasyonlara tabi tutulur. Kalretikülin, kalneksin gibi glikoproteinler için benzer substrat özgülüğüne sahip, yüksek kapasiteli Ca^{+2} tamponlayıcı ER lokalize proteindir (Michalak, Groenendyk, Szabo, Gold & Opas, 2009). Her iki protein, ER’de bulunan bir oksidoredüktaz olan ERp57 ile bağlantılı olarak, Kalneksin / kalretikülin döngüsündeki ana şaperon kompleksi olarak işlev görür.

Kalneksin, 90 kDa'luk, glikozile edilmemiş bir proteindir (Williams, 2006). Kalneksinin ER lümeninde bulunan kısmı P-bölgesi ve globüler karbonhidrat bağlama bölgesi olmak üzere iki önemli fonksiyonel bölgeye sahiptir (Schrag vd., 2001). Kalneksinin P bölgesi ERp57 bağlanma bölgesi içerir (Pollock vd., 2004). ERp57 ile olan bu etkileşim, kalneksinin şaperon görevi için önemlidir.

Kalretikülin evrimsel olarak korunmuş, 46 kDa'luk bir ER lümen proteinidir (Michalak vd., 2009). Kalretikülin 1974'te *high-affinity calcium-binding protein* (HACBP) olarak tanımlandı. Daha sonra 1989'da bu Ca^{+2} bağlayan proteinin cDNA'sı izole edildi. Hem Ca^{+2} bağlama hem de ER lümeninde olması itibariyle HACBP yerine kalretikülin olarak yeniden adlandırıldı (Johnson, Michalak, Opas & Eggleton, 2001). Kalretikülin hücrede çekirdek, mitokondri, sitoplazma ve plazma membranı dahil olmak üzere alternatif bölgelere de hedeflenebilir ve özel durumlarda hücrelerden salınabilir (Gold vd., 2010). Üç yapısal ve fonksiyonel bölge içerir: küresel bir N-bölgesi, uzun bir P-bölgesi kolu ve asidik bir C-bölgesi, bu bölgeleri karboksil ucuna ekli dört aminoasitlik retansiyon dizisi (KDEL) izler. Kalretikülinin N-bölgesi alfa integrinleri ile etkileşiminden sorumlu olan ve şaperon fonksiyonlarında yer alan steroid reseptör benzeri DNA bağlanma sahası içeren küresel bir alandır. Kalretikülinin P-bölgesi şaperon aktivitesine katılan Ca^{2+} bağlanması için yüksek afiniteye ve düşük kapasiteye sahip, merkezi prolin açısından zengin bir alandır. Oldukça asidik bir bölge olan Kalretikülinin C-bölgesi ise Ca^{2+} bağlanması için düşük afiniteye ve yüksek kapasiteye sahip olup, Ca^{2+} tamponlama fonksiyonlarında rol alır ve kalretikülinin Golgi aygıtından ER'ye geri alınmasını KDEL alanı sağlar. (Fucikova, Spisek, Kroemer & Galluzzi, 2020; Michalak vd., 2009). Kalretikülin kalneksin ile güçlü bir homoloji gösterir. ERp57 bağlanma bölgesi P-bölgesinde bulunur.

Kalretikülin retiküler bir protein olarak yeni sentezlenen protein ve glikoproteinlerin kalite kontrolünde kalneksin, GRP78, GRP94 ve protein disülfid izomeraz ailesi üye 3 gibi proteinlerle birlikte hareket eder. Protein katlanmasındaki ve Ca^{+2} dengesinin düzenlenmesindeki rolünün yanında hücre adezyonu, migrasyonu, 'eat me' sinyali olarak immünojenik apoptoz süreci gibi diğer bazı hücrel süreçlerde de rol alır (Panaretakis vd., 2009).

Adaptif antikanser immünitinin başlamasına katkıda bulunur. Özellikle, immünojenik hücre ölümüne uğrayan kanser hücrelerinin yüzeyinde açığa çıkan kalretikülin, güçlü pro-fagositik etkilere aracılık eder. Hücre yüzeyinde 'eat me' sinyali

vererek ölen hücrelerin veya bunların artıklarının antijen sunan hücreler tarafından, özellikle de göç eden olgunlaşmamış dendritik hücreler tarafından yutulmasını ve lenf nodları ve tümöre özgü CD8+ T hücrelerine sunumunu ve tümöre özgü sitotoksik T lenfosit cevabını kolaylaştırır (Obeid vd., 2007; Galluzzi vd., 2020). Kalretikülünün fagositozu uyarıcı etkisinin bir integrin ilişkili protein olan ve 'don't eat me' sinyali veren CD47 ile dengelenebileceği gösterilmiştir (Chao vd., 2010).

İmmün sistem üzerindeki etkilerinden dolayı, yabancı tip kalretikülünün, malign özellikleri sınırlandırarak ve / veya gelişen tümörlerin immüno-gözetimini sağlayarak onkosupresif etkilere aracılık edebileceği düşünülebilir. Bu durumda kalretikülünde işlev kaybına neden olan bir mutasyon bazı hastalarda tümörün ilerlemesine ve tedavi direncine neden olabilir (Fucikova vd., 2015). Bu durumun tersine, kalretikülün hücre içinde Ca²⁺ dengesinin anahtar düzenleyicisi olması ve integrin-bağımlı sinyal iletimindeki rolü bazı tümörlerin ilerlemesi için gerekli olabileceğini düşündürmektedir (Fucikova vd., 2020).

Serumda kalretikülün seviyeleri akciğer kanserli hastalarda kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca aynı çalışmada akciğer kanserinin histopatolojik alt tipleri ile de kalretikülün seviyelerinin değiştiği ve kemoterapi sonrasında artış gösterdiği belirtilmiştir (Liu vd., 2012).

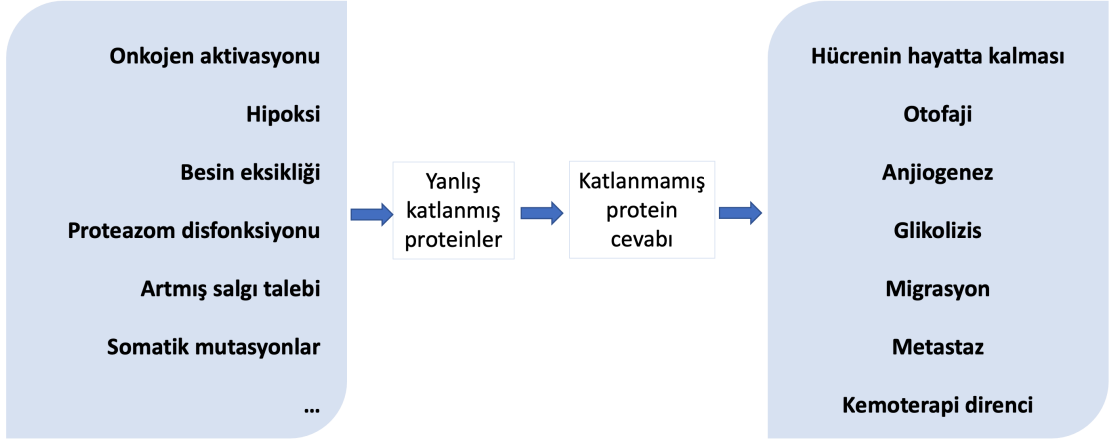
KHDAK'li hastalarda kalretikülünün prognostik önemini araştıran retrospektif bir çalışmada, tümör hücrelerindeki kalretikülün ifade seviyesi EIF2a fosforilasyonu ile uyumlu ve iyi prognozla ilişkili bulunmuştur. Tümör hücrelerindeki yüksek kalretikülün ifadesi, olgun dendritik hücreler ve efektör bellek T hücresi alt gruplarının daha yüksek bir yoğunluğuyla ilişkilendirilmiştir. Kalretikülünün tümör mikro çevresinde adaptif immün yanıt aktivasyonunu tetiklediği yorumu yapılmıştır. Bununla uyumlu olarak, artmış kalretikülün ifadesi ile dendritik hücreler ve CD8+ T lenfositleri tarafından yoğun intratümöral infiltrasyonu olan hastalar en iyi prognozu göstermiştir (Fucikova vd., 2016). Kalretikülün ifadesinin, akciğerde artmış lokal antitümör immün yanıtları yansıtan yeni, güçlü bir prognostik biyolojik belirteç olduğu düşünülmüştür.

2. 2. 7. Kanserde endoplazmik retikulumda protein katlanması

ER, ekzositik ve endositik yollar için tüm proteinleri sentezler, bu nedenle birçok hastalığın, proteinlerin ER kalite kontrolünü geçememesinden kaynaklanması şaşırtıcı değildir. Bazı lizozomal depo hastalıkları dahil birçok metabolik bozukluk, ER'den atılamayan anahtar enzimlerin doğrudan bir sonucudur. Kistik fibrozis, α 1-antitripsin

eksikliği ve buna bağlı amfizem bunlardan bazılarıdır. Kistik fibrozun en yaygın nedeni, kistik fibroz transmembran regülatöründe tek bir amino asit için kodonun genetik olarak silinmesidir, bu da proteinin düzgün bir şekilde katlanamamasına neden olur. Normalde α 1-antitripsin, nötrofiller tarafından üretilen elastaz gibi hücre dışı proteazları inhibe ederek dokuları korur. Hastalığa neden olan mutasyonlar, ER'de α 1-antitripsin katlanmasını önleyerek onun bozunmasına neden olur. α 1-antitripsin eksikliği sonucunda elastaz akciğer dokusunu tahrip ederek amfizeme yol açar. Bu ve benzeri birçok hastalığın ötesinde bu süreçte gelişen aksaklıkların kanser gelişimiyle olan ilişkisi geniş bir şekilde araştırılmaktadır.

UPR'nin kanser gelişimini önlediği mi yoksa teşvik mi ettiği tartışma konusudur. Kanser hücrelerinin en yaygın özelliklerinden biri lokal olarak yayılma ve diğer dokulara metastaz yapma yetenekleridir. Hipoksi, düşük glukoz, büyüme faktörü eksikliği, laktik asidoz, oksidatif stres ve amino asit açlığı gibi kötü çevresel koşullarda ER'de protein katlanması bozulur (Moenner, Pluquet, Bouchecareilh & Chevet, 2007). Dahası, onkojen aktivasyonu, anöploidi ve artan glikoliz ihtiyacı dahil olmak üzere birçok tümör hücresi tarafından paylaşılan intrinsik stresler, genellikle protein translasyonu ve protein sekresyonu süreçlerine etki eder. Ayrıca, sekretuar yolak proteinlerindeki genomik kararsızlık ve somatik mutasyonlar, onların katlanmasını bozabilir ve ER stresine neden olabilir. Çok sayıda çalışma, UPR'nin üç kolunun da (IRE1a, PERK ve ATF6) hem hematopoetik (lösemi, lenfoma ve miyelom) hem de solid tümörlerde (glioblastom ve meme, mide, kolon, yemek borusu, akciğer, prostat, pankreas ve karaciğer karsinomu) yüksek seviyelerde aktive olduğunu rapor etmiştir (Moenner vd., 2007). Sonuçlar bazı kanser hücrelerinin hayatta kalmak için sonlandırıcı UPR'yi devre dışı bırakabileceğini düşündürmektedir. Teorik olarak, UPR'nin hedeflenmesinin ER stresinin neden olduğu apoptozu engelleyip, kanser ilerlemesini teşvik edebileceği, bu yollara karşı geliştirilen terapötiklerin güvenliği hakkında endişeleri artırabileceği düşünülebilir. Buna karşın, son yıllarda UPR'nin anjiyogenez, metabolizma, metastaz ve kemorezistans dahil olmak üzere tümör büyümesinin çeşitli yönlerini desteklediğine dair kanıtların sayısı artmaktadır (Şekil 2.3). Bu durumda kanseri kontrol etmek için UPR'nin hedeflenmesi planlanıyorsa kanserin büyümesine neden olan UPR aktivasyon mekanizmasının anlaşılması gerekir.



Şekil 2.3. Kanserde endoplazmik retikulum stresi ve katlanmamış protein cevabı.

Otofaji, uzun ömürlü proteinlerin ve ER dahil olmak üzere hasarlı organellerin lizozomal bozunmasını düzenleyen, evrimsel olarak korunmuş bir yolaktır. Otofaji, hasar görmüş veya fazlalık hücre bileşenlerini geri dönüştürerek, hücresel dengeyi sürdürmek ve hayatta kalmayı desteklemek için enerji veya makromoleküler yapı taşları sağlayabilir. Otofajinin kanserdeki rolü karmaşık ve içeriğe bağlıdır. Otofajinin hücresel denge işlevleri, özellikle reaktif oksijen türlerinin birikimini sınırlama ve DNA hasarını önleme işlevleri, tümör oluşumunun önlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Jiang, Overholtzer & Thompson, 2015). Bununla birlikte, hipoksiye ve / veya düşük besin koşullarına maruz kalan tümörlerde otofaji indüksiyonu, kanser hücresinin hayatta kalmasını ve kemoterapiye direnci artıran enerji kaynakları sağlayabilir. Ayrıca, tümör stromal fibroblastları yakınındaki otofaji aktivitesi, tümör büyümesini teşvik etmek için yakıt görevi gören laktat, keton cisimcikleri ve amino asitler gibi metabolitlerin oluşmasına yol açabilir (Capparelli vd., 2012). Bu nedenle, otofajinin bloke edilmesi antitümör aktiviteye sahip olabilir. Otofaji ve UPR arasında karşılıklı etkileşim söz konusudur ve UPR'nin her bir kolu otofajiyi farklı şekillerde düzenleyebilmektedir.

Solid tümörlerin büyümesi, özellikle tümörün merkezindeki hücreler olmak üzere genişleyen hücre kütesine oksijen, glikoz ve diğer besinleri sağlama yeteneği ile sınırlanır. Hipoksi ve glikoz yoksunluğu durumunda, tümör hücreleri, neoanjiyogenezi teşvik etmek için vasküler endotelial büyüme faktörü, fibroblast büyüme faktörü 2 ve diğer proanjiyojenik sinyallerin ekspresyonunu yukarı yönde düzenler. Bu koşullar aynı şekilde ER stresine neden olur ve çeşitli proanjiyojenik faktörlerin transkripsiyonel ve posttranslasyonel kontrolünü düzenleyen UPR'yi aktive eder. UPR'nin her üç kolu da bu

süreçlerde görev almakta ve anjiogeneze katkıda bulunmaktadır (Ghosh vd., 2010; Wang vd., 2012).

Epitelial-mezenkimal geçiş tümör hücrelerinde sık görülen bir durum olup metastaz sürecinde rol oynar (Feng vd., 2014). UPR, hücre iskeletinin yeniden şekillenmesini ve hücre göçünü dolayısıyla da tümör metastazını düzenleyebilir (Urta vd., 2018).

Kanser hücreleri düşük besin koşullarıyla karşı karşıya kaldıklarında, UPR aktivasyonu yoluyla metabolizmalarını değiştirebilirler (Wang vd., 2014).

Sitotoksik kemoterapi ve hedefe yönelik tedavilerdeki ilerlemelere rağmen, sonuçta bu tedavilerin çoğu tedavi sırasında dirençli klonların ortaya çıkması nedeniyle başarısız olmaktadır. Kemoterapi direncinde yer alan mekanizmalar, kullanılan tedaviye ve kanser türüne bağlı olarak değişmekle birlikte, ortak mekanizmalar arasında, detoksifikasyon yollarıyla ilaç inaktivasyonu, ilaç taşıyıcılarının aşağı yönde regülasyonu, dışa akış pompalarının yukarı yönde regülasyonu, hayatta kalma proteinlerinin yukarı yönde regülasyonu ve gelişmiş DNA onarımı yer almaktadır (Holohan, Van Schaeybroeck, Longley & Johnston, 2013). UPR aktivasyonu tedavi ajanlarına karşı kanser hücresinin hayatta kalmasını destekleyerek, sitotoksik kemoterapi ve hedefe yönelik tedavilere dirençte önemli bir rol oynamaktadır (Avril, Vauleon & Chevet E, 2017). Tedavi direncine neden olan yolların tespiti ve hedeflenmesi tedavi etkinliğini artırabilir.

UPR tümör gelişiminde etkili olan nülear faktör kappa B, hipoksi ile indüklenen faktör 1 alfa gibi diğer majör sinyal yollarıyla da etkileşimde bulunur (Hu, Han, Couvillon, Kaufman & Exton, 2006). Dolayısıyla UPR'nin rol aldığı süreçler ve bu süreçlere müdahalede bu ve benzeri etkileşimlerin dikkate alınması gerekir.

Tüm bunların ötesinde, UPR'nin birçok bağışıklık hücresi tipinin farklılaşmasında ve işlevinde önemli bir rol oynadığı ve bu nedenle antijen sunumu, antikor üretimi, inflamasyon ve tümör immünitesi üzerinde sonuçlara sahip olduğu anlaşılmıştır. Özellikle, tümörle ilişkili dendritik hücrelerde IRE1alfa / XBP1 yolağı aracılığıyla sinyal verme, antitümör immüniteyi köreltir. Bu nedenle, bu yolağın genetik veya farmakolojik inhibisyonunun, T hücresi antitümör immünitesini artırdığı ve kanserli farelerin sağ kalımını arttırdığı gösterilmiştir (Cubillos-Ruiz vd., 2015). İmmünojenik hücre ölümü süreci, kalretikülünün ER lümeninden plazma membranına translokasyonunu içerir ve burada tümör antijenlerinin dendritik hücrelere transferini artırır (Obeid vd., 2007; Gardai vd., 2005). Bu nedenle, UPR'nin hedeflenmesi hem tümör hücreleri düzeyinde hem de T hücrelerinin antitümör kapasitesinde antikanser etki sağlayabilir.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Çalışma Populasyonu

Çalışma için Eskişehir Osmangazi Üniversitesi (ESOGÜ) Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan onay alındı (Karar no = 12.04.2018-12). Moleküler analizlerin gerçekleştirilmesinde gerekli cihaz ve malzemeler ESOGÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu desteği ile temin edildi (Proje onay kodu = 2020-2243).

Çalışmanın ilk aşamasına Mart 2014 ile Ekim 2017 arasında ESOGÜ Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Akciğer ve Plevra Tümörleri Polikliniğinde tanı konulup, takip ve tedavisi yapılan 52 akciğer kanserli hasta dahil edildi. İkinci aşamasındaki çalışma grubu ise Ekim 2017 ile Aralık 2018 tarihleri arasında tanı, tedavi ve takibi yapılan 140 akciğer kanserli hastadan oluşmaktaydı. Tüm hastalardan yazılı onam formu alındı. Çalışmaya dahil edilme ve çalışmadan hariç bırakma kriterleri aşağıda belirtilmiştir.

Çalışmaya dahil edilen hastalar:

- 18 – 85 yaş arası olan,
- Çalışmaya katılmayı kabul eden,
- Çalışmanın ilk aşaması için akciğer kanseri ön tanısı ile bronkoskopi yapılması planlanan,
- Akciğer kanseri tanısı patolojik olarak doğrulanan,
- Tanı sonrası tedavi ve takibi ESOGÜ Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Akciğer ve Plevra Tümörleri Polikliniğinde yapılan,

Çalışmaya dahil edilmeyen hastalar:

- 18 yaşından küçük, 85 yaşından büyük olan,
- Çalışmaya katılmayı kabul etmeyen,
- Akciğer kanseri tanısı patolojik olarak doğrulanamayan,
- Histopatolojik alt tip ayırımı yapılamayan
- Tanı sonrası tedavi ve takibi ESOGÜ Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Akciğer ve Plevra Tümörleri Polikliniği dışında yapılan,
- Daha önce antitümöral tedavi alan,
- İkinci bir aktif kanseri olan,

Bunun için gerekli olan akciğer kanserli hasta dokuları, serumları ve klinik verileri ESOGÜ Akciğer ve Plevra Kanseri Uygulama ve Araştırma Merkezi biyolojik örnek bankasından temin edildi. Moleküler çalışmalar için onam veren hastalardan elde edilen

biyolojik örnekler ESOGÜ Akciğer ve Plevra Kanseri Uygulama ve Araştırma Merkezinde -80°C'de saklanmaktadır.

Çalışma popülasyonunun demografik, klinik ve prognoz verileri ESOGÜ Akciğer ve Plevra Kanseri Uygulama ve Araştırma Merkezi veri tabanından alındı. Hastaların yaş, cins, sigara, ko-morbid hastalıklar, performans durumu, hücre tipi, evre, metastaz yeri ve sayısı, tedavi şekli, kemoterapi cevabı, tanı tarihi ve ölüm tarihi kaydedildi.

Çalışma iki aşamada gerçekleştirildi. Birinci aşamada ER stresinde görev alan ER şaperonlarının (GRP78, GRP94, kalneksin, kalretikülin) akciğer kanserli hastaların tümör dokusunda gen ifadelerine bakıldı. GRP78, GRP94, kalneksin, kalretikülin gen ifade seviyelerinin klinik veriler ve prognozla ilişkisi değerlendirildi. İkinci aşamada başka bir hasta grubunda GRP78, GRP94, kalneksin, kalretikülin serum protein düzeylerinin klinik veriler ve prognozla ilişkisi değerlendirildi.

3.2. Kullanılan Cihazlar, Malzemeler ve Kimyasallar

Çalışmada kullanılan cihazlar, malzemeler ve kimyasallar aşağıda yer almaktadır:

- Steril eldiven
- Pipet seti
- Steril pipet ucu (100-1000 µl; 10-100 µl; 0,5-20 µl)
- Mikrosantrifüj tüpü (2 ml, DNAaz ve RNAaz free)
- Santrifüj-mini-yüksek hız-15.000 rpm
- RNA örneklerini saklama kutusu
- PCR reaksiyonları için distile su
- Qubit (Thermo qubit 2.0, Fluorometer)
- Vorteks
- Buzdolabı
- Derin dondurucu (-80°C ve -20°C)
- Thermal cycler (MiniAmp Plus, Applied Biosystems by TFS)
- Real-Time PCR Sistemi (StepOne Plus, Applied Biosystems by TFS)
- ELISA cihazı (Multiskan Sky, ThermoScientific)
- RNA izolasyon kiti
- Qubit RNA ölçüm kiti
- High-capacity cDNA reverse transcription kit

- SYBR green master mix
- MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plate
- MicroAmp 96-Well Optical Adhesive Film 25 films
- Primer (GRP78, GRP94, kalneksin, kalretikulin, beta aktin)
- Human GRP78 ELISA kit
- Human GRP94 ELISA kit
- Human CNX (calnexin) ELISA kit
- Human CRT (calreticulin) ELISA kit

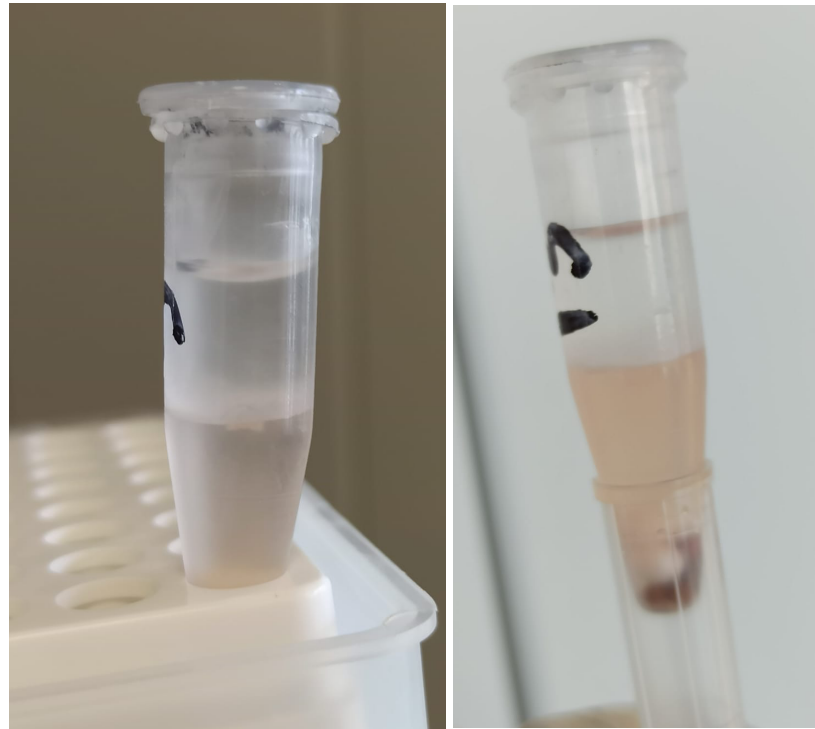
3. 3. Deneysel Çalışmalar

3. 3. 1. Total RNA izolasyonu

Doku örneklerinden total RNA izolasyonu RNA izolasyon kiti kullanılarak, aşağıdaki kit protokolü takip edilerek gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.1.):

1. 10-20 mg dokuya 200 µl PBS (Ca Mg free), 10 µl proteinaz K (20 mg/ml), 500 µl lizis buffer ve 60 mg zirkonyum bead eklenip homojenizatörde homojenize edildi. Homojenat yeni bir 2 ml'lik santrifüj tüpüne aktarıldı.
2. 3 dk. oda sıcaklığında inkübe edildi.
3. Üzerine 500 µl buffer P eklenip iyice vortekslendi ve 3 dk. oda sıcaklığında inkübe edildi.
4. Karışımın üzerine 200 µl kloroform izoamilalkol (49:1) karışımı eklendi. Alt-üst edilerek karıştırıldı ve oda sıcaklığında 2 dk. daha bekletildi.
5. Karışım 4⁰C'de 12000 x g'de 15 dk. santrifüj edildi ve santrifüj sonrası en üstte bulunan sıvı fazdaki süpernatant (yaklaşık 600 µl) yeni bir tüpe aktarıldı.
6. Üzerine 1.25 kat etanol (%96-100) eklenip (yaklaşık 800 µl) pipetleyerek karıştırıldı.
7. 700 µl lizat kolona transfer edildi ve oda sıcaklığında 12000 x g'de 20 sn. santrifüj edilerek tüp döküldü ve kolon tekrar tüpün içine yerleştirildi. Tüm lizatlar kolona transfer edilinceye kadar bu basamak tekrarlandı.
8. Kolonun üzerine 700 µl wash buffer1 solüsyonu eklenip oda sıcaklığında 12000 x g'de 20 sn. santrifüj edilip tüp döküldü ve kolon tekrar tüpün üzerine yerleştirildi.

