

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GASTRİK KANSERLİ HASTALARDA
***PTEN* GENİ DEĞİŞİKLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Aysel KALAYCI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

Danışman
Doç. Dr. Tülin ÇORA

KONYA-2008

ÖNSÖZ

Tez çalışmam süresince desteklerini esirgemeyen başta tez danışmanım Doç.Dr. Tülin Çora'ya, tezimin her aşamasında bilgi ve deneyimleri ile bana destek olan, bölüm başkanımız sayın Prof.Dr. Hasan Acar'a ve Yard.Doç.Dr. Ercan Kurar'a, deney materyallerinin oluşturulması ve gerekli bilgilerin temininde yardımlarını aldığım Yard.Doç.Dr. Hatice Toy'a, eğitimim süresinde desteklerini her zaman yanımda hissettiğim F. Hümeysra Yerlikaya' ya ve aileme teşekkür ederim.

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Midenin bölümleri	3
Şekil 2. Midenin tabakaları	4
Şekil 3. Kanser oluşumunda genetik ve epigenetik değişikliklerin mekanizması.....	10
Şekil 4. Sporadik kanserlere neden olan tümör baskılayıcı gende normal bir hücrede mutasyon ve tümör oluşumu	11
Şekil 5. <i>PI3- Kinaz</i> aktivitesi ile <i>PIP-2</i> 'nin <i>PIP-3</i> ' e dönüşümü.....	13
Şekil 6. <i>AKT</i> protein kinazın aktivasyonu	14
Şekil 7. <i>PI3K/PTEN/AKT</i> yolağı	14
Şekil 8. <i>PTEN</i> geni ekzon 2'de SSCP tekniği sonrası farklı gözlenen bantların poliakrilamid jel fotoğrafı	25
Şekil 9.a. 401 C normal genotipli kontrol DNA' sı kullanılan bireye ait DNA dizi analizi grafiği	26
Şekil 9. b. 401 C/T heterozigot genotipli bireye ait DNA dizi analizi grafiği.....	26
Şekil 10. <i>PTEN</i> geni ekzon 3'de SSCP tekniği sonrası farklı gözlenen bantların poliakrilamid jel fotoğrafı.	26
Şekil 11. G63A heterozigot genotipli hastanın tümör dokusuna ait DNA dizi analizi grafiği	27

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Mide kanseri için TNM evreleme sistemi.....	7
Tablo 2. <i>PTEN</i> geni ekzon 2, 3 ve 6 bölgelerini kapsayan PZR primerleri	19
Tablo 3. Tümör dokularının TNM sınıflamasına göre dağılımı.....	24
Tablo 4. Tümör lokalizasyonları ile SNP’li hastalar arasındaki dağılım	27

KISALTMALAR

APS: Amonyum per sülfat

Bç: Baz çifti

EDTA: Etilendiamin tetraasetikasit

Et-Br: Ethidium bromür

GK: Gastrik kanser

HCl: Hidrojen klorür

HP: Helikobakter pilori

LOH: Loss of heterozigoty (heterozigotluk kaybı)

miRNA: Mikro RNA

PI3K: Fosfatidil inozitol 3-kinaz

PIP2: Fosfatidil inozitol 4,5-bifosfat

PIP 3: Fosfatidilinositol 3,4,5 bisfosfat

PTEN: Phosphatase and tensin homologue

PTEN/MMAC1: Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten/mutated in multiple advanced cancer 1

PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu

RE: Restriksiyon enzimi

TBE: Tris, borik asit, EDTA

TEMED: Tetramethylethylenediamine

TEPI: Transforming growth factor- β regulated and epithelial cell enriched phosphatase 1

TİUP : Tek iplikçikli uygunluk polimorfizmi

TNM: Tümör, nodül, metastaz

TNP : Tek nükleotid polimorfizmi

İÇİNDEKİLER

1.GİRİŞ.....	1
2.LİTERATÜR BİLGİ.....	3
2.1. Mide (gaster) Anatomisi ve Histolojisi.....	3
2.2. Gastrik Kanserlerin Epidemiyolojisi.....	5
2.3. Gastrik Kanserlerin Patolojisi ve TNM (tümör, nodül ve metastaz) Sınıflandırması.....	5
2.4. Gastrik Kanserlerin Etiyolojisi ve Patogenezi.....	8
2.5. Kanser ve Tümör Baskılayıcı Genler.....	9
2.5.1. Tümör Baskılayıcı Genler.....	10
2.6. <i>PI3K/PTEN/AKT</i> Yolağı.....	12
2.6.1. <i>PI3K/AKT</i> Yolağında <i>PTEN</i> Geni ve Değişikliklerinin Önemi.....	15
3.MATERYAL VE METOD.....	17
3.1. Vaka ve Kontrol Grubu.....	17
3.2. DNA İzolasyonu.....	17
3.3. PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu).....	18
3.4.Jel Elektroforezi.....	20
3.5. TİUP (Tek İplikçikli Uygunluk Polimorfizmi) Tekniği.....	20
3.6. DNA Dizi Analizi.....	22
3.7. İstatistiksel Analizler.....	23

4.BULGULAR.....	24
5.TARTIŞMA VE SONUÇ.....	28
6.ÖZET.....	31
7.SUMMARY.....	33
8.KAYNAKLAR.....	34
9.ÖZGEÇMİŞ.....	42

Bu tezin hiçbir bölümünde, kaynak gösterilmeden başka bir çalışmadan tamamen veya kısmen alıntı yapılmadığını, alınan bilgilerin ise kaynağının referans olarak gösterildiğini beyan ederim.

28.11.2008

Aysel KALAYCI

1. GİRİŞ

Kanser, hücrelerin yapılarında meydana gelen özel değişiklikler sonucu organizmanın denetim mekanizmasının bozularak hücrelerin bağımsız ve kontrolsüz bir şekilde çoğalması olayıdır. Ölüm nedeni olarak, kalp ve damar hastalıklarından sonra gelen, önemi giderek artan bir sağlık sorunudur. Türüne, coğrafi bölgelere, hasta yaş ve cinsiyetine göre farklılıklar gösteren kanserin, genel sıklığı toplumlarda değişiklik göstermekle birlikte 85/100.000 ile 350/100.000 arasında değişmektedir.

Dünya çapında görülen kanserlerin yaklaşık %10'unu gastrik kanser (GK)ler oluşturur. GK'ler erken dönemde genellikle asemptomatik olmasından dolayı geç tanı alabilmekte ve en çok ölüme neden olan kanserler sıralamasında ikinciliğini korumaya devam etmektedir. Hastalığın insidansında azalma gözlenmekle birlikte Türkiye'de GK'lerden ölüm oranı erkeklerde 8-9/100.000, kadınlarda ise 4-5/100.000 arasındadır. GK'ler, en yaygın malignansilerden biri olmasına rağmen etiyojisi halen kesin olarak bilinmemektedir.

Son yıllarda, kanserin moleküler biyolojisi ve genetiği konusundaki bilgilerin artması, 1980'li yıllardan sonra dile getirilmeye başlanan, "kanseri genlerin hastalığıdır" tanımını bir adım daha ileri götürerek, kanseri genetik temelli bir hastalık olduğu şekline dönüştürmüştür.

Kanserin meydana geliş sürecinde genelde birden fazla gen rol oynamaktadır. Bunlardan onkogenler, tümör baskılayıcı genler, DNA tamir mekanizması genleri ve mikro RNA (miRNA) genleri başlıcalarıdır. Bu genlerin herbiri farklı mekanizmalar aracılığıyla malign fenotipin oluşumuna katkıda bulunmaktadır.

Bu süreçte yer alan tümör baskılayıcı genler büyüme faktörlerine ters olarak çalışırlar. Bu etki ile hücre çoğalmasını ve büyümesini azaltarak tümör gelişimine engel olurlar. Bu genlerin kaybı veya inaktif hale geçmesi ile hücre bölünmesinde oynadıkları negatif düzenleyici rol ortadan kalkmakta bu durumda tümör hücrelerinin anormal çoğalması meydana gelmektedir.

Tümör baskılayıcı genlerden birisi olan *PTEN* (phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten) geni; adezyon molekülleri ile etkileşen,

hücre iskelet proteinlerinden tensin ve “auxillin” ile benzerlik gösteren, çift yönlü fosfataz aktivitesine sahiptir. *PTEN* geni 10q23.3’te lokalize olmuş, 9 ekzona sahip ve 403 aminoasitlik bir proteini kodlamaktadır. Bu genin kodladığı proteinler ile hücre büyümesi nasıl kontrol ediliyorsa, aktivitelerindeki anormalliklerde neoplastik hastalıklara neden olabilmektedir.

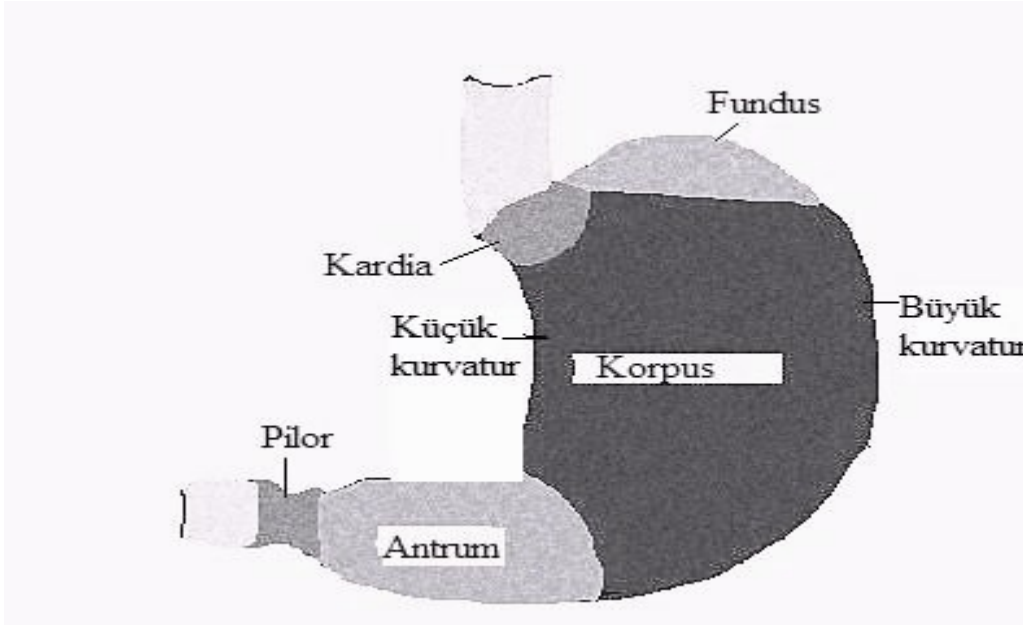
PTEN geni üzerinde yapılan çalışmalar, bu gende meydana gelen değişikliklerin çeşitli tümör gelişiminde etkili olabileceğini göstermiştir. Bu konuda çalışılan birçok tümör tipi olmasına rağmen GK’ lerle ilgili yeterli çalışma bulunmamaktadır. Bu bağlamda gastrik kanserlerde *PTEN* genindeki değişikliklerin belirlenmesi, hastalığın patogenezi ve moleküler temelini anlaması açısından yararlı olabilir.

2.LİTERATÜR BİLGİ

2.1. MİDE (GASTER) ANATOMİSİ VE HİSTOLOJİSİ

Mide, diafragma'nın altında, karın boşluğunun üst bölümünde yer alan, sindirim kanalının en geniş bölümüdür. Ağızda başlayan karbohidrat sindirimini devam ettirme fonksiyonunun yanı sıra, hidrojen klorür (HCl) ve bunun etkisi ile proteolitik pepsine dönüşen pepsinojen salgılayarak protein sindirim işlemini başlatmakla görevlidir.

Anatomik olarak mide; Kardya, fundus, korpus, antrum ve pilor olmak üzere beş bölüme ayrılmaktadır (Şekil 1).



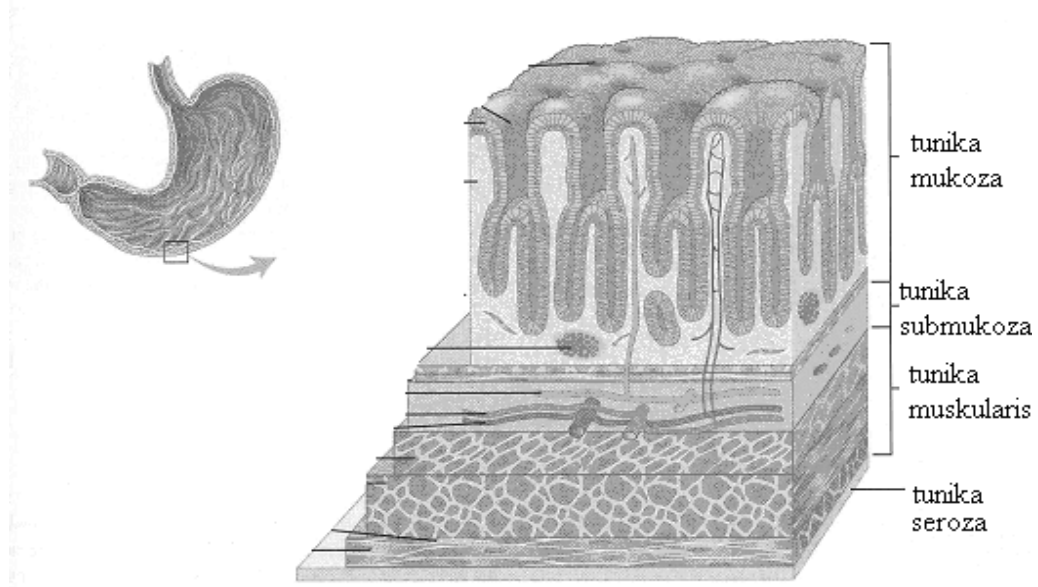
Şekil 1. Midenin bölümleri.

<http://www.histopathology-india.net/stomach.jpg> den alınmıştır.

Gastrik mukoza; Kardiyak, fundik (korpus) ve pilorik (antral) olmak üzere üç ana bölgeden oluşur. Bu bölgeler içten dışa doğru tunica mukoza, tunika submukoza, tunica muscularis ve tunica serosa olmak üzere 4 tabakadan meydana gelir (Şekil 2).

