

T.C.
AFYONKARAHİSAR SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

**FARKLI EVRE VE DERECELERDEKİ MEME KANSERLİ
HASTALARDA *PTEN* GENİNİN İFADELENME
DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

HATİCE ARZU ÖZYÜREK
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üy. Evrim Suna ARIKAN

2020 –AFYONKARAHİSAR

T.C.
AFYONKARAHİSAR SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

**FARKLI EVRE VE DERECELERDEKİ MEME KANSERLİ
HASTALARDA *PTEN* GENİNİN İFADELENME
DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Hatice Arzu ÖZYÜREK
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üy. Evrim Suna ARIKAN

**Bu çalışma; Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma
Projeleri Birimi tarafından 19.LİS.002 kodlu proje ile desteklenmiştir.**

2020 –AFYONKARAHİSAR

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Yüksek Lisans Öğrencisinin

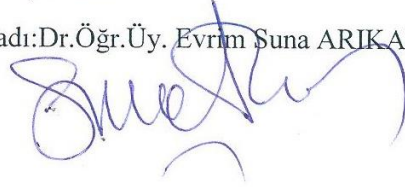
Danışmanın

Adı Soyadı: Hatice Arzu ÖZYÜREK Adı Soyadı: Dr. Öğr. Üy. Evrim Suna ARIKAN

İmza



İmza



KABUL VE ONAY

Dr.Öğr.Üy.Evrım Suna ARIKAN danışmanlığında Hatice Arzu ÖZYÜREK tarafından hazırlanan “FARKLI EVRE ve DERECELERDEKİ MEME KANSERLİ HASTALARDA *PTEN* GENİNİN İFADELENME DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tıbbi Genetik Anabilim Dalında yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

13..10.21..2020

JÜRİ:

Başkan: Prof.Dr. Mustafa SOLAK, AFSÜ Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik AD.

Üye: Dr.Öğr.Üy.Evrım Suna ARIKAN, AFSÜ Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji AD.

Üye: Dr.Öğr.Üy.H.İbrahim KENGER, GİBTÜ, Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik AD.

ONAY :

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun 05.08.2020 tarih ve 2020-20.... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....
Prof.Dr. Mustafa SOLAK Enstitü Müdürü
Y. 74 mif

TEŞEKKÜR

Eğitim olanaklarımızı en üst seviyede oluşturan ve yönlendiren Anabilim Dalı Başkanımız Sayın *Prof. Dr. Mustafa SOLAK* başta olmak üzere akademi yolculuğumda yanımda olan tez projemin hazırlanması, yürütülmesi ve yazımının her aşamasında bilgi ve önerileri ile beni yönlendirerek destek olan, yardımını esirgemeyen danışmanım *Dr.Öğr.Üy. Evrim Suna ARIKAN*'a teşekkürlerimi sunarım.

Bu süreçte hep benim yanımda olan, sevgilerini ve desteklerini daima hissettiğim çalışmada benimle deneyimlerini paylaşan, yol gösteren, destek olan ve her şeyden önemlisi bana değer verdiklerini her fırsatta hissettiren, en sıkıntılı anlarımda bile beni güldüren, moral kaynaklarım olan ablam gibi çok değer verdiğim Acil Tıp Anabilim Dalı Başkanı *Sn. Doç. Dr. Şerife ÖZDİNÇ*'e ve yakın arkadaşlarım; *Arş. Gör. Dr. Başak GÖĞÜŞ*'e, ve *Dr. Gamze KAYA*'ya teşekkür ederim.

Manevi desteğini her zaman yanımda hissettiğim, yaşamdaki yol göstericim ve en önemli destekçilerimden biri olan kalbimin diğer yarısı canım kardeşim **F. Kübra ÖZYÜREK**'e teşekkür eder, kalbi kadar güzel bir yaşam dilerim.

Beni bugünlere sevgi ve ilgi ile getiren, her anımda her zaman yanımda olan, imkansızlıklar içinde imkan yaratan, aldığım kararlarda her daim arkamda durup destek olan, her zaman başaracağıma inanan, yol gösteren, süreci benim kadar yoğun yaşayan, emeklerini ve haklarını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim hayattaki en değerli varlıklarım olan **Babam Nurettin** ve **Annem Zeynep ÖZYÜREK**'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

.

H. Arzu ÖZYÜREK

Afyonkarahisar, Temmuz 2020

Farklı Evre Ve Derecelerdeki Meme Kanserli Hastalarda *PTEN* Geninin İfadeleme Düzeylerinin Araştırılması

Hatice Arzu ÖZYÜREK

**Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi
Temmuz 2020
Dr. Öğr. Üy. Evrim Suna ARIKAN**

ÖZET

Meme kanseri, kadınlarda en sık görülen ve ölümle sonuçlanmasına neden olan malignitedir. Günümüzde yeni yaklaşımlar ve yöntemler geliştirilmesine rağmen hastalığın insidansındaki artış meme kanserini çok önemli bir sağlık sorunu haline getirmiştir. Meme kanserinin gelişimine genetik ve çevresel faktörler etki etmektedir. Yapılan birçok çalışmada *PTEN*'in meme kanserleri içinde önemli bir tümör baskılayıcı gen olduğunu ve kaybının memede karsinogenezi indüklediği belirlenmiştir.

