



T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PROSTAT KANSERLİ HASTALARDA PTEN GEN MUTASYONLARININ TANIMLANMASI

MERİÇ TUĞBA AKGÜN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Haziran-2012
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

YÜKSEK LİSANS

PROSTAT KANSERLİ HASTALARDA PTEN GEN MUTASYONLARININ TANIMLANMASI

Meriç Tuğba AKGÜN

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Hasibe Cingilli VURAL

2012, X+70 Sayfa

Jüri
Yrd. Doç. Dr. Hasibe Cingilli VURAL
Doç. Dr. Birol ÖZKALP
Yrd. Doç. Dr. Gökhan KARS

Prostat kanseri; gelişmiş ülkelerde kansere bağlı ölümler arasında 2. sıradadır. Prostat kanserinin ortaya çıkışından ve hastalığın seyrinden sorumlu mekanizmalar tamamen açığa çıkarılamamıştır, ancak tümör seyri ve gelişiminden birçok değişik faktörün önemli rol oynadığı düşünülmektedir. PTEN (fosfotaz ve tensin homoloğu) kromozom 10q23.3 lokalize olmuş, bir çok kanser türünde işlevini kaybetmiş tümör baskılayıcı bir gendir. PTEN, PI3K/Akt yolağını inhibe ederek negatif düzenleyici rol oynar. PI3K/Akt/ yolağı prostat karsinogenezinde önemli hücresel olayları düzenlemektedir. Prostat kanserinde bu yolağın aktivasyonunun daha ileri evre, daha kötü prognoz ve daha yüksek gleason skoru ile ilişkili olduğu gösterilmiştir.

Çalışmamızda; primer prostat kanserli hastalarda PTEN gen mutasyonları Real-Time PZR'a dayalı yeni bir analiz yöntemi olan HRM yöntemiyle araştırılmıştır. HRM (High Resolution Melting) analizinde; PTEN genine ait Ekson1 ve 2 primer olarak kullanılmış, sağlıklı bireylerden alınan 5 adet kan örneği kontrol grubu olarak seçilmiş ve parafin bloklara emdirilmiş olan 10 adet prostat kanserli solid doku örnekleri kullanılmıştır. Çalışmamızın sonucunda; 2 adet prostat kanserli dokuda ve 1 adet kontrol olarak kullanılan örnekte; her iki eksonda da mutasyon gözlemlenmiştir. Türk popülasyonun da; PTEN geni nin prostat kanserinde ki öneminin ve işlevinin anlaşılması için daha geniş çalışmalarla araştırılmalı, PTEN geninin genetik bir marker olarak Türk popülasyonunda kullanılıp kullanılmayacağı yönündeki çalışmalar tetiklenmelidir.

Anahtar Kelimeler: HRM, prostat kanseri, PTEN, mutasyon

ABSTRACT

MS THESIS

IDENTIFICATION of PTEN GENE MUTATIONS in PATIENTS with PROSTATE CANCER

Meriç Tuğba AKGÜN

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF SELÇUK UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
IN BIOLOGY

Advisor: Asst.Prof.Dr. Hasibe CİNGİLLİ VURAL

2012, X+70 Pages

Jury
Asst.Prof.Dr. Hasibe CİNGİLLİ VURAL
Assoc.Prof.Dr. Birol ÖZKALP
Asst.Prof.Dr. Gökhan KARS

Prostat carcinoma is the second most common cause of cancer-related mortality in developed countries. Although the mechanisms responsible for emergence of and progression of prostate cancer were not brought fully exposed, many different factors thought to play an important role in tumor progression. PTEN (phosphatase, tensin homologue) located 10q23.3 on chrosome and inactivation of tumor suppressor gene PTEN has been reported in several types of human tumors. PTEN plays a role as negative regulator by inhibiting the PI3K/Akt pathway. PI3K/Akt pathway regulates cellular events in prostate carcinogenesis. Activation of this pathway in more advanced stages of prostate cancer, poorer prognosis are associated with higher gleason score.

Our study, PTEN gene mutations in patients with primary prostate cancer investigated with the method of HRM-based Real-Time PZR. In this study with HRM method used 5 different blood samples of healthy individuals for control and 10 pieces of solid tissue samples of parafin-embedded blocks with prostate cancer. In the present study, 2 pieces of tissue with prostate cancer and used as a control sample of 1; which mutation is observed in both exons. The importance of PTEN gene in prostate cancer and for understanding the function to be explored in larger studies, PTEN gene as a genetic marker in the direction of the Turkish population triggered whether to use in Turkish population or not.

Keywords: HRM, prostate cancer, PTEN, mutation

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgisini, tecrübesini ve hoşgörüsünü esirgemediği için saygıdeğer danışmanım Yrd. Doç. Dr. Hasibe Cingilli VURAL'a (Selçuk Üniversitesi Moleküler Biyoloji A.B.D.), tezimde çalışma materyali sağlayan Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Patoloji Bölümü'ne, tez projemi destekleyerek gerekli maddi olanağı sağlayan Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne (BAP), hedeflerimi oluşturmamda ve bu hedeflere ulaşacağıma olan inançları ile ne olursa olsun her zaman yanımda olan, bugünlere gelmemi sağlayan, desteklerini daima hissettiğim anneme, babama ve kardeşlerime çok teşekkür ediyorum.

Meriç Tuğba AKGÜN
KONYA-2012

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **iv**

ABSTRACT ..... **v**

ÖNSÖZ ..... **vi**

İÇİNDEKİLER ..... **vii**

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **ix**

1. GİRİŞ **1**

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI **3**

2.1. Kanser 3
2.1.1. Kanserli hücrenin gelişmesi 5
2.1.2. Kanserin Evrelendirilmesi 6
2.1.2.1. TNM Evrelemesi 6
2.2. Prostat Kanseri 7
2.2.1. Prostat bezi 7
2.2.2. Prostat kanserinin tanımı ve sınıflandırılması 8
2.2.3. Prostat kanserinin risk faktörleri 9
2.2.4. Prostat kanseri semptomları 10
2.2.5. Prostat kanserinin teşhisi 10
2.2.6. Prostat kanseri tedavisi 11
2.2.7. Prostat kanserinin tedavisinde kullanılan mevcut yaklaşımlar 11
2.2.8. Prostat kanserinin evrelendirilmesi 12
2.2.9. Prostat kanserinin gelişiminde moleküler mekanizmalar 14
2.3. Onkogenler 15
2.4. Tümör Baskılayıcı Genler 16
2.5. Hücre Çekirdeği Dışında Etkili Olan Tümör Baskılayıcı Genler 18
2.5.1. PTEN 19
2.5.1.1. PI3 kinaz/Akt sinyal iletim yolu 20
2.6. Mutasyon 23
2.6.1. Mutasyon Çeşitleri 24
2.6.1.1. Nokta mutasyon 24
2.7. Mutasyon tarama yöntemleri 24
2.7.1. Tek zincir konformasyon polimorfizmi (SSCP) 25
2.7.2. DGGE (denatüre edici jel elektroforezi) 28
2.7.3. MPLA (Multiple Ligand Probe Amplification) 28
2.7.4. Southern blot analizi 29
2.7.5. Polimeraz zincir reaksiyonu/restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (PZR/RFLP) 29
2.7.6. Real Time PZR 30
2.7.6.1. HRM (high resulotion melting) analizi 31
2.7.6.1.1. HRM analizinde kullanılan boyalar 32
2.7.6.1.2. Floresan DNA melting analizinin temeli 33

2.7.6.1.3. Çalışma prensibi 34
2.7.6.1.4. PZR koşulları 34
2.7.6.1.5. Genotiplendirme 34
2.7.6.1.6. DNA Tm Derecesi 35

3. MATERYAL VE METOT 37

3.1. Biyolojik Materyal 37
3.2. Moleküler Materyal 37
3.3. Histopatolojik Metotlar 38
3.3.1. Doku örneklerinin histopatolojik çalışması 38
3.3.1.1. Histopatolojik incelemeye dayalı yöntemler 38
3.4. Moleküler Metotlar 38
3.4.1. Parafinli bloklardan deparafinasyon 38
3.4.2. DNA izolasyonu 38
3.4.2.1. EZ1 biorobot (Qiagen) DNA izolasyon cihazı ile izolasyon 39
3.4.3. DNA kalitesinin tanımlanması 39
3.4.3.1. Agaroz jel elektroforez yöntemi 39
3.4.3.2. Mikro hacim (nanodrop) spektrofotometre değerlendirmesi 40
3.4.4. HRM (High Resolution Melting Curve) yöntemi ile mutasyon tanımlama . 40
3.4.4.1. HRM koşulları 40

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA 41

4.1. Histopatolojik Bulgular 41
4.2. HRM Analizi Bulguları 42
4.2.1. Housekeeping gen 43
4.2.2. Denatürasyon eğrisi analizi 44
4.2.2.1. Denatürasyon eğrisi (HRM Eğrisi) 44
4.2.2.2. Normalize ve türev eğriler 47

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 58

5.1. Sonuçlar 58
5.2. Öneriler 59

KAYNAKLAR 60

ÖZGEÇMİŞ 71

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

°C: Santigrad derece
µ: Mikron
µg : Mikrogram
µg: Mikrogram
µl: Mikrolitre
γ: gama

Kısaltmalar

ABD: Amerika Birleşik Devleti
APC: Adenomatous polyposis coli geni
AR: Androjen reseptörü
ASA: Allel spesifik amplifikasyon
B2M: Beta2-microglobulin geni
BCL2: B-cell lymphoma 2 geni
bç: Baz çifti
cc: Cubic centimeter = 1ml
cm: Santimetre
CpG: Sitozin ve guanin içeren bölge
Ct: Her bir örneğin eşik değerini aştığı siklus sayısı
DAPI: 4-6 diamidino- phenylindole
DCC: Deleted Colon Cancer geni
DGGE: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
dH_2O: Distile su
dk: Dakika
DNA: Deoksiribonükleik asit
dsDNA: Çift zincirli DNA
EGF: Epidermal growth factor geni
EGFR: Epidermal growth factor reseptörü
ETaR: Endotelin A reseptörü
F: Forward
g: Gram
GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GTPaz: Guanosin tripfosfotaz
HA: Heterodubleks analizi
HER2: Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
HPRT-1: Hypoxanthine phosphoribosyltransferase1 geni
HRM: High resolution melting
IGF: Insulin-like growth factor geni
IGF1 R: insulin-like growth factor 1 receptor
kDa: Kilo Dalton
L: Litre
mA: MiliAmper
Mg^{+2}: Magnezyum
ml: Mililitere

mRNA: Mesajcı ribonükleik asit
NF1: Neurofibromin geni
ng: Nanogram
p16(CDKN2A): Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
p21(CDKN1A): Cylin dependent kinase inhibitor 1A
PAP: Prostate spesific Acid Phosphatase
pH: -log[H^+]
PI3K: Phosphoinositide 3-kinase
PIP3: Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate
PSA: Prostat Spesifik Antijeni
PTEN: Phosphatase and tensin homolog
PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu
R: Reverse
RAS: Rat sarcoma
RB1: Retinoblastoma1 geni
RFLP: Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi
RNA: Ribonükleik asit
rpm: Dakika başına devir sayısı
rRNA: Ribozomal ribonükleik asit
RTK: Receptor tyrosine kinases
RT-PCR: Real time-Polimerase Chain Reaction
sn: Saniye
SNP: Single nükleotid poliformizm
SSCP: Single Strand Conformation Polymorphism
TAE: Tris Asetik asit Etilen diamin tetra asetik asit
TGF: Transforming growth factor
Tm: Melting temperature
tRNA: Taşıyıcı ribonükleik asit
TRUS: Transrektal Ultrason
UV: Ultraviyole
V: Voltaj
VEGFR: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

1. GİRİŞ

Prostat, mesanenin alt kısmında bulunan ve mesaneden dışarıya açılan idrar yolunu saran bir salgı bezidir. Meniyi üretmekle görevlidir.

Prostat kanseri, erkek üreme sisteminin önemli bir üyesi olan prostatta görülen malign (kötü huylu) değişikliklerdir. Batı erkek popülasyonunda en sık karşılaşılan malign lezyondur ve bu popülasyonda kansere bağlı ölüm nedenleri arasında ise ikinci sırada yer almaktadır (Parker ve ark., 1997). Prostat kanseri tüm erkek kanserlerinin %11'ini ve erkekler arasında kanserden ölümlerin %9'unu oluşturmaktadır. Her 5 erkekten birisi hayatı boyunca prostat kanserine yakalanmaktadır. Ülkemizde ise 2003 yılı sağlık bakanlığı verilerine göre en sık gözlenen kanserler arasında üçüncü sıradadır. Akciğer ve barsak kanserlerinden sonra en sık görülen kanser tipidir.

Fosfataz ve tensin homologları (PTEN), 10q23.3 kromozomal bölgede yer alan bir tümör baskılayıcı gendir. PTEN lipid fosfataz etkisi ile fosfoinozitid-3 kinaz/protein kinaz B (PI3K/AKT) sinyal yolunun ikincil habercisi olan fosfotidil inositol 3,4,5 trifosfat'ın (PIP 3) D3 konumundaki fosfatı ayırmakta ve fosfoinozitid-3 kinaz/protein kinaz B'nin merkezi düzenleyici etkisini baskılayarak hücrenin büyümesi, çoğalması, yaşamı ve embriyolojik göçü gibi çok sayıda hücresel fonksiyonları denetlemektedir. PTEN geninde çok sayıda mutasyon görülmektedir. Bu mutasyonlar sonucunda PTEN proteini üretilememekte ve PIP3/AKT yolunun etkisi ile oluşan kontrolsüz hücre çoğalması engellenememektedir. PTEN protein üretim oranı azaldıkça tümör hücreleri hızla farklılaşmakta ve tümör ilerleyici bir seyir izlemektedir (Gül, 2008).

Prostat, beyin, meme, endometrium ve böbrek kanserlerinde PTEN tümör baskılayıcı geni inaktif bir durumdadır. Prostat kanserli hücrelerde PTEN işlevinin yok olması; silinme, mutasyon ve ksenograf modelerinde metilasyon aracılığıyla olmaktadır. Primer prostat kanserlerinde PTEN mutasyonları göreceli olarak az olmasına karşın ileri evre tümörlerde PTEN inaktivasyonu daha sık görülmektedir.

Bilimsel ilerleyiş birçok alanda olduğu gibi, geçtiğimiz son on beş yılda moleküler biyoloji ile ilgili araştırmalarda da önemli ilerlemeler gerçekleşmiştir ve birçok uygulama arasında, bilinmeyen DNA dizileri ya da genetik anomalilerin ortaya çıkarılmasında kullanılabilirliği kanıtlanmıştır. Moleküler biyoloji dahilinde; duyarlı tekniklerin gelişimi ile nükleik asitlerin dakika mertebesinde tayinini sağlayan bir çok güçlü ekipman geliştirilmiştir.

Genomiğin keşfi için kullanılan ilk yöntemlerden biri PCR'dır. Özellikle çalışmalarda genotiplendirme ve mutasyon taraması için PCR sonrası analiz teknikleri kullanılmıştır. DHPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography), SSCP (single-stranded conformation polymorphism), TGCE (temperature gradient capillary electrophoresis), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) gibi PCR sonrası geleneksel metotlar; maliyetli laboratuar ekipmanları gerektirmektedir. Artık geleneksel PCR yerini Real-time PCR cihazına bırakmaya başlamıştır. Real-Time PCR, PCR reaksiyonlarında sıcaklık döngülerini sağlamak için kullanılan cihazların (thermocycler) hassas ölçüm aletleriyle birleştirilmesiyle ortaya çıkmıştır. DNA ve RNA örnekleri kalitatif ve kantitatif olarak kısa sürede analiz edilebilmektedir. Real-time PCR' da ürünlerin analizi reaksiyon sırasında yapılmaktadır. Klinik uygulamaları giderek artan real-time PCR sistemleri, infeksiyon hastalıklarının tanısında ve nokta mutasyonlarının belirlenmesinde sağladığı üstünlükler nedeniyle tercih edilmektedir. Prob temelli genotiplendirme herhangi bir standart real time cihazında uygulanan yeni ve daha hassas bir tekniktir, ama özel etiketli problar oldukça pahalıdır. Bu yaklaşım optimizasyon için önemli bir çaba ve zaman gerektirmektedir. Yakın zamana kadar çalışmalar için eksikliği olan şey yüksek verimlilikte örnek çalışmasını sağlayan ve her örnek başına düşük maliyet gerektiren bir analiz yöntemiydi. Bu eksiklik; HRM analizi ile doldurulmuş, prob temelli genotip deneyleri için yüksek maliyet ve zaman sorununun çözen alternatif bir yöntem olmuştur. HRM analizi mevcut real-time PCR sistemleri üzerinde yapılabildiği için özel ekipmanlara ihtiyaç duyulmamaktadır. Bu basit ve son derece hassas analiz, genetik analiz çalışmasının önemli bir parçası haline gelmektedir. HRM, artan sıcaklıkla birlikte çift zincirli DNA' nın tek zincirli DNA ya dönüşümü ile karakterize bir analizdir. Analizin uygulamasından önce, hedef sekans çift zincirli DNA ya bağlanan floresan boyalar varlığında çoğaltılmaktadır. DNA sekans varyantlarını tanımlamak için geliştirilmiş ve ilk olarak genotiplendirme için kullanılmıştır. Basit oluşu, diğer sekanslama yöntemlerine göre düşük maliyetli oluşu, kullanım kolaylığı, özgüllü HRM analizinin en belirgin özelliklerindendir.

Mevcut çalışmada histopatolojik sonuçlara göre prostat kanserli bireylerden alınan biyopsi örneklerine özgü parafin bloklara emdirilmiş dokulardan DNA izolasyonları yapılarak elektroforetik ve spektral yöntemlerden sonra Real-Time PZR cihazında HRM analizi ile gene özgün mutasyonlar ve mutasyon tipleri tanımlanacaktır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Kanser

Kanser terimi tek bir hastalık adı olmayıp kontrolsüz büyüme olan habis tümörlerin tümüne verilen bir addır. Hücre çoğalması sonucu bir kitle haline gelen tümör (neoplazma) kendini saran komşu hücrelere de saldırmakta (cancer=yengeç) ve hastalığın sonraki evrelerinde tüm vücudu sarmaktadır (metastaz) (Başaran, 1999).

Ülkemizde 1970'li yıllarda sebebi bilinen ölümler arasında 4. sırada yer alan kanser, son yıllarda kardiyovasküler sistem hastalıklarından sonra 2. sıraya yükselmiştir. Kanser tüm yaştaki insanları etkiler ve her 3 insandan biri, yaşamının bir döneminde kanser tanısı konusunda deneyim yaşamaktadır. Kanserin kontrol altına alınması hususunda önceliklerin belirlenebilmesi için kanser yükünün insidans (ortaya çıkan yeni vakalar) ve ölüm sayısı cinsinden tahmin edilmesi gerekmektedir. En son uluslararası verilere göre (Ferlay ve ark., 2002; 2006, American cancer society, 2008) 2008 yılı tamamında 12,4 milyon tahmin edilen yeni vaka ve 7,6 milyon ölüm meydana gelmiştir. İnsidans yönünden dünyada en yaygın kanserler akciğer (1,52 milyon), meme (1,29 milyon), ve kolorektal (1,15 milyon) kanserleridir. Kötü prognoz nedeniyle akciğer kanseri aynı zamanda en fazla ölüme (1,31 milyon) neden olan kanser iken onu mide kanseri (780.000 ölüm) ve karaciğer kanseri (699.000 ölüm) izlemiştir (Dünya kanser raporu, 2008).

Yurdumuzda en sık görülen kanserler erkeklerde akciğer, prostat, kalınbarsak, rektum, mide ve pankreas; kadınlarda ise meme, akciğer, kalın barsak, rektum, serviks, over, mide ve pankreas kanserleri olarak sıralanabilir.

Bugün, artık kansere bir tek etmenin sebep olmadığı bilinmektedir. Bazen kanser bir kişinin, hatalı genleri kalıtım yoluyla alması gibi basit bir yol çizmektedir. Bazen de sebebinin saptanması mümkün olmamaktadır. Ama genelde yüksek risk faktörü dediğimiz sebeplerden bazılarının bir araya gelmesiyle kanser tablosu oluşturmaktadır. Kanser risk faktörlerine bakılacak olursa; son yıllarda sağlıksız yaşam alışkanlıkları, sigara ve alkol kullanımı, genetik yatkınlık, çok az veya çok fazla güneş ışığına maruz kalma, bazı virüsler, yüksek yağlı yiyecekler, yaş durumu gibi etmenler sıralanabilir.

Kanserde temel sorun, hücre çoğalmasındaki kontrolün kaybolmasıdır ve çoğalma ya da büyüme, gen kontrolü altında olduğuna göre genetik faktörlerde tüm kanser türlerinde etkilidir şeklinde genelleme yapılabilir. Kanser gelişimine hangi

faktörler etkili olursa olsun tüm kanser türlerinin (belirgin bir kalıtsal komponent bulunmasa bile) somatik hücrelerde mutasyon ya da mutasyonlar sonucu oluştuğu ve mutasyonların da bir seri genin ekspresyonunu etkilediği artık bilinen bir gerçektir (Başaran, 1999).

Kanserde genetik değişikliklerin rolü 50 yılı aşkın bir süredir bilinmektedir ve bilim adamları kanserde mutasyona uğramış genlerin uzun bir katalogunu çıkarmıştır. Genellikle DNA tamir mekanizması, hücre çoğalması, hücre ölümü ve hücre farklılaşmasında rol alan proteinleri kodlayan genlerde ortaya çıkan mutasyonlar kanser oluşumuna sebep olur.

Kansere yol açan genetik mutasyonlar bazen kalıtsal olarak anne babadan çocuklara aktarılan mutasyonlardır. Örneğin ailesel meme ve kolon kanserlerinde gözlenen mutasyonları taşıyan bireyler toplumun diğer bireylerine göre daha fazla risk taşır. Kansere neden olan genetik değişikliklere tabi genler arasında; hücre çevrimi kontrolünde rol alan genler de önemlidir (Lobrich ve Jeggo, 2007; Malumbres ve Barbacid, 2001). Bununla birlikte, kanser hücrelerinin çoğalması hücrelerin hücre çevrimi süreçlerini işler tutmasını gerektirir.

Kanserde görülen hücre çevrimi değişiklikleri başlıca iki ana regülatör kümesiyle sınırlıdır: hücre çevrimi ilerlemesinin negatif kontrolünde rol alanlar (ki bunların etkin olmayan hale getirilmesi hızlanmış ve kontrolsüz hücre çoğalmasına yol açar) ve genom bütünlüğünün korunmasını hücre çevrimine bağlayanlardır (ki bunların etkin olmayan hale getirilmesi karsinogenez sırasında sürekli biriken gen değişiklikleri olan hücrelere yol açar) (Lobrich ve Jeggo, 2007).

Apoptosis ya da apoptosisin olmaması da kanser oluşumunda kritik öneme sahiptir (Letai, 2008). Örneğin; apoptotik uyaranlara karşı direnç sağlayan bir gen olan BCL2, düşük dereceli B hücresi Hodgkin olmayan lenfomalarda t(14: 18) kromozomal translokasyonda bulunmuştur. Böylelikle, neoplastik hücre genişlemesinin hızlı çoğalmadan ziyade, hücre ölümünün azalması nedeniyle ortaya çıktığı anlaşılmıştır. Apoptosisteki hatalar neoplastik hücrelerin yaşlanmanın ötesinde hayatta kalabilmelerini sağlar ve böylelikle tümör kütlesi genişledikçe hipoksiya ve oksidatif stresten koruma sağlanmış olur. Tümörlerin büyümeleri, özellikle de kimyasal karsinojenlere yanıt olarak büyümeleri, çoğalma etkinliği; değişikliğe uğramış hücre popülasyonları ortaya çıktıkça, etkilenen dokulardaki değişen apoptosis oranları ile ilişkilendirilmiştir. Öte yandan, bir paradoks olarak, bazı kanserlerde, özellikle de meme

kanserinde büyüme artan apoptosisle pozitif olarak ilişkilendirilmektedir (Parton ve ark., 2001).

2.1.1. Kanserli hücrenin gelişmesi

Kanser gelişimi başka dokulara sıçraması ilaç ya da radyasyon tedavisine direnç geliştirmesi ve genetik mutasyonları gerektirir. Kanser hücrelerinde ortaya çıkan mutasyonlar kesinlikle rastgele değildir.

Yapılan deneysel çalışmalarda tam bir kanserli hücrenin gelişmesi için gereken minimum basamak sayısı belirlenmiştir (Hanahan ve Weinberg, 2000). Buna göre üç temel kuralın ihlal edilmesi gerekir.

Birincisi, hücrelerin ancak doğru sinyali aldıklarında bölünmeleridir. Bu kuralı ihlal etmek için hücre, bir hormon ya da büyüme faktörü ile uyarıldığında normal olarak aktif hale geçen devreleri açarak hücre bölünmesini kalıcı olarak aktif hale getirmelidir.

İkinci kural, hücrelerin DNA replikasyonu için gergin ya da yanlış koşullarla karşılaştığında, genlerin hasar görebileceği koşullarda DNA replikasyonunu başlatmak yerine, kendi kendini imha etme programlarını aktif hale getirmeleridir. Bu kendini imha programlarından kaçınmak için, hücrelerin normalde anormal ya da aşırı hücre bölünmesini engelleyen güvenlik frenlerinden kurtulması gerekir. Bu frenler iki ana gen tarafından kontrol edilmektedir: RB1 (aynı zamanda Retinoblastoma geni olarak da bilinir) ve TP53 (normalde ortamda rahatsızlık olduğunda hücrelerin bölünmesini önleyen bir stres sensörü olan p53 proteinini üreten gen) genleridir. Bu iki fren mutasyon sonucu ortadan kalktıklarında, hücreler sadece bölünmekle kalmaz, aynı zamanda programlanmış hücre ölümünden de kaçınmış olurlar ve böylelikle de bir tümör kitlesinin oluşumuna izin verilmiş olur.

Üç numaralı kural, normal hücrelerin sadece sınırlı, belli sayıda bölünmeleri kuralıdır. Başka bir deyişle; hücrelerin DNA'larını önceden tanımlanmış, belirli bir sayının ötesinde kopyalamalarını engelleyen bir "bölünme sayaçları" vardır. Normal hücreler, her kromozomun ucunda yer alan ve telomer adı verilen özel bir yapı nedeniyle sınırlı sayıda DNA replikasyonu yapabilir ve bölünebilirler.

Bu değişikliklerin her biri ayrı ayrı ele alındıklarında, normal hücre işlevini altüst edebilir; apoptozis ile imha edilebilir. Dolayısıyla kanserleşecek bir hücrenin asıl sorunu bu değişikliklerin tümünü eş güdümlü bir şekilde çalıştırabilmektir.

2.1.2. Kanserin Evrelendirilmesi

2.1.2.1. TNM Evrelemesi

Bir kanserin anatomik derecesini tanımlamaya yönelik evrensel, basit bir sistem olan TNM sınıflandırma sistemi oluşturulmuştur.

T = Tümörün çapı ile ilgili bilgi verirken
N = Lenf Nodu metastazını gösterir
M =Metastaz olup olmadığını söyler.

Bu sınıflandırmaya göre T0, T1, T2, T3, T4,N0, N1, N2, N3n M0 ve M1 evreleri vardır.

T0= Primer tümör saptanamıyorsa
T1= Tümörün çapı belli bir cm'den küçükse (her tümör için değişik değerler olabilmekte)
T2= Tümör çapı belli bir cm'den büyükse
T3= Çaptan bağımsız olarak yakın komşu organ veya dokulara yayılmışsa
T4= Uzak organ ve dokulara yayılmışsa

N0= Bölgesel lenf bezi metastazı olmaması
N1= Aynı taraftaki lenf bezlerine metastaz
N2= Aynı taraf uzak lenf bezlerine metastaz
N3= Karşı taraf lenf bezlerine metastaz

M0=Uzak metastaz yok
M1=Uzak metastaz var

Daha sonra tümörden tümöre fark etmek kaydıyla T, N ve M değerine göre Evre1, 2, 3, 4 diye evrelere ayrılmaktadır. Bazı tümörlerde evrelerde kendi içlerinde alt evrelere ayrılmaktadır. Ör: Evre 1a, 1b, Evre2 vs. gibi.