Bu tabakalardan; Tunika mukoza, kalın ve yumuşak yüzeyli bir tabaka olup midenin iç yüzünü örter; Tunika submukoza, temelde gevşek bağ dokusu karakterindedir; Tunika muskularis, düz kas lifleri içerir; Tunika serosa, mideyi örten periton tabakasıdır.

Mide yüzeyini, mukus salgılayan basit tek katlı prizmatik tipte epitel hücreler oluşturur. Salgılanan mukus, epitel yüzey üzerinde kalın bir tabaka oluşturarak hücreleri mide asidinin ve pepsinin zararlı etkisinden korur.



Şekil 2. Midenin tabakaları.

<http://www.lodebar.org/personal/graphics/stomach04.gif> ' den alınmıştır.

Gastrik kanserler diğer organların malign tümörlerinde olduğu gibi bu anatomik yapılar ve histolojik özellikler göz önüne alınarak sınıflandırılmaktadır.

2.2. GASTRİK KANSERLERİN EPİDEMİYOLOJİSİ

Gastrik kanser (GK)ler, insidansının giderek düşüş göstermesine rağmen halen dünyada kansere bağlı ölümlerde, akciğer kanserlerinden sonra ikinci sırada yer almaktadır (Greenle ve ark 2001, Parkin ve ark 2001, Jemal ve ark 2002). Hastalığın coğrafi dağılımı farklılık göstermekle birlikte Japonya, Kore ve Çin'deki sıklığı diğer bölgelere göre daha yüksektir (Parkin ve ark 2001, Yamamoto 2001, Lee ve ark 2002, Kong ve ark 2004). Ülkemizde ise 2004 yılı Sağlık Bakanlığı verilerine göre en sık gözlenen kanserler arasında GK'ler beşinci sırada yer almaktadır (<http://www.saglik.gov.tr/TR/BelgeGoster.aspx>).

GK'lerin erkeklerde görülme oranı bayanlara göre, yaklaşık olarak iki kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Parkin ve ark 1992, Sipponen ve Correa 2002, Yalçın ve ark 2006). Erkeklerde GK insidansının daha yüksek olmasının sebebi henüz aydınlatılmamış olmasına rağmen iki ihtimal üzerinde durulmaktadır. Bunlardan birincisi, biyolojik farklılığa bağlı olarak kadınlık hormonlarının (östrojen, vb) GK'lerde koruyucu olabileceğidir. İkincisi ise, GK'lerin oluşumu esnasında erkeklerin çevresel faktörler ile etkileşimini sonucunda daha hassas olabildikleri, özellikle *Helicobacter pylori* (H.P) infeksiyonunda erkeklerin daha çok kronik gastrit olduğu ve bununda GK'lerde öncü haberci olduğu belirtilmektedir (Sipponen ve Correa 2002). Buna ilaveten Signh ve ark (1997)nin yaptıkları çalışmada ise normal gastrik mukozada östrojen reseptör miktarının, GK mukozasından daha fazla olduğunu ve östrojenin GK oluşumunda koruyucu bir faktör olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Genel olarak sosyoekonomik düzeyi düşük pek çok popülasyonda sıklıkla rastlanan (Parkin ve ark 1997) GK'lerin artan yaşla birlikte insidansıda artmakta ve beş ile yedinci dekatlar arasında en yüksek seviyelere ulaşmaktadır (Christie ve ark 1997).

2.3. GASTRİK KANSERLERİN PATOLOJİSİ VE TNM (TÜMÖR, NODÜL VE METASTAZ) SINIFLANDIRMASI

Gastrik karsinomların en sık görüldüğü bölgeler prepilorik bölge, antrum ve küçük kurvatur yerleşimlidir (Larson ve ark 2006, Portnoy 2006). Sınıflandırmaları tümör kitlesinde değişik histolojik özellikler bir arada bulunabileceğinden dolayı

güçtür (Shibata 2001). Gastrik tümörlerin yaklaşık %90-95'i adenokarsinom tipindedir. Kalan kısmın çoğunluğunu ise Non-Hodking lenfomalar ve leyomiyosarkomalar oluşturur (Lewin ve Appelman 1995, Gunderson ve ark 2000, Kelley 2003).

Lauren (1965) tarafından yapılan sınıflandırmada gastrik adenokarsinomlar tümörlerin histolojik yapılarına göre intestinal ve diffüz olmak üzere iki histolojik tipe ayrılmıştır. İntestinal tip erkeklerde ve ileri yaşlarda daha sık gözlenirken, diffüz tip ise daha genç bireylerde ve her iki cinsiyette eşit oranda görülür (Correa 1985).

Lauren sınıflaması epidemiyolojik ve patogenetik çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak tümörün hem histolojik hemde büyüme paterni göz önüne alınarak yapılan bu sınıflamada gastrik karsinomların önemli bir bölümü sınıflandırılmayan gruba dahil olmaktadır.

GK' lerde kullanılan birçok benzer sınıflandırma olmasına rağmen epidemiyolojik, klinik ve patolojik çalışmaların birçoğu WHO (World Health Organization) sınıflandırmasına dayanmaktadır (Jass ve ark 1990). Bu sınıflamaya göre;

1. Adenokarsinom: Papiller, tubuler, müsinoz, taşlı yüzük hücreli
2. Adenoskuamoz
3. Skuamoz
4. Küçük hücreli
5. İndiferansiye
6. Diğer karsinomlar (koryokarsinoma, embriyonik karsinoma) şeklindedir.

GK' lerin evrelemesinde ise en yaygın kullanılan sınıflandırma sistemi American Joint Committee on Cancer (AJCC) tarafından yapılan TNM evreleme sistemidir (AJCC 1997). Tümör evrelemesinde (T), mide duvarı içinde infiltrasyon derinliğini, iç organlara ait serozada penetrasyonu ve diğer organlara infiltrasyonu; nodal metastaz (N) bölgesel lenf nodlarının boyutu ve sayısını, uzak metastaz (M) ise uzak metastazların varlığını ya da olmadığını belirtir (Tablo 1) (Sobin ve Wittekind 1997).

Tablo 1. Gastrik kanser için TNM evreleme sistemi ve özellikleri (AJCC 1997)

<i>PRİMER TÜMÖR (T)</i>	
T1	Tümör ve submukozayı invaze etmiştir.
T2	Tümör lamina propria ve submukozayı geçerek muskularis propriayı ve subserozayı invaze etmiştir.
T3	Tümör serozaya penetrasyon yapmış ancak komşu organları invaze etmemiştir.
T4	Tümör pankreas, dalak ve karaciğeri invaze etmiştir. Diyafragma ve abdomen duvarına uzanım vardır.
<i>NODAL TUTULUM (N)</i>	
N0	Bölgesel lenf nodlarında tutulum yoktur.
N1	Primer kitleye 3 cm'den yakın perigastrik lenf nodlarında tutulum mevcuttur. 1-6 çevre nod metastazı
N2	Primer kitleye 3 cm'den uzak perigastrik lenf nodlarında ve çölyak arter ve dallarının etrafındaki lenf nodlarında tutulum mevcuttur. 7-15 çevre lenf nod metastazı
N3	Paraaortik, hepatoduodenal, retropankreatik, mezenterik, portal hepatik, retrokaval ve retrokrural lenf nodlarında tutulum mevcuttur. 15> çevre lenf nod metastazı
<i>UZAK METASTAZLAR (M)</i>	
M0	Uzak metastaz yoktur.
M1	Karaciğer, böbrek üstü bezleri, kemik metastazları ve peritoneal tutulum mevcuttur.

2.4. GASTRİK KANSERLERİN ETİYOLOJİSİ VE PATOGENEZİ

GK' lerin gelişiminde birbirleriyle bağlantılı pek çok çevresel ve genetik risk faktörü bulunmaktadır (Fuchs ve Mayer 1995, You ve ark 2000). Çevresel faktörler içerisinde diyetle aşırı tuz ve tütülenmiş gıda alımı, mide pH'sının yükselmesi (hipoklorhidri), hijyenik şartların kötü olması ve vitamin C eksikliği gibi faktörler yer almakta ve GK riskini artırdığı bilinmektedir (Demirer ve ark 1990, Joossens ve ark 1996, Palli 2000, You ve ark 2000, Mayne 2001). Ayrıca *Helicobacter pylori* (HP) enfeksiyonu, A kan grubu ve atrofik gastritinde etiyolojide sorumlu tutulan faktörlerden olduğu bildirilmektedir (Aird ve ark 1953, You ve ark 2000, Karasu ve ark 2001, Uemura ve ark 2001).

Son yıllarda GK hücrelerindeki çeşitli genetik ve moleküler değişikliklerde gastrik kanserin oluşumunda risk faktörleri arasında gösterilmeye başlanmıştır. Yapılan sitogenetik çalışmalar, GK hücrelerinde özellikle kromozom 3 (yeniden düzenlenmeleri), 6 (6q21'de delesyon), 8 (trizomi), 11 (11p13-p15 aberasyonu) ve marker kromozomları kapsayan çok sayıda sayısal ve yapısal anomaliler olduğunu göstermiştir (Seruca ve ark 1993, Panani ve ark 1995, Guleria ve ark 2005). Ayrıca onkogenlerin aktivasyonu (Lee ve ark 2003), hücre adezyonunun azalması (Shimada ve ark 2004), telomeraz reaktivasyonu (Hiyama ve ark 2001), mikrosatellit instabilitesi varlığı (Horii ve ark 1994) ve tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonunun da (Muta ve ark 1996, Wang ve ark 2003, Yang ve ark 2003) GK hücrelerinde meydana gelen moleküler değişikliklerden olduğu belirtilmektedir (Werner ve ark 2001, Ebert ve Malfertheiner 2002).

GK' lerde risk faktörü olarak gösterilen tümör baskılayıcı genlerin temel fonksiyonları hücre büyümesinin inhibisyonu ve diferansiyasyonudur. Tümör baskılayıcı gendeki her iki allelde normal işlevin kaybı, kontrolsüz hücre bölünmesine ve tümör büyümesine neden olur (Knudson 1971). Fonksiyonlarının bozulması sonucunda DNA'nın yapısında meydana gelen genetik ve epigenetik birtakım değişimlere; tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyonların (Tamura ve ark 1991, Wang ve ark 2003), kromozomal heterozigosite kayıplarının (Uchino ve ark 1992, Sud ve ark 2001), hipermetilasyonların (Zhang ve ark 2007) ve gen inaktivasyonlarının (Wang ve ark 2007) neden olabileceği yönünde çalışmalar mevcuttur. Normal koşullarda hücre büyümesini kontrol etmede ve tümör gelişimini

baskılamada rol oynayan genlerden biri olan *PTEN* (phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten) genindeki değişiklikler ile GK arasındaki ilişkiyi inceleyen az sayıda çalışma mevcuttur. *PTEN* genindeki değişimlerin belirlenmesi moleküler temeli henüz aydınlatılmamış olan gastrik karsinogenezin anlaşılmasında yararlı olabilir.

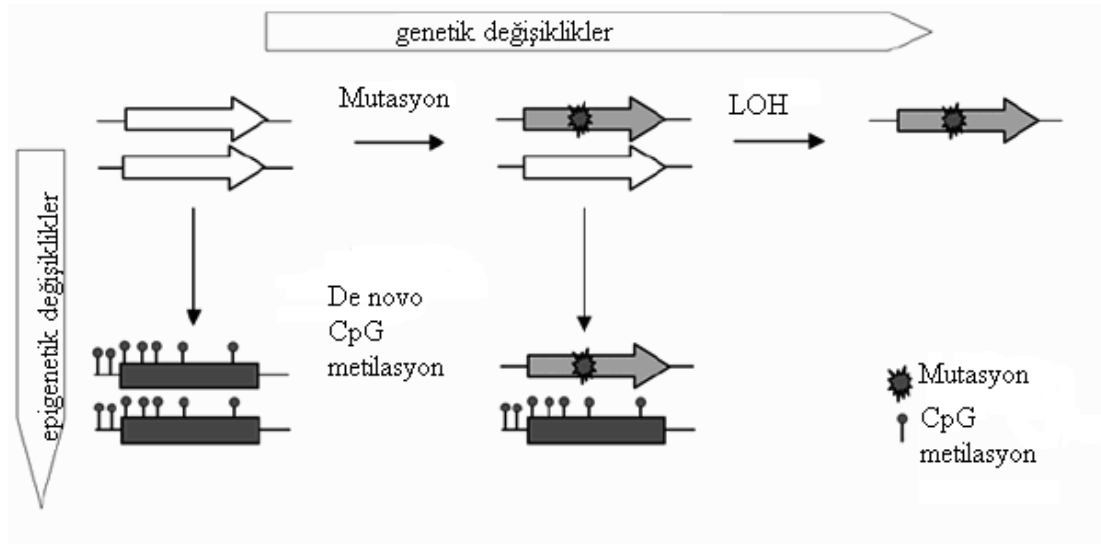
2.5. KANSER VE TÜMÖR BASKILAYICI GENLER

Kanser, hücrelerin yapılarında meydana gelen değişiklikler sonucu organizmanın denetim mekanizmasının bozularak hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalması olayıdır. Kanser hücrelerinde değişiklikler epigenetik modifikasyonlar ile birlikte hücrelerin DNA'larında oluşan genetik değişikliklerden kaynaklanır. Normal hücre sel denge ve bölünme birçok yoldan uyarıların birleşmesi ile genlerin ekspresyonu ve düzenlenmesi, sıkı işlemlerle kontrol edilmektedir. Hücrelerdeki bu değişimler, hücredeki doğal fizyolojik dengenin bozulmasına ve hücre sel transformasyona neden olur (Şekil 3) (Liotta ve Liu 2001, Schulz 2005, Furney ve ark 2008).