Çalışmamızda *PTEN* geninin mRNA ekspresyon seviyeleri, meme kanseri tanısı alan 31 olgunun tümör dokuları ve periferik kan örnekleri ile 5 sağlıklı bireye ait meme dokuları ile periferik kan örneklerinde belirlendi. Analizler için Eş-Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu yöntemi kullanıldı. Elde edilen sonuçlar, REST 2009 software programıyla değerlendirilmiştir. Çalışmamızda, meme kanserli hastaların tümör dokuları ve periferik kan örneklerinde *PTEN* gen ekspresyon değişimleri değerlendirildiğinde toplam 31 hastanın 15'inde down regülasyon, 16'sında up regülasyon gözlenmiştir. Bu değişimlerin %32,3'ü istatistiksel olarak önemli seviyededir ($P<0,05$). Önemli seviyedeki bu değişimlerin %30'u down regülasyon %70'i up regülasyondur. Meme kanserli hastaların periferik kan örneklerinde *PTEN* gen ekspresyon değişimleri değerlendirildiğinde ise toplam 31 hastanın 23'ünde down regülasyon, 8'inde up regülasyon gözlenmiştir. Bu değişimlerin %58,1'i istatistiksel olarak önemli seviyededir ($P<0,05$). Önemli seviyedeki bu değişimlerin %83,3'ü down regülasyon, %16,7'si up regülasyondur. Kan ve doku arasında *PTEN* geni ekspresyon davranışları bakımından zıtlık söz konusudur. Bunun yanı sıra, meme kanseri Evre IIA'da bulunan olguların periferik kan örneklerinde analiz edilen *PTEN* gen ekspresyonundaki down regülasyon %92,9 oranıyla dikkat çekmektedir. Grad I-II-III'de bulunan meme kanserli hastalarda *PTEN* gen ekspresyonu değerlendirildiğinde her histolojik gradda tümör dokusunda *PTEN* geni up regüle iken periferik kanda down regüle olduğu öne çıkmaktadır.

Genel olarak sonuçlarımız değerlendirildiğinde, meme kanserli olguların periferik kanında *PTEN* geninin mRNA düzeylerindeki azalmanın (down regülasyon), erken evre teşhisinde potansiyel bir bulgu olabileceğini düşünmekteyiz. Bu veriler yeni geniş kapsamlı çalışmalara ışık tutacaktır.

Anahtar Kelimeler: Meme tümörü, gen ekspresyonu, farklı evre, biyobelirteç, *PTEN*

Investigation of *PTEN* Gene Expression Levels in Patients with Different Stages and Grades of Breast Cancer

Hatice Arzu ÖZYÜREK

**Afyonkarahisar University of Health Sciences
Institute of Graduate Education Department of Medical Genetic M.Sc. Thesis**

Temmuz 2020

Dr. Öğr. Üy. Evrim Suna ARIKAN

ABSTRACT

Breast cancer is the most common malignancy in women that causes death. Although new approaches and methods are being developed today, the increase in the incidence of the disease has made breast cancer a very important health problem. Genetic and environmental factors affect the development of breast cancer. In many studies, it has been determined that *PTEN* is an important tumor suppressor gene for breast cancers and its loss induces carcinogenesis in the breast.

In our study, mRNA expression levels of *PTEN* gene were determined in tumor tissues and peripheral blood samples of 31 cases diagnosed with breast cancer, and breast tissues and peripheral blood samples of 5 healthy individuals. Real-Time Polymerase Chain Reaction method was used for the analysis. The results were evaluated with the REST 2009 software program. In our study, when *PTEN* gene expression changes were evaluated in tumor tissues and peripheral blood samples of breast cancer patients, down regulation was observed in 15 of 31 patients and up regulation was observed in 16 of 31 patients. 32.3% of these changes are statistically significant ($P<0.05$). 30% of these significant changes are down regulation and 70% is up regulation. When *PTEN* gene expression changes in peripheral blood samples of breast cancer patients were evaluated, 23 of 31 patients were down-regulated and 8 were upregulated. 58.1% of these changes are statistically significant ($P<0.05$). 83.3% of these significant changes are down regulation and 16.7% are up regulation. There is a contrast between *PTEN* gene expression behavior between blood and tissue. In addition, the down regulation in *PTEN* gene expression, which was analyzed in peripheral blood samples of patients with breast cancer stage IIA, attracts attention with 92.9%. When *PTEN* gene expression is evaluated in patients with breast cancer found in Grad I-II-III, it appears that *PTEN* gene is regulated up in tumor tissue in every histological grade while down regulated in peripheral blood.

In general, when our results are evaluated, we think that the decrease in the mRNA levels of the *PTEN* gene (down regulation) in the peripheral blood of breast cancer cases may be a potential finding in early stage diagnosis. These data will shed light on new comprehensive studies.