9. Kolonun üzerine 600 µl wash buffer2 solüsyonu eklenip oda sıcaklığında 12000 x g'de 20 sn. santrifüj edilip tüp döküldü ve kolon tekrar tüpün üzerine yerleştirildi.
10. Kolonun üzerine 600 µl wash buffer2 solüsyonu eklenip oda sıcaklığında 12000 x g'de 20 sn. santrifüj edilip tüp döküldü ve kolon tekrar tüpün üzerine yerleştirildi.
11. Kolon tekrar 1 dk. maksimum hızda santrifüj edildi ve kolon 1.5 ml'lik eppendorf tüpün üzerine yerleştirildi.
12. Kolonun merkezine 50-100 ul, 65-70°C'de bekletilmiş nükleaz free, ultra distile su veya DEPC'li su eklendi, oda sıcaklığında 12000 x g'de 1 dk. santrifüj edildi.
13. Elde edilen RNA -80°C'de saklandı.



Şekil 3.1. RNA izolasyonu.

RNA konsantrasyonu qubit cihazı ile ölçüldü. Qubit RNA ölçüm kiti kullanılarak kantitasyon yapıldı.

3. 3. 2. cDNA'nın elde edilmesi

Elde edilen RNA'lerden complementary DNA (cDNA) sentezi cDNA sentez kiti kullanılarak kit protokolüne göre aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi. cDNA reaksiyonu 100 ng üzerinden kuruldu (Tablo 3.1, Tablo 3.2). Elde edilen cDNA'lar -20°C'de saklandı.

Tablo 3.1. cDNA reaksiyonu.

20 µl reverse transkriptaz reaksiyonu için	Volüm
10X Reaksiyon buffer	2 µl
dNTP mix (2.5 mM)	1 µl
Random heksamer (50 pM)	2 µl
Reverse transkriptaz (200 U/µl)	1 µl
RNase inhibitör	0.5 µl
RNase free su	3.5 µl
RNA template	10 µl

Tablo 3.2. cDNA protokolü.

Basamak	Döngü	Isı (°C)	Zaman
1	1	25	10 dk.
2	1	37	120 dk.
3	1	85	5 dk.
4	1	4	∞

3. 3. 3. RT-PCR yöntemi ile gen ifadelerinin belirlenmesi

Elde edilen cDNA'lar kalıp olarak kullanılarak GRP78, GRP94, kalretikülin, kalneksin ve beta aktin genlerin ifade profilleri RT-PCR ile analiz edildi. RT-PCR reaksiyonu için kullanılan primerler ve kurulan PCR reaksiyonu Tablo 3.3, Tablo 3.4 ve Tablo 3.5'te, deneylerin yapılma aşaması Şekil 3.2.'de ve kontrol geni ve çalışılan genlerin amplifikasyon eğrileri Şekil 3.3A-E'de verilmiştir.

Tablo 3.3. Forward ve reverse primer dizileri.

Gen	Forward (5' – 3') primer dizisi	Reverse (5' – 3') primer dizisi
Beta aktin	GCCAACTTGTCTTACCCAGA	AGGAACAGAGACCTGACCC C
GRP78	ATCTGAGCTGGCTCCTAGAGT	GCACATCTAGATCCCCGCA TT
GRP94	GGTCCAGCAGAAAAGAGGCT	CAAATTCGGGAAGGGCCTG A
Kalneksin	AAGCCAAGAAAGACGATACC GA	GAGATGGCATGATGCTTGG C
Kalretikülin	GCACTTGGATCCACCCAGAA	ATGGTGCCAGACTTGACCT G

Tablo 3.4. PCR reaksiyonu.

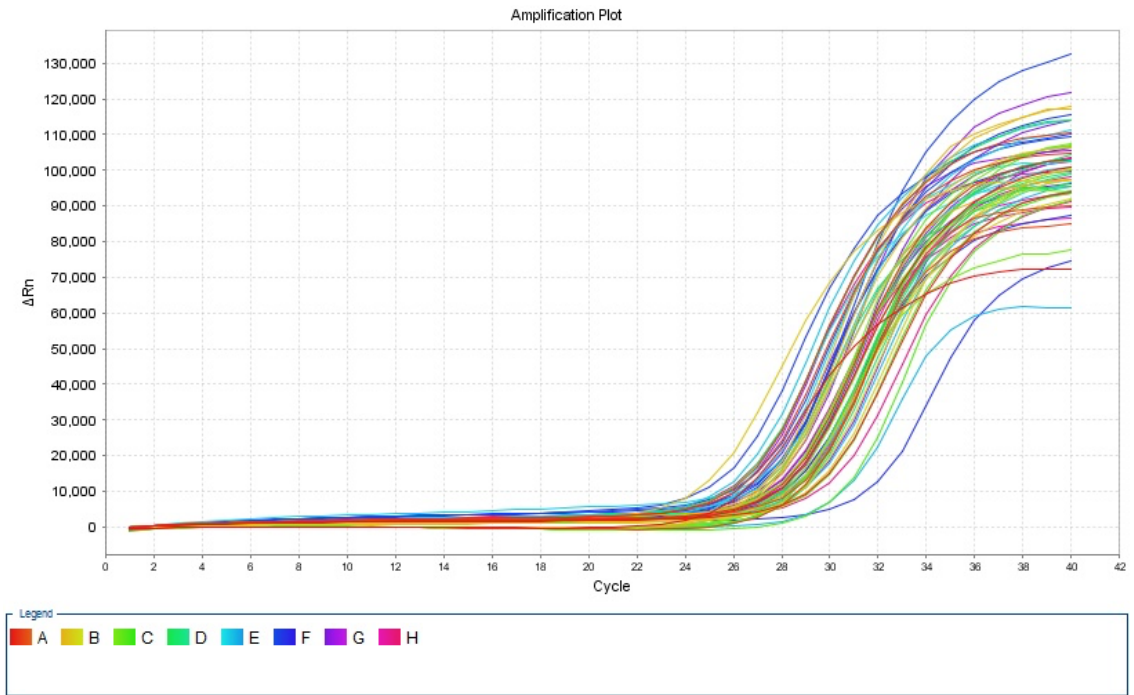
İçerik	Volüm	Final konsantrasyon
2X Magic SYBR Mix	10 µl	1X
Template DNA	X µl	max. 2 µl
Forward primer (10 µM)	0.4 µl	0.05-0.9 µM her biri
Reverse primer (10 µM)	0.4 µl	0.05-0.9 µM her biri
Nuclease-free dH ₂ O	X µl	20 µl'ye kadar

Tablo 3.5. PCR protokolü.

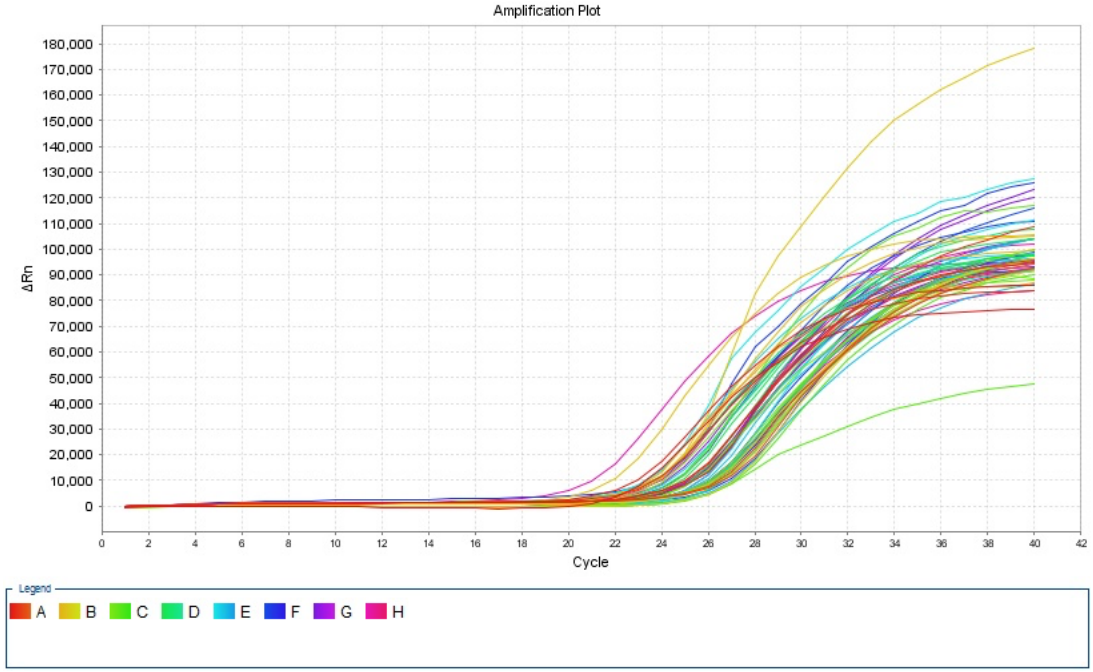
Basamak	Döngü	Isı	Zaman
Başlangıç denatürasyonu	1	95°C	5 dk.
Amplifikasyon	40	95°C	10 sn.
		60°C	15 sn.
		72°C	20 sn.
Son uzama	1	72°C	2 dk.



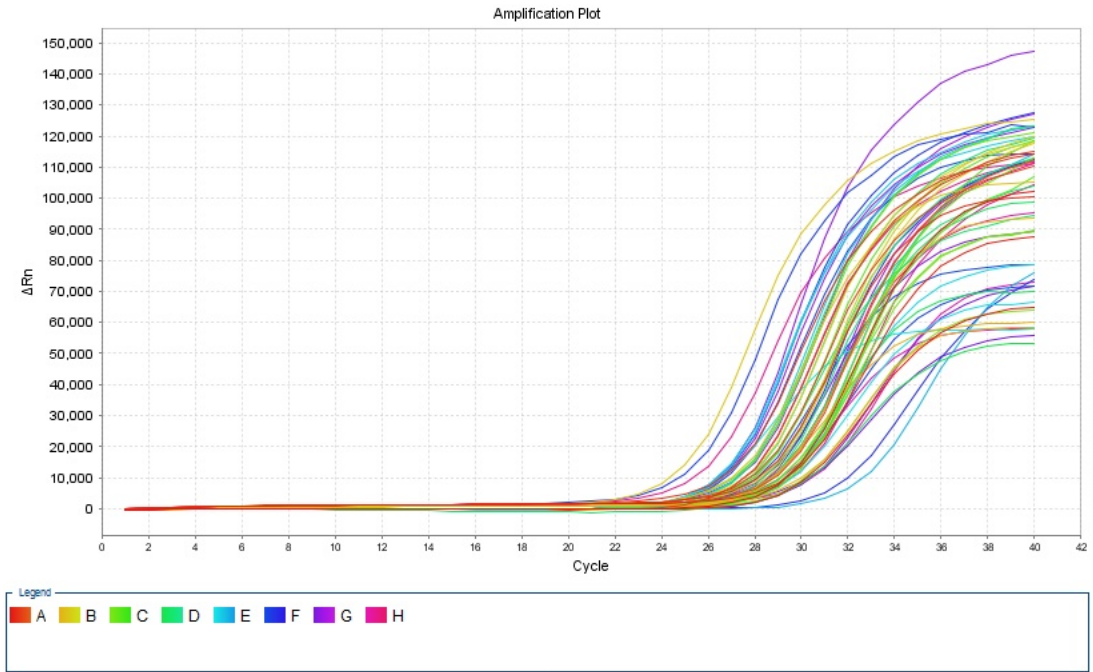
Şekil 3.2. Deneylerin yapıma aşaması.



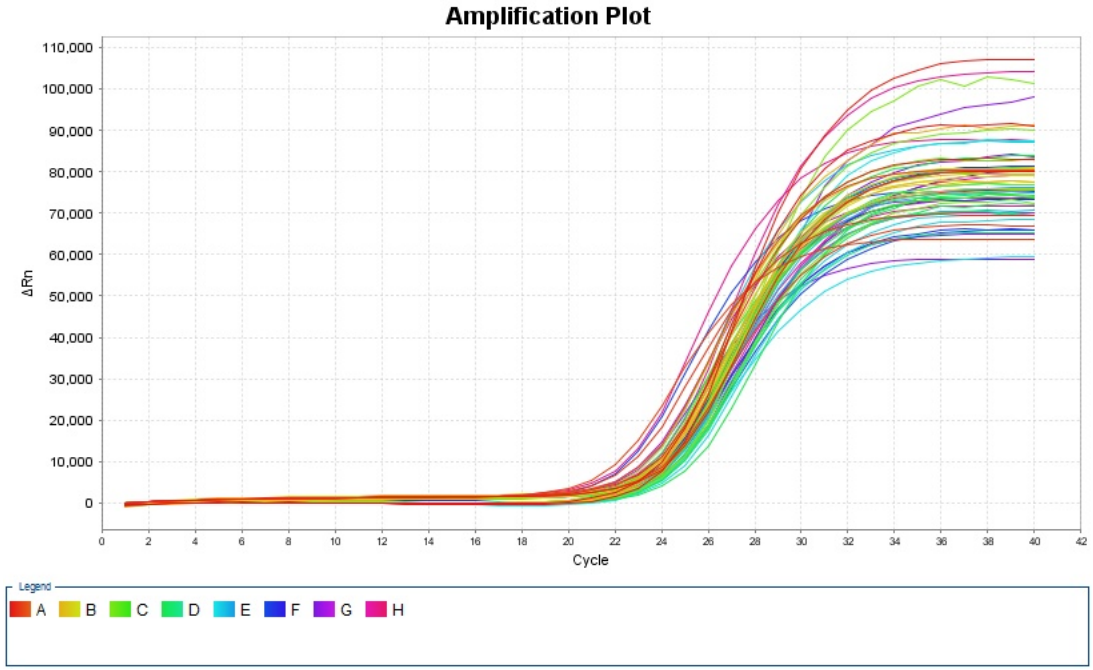
Şekil 3.3A. Aktin amplifikasyon eğrisi.



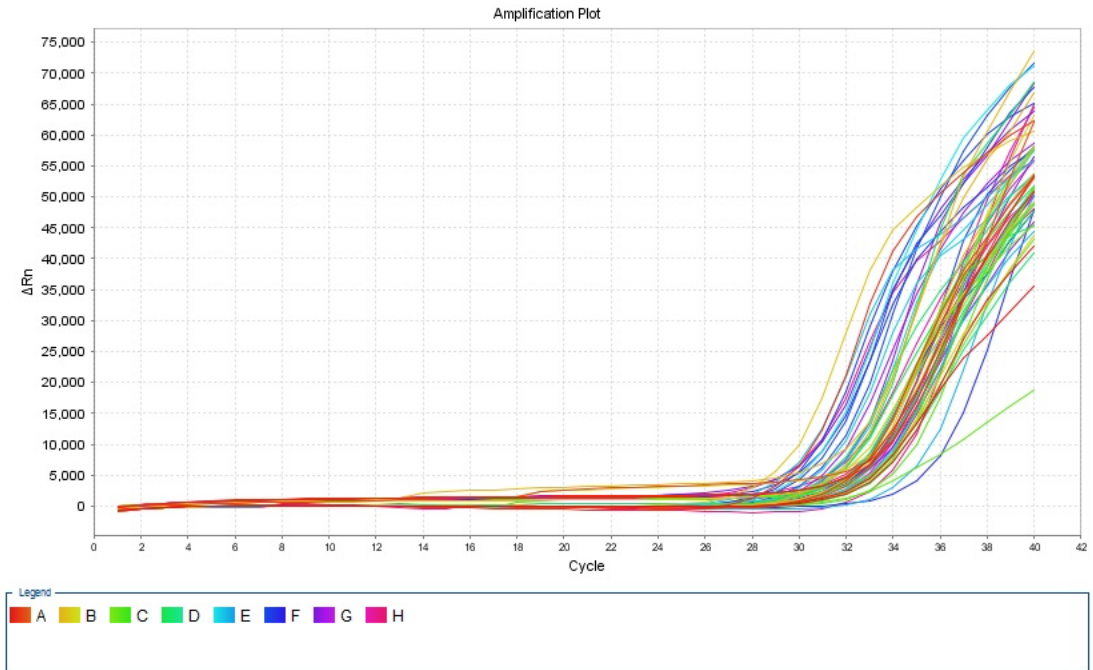
Şekil 3.3B. GRP78 amplifikasyon eğrisi.



Şekil 3.3C. GRP94 amplifikasyon eğrisi.



Şekil 3.3D. Kalneksin amplifikasyon eğrisi.



Şekil 3.3E. Kalretikülin amplifikasyon eğrisi.

3. 3. 4. *DeltaCt değerlerinin hesaplanması*

Elde edilen cycle threshold (C_T) sonuçları Excel dosyasına aktarılarak önce kontrol geni beta aktine göre normalize edilerek ΔC_T , daha sonra da kontrol örneklerine göre

$\Delta\Delta C_T$ değerleri hesaplandı. Bunun için Microsoft Excel programı kullanıldı. Aşağıdaki formül kullanıldı: (Livak & Schmittgen, 2001)

$$\Delta C_T = C_{T, \text{test edilgen}} - C_{T, \text{aktin}};$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T, \text{hasta}} - \Delta C_{T, \text{kontrol}};$$

$$2^{-\Delta\Delta C_T} = \text{Fold Change}$$

3. 3. 5. *Protein seviyelerinin belirlenmesi*

Serum örneklerinde GRP78, GRP94, kalretikülin ve kalneksin protein seviyeleri ELISA yöntemi ile Bioassay Technology Laboratory ELISA kitleri (Shanghai, China) kullanılarak belirlendi. Protokol aşamaları kit talimatlarına göre aşağıdaki adımlar takip edilerek gerçekleştirildi;

- Her bir kit protokolünün belirttiği konsantrasyondaki standart serileri, stok standart ve standart dilüent kullanılarak hazırlandı ve 50 µl elisa plate kuyucuklarına pipetlendi.
- Her bir örnekten 40 µl plate kuyucuklarına pipetlendi.
- Örnek kuyucuklarına 10 µl antibody pipetlendi.
- Blank hariç tüm kuyucuklara 50 µl streptavidin-HRP pipetlendi.
- Plate kapatıldı ve 60 dk 37°C'de inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonrasında plate her bir kuyucuk için 350 µl 1X wash buffer ile 5 kez yıkandı.
- Tüm kuyucuklara 50 µl Chromogen A ve 50 µl Chromogen B solüsyonları eklendi.
- Plate 10 dk 37°C'de inkübasyona bırakıldı.
- Tüm kuyucuklara 50 µl Stop Solüsyonu eklendi ve plate 450nm'de Thermo Scientific Multiskan GO UV/Vis Microplate and Cuvette Spectrophotometer (ThermoFisher Scientific, Vartaa, Finland) cihazında okundu.
- Sonuçlar standart eğri grafiğine göre hesaplandı.

3. 4. **İstatistiksel Analiz**

Çalışmanın örneklem hacmi alfa hata 0.05, beta hata 0.20 (Power: 1 – beta: 0.80) ve iki grup arasında prognozu belirlemedeki farkın %20 olması öngörüsüyle en az 41 kişi olarak belirlendi. Örnek hacminin hesaplanmasında MedCalc programından yararlanıldı. Bunun iki katından daha fazla bir grupta ikinci aşamanın gerçekleştirilmesi planlandı. İlk aşamada 52, ikinci aşamada da 140 hastayla çalışma tamamlandı. Çalışma bittikten sonra

G – power Software (G*Power (Version 3.1.9.2)) programı kullanılarak post-hoc olarak power analizi tekrar yapıldı. Çalışmanın gücü %88.2 olarak hesaplandı.

Çalışmada kategorik değişkenler frekans ve yüzde ile ifade edildi. Çalışmanın sürekli verileri ortalama \pm SD, ortanca ve min – maks değerleriyle verildi. Sürekli veriler için normalite testi yapıldı ve grafikleri çizildi. Normal dağılım göstermeyen verilerin logaritması alınarak normal dağılıma dönüşmeleri sağlandı. Verilerin karşılaştırılmasında parametrik testler (t-testi ve One-way ANOVA) kullanıldı. Parametreler arasındaki ilişkiyi göstermede Pearson korelasyon testi yapıldı.

Sağ kalım süresi olasılığının hesaplanmasında Kaplan – Meier metodu kullanılarak ortanca sağ kalım süresi ve %95 güven aralığı hesaplandı. Sağ kalım süresi patolojik tanı tarihiyle ölüm veya son görülme tarihleri esas alınarak hesaplandı. Biyobelirteçlerin kestirim değerini hesaplamada birinci aşamada grubun kendi ortanca değeri, ikinci aşamada ise kontrol grubunun ortanca değeri esas alındı. Çalışılan belirteçlerin sağ kalımı belirlemedeki önemini tespit etmek için Log-rank testi yapıldı. Belirteçlerin kötü şans düzeyi ve %95 güven aralıklarını belirlemede prognoza etkili faktörlere göre düzeltme yapmak için Cox regresyon analizi yapıldı.

4. BULGULAR

4. 1. GRP78, GRP94, Kalneksin ve Kalretikülin Gen İfadeleri

Çalışmanın ilk aşaması olan bu aşamada 52 akciğer kanserli hastanın tümör dokularında RT-PCR analizi ile elde edilen GRP78, GRP94, kalneksin ve kalretikülin gen ifadelerinin hastaların demografik ve klinik verileriyle ilişkisi değerlendirildi. Bu gruptaki akciğer kanserli hastaların yaş ortalaması 65.13 ± 9.62 (40-85) yıl, ortancası 66 yıl ve kadın / erkek oranı 5/47 idi. Bu grupta hiç sigara içmeyen hasta yoktu, ancak 23 tanesi sigarayı bırakmıştı. Tablo 4.1.'de çalışmanın bu aşamasına dahil edilen hastaların demografik ve klinik özellikleri görülmektedir.

Tablo 4.1. Gen ifadesi değerlendirilen akciğer kanserli hastaların demografik ve klinik özellikleri.

Özellikler	n=52
Yaş, yıl	
X±SD	65.13±9.62
Ortanca (min-max)	66 (40-85)
Cinsiyet, n (%)	
Erkek	47 (90.4)
Kadın	5 (9.6)
Aktif sigara içiciliği, n (%)	
Var	29 (55.8)
Yok	23 (44.2)
Ko-morbidite, n (%)	
Var	30 (57.7)
Yok	22 (42.3)
Karnofsky performans skoru, median (min-max)	80 (60-100)
Histopatolojik alt tip, n (%)	
Skvamöz hücreli karsinom	38 (73.1)
Adenokarsinom	5 (9.6)
Küçük hücreli akciğer kanseri	9 (17.3)

Tablo 4.1. (Devam ediyor).

Özellikler	n=52
Evre, n (%)	
I-II-III A	7 (13.5)
IIIB	12 (23.0)
IIIC	3 (5.8)
IVA	11 (21.2)
IVB	19 (36.5)
Metastaz, n (%)	
Var	30 (57.7)
Yok	22 (42.3)
Metastaz yeri, n (%)*	
Karşı akciğer	12 (23.1)
Plevra	11 (21.2)
Perikard	1 (1.9)
Ekstratorasik lenf nodu	8 (15.4)
Beyin	4 (7.7)
Kemik	12 (23.1)
Karaciğer	8 (15.4)
Sürrenal	5 (9.6)
Yumuşak doku	2 (3.8)
Tedavi şekli, n (%)	
Destek tedavisi	15 (28.9)
Kemoterapi	14 (26.9)
Kemoradyoterapi	19 (36.6)
Cerrahi	1 (1.9)
Cerrahi - kemoterapi - radyoterapi	2 (3.8)
Radyoterapi	1 (1.9)

*: Bazı hastalarda birden fazla metastaz mevcuttur. SD: Standard Deviation.

Akciğer kanserli hastaların dokularındaki GRP78, GRP94, kalneksin ve kalretikülin gen ifade seviyeleri ve birbirleriyle olan korelasyonu Tablo 4.2. ve 4.3.'te verilmiştir.

Tablo 4.2. Çalışma grubunun RT-PCR ile GRP78, GRP94, kalneksin ve kalretikülin gen ifade seviyeleri.

	Hasta grubu (n=52)
GRP78	
Ortalama ± SD	-3.18±1.35
Ortanca (min-max)	-3.23 (-7.19 - -0.35)
GRP94	
Ortalama ± SD	0.59±1.23
Ortanca (min-max)	0.21 (-1.22 - 3.67)
Kalneksin	
Ortalama ± SD	-3.57±1.27
Ortanca (min-max)	-3.64 (-6.79 - -0.98)
Kalretikülin	
Ortalama ± SD	3.59±1.05
Ortanca (min-max)	3.51 (0.32 - 5.91)

SD: Standard Deviation; GRP78: glucose-regulated protein 78; GRP94: glucose-regulated protein 94.