Son yıllarda yapılan çalışmalar, epigenetik değişikliklerin de tümör genlerinde yer alabileceği yönündedir. Epigenetik değişiklikler, genelde 2 şekilde sınıflandırılmaktadır. Bunlardan birincisi, nükleotid dizisi değişmeden özellikle genlerin promotor veya enhanser bölgelerindeki CpG adaların metilasyonu ile gerçekleşir. Anormal CpG ada metilasyonu sonucunda bu genler sessizleşerek protein ekspresyonunu durdururlar. Üzerinde en fazla çalışılan epigenetik mekanizma DNA metilasyonudur. Diğer mekanizma ise kromatin yapı ve fonksiyonlarını değiştiren histon modifikasyonlarıdır. Modifikasyonların histonların elektostatik yükünü etkileyerek kromatin yapısını değiştirdiği ve protein kompleksleri için tanıma bölgesi oluşturduğu düşünülmektedir. (Mompalao 2003, Egger ve ark 2004, Schulz 2005, Hatada ve ark 2006, Zhu 2006, Furney ve ark 2007).

Kansere neden olan genetik değişiklikler ise genlerde birçok şekilde meydana gelebilir. Bunlardan yaygın olarak çalışılanları arasında onkogenler, tümör baskılayıcı genler, DNA tamir genleri ve mikro RNA (miRNA) genleri sayılabilir.

Onkogenler fonksiyon kazandıran mutasyonlar yoluyla ya da genin bir allelinin artmış ekspresyonuyla kodladıkları proteinlerin yapısını değiştirirlerken (Vogelstein ve Kinzler 1998, Nussbaum ve ark 2005, Croce 2008), tümör baskılayıcı genler genin her iki allelinin fonksiyonunu yitirmesi gibi farklı bir mekanizma ile kanser oluşumuna neden olurlar (Knudson 1993, Bobbs 2005, Lewin 2004). DNA tamir mekanizması genleri DNA’ da oluşabilecek hasarların tamirinde rol alırken, miRNA genleri ise çoğalma, apoptozis ve farklılaşmada görev yapan genlerin ifadesinin düzenlenmesinde yer alırlar (Liotta ve Liu 2001, Zingde 2001, Schulz 2005, Cooper ve Hausman 2006).

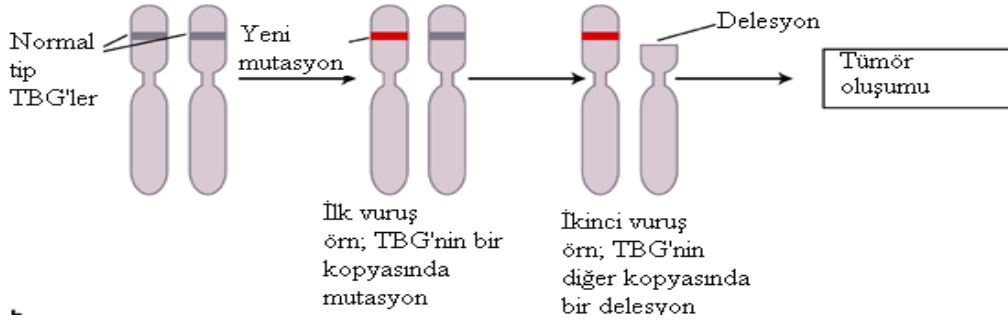


Şekil 3. Kanser oluşumunda genetik ve epigenetik değişikliklerin mekanizması www.nature.com/v15/n4/fig_tab/7290292f1.html’ den alınmıştır.

2.5.1. Tümör Baskılayıcı Genler

Tümör baskılayıcı gen (TBG) diğer adıyla “antionkogen” lerin görevi hücre büyümesini inhibe ederek normal hücreleri kanserleşmeden korumaktır (Grander 1998, Liotta ve Liu 2001). TBG mekanizması ilk olarak Knudson’un “çift vuruş hipotezi” ile açıklanmıştır (Şekil 4) (Knudson 1971). Hipoteze göre; heterozigot olan hücreler gende tek bir fonksiyonel tümör baskılayıcı kopyaya sahiptir ve bu da onların normal hücre fenotipini sağlamasına yeterlidir. Bununla birlikte, kalıtsal olarak kopyanın biri mutasyona uğramışsa, diğer normal allelin fonksiyonunun bir şekilde sonradan kaybolması, tümörü baskılama yeteneğini

ortadan kaldırmış olur. Sonuçta genin her iki alleli de fonksiyonunu yitirir ve tümör oluşumuna zemin hazırlar (Vile 1989, Knudson 1993, Nussbaum ve ark 2005). TBG'ler son derece heterojen olup kontrol edici (caretaker), nöbetçi (gatekeeper) ve landscaper genler olmak üzere 3 gen grubuna ayrılırlar (Michor ve ark 2003).



Şekil 4. Sporadik kanserlere neden olan TBG' de normal bir hücrede mutasyon ve tümör oluşumu.

http://www.journals.cambridge.org/fulltext_content/ERM/E'den uyarlanmıştır.

Kontrol edici (Caretaker) gen terimi, DNA hasarını tamir etmede ve genomik bütünlüğü sürdürmede görev alan genler olarak tanımlanmıştır (Kinzler ve Vogelstein 1997, Nussbaum ve ark 2005). Kontrol edici genlerin kodladığı ürünler genomda sabit olup bu genlerde oluşan mutasyonlar genomik instabiliteye neden olurlar. Genomun kararlılığı; hücre siklusu kontrol noktaları, DNA tamir yolları ve DNA hasarında hücrenin devamlılığını sağlayan diğer faktörler tarafından sağlanır (Levitt ve Hickson 2002, Michor ve ark 2003). Kontrol edici genlerin inaktivasyonunda hücrelerin sürekli olarak mutajenlere maruz kalması ile çevresel faktörler eşit oranda etkilidirler. DNA onarım yolağını kodlayan bir nöbetçi gende meydana gelen bir mutasyon DNA tamir yolağının bozulmasına ve bunun sonucu olarak da kontrolsüz hücre bölünmesine neden olabilmektedir (Kinzler ve Vogelstein 1998).

Nöbetçi (Gatekeeper) genler ise DNA hasarını tamir etmede yetersiz kaldığı durumlarda; hücre büyüme-farklılaşmasını durdurarak ve apoptozis yoluyla hücreyi yok ederek tümör gelişimini doğrudan engelleyen genlerdir (Kinzler ve Vogelstein 1998, Nussbaum ve ark 2005). Hücrede bu yolda görev alan genlerin yapısındaki değişiklikler ve bunun sonucu fonksiyonlarını yitirmeleri tümörogenezin pek çok aşamasında önemli bir adımdır (Macleod 2000, Kotnis ve ark 2005).

Bazı genlerin epitelyal hücre büyümesinde etkili olarak stromanın yapısını değiştirdiği ve kansere duyarlılığını arttırdığı Kinzler ve Vogelstein tarafından (1998) “landscaper” etki olarak tanımlanmıştır.

İlk olarak landscaper genler otozomal dominant geçiş gösteren ve kromozom 18q’da lokalize SMAD4/DPC4 geninde mutasyonla meydana gelen juvenil polipozis koli (JPC) hastalığında tanımlanmıştır (Richens ve ark 2000).

Landscaper genler büyüyen tümör hücreleri üzerinde küçük bir alanda etkilidirler. Bu etkilerini biyokimyasal yollarda meydana gelen hücre dışı matriks proteinlerinde direk/indirek düzenleme, hücre yüzey markerları, adezyon proteinleri ya da büyüme/sağkalım faktörleri salgılayan ürünleri kodlayarak gösterirler (Macleod 2000).

Landscaper genlerin fonksiyonlarını yitirmeleriyle hücrenin normal büyümesi bozulur ve dar alanda etkili olduklarından komşu epitelde neoplastik dönüşüm başlar. Genellikle tümör mutasyon nedeniyle çok sayıda farklı hücreden gelişir (Playford 2001, Shekhar ve ark 2003, Bhowmick ve ark 2004).

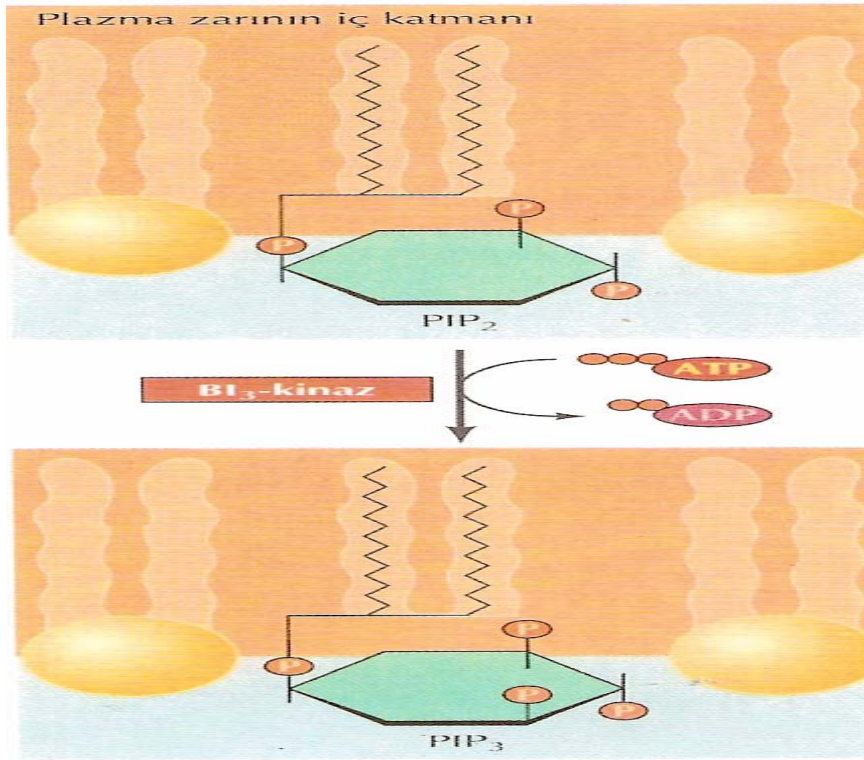
2.6. *PI3K/PTEN/AKT* YOLAĞI

Biyokimyasal yollar hücre dışı matrikste oluşan ve canlı hücrelerde pek çok yönden düzenleyici rol oynayan sinyal moleküllerini içerir (Campisi 2005). Hücreler arası iletişim hücre-dışı matriks yoluyla direk temas veya sinyal molekülleri ile sağlanır (Bissell ve Radisky 2001). Birçok sinyal ileti molekülünün reseptörlerine bağlanması ile hücre davranışlarını düzenleyen reaksiyonlar hücre sinyal iletimi yolları aracılığıyla başlar (Cooper ve Hausman 2006). Hücre içi sinyal iletiminde yer alan yollardan birisi, *PI3K* (Phosphoinositide 3-kinase)/*PTEN* (phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten) /*AKT* yolağıdır. Bu yolağın pek çok üyesinin çeşitli tümörlerde ya regülasyonunun bozulduğu ya da mutasyona uğradığının anlaşılmasıyla hücrenel transformasyonda anahtar rol oynadığı tespit edilmiştir (Katso ve ark 2001, Saal ve ark 2007).

PI3K (Phosphoinositide 3-kinase)/*PTEN* (phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten) /*AKT* yolağı özellikle hücre büyümesinin düzenlenmesi, glukoz transportu, protein biyosentezi gibi hücre metabolizmasını kontrol etmede ve

hücrel olaylarda hücre-dışı sinyallere yanıtta önemli bir rol oynar (Katso ve ark 2001, Schulz 2005).

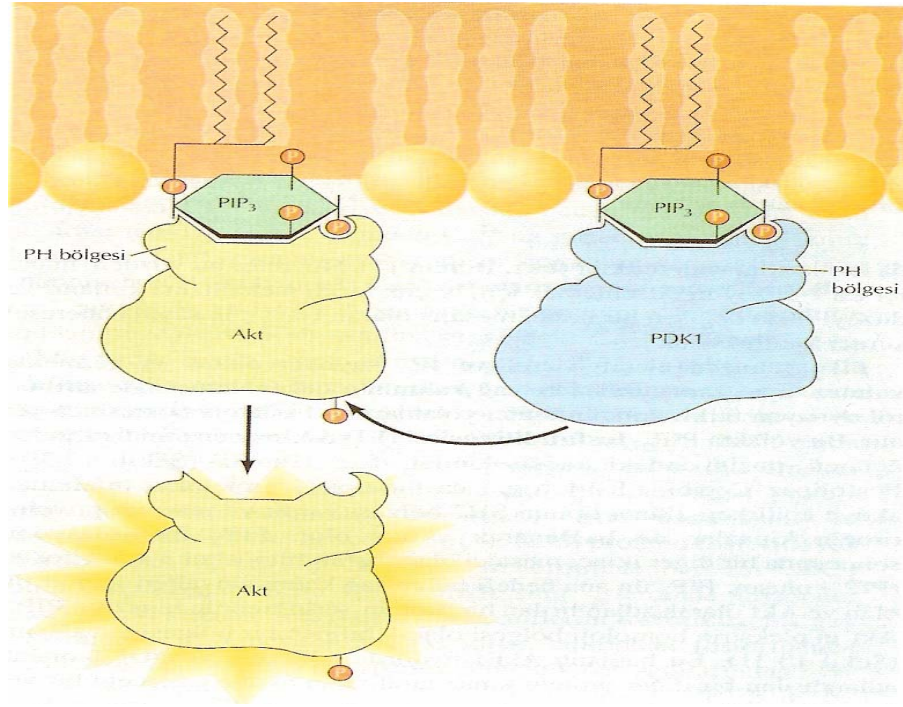
Sinyal yolağının ilk aktivasyonu büyüme faktörleri, sitokinler, kemokinler, hormon reseptörleri ve antijen reseptörlerinden birinin reseptör tirozin kinazlara bağlanarak *PI3K*'nin aktif hale gelmesi ile başlar. Aktifleşen *PI3K* fosforillenerek lipid molekülü olan *PIP-2* (phosphatidylinositol 4,5 biphosphate)'nin *PIP-3* (phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphate)'e dönüşmesini sağlar (Şekil 5) ve *PDK1* (phosphatidylinositol-dependent kinase-1)'i harekete geçirir.



Şekil 5. *PI3- Kinaz* aktivitesi ile *PIP-2*'nin *PIP-3*' e dönüşümü (Cooper ve Hausman 2005).