Key Words: Breast cancer, Gene expression, different stage, biomarker, *PTEN*

İÇİNDEKİLER

Sayfa

T.C.....	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK	ii
KABUL VE ONAY	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
KISALTMALAR	x
TABLO DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
GRAFİKLER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Meme Anatomisi	4
2.2. Meme Kanserlerinin Epidemiyolojisi ve İnsidansı	5
2.3. Meme Kanserinin Etiyolojisi.....	5
2.4. Meme Kanserlerinde Risk Faktörleri	6
2.4.1. Demografik Özellikler	6
2.4.2. Reprodüktif Öykü	7
2.4.3. Ailesel/Genetik Risk Faktörleri	7
2.4.4. Çevresel Faktörler.....	8
2.5. Kanser ve Genetiği	8
2.5.1. Onkogenler	8
2.5.2. Tümör Baskılayıcı Genler.....	11
2.6. Fosfataz Ve Tensin Homolog (<i>PTEN</i>)	13
2.6.1. Yapısı.....	13
2.6.2. Fonksiyonu	14
2.6.3. <i>PTEN</i> Protein Yapısı.....	17
2.6.4. <i>PTEN</i> Gen Mutasyonları.....	17

2.6.5. <i>PTEN</i> Geni ve Kanseri İlişkisi	19
2.7. İmmünohistokimyasal Yöntem ve Tanısal Belirleyiciler	20
2.7.1. Biotin-Streptavidin Sistemi	20
2.7.2. Sinyal Oluşturan Sistemler	20
2.7.3. Belirteçler	21
2.7.3.1. P53 Tümör Süpresör Geni	21
2.7.3.2. <i>Cerb-B2</i>	21
2.7.3.3. <i>Ki67</i>	21
2.7.3.4. Östrojen / Progesteron Reseptör (ER/PR)	22
2.8. Eş-Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Yöntemi (Real-Time Polymerase Chain Reaction)	22
2.8.1. SYBR Green PZR Nedir?	24
3. GEREÇ VE YÖNTEM	26
3.1. Örnek Toplanması	26
3.2. Histolojik Grade Belirlenmesi ve İmmünohistokimyasal İnceleme	26
3.3. Meme Kanseri Evreleme	29
3.4. Dokulardan Total RNA İzolasyonu	29
3.5. Kandan Total RNA İzolasyonu	30
3.6. cDNA Sentezi	31
3.7. <i>PTEN</i> ve <i>GAPDH</i> için Reaksiyon Etkinliklerinin Belirlenmesi	32
3.8. <i>PTEN</i> genine ait mRNA seviyelerinin Eş Zamanlı PZR ile Ölçülmesi	33
4. BULGULAR	35
4.1. Olgulara Ait Klinik ve Demografik Özellikler	35
4.2. <i>PTEN</i> Genine İlişkin mRNA Analizleri	35
4.3. Meme Kanseri Olgularının Tümör Dokularında ve Periferik Kanlarında İfade Edilen <i>PTEN</i> Genine İlişkin mRNA Analizleri	37
4.4. Farklı Evrelerde Bulunan Meme Kanseri Olgularının Tümör Dokularında ve Periferik Kanlarında İfade Edilen <i>PTEN</i> Genine İlişkin mRNA Analizleri	38
4.5. Grade I-II-III'de Bulunan Meme Kanseri Olgularının Tümör Dokularında ve Periferik Kanlarında İfade Edilen <i>PTEN</i> Genine İlişkin mRNA Analizleri	41
4.6. Meme Kanseri Hastalarının Cerrahi Evre, Histolojik Grade, <i>PTEN</i> gen Ekspresyonu, ER, PR, <i>CerbB2</i> , <i>ki67</i> ve p53 İmmünohistokimyasal Sonuçları	42

4.6.1. <i>PTEN</i> Gen Ekspresyon Değişimlerinin ER ve PR Durumları İle	
Değerlendirilmesi	42
5. TARTIŞMA	46
5.1. Meme Kanseri ile <i>PTEN</i> Gen İfadesinin İlişkisi	47
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	55
7. KAYNAKLAR	57
EKLER.....	68
Ek. 1. İntihal Raporu	68
Ek. 2. Etik Kurul İzin Raporu.....	69
ÖZGEÇMİŞ	70

KISALTMALAR

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AJCC	American Joint Committee On Cancer
BMI	Vücut Kitle İndeksi
BRCA1/2	(Breast Cancer Gene 1/2) Meme Kanseri Geni 1/2
c-DNA	(complementer DNA) komplementer DNA
c-Myc	cellular – Myelocytomatosis
Ct	Cycle Threshold (Eşik Değer)
ER	Österojen Reseptörü
FISH	Fluresence İn Situ Hybridization
EGFR	Epidermal büyüme faktör reseptör
HER-2	İnsan Epidermal Büyüme Faktör reseptörü 2
GAPDH	Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz
İHK	İmmünohistokimyasal
KT	Kemoterapi
N	Nodal Tutulum
NI	Nöral İnvazyon
ER	Östrojen Reseptörü
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
p53	Protein 53
PR	Progesteron reseptörü
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PTEN	Fosfataz ve Tensin Homologları
Real-time PCR	Eş zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RT	Reverse transkripsiyon
RT	Radyoterapi
T	Tümör Boyutu