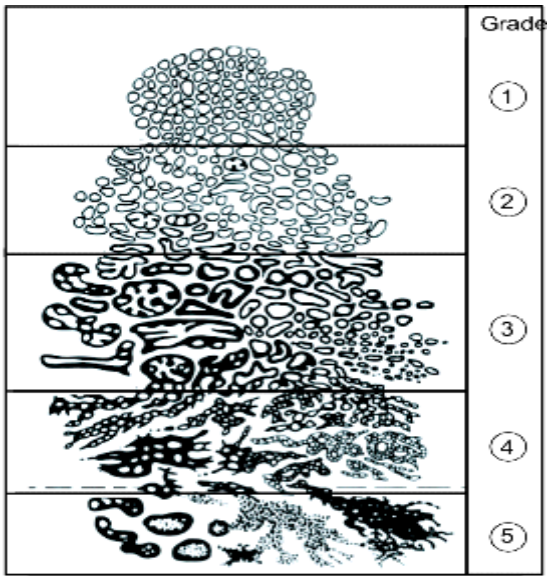
2.1.2.2. Gleason skoru

Kanser dokusunun histolojik incelemesi sonucunda, aynı alanda benign bezler, prenoeplastik odaklar (PIN) ve farklı derecelerdeki neoplastik odaklar bir arada görülebilir. Bu heterojenite ile ilgili olarak, Gleason bugün iyi bir prognostik indikatör

olarak kabul görmüş olan bir derecelendirme sistemi geliştirmiştir (Gleason, 1992; Şanlıoğlu, 2005). Bu sistemde glandüler yapı değerlendirilir.

Gleason dereceleri 1 ile 5 arasında değişmekte olup, en sık görülen derece ile ikinci sıklıkta görülen derecenin toplamı Gleason skor'unu oluşturur (Şekil 2.1). Gleason skor 2 ile 10 arasında değişmektedir. Birinci derece tümörler normale yakın bir özellik gösterirken, 5. derecede herhangi bir glandüler yapı görülmemektedir.

Küçük ve iyi diferansiye tümörler (1. ve 2. derece) genelde organa sınırlı iken, büyük (4 cm^3'ten büyük) ve kötü diferansiye tümörler (4. ve 5. derece) genellikle lokal ileri evre ya da metastatiktirler. Gleason skor 2-4 iyi diferansiye tümör, Gleason skor 5-7 orta derecede diferansiye tümör, Gleason skor 8-10 ise kötü diferansiye tümörü temsil eder (Mazeron ve ark., 2002; Şanlıoğlu, 2005).

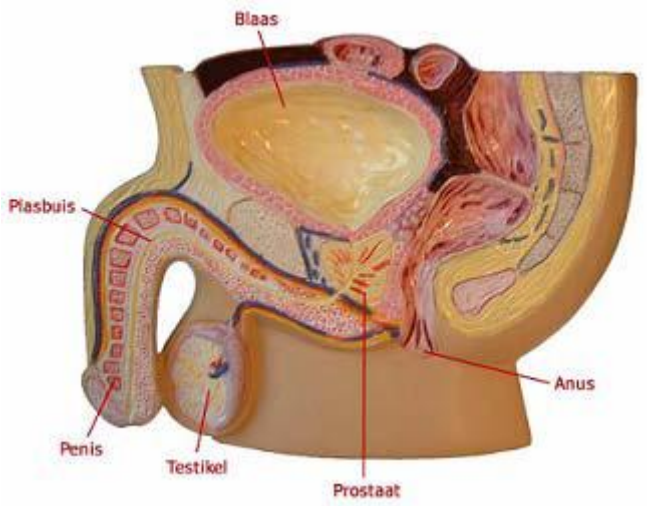


Şekil 2.1. Gleason derecelendirme sistemi

2.2. Prostat Kanseri

2.2.1. Prostat bezi

İnsanda prostat bezi, mesanenin hemen altında yer alır. Prostat bezinin orta kısmından idrar boşaltımında rol alan üretra geçer. Prostatı oluşturan hücrelerin yaptığı salgı, seminal sıvının bir bölümünü oluşturur.

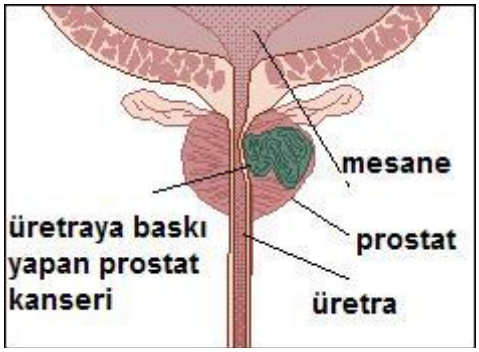


Şekil 2.2. Prostat bezinin görüntüsü

2.2.2. Prostat kanserinin tanımı ve sınıflandırılması

Prostat kanseri, prostat bezinde kanser gelişmesiyle oluşan bir hastalıktır. Kanser, prostat hücreleri değişime uğradığında ve kontrol dışı çoğalmaya başladığında olur. Prostat kanserlerinin yaklaşık %5-10'unun genetik faktörler tarafından belirlendiği iddia edilmiştir. Normal prostat hücrelerinin bozularak agresif, metastatik ve hormonal refraktör prostat hücrelerine dönüşmesinde onkogenler, tümör baskılayıcı genler, apoptoz, başkalaşım, adhezyon, anjiogenez, DNA onarımı, genetik instabilite ve ilaç direncinden sorumlu genlerin de etkisi olmuş olabileceği düşünülmektedir (Güneş ve ark., 2003).

Prostat kanseri, tümörün baskısı sonucu sık idrara çıkma, hematüri, hematospermi ya da postejakülatör ağrı gibi semptomlarla ortaya çıkan bir kanserdir (Şekil 2.3.). İleri evrede lenf nodlarına, kemiğe ya da diğer organlara metastazı tipiktir.



Şekil 2.3. Kanserin üretraya baskısı

Erkeklerde prostat kanseri, gelişmiş bölgelerde en fazla teşhis edilen kanser türü haline gelirken (643.000 vaka, yeni vakaların toplamının %20,2'si), az gelişmiş ülkelerde birinci sıradaki akciğer kanserinin (538.000 vaka, %15,3) oldukça gerisinde, altıncı sıradadır (197.000 vaka, %5,6).

2.2.3. Prostat kanserinin risk faktörleri

Yaş: Prostat kanserinde yeni tanı konmuş hastaların %75'inden fazlası 65 yaş üstündedir. 85 yaşında, prostat kanseri riski tüm dünyada % 0.5-20 arasında değişir (Epstein, 2005; Rosai, 2004; Reiter ve Kernion, 2002). Otopsi çalışmaları sonuçlarına göre; 30 yaşındaki erkeklerin %30'u, 50 yaşındaki erkeklerin %50' si ve 85 yaş üstündeki erkeklerin büyük çoğunluğu histolojik (latent) prostat kanserine sahiptir. 50 yaşından küçük erkeklerde prostat kanseri teşhisi % 1'in altındadır (Grönberg, 2003).

Coğrafik özellikler: Prostat kanseri insidansı etnik popülasyonlar ve ülkeler arasında farklılık göstermektedir. Asya'da, özellikle Çinlilerde ve Japonlarda düşük oranda saptanırken; Kuzey Amerika ve İskandinav ülkelerinde yüksek orandadır (Estein, 2004; Epstein, 2005; Grönberg, 2003).

Irk: Siyah ırkta görülme oranı beyazlara göre yaklaşık bir buçuk kez daha fazladır (Epstein, 2005; Rosai, 2004).

Heredite ve Genetik: Prostat kanserinin başlangıç ve ilerlemesine yol açan spesifik nedenler henüz bilinmemesine rağmen, genetik ve çevresel faktörlerin bu hastalığın oluşumunda rol oynadığı gösterilmiştir. Prostat kanseri gelişme riski, etkilenen akrabaların sayısı ve onların teşhis anındaki yaşı ile ilişkilidir. Birinci derece akrabaların birinde mevcutsa risk 2 kat, iki-üçünde mevcutsa risk 5-11 kat artmaktadır. Prostat kanseri için güçlü aile hikayesi olan erkekler, daha erken yasta hastalık geliştirmeye eğilimlidirler (Rosai, 2004; Grönberg, 2003; Reiter ve Kernion, 2002). Prostat kanserlerinin %10'unun kalıtımsal olduğuna inanılmaktadır (Rosai, 2004; Reiter, 2002). İsveç ve ABD' de yaşayan, prostat kanseri açısından yüksek riskli 91 ailenin genetik incelemesi, 1. kromozomun uzun kolunda bir major hassasiyet bölgesi (1q24-25) bulunduğunu ortaya koymuştur. Bu kişilerde prostat kanseri daha erken yaşta görülmektedir (Epstein, 2005; Reiter ve Kernion 2002).

Hormonal faktörler: Prostat kanserinin gelişimi ve ilerlemesi androjenlerden etkilenir. Medikal veya cerrahi kastrasyon ile testosteronun kesilmesi sonucu tümör geriler (Epstein, 2005; Rosai, 2004; Grönberg, 2003). İnsülin benzeri büyüme faktörü (IGF-I),

tümör hücrelerinin proliferasyon, diferansiyasyon ve apoptozunu düzenler. Prostat kanseri riski, yüksek plazma IGF-I düzeyi ile doğru orantılıdır (Grönberg, 2003; Reiter, 2002).

Diyet: Latent veya histolojik prostat kanserinin, klinik kansere dönüşümünde diyetin rol oynayabileceğine dair kanıtlar mevcuttur (Reiter, 2002). Kırmızı etin fazla tüketimi prostat kanseri ile ilişkilidir. Soya yüksek oranda fitoöstrojen içerir ve prostat kanseri riskini azaltır. Domates bazlı ürünlerin sık alımı da prostat kanseri riskini azaltır. Selenyum tümör oluşumunu; antioksidan etki, immün sistemin uyarılması, apoptozun indüklenmesi ve testesteron oluşumunu inhibe etmesiyle engeller. Bir çalısmada vitamin E (α-tokoferol) alan hasta grubunda, almayanlara göre prostat kanser insidansi ve mortalitesinde azalma saptanmıştır (Epstein, 2005; Grönberg, 2003; Reiter, 2002).

2.2.4. Prostat kanseri semptomları

Prostat kanserinin ilk aşamalarında genellikle belirtiler gözlenmez. Hastalar da, üretral tıkanma ile ilgili prostat kanseri belirtileri görülebilir. Ancak bu durum iyi huylu prostat kanseri belirtisi olabilir, çok daha az zararlı bir durumdur fakat yaşlı bireylerde istenmeyen büyümeler gözlenir.

2.2.5. Prostat kanserinin teşhisi

Prostat kanseri, dijital rektal muayene, transrektal ultrasonografi, prostat asit fosfataz (PAP) ve prostat spesifik antijen (PSA) kan testleri ile tespit edilebilir.

Dijital rektal muayene: Dijital rektal muayene, prostat kanseri taramalarında rutin olarak kullanılan bir tekniktir. Şüpheli dijital rektal muayene, serum prostat spesifik antijen (PSA) düzeyleri ile birlikte değerlendirildiğinde taramalarda prostat kanseri tanı oranını yükseltir (Coley ve ark., 1997).

PSA: PSA ilk kez 1971 yılında seminal plazmada tanımlanmış, 1980 yılında serumda ölçülmüş ve son olarak 1994 yılında prostat kanseri tanımlamasında kullanım onayı almıştır (Lilja ve ark., 1991).

Prostata özgü antijen (PSA) seviyesi tanı konmasında oldukça önemli spesifik bir markırdır. Kanda bakılan ve prostat bezine özgü bir protein olan PSA prostat kanserinin tanısında yardımcı tetkiklerden biri olmaktadır. İyi huylu tümörlerde genellikle PSA değeri yüksektir. Bu yüzden Prostat kanseri açısından kabul edilebilir

duyarlılığa sahip olmasına rağmen özgüllük açısından yetersizdir (Lilja ve ark., 1991). Bu yüzden biyopsi yapılması bütün teşhislerde gereklidir.

PSA' nın kullanım alanları prostat kanseri tanıma, erken tanı, evreleme ve tedavi sonrası izlemdir.

PAP: Prostattan salgılanan bir glikoproteindir. Prostat maligniteleri, biopsi, tuşe, kateterizasyon, postoperatif dönem, benign prostat hiperplazisi, prostatit, prostat enfarktı vb. durumlarda serum prostatik asit fosfataz düzeyi (PAP) artar. Prostat kanserleri için tarama amaçlı olarak kullanılamaz. Klinik kullanımı, metastatik prostat kanserlerinin doğrulanması ve derecelendirilmesi ile sınırlıdır. Ayrıca radikal prostatektomili hastalarda rekürrens takibi ve tedaviye cevabın izlenmesinde de yardımcıdır.

Transrektal ultrasonografi: Kanser olmayan durumlarda da PSA seviyeleri yükselebildiği için genellikle transrektal ultrasonografi (TRUS) yapılması gerekmektedir. Bu işlem sırasında prostat görüntüsünü yansıtan, acısız ses dalgaları üreten bir alet rektuma yerleştirilir. Yansıyan ses dalgaları, daha sonra bir televizyon ekranında prostatın şekli, büyüklüğü ve iç kesimlerinin görüntüsü hakkında bilgi verir.

Biyopsi: Biyopsi rektumdan prostat bezi içine uzatılan özel iğneler yardımıyla alınır. Biyopsi prostat kanserini kesin olarak teşhis etmenin tek yoludur.

2.2.6. Prostat kanseri tedavisi

Tedavi; tümörün tipine, yayılma durumuna, kişinin yaşına ve sağlık durumuna ve tedavide oluşabilecek yan etkilerde hastanın moraline bağlıdır. Tedavi seçenekleri; radyasyon, kemoterapi ve hormon tedavisidir. Yayılmamış kanser; genellikle radyasyon veya prostat bezinin cerrahi olarak ortadan kaldırarak tedavi edilmektedir. Cerrahi tekniklerde ki gelişmeler artık hastaların çoğunda normal cinsel fonksiyonunu sürdürmeye izin vermektedir.

2.2.7. Prostat kanserinin tedavisinde kullanılan mevcut yaklaşımlar

Prostat kanserinde tanıda belirlenen histolojik derecelere göre hastalar farklı stratejiler ile tedavi edilmektedir. Hastalığın organa sınırlı olarak seyrettiği erken evrelerde, tedavide genellikle operasyon ve/veya radyasyon tedavisi uygulanır (Klotz ve ark., 2000; Do ve ark., 2002; Şanlıoğlu, 2005). Tümörün artık prostat bezi ile sınırlı olmadığı, ancak metastaza dair belirtiye rastlanılmayan aşama, lokal ileri evre olarak

tanımlanır. Lokal ileri evre hastalığın tedavisinde amaç, metastazı ve doku invazyonu riskini düşürmektir. Bu evrede, tedavide genellikle radyoterapi ve hormon tedavisinin birlikte kullanıldığı yaklaşımlardan yararlanılır. Ancak, hastalık erken evrede teşhis edilemediğinde ya da agresif formlarda, seminal vesiküllerin lokal invazyonu ile karakterize olan ileri evrelere geçiş ve çoğunlukla kemiğe olmak üzere metastaz gerçekleşir. Metastatik hastalığın tedavisinde amaç, hastanın yaşam süresini uzatabilmek ve metastazın kemik ağrısı gibi başlıca semptomlarını önleyerek ya da kontrol altına alarak hastanın yaşam kalitesini artırmaktır. Bu evrede hastalara genellikle hormon tedavisi uygulanır (Anonim).

Androjen sentezini bloke edici ajanlarla muamele, hastalığın gelişimini bir süre geriletse de, bu tümörlerin hemen hemen hepsinde androjen yokluğunda tümör progresyonu devam eder (Smith ve ark., 2002; Klotz ve ark., 2000; Şanlıoğlu, 2005). Bu aşamada hastalığın progresyonunu yavaşlatmak amacıyla sitotoksik kemoterapi veya glukokortikoidlerle birlikte uygulanan radyoterapiden yararlanılır. Prostat kanserinin tedavisinde sıklıkla yararlanılan radyoterapi (Wang ve Li, 2003) ve kemoterapi (Stein ve ark., 2001) kanser hücrelerini apoptozis yoluyla ölüme götürme prensibi ile çalışır. Bu tedavi metotlarının apoptotik etkinliği, p53 tümör baskılayıcı proteininin varlığını gerektirir (Levine, 1997). Ancak diğer birçok tümörde olduğu gibi, ileri evre prostat kanserlerinde de, p53 geninde ilgili proteinin fonksiyonunu inhibe edici mutasyonlar bildirilmiştir (Abate-Shen ve Shen, 2000; Zeimet ve ark., 2000; Horowitz, 1999). Sonuç olarak, fonksiyonel bir p53 genine sahip olmayan tümörler, hem kemoterapiye hem de radyoterapiye dirençlilik gösterir (Obata ve ark., 2000; Şanlıoğlu, 2005).

2.2.8. Prostat kanserinin evrelendirilmesi

2.2.8.1. Prostat kanserinde TNM evrelemesi ve gleason skoru

Prostat kanserinde, lokal tümör büyümesi, T1 ile T4 arasında dört evrede tanımlanır. T1 evresinde tümör dijital rektal muayene veya ultrasonla tespit edilemez, ancak transüretral rezeksiyon veya PSA testi sonrası biyopsi ile tanımlanabilir. T4, tümörün komşu organları tuttuğu ileri evresini temsil eder. Nodal evreler (N0-N1) ve metastatik evreler (M0-M1C), hastalığın sırasıyla lenf nodlarına ve uzak bölgelere klinik yayılımını (metastaz) tanımlar (Anonim).

Çizelge 2.1. Prostat kanserinin TNM evrelemesi ve gleason skoru

Primer Tümör (T)
Tx: Primer tümör değerlendirilemiyor.
T0: Primer tümör bulgusu yok.
T1: Klinik olarak görülebilen veya palpe edilebilen tümör yok.
T1a: Tümör incelenen dokunun %5 veya daha azında, insidental olarak tespit edilir.
T1b: Tümör incelenen dokunun %5' inden fazlasında insidental olarak tespit edilir.
T1c: Tümör iğne biyopsisi ile tespit edilir .(Yükselmiş PSA nedeniyle)
T2: Tümör prostat içinde sınırlıdır.
T2a: Bir lobun yarısı veya daha azını tutmuştur.
T2b: Bir lobun yarısından daha fazlasını tutmuştur.
T2c: Her iki lobu tutmuştur.
T3: Tümör prostatik kapsül dışına yayılmıştır.
T3a: Ekstrakapsüler yayılım vardır. (unilateral veya bilateral)
T3b: Seminal vezikül yayılımı vardır.
T4: Tümör seminal vezikülden başka diğer komşu organlara; mesane boynu, eksternal sfinkter, rektum, levator kaslar ve / veya pelvik duvara invaze veya fiske olmuştur.
Patolojik (pT)
pT2: Organa sınırlıdır.
pT2a: Unilateral, bir lobun yarısı veya daha azını tutar.
pT2b: Unilateral, bir yarısından fazlasını tutar.
pT2c: Bilateral hastalık vardır.
pT3: Ekstraprostatik yayılım vardır.
pT3a: Ekstraprostatik yayılım vardır.
pT3b: Seminal vezikül invazyonu vardır.
pT4: Mesane, rektum invazyonu vardır.
Patolojik T1 sınıflandırması yoktur. pT3a' da pozitif cerrahi sınır, rezidüel mikroskopik hastalık ile gösterilmelidir.
Bölgesel Lenf Nodları (N)
Nx: Bölgesel lenf nodu tutulumu değerlendirilemiyor.
N0: Lenf nodu metastazı yoktur.
N1: Lenf nodu metastazı vardır.
Patolojik
pNx: Bölgesel lenf nodları örneklenmemiştir.

pN0: Pozitif bölgesel lenf nodu yoktur.
pN1: Lenf nodlarına metastaz vardır.
Uzak Metastaz (M)
Mx: Uzak metastaz değerlendirilemiyor
M0: Uzak metastaz yoktur.
M1: Uzak metastaz vardır.
M1a: Bölgesel olmayan lenf nodlarına metastaz vardır.
M1b: Kemik metastazı vardır.
M1c: Diğer alanlar, beraberinde kemik hastalığı olur veya olmaz.
Histopatolojik Grade
Gx: Grade değerlendirilemiyor
G1: İyi diferansiye (Gleason 2–4)
G2: Orta derecede diferansiye (Gleason 5–6)
G3–4: Az differansiye/ indiferansiye (Gleason 7–10)

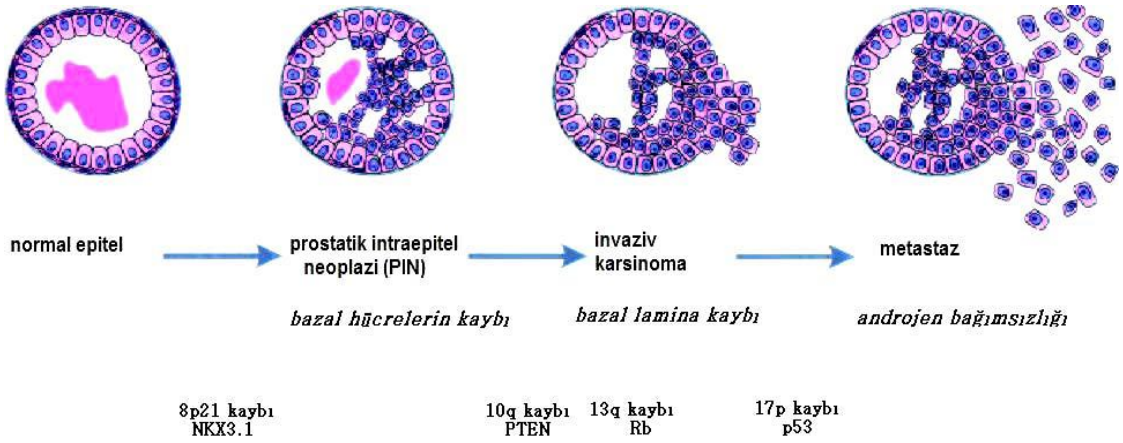
2.2.9. Prostat kanserinin gelişiminde moleküler mekanizmalar

Prostat kanserinin ortaya çıkışından ve ilerlemesinden sorumlu mekanizmalar tamamen açığa çıkarılamamıştır, ancak tümör ilerlemesinde birçok değişik faktörün (sinyal iletim yollarında, anjiogenez ve adhezyon moleküllerinde değişiklikler gibi) önemli rol oynadığı düşünülmektedir (Şanlıoğlu, 2005) (Şekil 2.4.).

Prostat epitel hücrelerinin normal durumdan malign duruma ilerlemesi, protoonkogenlerin aktivasyonuna ek olarak tümör baskılayıcı genlerin kaybı ile sonuçlanan birtakım mutasyon ve delesyonların kombinasyonuyla meydana gelmektedir. Hücre içinde sinyal ileten yolakların birçoğunun prostat kanserinin ortaya çıkışında önemli rol oynadığı bulunmuştur.

Prostat kanserinde önemli rol oynayan moleküler sinyal ileten yolaklar, androjen reseptörü (AR), vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü (VEGFR), endotelin A reseptörü (ETaR), fosfotidilinozitol-3-OH kinaz (PI3K), epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) ve insülin büyüme faktörü 1 reseptörü (IGF1 R)'dür.

Özellikle PI3K/Akt yolağı prostat kanserinin gelişimi ve ilerlemesinde önemli bir role sahiptir. Bu yolak sıklıkla prostat kanser hücrelerinde tümör baskılayıcı protein olan PTEN ekspresyonunun azalması aracılığıyla aktive olur.



Şekil 2.4. İnsanda prostat kanseri gelişim basamakları. Gelişim aşamaları, spesifik kromozom bölgelerinin ve aday tümör baskılayıcı genlerin kaybı ile gerçekleşir (Abate-Shen, 2000)

2.3. Onkogenler

1911 yılında Peyton Rous isimli bilim adamı, tümör tipi bilinen civcivden sağlıklı civcive aktarıldığında benzer tümörün gelişimine neden olan bir etkeni açıklamıştır (Ekmekçi ve ark., 1991; Eischen ve ark., 1999). Daha sonraki çalışmalar bu etkenin bir retrovirus olduğunu ve *v-src* olarak adlandırılan bu genin tümöre özgü olduğu ve tümörün oluşumundan sorumlu olduğunu göstermiştir (Eischen ve ark., 1999). Retrovirüslerde bulunan ve normal hücreleri kanser hücrelerine dönüştürme yeteneğine sahip olan bu genler "onkogen" olarak adlandırılmıştır (Ekmekçi ve Erbaş, 1991). Onkogenler kontrolünü kaybetmiş proteinleri kodlayan genler olarak tanımlanmaktadır. Onkogenlerinin kökenini oluşturan genler ise protoonkogen olarak adlandırılır ve normal hücrelerde hücrenin büyümesi, farklılaşması için gerekli olan genlerdir.

Protoonkogen adı verilen normal genler, çeşitli faktörlerle aktive olarak anormal protein sentezine veya aşırı protein yapımına sebep olmaktadır. Protoonkogenlerin ürünleri büyüme faktörleri (EGF, IGF gibi), büyüme faktörü reseptörleri, sinyal ileticiler, transkripsiyon faktörleri gibi görevlerde yer alırlar. Her bir protoonkogen, hücre döngüsü süresince veya belli bir dokunun gelişiminin çok özel bir döneminde farklı olarak ifade edilen protein ürünlerini yaparlar.

Normal hücre büyümesi ve farklılaşmasında görev alan protoonkogenlerin, onkogenlere dönüşümü ile kanser ortaya çıkabilir. Protoonkogenlerin ifadesini ve yapısını değiştirerek aktifleştiren, protoonkogenleri onkogene dönüştüren birtakım mutasyonlar vardır.

Onkogenler, doğal veya deneysel şartlar altında normal hücreleri kanser hücresine dönüştürebilme özelliğine sahiptirler. Onkogenler dominant etkilidir. Protoonkogen alellerden birinin mutasyonu, hücre döngüsü için önemli gerekliliğe sahip işlevsel bir sinyal molekülü veya anti-apoptotik bir işlev kazanması için yeterlidir. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda en az 100 kadar onkogen tespit edilmiştir. İnsan kanserlerinde en sık bozulmaya uğrayan onkogen RAS ve HER2/neu onkogenidir (Wagener, 2012; Weissleder ve Pittet, 2008).

Çizelge 2.2. Bazı onkogenler ve ilgili kanser tipleri

PDGF: Plateletten türemis büyüme faktörünü kodlar. Glioblastoma (bir beyin kanseri) ile ilgilidir.
EGFR: Epidermal büyüme faktörü reseptörünü kodlar. Glioblastoma (bir beyin kanseri) ve meme kanseriyle ilgilidir.
HER-2 (ERBB2): Bir büyüme faktörünü kodlar. Meme, tükürük bezi ve over kanserleriyle ilgilidir.
RET: Bir büyüme faktörünü kodlar. Tiroid kanseri ile ilgilidir.
KRAS: Akciğer over kolon ve pankreatik kanserleriyle ilgilidir.
NRAS: Lösemiler ile ilgilidir.
MYC1: Lösemi, meme, mide ve akciğer kanserleriyle ilgilidir.
NMYC: Nöroblastoma (bir sinir hücresi kanseri) ve glioblastoma ile ilgilidir.
LMYC: Akciğer kanseriyle ilgilidir.
BCL2: Normalde hücre intiharını bloke eden bir proteini kodlar. Foliküler B hücresi lenfoması ile ilgilidir.
CCND1 veya **PRAD1:** Hücre çevrimi saatinin uyarıcı bir bileseni olan siklin D1 kodlar. Meme kafa ve boyun kanserleriyle ilgilidir.
CTNB1: Beta-katenin kodlar. Karaciğer kanserleriyle ilgilidir.
MDM2: p53 tümör baskılayıcı proteinin bir antagonistini kodlar. Sarkomalar (bağ dokusu kanserleri) ve diğer kanserlerle ilgilidir.