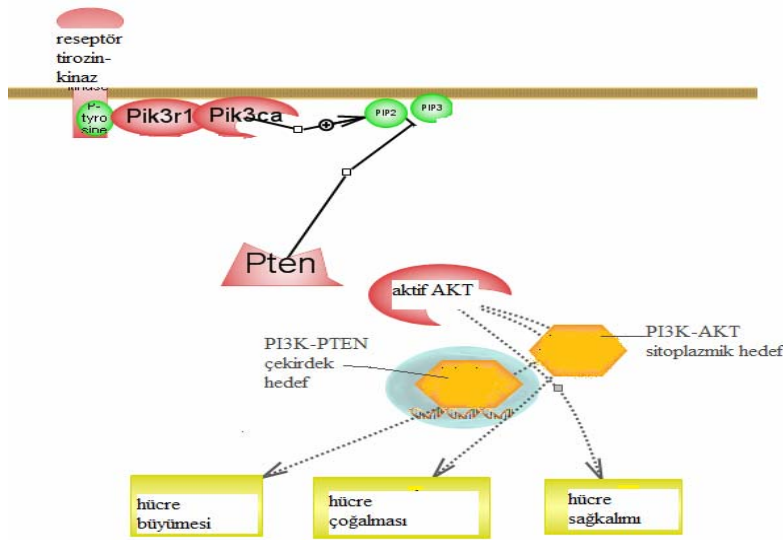
PIP-3 düzeyi durağan hücrelerde çok düşüktür, fakat *PI3K* aktivasyonu ile uyarılarak hızlı bir şekilde artırılır (Cristofano ve ark 2005). *PIP-3*'ün hücre membranında birikmesi plekstrin homoloji (PH) bölgesinde bulunan hücre içi proteinlerin geçişine izin verir. PH bölgesi lipid bağlayan bölgedir ve çeşitli sıralarda dizilmiş hücre içi proteinleri (serin/treonin kinazlar, tirozin kinazlar, hücre iskelet proteinleri, uyarıcı moleküller vb.) içerir. Bu proteinler arasında en yaygın kullanılan bir serin/treonin kinaz olan ve *AKT* olarak bilinen protein kinaz B

(PKB)'dir (Şekil 6) (Vanhaesebroeck ve Alessi 2000, Katso ve ark 2001, Tsugawa ve ark 2002, Cristofano ve ark 2005, Cully ve ark 2006).



Şekil 6. *AKT* protein kinazın aktivasyonu (Cooper ve Hausman 2006).

AKT aktive olduğunda, hücre sağ kalım düzenleyicileri, transkripsiyon faktörleri ve diğer protein kinazları da kapsayan çok sayıda hedef proteini fosforiller (Şekil 7) (Cooper ve Hausman 2006).



Şekil 7. *PI3K/Pten/Akt* yolağı

http://rgd.mcw.edu/wg/pathway/phosphatidylinositol_3' den uyarlanmıştır.

PI3K yolağının çeşitli insan tümörlerinde aktif olduğu ve *PTEN* tümör baskılayıcı geniyle birlikte görev yaptıkları bilinmektedir (Maehama ve Dixon 1998, Blanco-Aparicio ve ark 2007). *PTEN* negatif düzenleyici görevi yaparak *PIP3*'ü defosforilasyon yoluyla *PIP2*'ye dönüştürür ve böylece *PDK1*'in hareketini dolayısıyla *AKT*'nin aktivasyonunu da engellemiş olur (Sun ve ark 1999, Cristofano ve Pandolfi 2000).

2.6.1. *PI3K/AKT* Yolağında *PTEN* Geni ve Değişikliklerinin Önemi

PTEN/MMAC1 (phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten/mutated in multiple advanced cancer 1) geni *TEP1* (transforming growth factor- β regulated and epithelial cell enriched phosphatase 1) olarak bilinen 10q23.3'de lokalize olan bir tümör baskılayıcı genidir (Li ve ark 1997, Steck ve ark 1997). Bu geninin 9 ekzonu bulunmaktadır ve 47 kDalton ağırlığındadır. Adezyon molekülleri ile etkileşim gösteren, hücre iskelet proteinlerinden tensin ve "auxillin" e benzeyen, çift yönlü fosfataz aktivitesine sahip 403 aminoasitlik bir proteini kodlamaktadır (Li ve ark 1997, Steck ve ark 1997, Engin ve Erişen 2003).

PTEN, *PI3K/AKT* yolağında *AKT*'nin aktivasyonunu fosforile olmasını engelleyerek negatif yönde düzenler. Fosfolipid fosfataz aktivitesi sergileyen *PTEN* hücre büyümesi, sağkalım ve motilite için önemli hücre fonksiyonları düzenleme potansiyeline sahiptir (Myers ve ark 1998, Wu ve ark 1998).

Literatürlerde *PTEN* geni değişikliklerinin birçok kanser türünde özellikle glial tümörler (glioblastoma multiforme/anaplastik astrositoma), prostat, tiroid, endometrium, renal ve küçük hücreli akciğer karsinomları, melanom ve menenjiomalarda diğer kanser türlerine göre daha yaygın görüldüğü belirtilmektedir (Dahia ve ark 1997, Li ve ark 1997, Liu ve ark 1997, Steck ve ark 1997, Forgacs ve ark 1998). Vlietstra ve ark (1998) prostat kanserlerinde yaptıkları çalışmada *PTEN* geni mutasyon ve delesyonlarının prostat kanser patogenezinde önemli bir rol oynadığını bildirmişlerdir. Malignant melanomlarda Birck ve ark (2000) yaptıkları bir çalışmada ise *PTEN* geninin her iki allelin de inaktive olduğunu tespit etmişler ve malignant melanom tümörlerin gelişiminde bu genin etkili olabileceğini belirtmişlerdir. *PTEN* geniyle yapılan diğer bir çalışmada ise Van Nederveen ve ark (2005) feokromasitoma tümörlerinde genin inaktivasyonunun önemli rol

oynamadığını belirlemişlerdir. Bu çalışmalardan elde edilen bulgular *PTEN* geni inaktivasyonunun bazı tümör tiplerinde önemli rol oynarken bazılarında ise rolünün olmadığını göstermektedir. Sık görülen kanser türlerinden biri olmasına rağmen gastrik kanserler ile *PTEN* geni değişiklikleri arasındaki ilişkiyi inceleyen az sayıda çalışma mevcuttur. Fei ve ark (2002) gastrik kanserli hastaların kanserli korpus ve antrum bölgelerinden kanserli ve normal doku biyopsileri alarak yaptıkları çalışmada, kanserli dokulardaki *PTEN* gen ekspresyonunun normal dokulara göre azaldığını tespit etmişlerdir. Azalan ekspresyonun *PTEN* geninin promotöründe hipermetilasyondan ya da gende mutasyon ve delesyonlar sonucu transkripsiyonel inaktivasyondan kaynaklanabileceğini ileri sürmüşlerdir. Li ve ark (2005) prekanseröz gastrik mukoza ile gastrik kanserli dokular arasında farklılıkları *PTEN* geninde yaptıkları LOH (Loss of heterozygosity=Heterozigosite kaybı) analiziyle araştırmışlar ve GK' lerde *PTEN* geninde mutasyon ve heterozigosite kayıplarının tamamen infiltrasyon ve metastazlara bağlı olduğunu bildirmişlerdir. Diğer taraftan Sato ve ark (2002) ise gastrik karsinogenezde tümör baskılayıcı gen olarak *PTEN* geninin rolü olmadığını bildirmişlerdir.

Bu bulgular sonucunda *PI3K/AKT* yolağında önemli rol oynayan ve tümör baskılayıcı gen olarak görev yapan *PTEN* geninin çeşitli tümör tiplerinde olduğu gibi gastrik karsinogenezde de yer alabileceği görülmektedir. Bu nedenle, yüksek mortalite oranına sahip olan gastrik kanserlerin etiyolojisinin belirlenmesinde daha fazla sayıda çalışmalarla moleküler patogenezin ortaya konması gerekmektedir.

3.MATERYAL VE METOD

3.1. VAKA VE KONTROL GRUBU

Çalışmaya 2005-2007 yılları arasında Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Patoloji Laboratuvarı'na gelen; gastrik adenokarsinom tanısı almış 47 hastanın parafin bloklardaki tümörlü dokuları; kontrol grubu olarak ise aynı vakaların normal dokuları alındı. Ayrıca aynı hasta grubundan 10 hastanın periferik kan örnekleri de alındı. Çalışma grubu 29 erkek ve 18 bayandan oluşmakta; yaş aralığı ise 27 ile 87 (ortalama 64,4) arasında değişmektedir. Hasta grubu patoloji raporları ve postoperatif anamnezlerine göre tümör, nodül ve metastaz (TNM) sınıflandırması yapıldı. Tümörün lokalizasyonu (T); T1, T2, T3 ve T4; Nodal tutulum (N); N0, N1, N2, N3 ve uzak metastaz (M); M0 ve M1 olarak belirlendi.

Sınıflandırmalar yapılırken hastaların patoloji raporları göz önüne alındığından dolayı bazı hastaların gruplara dahil edilememesi, sonuçlarında anamnezlerin bulunmamasından kaynaklanmıştır.

Çalışma için Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Etik Kurulu'ndan onay alındı.

3.2. DNA İZOLASYONU

Hastaların parafin bloklarda bulunan tümörlü ve normal doku örneklerinden S.Ü. Meram Tıp Fakültesi Patoloji Laboratuvarı'nda 10 µm'luk kesitler halinde ependorf tüpüne alındı. İlk olarak dokulara parafin bloklardan kurtarma işlemi uygulanmıştır. Bunun için,

- Ependorf tüplerde bulunan dokular üzerine 1'er ml ksilol solüsyonu eklendi.
- Etüvde 50°C' de 1 saat bekletildi.
- 13 000 rpm' de 15 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısmı dokulara zarar vermeden uzaklaştırıldı.
- Ksilol solüsyonu yenilenerek aynı işlem tekrar edildi.
- Ksilol solüsyonundan arındırılan dokular yeni bir ependorf tüpe alındı ve üzerine %100' lük etil alkolden 1'er ml eklendi.
- Etüvde 37°C' de 30 dakika bekletildi.

- 13 000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısmı atıldı.
- Ependorf tüplere 1'er ml %80'lik alkol ilave edildi.
- Etüvde 37°C' de 30 dakika bekletildi.
- 13 000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısmı atıldı.
- Bu işlem %60'lık ve %40'lık alkollerle her birinde 15'er dakika bekletilmek üzere tekrar edildi.
- 13 000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısmı atıldı.
- Ependorf tüplerde bulunan dokulara yıkama işlemi için 1'er ml dH₂O eklendi.
- Etüvde 37°C'de 15 dakika bekletildi.
- 13 000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek dokuların üst kısmında bulunan dH₂O atıldı.
- Dokular cerrahi makas yardımıyla daha küçük parçalara ayrılıp üzerlerine 40'ar µl Proteinaz-K ve 200'er µl doku lizisi ilave edilerek 37°C' de su banyosunda bir gece inkübasyona bırakıldı. Sonraki aşamada ticari kit (Roche high pure PCR DNA isolation kit) kullanılarak hastaların parafinden kurtarılan doku örnekleri ve kan örneklerinden DNA izole edildi.

3.3. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PZR)

PTEN genindeki değişikliklerin tespit edilmesi için tek iplikçikli uygunluk polimorfizmi (TIUP) tekniği kullanıldı. Bu çalışmada PZR' da *PTEN* geni ekzon 2, 3 ve 6'ya ait primerler kullanılmış olup Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2. *PTEN* geni ekzon 2, 3 ve 6 bölgelerini kapsayan PZR primerleri (Minaguchi ve ark 2001).

No	Ekzon	Lokus	Primer	PZR ürünü
1	2	PTEN-Ex2-İ PTEN-Ex2-G	TGA CCA CCT TTT ATT ACT CC TAC GGT AAG CCA AAA AAT GA	367 bç
2	3	PTEN-Ex3-İ PTEN-Ex3-G	ATA TTC TCT GAA AAG CTC TGG TTA ATC GGT TTA GGA ATA CAA	434 bç
3	6	PTEN-Ex6-F PTEN-Ex6-G	TTG GCT TCT CTT TTT TTT CTG ACA TGG AAG GAT GAG AAT TTC	201 bç

PZR reaksiyonu 35 µl’de gerçekleştirildi. Reaksiyon içeriği;

- 4 µl 10xPZR tamponu
- 2 µl MgCl₂ (50 mM)
- 3,2 µl dATP, dGTP, dTTP ve dCTP (10 pmol)
- 2,4 µl 10 pmol ileri ve geri primer karışımı
- 19.8 µl dH₂O
- 0,6 µl DNA Taq Polimeraz enzimi
- 3 µl genomik DNA’ dan oluşmaktaydı.

PZR’ ları, Applied Biosystems GeneAmp PZR System 2700 model PZR profili kullanılarak iki aşamada gerçekleştirildi. Ekzon 2 için; 95 °C’de 4 dakika ile tam bir denatürasyon sağlandıktan sonra I. aşamada 10 döngü için 94 °C’de 15 saniye denatürasyon, primerlerin ideal bağlanma noktasının sağlanması için 60 °C’de 30 saniye süren birleşme ve 72°C’de 15 saniye uzama sağlandı. II. aşamada 94 °C’de 15 saniye denatürasyon, 58 °C’de 30 saniye birleşme ve 72 °C’de 15 saniye uzama olacak şekilde toplam 35 döngü kullanıldı. Son olarak örnekler 72°C’de 3 dakika tutuldu. Ancak ekzon 3 ve ekzon 6 için sırasıyla 52 °C - 48 °C ve 59 °C - 57 °C Tm’ ler kullanıldı.

3.4. JEL ELEKTROFOREZİ

Elde edilen PZR ürünlerini değerlendirmek amacıyla %2'lik agaroz (A 5093, Sigma) jele yüklendi. Agaroz jel için 5xTBE (Tris, Borik asit, EDTA) stok tamponu hazırlandı. 5xTBE tamponu; 54 gr Tris, 27,5 gr Borik asit, 3,72 gr EDTA 1 lt dH₂O içerisinde çözerek hazırlandı. Hazırlanan 5xTBE stok tamponu 1/5 oranında sulandırılarak 1xTBE tamponu haline getirildi. İstenilen konsantrasyona getirilen agaroz mikrodalga fırında eritildi ve içine Et-Br (10µg/ml Ethidium bromür) ilave edilerek boyandı. Agaroz jel kaseti içine dökülerek taraklar yerleştirildi ve donması için 20-30 dk bekletildi. PZR ürünlerinden kontrol için 7'şer µl yükleme boyası (6xLoading dye) ile muamele edilerek kuyucuklara yükleme yapılmıştır. Beklenen bantların doğruluğu kontrol etmek amacıyla 100 bç'lik marker da ayrıca yüklendi. Jel 150 V elektrik akımında yaklaşık 30 dakika yürütüldü ve jel UV illüminatörde değerlendirildi. Değerlendirme sonucunda *PTEN* geni ekzon 2'de 367 bç, ekzon 3'te 434 bç ve ekzon 6'da 201 bç büyüklüğünde bantlar gözlemlendi.