TABLO DİZİNİ

Sayfa

Tablo 3.1: Nottingham dereceleme sistemi	27
Tablo 3.2: Meme kanseri TNM evrelemesi.....	29
Tablo 3.3: cDNA sentez reaksiyon karışımı.....	32
Tablo 3.4: cDNA sentezi reaksiyon protokolü	32
Tablo 3.5: Eş zamanlı PZR reaksiyon karışımı	33
Tablo 3.6: <i>PTEN</i> ve <i>GAPDH</i> amplifikasyon protokolü.....	34
Tablo 3.7: Hedef genlere ve referans gene ait baz dizileri	33
Tablo 4.1: Olgulara ait klinik ve demografik özellikler	35
Tablo 4.2: Meme Kanserli hastalara ait <i>PTEN</i> gen ekspresyon seviyeleri (Up/down regülasyon), Cerrahi evre, Histolojik grade, immünohistokimyasal durumları.	43
Tablo 4.3: Cerrahi Evre I Meme Kanserli hastalara ait <i>PTEN</i> gen ekspresyon seviyeleri (Up/down regülasyon), histolojik grade ve immünohistokimyasal durumları.....	44
Tablo 4.4: Cerrahi Evre IIA Meme Kanserli hastalara ait <i>PTEN</i> gen ekspresyon seviyeleri (Up/down regülasyon), histolojik grade ve immünohistokimyasal durumları.....	44
Tablo 4.5: Cerrahi Evre IIB Meme Kanserli hastalara ait <i>PTEN</i> gen ekspresyon seviyeleri (Up/down regülasyon), histolojik grade, immünohistokimyasal durumları.	44
Tablo 4.6: Cerrahi Evre IIIA Meme Kanserli hastalara ait <i>PTEN</i> gen ekspresyon seviyeleri (Up/down regülasyon), histolojik grade ve immünohistokimyasal durumları.....	45
Tablo 4.7: Cerrahi Evre IIIB Meme Kanserli hastaya ait <i>PTEN</i> gen ekspresyon seviyeleri (Up/down regülasyon), histolojik grade ve immünohistokimyasal durumları.....	45

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1: Meme anatomisi	4
Şekil 2.2: 10. Kromozomdaki lokasyonu	14
Şekil 2.3: PI3K/AKT/mTOR yolağı.....	16
Şekil 2.4: Amplifikasyon grafiği	23
Şekil 2.5: SYBR Green PZR prensibi (Qiagen, 2014)	24
Şekil 3.1: Çalışmaya aldığımız bir olguya ait RNA ölçüm bilgileri	32
Şekil 4.1: Eş Zamanlı PZR ekspresyon reaksiyon örneği	36
Şekil 4.2: <i>PTEN</i> ve <i>GAPDH</i> erime eğrisi örneği.....	36

GRAFİKLER DİZİNİ

Sayfa

Grafik 4.1: Meme kanserli olguların tümör dokuları ile periferik kan örneklerinde, kontrole göre <i>PTEN</i> gen ekspresyonundaki değişimler.	37
Grafik 4.2: Evre I meme kanserli olguların tümör dokuları ile periferik kan örneklerinde, kontrole göre <i>PTEN</i> gen ekspresyonundaki değişimler....	38
Grafik 4.3: Evre IIA meme kanserli olguların tümör dokuları ile periferik kan örneklerinde, kontrole göre <i>PTEN</i> gen ekspresyonundaki değişimler....	39
Grafik 4.4: Evre IIB meme kanserli olguların tümör dokuları ile periferik kan örneklerinde, kontrole göre <i>PTEN</i> gen ekspresyonundaki değişimler....	39
Grafik 4.5: Evre IIIA meme kanserli olguların tümör dokuları ile periferik kan örneklerinde, kontrole göre <i>PTEN</i> gen ekspresyonundaki değişimler....	40
Grafik 4.6: Evre IIIB meme kanserli olguların tümör dokuları ile periferik kan örneklerinde, kontrole göre <i>PTEN</i> gen ekspresyonundaki değişimler....	40
Grafik 4.7: Grade I-II-III'de bulunan meme kanserli olguların tümör dokuları ile periferik kan örneklerinde, kontrole göre <i>PTEN</i> gen ekspresyonundaki değişimler.	41

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Ülkemizde meme kanseri kadınlarda görülen kanserlerin 24,6'sını oluşturmaktadır ve 2013 yılında 9733 yeni meme kanseri olgusu tespit edilmiştir. 2013 yılında Türkiye'de meme kanseri insidansı 100.000 kişide 45,9 olup, Türkiye'de görülen ilk 5 kanser türünün dünyadaki ve diğer gelişmiş ülkeler ile benzerlikler görülmektedir. Erkeklerde trakea, bronş ve akciğer kanseri, kadınlarda ise meme kanseri en sık görülen kanserlerdir. Ülkemizde 15-24 yaş aralığındaki tüm kadın kanserlerinin %4,9'u, 25-49 yaş aralığındaki kadınların tüm kanserlerinin %33,7'si, 50-69 yaş aralığındaki tüm kadın kanserlerinin %25,4'ü, 70 yaş üzeri tüm kadın kanserlerinin % 14,16'sı meme kanseridir. 2006-2012 tarihleri arasında hastaların 5 yıllık sağkalımı %89,7'dir (T.C.Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu 2016).