2.4. Tümör Baskılayıcı Genler

Tümör baskılayıcı genler hücre büyümesini kontrol eden genlerdir. Bu genler onkogenleri dengeleyen ve hücrenin aşırı çoğalmasını engelleyen fizyolojik olarak bulunan gen gruplarıdır. Tümör baskılayıcı genler ilk kez tümör hücresinin tek sarmal

DNA'sıyla normal hücrenin tek sarmal DNA'sının birleştirme (hibridizasyon) çalışmalarında tanımlanmıştır. Bu genlerin ürünleri, hücre döngüsünün negatif düzenleyicisi olarak iş gören anahtar proteinlerdir. Tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen mutasyonlar kanser oluşumunda en önemli basamaklardan biridir (Gül, 2008).

Bu genler arasında p53, RB1, p16, p21, PTEN ve ING ailesi gibi genler sayılabilir. Tümör baskılayıcı genlerden en önemli olan ve üzerinde en çok çalışılan tümör baskılayıcı genler p53 ve Rb'dır. P53 geni genomun koruyucusudur; genotoksik strese karşı önemli bir rol oynar ve eksikliği kanserde önemli bir adımdır. P53 geni şimdiye kadar bilinen en ünlü tümör baskılayıcı gendir ve bütün kanser tiplerinin yaklaşık %50'sinde inaktive edici mutasyon gösterdiği bilinmektedir.

Tümörlerin büyük çoğunluğunda; P53 mutasyonu, P53 fonksiyonun inhibisyonu veya P53 yolunda bir bozulma olduğu tahmin edilmektedir.

Keşfedilen ilk tümör baskılayıcı gen ise: RB1 genidir. Onkojenik uyarımın transformasyona karşı normal hücrelerde, birçok yolu harekete geçirdiği düşünülmektedir (Wagener, 2012; Weissleder ve Pittet, 2008; Gül, 2008).

Çizelge 2.3. Bazı tümör baskılayıcı genler ve ilgili kanser tipleri

APC: Kolon ve mide kanserleriyle ilgilidir.
DPC4: Hücre bölünmesini inhibe eden bir sinyal yolunda bulunan bir aktarma molekülünü kodlar. Pankreatik kanserle ilgilidir.
NF-1: Bir uyarıcı (Ras) proteini inhibe eden bir proteini kodlar. Nörofibroma ve feokromositoma (periferal sinir sistemi kanserleri) ve myeloid ile ilgilidir.
NF-2: Meningioma ve ependimoma (beyin kanserleri) ve schwannoma (periferal sinirler etrafındaki sargıyı etkileyen) ile ilgilidir.
CDKN2A/MTS1: Hücre çevrimi saatinin bir fren bileseni olan p16 proteinini kodlar. Çok çesitli kanserlerle ilgilidir.
RB1: Hücre çevriminin ana freni olan pRB proteinini kodlar. Retinoblastoma ve kemik mesane küçük hücreli akciğer ve meme kanserleriyle ilgilidir.
TP53: Hücre bölünmesini durdurabilen ve anormal hücreleri kendi kendilerini öldürmeye zorlayan p53 proteinini kodlar. Çok çesitli kanserlerle ilgilidir.
WT1: Karaciğerde Wilms tümörüyle ilgilidir.
BRCA1: Meme ve over kanserleriyle ilgilidir.
BRCA2: Meme kanseriyle ilgilidir.

VHL: Renal hücre kanseriyle ilgilidir.

Tümör baskılayıcı genler hücre çekirdeğinde ve çekirdek dışı olanlar olmak üzere sınıflandırılırlar. Buna göre;

2.5. Hücre Çekirdeği Dışında Etkili Olan Tümör Baskılayıcı Genler

Hücre büyüme ve davranışını düzenleyen hücre yüzeyinden salınan çeşitli tipte moleküller vardır. En önemlileri TGF beta, Kadherin ve DCC geni sayılabilir. TGF beta; büyümeyi baskılayıcı faktördür. Kadherin hücresel yapışmayı sağlar. DCC geni ise hücre-hücre ve hücre-matriks ilişkisini sağlar. Çevreden aldığı uyarı ile hücre büyüme ve farklılaşmasını düzenler (Gül, 2008).

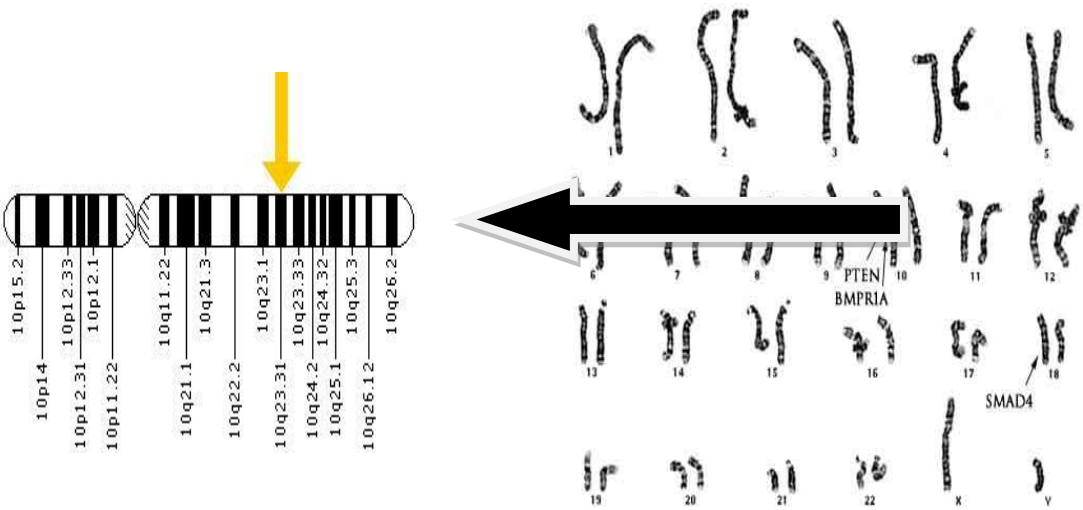
TGF beta büyümeyi baskılayan genlerin transkripsiyonunu düzenler. Bunu siklin ve siklin bağımlı kinaz baskılayıcıları ile yapar ve hücre döngüsü engellenir. TGF beta'da mutasyon pek çok tümörde görülür (Lecanda ve ark., 2007; Gül, 2008).

Tümör baskılayıcı genlerin bir diğer etkili olduğu yol büyüme sinyalini azaltmaktır. Nörofibromin 1 (NF1) geni ile Adenomatoz polipozis geni (APC) bu yol ile çalışmaktadır. NF1'de ve APC'de germ çizgi mutasyonu selim tümörlerle ve karsinom öncü lezyonları ile ilişkilidir. APC geni ile doğan bir kişide bir mutant allel vardır. Yaşam sırasında yüzlerce polip gelişir. Malignite gelişmez, ancak tümör gelişimi için iki kopyanın da kaybı gerekir. Adenomdan kanser gelişimi ek mutasyonlarla mümkündür. APC geni sitoplazmada yer alır ve diğer proteinlerle ilişkidedir (beta katenin vb), nükleusa girip transkripsiyon faktörlerini etkileyebilir. APC'nin görevi, katenini yıkmak ve sitoplazmada az bulunmasını sağlamaktır. APC aktivasyon kaybı katenin seviyesini artırır ve hücresel çoğalma olur. Katenin mutasyonu da olabilir. Mutant katenin APC'nin yıkıcı etkisine direnç göstermektedir (Gül, 2008).

NF1 geni de APC gibi davranmaktadır. Bir mutant allel geni olan vakalarda sayısız nörofibrom gelişir. İki allel gende kayıp olması veya ek mutasyonlarla malign tümör olabilir. NF1 geni uyarı iletimini protoonkogenlerden ras ile yapar. NF1, GTPaz'ı aktive ederek aktif ras'ı aktif olmayan ras'a çevirir. NF1 kaybı olunca, ras aktif kalır ve sürekli sinyal iletilir (During ve ark., 2007; Gül, 2008).

2.5.1. PTEN

PTEN geni, birçok insan tümör tipinde heterozigosite kaybı sıklığı ile karakterli bir genomik bölge olan 10q23.3 kromozomal bandı üzerinde lokalize, 403 aminoasit içeren, yaklaşık 47 kDa ağırlığında, tirozin fosfataz ve tensin homoloğu olan, hücre çekirdeği dışında yer alan tümör baskılayıcı bir gendir (Şekil 2.5). Tirozin fosfatazlar üzerinde araştırma yapılırken tesadüfen saptanmıştır (Li ve ark., 1997; Ali ve ark., 1999).



Şekil 2.5. PTEN genin 10. kromozomdaki yeri

PTEN ismini; protein tirozin fosfotaz olmasından ve tensin homoloğu olmasından alır (Ali ve ark., 1999). PTEN' in tümör baskılayıcı gen olarak düşünülmesinin ilk nedeni fosfoproteinleri veya fosfolipidleri defosforile etmesi ve PIP3'e karşı negatif etki göstermesidir (Pourmand ve ark., 2007).

PTEN' in tümör baskılayıcı gen olarak kabul edilmesinde 3 kanıt tespit edilmiştir.

1. PTEN deki germline mutasyonlar; otozomal dominant homortom ve sıklıkla kanser öncesi sendromların (Cowden ve Bannayan Zonana sendromu) görülmesinde ilişkilidir.

2. PTEN geni homozigot şekilde sporadik insan kanserlerinde inaktive durumdadır.

3. PTEN ziyadesiyle korunmuş bir proteindir (Ali ve ark., 1999).

PTEN' in değişen fonksiyonlarından en iyi bilineni fosfotidilinozitol 3,4,5 trifosfatı fosfotidilinozitol 4,5 bifosfata defosforlama yeteneğidir ki fosfotidilinozitol 3,4,5 trifosfat fosfotidilinozitol 3-kinaz (PI3K) tarafından fosforile edilir. Yani PTEN

PI3K etkisine karşı çalışarak hücrenin büyümesi, çoğalması, yaşamı ve embriyolojik göçü gibi çok sayıda hücresel fonksiyonları denetlemektedir (Ghosh, 2011).

2.5.1.1. PI3 kinaz/Akt sinyal iletim yolu

Fosfotidil inositol-3 kinaz (PI-3K) ailesi büyüme ve yaşama sinyallerinin iletiminden sorumlu proteinlerdir. Mitojenik ligantlara yanıt olarak reseptör tirozin kinaz (RTK); fosfotidil inositol 3 kinaz'ı (PI3K) aktive eder. PI3K'lar PIP2 (fosfatidilinositol (4,5) bifosfatı) fosforilleyerek PIP3'e (fosfatidil inositil 3, 4, 5 trifosfat) dönüştürür. Oluşturulan PIP3'ler ise membrana bağlı demirleme bölgeleri şeklinde protein kinazları küçük GTPaz düzenleyicileri ve iskelet proteinlerini etkilemektedir (Chang ve ark., 2003; Nicholson ve Anderson 2002; Sekulic ve ark., 2000; Vara ve ark.,2004; Engelman, 2009; Yuan ve Cantley, 2008; Kuş, 2010).

Fosfotidil inositol-3 kinazlar yapısına, bağlanma şekline, aktivasyonu ve substratına göre PI3KI, PI3KII ve PI3KIII olmak üzere 3 gruba ayrılır. IA sınıfı enzimleri en iyi nitelendirilmiş PI3K grubudur. Sınıf IA grubu PI3K lar iki alt üniteden oluşmaktadır (Geering ve ark., 2007; Kuş, 2010).

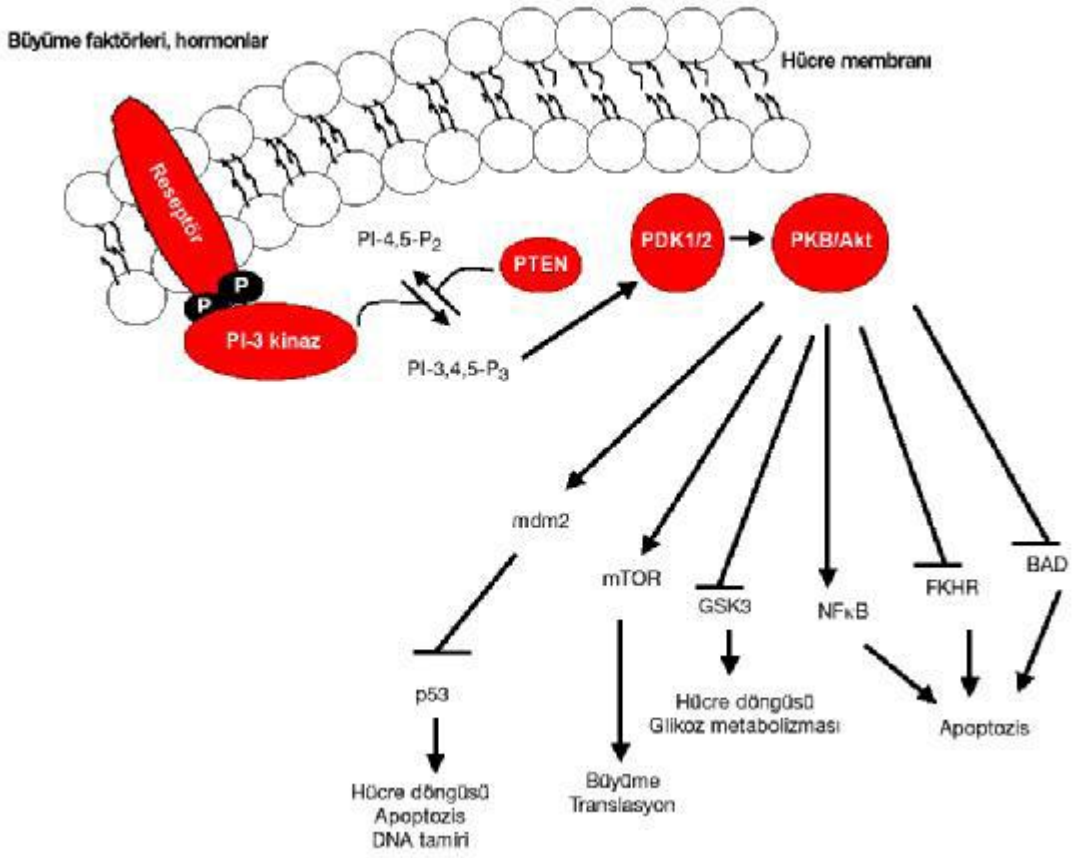
2.5.1.2. Akt yolu

Ekstraselüler sinyal RTK (reseptör tirozin kinaz)' nın aktive olmasını sağlar, inaktif PI3K SH2 domainleri ile RTK nın fosforillenmiş tirozinlerine bağlanarak aktive olur. Aktif PI3K katalitik üniteleri p110 ile PIP2 yi PIP3 e dönüştürürler. Hücre membranının sitosolik kısmında PIP3 artışıyla Akt ve PDK1 proteinleri yapılarındaki PH domainleriyle PIP3 e bağlanırlar. Böylece Akt ve PDK1 hücre membranına tutulur. PDK1 Akt yi fosforilleyerek aktive eder (Sartelet ve ark., 2008; Franke, 2008; Ihle ve Powis, 2009; Mannig ve Cantley, 2007; McCormick, 1999; Kuş, 2010).

Sitokinler ve büyüme faktörleri Akt ve PI3K yolunu aktive ederek hücreler için yaşama sinyalleri oluştururlar (Kuş, 2010).

Protein kinaz B uyarısı hücre içinde çeşitli proteinlerin aktivitelerini etkilemektedir. Bunlardan biri, mammalian target of rapamycin (mTOR) proteinidir. Kinaz aktivitesine sahip olan bu proteinin rapamisin tarafından inhibe olduğu gösterilmektedir (Vogt, 2001; Doğan ve Güç , 2004; Kuş, 2010).

Tümörlerin oluşumunda PTEN fonksiyonun önemli kaybında; Akt, (bu yolakta PI3K nin en iyi bilinen etkileyicisidir) kolayca fosforile edilebilir (Ghosh, 2011).



Şekil 2.6. PI3K/Akt yolağı

PTEN, PI3K/Akt yolağını inhibe ederek negatif düzenleyici rol oynamasının yanı sıra VEGFR, IGFR1 gibi bazı reseptörler de, bu yolağı aktive edebilir.

EGR1 (early growth response gene 1) transkripsiyon faktörü PTEN promotöründeki EGR1 bağlayıcı dizilere direk olarak bağlıdır ve UV, γ-ışınları ve diğer stres uyarıcılarına cevaptaki PTEN mRNA'sının regülasyonun artması için gereklidir (Virolle ve ark., 2001).

PTEN transkripsiyonu p53 tarafından da uyarılabilir bunu EGR1 bağlayıcı bölgeye yakın promotörde ki bölgeye bağlanarak gerçekleştirir.

EGR1 ve P53 hücre çoğalmasının kontrolünde büyük bir fonksiyona sahip olmakla birlikte çoğalan hücrelerin baskılanmasını da sağlarlar (De Belle ve ark., 1999). P53 ekspresyonu tümör baskılanması ve apoptozla bağlantılı olmasına karşın EGR1; hücre büyümesinde ve apoptozun düzenlenmesinde çift fonksiyonu vardır (Huang ve ark. 1998; Krones-Herzig ve ark., 2005). EGR1 ışın tedavisi veya IGF1 e karşı cevapta; PTEN transkripsiyonu için önemlidir. EGR1 in bu aktivitesi ARF ve EGR1 ilişkisi ile sağlanır. EGR1'in veya ARF'nin kaybı kanser hücrelerinde azaltılmış PTEN gen

ekspresyonuna yol açması beklenir. Aslında; HT1080 insan fibrosarkoma ve birçok glial ve meme tümörlerinde olduğu gibi EGR1 sıklıkla baskılanır veya kaybolur (Liu ve ark., 1999).

PTEN geni; mutasyonlar, silinmeler veya epigenetik mekanizmalar tarafından zarar görebilir (Priulla ve ark., 2007) ve PTEN protein kararlılığı veya fonksiyonu diğer mekanizmalar tarafından azaltılabilir (Mirmohamadsadegh ve ark., 2006). Ancak birçok kanser türünde PTEN geni bozulmamıştır ama transkipsiyonu sessiz görünür. PTEN hücre tipine bağlı olarak sadece 2-4 saatlik bir yarılanma ömrü ile hızla bozulan bir proteindir ve kanser hücrelerindeki PTEN de bulunan genetik değişimlerin çoğu bu hızlı bozulma ile daha da hızlanmaktadır (Davies ve ark., 1999).

PTEN geni hastaların germline hücrelerinde, spesifik kanserlerde mutasyona uğramakla birlikte nadir olarak otozomal dominant kanser sendromlarında da mutasyona uğradığı gözlenmiştir.

PTEN deki germline ve somatik mutasyonlar çoğunlukla; protein kodlayan bölgede, fosfotaz domin bölgede ve poly$(A)_6$ geniş bölgesinde görülmektedir. PTEN geninde bulunan germline değişiklikler karşılaştırıldığında; tümörlerde çerçeve kayma mutasyonlarının önemli ölçüde arttığı gözlenmiştir (Ali ve ark., 1999).

Germline hücrelerinde bulunan PTEN değişikliklerine kıyasla, somatik hücrelerdeki mutasyonların önemli derecede arttığı bulunmuştur. Doku tipine bağlı olarak PTEN genin işlevinde, kanserin başlangıcında veya gelişiminde değişiklikler olabilmektedir (Ali ve ark., 1999).

Normal kök hücrelerin yenilenmesini düzenleyen Wnt, Notch ve Hedgehog gibi yolakların yanı sıra, PTEN ve p53 gibi tümör baskılayıcı genlerin de kanser kök hücrelerinin yenilenmesinde düzenleyici rol aldığı bulunmuştur (Ulukaya, 2012).

Wnt yolağı; hücre çoğalması, farklılaşma ve hareketi ile gelişme ve morfogenez için hücrenin kullandığı en önemli yolaklardan biridir. Yeni ortaya çıkan konsensusa göre NOTCH yolağında hem bozulma hem de aşırı aktivite kanser gelişimini teşvik etmektedir. Hedgehog sinyal yolağında ise, yaşamın erken aşamalarında düzgün büyüme ve gelişmeyi düzenlemede önemli rol oynamaktadır ve ardından, yetişkinlerde daha az etkin hale gelmektedir. Bununla birlikte, Hedgehog sinyalini yeniden reaktive eden yoldaki mutasyonlar, kanserin birkaç farklı tipinde görülmektedir (Anonim). Wnt sinyal yolağı, kök hücrenin kendini yenilemesinde anahtar faktördür. Notch ve hedgehog sinyal yolakları da hematopoetik kök hücrenin kendisini yenilemesi için düzenleyici rol oynamaktadır (İnan ve Özbilgin, 2008).

PI3K/Akt yolağı prostat karsinogenezinde önemli hücresel olayları düzenlemektedir. Prostat kanserinde bu yolağın aktivasyonunun daha ileri evre, daha kötü prognoz ve daha yüksek gleason skoru ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca fosforillenmiş Akt'ın immün boyama ile prostat kanser dokusunda fazla saptanması biyokimyasal nüksü tahmin ettirebileceği de belirlenmiştir. Bu yolak VEGFR ve IGFR-1 tarafından da aktive edilebilmektedir. Ayrıca AR ve bu yolak arasında da etkileşim vardır. PI3K ve Akt'ı inhibe eden küçük molekül ağırlıklı ajanlar (wortmannin, LY24002) invitro çalışmalarda prostat kanser hücrelerinde antitümöral etkiye sahiptir. Bu ajanlarla ilgili çalışmalar devam etmektedir (Demirkazık ve Özal, 2010).

Adenokarsinoma bezsel dokularda ortaya çıkan tümör türüne verilen isimdir. Bir delesyon olduğu zaman, PTEN kaybı; prostat adenokarsinoması olarak histolojik çalışılarak sınıflandırılır. Çoğu prostat bezinin histolojik çalışıldığında; benign veya malign olarak sınıflandırılmasının tam tersine, örneklerin sinyal kaybı; kontrol problarını kullanmak için teknik altyapı seviyesinin üstünde olduğu ve hücre sayımı gösterilemediği için delesyonsuz olarak sınıflandırılır.

PTEN gen kaybı 3 alt gruba ayırabilmektedir; 2 kopyanın anlamı delesyonsuz, 1 kopyanın anlamı delesyonlu (heterozigot) ve sıfır kopyanın anlamı delesyonlu (homozigot) demektir. İlerlemiş prostat kanserlerin ve metastatik tümörlerin her iki kopyası da PTEN geni işlevini sıklıkla kaybetmiştir ve sıklıkla sınıflar homozigot delesyonlar olarak gözlenir (Yoshimito ve ark., 2007; Sircar ve ark., 2009). Homozigot PTEN delesyonları hastaların erken evrelerinde görülür ve metastazın yüksek olasılığıdır. Yakın bir dizi genlerin genomik kararsızlığı ile PTEN ekspresyonunda azalma meydana gelmekte buna bağımlı olarak, PI3K/Akt yolağı aktif hale geçerek hücre çoğalması kontrolsüz bir şekilde artmaktadır bunun sonucunda ise prostat kanseri oldukça hızlı gelişmektedir (Sircar ve ark., 2009; Bismar ve Trpkov, 2010).

2.6. Mutasyon

DNA diziliminde mutasyon adı verilen küçük değişiklikler meydana gelebilir. Bu değişiklikler tek bir baz değişikliği olabilir ve bu durumda bir kodonu tanımlayan 3 bazdan biri değişmiş olur ve bir proteine farklı bir proteinin eklenmesine yol açar.

Bazı durumlarda, DNA diziliminde mutasyon, söz konusu proteinin aktivitesini dramatik bir biçimde değiştirmek için yeterlidir. Başka DNA mutasyonları ise, çok sayıda bazı etkileyebilir ve genomdan birkaç gen içeren bir DNA parçası kopar; ya da

bu DNA parçası genomda başka bir yere yerleşerek bitişik olmayan DNA parçalarının birleşmesiyle oluşan yeni genler oluşarak yeni, anormal proteinlerin sentezine yol açar. Büyüklükleri ne olursa olsun, böylesi değişiklikler "genetik değişimler" ya da "mutasyonlar" olarak adlandırılır. Bu değişiklikler kanserli hücrelerin DNA diziliminin saptanmasıyla belirlenebilir.

2.6.1. Mutasyon çeşitleri

Mutasyon çeşitlerini;

Kromozom yapısının değişmesi

Kromozom sayısının değişmesi

Nokta mutasyonları olarak 3'e ayırabiliriz (Anonim).

2.6.1.1. Nokta mutasyon

İnsan genomunda en sık görülen mutasyon, tek nükleotid değişimleridir. Bir pürinin diğer bir pürin ile ya da, bir pirimidinin diğer bir pirimidin ile yer değiştirmesi transisyon (karşılıklı geçiş, A↔G ya da T↔C), bir pürinin pirimidinle (ya da tam tersi) yer değiştirmesi transversiyon (çaprazlama geçiş, G↔C ya da A↔T) olarak adlandırılır. Bu değişim, belli bir aminoasidi kodlayan kodon da yanlış okumaya yani farklı aminoasit oluşumuna neden olursa "missense mutasyon" olarak adlandırılır (Bozkaya, 2008).

Nokta mutasyonların büyük bir bölümü spontan olarak ortaya çıkar ve çoğunlukla nedeni pek izah edilemez, fakat mutajenik kimyasal maddeler ve iyonize radyasyon gibi belirli bazı faktörlerin spontan mutasyon oranını artırabileceği de bilinmektedir. Bu tür spontan mutasyonları artırıcı ajanların bulunmadığı durumlardaki mutasyon oranı, replike olan her 10^9 ve 10^{10} baz çiftinde bir baz çiftinin yer değiştirmesi kadardır (Başaran, 1999).

2.7. Mutasyon tarama yöntemleri

Mutasyon taraması için kullanılacak metodun seçiminde, göz önüne alınabilecek başlıca kriterler şunlardır; hangi tip biyolojik materyalin kullanılacağı, hangi tip nükleik asitin analiz edileceği, saptanacak mutasyonun daha önceden bilinip bilinmediği, saptanacak potansiyel mutasyonların ne kadar fazla olduğu, kullanılacak metodun ne

kadar güvenilir olduğu ve ne ölçüde standardize edilebileceği, testin nasıl uygulanacağı, rutin tanı için uygun olup olmadığı, testin maliyeti ve kalite değerlendirmesidir

Küçük delesyonlar, insersiyonlar ve nokta mutasyonları için tek zincir konformasyon polimorfizm analizi (SSCP) (Orita ve ark., 1989), heterodubleks analizi (HA) (White ve ark., 1992), denatüre edici jel elektroforezi (DGGE) (Lerman ve Silverstein, 1987), restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (RFLP), allel spesifik amplifikasyon (ASA) (Özgül, 1998) ve DNA dizi analizi gibi çeşitli mutasyon tarama teknikleri tanımlanmıştır.

Kalıtsal hastalıkların prenatal ya da postnatal tanısı, veya popülasyonda taşıyıcı taraması yapılarak hastalıkların önüne geçilmesi, aileye ve bireye verilen hem maddi, manevi hasarın önlenmesinde hem de topluluklar için gen frekanslarının belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Tanıyı kolaylaştırmak için bugüne kadar, pek çok mutasyon tarama yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntemler; süre, pratik uygulanabilirlik, maliyet gibi özellikleri göz önünde tutularak kullanılır (Nal, 2000).