3.5. TİUP (TEK İPLİKÇİKLİ UYGUNLUK POLİMORFİZMİ) TEKNİĞİ

Agaroz jelde değerlendirme sonucunda tek iplikçikli DNA'da oluşan değişimi belirlemek için TİUP tekniği uygulandı. TİUP tekniğinde %8'lik non-denatüre Poliakrilamid jel kullanılarak gümüş boyama ile boyandı. %8'lik non-denatüre poliakrilamid jel için;

- Akrlamid stok solüsyonu (%30'luk) 142,5 gr Akrlamid ile 7,5 gr bisakrlamid karışımı 500 ml dH₂O'da çözdürülerek hazırlandı.
- Beher içerisine 5,35 ml akrlamid stok solüsyonu, 4 ml 5xTBE tamponu, 1 ml Gliserol ve 10,65 ml dH₂O eklenerek manyetik karıştırıcıda 5 dakika homojenize edildi.
- Amonyum Per Sülfat (APS) (%10'luk) çözeltisi hazırlanarak 125 µl eklendi ve polimerizasyonu başlatmak için 12,5 µl Tetra Methyl Ethylene Diamine (TEMED) ilave edildi.

Dikey jel elektroforez sistemine (Biorad,10x10 cm) poliakrilamid jel dikkatli bir şekilde döküldü ve taraklar yerleştirildi. Yaklaşık bir saat jel donması için bekletildi. Amplifiye edilen PZR ürünleri Formamidli Loading Dye ile denatüre edildi. Denatürasyon çözeltisi olarak kullanılan Loading dye; 10 ml Formamid, 10

mg Xylene Cyanol, 10 mg Bromophenol blue ve 0,5 M EDTA dan pH:8 200 µl alınarak hazırlandı. PZR ürünlerinden 3 µl alınarak 9 µl denatürasyon çözeltisi ile karıştırıldı ve 95 °C de blok ısıtıcıda 10 dakika denatüre edildi. Denatürasyon işleminden sonra renatürasyonu engellemek için PZR ürünleri buz üzerine alındı. Donmuş olan poliakrilamid jele yaprak uçlar yardımıyla 10 'ar µl yüklendi ve dikey jel elektroforez sistemde 200 Voltta bç uzunluklarına göre değişen zaman aralıklarında yürütme yapıldı.

Süre sonucunda beş farklı solüsyon hazırlandı ve poliakrilamid jel gümüş boyama tekniğine tabi tutuldu.

Solüsyon 1; 100 ml asetik asit, 100 ml %96'lık etanol, 1800 ml dH₂O'dan,

Solüsyon 2; 25 ml asetik asit, 500 ml %96'lık etanol, 4500 ml dH₂O'dan,

Solüsyon 3; 0,6 gr AgNO₃, 50 ml dH₂O'dan,

Solüsyon 4; 1,5 gr NaOH, 70 µl Formaldehit, 50 ml dH₂O dan

Solüsyon 5 ise 100 ml Asetik asit, 200 ml Metanol ve 700 ml dH₂O'dan oluşmaktaydı.

Solüsyon 3 ve 4 taze olarak diğer üç solüsyon ise stok olarak kullanıldı.

Boyama işlemi orbital karıştırıcıda her solüsyon için 50 ml alınarak gerçekleştirildi. Solüsyon 1 de 10 dakika karıştırıldı ve süre sonunda dökülerek 5 dakika solüsyon 2 de muamele edildi. Solüsyon 2 dökülerek boyama basamağı olan solüsyon 3 te 23 dakika karıştırıldı. AgNO₃ çözeltisinde boşaltıldı ve 2 dakika dH₂O da bekletildi. Süre sonunda dökülen dH₂O yerine solüsyon 4 eklenerek bantlar gözlenene kadar elde karıştırıldı. Değerlendirme yapılabilecek duruma gelen bantlar gözlenince solüsyon 4 boşaltılarak solüsyon 5 ilave edildi ve 10 dakika karıştırıcıda bekletildi. Poliakrilamid jel asetat arasına alınıp değerlendirme yapıldı.

Çalışmamızdaki TIUP tekniğindeki deneysel aşamalar üçer kez tekrar edilmiş olup kaynaklanabilecek hataların engellenmesi sağlanmıştır. Değerlendirme sonucunda anlamlı gözlenen bantların PZR ürünleri; değişikliklerin belirlenmesi için DNA dizi analizi yapıldı.

3.6. DNA DİZİ ANALİZİ

DNA izolasyonu, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve Tek iplikçikli uygunluk polimorfizmi (TİUP) çalışmaları Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi ve Tıbbi Genetik laboratuvarlarında yapılmıştır. Yapılan değerlendirmelerde her ekzon için, anlamlı bulunan hasta ve kontrol gruplarının uygun kaliteye sahip PZR ürünleri, ileri-geri primerleri ile birlikte DNA dizi analizine tabi tutulmuştur.

Mevcut laboratuvarlarımızda DNA analizi cihazı bulunmadığından dolayı Refgen Araştırma Laboratuvarı'nda bulunan (Ankara) DNA dizi analizi cihazı (ABI 3100 16 kapiller Big Dye Cyler sequencing Version 3.1) ve Geneservice (İngiltere) de bulunan ABI 3730 48 kapiller Big Dye Cyler sequencing Version 3.1 DNA analizi cihazına değişikliklerin belirlenmesi için gönderildi.

DNA dizi analizi sonuçları, ileri ve geri okumaları karşılaştırılarak (blastlama) normal, mutant ve heterozigot olarak değerlendirildi.

3.7. İSTATİKSEL ANALİZLER

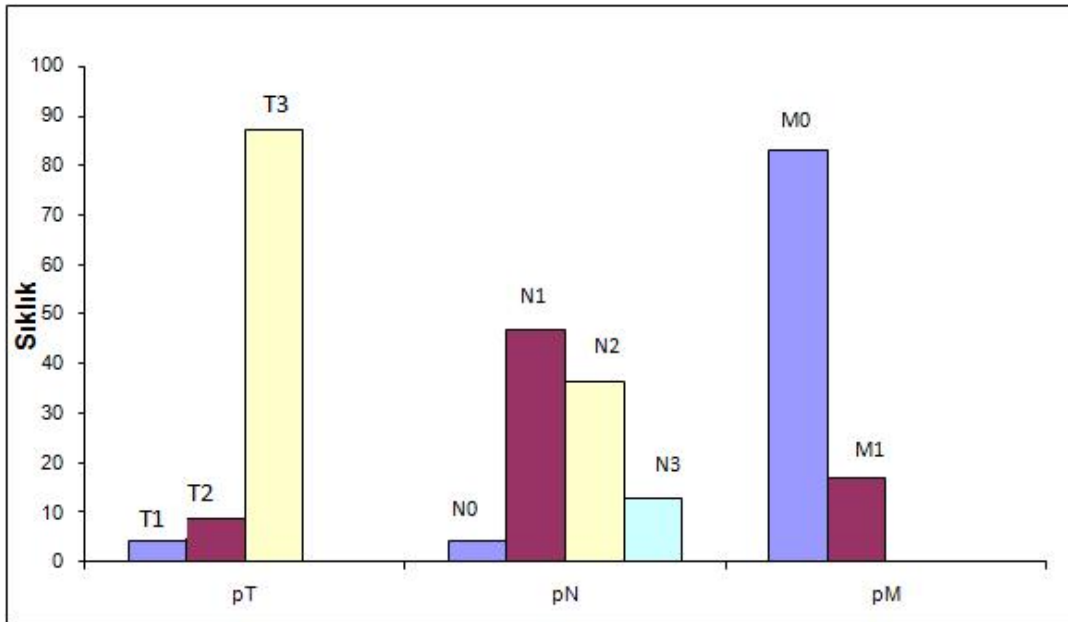
Çalışmamızda kullanılan verilerin ortalama \pm standart sapma ve % sıklığı değerlerini bulmak için SPSS 15.0 for Windows istatistik paket programı kullanıldı. Grafikler ise Microsoft Office Excell 2007 paket programı ortamında hazırlanmıştır.

4.BULGULAR

Çalışma grubumuz gastrik adenokarsinomlu 29 erkek ve 18 bayan olmak üzere toplam 47 bireyden oluştu. Erkek/kadın oranı 2,5/1,5; yaş ortalamasının ise $64,45 \pm 1.9$ olduğu görüldü.

Hasta grubumuzdaki tümörlerin tümör, nodül, metastaz (TNM) sınıflandırması; T1'de 3 (%6,4), T2'de 5 (%10,6) ve T3'te 39 (%83) bireyden oluşmaktaydı. Nodül tutulumuna göre N0 da 3 (%6,4), N1'de 23 (%48,9), N2'de 15 (%32) ve N3'te 6 (%12,7) birey ve uzak metastaz bulunmayan M0'da 39 (%83,3), sadece karaciğer metastazı olan M1'de 8 (%16,7) birey olarak belirlendi (Tablo 3).

Tablo 3. Tümör dokularının TNM sınıflamasına göre dağılımı

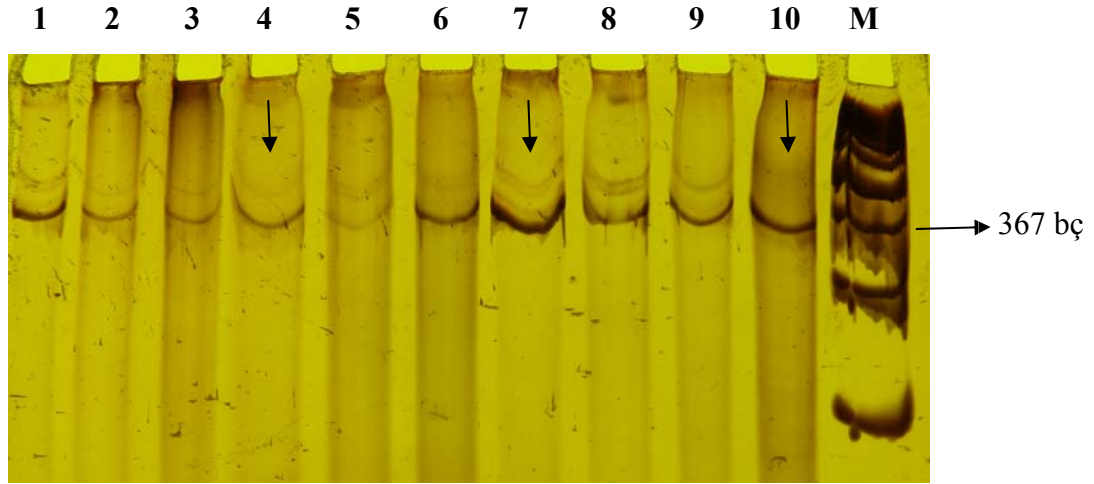


Çalışmaya gastrik adenokarsinomlu 47 hastanın tümör ve normal dokuları; ayrıca aynı hasta grubunda bulunan ve çalışma sürecinde S.Ü. Meram Tıp Fakültesi Genel Cerrahi servisinde tedavi görmekte olan 10 hastanın periferik kan örnekleri dahil edildi. Periferik kan örnekleri tümör ve normal dokuları kullanılan hastaların kan örneklerinde de *PTEN* geninde herhangi bir değişiklik olup olmadığını incelemek amacıyla alındı.

PTEN geni 9 ekzona sahip tümör baskılayıcı bir gendir. *PTEN* geniyle yapılan çalışmalar mutasyonların gende kodlayıcı bölgeler olan ekzon bölgelerinde ve mevcut çalışmada kullandığımız ekzonlarda yoğunlaştığı yönündedir (Wang ve

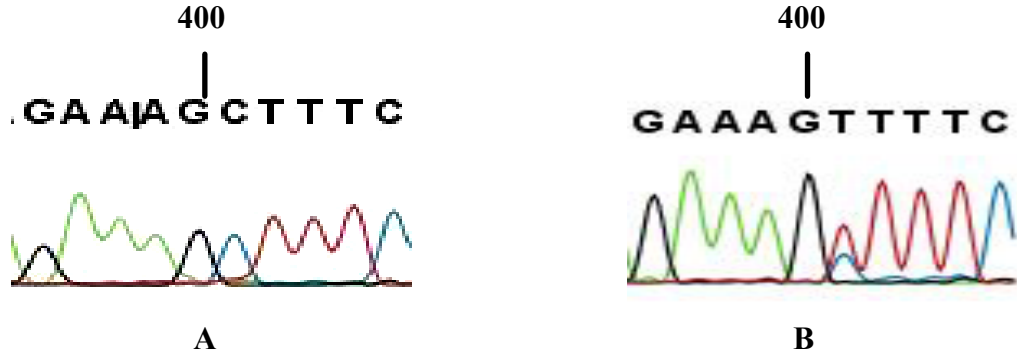
ark 2003). Çalışmamızda öncelikle *PTEN* geninde mutasyonların daha yoğunlukta gözleendiği ekzon bölgelerinden olan ekzon 2, 3 ve 6 ile GK'ler arasındaki ilişki incelenmiştir.

PTEN geni ekzon 2'de PZR-TIUP tekniği sonrası 47 hasta grubundan 8 tanesinde (%17) farklı bantlar gözleendi (Şekil 8). Bu farklılıkların; tümör ve/veya normal dokulardaki bant eksikliği ya da fazlalığı şeklinde olduğu görüldü.