Tablo 4.3. Çalışma grubunun GRP78, GRP94, kalneksin ve kalretikülin gen ifade seviyeleri arasındaki korelasyon değerleri.

	GRP78	GRP94	Kalneksin	Kalretikülin
GRP78 r; p				
GRP94 r; p	-0.047; 0.740			
Kalneksin r; p	0.346; 0.012	0.411; 0.002		
Kalretikülin r; p	-0.010; 0.946	0.102; 0.470	0.184; 0.192	

GRP78: glucose-regulated protein 78; GRP94: glucose-regulated protein 94.

Korelasyon analizi sonucunda kalneksinin GRP78 ve GRP94 ile korelasyon gösterdiği bunun dışında herhangi bir korelasyon olmadığı saptandı.

Hastaların GRP78, GRP94, kalneksin ve kalretikülin gen ifade seviyelerinin yaş, cins, sigara içme durumu ve ko-morbidite durumlarına göre değişimleri Tablo 4.4.-4.6.'da verilmektedir.

Tablo 4.4. Akciğer kanserli hastaların yaş gruplarına göre GRP78, GRP94, kalneksin ve kalretikülin gen ifade seviyelerinin karşılaştırılması.

	< 65 (n=22)	≥65 (n=30)	p
GRP78			
Ortalama ± SD	-3.50±1.30	-2.94±1.36	0.142
Ortanca (min-max)	-3.78 (-6.05 - -1.49)	-2.86 (-7.19 - -0.35)	
GRP94			
Ortalama ± SD	0.72±1.36	0.50±1.23	0.550
Ortanca (min-max)	0.22 (-1.00 - 3.67)	0.23 (-1.22 - 3.00)	
Kalneksin			
Ortalama ± SD	-3.45±1.30	-3.66±1.26	0.564
Ortanca (min-max)	-3.59 (-5.80 - -0.98)	-3.69 (-6.79 - -1.30)	
Kalretikülin			
Ortalama ± SD	3.56±1.35	3.61±0.78	0.865
Ortanca (min-max)	3.56 (0.32 - 5.91)	3.42 (2.46 - 5.61)	

SD: Standard Deviation; GRP78: glucose-regulated protein 78; GRP94: glucose-regulated protein 94.

Tablo 4.5. Akciğer kanserli hastaların cinsiyete göre GRP78, GRP94, kalneksin ve kalretikülin gen ifade seviyelerinin karşılaştırılması.

	Erkek (n=47)	Kadın (n=5)	p
GRP78			
Ortalama ± SD	-3.19±1.39	-3.10±0.94	0.896
Ortanca (min-max)	-3.17 (-7.19 - -0.35)	-3.38 (-3.77 - -1.50)	
GRP94			
Ortalama ± SD	0.53±1.30	1.20±0.90	0.268
Ortanca (min-max)	0.19 (-1.22 - 3.67)	1.64 (0.21 - 2.16)	
Kalneksin			
Ortalama ± SD	-3.59±1.34	-3.42±0.25	0.446
Ortanca (min-max)	-3.67 (-6.79 - -0.98)	-3.34 (-3.72 - -3.13)	
Kalretikülin			
Ortalama ± SD	3.61±1.07	3.47±0.91	0.783
Ortanca (min-max)	3.47 (0.32 - 5.91)	3.67 (2.46 - 4.72)	

SD: Standard Deviation; GRP78: glucose-regulated protein 78; GRP94: glucose-regulated protein 94.

Tablo 4.6. Akciğer kanserli hastaların aktif sigara içme durumlarına göre GRP78, GRP94, kalneksin ve kalretikülin gen ifade seviyelerinin karşılaştırılması.

	Aktif sigara içiciliği		p
	Yok (n=23)	Var (n=29)	
GRP78			
Ortalama ± SD	-3.36±1.52	-3.04±1.20	0.399
Ortanca (min-max)	-2.92 (-7.19 - -1.44)	-3.37 (-4.89 - -0.35)	
GRP94			
Ortalama ± SD	0.35±1.04	0.78±1.43	0.241
Ortanca (min-max)	0.07 (-1.00 - 2.18)	0.26 (-1.22 - 3.67)	
Kalneksin			
Ortalama ± SD	-3.87±1.04	-3.34±1.40	0.139
Ortanca (min-max)	-3.81 (-6.79 - -2.04)	-3.56 (-6.74 - -0.98)	
Kalretikülin			
Ortalama ± SD	3.51±0.93	3.66±1.15	0.613
Ortanca (min-max)	3.39 (1.93 - 5.61)	3.57 (0.32 - 5.91)	

SD: Standard Deviation; GRP78: glucose-regulated protein 78; GRP94: glucose-regulated protein 94.

Tablo 4.7. Akciğer kanserli hastaların komorbidite durumlarına göre GRP78, GRP94, kalneksin ve kalretikülin gen ifade seviyelerinin karşılaştırılması.

	Ko-morbidite		p
	Yok (n=22)	Var (n=30)	
GRP78			
Ortalama ± SD	-3.45±1.63	-2.97±1.08	0.238
Ortanca (min-max)	-3.61 (-7.19 - -1.49)	-3.06 (-5.70 - -0.35)	
GRP94			
Ortalama ± SD	0.79±1.36	0.45±1.22	0.341
Ortanca (min-max)	0.22 (-0.89 - 3.67)	0.23 (-1.22 - 2.70)	
Kalneksin			
Ortalama ± SD	-3.39±1.27	-3.70±1.28	0.386
Ortanca (min-max)	-3.51 (-5.80 - -0.98)	-3.69 (-6.79 - -1.30)	
Kalretikülin			
Ortalama ± SD	3.41±1.22	3.72±0.90	0.296
Ortanca (min-max)	3.44 (0.32 - 5.76)	3.65 (2.46 - 5.91)	

SD: Standard Deviation; GRP78: glucose-regulated protein 78; GRP94: glucose-regulated protein 94.

Akciğer kanserli hastaların tümör dokusunda GRP78, GRP94, kalneksin ve kalretikülin gen ifade seviyelerinin yaş, cins, aktif sigara içme ve ko-morbidite durumlarına göre değişiklik göstermediği saptandı.

Hastaların histopatolojik alt tipleri, evreleri ve metastaz durumlarına göre GRP78, GRP94, kalneksin ve kalretikülin gen ifade seviyeleri Tablo 4.8.-4.10.'da görülmektedir.

Tablo 4.8. Akciğer kanserli hastaların histopatolojik alt tiplerine göre GRP78, GRP94, kalneksin ve kalretikülin gen ifade seviyelerinin karşılaştırılması.

	Adenokarsinom (n=5)	Skvamöz hücreli karsinom (n=38)	Küçük hücreli akciğer kanseri (n=9)	p
GRP78				
Ortalama ± SD	-2.61±0.97	-3.37±1.39	-2.67±1.24	0.228
Ortanca (min-max)	-2.92 (-3.55 - - 1.50)	-3.34 (-7.19 - - 1.44)	-3.11 (-3.92 - - 0.35)	
GRP94				
Ortalama ± SD	0.20 ±1.34	0.36±1.10	1.82±1.36	0.005*
Ortanca (min-max)	-0.30 (-1.0 - - 2.48)	0.13 (-1.22 - - 2.81)	2.16 (-0.34 - - 3.67)	
Kalneksin				
Ortalama ± SD	-4.51±1.80	-3.80±1.02	-2.11±0.80	<0.001**
Ortanca (min-max)	-4.01 (-6.79 - - 2.22)	-3.76 (-6.74 - - 0.98)	-1.94 (-3.26 - - 0.98)	
Kalretikülin				
Ortalama ± SD	3.13±0.34	3.52±1.0	4.17±1.32	0.140
Ortanca (min-max)	3.29 (2.72 - - 3.41)	3.56 (0.32 - - 5.61)	4.14 (1.87 - - 5.91)	

SD: Standard Deviation; GRP78: glucose-regulated protein 78; GRP94: glucose-regulated protein 94. *Adenokarsinom KHAK karşılaştırması p=0.017; skuamöz hücreli karsinom KHAK karşılaştırması p=0.002; adenokarsinom skuamöz hücreli karsinom karşılaştırması p=0.781. ** Adenokarsinom KHAK karşılaştırması p<0.001; skuamöz hücreli karsinom KHAK karşılaştırması p<0.001; adenokarsinom skuamöz hücreli karsinom karşılaştırması p=0.172.

Akciğer kanserinin hücre tipleri arasında GRP94 ve kalneksin gen ifade seviyelerinin farklı olduğu (sırasıyla, p=0.005 ve p<0.001), bu farkın KHAK'dan kaynaklandığı hem GRP94 hem de kalneksin gen ifade seviyelerinin diğer hücre tiplerine göre KHAK'da düşük olduğu, buna karşın adenokarsinom ile skuamöz hücreli karsinom arasında fark olmadığı saptandı. GRP94'ün adenokarsinomda KHAK'ne göre 3.07 kat, skuamöz hücreli karsinomda KHAK'ne göre 2.75 kat, kalneksinin adenokarsinomda

KHAK'ne göre 5.28 kat, skuamöz hücreli karsinomda KHAK'ne göre 3.23 kat daha fazla ifade edildiği saptandı.

Tablo 4.9. Akciğer kanserli hastaların evrelerine göre GRP78, GRP94, kalneksin ve kalretikülin gen ifade seviyelerinin karşılaştırılması.

	Evre I-II-III A (n=7)	Evre IIIB-C (n=15)	Evre IVA-B (n=30)	p
GRP78				
Ortalama ± SD	-3.63±1.92	-3.05±1.21	-3.14±1.29	0.634
Ortanca (min-max)	-3.45 (-7.19 - - 1.55)	-3.11 (-4.89 - - 1.49)	-3.23 (-6.05 - - 0.35)	
GRP94				
Ortalama ± SD	0.82 ±1.40	0.40±1.16	0.64±1.34	0.751
Ortanca (min-max)	0.25 (-0.86 - 2.70)	0.21 (-1.11 - 2.81)	0.22 (-1.22 - 3.67)	
Kalneksin				
Ortalama ± SD	-4.00±1.33	-3.84±1.20	-3.34±1.28	0.303
Ortanca (min-max)	-3.56 (-5.80 - - 2.22)	-3.71 (-6.74 - - 1.98)	-3.56 (-6.79 - - 0.98)	
Kalretikülin				
Ortalama ± SD	3.18±0.74	3.49±1.33	3.74±0.95	0.412
Ortanca (min-max)	3.26 (1.93 - 4.12)	3.67 (0.32-5.61)	3.56 (1.87 - 5.91)	

SD: Standard Deviation; GRP78: glucose-regulated protein 78; GRP94: glucose-regulated protein 94.

Hastaların evrelerine göre GRP78, GRP94, kalneksin ve kalretikülin gen ifade seviyeleri arasında fark tespit edilmedi.

Tablo 4.10. Akciğer kanserli hastaların metastaz durumlarına göre GRP78, GRP94, kalneksin ve kalretikülin gen ifade seviyelerinin karşılaştırılması.

	Metastaz		p
	Yok (n=22)	Var (n=30)	
GRP78			
Ortalama ± SD	-3.24±1.45	-3.14±1.29	0.804
Ortanca (min-max)	-3.24 (-7.19 - -1.49)	-3.23 (-6.05 - -0.35)	
GRP94			
Ortalama ± SD	0.53 ±1.22	0.64±1.34	0.767
Ortanca (min-max)	0.23 (-1.11 - 2.81)	0.22 (-1.22 - 3.67)	
Kalneksin			
Ortalama ± SD	-3.89±1.21	-3.34±1.28	0.126
Ortanca (min-max)	-3.69 (-6.74 - -1.98)	-3.56 (-6.79 - -0.98)	
Kalretikülin			
Ortalama ± SD	3.39±1.17	3.74±0.95	0.242
Ortanca (min-max)	3.34 (0.32 - 5.61)	3.56 (1.87 - 5.91)	

SD: Standard Deviation; GRP78: glucose-regulated protein 78; GRP94: glucose-regulated protein 94.

Akciğer kanserli hastaların metastaz durumlarına göre GRP78, GRP94, kalneksin ve kalretikülin gen ifade seviyeleri arasında fark tespit edilmedi.

Hastaların gen ifade seviyelerinin ortanca değeri kestirim değeri olarak alındı ve kestirim değerinin altında ve üstünde kalan hastaların sağ kalımları karşılaştırıldı. Hastaların GRP78, GRP94, kalneksin ve kalretikülin gen ifade seviyelerine göre sağ kalım süreleri Tablo 4.11’de verilmiştir.

Tablo 4.11. Akciğer kanserli hastaların GRP78, GRP94, kalneksin ve kalretikülin gen ifade seviyelerinin düzeyine göre sağ kalım sürelerinin karşılaştırılması.

	Ortanca sağ kalım±SE, ay (%95 GA)	p
GRP78		
≥-3.23	7.00±4.46 (0.00-15.75)	0.412
<-3.23	10.00±3.82 (2.50-17.50)	
GRP94		
≥0.21	12.00±2.55 (7.00-17.00)	0.443
<0.21	7.00±3.19 (0.75-13.25)	
Kalneksin		
≥-3.64	8.00±2.55 (3.00-13.00)	0.435
<-3.64	12.00±3.05 (6.02-17.98)	
Kalretikülin		
≥3.51	9.00±1.91 (5.25-12.75)	0.425
<3.51	12.00±7.65 (0.00-26.99)	

GRP78: glucose-regulated protein 78; GRP94: glucose-regulated protein 94; SE: Standard Error; GA: Güven Aralığı.

Hastaların GRP78, GRP94, kalneksin ve kalretikülin gen ifade seviyelerine göre sağ kalım süreleri arasında anlamlı fark tespit edilemedi.

4. 2. GRP78, GRP94, Kalneksin ve Kalretikülin Protein Seviyeleri

Çalışmanın ikinci aşamasında başka bir hasta grubunun serumunda ve 30 kişiden oluşan sağlıklı kontrol grubunda GRP78, GRP94, kalneksin ve kalretikülin protein seviyeleri belirlenerek önce iki grup kıyaslandı ve hastalarda söz konusu proteinlerin birbirleriyle olan korelasyonuna bakıldı. Daha sonra protein seviyeleri ile akciğer kanserli hastaların yaş, cins, aktif sigara içme ve ko-morbidite durumları, histopatolojik alt tipleri, evreleri, metastaz durumları ve sağ kalımları arasındaki ilişki değerlendirildi.

Akciğer kanserli 140 hastanın yaş ortalamaları 64.37±9.11, 30 kontrol grubunun yaş ortalamaları 56.97±9.81; kadın / erkek oranı sırasıyla 14/126 ve 5/25 idi. Tablo 4.12.'de akciğer kanserli 140 hastanın klinik özellikleri yer almaktadır.

Tablo 4.12. GRP78, GRP94, kalneksin ve kalretikülin protein seviyeleri değerlendirilen akciğer kanserli hastaların klinik özellikleri.

Özellikler	n=140
Yaş, n (%)	
<65	67 (47.9)
≥65	73 (52.1)
Aktif sigara içiciliği, n (%)	
Var	84 (60.0)
Yok*	56 (40.0)
Ko-morbidite, n (%)	
Var	82 (59.0)
Yok	58 (41.0)
Karnofsky performans skoru, median (min-max)	90 (70-100)
Histopatolojik alt tip, n (%)	
Skvamöz hücreli karsinom	75 (53.6)
Adenokarsinom	31 (22.1)
Küçük hücreli akciğer kanseri	34 (24.3)
Evre, n (%)	
I-II-III A	15 (10.7)
IIIB-C	35 (25.0)
IVA-B	90 (64.3)
Metastaz, n (%)	
Var	90 (64.3)
Yok	50 (35.7)

Tablo 4.12. (Devam ediyor).

Özellikler	n=140
Metastaz yeri, n (%)**	
Karşı akciğer	28 (20.0)
Plevra	29 (20.7)
Perikard	7 (5.0)
Ekstratorasik lenf nodu	20 (14.3)
Beyin	16 (11.4)
Kemik	39 (27.9)
Karaciğer	23 (16.4)
Sürrrenal	18 (12.9)
Kemik iliği	1 (0.7)
Yumuşak doku	1 (0.7)
Tedavi şekli, n (%)	
Destek tedavisi	15 (10.7)
Kemoterapi	57 (40.8)
Kemoradyoterapi	58 (41.4)
Cerrahi	3 (2.1)
Cerrahi – kemoterapi- radyoterapi	1 (0.7)
Radyoterapi	1 (0.7)
Kemoterapi – tirozin kinaz inhibitörü	5 (3.6)
Kemoterapi cevabı***	
İlerleyen hastalık	18
Durağan hastalık + kısmi cevap	89

*: 6 hasta hiç sigara içmemişti. **: Bazı hastalarda birden fazla metastaz mevcuttu. ***: 15 hasta destek tedavisi, 3 hasta cerrahi, 1 hasta radyoterapi aldığı, 14 hastanın da veri eksikliği olduğu için kemoterapi cevabı belirlenemedi.

Akciğer kanserli hastalar ile kontrol grubunun GRP78, GRP94, kalneksin ve kalretikülin protein seviyelerinin karşılaştırılması Tablo 4.13.'te verilmiştir.

Tablo 4.13. Çalışma grubunun ELISA ile GRP78, GRP94, kalneksin ve kalretikülin protein seviyelerinin karşılaştırılması.

	Hasta grubu (n=140)	Kontrol grubu (n=30)	p
GRP78, ng/ml			
Ortalama ± SD	8.74±9.68	5.70±1.95	0.05
Min-max	2.18-60.28	2.53-9.48	
Ortanca (IQR)	5.33 (4.19-7.51)	5.52 (4.31-7.08)	
GRP94, ng/ml			
Ortalama ± SD	2.52±2.83	1.69±0.65	0.029
Min-max	0.46-23.53	0.67-3.33	
Ortanca (IQR)	1.69 (1.41-2.17)	1.61 (1.25-2.01)	
Kalneksin, ng/ml			
Ortalama ± SD	22.17±30.06	13.75±3.76	0.002
Min-max	3.50-170.65	8.88-29.37	
Ortanca (IQR)	12.31 (10.15-15.54)	13.47 (11.82-14.70)	
Kalretikülin, ng/ml			
Ortalama ± SD	375.01±412.70	245.42±68.59	0.025
Min-max	48.59-2711.60	141.37-414.55	
Ortanca (IQR)	250.73 (199.38-357.43)	250.52 (182.64-285.86)	

SD: Standard Deviation; GRP78: glucose-regulated protein 78; GRP94: glucose-regulated protein 94; IQR: Inter Quantile Range.

GRP78, GRP94, kalneksin ve kalretikülin protein seviyeleri akciğer kanserli hastalarda kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek saptandı (Tablo 4.13.).

Akciğer kanserli hastalarda GRP78, GRP94, kalneksin ve kalretikülin protein seviyeleri arasındaki korelasyon değerlendirildi (Tablo 4.14.).

Tablo 4.14. Akciğer kanserli hastaların GRP78, GRP94, kalneksin ve kalretikülin protein seviyeleri arasındaki korelasyon değerleri.

	GRP78	GRP94	Kalneksin	Kalretikülin
GRP78 r; p				
GRP94 r; p	0.702; <0.001			
Kalneksin r; p	0.714; <0.001	0.743; <0.001		
Kalretikülin r; p	0.742; <0.001	0.604; <0.001	0.744; <0.001	

GRP78: glucose-regulated protein 78; GRP94: glucose-regulated protein 94.

Hasta grubunda GRP78, GRP94, kalneksin ve kalretikülin protein seviyelerinin birbirleriyle olan korelasyonu pozitif yönde ve güçlü olarak değerlendirildi (tümü için $p < 0.001$).

Akciğer kanserli hastaların GRP78, GRP94, kalneksin ve kalretikülin protein seviyelerinin, yaş, cins, aktif sigara içiciliği ve ko-morbidite durumlarına göre değişimi Tablo 4.15-4.18'de verilmiştir.

Tablo 4.15. Akciğer kanserli hastaların yaş gruplarına göre GRP78, GRP94, kalneksin ve kalretikülin protein seviyelerinin karşılaştırılması.

	< 65 (n=67)	≥ 65 (n=73)	p
GRP78, ng/ml			
Ortalama ± SD	10.84±11.43	6.87±7.40	0.015
Ortanca (min-max)	5.81 (2.18-50.93)	5.06 (2.48-60.28)	
GRP94, ng/ml			
Ortalama ± SD	3.03±2.95	2.05±2.65	0.011
Ortanca (min-max)	1.94 (0.70-15.52)	1.61 (0.46-23.53)	
Kalneksin, ng/ml			
Ortalama ± SD	28.49±37.15	16.36±20.18	0.026
Ortanca (min-max)	14.03 (3.50-164.12)	11.64 (5.30-170.65)	
Kalretikülin, ng/ml			
Ortalama ± SD	460.60±544.02	301.31±229.96	0.109
Ortanca (min-max)	256.50 (48.59-2711.60)	247.21 (91.80-1491.40)	

SD: Standard Deviation; GRP78: glucose-regulated protein 78; GRP94: glucose-regulated protein 94.

GRP78, GRP94 ve kalneksin protein seviyelerinin 65 yaş altı hastalarda 65 yaş ve üstü gruba göre anlamlı olarak daha yüksek olduğu (sırasıyla p=0.015, p=0.011 ve p=0.026), buna karşın kalretikülin seviyelerindeki yüksekliğin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı (Tablo 4.15).

Tablo 4.16. Akciğer kanserli hastaların cinsiyete göre GRP78, GRP94, kalneksin ve kalretikülin protein seviyelerinin karşılaştırılması.

	Erkek (n=126)	Kadın (n=14)	p
GRP78, ng/ml			
Ortalama ± SD	8.24±8.49	13.44±17.19	0.441
Ortanca (min-max)	5.22 (2.18-50.93)	5.82 (2.26-60.28)	
GRP94, ng/ml			
Ortalama ± SD	2.32±2.13	4.25±6.21	0.344
Ortanca (min-max)	1.69 (0.46-15.52)	1.67 (0.72-23.53)	
Kalneksin, ng/ml			
Ortalama ± SD	20.47±25.40	37.46±56.35	0.427
Ortanca (min-max)	12.31 (3.50-155.76)	13.54 (4.83-170.65)	
Kalretikülin, ng/ml			
Ortalama ± SD	362.05±384.79	506.72±640.19	0.426
Ortanca (min-max)	249.38 (48.59-2711.60)	267.54 (114.14-2212.68)	

SD: Standard Deviation; GRP78: glucose-regulated protein 78; GRP94: glucose-regulated protein 94.

Hastaların GRP78, GRP94, kalneksin ve kalretikülin protein seviyelerinin her iki cinsten benzer olduğu saptandı.

Tablo 4.17. Akciğer kanserli hastaların aktif sigara içme durumlarına göre GRP78, GRP94, kalneksin ve kalretikülin protein seviyelerinin karşılaştırılması.

	Aktif sigara içiciliği		p
	Yok (n=56)	Var (n=84)	
GRP78, ng/ml			
Ortalama ± SD	6.71±5.24	10.08±11.56	0.076
Ortanca (min-max)	5.11 (2.48-31.05)	5.40 (2.18-60.28)	
GRP94, ng/ml			
Ortalama ± SD	1.92±1.20	2.91±3.47	0.036
Ortanca (min-max)	1.76 (0.46-8.56)	1.65 (0.70-23.53)	
Kalneksin, ng/ml			
Ortalama ± SD	16.97±21.96	25.63±34.10	0.039
Ortanca (min-max)	11.72 (4.83-164.12)	13.13 (3.50-170.65)	
Kalretikülin, ng/ml			
Ortalama ± SD	350.29±357.34	392.21±448.65	0.666
Ortanca (min-max)	240.75 (91.84-2212.68)	254.12 (48.59-2711.60)	

SD: Standard Deviation; GRP78: glucose-regulated protein 78; GRP94: glucose-regulated protein 94.

Aktif sigara içen hastaların GRP94 ve kalneksin seviyeleri hiç içmeyen veya içip bırakan hastalara göre anlamlı olarak daha yüksek saptandı (sırasıyla p=0.036 ve p=0.039). GRP78 ve kalretikülindeki artış ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

Tablo 4.18. Akciğer kanserli hastaların ko-morbidite durumlarına göre GRP78, GRP94, kalneksin ve kalretikülin protein seviyelerinin karşılaştırılması.

	Ko-morbidite		p
	Yok (n=58)	Var (n=82)	
GRP78, ng/ml			
Ortalama ± SD	9.81±9.97	8.01±9.47	0.200
Ortanca (min-max)	5.58 (2.26-40.07)	5.11 (2.18-60.28)	
GRP94, ng/ml			
Ortalama ± SD	2.66±2.63	2.42±2.98	0.431
Ortanca (min-max)	1.73 (0.70-15.52)	1.66 (0.46-23.53)	
Kalneksin, ng/ml			
Ortalama ± SD	25.06±33.20	20.12±27.64	0.386
Ortanca (min-max)	13.17 (3.50-164.12)	12.02 (5.30-170.65)	
Kalretikülin, ng/ml			
Ortalama ± SD	432.70±517.61	334.84±317.74	0.480
Ortanca (min-max)	247.07 (48.59-2711.60)	252.50 (91.84-2153.02)	

SD: Standard Deviation; GRP78: glucose-regulated protein 78; GRP94: glucose-regulated protein 94.

Ko-morbiditesi olan ve olmayan hastaların protein seviyeleri arasında fark saptanmadı (Tablo 4.18.).