Meme kanseri dünyada ve ülkemizde kadınlarda en sık görülen kanserdir. Amerika Birleşik Devletleri'nde ölüme neden olan kanserler arasında 4. sırada meme kanseri yer almaktadır. ABD'de yapılan prevalans ve insidans çalışmalarında; 2013 yılında 3.053.450 kadının meme kanseri olduğu, 232.000 yeni meme kanseri olgusu görüldüğü bildirilmiştir ve 2009-2013 arasında 100.000 ölümün 21,5'inden meme kanserinin etkili olduğu görülmüştür (U.S. Cancer Statistics SEER 2016).

Çeşitli faktörler prognozu etkileyip sağkalımı etkilemektedir. Bu etki patolojik bulgu ve klinik seyirle ilişkili olduğundan meme kanserinde prognozu değerlendirirken rutin patolojik inceleme çok önemlidir. Histolojik grade, tümör çapı, aksiller lenf nodu durumu, histolojik tümör tipi, yaş, lenfovasküler invazyon ve proliferasyon hızı, hormon reseptör durumu varlığı bilinen önemli prognostik faktörler arasında yer almaktadır (Joensuu H ve ark. 1990).

Östrojen (ER) ve progesteron reseptörleri (PR) de meme kanserlerinde bağımsız birer prognostik faktördür. Dolaşımdaki hormon ile aktive olan hormon reseptör kompleksi, spesifik olarak, nükleus içindeki DNA sekanslarına bağlanır ve fizyolojik ve mutajenik hormon aktivitesini sağlayan transkripsiyonda aktif rol alırlar (Green ve Chambon 1991; Klein-Hitpass ve ark.1986). Kültür çalışmalarında fonksiyonel

östrojen reseptörü taşıyan meme kanser hücrelerinde mutajenik etki kanıtlanmıştır (King ve ark.1985).

Başta meme ve endometrium karsinomu olmak üzere, bir grup neoplastik hastalıkta östrojen ve progesteron reseptörlerinin prognostik önemi belirlenmiştir. Primer meme kanserlerinin ortalama %55-65'i; meme kanseri metastazlarının yaklaşık %45-55'i ER pozitifdir. ER ve PR pozitifliği postmenopozal dönemde, premenopozal dönemden daha fazladır. ER pozitif tümörlerde, hormon tedavisine %55-60, ER negatif tümörlerde ise %8 yanıt alınmaktadır. Hem ER hem de PR pozitif tümörlerde hormon tedavisine yanıt %75-80'e ulaşmaktadır. ER, evre 1 ve 2 meme kanserlerinde, sağkalım ve hastalıksız sağkalım ile ilgili bulunmuş PR'nün ise sağkalım için ER'den daha belirleyici olduğu saptanmıştır (Tavanssol ve ark. 1999).

Histolojik grade yani derece ise kanser hücrelerinin normal hücreden ne derecede farklılaştığını gösteren bir terim olup farklılaşmanın çok olması diferansiyasyon kötüleşmesi anlamına gelmektedir. Histolojik grad, patoloğlar tarafından incelenen hücrenin glandüler ve tubüler diferansiyasyona, nükleer pleomorfizmine ve mitoz sayısına göre skorlamayı esas alan Nottingham (Elston-Ellis sistemi) ile değerlendirilir (Haybittle JL ve ark. 1982). Özellikle nod negatif hastalarda, klinik kötü gidiş ve endokrin yanıtı ile eşlik eder (Merino ve Livolsi 1981).

PTEN 10. kromozomda yer alan tümör supresör gen ailesindendir. Hücre proliferasyonu ile sağkalımında rol oynayan PI3K yolağının en önemli modülatörüdür. Özellikle, meme kanserinde hücre hattı analizleri, *PTEN*'in PI3K'nın aşağı regülasyonu ile sonuçlanan G1 tutuklanması ve hücre ölümü ile meme kanseri büyümesini baskıladığını göstermiştir (Weng ve ark. 1999, Li ve ark. 1998)). Embriyonik kök hücrelerin çalışmaları, *PTEN* geninin mutasyonlarına sahip hücrelerin artmış bir büyüme oranı sergilediğini ve S-fazına gelişmiş bir giriş gösterdiğini göstermiştir (Sun ve ark. 1999). *PTEN*, PI3K/AKT (fosfatidilinozitol-3-kinaz/protein kinaz B) yolağını olumsuz yönde etkileyen bir tümör baskılayıcı gen ailesindendir (Ming ve ark. 2010; Blanco-Aparicio ve ark. 2007). Tüm dokularda özellikle meme dokusunda bulunan bu sinyal kaskadı hücre büyümesi, yaşaması, üremesi, göçü ve metabolizması gibi birçok faktörü etkilemektedir (Ming ve He 2009).