Şekil 8. *PTEN* geni ekzon 2'de SSCP tekniği sonrası farklı gözlenen bantların poliakrilamid jel fotoğrafı. Kuyucuklar **1, 3, 5, 7 ve 9** hastaların tümör dokularından elde edilen DNA örneklerinin PZR sonucu elde edilen bant örnekleri; Kuyucuklar **2, 4, 6, 8 ve 10** hastaların normal dokularından elde edilen DNA örneklerinin PZR sonucu elde edilen bant örnekleri, **M:** DNA markerini (100 bç Vivantis DNA ladder) göstermektedir.

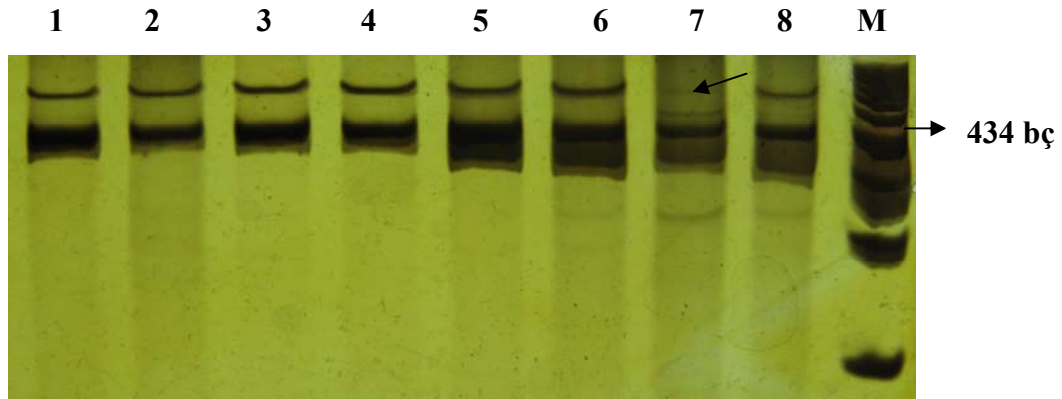
Poliakrilamid jelde bant eksikliği veya fazlalığı şeklinde gözlenen bantlar DNA dizi analizi sonucunda değerlendirildi. DNA dizi analizi yapılan 8 hastaya ait tümör ve normal dokuların tamamında (%100) Tek nükleotid polimorfizmi (TNP) olduğu tespit edildi. Polimorfik bölgede kullanılan primerlerin dizaynı ekzon bölgelerine ilaveten intronik bölgeleri de içermektedir. Mevcut çalışmada tespit edilen TNP geri yönlü analizde intronik bölgede bulunan 8402202 bç pozisyonunda, 401. nükleotitte ve C/T genotipinde bulunmaktadır. Söz konusu bölge önceden tanımlanmış olup referans numarası 1903858'dir (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=1903858). TNP'lerin DNA dizi analizi sonrasında yapılan 8 hastanın tümör ve normal dokuların tümünde (%100) heterozigot formda olduğu tespit edildi (Şekil 9).



Şekil 9. a. 401 C normal genotipli kontrol DNA' sı kullanılan bireye ait DNA dizi analizi grafiği, **b.** 401 C/T heterozigot genotipli bireye ait DNA dizi analizi grafiği.

PTEN geni ekzon 6'da 47 hastaya ait tümör ve normal doku DNA'larının PZR örnekleri TİUP tekniği sonrasında 8'inde bant farklılığı bulunduğu gözlemlendi. Ancak DNA dizi analizi sonucunda herhangi bir değişiklik olmadığı belirlendi.

Çalışmamızda kullanılan üçüncü ekzon olan ekzon 3'te ise PZR-TİUP tekniği sonrası incelendiğinde 7 hastanın normal ve tümör dokularında bant farklılığı gözlemlendi (Şekil 10).



Şekil 10. *PTEN* geni ekzon 3'de SSCP tekniği sonrası farklı gözlenen bantların poliakrilamid jel fotoğrafı. Kuyucuklar 1, 3, 5 ve 7 hastaların tümör dokularından elde edilen DNA örneklerinin PZR sonucu elde edilen bant örnekleri; Kuyucuklar 2, 4, 6 ve 8 hastaların normal dokularından elde edilen DNA örneklerinin PZR sonucu elde edilen bant örnekleri, M: DNA markerini (100 bç Vivantis DNA ladder) göstermektedir.

TİUP tekniği sonrası bant eksikliği veya fazlalığı şeklinde farklılık gözlenen 7 hastaya ait tümör ve normal doku örnekleri DNA dizi analizi sonucunda

değerlendirildi. Tümör ve normal doku örneklerinin tamamında (%100) geri okumalarda G63A'de heterozigot pikler gözlemlendi (Şekil 11). Fakat heterozigot piklerin sadece geri okumalarda mevcut olup ileri okumalarda bulunmamasından dolayı background (zemin) kirliliği olabileceği düşünülüp bu farklılıklar göz önüne alınmadı. Ayrıca bölgeyi kesen restriksiyon enzimi (RE) bulunmadığından restriksiyon fragmenti uzunluk polimorfizmi (PZR –RFLP) tekniği ile de farklılık olduğu düşünülen bölge teyit edilemedi (<http://www.restrictionmapper.org/cgi-bin/sitefind3.pl>).



Şekil 11. G63A heterozigot genotipli hastanın tümör dokusuna ait DNA dizi analizi grafiği.

PTEN geni intron 1'de tespit edilen TNP'ler ile çalışmamızda kullanılan gastrik tümörlerin lokalizasyonu arasındaki ilişki incelendiğinde; korpus bölgesinde (3/8), büyük kurvaturda (2/8), pilör bölgesinde (1/8), antrum bölgesinde (1/8) ve küçük kurvaturda (1/8) şeklinde olduğu görülmüştür (Tablo 4). Bu oranlara bakıldığında çalışmamızda popülasyon çalışmaları gibi geniş hasta sayısı bulunmamasına rağmen TNP bulunan hastaların tümör lokalizasyonlarının diğer bölgelere göre korpus bölgesinde yoğunlaştığı görülmektedir.

Tablo 4. Tümör lokalizasyonları ile TNP'li hastalar arasındaki dağılım



5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Gastrik kanserler kansere bağlı ölümlerin en sık nedenlerinden biridir. Dünyada hastalığın görülme sıklığı giderek düşüş göstermesine rağmen; bazı bölgelerde kanser ölümlerinde önemli bir yer tutmaya devam etmektedir (Greenle ve ark 2001, Parkin ve ark 2001). GK'li hastaların çoğunluğunu 50 ve 70'li yaşlar arasındaki bireyler oluşturmaktadır. Cinsiyete göre ise erkeklerde sıklığı bayanlara göre yaklaşık iki kat daha fazla görülmektedir (Christie ve ark 1997, Sipponen ve Correa 2002). GK'lerin %90-95' ini adenokarsinomlar oluşturur ve tümör lokalizasyonları daha sıklıkla pilörük kısımda yer alır (Gunderson ve ark 2000, Portnoy 2006).

GK'lerin oluşumunda diğer pek çok kanser türünde olduğu gibi çevresel ve genetik faktörlerin bir araya gelmesi önemli bir yer tutar. Özellikle son yıllarda yapılan moleküler düzeydeki genetik çalışmalar karsinogenez sürecinde hücrede meydana gelen değişikliklerin gastrik karsinogenez mekanizmasında da etkili faktörlerden olabileceğini göstermiştir (You ve ark 2000, Werner ve ark 2001, Ebert ve Malfertheiner 2002).

Gastrik kanser hücrelerinde belirlenen moleküler ve genetik değişiklikler arasında temel olarak bilinenleri onkogenlerin aktivasyonu ve tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonudur (Lee ve ark 2003, Shimada ve ark 2004). Onkogenler normal hücrelerin malign trasformasyonuna neden olurken, TBG (tümör baskılayıcı gen) ler ise negatif düzenleyici rol oynayarak tümör gelişimine engel olurlar.

TBG'ler son derece heterojen olup nöbetçi (gatekeeper), kontrol edici (caretaker) ve landscaper genler olmak üzere 3 gruba ayrılmaktadır. Son yıllarda ayrı bir grup olarak ele alınan tümör baskılayıcı genlerin üçüncü grubu olan landscaper genler birbirleriyle etkileşimli birçok sinyal yolağında çok sayıda geni kontrol etmekle kalmaz onların iletişimini de sağlarlar (Kinzler ve Vogelstein 1998, Nussbaum ve ark 2005). *PTEN* geni; hücre içi sinyal iletiminde yer alan yolaklardan *PI3K/AKT* yolağında görev alan landscaper genlerden biridir. 403 aminoasitlik bir proteini kodlamaktadır. Bu genin kodladığı proteinler ile hücre büyümesi nasıl kontrol ediliyorsa, aktivitelerindeki anormalliklerde neoplastik hastalıklara neden olabilmektedir (Liu ve ark 1997, Forgacs ve ark 1998, Vlietstra ve ark 1998).

Mevcut çalışmada etiyojisi halen kesin olarak bilinmeyen GK' ler ile *PTEN* geni değişiklikleri arasındaki ilişkinin bulunup bulunmadığını ortaya koymak hedeflenmiştir. Elde edilen verilere göre; *PTEN* geni ekzon 2'de 8 hastaya ait tümör ve normal dokuların tamamında (%100) TNP olduğu gözlemlendi. Ancak polimorfik bölgede kullanılan primerlerin dizaynı ekzon bölgelerine oturduğundan dolayı tespit edilen TNP'nin geri yönlü analizde intronik bölgede bulunan ve literatürde önceden 1903858 referans numaralı 401. nükleotitdeki C/T değişimi olduğu görüldü.

PTEN geninde yaygın görülen genetik varyasyonlardan biri olarak gösterilen bu varyant (rs1903858) ile sadece iki çalışma mevcuttur. Haiman ve ark (2006) yaptıkları multietnik bir çalışmada meme ve prostat kanserleri riski ile *PTEN* geninde rs1903858 varyantını kapsayan varyasyonlar arasındaki ilişkiyi araştırmışlar ve araştırılan allel frekansları ile bu kanserler arasında ilişki bulamamışlardır. Diğer çalışmada ise Treloar ve ark (2007) *PTEN* genindeki varyasyonların endometriozis gelişiminde etkili olmadığını bildirmişlerdir. Her iki çalışmada bizim verilerimizde bulunan rs1903858 varyantını içermektedir. Ancak GK' lerde etkili olabileceği yönünde literatürde çalışma bulunmamaktadır. Bazı TNP alleleri, direk olarak hastalığa katkısı olan genin fonksiyon veya düzenlenmesinde farklılığa yol açan DNA dizi varyantlarıdır. Bu nedenle rs1903858 varyantı gibi ekzon, intron ve diğer kodlanmayan bölgelerdeki TNP'ler GK'lerin gelişiminde etkili olabilir.

Wang ve ark (2003) GK' lerde TNP'lerden farklı olarak *PTEN* geni ekzon 2'de C31T, T34G ve A45G olmak üzere 3 farklı sessiz mutasyon tespit etmişler. Bu araştırmacılar GK'lerin mutasyonların yoğunlaştığı ekzon 2 ve 6 ile bağlantılı olabileceğini bildirmişlerdir.

Çalışmamıza konu olan diğer ekzonlardan biride *PTEN* geni ekzon 6'dır. Elde ettiğimiz veriler doğrultusunda ekzon 6'da herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. Guo ve arkadaşlarının (2008) GK' lerde *PTEN* geni ekzon 5-8'de yaptıkları çalışmada ekzon 7 kodon 297'de AA-TCC mutasyonu, ekzon 7'de (intronik bölge içeren) G-C nokta mutasyonu, ekzon 5' te T-G nokta mutasyonu ve yine ekzon 5'te adenin tek baz delesyonu şeklinde olmuştur. Bulgularında bizim bulgularımıza benzer şekilde ekzon 6'da herhangi bir değişiklik tespit etmemişlerdir. Mevcut çalışma ekzon 5,7,8 incelenememiş olup daha sonrası için planlanmıştır. Buna karşılık Wang ve arkadaşları (2003) nin çalışmasında ise ekzon 6 Tyr188Ser ve

Pro204Thr a.a değişimleri tespit etmişlerdir. Bu bulgu GK'lerde hastaların *PTEN* genlerindeki değişiklikleri populasyondan populusyona değişebileceğini göstermektedir.

PTEN geninde çalıştığımız üçüncü ekzon olan ekzon 3'te tümör ve normal doku örneklerinde bir değişiklik bulunamamıştır. Wang ve ark (2003) bizim çalışmamızla çelişen verilerinde ekzon 3'te Lys62Ile, Ile67Lys aminoasit değişimi ve A66T baz değişimi sonucu nonsense mutasyonlar bulunduğunu belirtmişlerdir.

Mevcut çalışmamız populasyon çalışmalarındaki kadar hasta ve kontrol grubu içermemesine rağmen çalışma grubumuzdaki tümör dokularının TNM sınıflamasında primer tümör lokalizasyonu T3'te %83, nodal tutulumu N2'de %32 ve N3'te %12,7 ve karaciğer metastazı M1'de % 16,7 olarak bulunmuştur. Ayrıca *PTEN* geni intron 1'de tespit edilen TNP'lerin (rs1903858) bulunduğu hastaların gastrik tümör lokalizasyonları ile arasındaki ilişki incelendiğinde; korpus bölgesinde (%37), büyük kurvaturda (%25), pilör bölgesinde (%13), antrum bölgesinde (%21,3) ve küçük kurvaturda (%12) şeklinde olduğu görülmüştür. Literatürlerde (Gunderson ve ark 2000, Portnoy 2006) midenin prepilörük ve antral kısımlarında daha sık gözlenen tümör lokalizasyonları mevcut grupta korpus (%37) bölgesinde yoğunlaşmaktadır.

Çalışmamız sonucunda *PTEN* geni ekzon 3 ve ekzon 6' da meydana gelen değişiklikler ile GK'ler arasında önemli bir ilişki bulunamamıştır. Ancak intron 1'de tespit edilen TNP (rs1903858 varyantı) gen düzenlenmesinde farklılığa yol açabilir. Bu konuda GK'ler ile tespit edilen TNP ile ilgili literatür çalışması bulunmadığından mevcut boşluğun doldurulması ve çalışma-kontrol grubunun artırılarak genin diğer ekzonlarında araştırılması belirlenen hedefler arasındadır.