2.7.1. Tek zincir konformasyon polimorfizmi (SSCP)

Tek zincir konformasyon polimorfizmi (SSCP) analizi, bilinmeyen mutasyonların saptanması için kullanılan polimeraz zincir reaksiyonuna (PZR) bağlı bir mutasyon tarama yöntemidir.

Bu yöntem nokta mutasyonlarının yanı sıra küçük insersiyon ve delesyon mutasyonlarının saptanmasında tercih edilmektedir. Özellikle gen dizisi büyük olan proteinlerde dizi analizi yapılacak bölgeyi önceden saptamak amacı ile genin taranmasında en sık kullanılan yöntemlerden biridir ve DNA dizi analizine iyi bir alternatiftir.

Mutasyon saptama oranı %80 ile %90 arasında değişmektedir. Bu analiz restriksiyon enzim analizini, blotting'i, problar ile hibridizasyonu gerektirmediğinden hızlı ve pratik bir yöntemdir.

Bu yöntemde PZR ürünleri denatüre edilir ve denatüre edici olmayan poliakrilamid jele uygulanır. Denatüre edilerek tek zincir haline getirilmiş DNA'ların zincir içi zayıf bağlarla kazandıkları yeni ikincil yapıları mutasyon sonucu değişebilir. Mutasyon sonucu oluşan bu ikincil yapıda oluşan konformasyon farkı o bölgenin elektroforezdeki hareketinde normal kontrol ile karşılaştırıldığında bir kaymaya, farklılığa neden olur.

SSCP analizi genellikle tek iplikli DNA'daki konformasyon değişikliklerinden yararlanılarak mutasyonun varlığını tahmin etmekte kullanılmaktadır. Çift iplikli DNA'daki değişiklikleri göstermeyen bir yöntemdir.

Her SSCP analizi için optimal koşulların belirlenmesi gerekir. Analiz edilecek DNA parçasının büyüklüğü, jelin özellikleri (kullanılan poliakrilamid ile gliserol konsantrasyonu, denatüran ajan varlığı), elektroforez sırasında tercih edilen sıcaklık, elektroforez zamanı, PZR ürünlerinin denatürasyon yöntemi, mutasyonun tipi ve bulunduğu yer performansı etkiler.

SSCP analizinde en iyi sonuç, DNA 150-200 baz çifti uzunluğunda olduğu zaman elde edilir. Uzunluğu 150 baz çifti altında olan DNA fragmanlarında ikincil yapının oluşmasındaki güçlük nedeni ile SSCP analizinin duyarlılığı azalmaktadır.

200 baz çifti üzeri büyüklüğe sahip DNA'larda ise tek baz değişikliği ile daha az konformasyon değişikliği oluşacağı için bunun jelde görünmesi güçleşmekte ve büyük parçaların analizinde tespit edilen mutasyonların sayısı düşmektedir.

Tek zincirli DNA'nın konformasyonu sıcaklığa hassastır. 17 °C nin altı ve 23 °C üzerindeki sıcaklıklar tek zincirli DNA'nın yarı stabil şekillerini bozabilmektedir. En iyi rezolüsyonu elde edebilmek için en çok tercih edilen oda sıcaklığıdır.

Elektroforez sırasında jellerin ısıtılması önlenmelidir. 5V/cm voltajda 4W da ortalama 22 °C de elektroforez yapıldığında jel fazla ısınmamakta ve jelin ısınma miktarı önemsiz olmaktadır. İçinden sıvı sirkülasyonu olan elektroforez sistemleri pahalı olmakla birlikte sıcaklığı standardize ettikleri için uygun sistemlerdir. İyi bir sonuç için yeterli hava konveksiyonu da gereklidir.

SSCP analizinde DNA parçalarını ayırmak için sıklıkla kullanılan matriks akrilamiddir. Akrilamid/bisakrilamid oranı, toplam akrilamid ve gliserol yüzdesi, tampon içeriği jelin ayırma özelliğini belirler, en fazla tercih edileni, düşük çapraz bağlayıcı oranı ve %10 gliseroldür.

Bazı SSCP'ler için yüksek yüzdeli jellerin kullanılması önerilmiştir. TEMED ve APS ile polimerize edilmiş, akrilamid benzeri hidrolink isimli jelin tek bir tipte gözenek büyüklüğüne sahip olduğu ve akrilamidden daha iyi rezolüsyon sağladığı belirtilmiştir. Yüksek rezolüsyon için ticari olarak bir çok özel jel matriksleri mevcuttur.

Şimdiye kadar rapor edilmiş jel uzunlukları 5-50 cm arasında değişmektedir. SSCP analizinde sonuçlar görsel değerlendirildiğinden iyi bir rezolüsyonun sağlanabilmesi için jelin boyutlarının uzun olması (yaklaşık 30x40 cm), elektroforez

işlemlerinin düşük voltajda, uzun sürede yapılması ve ince bir jelin kullanılması gereklidir.

Son yıllarda yapılan bir çok uygulamada standart sekans jelleri yerine mini jeller kullanılmıştır. Kısa jellerde keskin bant farklılıklarının gözlendiği bildirildiği halde %0,5 lik kayma farklılığının gözlenebilmesi için uzun elektroforezler tercih edilmelidir.

SSCP analizi için PZR ürünlerinin temiz ve spesifik olması gereklidir. Spesifik olmayan PZR ürünleri, kullanılmamış primerlerin varlığı, PZR siklus sayısının fazlalığı yanlış yorumlanabilecek bantlara neden olabilir.

Genel olarak PZR ürünleri 96°C de ısıtılarak denatüre edilir. Tek zincir haline gelmiş DNA lar hemen buz üzerine alınır ve hızla jele uygulanır.

Örneğe güçlü denatüranların eklenmesi veya örneklerin 10-30 kat seyreltilmesi tek zincirlerin kendi kendine çift zincir oluşturmalarını en aza indirir.

Denatüran olarak formamid, sodyum hidroksit, üre ve metil merkürik hidroksit kullanılabilir. Metil merkürik hidroksit toksiktir ama en etkili denatürandır. Özellikle ince jeller kullanıldığında denatüre edilmiş dilüe PZR ürünleri jele uygulandıkları noktada konsantre olurlar ve bir miktar renatürasyon gerçekleşir. Bu nedenle her zaman çift zincir DNA bantları tek zincir DNA bantlarından daha güçlü gözlenir. Daha iyi gözlenebilmesi için DNA'nın mümkün olduğunca sulandırılması gerekir. İnce jeller kullanıldığında tek zincir DNA'ların gözlenmesinde radyoaktif işaretleme, gümüş boyama ve etidyum bromide üstünlük sağlar.

Mutasyonun tipi ve bulunduğu yer SSCP analizinin duyarlılığını etkilemektedir. Mutasyon ikincil yapıya katılıyorsa SSCP analizinde mutasyon kolaylıkla saptanabilecektir. Eğer mutasyonun ikincil yapıyı oluşturmada rolü yoksa, mutasyon saptanmayabilir.

Pürin içeriğinin daha fazla olduğu DNA tek zinciri jelde daha hızlı yürümekte ve daha belirgin değişiklikler göstermektedir. Guaninin Timine transversiyonu haricinde herhangi tip baz değişikliğinin sensitivite üzerine belirgin etkisi yoktur.

Bir dizide heterozigot olarak bir değişim bulunuyorsa, bu dizinin SSCP analizi sonucunda dört farklı tek zincir DNA bandı oluşumu beklenir. Bunlar; normal allelin anlamlı ve anlamsız dizileri ve mutant allelin anlamlı ve anlamsız dizileridir.

SSCP analizi özel bir ekipmana ihtiyaç göstermeyen bir yöntem olduğu için basit ve hızlı bir tarama yöntemidir. SSCP analizinde mobilite farklılıkları görsel olarak değerlendirilir. Bu yüzden standardizasyonu kısıtlı ve otomasyona geçirilmesi de zordur. Optimal koşullar büyük oranda ampirik olarak tanımlanmıştır. Bir fragmanın

farklı koşullarda analiz edilmesi mutasyonların tespit edilebilme olasılığını arttırır (Nal, 2000; Orita 1989; Sinici ve Özkara, 2001; Soyöz, 2008).

2.7.2. DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)

Bilinmeyen mutasyonların taramasında yaygın olarak kullanılan bir başka yöntemdir. Tek zincirli-işaretli prob dsDNA ile aynı ortamda denatüre ve renatüre edildikten sonra DGGE uygulanır. Denatürasyon ile dsDNA molekülü ayrılır ve proba komplementer olan zincir, renatürasyon aşamasında probla hibridizasyon yapar. Renatürasyona katılmayan probu ortamdan uzaklaştırmak için dışardan proba komplementer olan tek zincirli halkasal DNA eklenir. Mutasyon nedeni ile oluşan "mismatch"ler denatüre edici ortamda normalden daha yavaş hareket ederler. Mutant/normal DNA heterodubleksi varsa erime özellikleri ve migrasyonu normale göre değişir. Böylece hangi mutasyon olduğu saptanamamakla birlikte ilgili bölgede mutasyon varlığı gösterilebilir (Erçal, 2008).

2.7.3. MPLA (Multiple Ligand Probe Amplification)

En fazla 45 değişik DNA dizisinin PZR tabanlı tek bir reaksiyon yardımı ile incelenmesidir. Bunun içim sadece 20ng DNA kullanmak yeterlidir. MPLA nükleik asit primerleri yerine prob içerir. Problar hedef dizi ile hibridize olduktan sonra ligasyon reaksiyonu gerçekleşir, örnekteki hedef dizinin bir kopyası oluşturulur. Ligasyonlu problar multipleks PZR yöntemi ile çoğaltılır. MPLA yönteminde tüm spesifik diziler eş zamanlı olarak amplifiye edilir. Ürünler dizileme tipi elektroforez cihazında analiz edilirler (Erçal, 2008).

QF PZR ve MPLA uygulamaları:

13,18,21,X ve Y kromozomlarının anöploidilerinin araştırılması, büyük kromozomal delesyon ve dublikasyonların araştırılması, tek ekzon delesyon/dublikasyonlarının araştırılması, kanser dokusu gen kayıp/kazançlarının araştırılması, tümör baskılayıcı genlerin promotor bölgelerindeki CpG adacıklarının metilasyonunun incelenmesi gibi alanlarda başarıyla kullanılmaktadır (Erçal, 2008).

2.7.4. Southern blot analizi

Southern blot analizi genetik alanında kullanılan hibridizasyon yöntemlerinden biridir. Uygun probların kolaylıkla elde ediliyor olması insanda özel bir genin, bu geni klonlamaya gerek kalmaksızın analizine olanak sağlanmıştır.

Bu yöntemde izole edilen DNA uygun bir restriksiyon enzimi ile kesilir ve belirli sayı ve uzunlukta DNA frangmentlerinin oluşumu sağlanır. Agaroz jel elektroforez yöntemi ile jel üzerinde büyüklüklerine göre birbirinden ayrılan bu fragmentler önce yüksek pH ile denatüre edilip blot yöntemi ile nitroselüloz filtre üzerine geçirilir. ^{32}p (ya da başka bir radyoaktif olmayan nükleotit analoğu) ile işaretli denatüre edilmiş ve incelenecek bölgeye özgü prob, filte üzerinde tutulan fragmentler ile uygun koşullar sağlanarak hibridize edilir. Sonra filtre üzerine bir röntgen filmi konularak otoradyografi işlemi gerçekleştirilir. Prob yalnızca kendisine tümleyici bazları içeren DNA fragmenti ile hibridize olacak ve otoradyogram sonucu bu bandın üzerinde gözlenebilecektir. Yüksek rezolüsyonlu jel elektroforezini komplementer nükleotid dizilerinin hibridizasyonuna dayandırır. Band yapısı, genin varlığı veya yokluğu, büyüklük varyasyonu gösterebilir.

2.7.5. Polimeraz zincir reaksiyonu/restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (PZR/RFLP)

PZR/RFLP yöntemi ile mutasyonun araştırılacağı gen bölgesi, mutasyonu içine alacak şekilde çoğaltılır. Uzunluğunu bildiğimiz genomik DNA parçası, bakılacak mutasyona özgü olan restriksiyon endonükleaz enzimi yardımıyla kesilir. Kesilen genomik DNA, parçalarının büyüklüğüne göre agaroz ya da poliakrilamid jelde elektroforez işlemi ile yürütülür. Jel tercih edilen yönteme bağlı olarak, hazırlanmadan önce veya elektroforezden sonra etidyum bromür ile boyanıp ardından UV ışıkta görüntülenir. Kesim noktalarına göre uzunlukları önceden bilinen parçalar değerlendirilerek mutasyonların varlığı ya da yokluğuna karar verilir.

Değerlendirme şu şekilde yapılır; hedef gen bölgesindeki nokta mutasyon, çoğaltılan DNA'da seçilen restriksiyon enziminin tanıma bölgesine özgülse mutasyonlu üründe kesim gerçekleşirken normal üründe kesim gerçekleşmez.

Böylece kesilen ürünlere sahip bireyler mutasyonlu diğerleri normaldir. Tam tersine restriksiyon enziminin tanıma bölgesi mutasyona özgül değil de normal olan

ürüne özgül ise kesim normallerde gerçekleşir, mutasyon olanlarda kesim gerçekleşmez. Değerlendirme, kesim olan ürünlere sahip bireyler normal, olmayanlar ise mutasyonludur şeklinde yapılır (Yiğit, 2006; Soyöz, 2008).

2.7.6. Real Time PZR

Rutinde en çok kullanılan yöntemler hala PZR, RFLP gibi bilinen teknikler olmasına rağmen son yıllarda teknolojideki hızlı ilerlemeler tanı yöntemi spektrumunu artırmıştır. Genotip analizörlerinin ve sekans aletlerinin rutine girmesi 'real time' PZR ve benzer tekniklerin devreye girmesi tanıda hız ve doğruluğu artırmıştır.

Real time PZR DNA'nın çoğaltımını ve ürünlerini tek bir tüpte belirlemeyi mümkün kılan çok yakın bir zamanda uygulamaya konulan popüler bir metottur (Gibson ve ark., 1996). Gen anlatımının analizini değiştiren bu metot ile geleneksel PZR yöntemi ve gen analizi birleştirilmiştir. PZR çoğaltımını görünür hale getiren ve monitorize edebilen floresan işaretli prob ve boyaların kullanıldığı, floresanın oluşan DNA ile doğru orantılı olarak arttığı bir çoğaltma yöntemidir. Birçok isimlendirilme yapılan bu teknoloji yabancı yayınlarda "kinetik PZR", "homojen PZR", "kantitatif Real-time PZR" gibi çeşitli adlarla da isimlendirilmektedir (Bustin, 2000).

Biyolojik örneklerden elde edilen DNA'nın kopya sayısını sayısal değerlere dönüştürme ve mRNA'nın düzeyini sayısal olarak belirleyebilme en çok kullanılan alanlarını oluşturmaktadır. Bu amaçlarla kullanımının yanı sıra tek nokta mutasyonlarını belirleme, patojen belirleme, DNA hasarı belirleme, metilasyon tespiti, SNP analizi, kromozom bozukluklarının tespiti gibi çalışmalarda da kullanım alanları mevcuttur (Kubista ve ark., 2006).

Real-time PZR, geleneksel PZR' ın uygulama alanlarını arttırırken PZR' la ilişkili pek çok laboratuar sorununa da çözüm getirmiştir. Bu yöntem sayesinde DNA ve RNA örnekleri kalitatif ve kantitatif olarak kısa sürede analiz edilebilmekte, çok sayıda örnek son derece az kontaminasyon riskiyle güvenle çalışılabilmektedir (Garcia ve ark., 2006). Real-time PZR' da ürünlerin analizi reaksiyon sırasında yapılmaktadır. Bu nedenle, agaroz jel elektroforezi, DNA bantlarının mor ötesi ışık altında görüntülenmesi gibi işlemlerin uygulanmasına gerek kalmamaktadır (Zhong, 2001).

Real-Time PZR ürünlerinin kalitatif ve kantitatif analizlerinde diziye özgün olmayan floresan boyalardan ya da diziye özgü problardan yararlanılmaktadır. Böylece

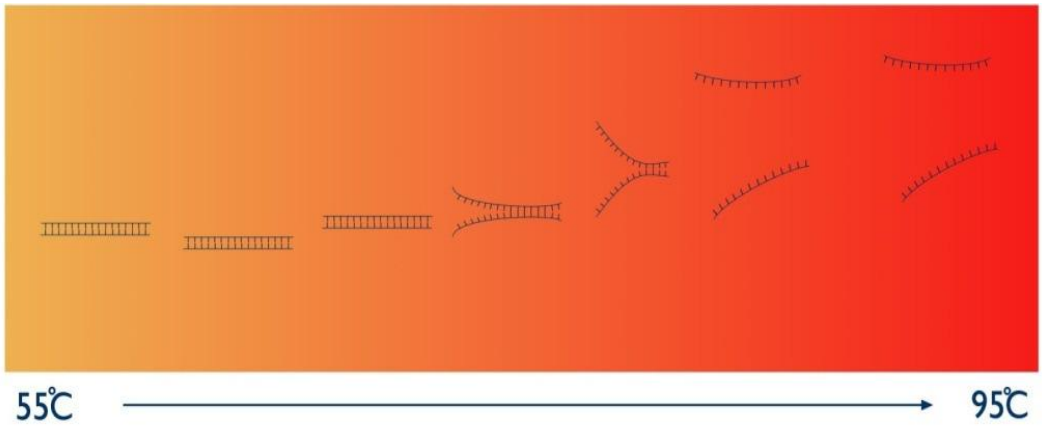
sonuçlar anında alınmakta ve kontaminasyon riski azalarak tüm işlemler sıcaklık döngüleri başlayınca otomatik olarak devem etmektedir.

2.7.6.1. HRM (high resulotion melting) analizi

HRM; 2002 de ortaya çıkan, akademi ve sanayinin işbirliği ile DNA analizleri için geliştirilmiş, Real-Time PZR cihazında bulunan yeni bir metottur (Reed ve ark., 2007).

HRM analizi çift zincirli DNA numuneleri üzerinde gerçekleştirilir. Tipik olarak, kullanıcının DNA'yı çoğaltmak için mutasyonun yer aldığı bölgede HRM analizden önce gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu kullanacaktır. PZR işleminden sonra HRM analizi başlar. Bu süreçte amplikon DNA'nın sıcaklığı 55° den 95 °e kadar çıkar (Şekil 2. 7). Bu işlem sırasında bir noktada amplikon erime sıcaklığına ulaşır ve DNA'nın iki zinciri birbirinden ayrılır. HRM in sırrı bu süreci eş zamanlı olarak izlemesidir.

Örnekler için bir ayırım veya işlem gerekli değildir. PZR aplikasyonundan sonra PZR işlemini engellemeyen doymuş boyalarının floresan değerleri izlenerek erime eğrileri oluşturulmaktadır (Reed ve ark., 2007).



Şekil 2.7. Sıcaklıkla DNA'nın çift zincirli halden tek zincirli hale geçmesi

HRM'nin gücü, cihazın sıcaklık kontrolüne, sıcaklık ve floresan ölçümüne (Hermann ve ark., 2006) floresan boyalara (Wittver ve ark., 2003) ve PZR ürününün saflığına (Montgomery ve ark., 2007) bağlıdır. Cihazın sözü edilen faktörlerden kaynaklanan yüksek çözünürlük kapasitesi, hassas ölçüm sağlamaktadır. Hassas ölçüm, artan her 0,1-1,0 °C sıcaklığın neden olduğu floresan sinyal şiddeti değişiminin kayıt edilebildiğini ifade etmektedir. Bu durum, DNA denatürasyonunun çok iyi takip edildiğinin bir göstergesidir. Veri eldesi, 2 sn' deki 0,1-1,0°C sıcaklık artışına karşılık

oluşan floresan sinyal şiddeti değişiminin ölçülmesi ile elde edilir. Artan her 0,1°C için ölçüm alınabilmektedir. Bu nedenle çözünürlük yüksektir (Gundry ve ark., 1999; Wittwer ve ark., 2001; Wittwer ve ark., 2003; Kuzpınar, 2007).

HRM analizi; çift sarmallı DNA örneklerinde mutasyon, polimorfizm ve epigenetik farklılıkların tespiti için son derece güçlü bir tekniktir. Diğer genotipleme teknolojilere göre büyük avantajlara sahiptir. Yani;

- ✓ Taq man, SNP ve DNA sekanslama v.b gibi diğer genotipleme teknolojilerinden daha az maliyetlidir.
- ✓ Hızlı ve güçlü bir sistemdir. Kısa sürede çok sayıda örneğin genotiplendirmesi doğru bir şekilde yapılabilmektedir.
- ✓ Basittir. HRM analizi yapabilen Real-Time cihazına sahip yetenekli bir genetikçi laboratuar dışında da bu genotiplemeyi gerçekleştirebilir.

Rapid-cycle PZR ile kombine edildiği zaman HRM özelleşmiş DNA diagnostiği için ideal bir çözümdür. Rapid-cycle PZR (<15 dk.) ve devamında HRM (<2 dk.) hızlı bir çözüm sağlamaktadır. Bu metotlar sadece hızlı değil aynı zamanda maliyetsizdir, çünkü real-time termal siklusları ve işaretli problar gerekli değildir. Eski metotlarda; DNA nın termal erimesi geçmişte UV absorbansı tarafından izlenmekteydi. Yüksek kaliteli erime eğrisi için DNA nın µg miktarı ve 0.1-1.0°C /dk oranı gerekliydi. Bu metotla; absorbansın tam tersine DNA erimesinin floresan analizi daha hassastır ve sadece nanogram miktarı yeterlidir, PZR aplikasyonu tarafından uygun olarak sağlanır. Floresan tarafından DNA erimesini izleyen metotlar; real-time PZR' ın çıkışıyla ve 15 yıl önce Light Cyler ile tanışılmasıyla popüler olmuştur. Kapiler örnekli formatlar ve daha küçük örnek hacimlerinde daha iyi sıcaklık kontrolüne izin vermekte, 0.1-1.0° C/s erime sıcaklığı oranları daha hızlı olmaktadır (Reed ve ark., 2007).

2.7.6.1.1. HRM analizinde kullanılan boyalar

Etidyum bromür, propidyum iyodit, DAPI ve hoechst gibi boyalar birinci nesil boyaları temsil etmektedir. Bu boyalar, genellikle nükleik asit görüntülemede ve floresan mikroskop incelemelerinde DNA işaretlemede kullanılmaktadırlar. Çoğu mutajenik ve karsinojeniktir. Ayrıca, bazıları çift zincirli DNA'ya özgül değildir (Cosa ve ark., 2001).

HRM analizi için SYBR Green gibi ikinci nesil boyalar kullanılabilmektedir. SYBR Green I PZR ürünlerinin erime analizlerinin takibi için kullanılan, hassas bir

boya olarak ortaya çıkarılmıştır (Reed ve ark., 2007). Ancak, bu boyalar yüksek konsantrasyonlarda kullanıldıklarında PZR inhibitörü olarak etki göstermektedir (Monis ve ark., 2005).

Boyaların düşük konsantrasyonlarda ki kullanımları ise; denatürasyonla açılan DNA çift zincirinden ayrılmalarından sonra henüz denatüre olmamış bölgelere yeniden bağlanmalarıyla sonuçlanmaktadır. DNA'dan boyanın ayrılmasıyla floresan sinyali şiddetinin azalması gerekirken, boyanın çift zincirli DNA'ya tekrar bağlanmasıyla floresan sinyali şiddetinde bir değişiklik olmamaktadır. Başka bir deyişle, floresan sinyali şiddeti hatalı ölçülmektedir. Bu durumda, denatürasyon kinetiklerinin görüntülenmesi, dolayısıyla Tm derecesi saptama hassasiyeti azalmaktadır (White ve Potts, 2006).

SYBR Green I den sonra daha iyi sonuçlar veren HRM için yeni nesil doymuş boyalar geliştirilmiştir (Reed ve ark., 2007). Son dönemlerde, LC Green, Eva Green ve SYTO9 adı verilen üçüncü nesil boyalar geliştirilmiştir. Bu boyaların PZR'yi inhibe edici etkileri daha düşüktür. Bu nedenle, yüksek konsantrasyonlarda kullanılabilmektedirler (Monis ve ark., 2005). Bu boyaların kullanımıyla ölçülen floresan sinyali şiddetindeki değişiklik, çift zincirli DNA'nın tek zincirli DNA'ya ayrılmasını doğru oranda yansıtmaktadır. Bir başka deyişle, yüksek doygunluktaki boyaların kullanımı, HRM analizinin mutasyon saptama hassasiyetini arttırmaktadır (Wittwer ve ark., 2003; Herrmann ve ark., 2006).

2.7.6.1.2. Floresan DNA melting analizinin temeli

Çift zincirli DNA varlığında belli boyalar güçlü bir floresan ışığı yayarlar. Bunların en yaygın olanı etidyum bromür, elektroforez jelde kullanılarak kırmızı bantlar vermeye yaramaktadır.

SYBR Green I ve LCGreen gibi asimetrik siyanin boyalar her zaman ışıma yaparlar, melting analizi ve real time PZR floresansı için seçilmiş boyalardır. Erime eğrileri (melting curve) oluşturmak için; örnek, bir dizi sıcaklıkla ısındırılırken, floresan sürekli toparlanır. Herhangi bir çift zincirli DNA varlığında düşük sıcaklıkta, güçlü bir floresan ışığı yayılacaktır. Sıcaklık arttıkça floresansın ışık yayması azalacaktır, ilk azalmadan sonra karakteristik bir sıcaklıkta floresan hızlıca düşecektir. Bunun anlamı da DNA 'nın tek zincir haline geçmesidir (Reed ve ark., 2007).

2.7.6.1.3. Çalışma prensibi

Aplikasyondan önce PZR tüplerine doymuş boyalar eklenir, PZR başladıktan sonra hiçbir örneğe ilave bir işlem uygulanmamaktadır. DNA ekstraksiyonu ve saflaştırılması PZR işleminden önce yapılmaktadır. En iyi sonuçlar için, bütün testler ve kontrol DNA'ları benzer yolla hazırlanmalı ve PZR tüplerine eş konsantrasyonlar da eklenmelidir. Çalışmadaki örneklerin ve kontrollerin DNA izolasyonu boyunca, numune tamponu tuz konsantrasyonu da dahil olmak üzere benzer reaktifler kullanılmalıdır. DNA örnekleri kontaminasyondan uzak tutulmalıdır. Bununla birlikte, iyi sonuçlar ham DNA'nın hazırlanmasından da kaynaklanabilir, örneğin kantitatif analiz olmaksızın kuru kan lekelerinden alınan örnekler gibi (Reed ve ark., 2007; Appliedbiosystems, 2009).

2.7.6.1.4. PZR koşulları

Sıcaklık döngüsü gradienti ve jel elektroforezinin kullanımı; koşulların optimize olması için henüz en iyi metodlardan biridir ve değişen Mg^{+2} konstrasyonu genellikle, aynı koşullar altında amplifiye etmek için çeşitli amaçlara izin verir. (Reed ve ark., 2007).

2.7.6.1.5. Genotiplendirme

Genotiplendirmenin bir çok metodu olmasına rağmen, kapalı tüp metodları klinik laboratuar, diagnostik ve özelleşmiş ilaç için güçlü avantajlara sahiptir. Aplikasyon ve analiz sırasında herhangi bir işlem olmadığı için kontaminasyon riskini ve otomasyon ihtiyacının ortadan kaldırmaktadır. Bu metotlar geleneksel olarak allele özel işaretli problarla kullanılır, sıklıkla floresan boya ve söndürücü; aplikasyon boyunca ikincil yapının kaybı ve/veya hidrolizi tarafından ayırır. Doğru bir genotiplendirme için, 2 prob vardır 1 tanesi wild-tip sekans ile eşlenecek olan prob, diğeri ise mutasyonlu sekansla eşleşecek probtur. Tipik olarak, annealing veya uzama boyunca her bir döngüden sonra Real Time PZR cihazında floresans ölçülür (Reed ve ark., 2007).