Bu tez çalışması kapsamında; meme kanseriyle ilişkisi olduğu düşünülen *PTEN* geninin İmmünohistokimyasal parametreler, tümör dereceleri, hastalığın evresi ile *PTEN* gen ekspresyonuna kan ve dokudan izole edilen cDNA'ların arasındaki ilişki değerlendirilmiştir. *PTEN* geninin, anatomik evrelemesini ortaya koyan TNM sistemiyle oluşturulmuş farklı evre ve derecelerdeki meme kanseri tümörlerinde ve normal dokulardaki ekspresyon seviyelerindeki ilişki ile tedavi ve izlem aşamasında yararlı prognostik bilgilerin elde edilmesiyle meme kanserinin erken teşhisinde yardımcı bir tümör belirteci olarak kullanılabilirliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

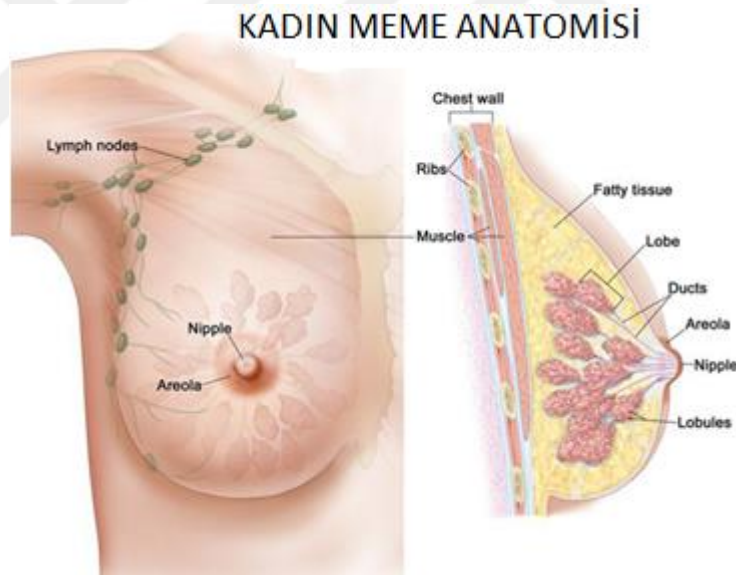
Bu tez çalışması kapsamında, meme kanserlerinde ilişkisi olabileceği düşünülen *PTEN* geninin;

- Meme kanseri tümörlerinde ve normal meme dokusunda ifadenme düzeyleri,
- Farklı evre meme kanseri tümörlerinde ve normal meme dokusunda ifadenme düzeyleri,
- Meme kanseri tanılgular ile kontrol grubu bireylere ait periferik kan örneklerinde ifadenme düzeyleri,
- Farklı evre meme kanser tanılgular ile kontrol grubu bireylerin periferik kan örneklerinde ifadenme düzeyleri belirlenmiştir.
- Periferik kan ile tümör dokularındaki ifadenme farklılıkları değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Meme Anatomisi

Meme dokusu vücutta önemli bir yağ deposu olup, boyutu bireyin vücut özelliğine göre 30 gr'dan 1000 gr'a kadar değişkenlik göstermektedir. Dikey ekseninde ikinci kostadan altıncı kostaya, yatay ekseninde ise sternum kenarından orta aksiller çizgiye dek uzanabilir (Choccalingam ve ark. 2012). Memenin şekli kişiye, yaşa ve fizyolojik şartlara göre değişir. Erkeklerde ve preadolesan dönemdeki kadınlarda rudimenterdir. Meme dört tabaka olup; deri, derialtı dokusu, meme bezi, meme-altı gevşek bağ dokusudur (Drake ve ark. 2005). (Şekil 2.1)



Şekil 2.1: Meme anatomisi (<http://memecerrahisi.com.tr/tag/meme-anatomisi-ve-fizyolojisi/> Erişim Tarihi: 15.06.2020)

Meme, göğüs ön duvarında bulunan pektoralis majör kasından bir fasya ile ayrılmış, cilt ve ciltaltı doku ile kaplı bir organdır (Collins ve Schnitt 2012; Rosai 2011).

Temel fonksiyonu bebeğe beslenme desteği sağlamak olan meme dokusu erişkin dönemde, özellikle gebelikte, belirgin periyodik değişiklikler gösterir ve yaşla birlikte involüsyona uğrar (Lester 2015).