6.ÖZET

S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ / KONYA-2008

Aysel KALAYCI

Danışman

Doç. Dr. Tülin ÇORA

Gastrik Kanserli Hastalarda *PTEN* Geni Değişikliklerinin Araştırılması

Gastrik kanserler yüksek ölüm oranı ile dünyada en yaygın malignansilerden biridir. Etiyolojisi kesin olarak bilinmemesine rağmen gastrik karsinogenezden birçok çevresel ve genetik faktörler sorumlu tutulmaktadır. Genetik faktörlerin incelendiği birçok çalışmada tümör baskılayıcı genlerdeki değişikliklerle kanser gelişimi arasında ilişki bulunduğu belirtilmektedir. Mevcut çalışmada tümör baskılayıcı genlerden olan *PTEN* geni (ekzon 2, ekzon 3 ve ekzon 6) ile çalışma grubumuzda bulunan gastrik kanserli olgular arasında ilişki bulunup bulunmadığı PZR/TİUP metodu ve DNA dizi analizi kullanılarak incelendi. İnceleme gastrik adenokarsinom tanısı almış 47 hastanın parafin bloklardaki tümörlü dokuları, kontrol grubu olarak aynı hastaların normal dokuları, ayrıca aynı gruptaki 10 hastanın periferik venöz kan örnekleri kullanılarak yapıldı. Çalışma sonucunda *PTEN* geni intron 1'de DNA dizi analizi sonucunda hastalara ait tümör ve normal dokuların tamamında heterozigot formda TNP (Tek Nükleotid Polimorfizmi) bulunmuştur. TNP geri yönlü analizde intronik bölgede bulunan 8402202 bç pozisyonunda, 401. Nükleotide ve C/T genotipinde bulunmaktadır. Mevcut bölge önceden tanımlanmış olup referans numarası rs1903858'dir. Çalışmamızda kullanılan diğer ekzon 3 ve ekzon 6'da ise herhangi bir değişiklik tespit edilmemiştir. Sonuç olarak *PTEN* geni rs1903858

varyantı gibi ekzon, intron ve diğer kodlanmayan bölgelerdeki TNP'ler GK'lerin gelişminde etkili olabilir.

Anahtar Sözcükler: Gastrik kanser, *PTEN* geni, PZR/TIUP metodu, DNA dizi analizi, TNP.

7.SUMMARY

Selcuk University Health Science Institute

Department of Medical Genetics

MASTER THESIS / KONYA-2008

Aysel KALAYCI

Evaluation of *PTEN* gene alterations in patients with gastric cancer

Gastric cancer (GC) is one of the most frequent malignancies in the world with high mortality rates. Although its etiology is not clearly known, many genetics and environmental factors can be hold responsible for gastric carcinogenesis. Many previous researches support that there is a relation between mutations in tumor suppressor genes and cancer progress. The present research has been examined whether there is any relationship between the gastric cancer cases in our working group and *PTEN* gene (exon 2, exon 3 and exon 6) from tumor suppressor genes family by using PCR/SSCP method(s) and DNA sequence analysis. DNA isolation was performed through using paraffin-embedded tumor tissues of 47 patients diagnosed as gastric carcinoma and paraffin-embedded normal tissues of the same patients as control group, also peripheral venous blood samples of 10 patients from the same patient group. As a result, at the end of the sequence analysis, heterozygote form of SNP was found in *PTEN* gene intron 1 of the patients' tumor and normal tissues. The SNP (Single Nucleotide Polymorphism) was found in the position of 8402202 base pair, 401st nucleotide and in C/T genotype. This region was defined before, and reference number is rs 1903858. There was no change determined in the regions of exon 3 and exon 6 used in this study. In conclusion, like the gene of *PTEN*- rs 1903858, Exon, Intron and SNPs which are in other non codable regions can be effective in progress of GCs.

Key Words: Gastric cancer, *PTEN* gene, PCR/SSCP method, DNA sequence analysis.

8. KAYNAKLAR

Aird I, Bentall HH, Roberts F. *A Relationship Between Cancer of Stomach and the ABO Blood Groups. British Medical Journal.* 1953; 799-801.

Bhowmick NA, Chytil A, Plieth D, Gorska A E, Dumont N, Shappell S, Washington MK, Neilson E G, Moses HL. *TGF-beta signaling in fibroblasts modulates the oncogenic potential of adjacent epithelia. Science.* 2004; 303: 848-851.

Birck A, Ahrenkiel V, Zeuthen J, Hou-Jensen K, Guldberg P. *Mutation and allelic loss of the PTEN/MMAC1 gene in primary and metastatic melanoma biopsies. J Invest dermatol.* 2000;114: 277-280.

Bissell M, Radisky D. *Putting Tumors in Context. Nature Reviews Cancer.* 2001; 1: 46-49.

Blanco-Aparicio C, Renner O, Leal JFM, Carnero A. *PTEN, more than the AKT pathway. Carcinogenesis.* 2007; 28 (7) : 1379-1386.

Bobbs A. *Genetic basis of cancer. .*
www.biochem.arizona.edu/classes/bioc461/461CancerNotes2005.pdf

Campisi J. *Aging Tumor Suppression and Cancer: a High Wire act. Mechanisms of Ageing and Development.* 2005; 26: 51-58

Christie J, Shepherd NA, Codling BW, Valori RM. *Gastric cancer below the age of 55: implications for screening patients with uncomplicated dyspepsia. Gut.* 1997; 41: 513-517.

Cooper GM, Hausman RE. *Hücre Moleküler Yaklaşım. Üçüncü baskı. İzmir. Brc Ofset.* 2006; 657-660.

Correa P. *Clinical implications of recent development in gastric cancer pathology and epidemiology. Semin Onco.* 1985;12: 2-10.

Cristofano AD, Pandolfi PP. *The multiple roles of PTEN in tumor suppressor. Cell.* 2000; 100: 387-390.

Cristofano AD, Lian Z, Vilgelm A, Beauparlant SL, Brewer C, Yeager N. *The PTEN/AKT pathway in epithelial tumors. Fox Chase Cancer Center.* 2005;1-4.

Croce CM. *Molecular Origins of Cancer Oncogenes and Cancer. N Engl J Med.* 2008;358:502-11.

Cully M, You H, Levine AJ, Mak TW. *Beyond PTEN Mutations: the PI3K Pathway as an Integrator of Multiple Inputs During Tumorigenesis. Nature Publishing Group.* 2006; 6: 184-192.

Dahia PL, Marsh DJ, Zheng Z, Zedenius J, Komminoth P, Frisk T, Wallin G, Parsons R, Longy M, Larsson C, Eng C. *Somatic deletions and mutations in the Cowden disease gene, PTEN, in sporadic thyroid tumors. Cancer Res* 1997; 57: 4710-4713.

Demirer T, Icli F, Uzunlimoglu O, Kucuk O. *Diet and Stomach Cancer Incidence A Case-Control Study in Turkey. Cancer.* 1990; 65: 2344-2348.

Ebert MPA, Malfertheiner P. *Pathogenesis of Sporadic and Familial Gastric Cancer-Implications for Clinical Management and Cancer Prevention. Aliment Pharmacol Ther.* 2002; 16: 1059-1066.

Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. *Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. Nature.* 2004; 429:457-63.

Engin K, Erişen L. *Baş-boyun Kanserleri. İstanbul. Nobel tıp kitapları.* 2003; 51-55.

Fei G, Ebert MPA, Mawrin C, Leodolter A, Schmidt N, dietzmann K, Malfertheiner P. *Reduced PTEN expression in gastric cancer and in the gastric mucosa of gastric cancer relatives.* *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2002; 14: 29-303.

Forgacs E, Biesterveld EJ, Sekido Y, Fong K, Muneer S, WistubaII, Milchgrub S, Brezinschek R, Virmani A, Gazdar AF, Minna JD. *Mutation Analysis of the PTEN/MMAC1 Gene in Lung Cancer.* *Oncogene.* 1998; 17: 1557 – 1565.

Fuchs CS, Mayer RJ. *Gastric carcinoma.* *N Engl J Med.* 1995;333: 32-41.

Furney SJ, Madden SF, Kisiel TA, Higgins DG, Bigas NL. *Distinct patterns in the regulation and evolution of human cancer genes.* *In Silico Biology.* 2007:8.

Furney SJ, Calvo B, Larranaga P, Lozano JA, Bigas NL. *Prioritization of candidate cancer genes—an aid to oncogenomic studies.* *Nucleic Acids Research,* 2008; 36: 18: 1-9.

Goksel S, *Mide karsinomu patolojisi.* In: *Topuz E, Aykan F, Demir C, ed. Sindirim sistemi kanserleri. Birinci baska. Ofset matbaacılık.* 1998; 202-208.

Grander D. *How do mutated oncogenes and tumor suppressor genes cause cancer?* *Medical Oncology.* 1998; 15: 20-26.

Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murray T, Thun M. *CA Cancer J Clin.* 2001;51: 15-36.

Guleria K, Singh HP, Singh J, Kaur H, Sambyal V. *Non-random Chromosomal Aberrations in Peripheral Blood Leucocytes of Gastrointestinal Tract and Breast Cancer Patients.* *Int J Hum Genet.* 2005; 5(3): 205-211.

Gunderson LL, Donohue JH, Burch PA. *Stomach.* In: *Abeloff's clinical oncology.* 2d ed. New York. 2000:1545-79.

Guo CY, Xu XF, Wu JY, Liu SF. *PCR-SSCP-DNA sequencing method in detecting PTEN gene mutation and its significance in human gastric cancer.* *World J Gastroenterol.* 2008; 14 (24): 3804-3811.

Haiman CA, Stram DO, Cheng I, Giorgi EE, Pooler L, Penney K, Marchand LL, Henderson BE, Freedman ML. *Common Genetic Variation at PTEN and Risk of Sporadic Breast and Prostate Cancer.* *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006;15(5): 1021-1025.

Hatada I, Fukasawa M, Kimura M, Morita S, Yamada K, Yoshikawa T, Yamanaka S, Endo C, Sakurada A, Sato M, Kondo T, Horii A, Ushijima T, Sasaki H. *Genome-wide profiling of promoter methylation in human.* *Oncogene.* 2006; 25: 3059–3064.

Hiyama E, Hiyama K, Yokoyama T, Shay JW. *Immunohistochemical detection of telomerase (h TERT) protein in human cancer tissues and a subset of cells in normal tissues.* *Neoplasia.* 2001; 3(1): 17-26.

Horii A, Han HJ, Shimada M, Yanagisawa A, Kato Y, Yasui W, Tahara E, Nakamura Y. *Frequent replication errors at microsatellite loci in tumors of patients with multiple primary cancers.* *Cancer Res* 1994;56: 668– 74.

<http://www.histopathology-india.net/stomach.jpg>

http://www.journals.cambridge.org/fulltext_content/ERM/E

<http://www.lodebar.org/personal/graphics/stomach04.gif>

http://www.nature.com/v15/n4/fig_tab/7290292f1.html

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=1903858

<http://www.restrictionmapper.org/cgi-bin/sitefind3.pl>

http://rgd.mcw.edu/wg/pathway/phosphatidylinositol_3

<http://www.saglik.gov.tr/TR/BelgeGoster.aspx>

Jass JR, Sobin LH, Watanabe H. *The World Health Organization's Histologic Classification of Gastrointestinal Tumors. A Commentary on the Second Edition.* *Cancer.* 1990; 66: 2162-2167.

Jemal A, Thomas A, Murray T, Thun M. *Cancer J Clin.* 2002;52: 23-47.

Joossnes JV, Hill MJ, Elliot P, Stamler R, Stamler J, Lesaffre E, Dyer A, Nichols R, Kesteloot H. *Dietary Salt, Nitrate and Stomach Cancer Mortality in 24 Countries.* *International Journal of Epidemiology.* 1996; 25: 494-505.

Karasu Z, Akarca US, Ersoz G, Kızıkanat M, Aydın A, Ozutemiz O, Batur Y. *Mide Kanserinde Helicobacter Pylori enfeksiyonu; Kanser dokusunda bakteri varlığının PCR ile belirlenmesi.* *T Klin J Gastroenterohepatol.* 2001, 12: 1-7.

Katso R, Okkenhaug K, Ahmadi K, White S, Timms J, Waterfield MD. *Cellular function of phosphoinositide-3kinases: Implications for development, immunity, homeostasis and cancer.* *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2001; 17: 615-75.

Kelley JR, Duggan JM. *Gastric cancer epidemiology and risk factors.* *Journal of Clinical Epidemiology.* 2003; 1-9.

Kinzler WK, Vogelstein B. *Gatekeepers and caretakers.* *Nature.* 1997; 386: 761-3.

Kinzler WK, Vogelstein B. *Landscaping the Cancer Terrain.* *Science.* 1998; 280: 1036-1037.

Knudson AG. *Antioncogenes and human cancer.* *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1993;90: 10914-10921.

Knudson AG. *Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma.* *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1971;68(4): 820-823.

Kong SH, Park DJ, Lee HJ, Jung HC, Lee KU, Choe KJ, Yang HK. *Clinicopathologic Features of Asymptomatic Gastric Adenocarcinoma Patients in Korea.* *Jpn J Clin Oncol* 2004;34(1)1-7.

Kotnis A, Sarin R, Mulherkar R. *Genotype, phenotype and cancer: Role of low penetrance genes and environment in tumour susceptibility.* *J. Biosci.* 2005; 30:1:93-102.

Larson MV. *Gastric neoplasms, In: Hayser SC, Pardi DS, Poterucha JJ, ed. Mayo Clinic Gastroenterology and Hepatology Board Review. Second Edition. Mayo clinic scientific press taylor& Francis group 2006; 67-69.*

Lauren P. *The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma.* *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 1965;64: 31-49.

Lee HJ, Yang HK, Ahn YO. *Gastric cancer in Korea.* *Gastric Cancer.* 2002;5: 177-82.

Lee SH, Lee JW, Soung YH, Kim HS, Park WS, Kim SY, Lee JH, Park JY, Cho YG, Kim CJ, Nam SW, Kim SH, Lee JY, Yoo NJ. *BRAF and KRAS mutations in stomach cancer.* *Oncogene.* 2003; 22, 6942-6945.