Real-time PZR cihazının özellikleri ve HRM yönteminin avantajları göz önüne alındığında; tek nükleotid polimorfizmi (SNP), mikro insersiyon ve delesyon gibi dizi varyasyonlarını taramak için ve klinik tanı için HRM yöntemine olan ilgi artmaktadır (Kuzpınar, 2007).

2.7.6.1.6. DNA Tm derecesi

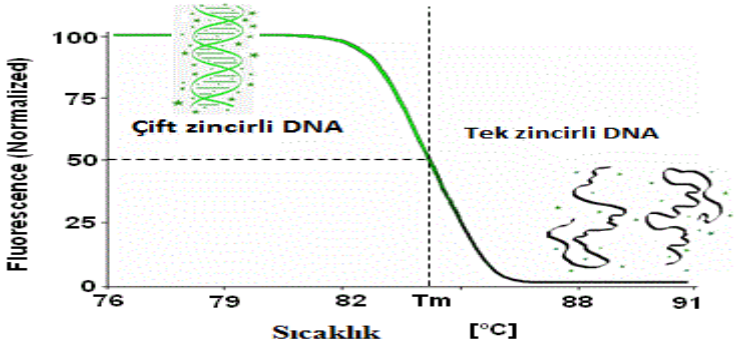
DNA, birbirine 3'-5' fosfodiester bağlarıyla bağlı dört deoksinükleotidin meydana getirdiği iki komplementer nükleik asit zincirinden oluşan çift zincirli bir moleküldür. İki zincir birbirine Adenin (A) ve timin (T) arasındaki iki (A=T), guanin (G) ile sitozin (C) arasındaki üç (G≡C) hidrojen bağı ile bağlanmaktadır. Hidrojen bağlarını kıran fiziksel ve kimyasal etkenlerle DNA çift zinciri denatürasyona uğrayabilmektedir (Alberts ve ark., 2002). DNA çift zincirinin %50'sinin birbirinden ayrılması için gerekli olan sıcaklık derecesi, DNA "Tm derecesi" olarak tanımlanmaktadır (Şekil 2.8.).

DNA çift zincirinin tamamen açılmasına ise "denatürasyon" denmektedir (Barker, 1971). Hipokromik DNA'dan hiperkromik DNA'ya geçiş, klasik spektrofotometrik yöntemlerle takip edilebilmektedir. Bir başka deyişle, denatürasyon, DNA çözeltisinin 260 nm'de UV absorbansındaki değişim ölçülerek izlenebilmektedir. 260 nm dalga boyunda tek zincirli DNA, çift zincirli DNA'dan daha fazla UV absorbansı oluşturmaktadır (Barker, 1971; Kuzpınar, 2007).

DNA boyutu ve GC içeriği, DNA'nın kararlılığını belirleyen en önemli faktörlerdir. DNA'nın denatürasyon sıcaklığı, kararlılığına bağlı olduğu için bu faktörlerden etkilenmektedir (Ririe ve ark., 1997). GC arasındaki hidrojen bağı sayısı AT arasındakinden fazla olduğu için, GC' den zengin bir DNA'nın Tm derecesi, AT' den zengin DNA'nın Tm derecesinden yüksektir. Başka bir ifadeyle, GC içeriğinin fazla olması DNA'nın denatürasyon sıcaklığını ve kararlılığını arttırmaktadır. Denatürasyon deneyleri, termodinamik kararlılığın sadece GC içeriğine değil, DNA baz dizilimine de bağlı olduğunu da göstermiştir (Wada ve ark., 1980). Bu nedenle, aynı oranda GC içeren iki dizi farklı kararlılıklara sahip olabilmektedir. DNA baz dizisinde meydana gelen değişiklikler, DNA çift sarmalının kararlılığını değiştirir. Bu durumdan, DNA Tm derecesi de etkilenmektedir (Breslauer ve ark., 1986). DNA'daki mutasyona bağlı olarak normal DNA dizisine göre Tm derecesi artabilmekte ya da azalabilmektedir. Bu değişimi mutasyona uğrayan baz türü belirlemektedir. Teorik olarak, DNA baz dizisinde meydana gelen ±%1'lik GC değişimi, Tm derecesini ±0,4°C değiştirmektedir (Benjamin, 1997). GC' den fakir bir DNA fragmentinde, 2 bç' lik GC delesyonu olduğunu varsayarsak, bu DNA'nın Tm derecesininn delesyon taşımayan DNA ile kıyaslandığında azalması beklenir (Razlutskii ve ark., 1987). Zincirlerin birbirlerinden ayrılmak için ihtiyaç duyacakları sıcaklığın düşmesinin nedeni ise, G ve C bazları

arasında azalan üçlü hidrojen bağlarıyla beraber DNA çift sarmalının kararlılığının azalmasıdır (Nakona ve ark., 1999; Santalucia ve Hicks, 2004; Kuzpınar, 2007).

HRM analizinde; Tm derecesinin doğru hesaplanabilmesi için altyapı gerekmektedir. Altyapının büyük bir içeriği doğrusaldır ve floresansın fiziksel niteliğinden doğar. Sıcaklık arttıkça, floresansın ışıması azalır. Daha düşük sıcaklıkta, altyapının katsayı içeriği primerlerin yüksek konsantrasyonlarına bağlanmış boyalardan doğarak açık hale gelir. Doğrusallıktan uzaklaşan metotlar ve katsayının alt yapısı tanımlanır ve ticari HRM software de birleştirilir. Bir PZR ürünün Tm derecesi rahat ölçülür ama bu türev eğri (melting curve) üzerinde tek bir nokta üzerindedir (Reed ve ark., 2007).



Şekil 2.8. Tm derecesi

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Biyolojik Materyal

HRM çalışmasında; kontrol için sağlıklı bireylerden alınan 5 adet kan örneği ve parafin bloklara emdirilmiş olan 10 adet prostat kanserli solid doku örnekleri kullanılmıştır.

3.2. Moleküler Materyal

HRM çalışması için; PTEN genine ait iki adet ekson (ekson 1 ve 2) çalışılmıştır ve bu primerler Yapılcan Ltd. Şti. firması tarafından sentezletilmiş olup ticari olarak kullanılmıştır.

PZR çalışmalarında her hücrede aynı seviyede eksprese olma özelliğine sahip β-aktin geni PZR etkinliğinin ölçümüne olanak vermesi sebebiyle pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan primerlerin oligonükleotid dizileri ve annealing sıcaklıkları

Gen		Oligonükleotid dizisi	Annealing
PTEN Ekson1	F	5'- TCT GCC ATC TCT CTC CTC CT-3'	60.0
	R	5'- CCG CAG AAA TGG ATA CAG GT -3'	60.0
PTEN Ekson2	F	5'- TGA CCA CCT TTT ATT ACT CCA-3'	56.0
	R	5'- TAC GGT AAG CCA AAA AAT GA -3'	56.0

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan β- aktine ait oligonükleotid dizisi ve annealing sıcaklığı

Gen	No		Oligonükleotid dizisi	Annealing
β- aktin	NM_001101.2	F	5’-CGCAAAGACCTGTACGCCAAC-3’	56.0
		R	5’-GAGCCGCCGATCCACACG-3’	56.0

3.3. Histopatolojik Metotlar

3.3.1. Doku örneklerinin histopatolojik çalışması

Bu çalışmada, Konya Üniversitesi Meram Tıp Fakültesinden 2012/05 karar sayılı etik kurulu kararıyla alınmış prostat kanserli biyopsi örnekleri kullanılmıştır.

3.3.1.1. Histopatolojik incelemeye dayalı yöntemler

Bu çalışmada histopatolojik incelemeye dayalı yöntemler yapılmamıştır. Daha önceki çalışmalarda patolojik olarak incelenmiş ve tanısı konulmuş Parafin bloklara emdirilmiş prostat kanserli doku örnekleri sadece moleküler analizler için kullanılmıştır.

3. 4. Moleküler Metotlar

3.4.1. Parafinli bloklardan deparafinasyon

1- Parafin bloktan 10'ar µ.luk kesitler alınır ve ependorf tüplere konulur.
2- Her tüpe 1'er cc Xylol eklenir ve 1 saat 37 °C'de bekletilir.
3- 13000 rpm'de 15 dk. santrifüj edilir.
4- Xylol yenilenerek 2. ve 3. adım tekrar edilir.
5- Ependorf tüplere absolute alkolden 1'er cc eklenir ve 37 °C'de 30 dk. bekletilir.
6- 13000 rpm'de10 dk. santrifüj edilir.
7- Alkol yenilenerek 5. ve 6. adım tekrarlanır. Dokulara dikkat edilerek alkol atılır.
8- % 75'lik alkolden ependorf tüplere 1'er cc eklenir ve 37 °C'de 30 dk. bekletilir.
9- 13000 rpm'de 10 dk. santrifüj edilir. Alkol yenilenerek 8. ve 9. adım tekrarlanır.
10- Alkol atılır ve ependorf tüplere 1'er cc saf su eklenir. 37 °C'de 15 dk. bekletilir.
11- 13000 rpm'de 10 dk. santrifüj edilir. Saf su yenilenerek 9. ve 10. adım tekrarlanır. Saf su atılır.
12- Ependorf tüplerin kapağı açılarak kurumaya bırakılır.

3.4.2. DNA izolasyonu

Sağlıklı kontrol kanlarından DNA izolasyonu EZ1 biorobot (Qiagen) DNA izolasyon cihazında Blood kitle ve parafinden arındırılmış doku örneklerinden EZ1 biorobot (Qiagen) DNA izolasyon cihazında Tissue kitle yapılan izolasyon yöntemi kullanılmıştır.

3.4.2.1. EZ1 biorobot (Qiagen) DNA izolasyon cihazı ile izolasyon

1- Parafinden arındırılan prostat dokularından 20-40 mg alınıp sterilize edilmiş havanlara konulur.
2- Havan içerisindeki dokular -196 °C'lik sıvı azotta ezilerek toz hainle getirilir.
3- Ezilen dokular spatula yardımıyla godelere konulur.
4- Godelerdeki dokular üzerine 190 µL G_2 buffer ve 10 µL proteinaz-K eklenir.
5- 37 °C'de 1 gece inkübasyona bırakılır.
6- 300 rpm'de 2 dk. santrifüj edilir.
7- Süpernatant kısımlar dikkatlice çekilir, ayrı godelere alınır.
8- Cihaz hazırlanır. Elusyon volümü 100 µL seçilir, örnek miktarı 200 µL seçilir.
9- Cihazın yönlendirmesine göre protokol başlatılır.
10- Protokol süresi 20 dakikaya ayarlanır.
11- Protokolden sonra DNA'lar elde edilir ve elde edilen DNA'lar agaroz jele yüklenir.

3.4.3. DNA kalitesinin tanımlanması

3.4.3.1. Agaroz jel elektroforez yöntemi

Çalışmamızda izole edilen DNA'lar kalite tespiti için %1'lik agaroz jelde elektroforez cihazında (Biorad) yürütülmüştür.

Bu amaçla 1 gr agaroz tartılıp 100 ml 1XTAE (Tris- Asetik Asit-EDTA) içerisinde kaynatılarak tamamen çözülmesi sağlandı. Bu sırada jel dökme tablası kalıba yerleştirildi ve izolasyon ürünlerinin yükleneceği kuyucukları oluşturmak için tablaya tarak yerleştirildi. Oda sıcaklığına kadar soğutulan agaroz çözeltisi tablaya döküldü. Jel polimerleştikten sonra tarak çıkartıldı ve jel tabladan çıkartılarak içerisinde 1L 1X TAE (Tris-Asetik Asit-EDTA) tampon bulunan elektroforez tankının içerisine yerleştirildi. 7 µL izolasyon ürünü (DNA ve RNA) için 3 µL jel yükleme tamponu (loading dye) eklenip jeldeki kuyuya yüklendi. Jel elektroforez tankı güç kaynağına bağlandı ve 45 dk. süreyle 150 V, 75 mA şiddetinde akım uygulandı.

Agaroz jel içindeki izolasyon ürünlerini görünür hale getirmek için floresan özellikteki etidyum bromür stok çözeltisinden 2–3 µL alınıp yaklaşık 500 ml saf su içerisinde iyice karıştırıldı. Agaroz jel bu solusyon içinde 15 dakika bekletildikten sonra izolasyon ürünleri jel görüntüleme sisteminde incelendi.

3.4.3.2. Mikro hacim (nanodrop) spektrofotometre değerlendirmesi

Bu çalışmada izole edilen DNA'ların konsantrasyon ve kalite ölçümlerinin yapılabilmesi için nanodrop (NanoDrop 2000c thermo) cihazı kullanıldı. Cihazda ölçümü yapılmak üzere DNA örneklerinden 1 µL alınıp A_{260}/A_{280} değerleri ölçüldü.

3.4.4. HRM (High Resolution Melting Curve) yöntemi ile mutasyon tanımlama

Çalışmamıza dahil edilen prostat kanserli dokularda HRM analiz yöntemi ile bir tümör baskılayıcısı gen olan PTEN genindeki; mutasyonlar tespit edilmiştir.

3.4.4.1. HRM koşulları

4'lü reaksiyon tüplerine konulan 1 µl'lik her bir sağlıklı kontrol DNA ve her bir prostat ca'lı DNA örneği üzerine; 2XHRM Mix (HotStarTaq Plus DNA Polymerase, EvaGreen Dye, optimized concentration of Q-Solution, dNTPs, and $MgCl_2$)' inden 12,5 µl, Forward primerden 1,75 µl, Reverse primerden 1,75 µl, dH_2O' dan 9 µl alınarak hazırlanan reaksiyon miksinden konularak cihazda çalışılmasına hazır hale getirilmiştir. β- aktin için ise; 2XPZR mixinden 12,5 µl, primer probtan 2 µl, dH_2O' dan 9,5 µl ve 1 µl DNA kullanılmıştır.

25 µl hacimli örnekler cihaza yerleştirildikten sonra, PZR optimizasyon koşulları sağlanmıştır.

Denatürasyon için 95ºC 10 dk, primerlerin hedef bölgeye tutunması için Ekson-1 için gerekli olan sıcaklık 60ºC 30 dk, Ekson-2 ve β- aktin için gerekli olan sıcaklık 56ºC 30 dk seçilmiş, primerlere nükleotid eklenerek komplementer DNA'nın polimerizasyonu için gerekli olan sıcaklık 72ºC 10 dk olarak belirlenmiştir. Bu üç farklı sıcaklığın ard arda uygulanmasından oluşan döngünün, 40 kez tekrarlanması ile reaksiyon gerçekleştirilmiştir.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. Histopatolojik Bulgular

Çizelge 4.1. Prostat parametreleri

Örnek no	Hastanın yaşı	Gleason Skoru (ng/dl) (PSA)	Ailesel kanser hikayesi	Hastanın taşıdığı diğer kanser tipleri
4	51	5	Akciğer	Testis
5	60	5	Yok	Yok
6	65	7	yok	Karaciğer
7	63	6	Yok	Yok
14	58	6	Yok	Yok
17	69	7	Testis	Testis
27	59	7	Kolon	Testis
29	58	5	Yok	Yok
36	65	7	Testis, kolon	Kolon
37	74	8	Melanoma	Testis Melanoma

Tablo incelendiğinde 4, 5, 7, 14 ve 29 numaralı örneklerin orta dercede diferansiye olduğu, 6, 17, 27, 36 ve 37 numaralı örneklerin ise az diferansiye olduğu tümörün ilerlerdiği görülmektedir.

Çizelge 4.2. Kan ve prostat dokularından izole edilen DNA'ların nano-drop sonuçları

Kan ve Prostat Doku Numaraları	Nükleik asit konsantrasyonu	A_{260}	A_{280}	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
K-1	35,3	0,705	0,348	**2,03**	0,11
K-2	32,8	0,656	0,317	**2,07**	0,10
K-3	13,7	0,274	0,159	**1,72**	0,14
K-4	26,6	0,532	0,325	**1,64**	0,35

K-5	28,8	0,577	0,340	**1,70**	0,40
4	65,2	1,303	0,751	**1,73**	1,11
5	49,0	0,980	0,543	**1,80**	0,86
6	40,3	0,806	0,467	**1,73**	0,91
7	59,3	1,186	0,635	**1,87**	1,06
14	72,5	1,449	0,785	**1,85**	1,73
17	45,6	0,913	0,533	**1,71**	0,90
27	960,7	19,213	26,644	**0,72**	0,30
29	27,8	0,556	0,283	**1,97**	0,67
36	522,1	10,442	12,115	**0,86**	0,52
37	1181,4	23,628	26,618	**0,89**	0,30

DNA izolasyonu; genetik olayların hücredeki moleküler temeli, genetik materyal görevini yüklenen nükleik asitlerin yapı ve özelliklerine dayanır. Bu nükleik asit deoksiribonükleik asit (DNA) dır. Bu projede HRM çalışmasında kullanılmak üzere kolay kullanımı, hızlı sonuç vermesi ve yüksek kalitede genomik DNA izolasyonu yapması nedeniyle EZ1 biorobot (Qiagen) DNA izolasyon cihazında izolasyon yapılmıştır.

Çalışmamızda DNA kalite tayini yapmak amacıyla agaroz jel elektroforez yöntemi kullanılırken, DNA örneklerinde tekrar kalite tayini ve miktar tayini yapmak için güvenilir sonuçlar vermesi nedeniyle nanodrop cihazı kullanılmıştır.

DNA örneklerinde proteinin en az miktarda olduğunun belirlenmesi için A_{260} / $A_{280} \geq 1,8$ olması gereklidir. Tablodaki A_{260} / A_{280} ölçüm değerlerine göre örneklerin 1,8 yakın değerlerde olduğu görülmektedir.

4.2. HRM Analizi Bulguları

Konya Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Hastanesi Patoloji Bölümü'nden 2012/05 etik kurul kararı ile alınmış 10 adet primer prostat kanserli hastalar da ve Konya Genetikon genetik tanı ve tedavi merkezinden temin edilen sağlıklı gönüllü bireylerden alınan 5 adet kan örneğin de; RT-PZR' ye dayalı tekniklerden biri olan HRM ile mutasyon analizi yapılmıştır.

Pozitif amaçlı kullanmak için ticari olarak temin edilmiş β- Aktin ile RT-PZR çalışması yapılmıştır.

β- Aktin ile yapılan çalışmaya bakıldığında; patolojik çalışmalar neticesinde sağlıklı olarak tanımlanan, kontrol grubu K-1, K-2, K-3, K-4 ve K-5 numaralı örneklerin düzgün bir biçimde çalıştığı görülmüştür. Ayrıca patolojik çalışmalar neticesinde prostat kanserli olarak tanımlanan 4, 5, 6, 7, 14, 17, 19, 27, 36 ve 37 numaralı örneklerin 27 numaralı örnek dışında düzgün bir biçimde çalıştığı görülmüştür (Şekil 4.1).

36 ve 37 numaralı, 14 ve 7 numaralı, 4 ve K-3 numaralı, K-1, K-2, K-3, K-4, 6, 17 ve 19 numaralı örneklerin birbirleriyle kantitatif (DNA saflığı) olarak örtüştüğü gözlenmiştir. Bu β- Aktin sonuçları ve nanodrop sonuçlarına bakıldığında örneklerin saflık ve kalite tayinleri birbirini doğrulamaktadır (Şekil 4.1. ve çizelge 4.2.).

PTEN geni ile yapılan HRM çalışmasında ise, PTEN genine ait Ekson-1 ve Ekson-2 mutasyon yani anlamlı bölgeler tespit edilmiştir.

Ekson-1 için; kontrol olarak kullandığımız sağlıklı olarak tanımlanan K-1 numaralı örnek, prostat kanserli olarak tanımlanan 36 ve 37 numaralı örneklerde mutasyon saptanırken, Ekson-2 için ise; yine K-1, 36 ve 37 numaralı örneklerde mutasyon saptanmıştır.

4.2.1. Housekeeping gen

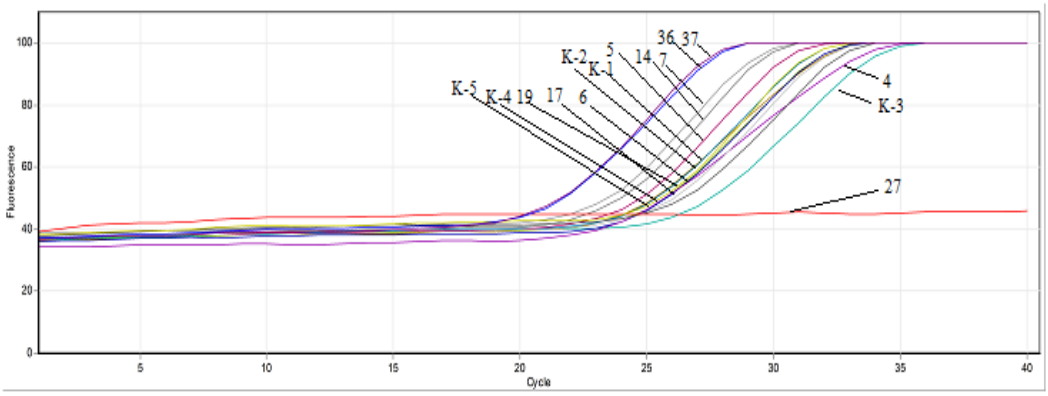
Housekeeping genlerin terim olarak kökeni belirsizdir. 1976'dan beri literatürde kullanılan bu terim özellikle tRNA ve rRNA'yı tanımlamaktadır. Housekeeping gen genellikle temel hücresel fonksiyonların korunumu için gerekli olan ve organizmanın bütün hücrelerinde eksprese olan gendir (Anonim). Housekeeping genlerin moleküler biyoloji deneylerinde kullanılırken aynı hücreden hücreye, örnekten örneğe, tedaviden tedaviye ve/veya hastadan hastaya ekspresyonun aşamalarında değişmeden kaldığı kabul edilir (Glare ve ark., 2002).

HSP90 ve β- Aktin Housekeeping genler sabit seviyelerde eksprese olmasına rağmen diğer housekeeping genler deneysel koşullara bağlı olarak değişkenlik gösterebilir. Kalp kök hücresi ile yapılan bir çalışmada β- Aktin ve GAPDH'nin en tutarlı housekeeping gen bulunmasına karşın B2M, HPRT-1 ve RPLP-1 gibi genler yetişkin kalp hücresi ile yenidoğan kalp hücresi arasında önemli farlılıklar göstermiştir.

Aktinler hücre hareketini, yapısını ve bütünlüğünü sağlayan yüksek düzeyde korunmuş proteinlerdir. Gen adı ACTB olan Beta-aktin geni; insanlarda tanımlanmış

olan 6 farklı aktin izoformlarından biridir. Hücre iskeletinde kasla ilgili olmayan iki aktinden biridir.

Beta-aktin; genellikle diğer aktinler arasında yük kontrolünün sağlanması, hücrelerin bütünlüğünün sağlanması, protein bozulmasını sağlar ve Western Blooting tekniğinde kullanılmaktadır. Bu özellikleri nedeniyle çalışmamızda β- Aktin pozitif kontrol amacıyla kullanılmıştır.



Şekil 4.1. Prostat ca'lı örneklerin ve kontrol kanlarının 56°C'deki β- Aktin görüntüsü

4.2.2. Denatürasyon eğrisi analizi

HRM analizi, bir örnekteki heterodupleks ve homodupleks DNA türlerinin varlığını yansıtabilen yüksek çözünürlüklü denatürasyon eğrilerinin değerlendirilmesi temeline dayanmaktadır. Bu şekilde, bilinmeyen DNA örnekleri, normal olduğu bilinen örneklerle karşılaştırılarak DNA mutasyonları saptanmaya çalışılmaktadır (White ve Poss, 2006). DNA örneklerinin denatürasyonu, normalize ve türev eğriler ile gösterilmektedir. Farklı genotipler, birbirlerinden farklı denatürasyon davranışları sergilemektedir. Farklı homo ve heterodupleks formların varlığı nedeniyle kademeli, kompleks eğriler oluşturmaktadır. Bu özellikleri nedeniyle heterozigot örnekleri homozigot örneklerden ayırt etmek kolay olmaktadır (Kuzpınar, 2007).

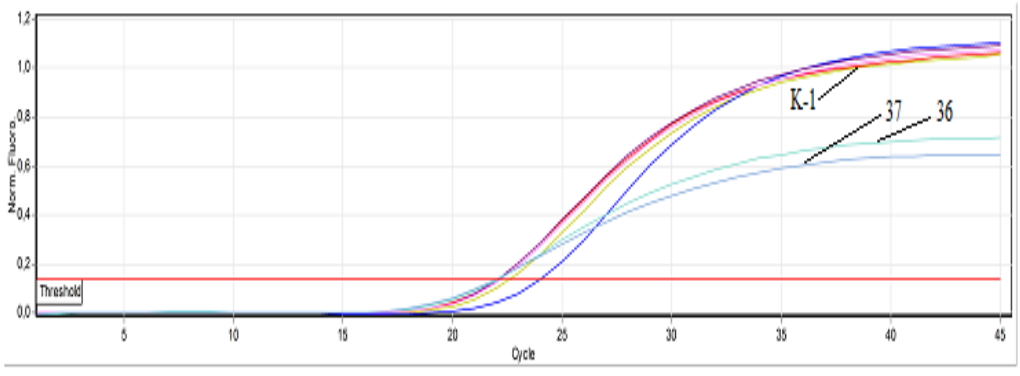
4.2.2.1. Denatürasyon eğrisi (HRM Eğrisi)

Tm derecesinden daha fazla denatürasyon eğrisinin içeriği hakkında bilgi gereklidir. Denatürasyon eğrisinin şekli; büyük ölçüde sekans eşleştirmesi, mutasyon taraması için heterozigot DNA'dan şekillenen heterodubleksin bir indikatörü olarak kullanılır (Reed ve ark., 2007).

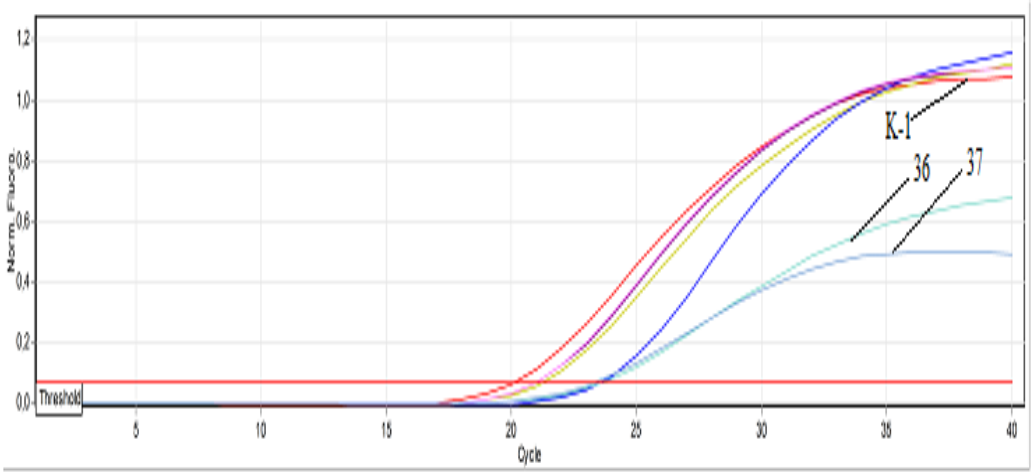
Artan sıcaklığın çift zincirli DNA üzerinde yarattığı etkinin, floresan sinyal şiddetinde oluşan değişikle takip edildiği eğrilere "denatürasyon eğrisi" denir. Bunlar, x ekseninde "sıcaklık" dereceleri, y ekseninde ise "floresan" değerleri çizilen eğrilerdir. Bu eğriler, belirlenen denatürasyon aralıkları için HRM analiziyle elde edilen ham veriyi sunmaktadır. Bu veri, 2 sn' lik zaman dilimlerinde 0,1°C' lik sıcaklık artışına karşılık floresan sinyal şiddetindeki değişimdir (Kuzpınar, 2007).