Akciğer kanserli hastaların GRP78, GRP94, kalneksin ve kalretikülin protein seviyelerinin histopatolojik alt tip, evre ve metastaz durumunu ile ilişkisi Tablo 4.19-4.21’de verilmiştir.

Tablo 4.19. Akciğer kanserli hastaların histopatolojik alt tiplerine göre GRP78, GRP94, kalneksin ve kalretikülin protein seviyelerinin karşılaştırılması.

	Adenokarsinom (n=31)	Skvamöz hücreli karsinom (n=75)	Küçük hücreli akciğer kanseri (n=34)	p
GRP78, ng/ml				
Ortalama ± SD	9.20±8.62	8.06±7.72	9.82±13.83	0.636
Ortanca (min-max)	6.17 (2.26- 40.07)	5.22 (2.48- 38.18)	5.17 (2.18- 60.28)	
GRP94, ng/ml				
Ortalama ± SD	2.30±1.77	2.45±2.38	2.86±4.26	0.988
Ortanca (min-max)	1.59 (0.72- 8.56)	1.81 (0.46- 15.52)	1.59 (0.89- 23.53)	
Kalneksin, ng/ml				
Ortalama ± SD	24.53±31.02	20.42±26.44	23.86±36.70	0.691
Ortanca (min-max)	13.49 (3.91- 164.12)	12.80 (3.50- 155.76)	11.07 (5.30- 170.65)	
Kalretikülin, ng/ml				
Ortalama ± SD	483.56±550.04	325.27±266.31	385.15±517.71	0.328
Ortanca (min-max)	245.78 (114.14- 2212.68)	254.26 (48.59- 1491.40)	250.73 (95.36- 2711.60)	

SD: Standard Deviation; GRP78: glucose-regulated protein 78; GRP94: glucose-regulated protein 94.

Akciğer kanserli hastaların hücre tiplerine göre GRP78, GRP94, kalneksin ve kalretikülin protein seviyeleri arasında anlamlı fark bulunamadı.

Tablo 4.20. Akciğer kanserli hastaların evrelerine göre GRP78, GRP94, kalneksin ve kalretikülin protein seviyelerinin karşılaştırılması.

	Evre I-II-III A (n=15)	Evre IIIB-C (n=35)	Evre IVA-B (n=90)	p
GRP78, ng/ml				
Ortalama ± SD	7.59±4.69	9.63±12.18	8.59±9.27	0.932
Ortanca (min-max)	6.09 (2.66-17.85)	5.17 (2.26-60.28)	5.39 (2.18-50.93)	
GRP94, ng/ml				
Ortalama ± SD	2.16±0.90	3.07±4.19	2.35±2.34	0.517
Ortanca (min-max)	2.06 (1.04-4.02)	1.72 (0.46-23.53)	1.60 (0.70-15.52)	
Kalneksin, ng/ml				
Ortalama ± SD	15.79±9.07	22.98±29.56	22.91±32.50	0.739
Ortanca (min-max)	11.90 (8.71-41.51)	13.39 (3.50-170.65)	11.64 (3.91-0.164.12)	
Kalretikülin, ng/ml				
Ortalama ± SD	315.27±130.90	370.30±325.29	387.43±473.76	0.901
Ortanca (min-max)	295.61 (177.12-695.02)	270.89 (48.59-1476.49)	237.99 (91.84-2711.60)	

SD: Standard Deviation; GRP78: glucose-regulated protein 78; GRP94: glucose-regulated protein 94.

Akciğer kanserli hastaların evrelerine göre GRP78, GRP94, kalneksin ve kalretikülin protein seviyeleri arasında anlamlı fark bulunamadı.

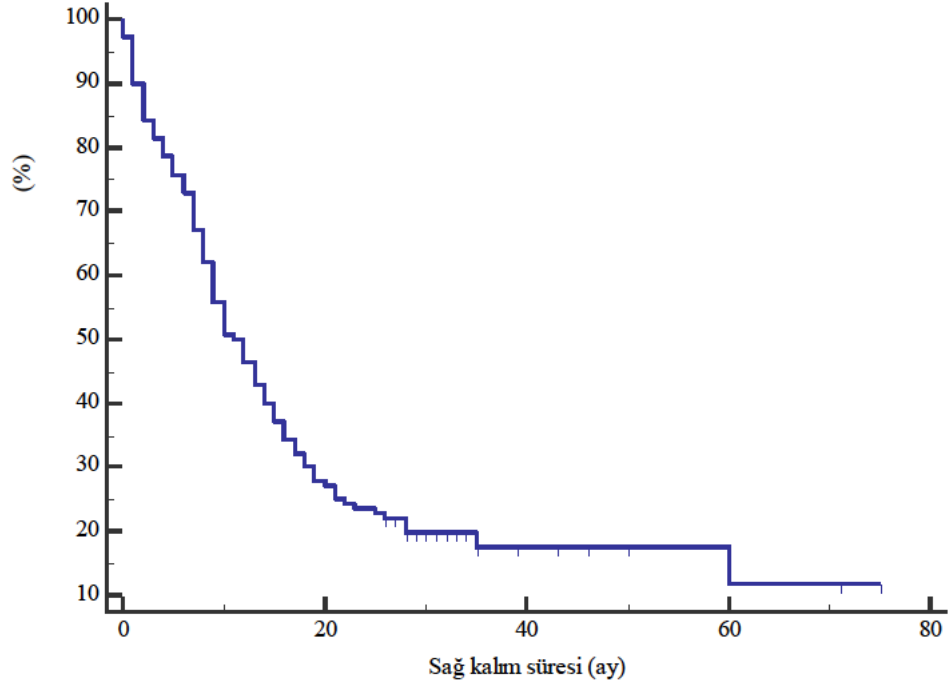
Tablo 4.21. Akciğer kanserli hastaların metastaz durumlarına göre GRP78, GRP94, kalneksin ve kalretikülin protein seviyelerinin karşılaştırılması.

	Metastaz		p
	Yok (n=50)	Var (n=90)	
GRP78, ng/ml			
Ortalama ± SD	9.00±10.46	8.59±9.27	0.711
Ortanca (min-max)	5.22 (2.26-60.28)	5.39 (2.18-50.93)	
GRP94, ng/ml			
Ortalama ± SD	2.81±3.55	2.35±2.34	0.263
Ortanca (min-max)	1.97 (0.46-23.53)	1.60 (0.70-15.52)	
Kalneksin, ng/ml			
Ortalama ± SD	20.82±25.32	22.91±32.50	0.658
Ortanca (min-max)	13.13 (3.50-170.65)	11.64 (3.91-164.12)	
Kalretikülin, ng/ml			
Ortalama ± SD	353.45±280.00	387.43±473.76	0.653
Ortanca (min-max)	271.10 (48.59-1476.49)	237.99 (91.84-2711.60)	

SD: Standard Deviation; GRP78: glucose-regulated protein 78; GRP94: glucose-regulated protein 94.

Akciğer kanserli hastaların metastaz durumlarına göre GRP78, GRP94, kalneksin ve kalretikülin protein seviyeleri arasında anlamlı fark bulunamadı.

Çalışmaya dahil edilen akciğer kanserli hastaların ortanca sağ kalım süreleri 11.0 ± 1.25 (%95CI: 8.54-13.46) ay idi (Şekil 4.1). Çalışmanın tamamlandığı Aralık 2020 tarihi itibarıyla toplam 26 hasta hayattaydı. Hayatta olan hastaların ortalama takip süreleri 35.81 ± 12.42 ay, ortanca takip süreleri 31.50 (26-75) aydı.



Şekil. 4.1. Çalışmanın ikinci aşamasında yer alan çalışma grubunun sağ kalım eğrisi.

Akciğer kanserli hastaların GRP78, GRP94, kalneksin ve kalretikülin protein seviyelerinin sağ kalım ile ilişkisi değerlendirildi. Kontrol grubunun ortanca değerleri temel alınarak yapılan analiz sonuçları Tablo 4.22’de yer almaktadır.

Tablo 4.22. Akciğer kanserli hastaların GRP78, GRP94, kalneksin ve kalretikülin protein seviyelerine göre sağ kalım sürelerinin karşılaştırılması.

	Ortanca sağ kalım±SE, ay (%95 GA)	p
GRP78, ng/ml		
≥5.52	14.00±2.18 (9.72-18.28)	0.271
<5.52	10.00±1.30 (7.44-12.55)	
GRP94, ng/ml		
≥1.69	14.00±2.30 (9.49-18.50)	0.072
<1.69	10.00±1.38 (7.29-12.71)	
Kalneksin, ng/ml		
≥13.47	14.00±2.74 (8.63-19.37)	0.350
<13.47	10.00±1.38 (7.29-12.71)	
Kalretikülin, ng/ml		
≥250.52	16.00±1.72 (12.62-19.38)	0.009
<250.52	8.00±1.38 (5.29-10.71)	

GRP78: glucose-regulated protein 78; GRP94: glucose-regulated protein 94; SE: Standard Error; GA: Güven Aralığı.

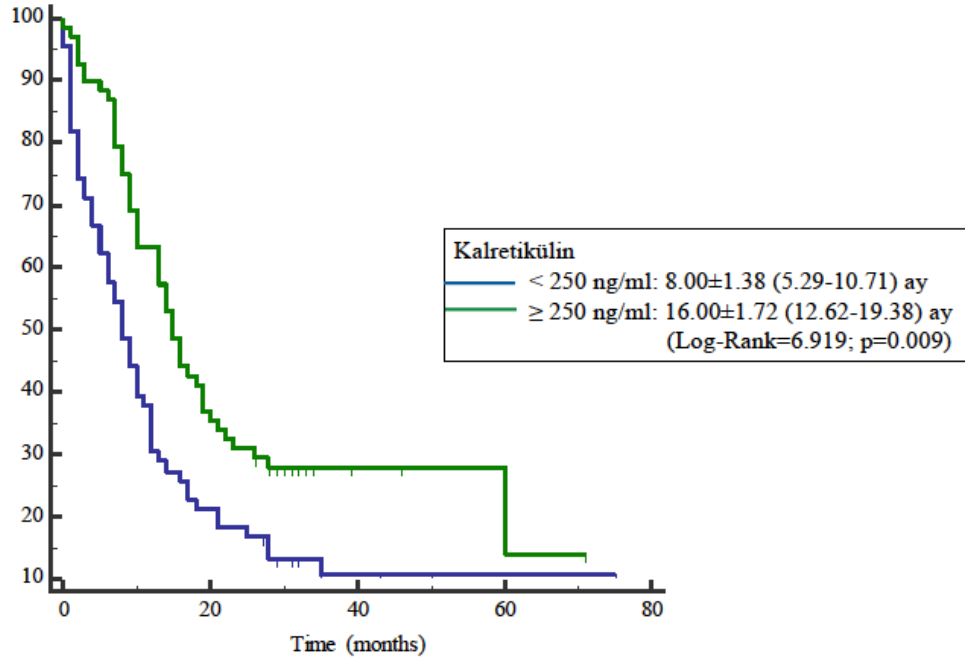
GRP78, GRP94 ve kalneksin protein seviyelerinin sağ kalımla ilişkisi saptanamadı. Ancak kalretikülin seviyeleri 250.52 ng/ml ve üzerinde olan hastalarda ortanca sağ kalım±SE (%GA) 16.00±1.72 (12.62-19.38) ay iken kestirim değerinden daha düşük kalretikülin değeri olanlarda 8.00±1.38 (5.29-10.71) ay idi (Log-Rank=6.919; p=0.009). Sağ kalım üzerine etkili değişkenler ile düzeltme Cox regresyon analizi ile yapıldı. Sağ kalım üzerine etkili histopatolojik alt tip, metastaz durumu ve kemoterapi cevabına göre düzeltildikten sonra kalretikülinin sağ kalım üzerine etkisi değerlendirildi. Çoklu regresyon modeli Tablo 4.23.'de yer almaktadır.

Tablo 4.23. Hastaların sağ kalımına etki eden değişkenlerin çoklu regresyon modeli.

Değişkenler	HR (%95GA)	p
Histopatolojik alt tip	1.761 (1.281-2.421)	<0.001
Metastaz	2.236 (1.424-3.511)	<0.001
Kemoterapi cevabı	0.374 (0.207-0.674)	0.001
Kalretikülin	1.659 (1.098-2.506)	0.016

HR: Hazard Ratio; GA: Güven Aralığı.

Sağ kalım üzerine etkili değişkenlere göre düzeltme yaptıktan sonra da kalretikülinin sağ kalım üzerinde etkili olduğu saptandı [HR (%95CI): 1.659 (1.098-2.506); p=0.016] (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. Akciğer kanserli hastaların serum kalretikülin seviyelerine göre Kaplan-Meier sağ kalım eğrisi.

5. TARTIŞMA

Çalışmada ilk aşamada ER şaperon proteinleri GRP78, GRP94, kalneksin ve kalretikülinin akciğer kanserli hastaların tümör dokularındaki gen ifade seviyeleri, birbirleriyle olan korelasyonları ve hastaların klinik verileri ve sağ kalım süreleriyle ilişkisi değerlendirildi. Yapılan korelasyon analizinde yalnızca kalneksinin gen ifade seviyesinin GRP78 ve GRP94 ile korelasyon gösterdiği, bunun dışında diğer genler arasında herhangi bir korelasyon olmadığı saptandı. Gen ifade seviyelerinin klinik verilerle ilişkisinde ise yalnızca GRP94 ve kalneksin seviyelerinin hücre tipleri arasında değiştiği, küçük hücreli akciğer kanserinde adenokarsinom ve skuamöz hücreli karsinoma göre daha düşük oldukları, buna karşın adenokarsinom ve skuamöz hücreli karsinom arasında farklı olmadıkları görüldü. Bunun dışında diğer klinik bulgularla gen ifade seviyeleri arasında herhangi bir ilişki saptanamadı. İkinci aşamada ise GRP78, GRP94, kalneksin ve kalretikülinin sağlıklı kontrol grubuna göre akciğer kanserli hastaların serumlarındaki protein seviyeleri, birbirleriyle olan korelasyonları ve hastaların klinik verileri ve sağ kalım süreleriyle ilişkisi değerlendirildi. Çalışılan tüm şaperon proteinlerinin seviyeleri akciğer kanserli hastalarda sağlıklı kontrol grubuna göre daha yüksekti ve her biri diğeriyle korelasyon göstermekteydi. Klinik verilerle ilişkilerine bakıldığında GRP78, GRP94 ve kalneksin protein seviyelerinin 65 yaş altı hastalarda 65 yaş ve üstü gruba göre daha yüksek olduğu, buna karşın kalretikülinin farklı olmadığı saptandı. Aktif sigara içen grupta GRP94 ve kalneksin protein seviyeleri daha yüksekti. Kontrol grubunun ortanca değerlerine göre yapılan sağ kalım değerlendirmesinde kalretikülin protein seviyesi yüksek olan hastalarda sağ kalımın daha iyi olduğu, bu etkinin histopatolojik alt tip, metastaz durumu ve kemoterapi cevabına göre düzeltme yapıldıktan sonra da devam ettiği tespit edildi.

Son iki dekatta akciğer kanserinin görüntülemesi, tanısal işlemleri, moleküler patolojisi, evrelemesi, intrabronşial tedavi ve cerrahi tedavisi konularında son derece olumlu gelişmeler olmuştur. Tüm bu gelişmelere rağmen kısa sağ kalımın iki ana nedeni olan ‘erken tanı’ ve ‘etkin tedavi’ konusunda maalesef kayda değer bir gelişme sağlanamamıştır. Çalışmamızda akciğer kanserli hastalarda ER şaperon proteinleri olan GRP78, GRP94, kalneksin ve kalretikülin seviyeleri belirlenerek klinik-patolojik özellikler ve sağ kalım ile ilişkisi analiz edilmiş ve akciğer kanserli hastaların tanı ve klinik sonuçlarının belirlenmesine katkısı değerlendirilmiştir. Sonuçlar bu alt başlıklar dikkate alınarak tartışılmıştır.

5. 1. Akciğer Kanserli Hastalarda GRP78, GRP94, Kalneksin ve Kalretikülin Seviyeleri

Tanı sırasında hastaların yaklaşık %75-80'i lokal ileri / ileri evre hastalığa sahiptir. Bu sorunun üstesinden gelebilmek, hastaları erken evrede yakalayarak etkili bir biçimde tedavi edebilmek için tarama yapmak makul görünmektedir. Bir tarama çalışmasından beklenen kullanılacak tarama testinin etkin, güvenli, kolay ve ucuz olmasıdır. Günümüzde akciğer kanserinde bunlara karşılık gelen ideal bir tarama yöntemi henüz mevcut değildir. Balgam sitolojisi ve direkt grafi ile tarama yapmanın faydalı olmadığı bilinen bir durumdur. İlk büyük çalışması 2010 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan, daha sonra başta Avrupa ülkeleri olmak üzere dünyanın çeşitli ülkelerinde de gerçekleştirilen düşük doz tomografi ile tarama çalışmaları akciğer kanserinin erken tanısı için umut verici olmuştur. Ancak çalışmalar arasında akciğer kanseri için 'riskli grup' tanımı ve bu riskli grubun 'tarama sıklığı ve süresi' bakımından farklılıklar olduğu görülmektedir (Oudkerk vd., 2017). Dolayısıyla tomografi ile hangi grubun nasıl taranacağı konusunda henüz genel kabul gören etkin bir protokol söz konusu değildir. Ayrıca düşük doz tomografi ile tarama radyasyon maruziyeti, yanlış pozitif sonuçlar ve yüksek maliyet gibi sakıncalar içermektedir.

Bir taraftan radyolojik tarama çalışmaları devam ederken, diğer taraftan da bazı bilim adamları tarafından tümörün moleküler özelliklerinin biyolojik materyallere yansımaları değerlendirilmiştir (Seijo vd., 2019). Bu amaçla kan, serum, plazma, plevra sıvısı, balgam, ekshale soluk havası ve tümör dokusu gibi örneklerde protein profili, DNA ve RNA analizleri yapılabilmektedir. Ayrıca, yakın zamanda çalışmalara konu olan farklı moleküler teknolojileri görüntüleme, radyomik ve yapay zekâ ile entegre etmek tarama ve erken tanıya farklı bir boyut getirebilir (Seijo vd., 2019; Cainap, Pop, Balacescu & Cainap, 2020). Ancak yukarıda da değinildiği üzere, düşük doz tomografi taramalarıyla belli bir noktaya kadar getirilen tarama çalışmalarında taranacak grubun (yüksek riskli grup) sınırlandırılması gerekmektedir. Moleküler yaklaşımlar düşük doz tomografi ile taranacak grubun sınırlandırılmasını hatta radyolojik tarama sıklığının belirlenmesini sağlayabilir (Sands vd., 2020). Bunun için önce kanserli kişilerle sağlıklı kontrol grupları arasındaki moleküler farklılıkları daha sonra da erken evre hastalarla ileri evre hastalar arasındaki farklılıkları saptamak makul görünmektedir.

Çalışmamızda akciğer kanserli hastalarda ER stresinde ve dolayısıyla UPR'de görev alan ER şaperon proteinleri çalışıldı. UPR, hücrenin ER içinde proteostazı

sürdüremediğinde aktive olan bir sinyal ileti yolağıdır. ER stresinde, ER lümeninde yanlış katlanmış proteinlerin birikmesine yanıt olarak, UPR dengeyi sağlamak üzere protein katlama yükünü azaltan ve ER salgılama yollarının kapasitesini artıran süreçleri yönetir. Bu düzeltici eylemler ER içindeki proteostazı geri döndürme konusunda başarısız olursa, UPR hücreyi ölüme götüren sinyalleri tetikler. Diğer taraftan kanser hücreleri, hipoksi, besin yoksunluğu, proteazom disfonksiyonu, salgılama yollarındaki artan talepler ve bunların proteinlerindeki somatik mutasyonlar dahil olmak üzere ER proteostazına yönelik birçok tehditle karşı karşıyadır. UPR hiperaktivasyonu ve süreçte rol alan şareronların arttığı, birçok solid ve hematopoietik malignitede iyi belgelenmiştir. Tümör modeline bağlı olarak, UPR aktivasyonunun hücre sağ kalımını, anjiyogenezi, enflamasyonu, invazyonu, metastazı ve kemorezistansı düzenlediği gösterilmiştir (Oakes, 2020).

Akciğer kanserli hastalarda ER moleküler şaperonlarının tümör dokusunda normal dokuya göre daha fazla ifade edildiği değişik çalışmalarda rapor edilmiştir. Ancak bu çalışmaların çoğunda BiP olarak da bilinen GRP78'in çalışıldığı (Wang vd., 2005; Kwon vd., 2018; Wu vd., 2014; Sun vd., 2012; Huang, Li, Zhao, Duan & Chen, 2018;) diğerlerinin daha az çalışıldığı (Duan & Xin, 2020; Kobayashi vd., 2015; Liu vd., 2012; Wang vd., 2017) görülmektedir.

Wang ve ark.'nın çalışmasında cerrahi uygulanan hastaların tümör dokularında ve farklı lob veya segmentte tümöre yaklaşık 3-5 cm uzaktaki bir alandan alınan normal dokuda GRP78 ve GRP94 mRNA ve protein seviyeleri değerlendirilmiştir. Çalışmada 54 akciğer kanserli hasta değerlendirilmiş ve GRP78 ile GRP94'ün ifade şeklinin benzer olduğu gösterilmiştir. Normal dokulara kıyasla tümörlü dokularda GRP78 ve GRP94'ün hem mRNA hem de protein seviyelerinde anlamlı bir aşırı ifade şekli saptanmıştır. RT-PCR analizlerinde tümörlü dokuda normal dokuya göre GRP78 seviyesinin 4 kat, GRP94 seviyesinin 3 kat daha fazla ifade edildiği, aynı şekilde protein seviyelerinin de sırasıyla 3 ve 2 kat daha fazla ifade edildiği gösterilmiştir. İmmünohistokimyasal analiz sonuçları da benzer olarak raporlanmıştır. Ayrıca, cerrahi rezeksiyon materyalinde çalışma şansı bulan araştırmacılar tümör dokusunda GRP94 ve GRP78'in aşırı ifadesini, tümörün farklılaşma derecesiyle de ilişki bulmuşlar, kötü diferansiye tümörlerde, iyi-orta derecede diferansiye tümörlere göre daha güçlü bir ifade olduğunu raporlamışlardır. Korelasyon analizinde ise, GRP94 ile GRP78 arasında pozitif bir korelasyon saptanmış, akciğer kanserinde GRP78 ve GRP94'ün ifade şeklinin benzer olduğu belirtilmiştir. Yazarlar

tarafından GRP78 ve GRP94'ün her ikisinin de kanser ve kanserin farklılaşması ile ilgili olduğu ayırıcı tanı ve klinik takipte faydalı olabilecekleri vurgulanmıştır (Wang vd., 2005).

Kwon ve ark.'nın çalışmasında akciğer kanserli hastalarda GRP78 ve XBP1 ifade seviyeleri immünohistokimya ile değerlendirilmiştir. Çalışma 369 adenokarsinom ve 246 skuamöz hücreli karsinomdan oluşan oldukça geniş bir cerrahi hasta grubunda yapılmıştır. Normal dokular cerrahi preparatlarda tümörden uzak alanlardan sağlanmıştır. Hem adenokarsinom hem de skuamöz hücreli karsinomda GRP78 ve XBP1 ifade seviyeleri normal dokuya göre daha yüksek saptanmıştır. Adenokarsinomlu hastalarda XBP1 ifadesinin *anaplastic lymphoma kinase (ALK)* translokasyonu olan hastalarda, anaplastik lenfoma kinaz translokasyonu olmayan, *epidermal growth factor receptor (EGFR)* pozitif veya negatif olanlara göre daha yüksek olduğu, GRP78 seviyesi ile ilişkili bu tip bir ilişkinin olmadığı gösterilmiştir (Kwon vd., 2018).

Wu ve ark.'nın çalışmasında KHDAK'li hastalarda, apoptozu indükleyerek tümör büyümesini baskılayıcı etkisi olduğu düşünülen *gene associated with retinoid-interferon-induced mortality-1 (GRIM-1)* ile GRP78'in ifadesi araştırılmıştır. Araştırmacılar, 23'ü skuamöz hücreli karsinom, 17'si adenokarsinom olmak üzere 40 cerrahi örnek kullanarak, KHDAK'de hem protein hem de mRNA seviyelerinde tümörden en az 5 cm uzaktan alınan normal dokulardakine kıyasla anlamlı ölçüde daha düşük GRIM-1 ifadesi rapor etmişlerdir. Buna karşın, tümör dokusunda GRP78'in hem protein hem de mRNA ifade seviyelerinin daha yüksek olduğu saptanmıştır. Benzer şekilde, KHDAK dokularında, GRIM-1 için daha zayıf boyanma, ancak GRP78 için daha güçlü boyanma gözlenmiştir. Korelasyon analizinde, protein ve mRNA ifadesinin veya GRIM-1 için immünoreaktif hücrelerin yüzdesinin GRP78'inki ile negatif korelasyon gösterdiği belirlenmiştir. Sonuç olarak, GRIM-1 ve GRP78 ifadesi insan KHDAK dokularında negatif korelasyon göstermiş ve GRP78'in GRIM-1 tarafından aşağı yönde düzenlenmesi, etkileşimleri için olası bir mekanizmayı akla getirmiştir (Wu vd., 2014).