Levitt NC, Hickson LD. *Caretaker tumor suppressor genes that defend genome integrity.* *Trends in Molecular Medicine.* 2002; 8: 179 - 186.

Lewin B. *Genes VIII. U.S.A. Pearson prentice hall.* 2004;892-893.

Lewin KJ, Appelman HD. *Atlas of Tumor Pathology.* Washington DC: Armed Forces Institute of Pathology, 1995.

Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, Puc J, Miliareis C, Rodgers L, McCombie R, Bigner SH, Giovanella BC, Ittmann M, Tycko B, Hibshoosh H, Wigler MH, Parsons R. *PTEN, A Putative Protein Tyrosinephosphatase Gene Mutated in Human Brain, Breast, and Prostate Cancer.* *Science.* 1997; 275: 1943-1947.

Li YL, Tian Z, Wu DY, Fu BY, Xin Y. *Loss of Heterozygosity on 10q23.3 and Mutation of Tumor Suppressor Gene PTEN in Gastric Cancer and Precancerous Lesions.* *World J Gastroenterol.* 2005;11(2): 285-288.

Liu W, James CD, Frederick L, Alderete BE, Jenkins RB. *PTEN/MMAC1 Mutations and EGFR Amplification in Glioblastomas.* *Cancer research.* 1997; 57: 5254-5257.

Liotta LA, Liu ET. *Essentials of molecular biology: Genomics and cancer,* In: De Vita TV, Hellman S, Rosenberg A, ed. *Cancer principles & practice of oncology.* 6th edition. USA. Lippincot Williams & Wilkins 2001; 18-28.

Macleod K. *Tumor Suppressor Genes.* *Current Opinion in Genetics and Development.* 2000; 10: 81-93.

Maehama T, Dixon JE. *The tumor supressor PTEN/MMAC1 Dephosphorylates the Lipid Second Messenger, Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphate.* *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 13375-13378.

Mayne ST, Risch HA, Dubrow R, Chow WH, Gammon MD, Vaughan TL, Farrow DC, Schoenberg JB, Stanford JL, Ahsan H, West AB, Rotterdam H, Blot WJ, Fraumeni JM. *Nutrient Intake and Risk of Subtypes of Esophageal and Gastric Cancer.* *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention.* 2001; 10: 1055-1062.

Mehta VK, Fisher G. *Gastric cancer.* Accessed January 22, 2004 at, <http://www.emedicine.com/med/topic845.htm>.

Michor F, Iwasa Y, Komarova NL, Nowak MA. *Local Regulation of Homeostasis Favors Chromosomal Instability.* *Current Biology.* 2003; 13: 581-584.

Minaguchi T, Yoshikawa H, Oda K, Ishino T, Yasugi T, Onda T, Nakagawa S, Matsumoto K, Kawana K, Taketani Y. *PTEN Mutation Located Only Outside Exons 5,6, and 7 is an Independent Predictor of Favorable Survival in Endometrial Carcinomas.* *Clinical Cancer Research,* 2001; 7: 2636-2642.

Momparler RL. *Cancer epigenetics.* *Oncogene.* 2003; 22: 6479-6483.

Muta H, Noguchi M, Kanai Y, Ochiai A, Nawata H, Hirohashi S. *E-cadherin gene mutations in signet ring cell carcinoma of the stomach.* *Jpn J. Cancer res.* 1996; 87: 843-848.

Myers MP, Pass I, Batty IH, Van der Kaay J, Stolarov JP, Hemmings BA, Wigler MH, Downes CP, Tonks NK. *The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for its tumor supressor function.* *Proc Natl Acad Sci.* 1998; 95: 13513-13518.

Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. *Thompson δ Thompson tubbi genetik.* *Altinci baski. İstanbul. Öncü Basimevi.* 2005; 320.

Palli D. *Epidemiology of gastric cancer: an evaluation of available evidence.* *J Gastroetiterol* 2000; 35: 84-89.

Panani AD, Ferti A, Malliaros S, Raptis S. *Cytogenetic study of 11 gastric adenocarcinomas.* *Cancer Genet Cytogenet.* 1995; 81(2):169-72.

Parkin DM, Muir CS, Whelan YT, Gao J, Ferlay J, Powell J. *Cancer in five continents. Vol VI. IARC Scientific Publication No. 120. Lyon: IARC; 1992.*

Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J. *Cancer Incidence in Five Continents, vol VII. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 1997: 822-823.*

Parkin DM, Bary FI, Devesa SS. *Cancer burden in the year 2000. The global picture. European Journal of Cancer. 2001; 37: 4–66.*

Playford RJ. *Landscaper seeks remunerative position. Gut. 2001;48: 594–595.*

Portnoy L.M. *Radiologic Diagnosis of Gastric Cancer. First Auflage. Medizin Verlag Heidelberg. Gedruckt auf säurefreiem Papier. 2006; 12-13.*

Richens KW, Williamson J, Bevan S, Young J, Leggett B, Frayling I, Thway Y, Hodgson S, Kim JC, Iwama T, Novelli M, Sheer D, Poulson R, Wright N, Houlston R, Tomlinson I. *Allelic Loss at SMAD4 in Polyps from Juvenile Polyposis Patients and Use of Fluorescence in Situ Hybridization to Demonstrate Clonal Origin of the Epithelium. Cancer Research. 2000; 60: 2477–2482.*

Saal LH, Johansson P, Holm K, Gruvberger-Saal SK, She QB, Maurer M, Koujak S, Ferrando AA, Malmström P, Memeo L, Ísola J, Bendahl PO, Rosen N, Hibshoosh, Ringner M, Borg A, Parsons R. *Poor prognosis in carcinoma is associated with a gene expression signature of aberrant PTEN tumor suppressor pathway activity. PNAS. 2007; 104(18): 7564-7569.*

Sato K, Tamura G, Tsuchiya T, Endoh Y, Sakata K, Motoyama T, Usuba O, Kimura W, Terashima M, Nishizuka S, Zou T, Meltzer SJ. *Analysis of Genetic and Epigenetic Alterations of the PTEN Gene in Gastric Cancer. Virchows Arch. 2002; 440:160–165.*

Schulz WA. *Human biology of human cancers. Netherlands. Springer. 2005; 25-354.*

Seruca R, Castedo S, Correia C, Gomes P, Carneiro F, Soares P, de Jong B, Sobrinho-Simões M. *Cytogenetic findings in eleven gastric carcinomas. Cancer Genet Cytogenet. 1993; 68(1):42-8.*

Shekhar MP, Pauley R, Heppner G. *Host microenvironment in breast cancer development: extracellular matrixstromal cell contribution to neoplastic phenotype of epithelial cells in the breast; Breast Cancer Res. 2003; 5: 130–135.*

Shibata A, Longacre TA, Puligandla B, Parsonnet J, Habel LA. *Histological Classification of Gastric Adenocarcinoma for Epidemiological Research: Concordance between Pathologists. Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention. 2001; Vol. 10, 75–78.*

Shimada Y, Yamasaki S, Hashimoto Y, Ito T, Kawamura JI, Soma T, Ino Y, Nakanishi Y, Sakamoto M, Hirohashi S, Imamura M. *Clinical Significance of Dysadherin Expression in Gastric Cancer Patients. Clinical Cancer Research. 2004; 10: 2818–2823.*

Signh S, Poulson R, Wright NA, Sheppard MC, Langman MJS. *Differential Expression of Oestrogen Receptor and Oestrogen Inducible Genes in Gastric Mucosa and Cancer. Gut. 1997; 40: 516-520.*

Sipponen P, Correa P. *Delayed Rise in Incidence of Gastric Cancer in Females Results in Unique Sex Ratio (M/F) Pattern: Etiologic Hypothesis. Gastric Cancer. 2002; 5: 213–219.*

Sobin L, Wittekind C. *UICC: TNM classification of malignant tumours. 5th ed. New York. 1997.*

Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, Yung WK, Lin H, Ligon AH, Langford LA, Baumgard ML, Hattier T, Davis T, Frye C, Hu R, Swedlund B, Teng DH, Tavtigian SV. *Identification of a Candidate Tumour Suppressor Gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is Mutated in Multiple Advanced Cancers. Nat Genet. 1997; 15: 356-362.*

Stomach in: American Joint Committee on Cancer: AJCC Cancer Staging Manual. 5th ed. Philadelphia, Pa: Lippincott-Raven Publishers, 1997; 71–76.

Sud R, Wells D, Talbot IC, Delhanty JDA. Genetic alterations in gastric cancers from British patients. *Cancer Genetics and Cytogenetics.* 2001;126: 111–119.

Sun H, Lesche R, Li DM, Liliental J, Zhang H, Gao J, Gavriloa N, Mueller B, Liu X, Wu H. PTEN modulates cell cycle progression and cell survival by regulating phosphatidylinositol 3,4,5,-triphosphate and Akt/protein kinase B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci.* 1999; 96: 6199-6204.

Tamura G, Kihana T, Nomura K, Terada M, Sugimura T, Hirohashi S. Detection of Frequent p53 Gene Mutations in Primary Gastric Cancer by Cell Sorting and Polymerase Chain Reaction Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis. *Cancer research.* 1991;51: 3056-3058.

Treolar SA, Zhao ZZ, Le L, Zondervan KT, Martin NG, Kennedy S, Nyholt DR, Montgomery GW. Variants in EMX2 and PTEN do not contribute to risk of endometriosis. *Molecular Human Reproduction.* 2007; 13(8):587–594.

Tsugawa K, Jones MK, Sugimachi K, Sarfeh IJ, Tarnawski AS. Biological role of phosphatase PTEN in Cancer and Tissue Injury Healing. *Frontiers in Bioscience.* 2002; 7: 245-251.

Uchino S, Tsuda H, Noguchi M, Yokota J, Tirada M, Saito T, Kobayashi M, Sugimura T, Hirohashi S. Frequent Loss of Heterozygosity at the DCC Locus in Gastric Cancer. *Cancer research.* 1992; 52: 3099-3102.

Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, Matsumura N, Yamaguchi S, Yamakido M, Taniyama K, Sasaki N, Schlemper RJ. Helicobacter pylori infection and the development of gastric cancer. *N Engl J Med* 2001; 345:784-9.

Vanhaesebroeck B, Alessi DR. The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem.* 2000; 346(3):561-76.

Van Nederven FH, Perren A, Dannenberg H, Petri BJ, Dinjens WN, Komminoth P, De Krijger RR. PTEN gene loss, but not mutation, in benign and malignant pheochromocytomas. *J Pathol.* 2006;209(2):274-80.

Vile R. Tumour suppressor genes. *BMJ.* 1989; 298: 1335-1336.

Vlietstra RJ, van Alewijk DC, Hermans KG, van Stenbrugge GJ, Trapman J. Frequent inactivation of PTEN in prostate cancer cell lines and Xenografts. *Cancer res.* 1998; 58: 2720-2723.

Vogelstein B, Kinzler KW. The genetic basis of human cancer. 1998;Mcgraw-hill.

Wang JY, Huang TJ, Chen FM, Hsieh MC, Lin SR, Hou MF, Hsieh JS. Mutation Analysis of the Putative Tumor Suppressor Gene PTEN/MMAC1 in Advanced Gastric Carcinomas. *Virchows Arch.* 2003; 442:437-443.

Wang LH, Kim SH, Lee JH, Choi YL, Kim YC, Park TS, Hong YC, Wu CF, Shin YK. Inactivation of SMAD4 Tumor Suppressor Gene During Gastric Carcinoma Progression. *Clin Cancer Res.* 2007;13(1).102-110.

Werner M, Becker KF, Keller G, et al. Gastric adenocarcinoma: pathomorphology and molecular pathology. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2001; 127: 207–16.

Wu X, Senechal K, Neshat MS, Whang YE, Sawyers CL. The PTEN/MMAC1 tumor suppressor phosphatase functions as a negative regulator of the phosphoinositide 3- kinase/Akt pathway. *Proc Natl Acad Sci.* 1998; 95: 15587-15591.

Yalcin B, Zengin N, Aydın F, İlhan M, Isıkdogan A, Demir G, Aykan F, Celik I, Dane F, Ustuner Z, Boruban MC, Bozcuk H, Coskun HS, Karaoglu A, Altınbas M, Yamac D, Tek I, Budakoglu

B, Utkan G, Ozdemir F, Aksoy S, Ozdemir N, Akbulut H, Buyukcelik A, Icli F. *The Clinical and Pathological Features of Patients with Gastric Cancer in Turkey: A Turkish Oncology Group Study. Turkish Journal of Cancer.* 2006; 36: 108-115.

Yamamoto S. *Stomach cancer incidence in the world. Jpn J Clin Oncol.* 2001; 31: 471.

Yang L, Kuang LG, Zheng HC, Li JY, Wu DY, Zhang SM, Xin Y. *PTEN Encoding Product: A Marker for Tumorigenesis and Progression of Gastric Carcinoma. World J Gastroenterol.* 2003; 9(1):35-39.

You WC, Ma JL, Liu WD, Gail MH, Chang YS, Zhang L, Hu YR, Fraumeni JF, Xu GW. *Blood Type and Family Cancer History in Relation to Precancerous Gastric Lesions. International Journal of Epidemiology.* 2000; 29: 405-407.

You WC, Zhang L, Gail MH, Chang YS, Liu WD, Ma JL, Li JY, Jin ML, Hu YR, Yang CS, Blaser MJ, Correa P, Blot WJ, Fraumeni JF, Xu GW. *Gastric Dysplasia and Gastric Cancer: Helicobacter Pylori, Serum Vitamin C, and Other Risk Factors. Journal of the National Cancer Institute.* 2000; 92: 1607-1612.

Zhang M, Wang L, Wang J, Wu H, Li H, Xing G, Wu A, Feng X, Liu B, Fan Z, Xin H. *Hypermethylation of tumor suppressor genes in carcinogenesis of human gastric cardia adenocarcinoma. Life Science Journal.* 2007; 4(2): 15– 18.

Zhu J. *DNA methylation and hepatocellular carcinoma. J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 2006; 13: 265–273.

Zingde SM. *Cancer genes. Current Science,* 2001; 81: 5: 508-514.

9. ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında Konya’da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Konya’da tamamladı. 2002 yılında Selçuk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandı ve 2005 yılında mezun oldu. Aynı yıl Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimine başladı ve halen eğitimine devam etmektedir.