PZR'de çift zincirli DNA'ya bağlanan boyaların floresan sinyal şiddeti, çoğalan çift zincirli DNA miktarıyla birlikte artmaktadır. DNA örneklerinin PZR ile amplifiye edilmelerinin ardından gerçekleştirilen HRM analizinde, artan sıcaklıkla birlikte DNA çift sarmalı zincirleri ayrılmaya başladığı için floresan sinyal şiddeti yavaş yavaş azalmaktadır (Nygren ve ark., 1998). Sıcaklık, DNA çift zincirlerinin %50'sinin ayrıldığı noktaya ulaştığında ise floresan sinyal hızlı bir azalma göstermektedir (Ririe ve ark., 1997). Tm derecesi en kolay denatürasyonun türev eğrisinin tepe noktasından belirlenmektedir. Primer-dimer ürünleri ilgilenilen üründen daha kısa olduğu için, daha düşük sıcaklıkta denatüre olurlar ve denatürasyon eğrisi analizi ile kolaylıkla ayırt edilirler (Kubista ve ark., 2006; Kuzpınar, 2007).

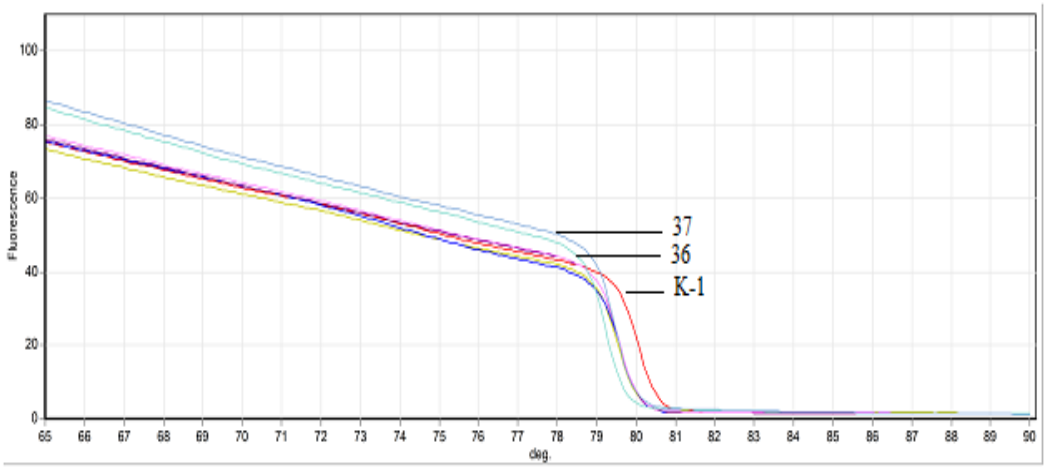
Bir PZR amplikonu, normal veya homozigot olarak mutasyon taşıyan örnekler için tek homodupleksten oluşmasına rağmen heterozigot örnekler için iki heterodupleks ve iki homodupleks formdan oluşmaktadır (Montgomery ve ark., 2007). Bunun nedeni, heterozigot PZR ürünlerinin normal ve mutasyon taşıyan allelleri bir arada taşımasıdır. Tümör biyopsisi gibi heterojen DNA örneklerinde, normal ve mutasyon taşıyan DNA'ların tümü PZR ile amplifiye olmaktadır. PZR sonrasında ise, heterodupleks formlar oluşmaktadır (Ruano ve Kidd, 1992).



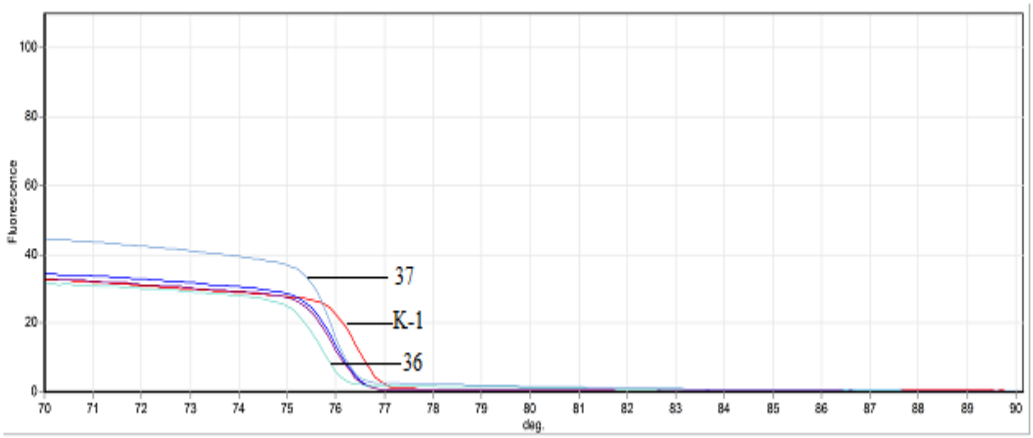
Şekil 4.2. PTEN geni Ekson1siklus; 36, 37 ve K-1 numaralı mutasyonlu örnekler ve kontrol kanları



Şekil 4.3. PTEN geni Ekson2 siklus; 36, 37 ve K-1 numaralı mutasyonlu örnekler ve kontrol kanları



Şekil 4.4. PTEN geni Ekson1 denatürasyon (HRM) eğrisi 36, 37 ve K-1 numaralı mutasyonlu örnekler ve kontrol kanları



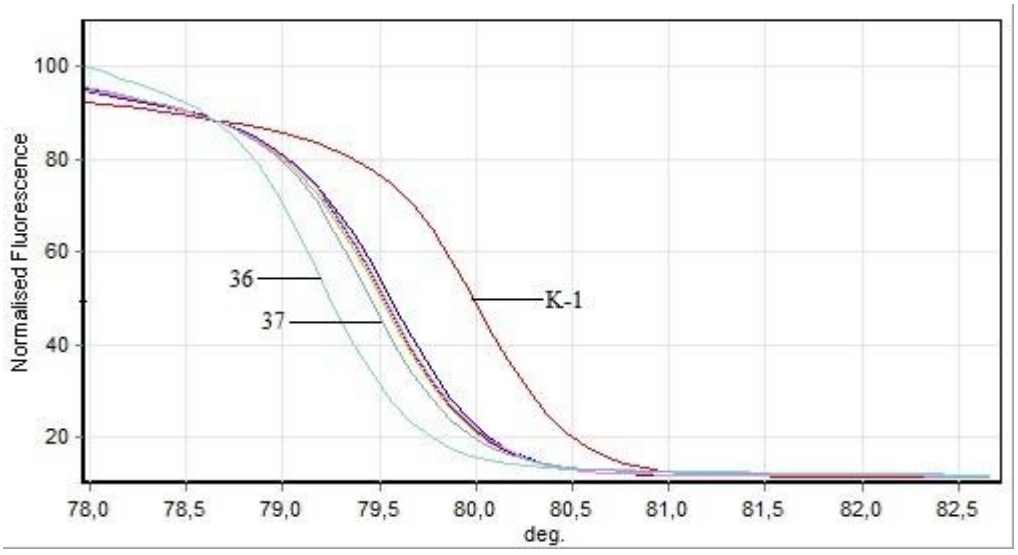
Şekil 4.5. PTEN geni Ekson2 denatürasyon (HRM) eğrisi 36, 37 ve K-1 numaralı mutasyonlu örnekler ve kontrol kanları

Yaptığımız HRM çalışması sonucunda; prostat kanserli örnekler ile kontrol kanları "denatürasyon eğrileri" üzerinde karşılaştırıldığında 36, 37 ve K-1 numaralı örneklerde mutasyon olduğu açıkça gözlenmektedir (Şekil 4.4. ve Şekil 4.5.).

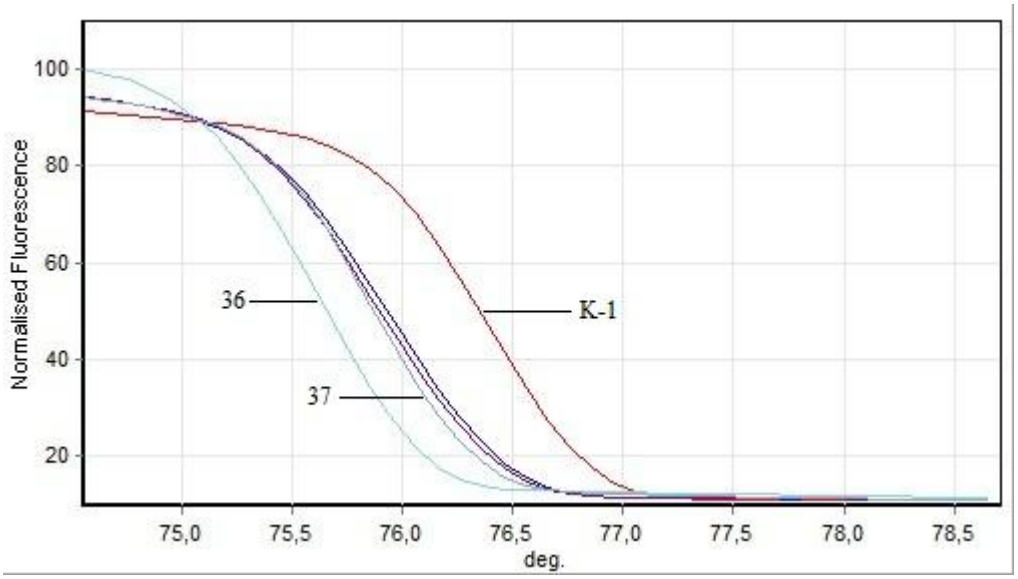
4.2.2.2. Normalize ve türev eğriler

Yorum ve analiz yapabilmek amacıyla tüm örneklerin aynı başlangıç (%100) ve bitiş (%0) floresan sinyal seviyelerine sahip olmalarını sağlayan, böylece bilinmeyen DNA örneklerinin normal örneklerle karşılaştırılarak analiz edilmesine imkan tanıyan eğrilere "normalize eğri" denir (Herrmann ve ark., 2006). Bu eğrilerde, x eksenindeki "sıcaklık" değerlerine karşılık y ekseninde "normalize floresan" değerleri yer almaktadır. HRM analizi yazılımı, ilk olarak ham veriyi sunmaktadır. Bu veri, normalizasyon bölgesini belirlememizi sağlayan temel bilgidir. Denatürasyon fazındaki floresan sinyal şiddeti değişikliği önemlidir. Çünkü denatürasyon fazının orta noktası, DNA örneklerinin Tm derecelerini vermektedir. Denatürasyon fazındaki Tm derecesi değişikliklerini analiz etmek amacıyla; HRM'den sonra manuel olarak denatürasyon öncesi ve denatürasyon sonrası faz bölgelerinin işaretlenmesine "normalizasyon" denir. Bu işlemle, örnekler arasındaki sıcaklık farklılıkları elimine edilerek, ortak sıcaklık değerleri elde etmek için eğriler x eksenine doğru hareket ettirilmektedir (Wittwer ve ark., 2003; Zhou ve ark.,2005).

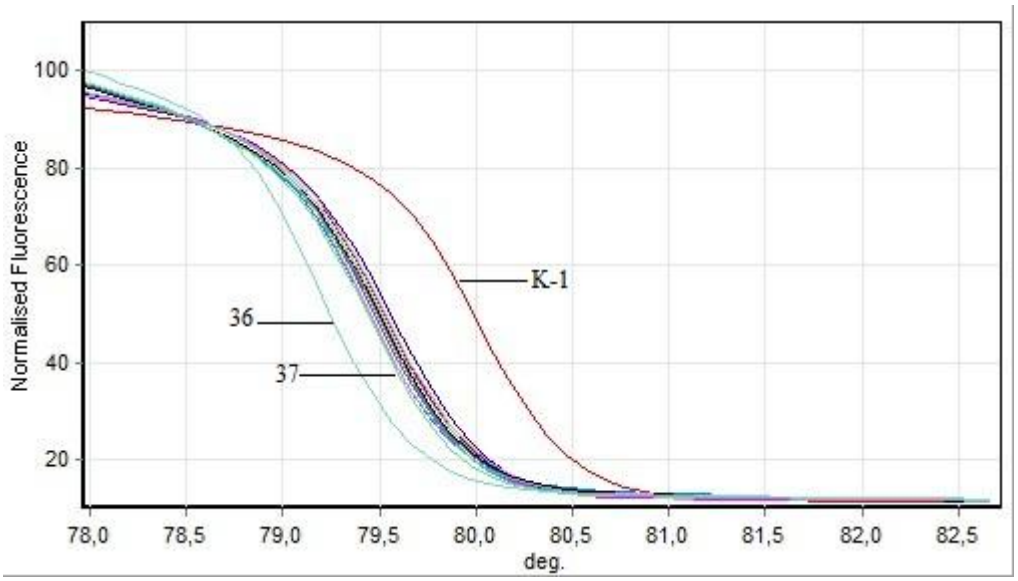
Normalize eğride, normal örnekle karşılaştırıldığında homozigot genotipler için eğrinin yerinin değişmesi söz konusu iken; heterozigotlarda eğrinin şeklinin değişmesi mutasyonların yorumlanması açısından önem taşımaktadır (Montgomery ve ark., 2007).



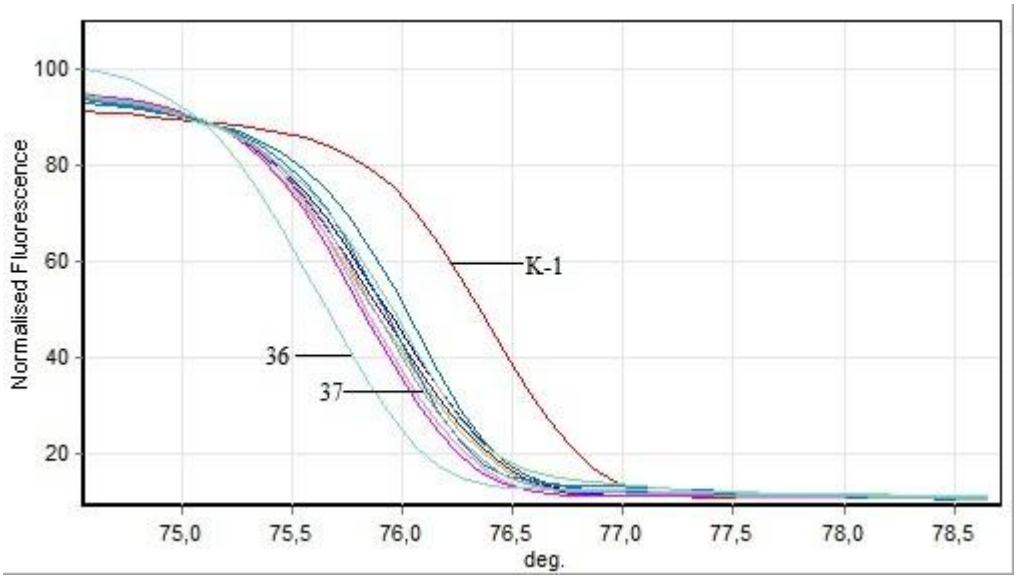
Şekil 4.6. PTEN geni Ekson1 normalize denatürasyon (HRM) eğrisi 36, 37 ve K-1 numaralı mutasyonlu örnekler ve kontrol kanları



Şekil 4.7. PTEN geni Ekson2 normalize denatürasyon (HRM) eğrisi 36, 37 ve K-1 numaralı mutasyonlu örnekler ve kontrol kanları

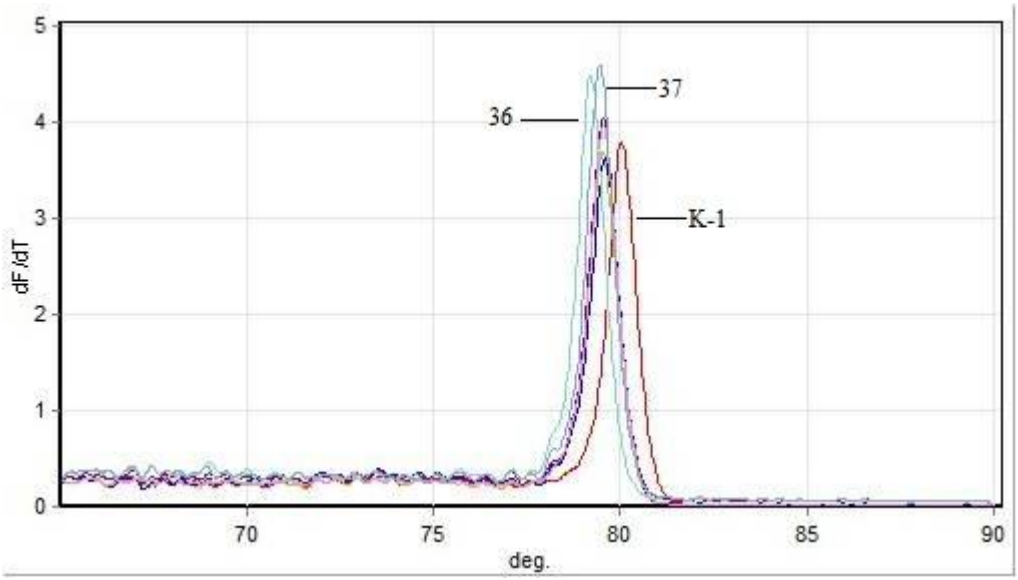


Şekil 4.8. PTEN geni Ekson1 normalize denatürasyon HRM) eğrisi 36, 37 ve K-1 numaralı Mutasyonlu örnekler ve diğer örnekler

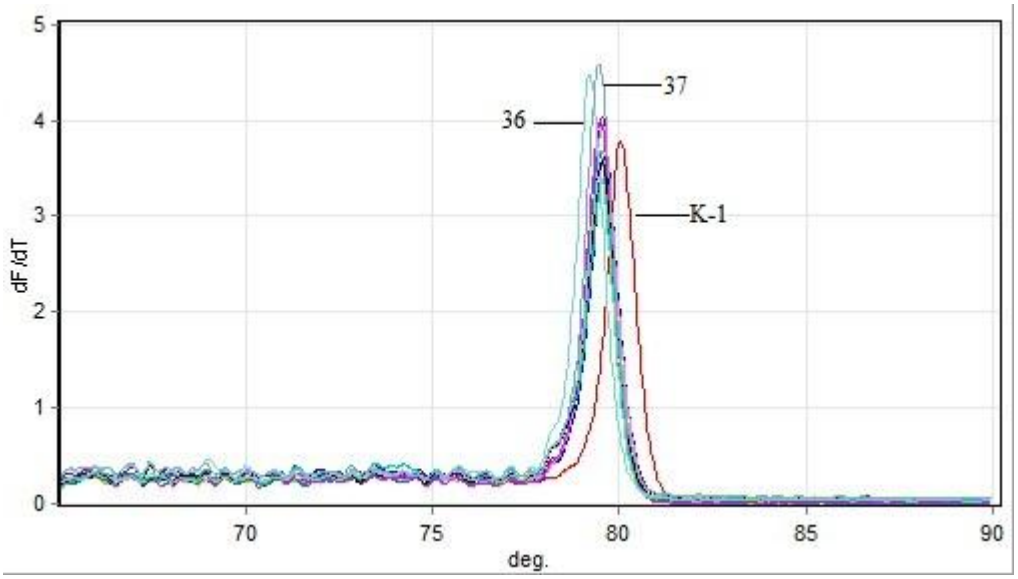


Şekil 4.9. PTEN geni Ekson2 normalize denatürasyon (HRM) eğrisi 36, 37 ve K-1 numaralı mutasyonlu örnekler ve diğer örnekler

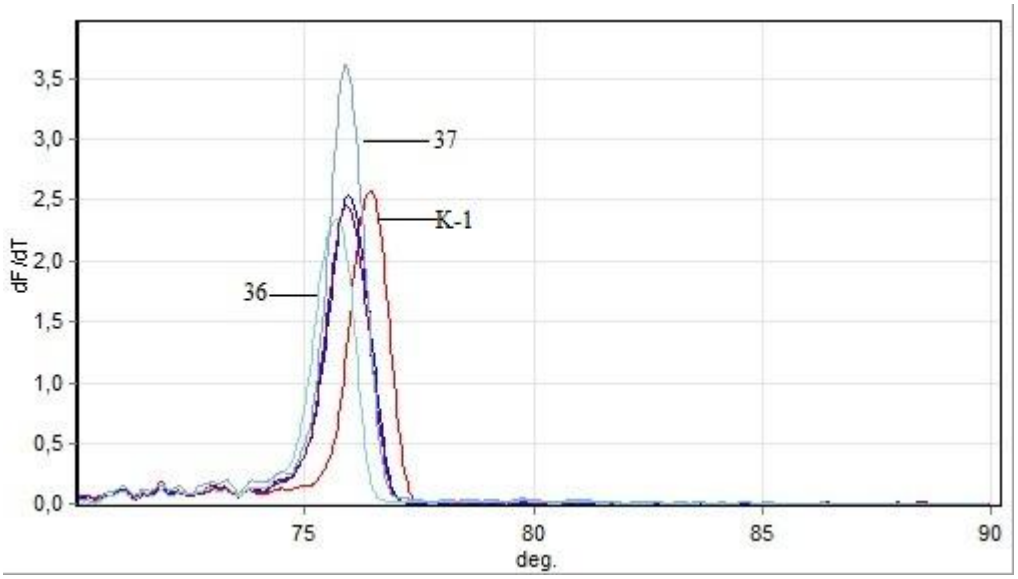
Artan sıcaklıkla meydana gelen floresan sinyali değişimlerinin tepe noktası (peak) olarak ifade edildiği eğrilere "türev eğri" denir. Türev eğride, y eksenine çizilen floresanın sıcaklık türevi (–dF/dT) ile x ekseninde sıcaklık derecesi yer almaktadır (Kuzpınar, 2007). Mutasyonlu örneklerin Tm dereceleri normal örneklerden farklı olduğu için eğrilerde kayma ve farklılıklar gözlenmektedir.



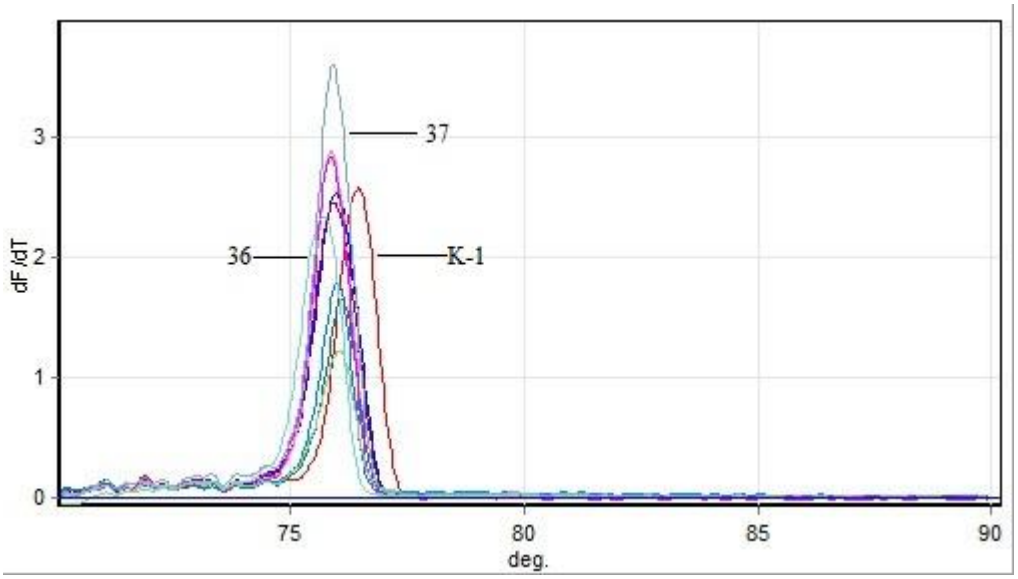
Şekil 4.10. PTEN geni Ekson1 türev eğrisi (Melting Curve) 36, 37 ve K-1 numaralı mutasyonlu örnekler ve kontrol kanları



Şekil 4.11. PTEN geni Ekson1 Türev Eğrisi (Melting Curve) 36, 37 ve K-1 numaralı mutasyonlu örnekler ve diğer örnekler



Şekil 4.12. PTEN geni Ekson2 türev (melting curve) eğrisi 36, 37 ve K-1 numaralı mutasyonlu örnekler ve kontrol kanları



Şekil 4.13. PTEN geni Ekson2 türev (melting curve) eğrisi 36, 37 ve K-1 numaralı mutasyonlu örnekler ve diğer örnekler

Özet olarak; Homozigot mutasyonlar kontrollere yakın bir eğriye sahiptir. Heterozigot mutasyonlu örnekler kontrolden çok farklı bir eğrisi vardır (Krypuy ve ark., 2006). Çalışmamızda; "Rotor-Gene Series software 2.0.2" programında prostat kanserli olarak tanımlanan örnekler ile kontrol kanlarının Ct değerleri dikkate alınarak, normalize ve türev denatürasyon eğrileri tek tek incelenerek yorumlanmıştır. Bu inceleme sonucunda 36, 37 ve K-1 numaralı örneklerinin mutasyon tiplerini değerlendirdiğimizde; 36 ve 37 numaralı örneklerde homozigot mutasyon olduğu, K-1 numaralı örnekte ise heterozigot mutasyon olduğu, Tm derecelerine, eğri şekillerine bakılarak saptanmıştır. K-1 numaralı örneğin sağlıklı olarak değerlendirmesinin olası nedeni heterozigot mutasyona yani tek bir allel de mutasyon yani taşıyıcı özellikte olmasından kaynaklanabilir.

2001 yılında insan genom projesinin tamamlanmasından sonra birbirinden farklı bireylerin genomları arasındaki benzerliğin %99'dan fazla olduğu anlaşılmıştır (Venter ve ark., 2001; Sachidanandam ve ark., 2001). Bu farklılık genom içersinde kodlanan ve kodlanmayan bölgelere dağılmış yaklaşık 4,5 milyon tek nükleotid polimorfizimden (Single Nucleotide Polymorphism = SNP) kaynaklanmaktadır. Ayrıca bu farklılıklar insanların birçok yönden farklı özelliklere sahip benzersiz bireyler olmasında belirleyici rol oynamaktadır. Bunun yanında yine bu farklılıklar, hastalıklara yatkınlık derecesi, ilaçlara veya tedaviye olası yanıt ve bilinen mutasyonlar ile etkileşim gibi birçok hayati faktör üzerinde etkilidir. Fakat olası birçok farklı tek nükleotid polimorfizim içerisinden

hangisinin ilgili hastalık ile ilişki içersinde olabileceğinin belirlenmesi yapılan tüm bu çalışmalardaki en büyük güçlüğü meydana getirmektedir (Gareth ve ark., 2005).