Sun ve ark.'nın çalışmasında KHDAK dokularında GRP78 ve Bax ifadelerini saptamak, bunların karsinogenez ve KHDAK gelişimi ile ilişkilerini analiz etmek ve KHDAK hücre hattı HCC827'de GRP78 ifadesinin metastaz ve apoptoz ile ilişkisini araştırmak amaçlanmıştır. KHDAK dokularında GRP78 ve Bax'ın pozitif ifade oranları RT-PCR ile sırasıyla % 60 ve % 35 olarak saptanmıştır. KHDAK dokularında GRP78'in mRNA ve protein ifade seviyeleri, nispeten normal çevre akciğer dokularındakinden

önemli ölçüde daha yüksek, tümör farklılaşmasının derecesi ne kadar düşükse, GRP78'in mRNA ve protein ifade seviyeleri o kadar yüksek raporlanmıştır. GRP78 ve bax mRNA ifade seviyeleri arasında negatif korelasyon saptanmıştır. HCC827 hücrelerinde GRP78 siRNA'nın transfeksiyonundan sonra, GRP78 proteini önemli ölçüde azalırken, Bax protein ifade seviyesinin arttığı görülmüştür. Apoptotik hücrelerin sayısı transfekte olmayan kontrol grubunda transfekte edilmiş kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde daha yüksek saptanmıştır. GRP78 ve Bax ifade seviyelerinin, KHDAK'nin karsinogenezi ve gelişimi ile ilişkili olduğu, KHDAK hücre hattı HCC827'de siRNA interferansı ile GRP78 ifadesinin azalacağı, HCC827 hücrelerinde apoptozu teşvik edebileceği belirtilmiştir (Sun vd., 2012).

Bir başka çalışmada Huang ve ark. tarafından GRP78'in akciğer kanserinin erken teşhisindeki rolü araştırılmıştır. Akciğer kanserli hastaların plazmalarında ticari ELISA kitiyle dolaşan GRP78 seviyeleri 251 hastadan oluşan akciğer kanserli ve 105 kişiden oluşan sağlıklı kontrol grubunun plazmalarında belirlenmiştir. GRP78'in akciğer kanserinin tanısındaki rolünü tespit etmek için *receiver operating characteristic* (ROC) eğrisi kullanılmıştır. Çalışmanın sonucunda akciğer kanserli hastaların plazmalarında GRP78 seviyelerinin kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu, GRP78'in akciğer kanserli hastaları normal kişilerden ayırt etmedeki duyarlılığı %70, özgüllüğü %71 olarak belirtilmiştir. Aynı şekilde GRP78'in erken evre hastalarda (evre I) diğerlerine göre daha yüksek olduğu ve erken evre hastaları ayırt etmedeki duyarlılığının %80, özgüllüğünün %69 olduğu raporlanmıştır. Yazarlar tarafından GRP78'in akciğer kanserinin erken tanısında dolaşan biyobelirteç olarak kullanılabilceği yorumu yapılmıştır (Huang vd., 2018).

Duan ve ark.'nın yakın tarihli çalışmasında akciğer kanserinin progresyonunda ve prognozunu belirlemede GRP94'ün rolü araştırılmıştır. Önce bir program aracılığıyla veri tabanlarından mRNA ifade seviyeleri, patolojik, klinik ve sağ kalım özelliklerini içeren ham veri seti indirilmiş ve analiz edilmiştir. Toplam 13 veri seti incelenmiş, bunların 10 tanesinde akciğer kanser dokularında HSP90B1'in yukarı yönde düzenlendiği, 1 tanesinde aşağı yönde düzenlendiği, kalan ikisinde aynı düzeyde olduğu tespit edilmiştir. Daha sonra çalışmada 80 akciğer adenokarsinom hastasının dokusunda ve buna karşılık gelen normal dokuda GRP94 immünohistokimyasal boyama yapılıp ve FOXP3⁺ düzenleyici T hücresi (Treg) infiltrasyonu ile ilişkisi analiz edilmiştir. GRP94 mRNA

(HSP90B1 ile kodlanan) ve protein seviyeleri akciğer adenokarsinomunda normal doku ile karşılaştırıldığında daha yüksek saptanmıştır (Duan & Xin, 2020).

Kobayashi ve ark. çalışmalarında akciğer kanseri için sero-diyagnostik belirteç geliştirmek üzere, rastgele immünizasyon yöntemi ile akciğer adenokarsinomu - A549 hücrelerini antijen olarak kullanıp monoklonal antikor oluşturmayı hedeflemişlerdir. Elde ettikleri monoklonal antikorlardan, KU-Lad-001 koduyla belirtilen antikor, immüno-presipitasyon ve *matriks assisted lazer desorption ionization time of flight massspectrometry* analiziyle kalneksin olarak tanımlanmıştır. Araştırmacılar bu aşamadan sonra bu antikorun akciğer kanseri için bir sero-diyagnostik belirteç olarak kullanımını değerlendirmek istemişler, 195 akciğer kanseri hastası ve 100 sağlıklı kontrolden oluşan örneklerde ters-fazlı protein dizisi analizini gerçekleştirmişlerdir. Kalneksin ifade seviyeleri, akciğer kanseri hastalarında sağlıklı kontrollere göre önemli ölçüde daha yüksek bulunmuştur. ROC eğrisiyle bulunan kestirim değeri dikkate alınarak yapılan değerlendirmede % 97 özgüllük ve % 99 duyarlılık bildirilmiştir. Ayrıca, kalneksin evre I hastalıkta da tespit edildiğinden, serum kalneksin seviyeleri, akciğer kanserli hastaları sağlıklı kontrollerden ayıran ve muhtemelen akciğer kanserinin erken evrede saptanmasında faydalı olabilecek bir belirteç olarak yorumlanmıştır (Kobayashi vd., 2015).

Liu ve ark.'nın çalışmasında rekombinant fragman ile fareler aşılansarak altı klon monoklonal antikor geliştirilmiş ve karakterize edilmiştir. Daha sonra bu monoklonal antikorlar temel alınarak belirli bir sınır değer ile kemilüminesan enzim immünoassay sistemi geliştirilmiştir. Bu sistem ile 58 akciğer kanserli hastadan alınan serum örneklerinde çözümlenen kalretikülin seviyesinin, 40 sağlıklı bireyinkinden önemli ölçüde daha yüksek olduğu bulunmuştur. İmmünohistokimya ile yapılan değerlendirmede, normal akciğer hücrelerinde eser miktarda kalretikülin ifadesi varken, kalretikülinin akciğer kanseri hücrelerinin hem zarında hem de sitoplazmasında yüksek oranda ifade edildiği gösterilmiştir. Buna uygun olarak, kalretikülinin akciğer kanseri hücre zarı üzerindeki ifade seviyesi, tümör patolojik derecesi ile ilişkilendirilmiştir. Araştırmacılar çalışmalarında, akciğer kanseri hastalarının serumlarındaki kalretikülin konsantrasyonunun sağlıklı bireylerin serumlarından daha yüksek olduğunu ve akciğer kanseri hücre zarındaki kalretikülin ifade seviyesinin tümör patolojik sınıflandırması ve derecesi ile ilişkili olduğunu vurgulamışlar, kalretikülinin akciğer kanserinde bir biyobelirteç olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir (Liu vd., 2012).

Wang ve ark.'nın çalışmasında, KHDAK ve tümör içermeyen komşu akciğer dokusundan oluşan 16 çift dokuda farklı ifade edilen proteinleri tanımlamak için, etiket içermeyen kantitatif proteomikler ve sıvı kromatografi tandem kütle spektrometrisi / kütle spektrometrisi ile kantitatif proteomik analiz yapılmıştır. Tanımlanan 4047 protein arasında tümör içermeyen komşu akciğer dokularına kıyasla KHDAK'de toplam 91 proteinin (71 protein kanserli dokuda, 20 protein tümör içermeyen komşu akciğer dokusunda yüksek saptanmıştır) farklı şekilde ifade edildiği saptanmıştır. Gen ontoloji analizi, genler ve genomların Kyoto ansiklopedisi yolak analizi ve yaratıcılık yolu analizi, bu 91 proteinin kanserle ilişkili biyolojik süreçlerle ilgili olduklarını göstermiştir. Daha sonra, kalretikülin ve PDIA3, KHDAK'de 20 çift örnek kullanılarak RT-PCR ve 5 çift örnek kullanılarak western blot ile aşırı ifade edildiği doğrulanmıştır. PDIA3 ifadesiyle kalretikülin ifadesi arasındaki korelasyonun oldukça yüksek oranda olduğu gösterilmiştir (Wang vd., 2017).

Çalışmamızda doku örnekleri bronkoskopik yöntemle intrabronşial lezyondan temin edildi. Bu nedenle hasta grubu klinik pratikte karşılaştığımız hasta grubunu yansıtmaktaydı. Yani çoğunluğu skuamöz hücreli karsinom alt tipine ve lokal ileri / ileri evre hastalığa sahipti. Skuamöz hücreli karsinom çoğunlukla santral yerleşim ve intrabronşial alana doğru büyüme gösterdiği için bronkoskopi ile en çok tanı konulan alt tip oldu. Erken evre hastaların çoğunluğu periferik yerleşimli nodüler lezyonla başvuran ve tanı ve tedavi amaçlı cerrahi uygulanan hastalar oldukları için, çalışmamızda erken evreye sahip hasta oranı daha azdı.

Çalışmamızın ilk aşamasında kanserli dokuya karşın normal doku kullanılmadı. Bunun başlıca nedenlerinden biri diğer çalışmalardaki gibi cerrahi rezeksiyondan temin edilen parafin bloklar kullanılmadı. Taze donmuş tümör dokusu kullanıldı. Dolayısıyla tümörden belli bir mesafe uzakta normal akciğer dokusu sağlanamadı. Hastaların bazıları karşı akciğerden normal bronşial dokunun alınmasına onam verirken çoğunluğu vermedi. Öte yandan intrabronşial alandaki gerek kanser gerek normal hücrelerin aynı havanın solunmasıyla benzer şekilde sigara veya iç ve dış ortam hava kirliliğine maruz kalacakları ve bu durumlardan ER stresinin ve UPR'nin akut bir şekilde etkilenebilecekleri düşünüldü. Bu nedenle, literatürden edinilen bilgi dikkate alınarak ER şaperonlarının kanserli dokuda ifadelerinin artacağı kabul edildi ve birbirleriyle olan korelasyonları ile klinik ve patolojik bulgularla ilişkisi değerlendirildi. Korelasyon analizinde beklenenin dışında yalnızca kalneksinin gen ifadesinin GRP78 ve GRP94 gen ifadesi ile korelasyon

gösterdiği bunun dışında diğer şaperonlar arasında herhangi bir korelasyon olmadığı görüldü. Bronşial doku örneklerinde ER şaperonlarının gen ifadelerinin birbiriyle korelasyon göstermemesinin nedeni bronkoskopi sırasında uygulanan intrabronşial ilaçlar ve bronkoskopi forsepsinin mekanik etkisinin UPR üzerindeki akut etkisi olabilir.

Çalışmamızın ikinci aşamasında akciğer kanserli hastalar ile sağlıklı bireylerin serumlarında ER şaperonları çalışıldı ve çalışılan şaperonların tümünün hastalarda kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu ve birbirleriyle korelasyon gösterdiği saptandı. Bu bulgular daha önceki çalışmalarla uyumlu olarak, çokça çalışılan ve literatürde geniş bir yer tutan GRP78'in yanında GRP94, kalneksin ve kalretikülinin de akciğer kanserli hastalarda arttığını, dolayısıyla hasta ve normal kişilerin ayırımında faydalı olabileceğini düşündürmüştür.

5. 2. GRP78, GRP94, Kalneksin ve Kalretikülinin Akciğer Kanserli Hastaların Klinik-Patolojik Özellikleri İlişkisi

Akciğer kanserli hastaların tedavi sonuçlarına ve klinik seyirlerine etki eden faktörler arasında yaş, cins, sigara, ko-morbidite, histopatolojik alt tip, evre ve metastaz durumu yer almaktadır. Bu nedenle çalışmamızda bu faktörlere göre ER şaperonları değerlendirilmiştir.

Akciğer kanseri görülme sıklığı yaşla birlikte artmaktadır. Daha önceki bir çalışmamızda 50 yaşın altındaki akciğer kanserli hastaların bazı klinik-patolojik bulgularını yaşlı gruptan farklı bulmuştuk. Yine etyolojide rol oynayan faktörlerin lojistik regresyon modelinde, genç hastalarda mesleki risk faktörlerinin, yaşlı grupta ise sigaranın ön planda olduğunu, bu nedenle akciğer kanserinin etyopatogenezinde farklı moleküler süreçlerin rol alabileceğini ve akciğer kanseri açısından riskli meslek kollarında çalışanların tarama programlarına alınabileceğini belirtmiştik (Ak vd., 2007).

Birçok çalışmada ER şaperonları ile yaş arasındaki ilişki değerlendirilmiştir. Bunlar arasında GRP78'in (Wu vd., 2014; Uramoto vd., 2005; Sun vd., 2012), kalneksinin (Kobayashi vd., 2015) ve kalretikülinin (Wang vd., 2017; Fucikova vd., 2016) yaş ile değişmediği gösterilmiştir. Buna karşın Xu ve ark.'nın çalışmasında KHDAK'de GRP94 (HSP90B1) ifadeleri ile klinik-patolojik parametreler arasındaki korelasyon değerlendirildiğinde GRP94'ün hastaların % 65'inde yüksek derecede ifade edildiği ve 60 yaş ve altı hastalarda daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Xu vd., 2016). Çalışmamızda kalretikülin hariç diğer şaperonların serumdaki protein seviyelerinin 65

yaş altı grup ile 65 yaş ve üstü grupta farklı olduğu tespit edildi. GRP78, GRP94 ve kalneksin seviyesi genç hastalarda daha yüksekti. Daha önceki çalışmamızın sonuçlarıyla birleştirildiğinde mesleksi risk faktörü olan genç hastaların tarama çalışmalarında söz konusu şaperonların değerlendirilmesi faydalı olabilir.

Gelişmekte olan ülkelerde tütün ve tütün ürünlerinin kullanımına ve mesleksi risk faktörlerine bağlı olarak akciğer kanseri erkeklerde kadınlara göre daha fazla görülmektedir. Bizim ülkemizde de akciğer kanseri Kuzey Amerika ve Batı Avrupa Ülkelerinden farklı olarak erkeklerde daha sık görülmektedir (Ak vd, 2007; Ak vd., 2017). Kadın hastalarda akciğer kanserinin etyolojisinde farklı mekanizmaların rol oynayabileceği belirtilmektedir (Stapelfeld, Dammann & Maser, 2020). Cinsine göre ER şaperonlarının farklılık gösterebileceği düşünülebilir. Ancak değişik çalışmalarda çalışılan şaperonların hiçbiri erkek ve kadınlar arasında farklı bulunmamıştır (Wu vd., 2014; Uramoto vd., 2005; Sun vd., 2012; Kobayashi vd., 2015; Wang vd., 2017; Fucikova vd., 2016; Kim vd., 2015). Bizim çalışmamızda da literatürle uyumlu olarak cinsler arasında GRP78, GRP94, kalneksin ve kalretikülin seviyeleri arasında farklılık saptanmamıştır.

Akciğer kanseri ileri yaş hastalığı olduğu için hastalarda eşlik eden hastalık oranı yüksektir. Bu durum hastaların performans durumunu ve dolayısıyla ideal tedaviyi almasını engelleyebilir. Her iki grupta da hastalarımızın yarıdan fazlasında bir veya daha fazla eşlik eden hastalık vardı. Ancak, eşlik eden hastalıkların ER şaperonlarını etkilemediği saptandı.

Sigara şüphesiz akciğer kanserinin etyolojisindeki en önemli faktördür. Bu etyolojik ilişkiden dolayı sigara, düşük doz tomografi ile akciğer kanseri tarama çalışmalarında riskli grupların belirlenmesinde önemli bir etmendir. Aktif sigara içen ağır içicilerde sigaranın içindeki reaktif oksijen türevleri hava yolu epitelinde ve alveolar makrofajlar gibi diğer ilgili hücrelerde ER'de protein katlanmasına müdahale edip UPR'yi ortaya çıkarabilmektedir. UPR antioksidan savunma, inflamasyon, enerji metabolizması, protein sentezi, apoptoz ve hücre döngüsünün düzenlenmesinde yer alan çeşitli genlerin ifadesini değiştirebilmektedir. Bu etki hem normal hem de kanserleşmiş hücrelerde olabilir (Jorgensen vd., 2008).

Kelsen ve ark.'nın çalışmasında, kronik sigara içiminin insan akciğerinde UPR'ye neden olduğu hipotezini test etmek için karşılaştırmalı proteomik teknoloji kullanılmıştır. Üç grup insan denekten elde edilen akciğer dokusu örnekleri üzerinde çalışmalar

yapılmıştır: sigara içmeyenler, kronik sigara içenler ve eskiden sigara içip bırakanlar. Kronik sigara içicilerinden alınan akciğer örneklerinde, sigara içmeyenlere kıyasla 26 farklı şekilde ifade edilmiş protein saptanmıştır (20'si yukarı yönde, 5'i aşağı yönde ve 1'i sadece sigara içen grupta olarak). GRP78, kalretikülin, PDI ve antioksidan savunmada rol oynayan enzimleri içeren bazı UPR proteinlerinin sigara içenlerde sigara içmeyenler ve içip bırakanlar ile karşılaştırıldığında yukarı yönde düzenlendiği gösterilmiştir. Kültürlenmiş insan hava yolu epitel hücrelerinde, GRP78 ve UPR ile düzenlenen temel lösin zipper, transkripsiyon faktörleri, önemli antioksidan genlerin ifadesini artıran ATF4 ve Nrf2, sigara dumanı ekstresi ile hızla (<24 saat) artmıştır. Bu veriler, sigara dumanının insan akciğerinde başlangıçta hızlı, konsantrasyona bağlı ve sigaranın bırakılmasıyla en azından kısmen geri döndürülebilir bir UPR tepkisine neden olduğunu göstermiştir (Kelsen vd., 2008). Sigara dumanının solunmasıyla UPR'nin akut aktivasyonu başka deneysel çalışmalarda da gösterilmiştir (Park, Park, Lee, Lee & Yoon, 2019; Tan vd., 2017).

Akciğer kanserli hasta gruplarını içeren çalışmalarda sigara öyküsüne çok fazla yer verilmediği görülmektedir. GRP78 ile ilgili bir çalışmada içilen sigara miktarı ile herhangi bir ilişki tespit edilememiştir (Wu vd., 2014). Fucikova ve ark. da kalretikülin seviyesi ile sigara öyküsü arasında herhangi bir ilişki saptamamışlardır (Fucikova vd., 2016). Aktif sigara içen akciğer kanserli hastalarda saptanacak bir ER şaperonu radyolojik tarama çalışmaları için 'riskli grubun' daraltılmasında etkili olabilir. Bu düşünceden yola çıkılarak aktif sigara içenlerle hiç içmeyen veya daha önce içip bırakmış olan hastalarımızda ER şaperonlarını karşılaştırdık ve aktif sigara içen hastalarda GRP94 ile kalneksin seviyelerinin daha yüksek olduğunu tespit ettik. Bu iki şaperon radyolojik tarama çalışmalarında riskli grupların daraltılmasında faydalı olabilir ancak bundan önce daha geniş çalışmalarda doğrulanması gerekmektedir.

Histopatolojik alt tip akciğer kanserinin tedavi ve prognozunu belirleyen en önemli faktörlerden biridir. Sigara ve sigara içme özelliğindeki değişime bağlı olarak yıllar içinde histopatolojik alt tiplerde skuamöz hücreli karsinomdan adenokarsinom yönüne kayma olmuştur. Ancak KHAK'nin oranı değişmeden kalmıştır. ER şaperonlarının histopatolojik alt tiplere göre değişimi tanı ve tedaviyi yönlendirebilir. ER stresini değerlendiren çalışmaların çoğunda cerrahi örneklerin kullanıldığı, bunun bir sonucu olarak hasta gruplarının çoğunun KHDAK'li hastalardan oluştuğu dikkat çekmektedir.

KHAK'nin de değerlendirildiği çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadı. Bu nedenle, alışmamızda KHAK alt tipi de değerlendirilmiştir.

Akciğer kanserinin patolojik sınıflaması 2015 yılında gözden geçirilmiş, ayrıca adenokarsinom için alt tiplerin tanımı daha ayrıntılı olarak belirlenmiştir (Travis vd., 2015). Kim ve ark.'nın çalışmasında KHDAK, yeni sınıflamada adenokarsinom alt tipleri olarak raporlanan bronkoalveolar karsinom ve atipik adenomatöz hiperplazi'de GRP78, CHOP ve otofajik proteinler olan Beclin-1 ile LC3'n ifadesi değerlendirilmiştir. Araştırmacılar 133 KHDAK (69'u skuamöz hücreli karsinom, 56'sı invaziv adenokarsinom, 8'i diğer KHDAK), 21 bronkoalveolar karsinom, 9 atipik adenomatöz hiperplazi dokusunda bu proteinlerin adenokarsinom tmrigenезisindeki yerini araştırmak için GRP78, CHOP, Beclin-1 ve LC3'n ifadesi immünohistokimya ile değerlendirmişlerdir. Atipik adenomatöz hiperplazide invaziv formlara göre GRP78, CHOP ve Beclin-1 pozitifliği anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur. Aynı şekilde GRP78 ve Beclin-1 pozitifliği bronkoalveolar karsinomda invaziv forma göre daha düşük bulunmuştur. İnvaziv kanserlerde GRP78 ve Beclin-1 ifadesi arasında korelasyon saptanmıştır (Kim vd., 2012).

Liu ve ark.'nın çalışmasında histopatolojik alt tiplere bakıldığında serum kalretikülin seviyesi KHAK'de adenokarsinomdakinden daha düşük, hem KHAK hem de adenokarsinomda ise skuamöz hücreli karsinomdakinden daha düşük olarak saptanmıştır (Liu vd., 2012).

Bunun dışında histopatolojik alt tipler ile GRP78 (Wu vd., 2014; Uramoto vd., 2005; Sun vd., 2012), GRP94 (Wang vd., 2005; Kim vd., 2015), kalneksin (Kobayashi vd., 2015) ve kalretikülin (Fucikova vd., 2016) seviyeleri arasında herhangi bir ilişki tespit edilmemiştir.

Çalışmamızın ilk aşamasında GRP94 ile kalneksin gen ifadesinin KHAK'li hastalarda adenokarsinom ve skuamöz hücreli karsinomlu hastalara göre azaldığı, ikinci aşamadaki hastaların protein seviyelerinin ise histopatolojik alt tipler arasında farklı olmadığı saptanmıştır. Protein seviyelerinin histopatolojik alt tipler arasında farklı olmaması tarama çalışmaları gözönüne alındığında avantaj olarak değerlendirilebilir.

Evre akciğer kanserinin tedavi ve prognozunu belirleyen bir diğernemi faktördür. Evreleme aralarındaki gelişmelere paralel olarak evreleme sistemleri gözden geçirilmektedir. Maksat tedavi sonuçlarını ve hastalığın seyrini en iyingren evreleme

sistemini oluşturmaktır. Evre I-II-III olarak evrelendirilen hastalara kardiyopulmoner rezervleri iyi ise cerrahi tedavi ve gereklilik halinde adjuvan tedaviler uygulanırken, daha ileri evreye sahip hastalar hedefe yönelik tedaviler ve immünoterapi için değerlendirilmekte, az sayıda hasta bu tedaviler için uygun bulunurken, çoğu hasta kemoradyoterapi ya da kemoterapi ile tedavi edilmektedir. Ancak, akciğer kanserli hastaların çok azı erken evrede tanı alıp, cerrahi tedavi şansını yakalamaktadır. Histopatolojik alt tip tartışmasında da değinildiği üzere ER stresini ve UPR'yi değerlendiren çalışmaların çoğu cerrahi serilerde yapıldığından erken evre hastaları kapsamaktadır. Bu nedenle lokal ileri / ileri evre hastalığın da değerlendirildiği çalışmalar klinik seyir açısından yol gösterici olabilir. Çalışmamızda yer alan hastaların çoğunluğu lokal ileri /ileri evre hastalığa sahip hastalardı.

Literatüre bakıldığında bazı çalışmalarda hastalığın evresi ilerledikçe ER şaperonlarında artış olduğu raporlanmıştır. Wu ve ark.'nın çalışmasında GRP78 ifadesinin TNM evresi ile önemli ölçüde korelasyon gösterdiği, evre III ve IV'te evre I ve II'ye karşın daha yüksek olduğu raporlanmıştır (Wu vd., 2014). Sun ve ark.'nın çalışmasında da GRP78 mRNA ve protein ifade seviyelerinin ileri patolojik evrelerdeki (III-IV) hastalarda erken patolojik evrelerdeki hastalardakinden anlamlı düzeyde daha yüksek ve lenf nodu metastazı olan hastalarda lenf nodu metastazı olmayan hastalardakinden yine anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. (Sun vd., 2012). Başka bir çalışmada da tümör evresi dikkate alınarak yapılan değerlendirmede evre III'te, evre I ve II tümörlere göre daha güçlü bir GRP78 ve GRP94 ifadesi olduğu görülmüştür (Wang vd., 2005). KHDAK'de GRP94 (HSP90B1) ifadeleri ile klinik-patolojik parametreler arasındaki korelasyonun değerlendirildiği çalışmada GRP94'ün evre III-IV hastalarda ve lenf nodu metastazı olanlarda daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Xu vd., 2016). Duan ve Xin de GRP94'ün ileri evre hastalarda daha fazla ifade edildiğini belirtmişlerdir (Duan & Xin, 2020). Bunların tersine Kim ve ark.'nın çalışmasında ise GRP78 pozitif hasta oranı evre I ve II hastalarda daha fazla olarak saptanmıştır (Kim vd., 2012).