2.2. Meme Kanserlerinin Epidemiyolojisi ve İnsidansı

Dünya çapında her yıl 1,3 milyondan fazla yeni vakaya meme kanseri tanısı konulmaktadır. Kanserden korunma yöntemlerinde, cerrahi rezeksiyon, adjuvan radyoterapi ve kemoterapi yöntemlerindeki çok sayıdaki gelişmelere rağmen yaklaşık 450,000 kadının da her yıl bu hastalıktan hayatını kaybetmektedir (Gucalp ve Trainal 2011).

Meme kanseri gelişmiş ülkelerdeki kadınlarda kansere bağlı ölümlerin en sık nedenidir. Sadece Birleşik Devletlerde 2013 yılında 234,580 kadın invaziv meme karsinomu tanısı almış ve 40,030 kadın bu hastalıktan dolayı hayatlarını kaybetmişlerdir (Hoeflerlin ve ark. 2013). Ancak mamografik görüntülemelerdeki gelişmelere bağlı erken tanı konmasının ve adjuvan sistemik kemoterapi uygulamasının bir sonucu olarak son yıllarda hasta sağkalımlarında istikrarlı bir gelişme olmuştur (Safarpour ve Tavassoli 2014).

2.3. Meme Kanserinin Etiyolojisi

Patolojik raporların Meme kanseri gelişiminde etkili olan risk faktörlerini şu şekilde kategorize etmek mümkündür. Demografik özellikler (cinsiyet, yaş, ırk/etnisite), reproduktif öykü (menarş yaşı, doğum yapma ve sayısı, hamilelik yaşı, menopoz yaşı, laktasyon, infertilite, düşük yapma, kürtaj), ailesel/genetik faktörler (aile öyküsü, bilinen veya şüphelenilen BRCA1/2, *p53*, *PTEN* veya meme kanseri riski ile ilişkili diğer gen mutasyonlar), çevresel faktörler (30 yaşından önce toraks bölgesine radyoterapi, hormon replasman tedavisi, alkol kullanımı, sosyoekonomik düzey), diğer faktörler (kişisel meme kanseri öyküsü, meme biyopsi sayısı, atipik hiperplazi veya lobüler karsinoma in situ, dens meme yapısı, vücut kitle indeksi (BMI) yer almaktadır Bu doğrultuda yaş en önemli risk faktörlerindendir. Yaş ilerledikçe meme kanseri insidansı artmaktadır. 40 yaşın altında meme kanseri görülme sıklığı 1/235 oranında iken, 40-59 yaş arası 1/25 oranında, 60-79 yaş arasında 1/15 oranındadır (NCCN 2009).

2.4. Meme Kanserlerinde Risk Faktörleri

Erken Meme kanseri gelişiminde risk faktörlerini şu şekilde sınıflandırabiliriz (NCCN 2009).

1. Demografik özellikler (cinsiyet, yaş, ırk/etnisite gibi)
2. Reprodüktif öykü (menarş yaşı, doğum yapma ve sayısı, ilk tam dönem hamilelik yaşı, menapoz yaşı, laktasyon, infertilite, düşük yapma)
3. Ailesel/genetik faktörler (aile öyküsü, bilinen veya şüpheli edilen BRCA1/2, *p53*, *PTEN* veya meme kanseri riski ile ilişkili diğer gen mutasyonları)
4. Çevresel faktörler (30 yaşından önce toraks bölgesine radyoterapi (RT), HRT, alkol kullanımı, sosyoekonomik düzey, vb.)
5. Diğer faktörler (Kişisel meme kanseri öyküsü, meme biyopsi sayısı, atipik hiperplazi veya lobüler karsinoma in situ, dens meme yapısı, vücut kitle indeksi (BMI)).

2.4.1. Demografik Özellikler

Kadın cinsiyeti başlı başına en büyük risk faktörüdür. Kadın cinsiyeti 100 kat artmış riski ifade eder. Yaş faktörü de en az kadın cinsiyeti kadar önemli risk faktörlerindendir. Günümüzde bir kadında hayat boyu meme kanseri görülme riski non invaziv tümörler için 6'da 1 ve invaziv meme tümörler içinde 8'de 1'dir (Hsieh ve ark. 1990). Bu riskin büyük bölümü yaşı ilerlemesi ile ortaya çıkar. Meme kanseri görülme sıklığı beyaz ırktasiah ırka oranla %20 daha fazla olmasına rağmen, mortalite oranları siyahlarda daha fazladır. Farklılıkların büyük oranda yaşam tarzı ve sosyoekonomik durumdan kaynaklandığı düşünülmektedir (Hsieh ve ark. 1990).