Kanser araştırmaları alanındaki geçen 30 yıl, tümör baskılayıcı ve onkojen genlerin kimliklendirilmesine ve ayrıca onların bulunduğu sinyal aktarım yollarının tarif edilmesine izin vermiştir. Bu sinyal aktarım yollarındaki seçilmiş genler farklı kanserlerde sıklıkla kalıtsal ve somatik olarak mutasyonlar bulundurmaktadır. Bu mutasyonlar hücrelerin homeostatik mekanizmasını değiştirmekte ve uygun olmayan hücre bölünmesine izin vermektedir. Bunun yanında bu mutasyonlar programlı hücre ölümünü (apopitozis) inhibe etmektedirler. Bu mutasyonlar aracılığı ile hangi sinyal iletim yolağının insan kanserlerinin oluşmasında rol oynadığı tanımlanmıştır. Bu sinyal yollarının kanser oluşumundaki fonksiyonlarını yapılan çalışmalar moleküler ve hücresel açıklamaları ile açıklamıştır. Bu yolaklardaki tek nükleotid polimorfizimlerinin kanserleşmiş hücrelerde sıklıkla değişmesi açık bir sonuca varmamızı sağlamaktadır. Bu tek nükleotid polimorfizimleri populasyondaki kanser sıklığının belirlenmesinde, bireylerin kansere yakalanma yaşında veya kanser tedavisine yanıtta iyi adaylar olabilir. Kanserleri etkileyen tek nükleotid polimorfizminlerini kimliklendirme, tek nükleotid polimorfizmi yolağı yaklaşımı olarak terimlendirilebilir (Arı, 2008).

İnsanlarda meydana gelen tek baz değişimleri sınıflandırıldığında; C/T ve G/A baz değişikliği görülme sıklığı % 64, C/A ve G/T baz değişikliği görülme sıklığı %20, C/G baz değişikliği görülme sıklığı %9 son olarak A/T baz değişikliği görülme sıklığı %7'dir (Reed ve ark., 2007). HRM analizinde; C/T ve G/A baz değişikliği ve C/A ve G/T baz değişikliği saptamak, C/G baz değişikliği ve A/T baz değişikliğini saptamaktan daha kolay olmaktadır. Çünkü bu baz değişiklikleri normalize eğride, mutasyonlu örnekler ile kontrol örnekleriyle karşılaştırıldığında açık bir şekilde farklı bir eğri gözlenmektedir ve Tm derecelerindeki sıcaklık farkları 0.5 dereceden fazla gözlenmektedir, ortalama sıcaklık farkı ise 1.0 derecedir (Appliedbiosystems, 2009).

C/G baz değişikliği bulunan mutasyonlu örnekler normalize eğride kontrol örnekleriyle karşılaştırıldığında eğrilerdeki farklılıklar küçük olmaktadır ve Tm derecesindeki sıcaklık farkları 0.2-0.5 derece arasında değişmektedir (Appliedbiosystems, 2009).

A/T baz değişikliği bulunan mutasyonlu örnekler normalize eğride kontrol örnekleriyle karşılaştırıldığında eğrilerdeki farklılıklar küçük olmaktadır ve Tm derecesindeki sıcaklık farkları 0.2 dereceden düşük olmaktadır (Appliedbiosystems, 2009).

PTEN kromozom 10q23.3 lokusunda lokalize bir tümör baskılayıcı gen olup, gen ürünü protein tirozin fosfataz ailesine üye bir proteindir (Li ve ark., 1997). PTEN hem protein, hem de lipid fosfataz özelliğine sahip bir dual fosfatazdır ve bir enzimatik fonksiyonu olduğu bilinen ilk tümör baskılayıcı moleküldür (Myers ve ark., 1997) PTEN, reseptör tirozin kinazlar tarafından hücre büyümesini ve çoğalmasını uyaran büyüme faktörleri ve sitokinler gibi ekstrasellüler moleküllerden aldıkları sinyalleri hücre içine ileten PI3K / Akt yolağında fonksiyon görmektedir. Büyüme faktörleri ile uyarılan PI3K, hücre membranına bağlı PIP2'leri fosforilleyerek PIP3'e dönüştürmektedir. PIP3 ise, bir onkoprotein olan Akt molekülünü aktive eden bir ikincil mesaj molekülüdür. Aktive olan Akt intrasitoplazmik pek çok kinazın, transkripsiyon faktörünün ve hücre siklus regülatörü molekülün fosforilasyonunu gerçekleştirerek hücreye gelen uyarıcı sinyallerin nukleusa iletilmesini sağlamaktadır. PTEN lipid fosfataz fonksiyonu ile lipid mediatör PIP3 molekülünü defosforile ederek inaktifleştirmektedir. PTEN' in tümör baskılayıcı özelliği bu lipid fosfataz fonksiyonundan gelmektedir. Hücre içi PTEN düzeyinin artması ve buna bağlı Akt inaktivasyonu hücre siklusunda G1 arresti ve apopitozise neden olur. PTEN fonksiyonu olmayan hücrelerde ise hücre proliferasyonu artmaktadır (Myers ve ark., 1998; Kır, 2007).

Yapılan çalışmaların çoğu göstermiştir ki genetik değişimlerin niceliği ve yapısı prostat kanserinin gelişmesine ve ilerlemesine neden olabilir. Bu genlerin tanımlanması prostat kanserinin ilerlemesini anlamak için önemli bir anahtar olacaktır. Bu genlerden en çok çalışılan PTEN geni olmuştur. Prostat kanserindeki PTEN mutasyonlarının sıklığıyla ilgili birçok çalışma arasında farklılıklar gözlenmiştir. Bunun muhtemel en önemli sebebi çalışılan popülasyonların farklı olmasıdır. Örneğin Gray ve ark. (1998)'nın 20 adet ilerlemiş prostat kanser dokusu, 17 adet primer prostat kanser dokusu; toplam 37 prostat kanser dokuyla yaptıkları çalışmada 5 adet tümörlü dokuda PTEN mutasyonu görülmüş ve bu 5 doku örneğinin 4 tanesinin ilerlemiş kanser dokusu olduğu görülmüştür.

PTEN ekspresyon kaybı genellikle yüksek Gleason skoru ve artmış rekürrens oranıyla paralellik göstermektedir (McMenamin ve ark.,1999; Halvorsen ve ark., 2003). Primer ve erken evre tümörlerde PTEN ekspresyon kaybı metastatik hastalığa göre belirgin oranda daha düşüktür. Bu da PTEN' in prostat kanserinin progresyonunda önemli olduğunu düşündürmektedir (Whang, 1998). Dong ve arkadaşları (1998); gleason skoru 8-10 arasında değişen 32 prostat kanserli dokuyla yaptıkları çalışmada 5

örnekte PTEN mutasyonu görülmüştür. McMenamin ve arkadaşları, çalışmalarında olguların %20'sinde PTEN ekspresyonunda total kayıp, %64.2'sinde ise parsiyel kayıp saptamışlardır ve ekspresyon kaybının yüksek Gleason skoru ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir.

Çalışmamızda kullanılan primer prostat kanserli hastalarının gleason skoru 5-8 arasında değişen 10 adet primer prostat kanserli doku kullanılmıştır. Bu 10 adet prostat kanserli dokuda 2 örneğin (36 ve 37 numaralı örnekler) gleason skoru sırasıyla 7 ve 8 dir. Çalışmamızda da yüksek gleason skorunun PTEN mutasyonu ile ilişkisi, literatürdeki çalışmalarla uyumlu olarak gözlenmektedir

Orikasa ve arkadaşlarının (1998), 45 adet primer prostat kanser dokusuyla yaptığı çalışmada 18 tümörlü dokunun 2'sinde PTEN lokusunda heterozigot kayıp olduğu gözlenmiş ancak herhangi bir örnekte mutasyon saptanmamıştır. Buda göstermiştir ki Japon halkında primer prostat kanserinde PTEN gen mutasyonları gözlenmemektedir. Buna karşılık Dong ve arkadaşlarının (1998), yaptığı çalışmada çeşitli metastazlı hastaların 19'unun 12 sinde (% 63) en az 1 metastaz bulunan prostat kanserli hastalarda PTEN genin en yaygın mutasyonlu gen olduğu gösterilmiştir. Pourmand ve arkadaşlarının (2007) yaptıkları çalışmada gleason skoru ve PSA değerleri bilinen ve 51 prostat kanserli dokunun 6 sında PTEN mutasyonu gözlenmiştir. SSCP yönteminin kullanıldığı bu çalışmada 6 adet PTEN mutasyonlu örneğin 5 tanesinin metastaz evresinde olduğu gözlenmiştir ve bu metastazlı hastalarında öldüğü bilgisi mevcuttur. Pourmand ve ark. yaptığı bu çalışmada İran popülasyonunda gleason skorunu; PTEN gen mutasyonu ve artan ölüm oranı ile ilişkili bulmuşlardır.

Wang ve arkadaşlarının (1998) prostat kanserli hastalarda homozigot delesyonları tanımlamak amacıyla yaptığı çalışmada, southern blot tekniğini kullanmışlardır. 60 adet primer prostat kanserli örneğin 8'inde homozigot delesyon tanımlamışlardır.

Baydar ve arkadaşlarının (2008), 69 Türk primer prostat karsinom olgusunda PTEN protein ekspresyonu ve ekspresyon değişiklilerinin önemini immünohistokimyasal yöntemler araştırmışlardır. Baydar ve ark. yaptığı bu çalışmada PTEN kaybının tümörlerde %49' unda saptamış ve PTEN protein seviye değişikliklerine Türk hastalardaki primer prostat kanserinde sık olarak rastlandığını ortaya koymuşlardır. Protein ekspresyonunda azalmanın kötü prognaza işaret eden belirleyici olma potansiyelinde olduğunu belirtmişlerdir.

Yaptığımız çalışma Baydar ve ark. yaptığı çalışmayı desteklemektedir. 10 adet primer prostat kanserli örnekte; 2 örneğin PTEN mutasyonuna sahip olduğu gözlemlenmiştir. PTEN genin mutasyonlu olduğu durumlarda; PTEN tümör baskılayıcı özelliğini gösterememektedir yani PTEN işlevini gerçekleştirememektedir. Çalışmamızda PTEN' in kötü prognoza işaret edip etmediği hakkında bir çalışma yapılmamıştır.

PTEN geni ile yapılan çalışmalarda odaklanılan bir nokta ise PTEN' in görevinin inaktivasyonundan kaynaklanan; delesyonlardır (Whang ve ark., 1998; Kwabi Addo ve ark., 2001). Son yıllardaki çalışmalarda PTEN lokuslarındaki 100 bp civarında genomik delesyonların da yaygın olarak Prostat kanserinde olduğu görülmüştür (Yoshimoto ve ark., 2006). Heterozigot delesyonlar da primer prostat kanserinde oldukça yaygındır (Yoshimoto ve ark., 2006, 2007, 2008). Yoshimoto ve arkadaşlarının (2007) yaptığı çalışmada primer prostatlı hastalarla yapılan çalışmalarda her 10 hastadan 1 inde PTEN' in işlevinin kaybettiği anlaşılmıştır. Metastatik süreç geçirildiğinde ise bu oranın %40 olduğu görülmüştür. Burdan anlayacağımız metastazla birlikte PTEN gen ekspresyonu azalmaktadır.

Bizim yaptığımız çalışmada ise delesyon saptamaya yönelik bir çalışma yapılmamıştır.

PTEN geni ile yapılan çalışmalarda özellikle endometrium, beyin, prostat, ovaryum kanserlerinde PTEN genin inaktif olduğu bulunmuştur (Cooney ve ark., 1999). Bir kaç çalışmada, PTEN geni endometrial kanserlerde mutasyonlu bulunmuştur. 6 farklı çalışmada endometrial kanserlerin %33-%55 oranında mutasyonlu olduğu gösterilmiştir (Ali ve ark., 1999)

Myriad genetiğin 2010 yılında yaptığı çalışmada; prostat bezinin bir kısmı yada tamamının alınmasından (prostatemik) sonra 5 yıl verileri takip edilen 132 hastadan alınmış prostat tümör dokuyla çalışılmıştır. PTEN protein ekspresyonu immunohistokimyasal yöntemi ile belirlenmiş ve bu hasta grubundaki prostat kanserinin biyokimyasal nüksü tahmin edilmiştir (p değeri= 0.0046). Ek olarak PTEN gen ve PTEN fonksiyon kaybı analizi tümör evresi belirlendikten sonra istatistiksel olarak anlamlı düzeyde hasta sağ kalım sonucu tahmin edilmiştir (p değeri= 0.009). Bu heyecan verici çalışmanın bulguları, prostat kanserinde PTEN genin rolünün önemini kanıtlamaktadır ve PTEN genin ekspresyonu prostat bezinin bir kısmı ya da tamamının alınmasından sonra prostat kanserinin nüks etmesi riski olan hastaların değerlendirmesinde klinik olarak kullanılabilir olduğu belirlenmiştir.

Çalışmamızın histopatolojik sonuçlarına baktığımızda çalıştığımız prostat kanserli örneklerin primer prostat kanseri olduğu görülmektedir. Çalışmamızda metastaz evresine geçmiş bir örnek bulunmamaktadır. Metastatik sürecin PTEN mutasyonu üzerinde etkisi olup olmadığı araştırılmamıştır.

Carracedo ve arkadaşlarının (2011) yaptığı çalışmada tümörün ilerlemesinde ve gelişiminde PTEN seviyesindeki değişimler önemli rol oynarken aynı zamanda kanserin önlenmesi ve tedavisi içinde önemli rol oynadığını göstermişlerdir. Tan ve arkadaşlarının (2012) çeşitli kanser tipleriyle yaptıkları çalışmada PTEN mutasyonlu hastalarda yaşamları boyunca bu kansere yakalanma riskinin arttığını bulmuşlardır ve PTEN mutasyonu olan hastaların kapsamlı bir gözetime tabi tutulması gerektiğini söylemişlerdir. Li ve arkadaşlarının (2011) yaptığı çalışmada epitel HO-1 ekspresyonun ve PTEN delesyonlarının prostat kanserli hastalarla ilişkili olduğunu klinik ve deneysel olarak göstermişlerdir.

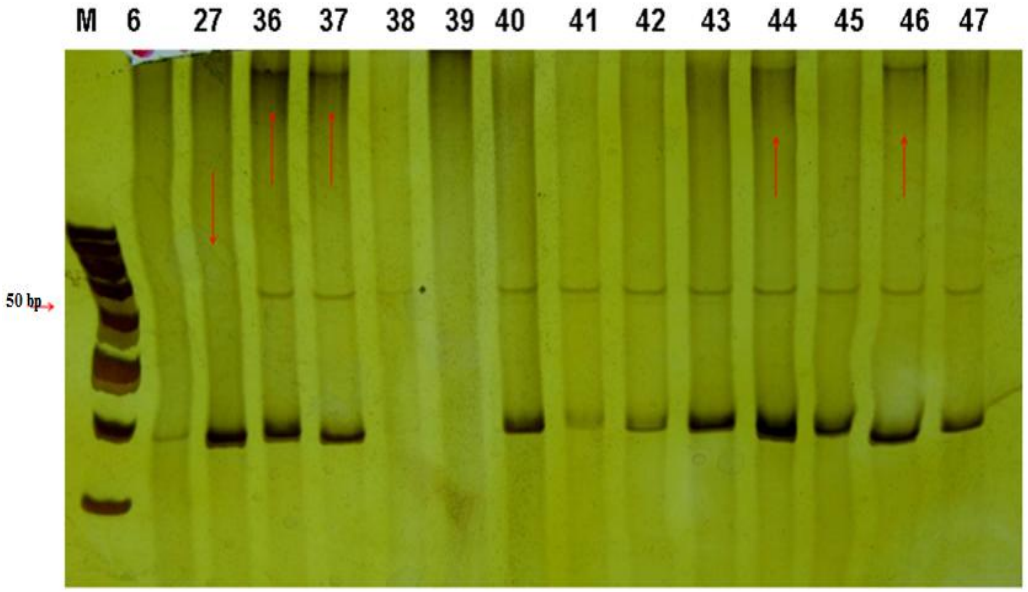
PTEN tümör baskılayıcı genin çeşitli kanser tiplerindeki rolü çalışmalar neticesinde açıkça ortaya koyulmuştur. Prostat kanseri ile PTEN geninin ilişkisi de bu zamana kadar yapılan çalışmalar ile ortaya çıkarılmıştır. Çalışmamızda, prostat kanserli hastalardaki PTEN mutasyonları yeni bir teknik olan HRM analizi ile belirlenmiş ve yapılan çalışmalarla uyumlu olarak PTEN mutasyonu ile prostat kanseri arasındaki ilişki gözlenmiştir.

SSCP işlemi ilgilendiğimiz DNA bölgesinde herhangi bir mutasyon olup olmadığını test etmeye yarayan güçlü tekniklerden biridir. SSCP yönteminde amplifiye edilen hedef DNA tek zincir haline getirilerek her bir tek zincirin, baz uzunluğu ve baz kompozisyonuna göre farklı ikincil yapı kazanması ve böylelikle poliakrilamit jel elektroforezinde farklı hızlarda yürümesi esasına dayanır. Tek zincir DNA çift zincir DNA'nın aksine esnek olup, baz kompozisyonuna göre molekül içi etkileşimlerle özgün bir yapı kazanır (Orita ve ark., 1989). Hedef DNA örneği tek bir baz bile değişiklik gösterse farklı ikincil yapı kazanacaktır ve jelde yürütüldüğünde hedef DNA sağlıklı kontrollerden farklı seviyede bant gösterecektir.

Daha önce laboratuarımızda prostat kanserli örneklerde SSCP yöntemi ile mutasyon tanımlamak için PTEN geni Ekson1 ve Ekson2 primeri kullanılarak araştırma yapılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda Ekson1de bir mutasyon saptanamazken, ekson2 de; 27, 36, 37, 44, 46 numaralı örneklerde mutasyon olduğu gözlemlenmiştir.

Mutasyon tanımlama için HRM yöntemi kullandığımız bu çalışmamıza baktığımızda; 27 numaralı örneğin çalışmadığı, 36 ve 37 numaralı örneklerin ise ekson1

ve ekson2 de HRM sonuçlarına göre mutasyonlu olduğu, 44 ve 46 numaralı örneklerin ise çalışmamıza dahil edilmediği görülmektedir.



Şekil 4.14. Prostat kanserli örneklerin PTEN geni Ekson2 ile amplifiye edilmiş SSCP görüntüsü

HRM analizi; basitliği ve kısaltılmış iş akışı haliyle SSCP gibi mutasyon tanımlama analizlerine göre üstün durumdadır. Yapılan çalışmalar göstermiştir ki HRM' in hassaslığı %100 ve seçiciliği ise %98.7'dir (Patel, 2009). SSCP analizinin hassaslığı; DNA konsantrasyonu, incelenen fragmentlerin uzunluğu, elektroforez ısısı, jel kompozisyonu, kullanılan tampon ve pH gibi birçok parametreden etkilenebilir (Gasser, 1997; Hongyo ve ark., 1993). Fragmentlerin boyu SSCP analizinin hassaslığı üzerinde en etkili faktörlerden birisidir. Bu teknik ile 100-200 bp'lik fragmentlerdeki mutasyonların belirlenme oranı %50- 95'tir. SSCP yönteminin düşük pH'de tamponlar kullanılması nedeniyle uzun fragmentlerin tercih edilememesi, mutasyonların % 10-20 tespit edilememesi, radyoaktif ve mutajen özellikli kimyasalların kullanılması mutasyonların saptanması için jel ya da matriks ayrımına gerek duyulması ve analiz süresinin en az 4-5 saat olması ve mutasyonu tanımlamak için dizi analizi gerektirmesi gibi çeşitli dezavantajları vardır. Yapılan son çalışmalar (Ujino-Ihara ve ark., 2010; Tricarico ve ark., 2011; Jas ve ark., 2012) HRM analizinin SSCP analizine olan üstünlüğünü göstermiştir. Bu çalışmalarla uyumlu olarak bizim çalışmamızda da SSCP yöntemi ile tanımlanamayan mutasyonlar HRM analizi ile tanımlanmıştır. HRM analizi ile mutasyon tarama yöntemi kısa bir sürede gerçekleşirken, SSCP yöntemi oldukça uzun bir zaman almıştır.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Patolojik çalışmalar sonucunda prostat kanserli olarak tanımlanmış 10 adet doku örneği ve sağlıklı olarak tanımlanmış 5 adet kan örneği kontrol olarak kullanılmış ayrıca pozitif kontrol için β-Aktin kullanılanarak Real-Time PZR cihazında HRM çalışması yapılmıştır. Çift zincirli DNA'ya bağlanma özelliğine sahip floresan boya olan EvaGreen varlığında PZR yapıldı ve yüksek çözünürlüklü DNA denatürasyon eğrileri elde edilmiştir.

Primer prostat kanserli Türk hastalarda PTEN gen mutasyonu (Ekson1 ve Ekson2) 2 adet prostat kanserli doku örneğinde görülmüştür. Ayrıca kontrol olarak kullandığımız, sağlıklı birey olarak tanımlanan 1 adet kan örneğinde ise PTEN gen mutasyonu görülmüştür.

Çalışmamızda pozitif kontrol olarak kullandığımız β-Aktin Real-Time PZR sonuçları ile nanodrop değerleri kantitatif olarak karşılaştırıldığında ise sonuçların birbiriyle uyuştuğu gözlenmiştir. 1 örnek dışında (27 numaralı örnek) bütün örneklerin düzgün çalıştığı gözlenmiştir. 27 numaralı örneğin DNA kalitesinin düşük olduğu nanodrop sonuçlarına göre de doğrulanmış yada reaksiyon tüpünde DNA bulunmadığı düşünülmektedir ve gleason skoru, 4'ün üstünde olduğu için (7) kanser olduğu muhtemeldir.

Heterozigot ve homozigot dizi farklılıkları normalize ve türev eğrilerin analiz edilmesiyle belirlenmiştir. Mutasyon taşıyan örnekler, normal örneklerden eğrilerin şekline ve durumuna göre ayırt edilmiştir.

Hastaların tanı anındaki PSA seviyeleri ile genotip arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Olgularımızın ulaşılan klinik verileri ile genotipler arasında herhangi bir ilişki olup olmadığını da istatistiksel olarak sorguladığımızda istatistiksel bir anlamlılık bulanamamıştır.

Daha önce laboratuarımızda prostat kanserli örneklerde SSCP yöntemi ile mutasyon tanımlamak için PTEN geni Ekson1 ve Ekson2 primerleri kullanarak yapılan çalışmayla HRM sonuçları karşılaştırılmıştır. SSCP çalışması sonucunda Ekson1 de mutasyon gözlenmezken Ekson2 de mutasyonlar gözlenmiştir. HRM analizi sonucunda ise her iki eksonda da mutasyonlar gözlenmiştir.

HRM tekniği, hasta bireylerde SNP mutasyonlarını tanımlamak ve sağlıklı kontrol örneklerinin kantitatif ve kalitatif analizlerinin tespit edilmesi için geleneksel ve jele dayalı yöntemlerden olan SSCP ve RFLP kıyasla daha etkili, spesifik, ekonomik ve kısa süren bir teknik olduğu araştırma da kanıtlanmıştır. HRM yöntemi, son yıllarda insanlarda hastalıklarla ilişkili olan genlerin tanımlanmasında ve gen haritalarının çıkartılarak genotip tayinlerinin yapılmasında da kullanılmaktadır.

5.2. Öneriler

β-Aktin, housekeeping gen sabit seviyeler de eksprese olmasına rağmen diğer housekeeping genler deneysel koşullara bağlı olarak değişkenlik gösterebilir. Yapılan çalışmamızda β- Aktin tutarlı housekeeping gen olduğu tanımlanmıştır. Çalışmalarda β-Aktin housekeeping geninin pozitif kontrol olarak kullanılması önerilmektedir.

HRM tekniğinin daha hassas daha etkin çalışmasından, çalışmaların kısa sürede tamamlanmasından, mutasyon tiplerinin denatürasyon eğrilene bakılarak saptanabilmesinden dolayı SSCP tekniği yerine; HRM tekniğinin mutasyon tarama çalışmalarında kullanılması önerilmektedir.

Yapılan çalışmalar da; prostat kanserinde PTEN genin rolünün önemi kanıtlanmaktadır. Türk hastalarda; PTEN genin prostat kanserinde ki öneminin ve işlevinin anlaşılması için daha geniş çalışmalarla metastaz durumuna geçmiş dokularda PTEN geninin ekspresyon ve mutasyon durumunun araştırılması ve buna bağlı olarak PTEN geninin genetik bir marker olarak Türk popülasyonunda kullanılıp kullanılmayacağı yönünde çalışmalar tetiklenmelidir.

KAYNAKLAR

Abate-Shen, C. ve Shen, M.M., 2000, Molecular genetics of prostate cancer, *Genes Dev.*, 2. 14 (19), 2410-34.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. ve Walter, P., 2002, *Molecular Biology of the Cell,* The structure and function of DNA, Bölüm 4, *Garland Science.* USA.

Ali, I.U., Schriml, L.M., Dean, M., 1999, Mutational Spectra of PTEN/MMAC1 Gene: a Tumor Suppressor With Lipid Phosphatase Activity, *Journal of the National Cancer Institute*, 91 (22), 1922-1932.

American Cancer Society, 2008, Cancer Facts & Figures, Atlanta: American Cancer society.

Appliedbiosystems, 2009, A guide to high resolution melting (HRM) analysis, http://www.appliedbiosystems.com/

Arı, B., 2008, P53 Yolağında Yer Alan Mdm2 Ve P53 Genlerinde Görülen Tek Nükleotid Polimorfizimlerinin Meme Kanserli Hastalarda Araştırılması, Yüksek lisans tezi *, Fen Bilimleri Enstitüsü*, Adana.

Barker, R., 1971, Organic Chemistry of Biological Compounds Foundations of Modern Biochemistry Series., *The polynucleotides and nucleic acids*, 309-339.

Başaran, N., 1999, Tıbbi genetik. 7. baskı, *Nobel*, Eskişehir.

Baydar, D.E., Özen, H., Saraçbaşı, O., Karabulut, E., 2008, PTEN Expression in Primary Prostate Carcinoma in Turkish Patients, *Turk J Med S*ci ., 38(5), 387-397

Benjamin, L., 1997, Genes, Bölüm 5: Nucleic acid structure, *Oxford University Press.*,New york.

Bismar, T.A., Trpkov, K., 2010, TMPRSS2-ERG gene fusion in transition zone prostate cancer, *Mod Pathol*., 23(7), 1040-1.

Bozkaya, Ö.G., 2008, Pediatrik Genetik , *Deü Tıp Fakültesi Dergisi* , 22(3), 171 - 179.

Breslauer, KJ., Frank, R., Blocker, H., Marky, LA., 1986, Predicting DNA duplex stability from the base sequence, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* 83(11), 3746-3750.

Bustin, S.A., 2000, Absolute quantification of mRNA using realtime reverse transcription polymerase chain reaction assays, *J Mol Endocrinol*, 25, 169-93.

Carracedo, A., Alimonti, A., Pandolfi, P.P., 2011, PTEN Level in Tumor Suppression: How Much Is Too Little?, *Cancer Research*, 71, 629-633.

Chang, F., Lee, J.T., Navolanic, P.M., ve ark., 2003, Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: A target for cancer chemotherapy, *Leukemia*, 17, 590-603.

Coley, C.M. ve ark., 1997, Early detection of prostate cancer. Part I: Prior probability and effectiveness of tests, *Ann Intern Med*., 126(5), 394-406.

Cooney, K.A., Tsou, H.C., Petty, E.M. ve ark., 1999, Absence of PTEN germ-line mutations in men with a potential inherited predisposition to prostate cancer, *Clin Cancer Res*. 1(5), 1387-91.

Cosa, G., Focsaneanu, K.S., McLean, J.R.N., McNamee, J.P., Scaiano, J.C., 2001, Photophysical properties of fluorescent DNAdyes bound to Single- and double-stranded DNA in aqueous buffered solution, *Photochemistry and Photobiology*, 73(6), 585–599.

Davies, M.A., Koul, D., Dhesi, H., Berman, R., McDonnell, T.J., McConkey, D., Yung, W.K.A., Steck, P.A., 1999, Regulation of Akt/PKB activity, cellular growth, and apoptosis in prostate carcinoma cells by MMAC/PTEN, *Cancer Res*., 59, 2551–2556.