ER şaperonlarının akciğer kanserinin evresine göre değişmediğini gösteren çok sayıda çalışma da bulunmaktadır. Uramoto ve ark.'nın çalışmasında GRP78 ifadesi ile patolojik evre, patolojik T, patolojik N arasında ilişki tespit edilmemiştir (Uramoto vd., 2005). Kim ve ark.'nın çalışmasında, cerrahi rezeksiyon uygulanan 208 KHDAK'li hastadan cerrahi doku örnekleri alınıp Hsp90b ve GRP94'ün ifade seviyeleri, doku

mikroarray ve immünohistokimya ile değerlendirilmiştir. Hsp90b veya GRP94 ifadesi ile hastaların evreleri arasında herhangi bir ilişki gözlenmediği rapor edilmiştir (Kim vd., 2015). Benzer şekilde Kobayashi ve ark. akciğer kanserli hastaların serum kalneksin seviyelerini evre ve metastaz durumu gibi klinikopatolojik faktörleri de dahil ederek değerlendirmişler ve kalneksin seviyeleri ile bu faktörler arasında herhangi bir ilişki tespit etmemişlerdir. Araştırmacılar kalneksinin evre I tümörler dahil tüm evrelerde tespit edilebilmesi nedeniyle tarama amaçlı kullanılabileceğini belirtmişlerdir (Kobayashi vd., 2015). Bir başka çalışmada da kalretikülin seviyesi ile KHDAK'li hastaların tümör büyüklüğü, lenf nodu metastazı ve evresi arasında ilişki bulunamamıştır (Wang vd., 2017). Fucikova ve ark.'nın çalışması da bu bulgularla uyumlu sonuçlar rapor etmiştir (Fucikova vd., 2016).

Çalışmamızda akciğer kanserli hastaların evreleri ile ER şaperonları arasında herhangi bir ilişki tespit edemedik. Başka bir deyişle ER şaperonlarının seviyesi erken evre diyebileceğimiz evre I-II-IIIa'da diğer evrelerden farklı değildi. Kobayashi ve ark.'nın ileri sürdüğü gibi bu durum tarama çalışmaları için umut verici bir sonuç olarak değerlendirilmiştir. Benzer şekilde metastazı olan ve olmayan hastalar arasında da ER şaperonları açısından fark tespit edemedik.

5. 3. GRP78, GRP94, Kalneksin ve Kalretikülinin Prognoz Üzerine Etkisi

Akciğer kanseri tüm dünyada kanser ölümlerinin başında gelmektedir. Tüm çabalara rağmen beş yıllık sağ kalım oranları %20'nin altındadır (National Cancer Institute). Akciğer kanserli hastaların çoğu küratif tedavi şansından mahrum kalmaktadır. Küratif tedavi alamayan hastalar eğer sürücü mutasyon tespit edilirse hedefe yönelik tedavi, ya da uygun antikor düzeylerinde immünoterapi almakta, bunların dışındaki hastalar ise platin bazlı kemoterapi ile tedavi edilmektedir. Yeni nesil tedavilerle kısmen daha iyi tümör cevabı ve daha uzun sağ kalımlar elde edilirken kemoterapiye daha az sayıda (yarısından daha az) hastada cevap alınmakta ve sağ kalım kısa olmaktadır. Kemoterapi hasta açısından zor bir tedavi olduğu kadar maliyeti de yüksek bir tedavidir. Dolayısıyla hangi hastanın tedaviye cevap vereceği ve sağ kalım avantajı kazanacağını öngörülmesi önemli hale gelmektedir. Tedavi sonuçlarını ve prognozu öngören belirteçlere gereksinim bulunmaktadır. Prognoza bağımsız bir değişken olarak etki eden bir biyobelirtecin tespit edilmesi halinde onun rol aldığı yollar üzerinde hedefe yönelik yeni tedavi çalışmalarının önü açılabilir.

ER şaperonlarının prognozla ilişkisi çok sayıda çalışmaya konu olmuştur. GRP78 ile ilgili çalışmalara bakıldığında çelişkili sonuçlar olduğu görülmektedir. Kim ve ark.'nın çalışmasında GRP78 ve Beclin-1 ifadesi uzun sağ kalımla korelasyon gösteriyor iken, CHOP kısa sağ kalımla korelasyon göstermiştir. Çok değişkenli analiz sonucunda ise T evresi, TNM, nüks, CHOP, Beclin-1 ifadesi sağ kalımla ilişkili bağımsız prognostik faktörler olarak saptanmasına rağmen, GRP78 için bu durum söz konusu olamamıştır (Kim vd., 2012).

Uramoto ve ark.'nın çalışmasında akciğer kanserli hastalarda immünohistokimya ile GRP78 seviyesi ve prognozla ilişkisini tespit etmek amaçlanmıştır. Cerrahi tedavi uygulanan, evre I-III olan, toplam 132 akciğer kanserli hastanın parafin bloklarında GRP78 protein seviyeleri tespit edilmiş ve klinik değişkenler ve sağ kalım ile ilişkisi değerlendirilmiştir. Hastaların 88'inde (% 66.7) tümör hücrelerinin sitoplazmasında GRP78 ifadesi pozitif olarak tespit edilmiştir. GRP78 ifadesi pozitif olan hastaların prognozu negatif olanlara göre daha iyi olma eğilimi göstermiştir. Pozitif olan hastalarda 5-yıllık sağ kalım oranı % 52 iken negatif olanlarda % 41 olarak belirtilmiştir. Çok değişkenli analizde sonrasında da pozitif GRP78 ifadesi histopatolojik alt tip ve patolojik evreden bağımsız olarak iyi prognozu belirleyen anlamlı bir değişken olarak raporlanmıştır (Uramoto vd., 2005).

Saito ve ark.'nın çalışmasında ise akciğer adenokarsinomunun prognozu ile GRP78 ve *protein-l-isoaspartate (d-aspartyl) O-methyltransferase* (PIMT) ifadesi arasındaki ilişkinin aydınlatılması amaçlanmıştır. Cerrahi olarak rezeke edilen akciğer adenokarsinomlu 208 hastadan elde edilen parafin bloklar immünohistokimyasal analize tabi tutulmuştur. Yoğun PIMT ve GRP78 ifadelerinin hastaların yaklaşık yarısında tespit edildiği, özellikle ileri evre akciğer adenokarsinomu olan hastalarda gözlendiği belirtilmiştir. Bu çalışmada güçlü PIMT ifadesi ile GRP78 ifadesi arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon saptanmıştır. Güçlü PIMT ifadesi olan hastaların sağ kalım süreleri daha kısa bulunmuştur. Çok değişkenli Cox regresyon analizi, güçlü PIMT ve GRP78 ifadesinin, akciğer adenokarsinomunun kötü prognozunun bağımsız bir belirleyicisi olduğunu göstermiştir. Evre alt grupları dikkate alınarak analiz tekrarlandığında PIMT ifadesi tek anlamlı değişken olarak saptanmıştır. Sonuç olarak araştırmacılar, PIMT ifadesinin, cerrahi olarak rezeke edilen akciğer adenokarsinomlu olgularda erken evre de olsa adjuvan kemoterapi ihtiyacını belirlemede yardımcı olabileceğini belirtmişlerdir (Saito vd., 2016).

Kwon ve ark. yüksek GRP78 ifadesini adenokarsinomlu hastalarda ve EGFR mutasyonu olan hastalarda daha kısa hastaliksız sağ kalım ile ilişkili olarak rapor etmişlerdir. Yaş, sigara, ALK translokasyonu, EGFR mutasyonu ve XBP1 ile GRP78'in birlikte dahil edildiği çok değişkenli analizde yüksek GRP78 seviyesi EGFR mutasyonu olan adenokarsinomlu hastalarda daha kötü hastaliksız sağ kalımla ilişkili bağımsız bir faktör olarak tespit edilmiştir (Kwon vd., 2018).

Kim ve ark.'nın çalışmasında GRP94 seviyesi genel sağ kalımda bir farklılık göstermemiştir. Alt grup analizlerinde skuamöz hücreli karsinom histolojisi olan hastalarda, genel sağ kalım ve hastaliksız sağ kalım Hsp90b ifadesi yüksek grupta düşük grubuna göre anlamlı derecede daha kötü saptanmıştır. Çok değişkenli analiz ileri yaş, ileri evre hastalık ve yüksek Hsp90b ifadesini genel sağ kalım için bağımsız kötü prognostik faktörler olarak belirlemiştir. Sonuç olarak araştırmacılar Hsp90b ifadesinin kötü genel sağ kalımın yararlı bir belirteci olabileceğini, ancak bulguların doğrulanması için daha geniş prospektif çalışmalara ihtiyaç olduğunu vurgulamışlardır (Kim vd., 2015).

Duan ve ark.'nın çalışmasında yüksek GRP94 ifadesi ile kötü sağ kalım ilişkili olarak saptanmıştır. Akciğer adenokarsinom dokularında GRP94 ifadesi ve FOXP3+ Treg infiltrasyonu arasında pozitif korelasyon gösterilmiştir. A549 hücre dizilerinde GRP94 ifadesini inhibe ederek GRP94'ün akciğer adenokarsinom hücrelerinin davranışındaki rolü araştırılmıştır. Sonuçlar, GRP94'ün susturulmasının hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini ve akciğer adenokarsinom hücrelerinde kaspaz-7 ve CHOP seviyelerini artırarak apoptozu kolaylaştırdığını doğrulamıştır. *Transforming growth factor* (TGF)-beta ve SMAD2 protein seviyeleri GRP94 azalması sonrası azalmıştır. Çalışmada, akciğer adenokarsinomundaki GRP94 ifadesinin tümör ilerlemesini desteklediği ve kötü prognozu öngördüğü gösterilmiştir. Araştırmacılar tarafından GRP94'ün onkojenik rolünün, TGF-sinyal yolağının aktifleştirilmesi ile Treg infiltrasyonunun uyarılmasını içerebileceği yorumu yapılmıştır (Duan & Xin, 2020).

Xu ve ark. KHDAK'de HSP90B1 ifadeleri ile klinik-patolojik parametreler arasındaki korelasyonu ve ayrıca prognoz ilişkisini araştırmışlardır. Toplam 143 KHDAK doku örneği ve 45 kontrol doku örneği değerlendirilmiştir. HSP90B1 proteininin ifadesi immünohistokimya ile tespit edilmiştir. HSP90B1'in hastaların % 65'inde yüksek derecede ifade edildiği tespit edilmiştir. Yüksek HSP90B1 ifadesinin KHDAK hastaları için daha kısa genel sağ kalım ve hastaliksız sağ kalım ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Cox model ile sağ kalım üzerine tek değişkenli analizde etkili olan evre, histopatolojik

alt tip, lenf nodu metastazı değişkenlerine göre düzeltme yapıldıktan sonra da HSP90B1 aşırı ifadesinin hem genel sağ kalım hem de hastalısız sağ kalım için bağımsız bir kötü prognostik faktör olduğu gösterilmiştir. Araştırmacılar HSP90B1'in KHDAK seyrini öngörmek için potansiyel bir biyobelirteç olabileceğini belirtmişlerdir (Xu vd., 2016).

Okayama ve ark.'nın çalışmasında yüksek metastatik potansiyele sahip cerrahi rezeksiyon geçiren akciğer adenokarsinomlarında ifade edilen ve prognozla ilişkili olabilecek proteinlerin belirlenmesi amaçlanmıştır. Cerrahiden sonraki 5 yıl içinde nüks gelişen erken evre akciğer adenokarsinom hastaları kötü prognoz grubu olarak tanımlanmıştır. Kötü prognoz grubunda 8, diğer grupta 13 hasta değerlendirilmiştir. Hastaların dokularından kanserli alanlar lazer yakalama mikro diseksiyonu yöntemi ile izole edilmiştir. *Shotgun liquid chromatography - tandem mass spectrometry* analizi ile bu kanserli dokularda toplam 875 protein tespit edilmiş ve tanımlanmıştır. Rölatif kantitatif analiz ile nüks gelişmeyen hastalardan oluşan iyi prognoz grubuna göre kötü prognoz grubunda 17 proteinin farklı olarak ifade edildiği ortaya çıkarılmıştır. Bunlar arasında, western blot analizi ile doğrulanan 14-3-3 beta / alfa ve kalneksinin kötü prognoz grubunda daha fazla ifade edildiği, potansiyel olarak tümör nüksü ve akciğer kanserinin malign özelliklerinde rol aldığı gösterilmiştir. İmmünolojik analizlerle de bu proteinlerin hastalıkla ilişkisi doğrulanmıştır. A549 kullanılarak bir hücre kültürü modelinde, 14-3-3 beta / alfa veya kalneksinin hedeflenerek baskılanması sonucu proliferasyon, invazyon ve göçün azaldığı saptanmıştır. Sonuç olarak araştırmacılar, her iki proteinin de akciğer kanserinin kötü prognozuna katkıda bulunan malign özelliklerinin belirlenmesinde rol oynayabileceğini belirtmişlerdir (Okayama vd., 2014).

Akciğer kanserinde ER şaperonlarından prognozla ilişkisi en çok araştırılan kalretikülin olmuştur. Birçok çalışmada kalretikülinin iyi prognozla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Kalretikülin seviyelerinin yüksek olması ile tümör mikro çevresinde lenfosit infiltrasyonu yüzdesinin fazla olduğu over, meme, kolorektal kanserler gibi diğer kanserlerde de gösterilmiş, kalretikülin ifade kaybı ile hastaların sağ kalımının daha kısa olabileceği belirtilmiştir (Stoll vd., 2016; Peng vd., 2010). Ölen tümör hücrelerinin, hücre yüzeyinde kalretikülin / ERp57 kompleksini açığa çıkararak güçlü bir antikanser immün yanıt ortaya çıkarabileceği öne sürülmüştür (Panaretakis vd., 2009). Başka bir çalışmada da kemoterapi alan hastalardan kemoterapi sonrası alınan serumlarda kalretikülin seviyesinin kemoterapi almayan hastalara göre daha yüksek olduğu bulunmuştur (Liu vd.,

2012). Tümör hücreleri immünojenik apoptoza uğradığında kalretikülin ER membranından hücre yüzeyine taşınabilmektedir (Fucikova vd., 2020).

Fucikova ve ark. kalretikülinin prognostik potansiyelini araştırmak için KHDAK'li iki bağımsız hasta kohortu üzerinde retrospektif bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. İlk değerlendirme 270 KHDAK'li hastada immünohistokimya ile gerçekleştirilmiştir. Düşük ve yüksek kalretikülin seviyesine göre hastalar ayrılıp sağ kalım ile ilişkisi araştırılmıştır. Kalretikülin seviyesi yüksek olan erken evre hastalar en iyi sağ kalıma sahipken, bunun tam tersine kalretikülin seviyesi düşük olan ileri evre hastalar en kötü sağ kalıma sahip olarak bulunmuştur. Diğer taraftan kalretikülin seviyesi düşük olan erken evreye göre kalretikülin seviyesi yüksek olan ileri evre hastalık daha avantajlı bulunmuştur. İkinci aşamada ise cerrahi öncesi platin bazlı neoadjuvan kemoterapi alan 125 evre III hastada kalretikülinin sağ kalım üzerindeki etkisi doğrulanmıştır. Tümör hücrelerinde kalretikülin seviyelerinin EIF2a fosforilasyonu ile korelasyon gösterdiği, bunun KHDAK'nin klinik sonuçlarını pozitif etkilediği rapor edilmiştir. Her iki kohort dikkate alınarak 395 hastada yapılan çok değişkenli Cox model ile histopatolojik alt tip ve kemoterapiden bağımsız olarak kalretikülin, patolojik evre ve yaş genel sağ kalımın anlamlı belirleyicileri olarak gösterilmiştir. Tümör hücrelerinde kalretikülin ifadesinin yüksek olmasıyla, infiltrate edici olgun DC ve efektör hafıza T hücrelerinin daha yoğun olması ilişkilendirilmiştir. Yazarlar buradan yola çıkarak kalretikülinin tümör mikro ortamında adaptif immün yanıt aktivasyonunu tetiklediğini düşünmüşlerdir. Buna göre, yüksek kalretikülin ifadesi ve DC veya CD8+ T lenfositleri tarafından yoğun intratümoral infiltrasyonu olan hastalar en iyi prognoza sahip hastalar olarak belirlenmiştir. Kalretikülin ifadesinin, akciğerde artmış lokal antitümör immün yanıtı yansıtan yeni ve güçlü bir prognostik biyobelirteç olabileceği belirtilmiştir (Fucikova vd., 2016).

Wang ve ark.'nın çalışmasında 88 örneğin doku mikroarray analiziyle gerçekleştirilen sağ kalım analizinde, KHDAK'de hem kalretikülin hem de PDIA3'ün düşük ifadesinin, kötü genel sağ kalım ile pozitif ilişkili olduğu gösterilmiştir. Kalretikülin seviyesi düşük olanlarda 5-yıllık sağ kalım %12 iken yüksek olanlarda %35 olarak bulunmuştur. Kalretikülin ve PDIA3 ifade seviyeleri farklı şekillerde kombine edildiğinde hem kalretikülin hem de PDIA3 seviyesi düşük olanların kötü sağ kalıma, bunun tam tersine hem kalretikülin hem de PDIA3 seviyesi yüksek olanların ise daha iyi sağ kalıma sahip olduğu saptanmıştır. Cox regresyon analizine yaş, cins, evre, histopatolojik alt tip ve kalretikülin - PDIA3 kombinasyonu dahil edildiğinde, kalretikülin

- PDIA3 kombinasyonu ve evre bağımsız prognostik faktörler olarak saptanmıştır. Kalretikülin ve PDIA3 kombinasyonunun, KHDAK'nin prognozunu öngörülmesinde etkili bir biyobelirteç olabileceği ve hasta takibini önemli ölçüde iyileştirebileceği sonucuna varılmıştır (Wang vd., 2017).

Kalretikülin seviyesinin antitümöral tedaviye yanıtı göstermede de faydalı olabileceği, bazı çalışmalarda tedaviye yanıt veren hastalarda kalretikülin seviyesinin daha yüksek olduğu rapor edilmiştir. Deneysel çalışmalarını veri tabanındaki bilgileri analiz ederek genişleten Garg ve ark. kalretikülin seviyesi yüksek fenotipli akciğer kanseri hastalarında radyoterapi ve paklitaksele cevabın daha iyi olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmacılar ayrıca, immünojenik hücre ölümü ortamında, tümör kalretikülin seviyelerinin, fagositozla ilişkili çeşitli genlerin seviyeleri ile pozitif olarak korelasyon gösterdiğini vurgulamıştır (Garg vd., 2015).

Yamamura ve ark. belirli kemoterapötik ajanların konakçı immün cevabını iyileştirebildiği fikrinden yola çıkarak çalışmalarında, kemoterapötik ajanların tümör mikro ortamında neden olduğu değişimi ve tümöre özgü immün yanıtları indükleyen mekanizmayı göstermeyi amaçlamışlardır. Üç fare kanser hücre dizisi, 5 insan kanser hücre dizisi ve klinik uygulamalarda sık kullanılan 5 kemoterapötik ajan (mitoksantron, mitomisin C, 5-florourasil, kamptotekin ve sisplatin) kemoterapötik ajanlara maruziyet sonrası kalretikülinin ve HLA sınıf I'in yüzey ifade düzeyini araştırmak için kullanılmıştır. Fare hücre hatlarının yüzeyinde artmış kalretikülin ifadesi ve ayrıca tüm insan hücre hatlarında hem kalretikülin hem de HLA sınıf I'in yüzey ifade seviyeleri, tedavi edilmeyen hücrelere kıyasla kemoterapötik ajanlarla tedavi edilen hücrelerde gözlenmiştir. Kalretikülinin yüzey ifade seviyesi, tüm insan hücre dizilerinde HLA sınıf I ifade seviyesi ile önemli ölçüde korelasyon göstermiştir. Sonuç olarak, kemoterapötik ilaçlar, kalretikülinin translokasyon mekanizması yoluyla hücreye özgü bir şekilde kanser hücrelerinin immünojenitesini iyileştirebildiği kanaatine ulaşılmıştır (Yamamura vd., 2015).

Çalışmamızda her iki hasta grubunda da ER şaperonları ile sağ kalım ilişkisini değerlendirdik. Çalışmanın birinci aşamasındaki hastaların GRP78, GRP94, kalneksin ve kalretikülin gen ifade seviyeleri ile sağ kalımı arasında herhangi bir ilişki tespit edilemedi. Çalışmanın ikinci aşamasında ise GRP78, GRP94 ve kalneksin protein seviyelerinin sağ kalımla ilişkisi saptanamadı. Ancak hastaların kalretikülin protein seviyeleri ile sağ kalımları arasında anlamlı bir ilişki tespit edildi. Kalretikülin seviyesi 250.52 ng/ml ve

üzerinde olan hastalarda ortanca sağ kalım 16 ay iken altında olanlarda 8 ay idi. Hastaların sağ kalımına etki edebileceği düşünülen histopatolojik alt tip, metastaz durumu ve kemoterapi cevabının dahil edildiği çoklu regresyon analizi sonrasında, kalretikülin sağ kalım üzerinde etkili bağımsız bir değişken olarak belirlendi.

Çalışmamızın ikinci aşamasının sonuçları kalretikülinin sağ kalım üzerine etkisini gösteren literatür bilgileriyle uyumludur. Sağ kalımın önemli belirleyicilerinden olan histopatolojik alt tip, metastaz durumu ve kemoterapi cevabına göre düzeltme yapıldıktan sonra da kalretikülinin etkisinin devam etmesi lokal ileri / ileri evre hastalarda klinik seyrin belirlenmesinde önemli bir biyobelirteç olabileceğini düşündürmüştür. Sağ kalım karşılaştırmasında kestirim değeri çalışmanın ilk aşamasında kontrol grubu olmadığı için hastaların gen ifade seviyelerinin ortanca değeri esas alınarak, ikinci aşamasında ise sağlıklı kontrol grubunun ortanca değerleri esas alınarak yapılmıştır. Bu nedenle sağ kalım değerlendirmesinin ikinci aşamada daha ideal yapıldığı düşünülmüştür.

Sonuçlarımız literatür bilgisiyle birlikte değerlendirilip kalretikülinin immün cevabın aktivasyonunda ve kanser immün gözetiminde kritik bir rol oynadığı dikkate alındığında, kalretikülinin monitörize edilmesi ile hastalığın seyrinin belirlenebileceği ve ayrıca kalretikülinin rol aldığı yollar ve ilgili moleküller üzerinden olası hedefe yönelik tedavilerin geliştirilebileceği düşünülmüştür.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tütün ve tütün ürünleriyle yakın etyolojik ilişkisi olan akciğer kanserinin sıklığı dünya genelinde artmaya devam etmektedir. Hastaların büyük bir çoğunluğu lokal ileri / ileri evrede tanı aldığından küratif tedavi şansına sahip değildir. Hastalığı erken evrede yakalayıp daha etkin tedavi etmek için düşük doz tomografi ile tarama çalışmaları devam etmektedir. Ancak düşük doz tomografi ile taranacak 'riskli gruplar' ile 'tarama sıklığı ve süresi' konusundaki belirsizlikler devam etmektedir. Taranacak riskli grupların moleküler testlerle daraltılarak maliyet – etkin bir tarama programı oluşturmak istenmektedir. Diğer taraftan klinisyenler küratif tedavi şansı olmayan hastalarda hastalığı yeni nesil tedavilerle adeta kronik bir hastalığa dönüştürerek yaşam kalitesini bozmadan yaşam süresini mümkün olduğunca uzatmaya çalışmaktadır. Son yıllarda akciğer kanserinin EGFR, ALK, ROS1, BRAF, PD-L1 vb. moleküler mekanizmaları üzerinden geliştirilen tedavilerle bu durum kısmen sağlanmaktadır. Ancak hastaların az bir kısmı bu tedaviler için uygundur. Dolayısıyla sonuçları öngören ve tedaviyi yönlendirebilecek olan yeni moleküller üzerindeki çalışmalar oldukça yoğun bir şekilde devam etmektedir.

Buradan yola çıkarak çalışmamızda kanserleşme sürecinde meydana gelen endoplazmik retikulum stresinde rol alan moleküler şaperonların akciğer kanserli hastaların klinik ve sağ kalım özellikleriyle ilişkisi değerlendirildi. Çalışma iki aşamalı olarak gerçekleştirildi. Birinci aşamada 52 akciğer kanserli hastanın tümör dokusunda GRP78, GRP94, kalneksin, kalretikülin gen ifade seviyelerinin klinik veriler ve sağ kalım ile ilişkisi değerlendirildi. İkinci aşamada ise 140 hastanın serumunda GRP78, GRP94, kalneksin, kalretikülin protein seviyelerinin klinik veriler ve sağ kalım ile ilişkisi değerlendirildi. Elde edilen bulgular şu şekildedir;

- GRP78, GRP94, kalneksin ve kalretikülin gen ifade seviyelerinin birbirleriyle olan korelasyonları değerlendirildi. Yalnızca kalneksinin GRP78 ve GRP94 ile korelasyon gösterdiği bunun dışında diğer şaperonlar arasında herhangi bir korelasyon olmadığı saptandı.
- GRP78, GRP94, kalneksin ve kalretikülin gen ifade seviyelerinin yaş, cins, aktif sigara içiciliği ve ko-morbidite durumuna göre değişmediği saptandı.
- GRP94 ve kalneksin gen ifade seviyelerinin KHAK'de daha düşük olduğu buna karşın adenokarsinom ve skuamöz hücreli karsinomda benzer olduğu, diğer iki şaperonun tüm hücre tiplerinde benzer olduğu saptandı.