De Belle, I., Huang, R.P., Fan, Y., Liu, C., Mercola, D., Adamson, E.D., 1999, p53 and Egr-1 additively suppress transformed growth in HT1080 cells but Egr-1 counteracts p53-dependent apoptosis, *Oncogen*e, 18, 3633–3642.

Demirkazık, A., Özal, G., 2010, Prostat kanserinde hedefe yönelik tedavinin yeri, *Üroonkoloji Bülteni*, 2. sayı.

Do, L.V. ve ark., 2002, Postoperative radiotherapy for carcinoma of the prostate: Impact on both local control and distant disease-free survival, *Am J Clin Oncol*, 25(1), 1-8.

Doğan, A.L., Güç, D., 2004, Sinyal iletim mekanizmaları ve kanser, *Hacettepe tıp dergisi*, 35, 34-42.

Dong, J.T., Sipe, T.W., Hyytinen, E.R., Li, C.L., Heise, C., McClintock, D.E., Grant, C.D, Chung, L.W.K., Frierson H.F.J., 1998, PTEN/MMAC1 is infrequently mutated in pT2 and pT3 carcinomas of the prostate, *Oncogene*, 17, 1979- 1982.

During, O., Martinez-Maza, O., Berek, J.S., 2007, Moleculer bıology and Genetics in Berek & Novak's Gynecology, Ed. Berek J.S. Philadelphia, USA, 129-157.

Eischen, C.M., Weber, J.D., Roussel, M.F., Cleveland, J.L., 1999, Distruption of the afrmdm2-p53 Tumor Suppressor Pathway in *myc*-induced Lymphomagenesis, *Genes and Developments*, 13, 2658-2669.

Ekmekçi, A., Erbaş, D., 1991, Kanser ve Onkogenler, Kanserin Moleküler Mekanizması Onkogenler ve Büyüme Faktörleri, *72 TDFO Tesisleri*, Ankara, 1-19, 44-104.

Engelman, J.A., 2009, Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations, *Clin Sci.*,117, 209-28.

Epstein, J., 2005, The Lower Urinary Tract and Male Genital System, In: Kumar V, Abbas A, Fausto N. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, *Elsevier Saunders Com*pany, 1023-1058

Erçal, D., 2008, Prenatal Tanıda Genetik, *Güncel pediatri dergisi*, 6, 47-50.

Estein, J., 2004, The prostate and seminal vesicles. Carter D, Reuter V, Greenson J,Stoler M, Oberman H. Stenberg's diagnostic surgical pathology, *Lippincott Williams & Wilkins*, 2, 2083-2132.

Ferlay, J., Bray, F., Pisani, P. ve ark., 2004, GLOBOCAN 2002: Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide, IARC Cancer Base No. 5. sürüm 2.0.

Ferlay, J., Autier, P., Boniol, M., ve ark., 2007, Avrupada Kanser Vakaları ve Ölümler, *Ann Oncol*, 16, 481-488.

Franke,T.F., 2008, PI3-K/Akt getting it right matters, *Oncogene*, 27, 6473-6488.

Garcia-Olmo, D.C., Gutierrez-Gonzalez, L., Samos, J., Picazo, M.G., Atienzar, M., Garcia-Olmo,D., 2006, Surgery and hematogenous dissemination: comparison between the detection of circulating tumor cells and of tumor dna in plasma before and after tumor resection in rats., *Ann Surg Oncol*., 13(8), 1136-44.

Gareth, L.B., Wenweı. HU., Arnold. L., 2005, A Single Nucleotide Polymorphism in the MDM2 Gene: From a Molecular and Cellular Explanation to Clinical Effect ,*Cancer Research*, 1;65(13), 5481-4.

Gasser, R.B., 1997, Mutation scaning methods for the analysis of parasite genes, *Int J Parasitol*., 27, 1449-1463.

Geering, B., Cutillas, P.R., Nock, G., Gharbi, S.I., Vanaesebroeck, B., 2007, Class IA phosphoinositide 3-kinases are obligate p85-p110 heterodimers, *PNAS*, 104(19), 7809-7814.

Ghosh, M.P., 2011, What controls PTEN and what it controls (in prostate cancer), *Asian Journal of Andrology*, 1–2.

Gibson, U.E., Heid, C.A., Williams, P.M., 1996, A novel method for real time quantitative RT-PCR, *Genome Res*., 6, 995-1001.

Glare, E. M., Divjak, M., Bailey, M. J., Walters, E. H., 2002, β-Actin and GAPDH housekeeping gene expression in asthmatic airways is variable and not suitable for normalising mRNA levels, *Thorax*, 57, 765–770.

Gleason, D.F., 1992, Histologic grading of prostate cancer: a perspective, *Hum Pathol.*, 23(3), 273-9.

Gray, I.C., Stewart, L.M., Phillip, S.M., et al., 1998, Mutation and expression analysis of the putative prostate tumoursuppressor gene PTEN, *Br J Cancer*, 78, 1296-300.

Grönberg, H., 2003, Prostate cancer epidemiology, *The Lancet*, 361, 859-64.

Gundry, C.N., Bernard, P.S., Herrmann, M.G., Reed, G.H. ve Wittwer, C.T., 1999, Rapid F508del and F508C assay using fluorescent hybridization probes, *Genetic Testing*, 3, 365–370.

Gül, D.K, 2008, Endometrium Patolojilerinde PTEN Tümör Supresör Gen Mutasyonunun Önemi, Uzmanlık tezi, *İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı.*

Güneş, S., Bağcı, H., Sarıkaya Ş., 2003, Prostat kanser genetiği, *O.M.Ü Tıp Dergisi,* 20(3), 152-158.

Halvorsen, O.J., Haukaas, S.A., Akslen, L.A., 2003, Combined loss of PTEN and p27 expression is associated with tumor cell proliferation by Ki-67 and increased risk of recurrent disease in localized prostate cancer, *Clin. Cancer Res*., 9, 1474–1479.

Hanahan, D., ve Weinberg, R.A., 2000, The hallmarks of cancer, *Cell*, 100, 57-70.

Herrmann, M.G., Durtschi, J.D., Bromley, L.K., Wittwer, C.T. ve Voelkerding, K.V. 2006, Amplicon DNA melting analysis for mutation scanning and genotyping: cross-platform comparison of instruments and dyes, *Clinical Che*mistry, 52, 494-503.

Hongyo, T., Buzard, G.S., Calvert, R.J., Weghorst, C.M., 1993, Cold SSCP: a simple, rapid and non-radyoactive method for optimized single strand conformation polymorphism analyses, *Nucleic Acid Research*, 21, 3637-3642.

Horowitz, J., 1999, Adenovirus-mediated p53 gene therapy: overview of preclinical studies and potential clinical applications, *Curr Opin Mol Ther.*, 1(4), 500-9.

Huang, R.P., Fan, Y., Peng, A., Zeng, Z.L., Reed, J.C, Adamson E.D., Boynton A.L., 1998,Suppression of human fibrosarcoma cell growth by transcription factor, Egr-1, involves down-regulation of Bcl-2, *Int J Cancer*, 77, 880–886.

Ihle, N.T., Powis, G., 2009, Take your PIK: phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors race through the clinic and toward cancer therapy, *Mol cancer ther*, 8(1), 1-6.

İnan, S., Özbilgin, K., 2008, Kök Hücre Biyolojisi, *Sağlıkta Birikim*, 1, 5.

Jas, R.M., Vasudevan, R.,Ismail, P., Gafor, A.H., Moin, S., Eshkoor, S.A., 2012, Amplification of real-time high resolution melting analysis PCR method for polycystic kidney disease (PKD) gene mutations in autosomal dominant polycystic kidney disease patients, *African Journal of Biotechnology*, 11(25), 6750-6757.

Kır, C., 2007, İntraduktal ve invaziv duktal meme karsinomlarında pten, survivin ekspresyonu ve apopitozisle ilişkisi, Uzmanlık tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi rektörlüğü tıp fakültesi patoloji anabilim dalı.

Klotz, L., 2000, Intraoperative cavernous nerve stimulation during nerve sparing radical prostatectomy: how and when?, *Curr Opin Urol*., 10(3), 239- 43.

Krones-Herzig, A. ve ark., 2005, Early Growth Response 1 Acts as a Tumor Suppressor In vivo and In vitro via Regulation of p53, *Cancer Res.*, 65, 5133.

Krypuy, M., Newnham, G.M., Thomas, D.M., Conron, M., Dobrovic, A., 2006, High resolution melting analysis for the rapid and sensitive detection of mutations in clinical samples: *KRAS* codon 12 and 13 mutations in non-small cell lung cancer, *BMC Cancer*, 6, 295.

Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K.,ve ark., 2006, The real-time polymerase chain reaction, *Mol Aspects Med*., 27, 95-125.

Kuş, Ç., 2010, Nöroblastomalarda Pı3-K Sağkalım Sinyal İletimini Değiştirerek Oluşan Apoptozis Sensitizasyonu, *Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Adana.

Kuzpınar, A., 2007, Hıgh resolutıon meltıng curve (hrm) analiz yönteminin delesyon tipi mutasyonların saptanmasında kullanımı, Yüksek Lisans Tezi, *Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Ankara.

Kwabi-Addo, B., Giri, D., Schmidt, K., Podsypanina, K., Parsons, R. , Greenberg, N., Ittmann, M., 2001, Haploinsufficiency of the Pten tumor suppressor gene promotes prostate cancer progression, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(20), 11563-8.

Lecanda, J., Parekh, T.V., Gama., P., Lin, K., Liarski, V., Uretsky, S., Mittal, K., Gold, L.I., 2007, Transforming growth factor-beta, estrogen, and progesterone converge on the regulation of p27Kip1 in the normal and malignant endometrium, *Cancer Res*., 67(3), 1007-18.

Lerman, L.S., Silverstein, K., 1987, Computational simulation of DNA melting and its application to denaturating gradient gel electrophoresis, *Methods in Enzymology*, 155, 482-01.

Letai, A.G., 2008, Diagnosing and exploiting cancer's addiction to blocks in apoptosis, *Nat.Rev Cancer*, 8, 121-132.

Levine, A.J., 1997, p53 the cellular gatekeeper for growth and division, *Cell*, 88(3), 323-31.

Li, J., Yen, C., Liaw, D., Podsypanina, K., Bose, S., Wang, S.I., Puc, J., Miliaresis, C., Rodgers, L., McCombie, R, Bigner, S.H., Giovanella, B.C., Ittmann, M., Tycko, B., Hibshoosh, H., Wigler, M.H., Parsons, R., 1997, PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer, *Science*, 275, 1943–1947.

Li, Y., Su, J., DingZhang, X., Zhang, J., Yoshimoto, M., Liu, S., Bijian, K., Gupta, A., Squire, J.A., Jamali M. A. A., Bismar, T.A,. 2011, *PTEN* deletion and heme oxygenase-1 overexpression cooperate in prostate cancer progression and are associated with adverse clinical outcome, *Journal of pathology*, 224, 90-100.

Lilja, H., Christensson, A., Dahlen, U. ve ark., 1991, Prostate-specific antigen in serum occurs predominantly in complex with alpha 1-antichymotrypsin, Cl*in Chem.*, 37 (9), 1618-25.

Liu, C., Yao, J., de Belle, I., Huang, R.P., Adamson, E.D., Mercola, D., 1999, The transcription factor EGR-1 suppresses transformation of human fibrosarcoma HT1080 cells by coordinated induction of transforming growth factor-beta 1, fibronectin, and plasminogen activator inhibitor-1, *J Biol Chem*., 274, 4400–4411.

Lobrich, M. ve Jeggo, P.A., 2007, The impact of a negligent G2/M checkpoint on genomic instability and cancer induction, *Nat Rev Cancer*, 7, 861-869.

Malumbres, M. ve Barbacid, M., 2001, To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer, *Nat Rev Cancer*, 1, 222-231.

Manning, B.D., Cantley, L.C., 2007, AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream, *Cell*, 129(7), 1261-74.

Mazeron, J.J., Graneli, C., Gerbaulet, A., Oral cavity. In Souhami, A.L., Tannock, I., Hohenberger, P., Horiot, J.C., (eds), 2002, *Oxford textbook of Oncology (2nd edition)*, Oxford-New York: Oxford University Press, 1091-408.

McCormick, F., 1999, Signalling networks that cause cancer, *Trends Cell Biol.*, 12, 53-6.

McMenamin, M.E., Soung, P., Perera, S., Kaplan, I., Loda, M., Sellers, W.R., 1999, Loss of PTEN expression in paraffin-embedded primary prostate cancer correlates with high Gleason score and advanced stage, *Cancer Res.*, 59, 4291–4296.

Mirmohammadsadegh, A., Marini, A., Nambiar, S., Hassan, M., Tannapfel, A., Ruzicka, T., Hengge, R., 2006, Epigenetic silencing of the PTEN gene in melanoma, *Cancer Res*., 66, 6546–6552.

Mohd, J.R., Vasudevan, R., Ismail, P., Halim, A., Gafor, A., Moin, S., and Eshkoor, S.A., 2012, Amplification of real-time high resolution melting analysis PCR method for polycystic kidney disease (PKD) gene mutations in autosomal dominant polycystic kidney disease patients, *African Journal of Biotechnology*, 11(25), 6750-6757.

Monis, P. T., Giglio, S. ve Saint, C. P., 2005, Comparison of SYTO9 and SYBR Green I for real-time polymerase chain reaction and investigation of the effect of dye concentration on amplification and DNA melting curve analysis, *Analytical Biochemistry*, 340 (1), 24- 34.

Montgomery, J., Wittwer, J.T., Palais, R., Zhou, R., 2007, Simultaneous mutation scanning and genotyping by high-resolution DNA melting analysis, *Nature Protocols*, 2 (1), 59-66.

Myers, M.P., Stolarov J.P., Eng C., Li J., Wang S., Wigler M., Parsons R.,mTonks R.K., 1997, PTEN, the tumor suppressor from human chromosome 10q23, is adual-specificity phosphatase, *Proc. Natl. Acad. Sci*., 94, 9052-9057.

Myers, MP., Pass, I., Batty, I.H., Van der, K.J., Stolarov, J.P., Brian, A., 1998, The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for its tumor supressor function, *Proc. Natl.Acad. Sci.*, 95, 13513-13518.

Myriad genetics, 2011, Myriad Study Shows PTEN Gene is Useful in Predicting Prostate Cancer Recurrence, http://investor.myriad.com, [Ziyaret tarihi: 4.21.2012]

Nakano, S., Fujimoto, M., Hara, H. ve Sugimoto, N., 1999, Nucleic acid duplex stability influence of base composition on cation effects, *Nucleic Acids Research*, 27, 2957-2965.

Nal, N., 2000, Ailesel Hiperkolesterolemili Hastalarda LDL Reseptör Geninin 3 Numaralı Ekzonundaki Mutasyonların SSCP Yöntemi ile Taranması, Akdeniz Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, Antalya.

Nicholson, K.M., Anderson, N.G., 2002, The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy, *Cellular Signalling*, 14, 381-95.

Nygren, J., Svanvik, N. ve Kubista, M., 1998, The interaction between the fluorescent dye thiazole orange and DNA, *Biopolymers*, 46, 39-51.

Obata, A.,ve ark., 2000, Clinical significance of p53 functional loss in squamous cell carcinoma of the oropharynx, *Int J Cancer*, 89(2), 187-93.

Orikasa, K., Fukushige, S., Hoshi, S., et al., 1998, Infrequent genetic alterations of the PTEN gene in Japanese patients with sporadic prostate cancer, *J Hum Genet*., 43:228-30.

Orita H., Suziki Y., Sekiya T., 1989, Rapid and sensitive detection point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction, *Genomics*, 5, 874-79.

Orita, M., Iwahana, H., Kanazana, H., Hayashi, K., Sekiya, T., 1989, Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms, *Proc Natl Acad Sci*., 86, 2766-70.

Özgül, R.K., 1998, Kalıtsal Hastalıklarda SSCP ve HA teknikleri ile Mutasyonların Hızlı Taranması, Bilim Uzmanlığı Tezi.

Parker, S.L., Tong, T., Bolden, S., Wingo, P.A., 1997, Cancer statistics, *Cancer J Clin*., 49, 5-27.

Parton, M., Dowsett, M., Smith, I., 2001, Studies of apoptosis in breast cancer, *BMJ*, 322, 1528-1532.

Patel, W., 2009, High resolution melt analysis applications, *Genetic Engineering& Biotechnology News*, 29,18.

Pourmand, G., Ziaee, A.A., Abedi, A.R., Mehrsai, A., Alavi, H. A., Ahmadi, A., Saadati, H.R., 2007, Role of *PTEN* gene in progression of prostate cancer, *Urological Oncology***,** 4, 95-100.

Priulla, M., Calastretti, A, Bruno, P, Azzariti, A., Paradiso, A., Canti, G., Nicolin, A., 2007, Preferential chemosensitization of PTEN-mutated prostate cells by silencing the Akt kinase., *Prostate*, 67, 782–789.

Razlutskii, I.V., Shlyakhtenko, L.S., ve Lyubchenko, Y.L., 1987, The effect of nucleotide substitution on DNA denaturation profiles, *Nucleic Acids Research.*, 15(16), 6665-6676.

Reed, G.H., Kent, J.O., Wittwer C.T., 2007, High resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics, *Pharmacogenomics*, 8(6), 597-608.

Reiter, R.E. ve Kernion J.B. 2002, Epidemiology, Etiology, and Prevention of Prostate Cancer. In: Walsh P, Retik A, Vaughan E, Wein A. Campbell's Urology, 4, 3003-3024.

Ririe, K.M., Rasmussen, R.P. ve Wittwer, C.T., 1997, Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction, *Analytical Biochemistry*, 245, 154-160.

Rosai, J., 2004, Male Reproductive system, *Rosai and Ackerman's Surgical Pathology*, 1, 1361-1411.

Ruano, G. ve Kidd, K.K., 1992, Modeling of heteroduplex formation during PCR from mixtures of DNA templates, *PCR Methods and Applications*, 2, 112-116.

Sachıdanandam, R., Weıssman, D., Schmıdt, Sc., Kakol, Jm,. Steın, L, D., Marth, G,. Sherry. S., Mullıkın, J, C., Mortımore, B, J., Wılley, D, L., Hunt. S. E., Cole, C, G., Coggıll, P, C., Rıce, C, M., Nıng, Z., Rogers, J., Bentley, D, R., Kwok, P, Y., Mardıs, E, R., Yeh, R, T., Schultz, B., Cook, L., Davenport, R., Dante, M., Fulton, L., Hıllıer, L., Waterston, R, H., Mcpherson, J, D., Gılman, B., Schaffner, S., Van, Etten, W, J., Reıch, D., Hıggıns, J., Daly, M, J., Blumenstıel, B., Baldwın, J., Stange-Thomann, N., Zody, M, C., Lınton, L., Lander, E, S., Altshuler, D, 2001, International SNP Map Working Group. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms, *Nature*, 409, 928–33.

Santalucia, J. Jr. ve Hicks, D., 2004, The thermodynamics of DNA structural motifs, *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 33, 415-440.

Sartelet, H., Vassal, G., Oligny, L.L., 2008, Akt pathway in neuroblastoma and its theraupeutic implication, *Expert reviews*, 8(5), 757-69.

Sekulic, A., Hudson, C.C., Homme, J.L., et al., 2000, Direct linkage between the phosphoinositide 3 kinase-AKT signaling pathway and the mammalian target of rapamycin in mitogen stimulated and transformed cells, *Cancer Res.*, 60, 3504-13.

Sinici, İ., Özkara, H.A., 2001, SSCP Analizinde Çift İplikli DNA Polimorfizmi, *Türk Biyokimya Dergisi*, 26, 135-42.

Sircar, K.,et al., 2009, PTEN genomic deletion is associated with p-Akt and AR signalling in poorer outcome, hormone refractory prostate cancer, *The Journal of Patholog*y, 218, 505-513.

Smith, M.R., ve ark., 2002, Changes in body composition during androgen deprivation therapy for prostate cancer, *J Clin Endocrinol Metab*., 87(2), 599-603.

Soyöz, M., 2008, Osteoartrit tanısı konmuş hasta bireylerde *smad3* gen mutasyonlarının analizi, Doktora tezi, *Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü,* Isparta, 1-97.

Stein, J.P., Lieskovsky, G., Cote, R., Groshen, S., Feng, A.C., Boyd, S., Skinner, E., Bochner, B., Thangathurai, D., Mikhail, M., Raghavan, D., Skinner, D.G., 2001, Radical cystectomy in the treatment of invasive bladder cancer: long-term results in 1,054 patients, *J Clin Oncol*, 19, 666–675.

Şanlıoğlu A.D., 2005, İleri evre prostat kanseri hücre hatlarında *Traıl*'a dirençlilik Mekanizmalarının Araştırılması, Doktora Tezi, *Sağlık Bilimleri Enstitüsü,*Antalya, 1-80.

Tan, M.H. , Mester J.L., Ngeow, J., Rybicki, L.A. , Orloff, M.S., Eng, C., 2011, Lifetime Cancer Risks in Individuals with Germline *PTEN* Mutations, *Clin. Can. Res*., 18, 400.

Tricarico, R., Crucianelli F., Alvau, A., Orlando, C., Sestini, R., Tonelli, F., Valanzano, R., and Genuardi, M., 2011, High resolution melting analysis for a rapid identification of heterozygous and homozygous sequence changes in the MUTYH gene, *BMC Cancer*, 11(305), 1-9.

Ujino-Ihara, T., Taguchi, Y., Moriguchi, Y., Tsumura Y., 2010, An efficient method for developing SNP markers based on EST data combined with high resolution melting (HRM) analysis, *BMC Research Notes*, 3(51), 1-5.

Ulukaya, E., 2012, Kanser Tedavisinde Kök Hücre Kavramı, *4.tıbbi onkoloji kongresi* , Antalya, 56.

Vara, J.A., Casado, E., de Castro, J., Cejas, P., Belda-Iniesta, C., Gonzalez-Baron, M., 2004, PI3K/Akt signalling pathway and cancer, *Cancer Treat Rev.*, 30193–204.

Venter, J, C., Adams, M, D., Myers, E, W., 2001, The sequenceof the human genome, *Science*, 291, 1304–51.

Virolle, T., Adamson, E.D., Baron, V., Birle, D., Mercola, D., Mustelin, T., de Belle, I., 2001, The Egr-1 transcription factor directly activates PTEN during irradiation-induced signalling, *Nat Cell Biol*, 3, 1124–1128.

Vogt, P.K., 2001, PI3-kinase, mTOR, protein synthesis and cancer, *Trends Mol Med*., 7, 482-4.

Wada, A., Yabuki, S. ve Husimi, Y., 1980, Fine structure in the thermal denaturation of DNA: High temperature-resolution spectrophotometric studies, *CRC Critical Reviews in Biochemistry*, 9, 87-144.

Wagener, C., Molecular oncology: prospects for cancer diagnosis and therapy, www.roche.com/pages/downloads/company/pdf/rtpenzberg01e.pdf, [Ziyaret tarihi: 12.01.2012]

Wang, J.Z., Li, X.A., 2003, Evaluation of external beam radiotherapy and brachytherapy for localized prostate cancer using equivalent uniform dose, *Med. Phys*., 30, 34.

Wang, S.I, Parsons, R., Ittmann, M., 1998, Homozygous deletion of the PTEN tumor suppressor gene in a subset of prostate adenocarcinomas, *Clin Cancer Res*, 4, 811-815.

Weissleder, R., ve Pittet, J.M., 2008, Imaging in the era of molecular oncology, *Natıonal Instıtutes Health*, 452(7187), 580–589.

Whang, Y. E. et al., 1998, Inactivation of the tumor suppressor PTEN/MMAC1 in advanced human prostate cancer through loss of expression, *Proc Natl Acad Sci*, 95(9), 5246–5250.

Whang, Y.E., Wu, X., Suzuki, H., Reiter, R.E., Tran, C., Vessella, R.L., Said, J.W.,Isaacs W.B, Sawyers C.L, 1998, Inactivation of the tumor suppressor PTEN/MMAC1 in advanced human prostate cancer through loss of expression, *Proceedings of theNational Academy of Sciences*, 95, 5246-5250,.

White M.B., Carvalho M., Derse D.,1992, Detecting single base substitions as heteroduplex polymorphisms, *Genomic*s, 12, 301-6.

White, H. ve Potts, G., 2006, Mutation scanning by high resolution melt analysis. Evaluation of RotorGene ™ 6000 (Corbett Life Science), HR1 ™ and 384 well LightScanner™ (Idaho Technology*)*. (Rapor No: NGRLW_HRM_1.0). United Kingdom, National Genetics Reference Laboratory (Wessex).

Wittwer, C.T., Herrmann, M.G., Gundry, C.N. ve Elenitoba-Johnson K.S.J. ,2001, Real-time multiplex PCR assays, *Methods*, 25, 430- 442.

Wittwer, C.T., Reed, G.H., Gundry, C.N., Vandersteen, J.G. ve Pryor, R.J., 2003, High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen, *Clinical Chemistry*, 49, 853-860.

Yiğit, S., 2006, Bölgemizdeki Ailevi Akdeniz Ateşi (FMF) Hastalarında Mutasyon Noktalarının ARMS, RFLP ve Strip Yöntemiyle Taranması, Doktora Tezi, *Ondokuz Mayıs Üniversitesi,* Samsun.

Yoshimoto, M., Cunha, I.W., Coudry, R.A., Fonseca, F.P., Torres, C.H., Soares, F.A., Squire, J.A., 2007, FISH analysis of 107 prostate cancers shows that *PTEN* genomic deletion is associated with poor clinical outcome, *British Journal of Cancer*, 97(5), 678-85.

Yoshimoto, M., Cunha, IW, Coudry, R.A., Joshua, A., Fonseca, F.P., Zielenska, M., Soares, F.A., Squire, J.A., 2008, Absence of *TMPRSS2*:*ERG* fusions and *PTEN* losses identifies prostate cancer genomic grade with favorable outcome, *Modern Pathology*, 21(12), 1451-60.

Yoshimoto, M., Cutz, J.C., Nuin, P.A.S., Joshua, A.M., Bayani, J., Evans, A.J., Zielenska, M., Squire, J.A., 2006, Interphase FISH Analysis of *PTEN* in Histologic Sections Shows Genomic Deletions are Present in 68% of Primary Prostate Cancer and 23% of High-Grade Prostatic Intra-Epithelial Neoplasias, *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 169,128-37.

Yuan, T.L., Cantley, L.C., 2008, PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme, *Oncogene*, 27, 54971–5510.

Zeimet, A.G., Riha, K., Berger, J., Widschwendter, M., Hermann, M., Daxenbichler, G., Marth, C., 2000, New insights into p53 regulation and gene therapy for cancer, *Biochem. Pharmaco*, 60(8),1153-63.

Zhong, X.Y., Holzgreve W., 2001, Sinuhe Hahn Risk free simultaneous prenatal identification of fetal Rhesus D status and sex by multiplex real-time PCR using cell free fetal DNA in maternal plasma, *Swıss Med Wkly*,131,70–74.

Zhou, L., Wang, L., Palais, R., Pryor, R. ve Wittwer, C.T., 2005, High-resolution DNA melting analysis for simultaneous mutation scanning and genotyping in solution, *Clinical Chemistry*, 51(10), 1770-1177.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Meriç Tuğba AKGÜN
Uyruğu : T.C
Doğum Yeri ve Tarihi : Ankara-1988
Telefon : 05544063143
Faks :
e-mail : m.tugbaakgun@gmail.com

EĞİTİM

Derece		**Adı, İlçe, İl**	**Bitirme Yılı**
Lise	:	**Meram Konya Lisesi, Selçuklu, KONYA**	**2006**
Üniversite	:	**Selçuk Üniversitesi Biyoloji bölümü, Selçuklu, KONYA**	**2010**
Yüksek Lisans	:	**Selçuk Üniversitesi Biyoloji ABD, Selçuklu, KONYA**	**2012**
Doktora	:		

YABANCI DİLLER

İngilizce