- GRP78, GRP94, kalneksin ve kalretikülin gen ifade seviyelerinin evre ve metastaz durumuna göre değişmediği saptandı.
- Sağ kalım analizinde GRP78, GRP94, kalneksin ve kalretikülin gen ifade seviyelerinin sağ kalımla ilişkisi olmadığı saptandı.
- GRP78, GRP94, kalneksin ve kalretikülin protein seviyelerinin akciğer kanserli hastalarda kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu ve hastaların GRP78, GRP94, kalneksin ve kalretikülin protein seviyelerinin birbiriyle korelasyon gösterdiği saptandı.
- GRP78, GRP94 ve kalneksin protein seviyelerinin 65 yaş altı hastalarda 65 yaş ve üstü gruba göre daha yüksek olduğu, buna karşın kalretikülinin farklı olmadığı saptandı.
- GRP78, GRP94, kalneksin ve kalretikülin protein seviyelerinin cinse ve ko-morbidite durumlarına göre değişmediği saptandı.
- Aktif sigara içen grupta GRP94 ve kalneksin protein seviyeleri daha yüksekti.
- Histopatolojik alt tip, evre ve metastaz durumlarına göre herhangi bir fark tespit edilmedi.
- Kontrol grubunun ortanca değerlerine göre yapılan sağ kalım değerlendirmesinde kalretikülin protein seviyesi yüksek olan hastalarda sağ kalımın daha iyi olduğu, bu etkinin histopatolojik alt tip, metastaz ve kemoterapi cevabına göre düzeltme yapıldıktan sonra da devam ettiği tespit edildi.

Sonuç olarak, çalışmamızın önemli bulgularından biri GRP78, GRP94, kalneksin ve kalretikülin protein seviyelerinin tümünün akciğer kanserli hastalarda sağlıklı kontrol grubuna göre daha yüksek olması ve kanserli hastalarda klinik seyri etkileyen histopatolojik alt tip, evre ve metastaz durumuna göre farklılık olmamasıydı. Bu bulgu gençlerde (< 65 yaş) GRP78, GRP94 ve kalneksinin daha yüksek olması ve sigara içenlerde GRP94 ve kalneksinin yüksek olması bulgularıyla birleştirildiğinde 65 y üstü, sigara içen kişilerde cins ve ko-morbiditeye bakmaksızın kalretikülin yüksekliğinin tarama çalışmalarında ‘riskli grupların’ daraltılmasında faydalı olabileceğini düşündürmektedir. Kalretikülinin prognoz üzerindeki histopatolojik alt tip, metastaz ve kemoterapi cevabından bağımsız olumlu etkisi hedeflenebilmesi halinde daha geniş bir hasta grubuna yönelik tedavi geliştirilmesinde faydalı olabileceğini akla getirmektedir. Bu durum akciğer kanserinde ilgi çekici bir terapötik hedef olarak ortaya çıksa da hem

akciğer kanserinin karmaşık moleküler patogenezi hem de UPR'de rol oynayan yolak ve moleküllerin çok yönlü olması nedeniyle bu süreçleri modüle etmenin yararlarını ve risklerini anlamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç bulunmaktadır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Adler, I. (1912). *Primary malignant growth of the lungs and bronchi-A pathological and clinical study*. London: Longmans, Green & Co.
- Ahmad, M., Hahn, I. F., & Chatterjee, S. (2014). GRP78 up-regulation leads to hypersensitization to cisplatin in A549 lung cancer cells. *Anticancer Research*, 34(7), 3493-3500.
- Ak, G., Metintas, M., Metintas, S., Yildirim, H., Erginel, S., & Alatas, F. (2007). Lung cancer in individuals less than 50 years of age. *Lung*, 185(5), 279-286.
- Ak, G. (2014). *Akciğer kanseri, tanı ve destek tedavisinde aile hekimi*. Ankara: Rotatıp Kitabevi.
- Ak, G., Metintas, S., Yilmaz, S., Bogar, F., Metintas, M. (2017). Trends in lung cancer in Eskisehir province of Turkey from January 1990 to December 2016. *European Respiratory Journal*, 50(suppl 61), PA4256.
- Alberg, A. J., Brock, M. V., Ford, J. G., Samet, J. M., & Spivack, S. D. (2013). Epidemiology of lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest*, 143(5), e1S-e29S.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2015). *Molecular biology of the cell: Intracellular compartments and protein sorting*. (6th ed.). NY, US: Garland Science.
- Argon, Y., Bresson, S. E., Marzec, M. T., & Grimberg, A. (2020). Glucose-Regulated Protein 94 (GRP94): A novel regulator of insulin-like growth factor production. *Cells*, 9(8), 1844.
- Avril, T., Vauleon, E., & Chevet, E. (2017). Endoplasmic Reticulum Stress Signaling and Chemotherapy Resistance in Solid Cancers. *Oncogenesis*, 6, e373.
- Braakman, I., & Bulleid, N. J. (2011). Protein folding and modification in the mammalian endoplasmic reticulum. *Annual review of biochemistry*, 80, 71-99.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 68(6), 394-424.
- Brodsky, J. L., & Skach, W. R. (2011). Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum: Recent lessons from yeast and mammalian cell systems. *Current opinion in cell biology*, 23(4), 464-475.
- Cainap, C., Pop, L. A., Balacescu, O., & Cainap, S. S. (2020). Early diagnosis and screening in lung cancer. *American Journal of Cancer Research*, 10(7), 1993.
- https://seer.cancer.gov/archive/csr/1975_2016/results_merged/sect_15_lung_bronchus.pdf
- Capparelli, C., Guido, C., Whitaker-Menezes, D., Bonuccelli, G., Balliet, R., Pestell, T. G., ... & Lisanti, M. P. (2012). Autophagy and senescence in cancer-associated fibroblasts metabolically supports tumor growth and metastasis, via glycolysis and ketone production. *Cell cycle*, 11(12), 2285-2302.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Chao, M. P., Jaiswal, S., Weissman-Tsukamoto, R., Alizadeh, A. A., Gentles, A. J., Volkmer, J., ... & Weissman, I. L. (2010). Calreticulin is the dominant pro-phagocytic signal on multiple human cancers and is counterbalanced by CD47. *Science translational medicine*, 2(63), 63ra94-63ra94.
- Chen, S., Novick, P., & Ferro-Novick, S. (2013). ER structure and function. *Current opinion in cell biology*, 25(4), 428-433.
- Chevet, E., Hetz, C., & Samali, A. (2015). Endoplasmic reticulum stress-activated cell reprogramming in oncogenesis. *Cancer discovery*, 5(6), 586-597.
- Cubillos-Ruiz, J. R., Silberman, P. C., Rutkowski, M. R., Chopra, S., Perales-Puchalt, A., Song, M., ... & Glimcher, L. H. (2015). ER stress sensor XBP1 controls anti-tumor immunity by disrupting dendritic cell homeostasis. *Cell*, 161(7), 1527-1538.
- Dadey, D. Y., Kapoor, V., Hoye, K., Khudanyan, A., Collins, A., Thotala, D., & Hallahan, D. E. (2017). Antibody Targeting GRP78 Enhances the Efficacy of Radiation Therapy in Human Glioblastoma and Non-Small Cell Lung Cancer Cell Lines and Tumor Models. *Clinical Cancer Research*, 23(10), 2556-2564.
- Dejeans, N., Glorieux, C., Guenin, S., Beck, R., Sid, B., Rousseau, R., ... & Verrax, J. (2012). Overexpression of GRP94 in breast cancer cells resistant to oxidative stress promotes high levels of cancer cell proliferation and migration: implications for tumor recurrence. *Free Radical Biology and Medicine*, 52(6), 993-1002.
- Dobson, C. M. (2003). Protein folding and misfolding. *Nature*, 426(6968), 884-890.
- Dong, D., Ni, M., Li, J., Xiong, S., Ye, W., Virrey, J. J., ... & Lee, A. S. (2008). Critical role of the stress chaperone GRP78/BiP in tumor proliferation, survival, and tumor angiogenesis in transgene-induced mammary tumor development. *Cancer research*, 68(2), 498-505.
- Duan, X. F., & Xin, Y. W. (2020). Overexpression of molecule GRP94 favors tumor progression in lung adenocarcinoma by interaction with regulatory T cells. *Thoracic cancer*, 11(3), 704-712.
- Feng, Y. X., Sokol, E. S., Del Vecchio, C. A., Sanduja, S., Claessen, J. H., Proia, T. A., ... & Gupta, P. B. (2014). Epithelial-to-mesenchymal transition activates PERK-eIF2 α and sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress. *Cancer discovery*, 4(6), 702-715.
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Mathers, C., Parkin, D. M., Piñeros, M., ... & Bray, F. (2019). Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *International journal of cancer*, 144(8), 1941-1953.
- Fucikova, J., Moserova, I., Urbanova, L., Bezu, L., Kepp, O., Cremer, I., ... & Spisek, R. (2015). Prognostic and predictive value of DAMPs and DAMP-associated processes in cancer. *Frontiers in immunology*, 6, 402.
- Fucikova, J., Becht, E., Iribarren, K., Goc, J., Remark, R., Damotte, D., ... & Cremer, I. (2016). Calreticulin expression in human Non-Small cell lung cancers correlates with increased accumulation of antitumor immune cells and favorable prognosis. *Cancer research*, 76(7), 1746-1756.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Fucikova, J., Spisek, R., Kroemer, G., & Galluzzi, L. (2020). Calreticulin and cancer. *Cell Research*, 1-12.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Warren, S., Adjemian, S., Agostinis, P., Martinez, A. B., ... & Marincola, F. M. (2020). Consensus guidelines for the definition, detection and interpretation of immunogenic cell death. *Journal for immunotherapy of cancer*, 8(1).
- Gardai, S. J., McPhillips, K. A., Frasch, S. C., Janssen, W. J., Starefeldt, A., Murphy-Ullrich, J. E., ... & Henson, P. M. (2005). Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. *Cell*, 123(2), 321-334.
- Garg, A. D., Elsen, S., Krysko, D. V., Vandenabeele, P., de Witte, P., & Agostinis, P. (2015). Resistance to anticancer vaccination effect is controlled by a cancer cell-autonomous phenotype that disrupts immunogenic phagocytic removal. *Oncotarget*, 6(29), 26841.
- Ghosh, R., Lipson, K. L., Sargent, K. E., Mercurio, A. M., Hunt, J. S., Ron, D., & Urano, F. (2010). Transcriptional regulation of VEGF-A by the unfolded protein response pathway. *PloS one*, 5(3), e9575.
- Gold, L. I., Eggleton, P., Sweetwyne, M. T., Van Duyn, L. B., Greives, M. R., Naylor, S. M., ... & Murphy-Ullrich, J. E. (2010). Calreticulin: non-endoplasmic reticulum functions in physiology and disease. *The FASEB Journal*, 24(3), 665-683.
- Goldstraw, P. (2009). *Staging manuel in thoracic oncology: The principles of the TNM systems*. Orange Park, FL, USA: Editorial Rx Press.
- Goldstraw, P., Chansky, K., Crowley, J., Rami-Porta, R., Asamura, H., Eberhardt, W. E., ... & Yokoi, K. (2016). The IASLC lung cancer staging project: proposals for revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (eighth) edition of the TNM classification for lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, 11(1), 39-51.
- Gonzalez-Gronow, M., Selim, M. A., Papalas, J., & Pizzo, S. V. (2009). GRP78: a multifunctional receptor on the cell surface. *Antioxidants & redox signaling*, 11(9), 2299-2306.
- Goyal, U., & Blackstone, C. (2013). Untangling the web: mechanisms underlying ER network formation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1833(11), 2492-2498.
- Güneş, HV. (2013). *Moleküler hücre biyolojisi: Lipid ve proteinlerin biyosentezi ve hücre içi trafikleri*. (3. Baskı). İstanbul: İstanbul Tıp Kitabevi.
- Hampton, R. Y., & Sommer, T. (2012). Finding the will and the way of ERAD substrate retrotranslocation. *Current opinion in cell biology*, 24(4), 460-466.
- Harris, J. E., Thun, M. J., Mondul, A. M., & Calle, E. E. (2004). Cigarette tar yields in relation to mortality from lung cancer in the cancer prevention study II prospective cohort, 1982-8. *Bmj*, 328(7431), 72.
- Hegde, R. S., & Ploegh, H. L. (2010). Quality and quantity control at the endoplasmic reticulum. *Current opinion in cell biology*, 22(4), 437-446.
- Hetz, C. (2012). The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nature reviews Molecular cell biology*, 13(2), 89-102.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Hetz, C., & Papa, F. R. (2018). The unfolded protein response and cell fate control. *Molecular cell*, *69*(2), 169-181.
- Holohan, C., Van Schaeybroeck, S., Longley, D. B., & Johnston, P. G. (2013). Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nature Reviews Cancer*, *13*(10), 714-726.
- Hu, P., Han, Z., Couvillon, A. D., Kaufman, R. J., & Exton, J. H. (2006). Autocrine tumor necrosis factor alpha links endoplasmic reticulum stress to the membrane death receptor pathway through IRE1 α -mediated NF- κ B activation and down-regulation of TRAF2 expression. *Molecular and cellular biology*, *26*(8), 3071-3084.
- Huang, F., Li, X., Zhao, N., Duan, L., & Chen, Y. (2018). Circulating GRP78 acts as a biomarker in the early diagnosis of lung cancer. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, *11*(11), 5223.
- Jeon, J., Holford, T. R., Levy, D. T., Feuer, E. J., Cao, P., Tam, J., ... & Meza, R. (2018). Smoking and lung cancer mortality in the United States from 2015 to 2065: a comparative modeling approach. *Annals of internal medicine*, *169*(10), 684-693.
- Jha, P., Ramasundarahettige, C., Landsman, V., Rostron, B., Thun, M., Anderson, R. N., ... & Peto, R. (2013). 21st-century hazards of smoking and benefits of cessation in the United States. *New England Journal of Medicine*, *368*(4), 341-350.
- Jiang, X., Overholtzer, M., & Thompson, C. B. (2015). Autophagy in cellular metabolism and cancer. *The Journal of clinical investigation*, *125*(1), 47-54.
- Johnson, S., Michalak, M., Opas, M., & Eggleton, P. (2001). The ins and outs of calreticulin: from the ER lumen to the extracellular space. *Trends in cell biology*, *11*(3), 122-129.
- Jorgensen, E., Stinson, A., Shan, L., Yang, J., Gietl, D., & Albino, A. P. (2008). Cigarette smoke induces endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in normal and malignant human lung cells. *BMC cancer*, *8*(1), 229.
- Kaufman, R. J. (1999). Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes & development*, *13*(10), 1211-1233.
- Kelsen, S. G., Duan, X., Ji, R., Perez, O., Liu, C., & Merali, S. (2008). Cigarette smoke induces an unfolded protein response in the human lung: a proteomic approach. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, *38*(5), 541-550.
- Kim, K. M., Yu, T. K., Chu, H. H., Park, H. S., Jang, K. Y., Moon, W. S., ... & Chung, M. J. (2012). Expression of ER stress and autophagy-related molecules in human non-small cell lung cancer and premalignant lesions. *International Journal of Cancer*, *131*(4), E362-E370.
- Kim, S. H., Ji, J. H., Park, K. T., Lee, J. H., Kang, K. W., Park, J. H., ... & Lee, G. W. (2015). High-level expression of Hsp90 β is associated with poor survival in resectable non-small-cell lung cancer patients. *Histopathology*, *67*(4), 509-519.
- Kobayashi, M., Nagashio, R., Jiang, S. X., Saito, K., Tsuchiya, B., Ryuge, S., ... & Sato, Y. (2015). Calnexin is a novel sero-diagnostic marker for lung cancer. *Lung Cancer*, *90*(2), 342-345.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Kwon, D., Koh, J., Kim, S., Go, H., Min, H. S., Kim, Y. A., ... & Chung, D. H. (2018). Overexpression of endoplasmic reticulum stress-related proteins, XBP1s and GRP78, predicts poor prognosis in pulmonary adenocarcinoma. *Lung cancer*, 122, 131-137.
- Langer, R., Feith, M., Siewert, J. R., Wester, H. J., & Hoefler, H. (2008). Expression and clinical significance of glucose regulated proteins GRP78 (BiP) and GRP94 (GP96) in human adenocarcinomas of the esophagus. *BMC cancer*, 8(1), 70.
- Lee, A. S. (2007). GRP78 induction in cancer: therapeutic and prognostic implications. *Cancer research*, 67(8), 3496-3499.
- Li, J., & Lee, A. S. (2006). Stress induction of GRP78/BiP and its role in cancer. *Current molecular medicine*, 6(1), 45-54.
- Lin, Y., Wang, Z., Liu, L., & Chen, L. (2011). Akt is the downstream target of GRP78 in mediating cisplatin resistance in ER stress-tolerant human lung cancer cells. *Lung Cancer*, 71(3), 291-297.
- Lindquist, S., & Craig, E. A. (1988). The heat-shock proteins. *Annual review of genetics*, 22(1), 631-677.
- Liu, R., Gong, J., Chen, J., Li, Q., Song, C., Zhang, J., ... & Jin, B. (2012). Calreticulin as a potential diagnostic biomarker for lung cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 61(6), 855-864.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ΔΔCT method. *methods*, 25(4), 402-408.
- Luo, B., & Lee, A. S. (2013). The critical roles of endoplasmic reticulum chaperones and unfolded protein response in tumorigenesis and anticancer therapies. *Oncogene*, 32(7), 805-818.
- Mattson, M. E., Pollack, E. S., & Cullen, J. W. (1987). What are the odds that smoking will kill you?. *American journal of public health*, 77(4), 425-431.
- Michalak, M., Groenendyk, J., Szabo, E., Gold, L. I., & Opas, M. (2009). Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum. *Biochemical Journal*, 417(3), 651-666.
- Moenner, M., Pluquet, O., Bouhccareilh, M., & Chevet, E. (2007). Integrated endoplasmic reticulum stress responses in cancer. *Cancer research*, 67(22), 10631-10634.
- National Cancer Institute. *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2008*. https://seer.cancer.gov/archive/csr/1975_2008/
- National Lung Screening Trial Research Team. (2011). Reduced lung-cancer mortality with low-dose computed tomographic screening. *New England Journal of Medicine*, 365(5), 395-409.
- Oakes, S. A. (2020). Endoplasmic Reticulum Stress Signaling in Cancer Cells. *The American Journal of Pathology*. 190(5), 934-946.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Obeid, M., Panaretakis, T., Joza, N., Tufi, R., Tesniere, A., Van Endert, P., ... & Kroemer, G. (2007). Calreticulin exposure is required for the immunogenicity of γ -irradiation and UVC light-induced apoptosis. *Cell Death & Differentiation*, *14*(10), 1848-1850.
- Oudkerk, M., Devaraj, A., Vliegenthart, R., Henzler, T., Prosch, H., Heussel, C. P., ... & Field, J. K. (2017). European position statement on lung cancer screening. *The Lancet Oncology*, *18*(12), e754-e766.
- Okayama, A., Miyagi, Y., Oshita, F., Nishi, M., Nakamura, Y., Nagashima, Y., ... & Hirano, H. (2014). Proteomic analysis of proteins related to prognosis of lung adenocarcinoma. *Journal of Proteome Research*, *13*(11), 4686-4694.
- Panaretakis, T., Kepp, O., Brockmeier, U., Tesniere, A., Bjorklund, A. C., Chapman, D. C., ... & Kroemer, G. (2009). Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death. *The EMBO journal*, *28*(5), 578-590.
- Park, E. J., Park, Y. J., Lee, S. J., Lee, K., & Yoon, C. (2019). Whole cigarette smoke condensates induce ferroptosis in human bronchial epithelial cells. *Toxicology Letters*, *303*, 55-66.
- Pearl, L. H., & Prodromou, C. (2006). Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery. *Annu. Rev. Biochem.*, *75*, 271-294.
- Peng, R. Q., Chen, Y. B., Ding, Y., Zhang, R., Zhang, X., Yu, X. J., ... & Zhang, X. S. (2010). Expression of calreticulin is associated with infiltration of T-cells in stage IIIB colon cancer. *World journal of gastroenterology: WJG*, *16*(19), 2428.
- Peto, R., Darby, S., Deo, H., Silcocks, P., Whitley, E., & Doll, R. (2000). Smoking, smoking cessation, and lung cancer in the UK since 1950: combination of national statistics with two case-control studies. *Bmj*, *321*(7257), 323-329.
- Pfaffenbach, K. T., & Lee, A. S. (2011). The critical role of GRP78 in physiologic and pathologic stress. *Current opinion in cell biology*, *23*(2), 150-156.
- Phillips, M. J., & Voeltz, G. K. (2016). Structure and function of ER membrane contact sites with other organelles. *Nature reviews Molecular cell biology*, *17*(2), 69-82.
- Podack, E. R., & Raez, L. E. (2007). Allogeneic tumor-cell-based vaccines secreting endoplasmic reticulum chaperone gp96. *Expert Opinion on Biological Therapy*, *7*(11), 1679-1688.
- Pollock, S., Kozlov, G., Pelletier, M. F., Trempe, J. F., Jansen, G., Sitnikov, D., ... & Thomas, D. Y. (2004). Specific interaction of ERp57 and calnexin determined by NMR spectroscopy and an ER two-hybrid system. *The EMBO journal*, *23*(5), 1020-1029.
- Ranganathan, A. C., Zhang, L., Adam, A. P., & Aguirre-Ghiso, J. A. (2006). Functional coupling of p38-induced up-regulation of BiP and activation of RNA-dependent protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase to drug resistance of dormant carcinoma cells. *Cancer research*, *66*(3), 1702-1711.
- Roller, C., & Maddalo, D. (2013). The molecular chaperone GRP78/BiP in the development of chemoresistance: mechanism and possible treatment. *Frontiers in pharmacology*, *4*, 10.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Ron, D., & Walter, P. (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature reviews Molecular cell biology*, 8(7), 519-529.
- Rong, B., & Yang, S. (2018). Molecular mechanism and targeted therapy of Hsp90 involved in lung cancer: New discoveries and developments. *International journal of oncology*, 52(2), 321-336.
- Rozpedek, W., Pytel, D., Mucha, B., Leszczynska, H., Diehl, J. A., & Majsterek, I. (2016). The role of the PERK/eIF2 α /ATF4/CHOP signaling pathway in tumor progression during endoplasmic reticulum stress. *Current molecular medicine*, 16(6), 533-544.
- Römisch, K. (2005). Endoplasmic reticulum-associated degradation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 21, 435-456.
- Ruiz-Cordero, R., & Devine, W. P. (2020). Targeted therapy and checkpoint immunotherapy in lung cancer. *Surgical Pathology Clinics*, 13(1), 17-33.
- Saito, H., Yamashita, M., Ogasawara, M., Yamada, N., Niisato, M., Tomoyasu, M., ... & Yamauchi, K. (2016). Chaperone protein l-isoaspartate (d-aspartyl) O-methyltransferase as a novel predictor of poor prognosis in lung adenocarcinoma. *Human Pathology*, 50, 1-10.
- Samet, J. M., Wiggins, C. L., Humble, C. G., & Pathak, D. R. (1988). Cigarette Smoking and Lung Cancer in New Mexico 1-3. *Am Rev Respir Dis*, 137, 1110-1113.
- Samet, J. M. (1991). Health benefits of smoking cessation. *Clinics in chest medicine*, 12(4), 669-679.
- Sands, J., Tammemägi, M. C., Couraud, S., Baldwin, D. R., Borondy-Kitts, A., Yankelevitz, D., ... & McKee, B. (2020). Lung Screening Benefits and Challenges: A Review of The Data and Outline for Implementation. *Journal of Thoracic Oncology*.
- Schmitt, E., Gehrman, M., Brunet, M., Multhoff, G., & Garrido, C. (2007). Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. *Journal of leukocyte biology*, 81(1), 15-27.
- Schrag, J. D., Bergeron, J. J., Li, Y., Borisova, S., Hahn, M., Thomas, D. Y., & Cygler, M. (2001). The structure of calnexin, an ER chaperone involved in quality control of protein folding. *Molecular cell*, 8(3), 633-644.
- Schröder, M., & Kaufman, R. J. (2005). The mammalian unfolded protein response. *Annu. Rev. Biochem.*, 74, 739-789.
- Schubert, U., Anton, L. C., Gibbs, J., Norbury, C. C., Yewdell, J. W., & Bennink, J. R. (2000). Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature*, 404(6779), 770-774.
- Seijo, L. M., Peled, N., Ajona, D., Boeri, M., Field, J. K., Sozzi, G., ... & Montuenga, L. M. (2019). Biomarkers in lung cancer screening: achievements, promises, and challenges. *Journal of Thoracic Oncology*, 14(3), 343-357.
- Shiu, R. P., Pouyssegur, J., & Pastan, I. (1977). Glucose depletion accounts for the induction of two transformation-sensitive membrane proteins in Rous sarcoma virus-transformed chick embryo fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(9), 3840-3844.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Shore, G. C., Papa, F. R., & Oakes, S. A. (2011). Signaling cell death from the endoplasmic reticulum stress response. *Current opinion in cell biology*, 23(2), 143-149.
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2020). Cancer statistics, 2020. *CA: a cancer journal for clinicians*, 70(1), 7-30.
- Stapelfeld, C., Dammann, C., & Maser, E. (2020). Sex-specificity in lung cancer risk. *International journal of cancer*, 146(9), 2376-2382.
- Stoll, G., Iribarren, K., Michels, J., Leary, A., Zitvogel, L., Cremer, I., & Kroemer, G. (2016). Calreticulin expression: Interaction with the immune infiltrate and impact on survival in patients with ovarian and non-small cell lung cancer. *Oncoimmunology*, 5(7), e1177692.
- Sun, Q., Hua, J., Wang, Q., Xu, W., Zhang, J., Zhang, J., ... & Li, M. (2012). Expressions of GRP78 and Bax associate with differentiation, metastasis, and apoptosis in non-small cell lung cancer. *Molecular biology reports*, 39(6), 6753-6761.
- Tan, J. S., Ong Kc, K. C., & Rhodes, A. (2016). The role of heat shock proteins and glucose regulated proteins in cancer. *Malays J Pathol*, 38(2), 75-82.
- Tan, S. X., Jiang, D. X., Hu, R. C., Dai, A. G., Gan, G. X., Fu, D. Y., ... & Li, J. (2017). Endoplasmic reticulum stress induces HRD1 to protect alveolar type II epithelial cells from apoptosis induced by cigarette smoke extract. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 43(4), 1337-1345.
- Tang, M. S., Wu, X. R., Lee, H. W., Xia, Y., Deng, F. M., Moreira, A. L., ... & Lepor, H. (2019). Electronic-cigarette smoke induces lung adenocarcinoma and bladder urothelial hyperplasia in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(43), 21727-21731.
- Taniguchi, H., Sen, T., & Rudin, C. M. (2020). Targeted therapies and biomarkers in small cell lung cancer. *Frontiers in Oncology*, 10.
- Tanvetyanon, T., & Bepler, G. (2008). Beta-carotene in multivitamins and the possible risk of lung cancer among smokers versus former smokers: a meta-analysis and evaluation of national brands. *Cancer*, 113(1), 150-157.
- Travis, W. D., Brambilla, E., Noguchi, M., Nicholson, A. G., Geisinger, K. R., Yatabe, Y., ... & Yankelwitz, D. (2011). International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *Journal of thoracic oncology*, 6(2), 244-285.
- Travis, W. D., Brambilla, E., Nicholson, A. G., Yatabe, Y., Austin, J. H., Beasley, M. B., ... & Wistuba, I. (2015). The 2015 World Health Organization classification of lung tumors: impact of genetic, clinical and radiologic advances since the 2004 classification. *Journal of thoracic oncology*, 10(9), 1243-1260.
- Türkiye Kanser İstatistikleri 2016. Sağlık bakanlığı verileri https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanser-db/istatistik/Trkiye_Kanser_statistikleri_2016.pdf

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Uramoto, H., Sugio, K., Oyama, T., Nakata, S., Ono, K., Yoshimastu, T., ... & Yasumoto, K. (2005). Expression of endoplasmic reticulum molecular chaperone Grp78 in human lung cancer and its clinical significance. *Lung Cancer*, 49(1), 55-62.
- Urrea, H., Henriquez, D. R., Cánovas, J., Villarroel-Campos, D., Carreras-Sureda, A., Pulgar, E., ... & Hetz, C. (2018). IRE1 α governs cytoskeleton remodelling and cell migration through a direct interaction with filamin A. *Nature cell biology*, 20(8), 942-953.
- Walter, P., & Ron, D. (2011). The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science*, 334(6059), 1081-1086.
- Wang, K., Li, H., Chen, R., Zhang, Y., Sun, X. X., Huang, W., ... & Chen, Z. N. (2017). Combination of CALR and PDIA3 is a potential prognostic biomarker for non-small cell lung cancer. *Oncotarget*, 8(57), 96945.
- Wang, M., Wey, S., Zhang, Y., Ye, R., & Lee, A. S. (2009). Role of the unfolded protein response regulator GRP78/BiP in development, cancer, and neurological disorders. *Antioxidants & redox signaling*, 11(9), 2307-2316.
- Wang, Q., He, Z., Zhang, J., Wang, Y., Wang, T., Tong, S., ... & Chen, Y. (2005). Overexpression of endoplasmic reticulum molecular chaperone GRP94 and GRP78 in human lung cancer tissues and its significance. *Cancer detection and prevention*, 29(6), 544-551.
- Wang, Y., Alam, G. N., Ning, Y., Visioli, F., Dong, Z., Nör, J. E., & Pulverini, P. J. (2012). The unfolded protein response induces the angiogenic switch in human tumor cells through the PERK/ATF4 pathway. *Cancer research*, 72(20), 5396-5406.
- Wang, Z. V., Deng, Y., Gao, N., Pedrozo, Z., Li, D. L., Morales, C. R., ... & Hill, J. A. (2014). Spliced X-box binding protein 1 couples the unfolded protein response to hexosamine biosynthetic pathway. *Cell*, 156(6), 1179-1192.
- Williams, D. B. (2006). Beyond lectins: the calnexin/calreticulin chaperone system of the endoplasmic reticulum. *Journal of cell science*, 119(4), 615-623.
- Wu, H. M., Jiang, Z. F., Fan, X. Y., Wang, T., Yan, X. B., Ma, Y., ... & Liu, R. Y. (2014). Reversed expression of GRIM-1 and GRP78 in human non-small cell lung cancer. *Human pathology*, 45(9), 1936-1943.
- Xie, J., Tao, Z. H., Zhao, J., Li, T., Wu, Z. H., Zhang, J. F., ... & Hu, X. C. (2016). Glucose regulated protein 78 (GRP78) inhibits apoptosis and attenuates chemosensitivity of gemcitabine in breast cancer cell via AKT/mitochondrial apoptotic pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 474(3), 612-619.
- Xu, Y., Chen, Z., Zhang, G., Xi, Y., Sun, R., Wang, X., ... & Li, X. (2016). HSP90B1 overexpression predicts poor prognosis in NSCLC patients. *Tumor Biology*, 37(10), 14321-14328.
- Yamamura, Y., Tsuchikawa, T., Miyauchi, K., Takeuchi, S., Wada, M., Kuwatani, T., ... & Hirano, S. (2015). The key role of calreticulin in immunomodulation induced by chemotherapeutic agents. *International Journal of Clinical Oncology*, 20(2), 386-394.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Young, J. C., Agashe, V. R., Siegers, K., & Hartl, F. U. (2004). Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. *Nature reviews Molecular cell biology*, 5(10), 781-791.
- Zhang, L., Wang, S., Wangtao, Wang, Y., Wang, J., Jiang, L., ... & Wang, Q. (2009). Upregulation of GRP78 and GRP94 and its function in chemotherapy resistance to VP-16 in human lung cancer cell line SK-MES-1. *Cancer investigation*, 27(4), 453-458.
- Zheng, H. C., Takahashi, H., Li, X. H., Hara, T., Masuda, S., Guan, Y. F., & Takano, Y. (2008). Overexpression of GRP78 and GRP94 are markers for aggressive behavior and poor prognosis in gastric carcinomas. *Human pathology*, 39(7), 1042-1049.

EK - 1

ETİK KURUL KARARI



T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığı



Sayı : 80558721-050.99-E.43253
Konu : 2018 - 23 Karar

24/04/2018

Sayın Prof.Dr.Hasan Veysi GÜNEŞ
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Tarafınızdan yürütülmekte olan “*Akciğer Kanserli Hastalarda ER Moleküler Şaperonları GRP78, GRP94, Kalretikülün ve Kalneksin Gen İfadelerinin Klinik Verilerle Karşılaştırılması*” başlıklı proje hakkında alınan karar ilişikte gönderilmiştir.
Bilgilerinizi ve gereğini saygı ile rica ederim.

Prof. Dr. Nihal DOĞAN
Etik Kurul Başkanı

Bu evrak 5070 sayılı Elektronik İmza Kanunu'na göre elektronik olarak imzalanmıştır. Evrak doğrulama adresi:
<https://ebysnetm.ogu.edu.tr/Home/Dogrulama/05085deb-3afd-4e56-a2a2-c06dd3c38e3f>

Adres	: Meselik Kampüsü PK.26480 Odunpazarı	Ayrıntılı Bilgi	: Aysun SERTTAŞ - Bilgisayar İşletmeni
Telefon	: 0222 2392979-4690	Faks	: 222 239 37 72
E-Posta	: aserttas@ogu.edu.tr	Elektronik Ağ	: http://klinikarastirmajaretikkurul.ogu.edu.tr/
		KEP Adresi	: esk.osmangaziunirek@hs01.kep.tr

ESKİŞEHİR OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU BAŞKANLIĞI

KARAR FORMU

Karar Tarihi: 12 Nisan 2018

Karar Sayısı: 12

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakóltesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Prof.Dr.Hasan Veysi GÜNEŞ (Doktora Tez Danıőmanı) sorumluluğunda yürütölen "*Akciğer Kanserli Hastalarda ER Moleköler şaperonları GRP78, GRP94, Kalretikölün ve Kalneksin Gen İfadelerinin Klinik Verilerle Karşılaştırılması*" baőtıklı çalışmanın yapılmasının uygun olduğuna oy birliğiyle karar verilmiştir.
Çalıőmanızda baőtarılar dileriz.

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		"Akciğer Kanserli Hastalarda ER Moleküler Şaperonları GRP78, GRP94, Kalretikülün ve Kalneksin Gen İfadelerinin Klinik Verilerle Karşılaştırılması"							
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU									
Prof.Dr.Nihal DOĞAN	Mikrobiyoloji	Eskişehir Osmangazi Üniv. Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Ertuğrul ÇOLAK	Biyostatistik	Eskişehir Osmangazi Üniv. Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr.Öğr.Üy.Nilüfer DEMİRSOY	Tıp Tarihi ve Etik	Eskişehir Osmangazi Üniv. Tıp Fakültesi Tıp Tarihi ve Etik Anabilim Dalı	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr. Hamdi ÇAKLI	Kulak Burun Boğaz	Eskişehir Osmangazi Üniv. Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Fezan MUTLU	Biyostatistik	Eskişehir Osmangazi Üniv. Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Coşkun YARAR	Çocuk Sağ. ve Hast.	Eskişehir Osmangazi Üniv. Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Nurdan ACAR	Acil Tıp	Eskişehir Osmangazi Üniv. Tıp Fakültesi Acil Tıp Anabilim Dalı	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Orhan Tansel KORKMAZ	Fizyoloji	Eskişehir Osmangazi Üniv. Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr.Öğr.Üy.Semra YİĞİTASLAN	Farmakoloji	Eskişehir Osmangazi Üniv. Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr.Ecz.Gökçen YAZ GÖZEY	Eczacı	Eskişehir Osmangazi Üniv. Tıp Fakültesi Sağlık, Uyg. ve Arş.Hst. Eczanesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Emre MUMCU	Diş Hekimliği	Eskişehir Osmangazi Üniv. Diş Hekimliği Fakültesi Protetik Diş Ted. Anabilim Dalı	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr.Öğr.Üy.Nazniye ÖZENBAŞ BOYDAĞ	Hukuk	Anadolu Üniversitesi Hukuk Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Ahmet AKÇAY	Fizik Mühendisi	-Atabey Beton Ve Zemin Laboratuvarı Ltd. Şti. -Akçay Ltd. Şti.	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Ayşe FERT DÖKMECİ	Avukat	Serbest Avukat	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	

*:Toplantıda Bulunma

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof.Dr.Nihal DOĞAN
İmza:

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

ÖZGEÇMİŞ

Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı	: Güntülü AK
Doğum tarihi ve yeri	: 29.10.1974
Uyruğu	: Türkiye Cumhuriyeti
Medeni durumu	: Evli
İletişim adresleri	: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı, Eskişehir

Eğitim Durumu

İlköğretim	: Balıklısu Köyü İlkokulu, 1981-1985, Giresun
Ortaöğretim ve Lise	: Beşikdüzü Kız Öğretmen Lisesi, 1985-1990, Trabzon
Lise (son sınıf)	: Atatürk Lisesi, 1991, Giresun
Üniversite	: Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi, 1991- 1997, Trabzon
Tıpta Uzmanlık Eğitimi	: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı, 1999-2005, Eskişehir

Mesleki Deneyim

Pratisyen hekim	: Güzelsu Sağlık Ocağı / Gürpınar, Van, 1997
Pratisyen hekim	: İki Nolu Sağlık Ocağı, Van, 1998
Pratisyen hekim	: Yolağzı Salık Ocağı / Keşap, Giresun, 1999
Araştırma Görevlisi	: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı, 1999-2005
Öğr.Gör.Dr.	: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı, 2005-2007
Yard.Doç.Dr.	: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı, 2007-2012

Doç.Dr. : Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı, 2012-2017

Prof.Dr. : Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı, 2017

Üye Olunan Bilimsel Kuruluşlar:

Türkiye Solunum Araştırmaları Derneği (TÜSAD)

Türk Toraks Derneği (TTD)

Avrupa Solunum Derneği (ERS)

Amerikan Göğüs Hekimleri Koleji (CHEST)

Uluslararası Akciğer Kanseri Araştırmaları Derneği (IASLC)

Avrupa Bronkoloji ve Girişimsel Pulmonoloji Derneği (EABIP)

Dünya Bronkoloji ve Girişimsel Pulmonoloji Derneği (WABIP)

Yayımlar (Son 5 yıl):

- **G.Ak**, S.C.Tomaszek, F.Kosari, M.Metintas, J.R.Jett, S.Metintas, H.Yildirim, E.Dundar, J.Dong, M.C.Aubry, D.A.Wigle, C.F. Thomas Jr. MicroRNA and mRNA features of malignant pleural mesothelioma and benign asbestos-related pleural effusion. *BioMed Research International* 2015; <http://dx.doi.org/10.1155/2015/635748>.
- **G.Ak**, S.Metintas, M.Akarsu, M.Metintas. The effectiveness and safety of platinum-based pemetrexed and platinum-based gemcitabine treatment in patients with malignant pleural mesothelioma. *BMC Cancer* 2015; 15: 510.
- Turkey Asbestos Control Strategic Plan – Final Report. Turkish Mesothelioma Working Group, Public Health Institute of Turkey, Eskişehir Osmangazi University. *Turk Thorac J* 2015; 16: S1 – S26. DOI: 10.5152/ttd.2015.10120136.
- Malign Plevral Mezotelyoma Türkiye Standartlar Rehberi. Türkiye Mezotelyoma Çalışma Grubu. *Eurasian J Pulmonol* 2015; 17: S1 – S21.
- H.F.Batirel, M.Metintas, H.B.Caglar, **G.Ak**, P.F.Yumuk, B.Yildizeli, M.Yuksel. Adoption of pleurectomy and decortication for malignant mesothelioma leads to similar survival as extrapleural pneumonectomy. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2016; 151: 478 – 84.
- M.Metintas, H.Yildirim, T.Kaya, **G.Ak**, E.Dundar, R.Ozkan, S.Metintas. CT scan-guided Abrams' needle pleural biopsy versus ultrasound-assisted cutting needle pleural biopsy for diagnosis in patients with pleural effusion: A randomized, controlled trial. *Respiration* 2016; 91: 156-63. doi: 10.1159/000443483.
- C.Ozbayer, I.Degirmenci, D.Ustuner, **G.Ak**, F.Saydam, E.Colak, H.V.Gunes, M.Metintas. miRSNPs of miR1274 and miR3202 Genes that Target MeCP2 and DNMT3b Are Associated with Lung Cancer Risk: A Study Conducted on MassARRAY Genotyping. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2016; 35: 223 – 36.

- D.Turgut Coşan, **G.Ak**, İ.Dağ, A.Soyocak, G.Dikmen, A.Dal, HV.Güneş, M.Metintaş. Drug carrier nanosystems in malignant pleural mesothelioma. *Tuberk Toraks* 2016; 64: 60–8.
- **G.Ak**, Y.Tada, H.Shimada, S.Metintas, M.Ito, K.Hiroshima, M.Tagawa, M.Metintas. Midkine is a potential novel marker for malignant mesothelioma with different prognostic and diagnostic values from Mesothelin. *BMC Cancer* 2017; 17: 212. DOI 10.1186/s12885-017-3209-5.
- S.Metintaş, **G.Ak**, Ş.Yılmaz, F.Boğar, M.Metintaş. Validity and Reliability of Asbestos Knowledge and Awareness Questionnaire for Environmental Asbestos Exposure in Rural Areas. *Eurasian J Pulmonol* 2017; 19: 34–40.
- A.Turna, **G.Ak**, B.Kömürcüoğlu, S.Yurt, Ü. Yılmaz. Küçük hücreli dışı akciğer kanserinde sekizinci evreleme ve uygulamadaki etkileri. *Türk Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Dergisi* 2017; 25: 484 – 98.
- S.Metintaş, H.F.Batirel, H.Bayram, Ü.Yılmaz, M.Karadağ, **G.Ak**, M.Metintaş. Turkey National Mesothelioma Surveillance and Environmental Asbestos Exposure Control Program. *Int J Environ Res Public Health* 2017; 14: 1293; doi:10.3390/ijerph14111293.
- S.Arslan, F.Mundt, S.Metintaş, **G.Ak**, K.Dobra, A.Hjerpe, M.Metintaş. Predicting Malignant Mesothelioma by Analyzing Serum N-ERC/Mesothelin, C-ERC/Mesothelin, Hyaluronan, Osteopontin, and Syndecan-1 Levels. *Eurasian J Pulmonol* 2017; 19: 130-8. DOI: 10.5152/ejp.2017.50023.
- T.Tuncel, M.Metintas, E.Yagci, **G.Ak**, S.Metintas, H.V.Gunes. Investigation of the MMP2 and MMP9 gene polymorphisms in malignant mesothelioma and other pleural diseases. *Biomedical Research* 2017; 28 (20): 8670-8674.
- S.Metintas, **G.Ak**, F.Bogar, S.Yilmaz, M.Metintas. Asbestos knowledge and awareness level in central part of Anatolia. *International Journal of Occupational and Environmental Health*. 2017; 23: 243 – 249. DOI: 10.1080/10773525.2018.1470789.
- C.Özbayer, D.Üstüner, **G.Ak**, F.Saydam, M.Metintaş, İ.Değirmenci. Akciğer kanserli hastalarda plazma DNA metiltransferaz ve metil CpG’ye bağlanan protein seviyelerinin değerlendirilmesi. *Dicle Tıp Dergisi / Dicle Medical Journal* 2017; 44: 57–64.
- C.Özbayer, **G.Ak**, D.Üstüner, F.Saydam, H.V. Güneş, M. Metintas. Expression and potential role of miR200b and miR1274a in lung cancer patients. *J Clin Anal Med* 2017; 8: 137 - 40. DOI: 10.4328/JCAM.4979
- **G.Ak**, S.Metintaş, Ş.Yılmaz, M.Metintaş. Asbest temasının akciğer kanserinin kliniğine yansması. *İzmir Göğüs Hastanesi Dergisi* 2017; Cilt XXXI, Sayı 1: 1–7.
- **G.Ak**, S.Metintaş, Ş.Yılmaz, F.Boğar, M.Metintaş. Yaşlı akciğer kanserli hastaların epidemiyolojik, klinik ve sağ kalım özellikleri. *İzmir Göğüs Hastanesi Dergisi* 2017; Cilt XXXI, Sayı 1: 1–8.
- H.F.Batirel, M.Metintas, H.B.Caglar, **G.Ak**, P.F.Yumuk, R.Akiskali, E.Bozkurt, N.Bekiroglu, T.Lacin, B.Yildizeli, M.Yuksel. Macroscopic complete resection is not associated with improved survival in patients with malignant pleural mesothelioma. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2018; 155: 2724 – 33.
- S.Metintas, **G.Ak**, M.Metintas. A review of the cohorts with environmental and occupational mineral fiber exposure. *Arch Environ Occup Health*. 2019;74(1-2):76–84.

doi:10.1080/19338244.2018.1467873

- S.G.Armato III, R.J.Francis, S.I.Katz, **G.Ak**, I.Opitz, E.Gudmundsson, K.G. Blyth, A.Gupta. Imaging in pleural mesothelioma: A review of the 14th International Conference of the International Mesothelioma Interest Group. *Lung Cancer* 2019;130 108–114.
- E.Yagci, I.Degirmenci, C.Ozbayer, **G.Ak**, F.Saydam, M.Metintas. Common Variants rs3815188 and rs1043994 on Notch3 Gene Confer Susceptibility to Lung Cancer: A Hospital-Based Case–Control Study. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology* 2019; 38:61–68.
- **G.AK**, S.Metintas, T.Kose, F.Bogar, N.Girginer, H.F. Batırel, N.Uckun, M.Metintas. The relationship between treatment cost and prognosis of malignant pleural mesothelioma in Turkey. *Eurasian J Pulmonol* 2019;21:50-6.
- M.Metintas, **G.Ak**, S.Metintas, H.Yildirim, E.Dündar, N.Rahman. Prospective Study of the Utility of Computed Tomography Triage of Pleural Biopsy Strategies in Patients With Pleural Diseases. *J Bronchology Interv Pulmonol.* 2019 Jul;26(3):210-218. doi: 10.1097/LBR.0000000000000559.
- S.Metintas, **G.Ak**, M.Metintas. Potential years of life and productivity loss due to malignant mesothelioma in Turkey. *Archives of Environmental & Occupational Health* 2020; <https://doi.org/10.1080/19338244.2020.1747380>
- Kabalak PA, Kizilgoz D, Kavurgaci S, Demirci NY, Yılmaz S, **G.Ak**, Metintas S, Metintas M, Demirag F, Yılmaz U. The Clinical Impact of Re-biopsies in Lung Adenocarcinoma: a Retrospective Multicenter Study. *Pathol Oncol Res.* (2020). <https://doi.org/10.1007/s12253-020-00876-2>
- FE. Urfali, S.Metintas, A.Gurgen, **G.Ak**, R.Ozkan, M.Metintas. The role of volumetric method in the assessment of chemotherapy response and predicting survival in malignant pleural mesothelioma. *J Can Res Ther* 2020; DOI: 10.4103/jcrt.JCRT_217_19
- NY.Demirci, D.Koksal, S.Bilaceroglu, N.Ogan, C.Atinkaya, M.Ozhan, **G.Ak**. Management of bleeding risk before pleural procedures: A consensus statement of Turkish respiratory society – Pleura study group. *Eurasian J Pulmonol* 2020;22:73-8.
- M.Akçay, D.Etiz, M.Metintas, **G.Ak**, A.Ozen, S.Yılmaz. Lung Stereotactic Body Radiotherapy: Single-Center Experience. *Turk Onkoloji Dergisi-Turkish Journal Of Oncology* 2020; 35:274-282.
- B.Gul, S.Metintas, **G.Ak**, S.Yılmaz, M. Metintas. The relationship between nutritional status and prognosis in patients with locally advanced and advanced stage lung cancer. *Supportive Care in Cancer.* <https://doi.org/10.1007/s00520-020-05856-5>
- A.Bononi, K.Goto, **G.Ak**, Y.Yoshikawa, M.Emi, S.Pastorino, L.Carporelli, A.Ferro, M.Nasu, J.Kim, JS.Suarez, R.Xu, M.Tanji, Y.Takinishi, M.Minaai, F.Novelli, I.Pagano, G.Gaudino, HI. Pass, J.Groden, JJ. Grzymiski, M.Metintas, M.Akarsu, B.Morrow, R.Hassan, H.Yang, M.Carbone. Heterozygous germline BLM mutations increase susceptibility to asbestos and mesothelioma. *PNAS* 2020. Doi: 10.1073/pnas.2019652117.
- G.Ak. COVID-19’un klinik, laboratuvar ve radyolojik özellikleri. *ESTÜDAM Halk Sağlığı Dergisi.* 2020;5(COVID-19 Özel Sayısı):61-9.
- DT.Coşan, G.Ak, E.Çolak, A.Dal, Ç.Öner, A.Soyocak, E.Çolak, HV.Güneş,

M.Metintas, et al. Evaluation of paraoxonase-1 enzyme activity and oxidative stress relations in malignant mesothelioma cases. Eurasian J Pulmonol 2020. DOI: 10.4103/ejop.ejop_78_19

Projeler (Son 5 yıl):

- DNA Metiltransferaz ve Metil Bağlayan Bölge Proteinlerini Hedefleyen miRNA Gen Polimorfizmlerinin Akciğer Kanseri ile İlişkisinin Belirlenmesi. BAP; Araştırmacı; Başlama: 2012; Bitiş: 2016.
- Mineral lifleriyle çevresel ve mesleki temasın yol açtığı akciğer patolojilerinin yönetimine yönelik iş birliği ağı. Araştırmacı; Başlama: 2013; Bitiş: 2016.
- Malign plevral mezotelyomanın patogeneğinde ailesel yatkınlığın genetik analizi. BAP; Yürütücü; Başlama: 2015; Bitiş: 2017.
- Kemoterapi alan malign mezotelyomalı hastalarda prognoz biyobelirteçlerinin tespit ve doğrulama çalışması. BAP; Araştırmacı; Başlama: 2015; Bitiş: 2017.
- Malign plevral mezotelyomalı hastaların tedavi takibinde biyolojik belirteçlerin yeri; boylamsal analiz. BAP; Yürütücü; Başlama: 2018; Bitiş: 2021.
- Malign plevral mezotelyomalı hastaların tedavi takibinde ve prognoz analizinde miRNA'ların yeri. BAP; Araştırmacı; Başlama: 2018; Bitiş: 2021.
- Stockholm'de yaşayan erionit temaslı Karain Kohort'da mezotelyoma riskinin seyri; 1965-2018. BAP; Araştırmacı; Başlama: 2018; Bitiş: 2020.