2.4.2. Reprodüktif Öykü

Östrojen hormonuna maruz kalınan süre ile meme kanseri gelişme riski arasında doğru orantı olup (erken menarş [12 yaşından önce], geç menapoz [55 yaşından sonra]); bu sürenin kısalmasının tümör gelişiminden koruyucu bir rol oynadığı düşünülmektedir (Hsieh ve ark. 1990). İlk canlı doğumun ileri yaşta yapılması ve hiç doğum yapmamış olmak meme kanseri riskinde artışla ilişkilidir. Nulliparite meme kanseri rölatif riskinde 1.2-1.7 kat artışa neden olur (Rosner ve ark. 1994). Multiparitenin meme kanserinden koruyucu etkisi tartışmalıdır. İnfertilitenin meme kanseri riskini azalttığı yönündeki veriler ve infertilite tedavisinin meme kanseri riskini ne yönde etkilediğine dair bilgiler çelişkilidir (Rossing ve ark 1996, Modan ve ark. 1998). Laktasyon meme kanseri riskini azaltmaktadır (Stuebe ve ark. 2009; Jernstrom ve ark. 2004).

2.4.3. Ailesel/Genetik Risk Faktörleri

Aile öyküsü varlığı meme kanseri açısından önemli bir risk faktörüdür. Yapılan çalışmalarda etkilenmiş olan hasta bireyin birinci ve ikinci derece akrabalarında kanser riskinin normal popülasyona göre artmış olduğu görülmüştür(Lynch ve ark. 1990; Murff 2004). Bir adet birinci derece akrabada meme kanseri olması, meme kanseri riskini 1.80 kat artırır. İki tane birinci derece akraba varlığında ise bu risk 2.9 kat artar. Meme kanserine yakalanmış olan akraba 30 yaşından önce tanı almış ise risk 2.9 kat, 60 yaşından sonra tanı konmuş ise risk 1.5 kat artar (Familial breast cancer 2001). Meme kanseri olgularının %5-10'unun ailesel olduğu bilinmektedir (Lynch ve ark. 1990; Ellisen ve Haber 1998; NCCN 2009).

Moleküler genetik alanındaki gelişmelerle, kansere yatkınlığın kalıtılmasına yol açan farklı genler tanımlanmıştır. Bu genlere ait mutasyonları taşıyan ailelerin/bireylerin yüksek kanser riski taşıdığı bilinmektedir. Bu genler içinde en önemlileri HBOC (Hereditary breast over cancer) sendromundan sorumlu BRCA1/BRCA2, Li Fraumeni sendromundan sorumlu TP53ve Cowden sendromundan sorumlu *PTEN* genleridir.

Meme kanserinden korunmada olduğu kadar kanser taraması ve tedavisinde genetik bilgilerin kullanımı çeşitli kılavuzlarda yerini almıştır (NCCN 2009).

2.4.4. Çevresel Faktörler

Kanser hem dünyada hemde ülkemizde önemli bir toplum sağlığı problemidir. Bu hastalığın tam ve etkin kontrolü ancak dinamik, çok yönlü, bilimsel, multidisipliner ve maliyet etkin bir program ile mümkün olabilecektir. Kanser %90 çevresel %10 genetik faktörlere bağlı oluşmaktadır. Çevresel faktörler arasındada tütün ürünlerinin kullanımı, sağlıksız beslenme ve obezite, alkol ve enfeksiyonlar ilk sıralarda yer almaktadır (Kelsey 1981).

2.5. Kanser ve Genetiğı

Bütün hücreler proliferasyon, diferansiasyon, yaşlanma ve ölüm seçeneklerini belirleyen genetik programlama ile doğar ve gerektiğinde işleme koyar. Hücre büyümesi ve çoğalmasını düzenleyen proteinlerin sentezini kontrol eden genlere genel olarak protoonkogen denir. Protoonkogenlerde herhangi bir nedenden dolayı meydana gelen mutasyon sonucu oluşan yeni gene onkogen denir. Kanserde temel sorun hücre proliferasyonundaki kontrolün kaybıdır. Günümüzde tüm kanser türlerinin somatik hücrelerdeki mutasyon ya da mutasyonlar sonucu oluştuğı ve mutasyonlarında bir seri genin ekspresyonunu etkilediğı artık bilinen bir gerçektir. Kanser oluşumunda etkili üç tip gen bulunmaktadır. Bunlar onkogenler, tümör baskılayıcı genler ve DNA tamir genleridir (Hanahan 2000).

2.5.1. Onkogenler

Normal hücre büyümesi ve çoğalmasını kontrol eden proteinleri kodlayan genler protoonkogenlerdir. Protoonkogen, kendiliğinden gen içindeki bir mutasyon veya dış kontrolün değişmesi sonucu farklılaşır ve normalden daha fazla ifade edilmeye

başlarsa bu değişiklikler hücrede kontrolsüz büyüme ve malignansiye sebep olur ve bu protoonkogenlerin mutant şekillerine onkogen denilmektedir (Geoffrey 2007)

Onkogenler protoonkogenlerden çok daha fazla miktarda hücrelerde eksprese olurlar ve bu nedenle gen ekspresyonundaki bu anormallikler normal çalışan bir protoonkogeni hücreyi transformasyona götüren bir onkogen haline dönüştürmek için yeterlidir (Geoffrey 2006). Protoonkogenler tarafından kodlanan proteinlerin çoğu normal hücre çoğalmasını kontrol ederlerken, onkogenler genetik hasar sonucu mutasyona uğradığı için, denetlenemeyen ve proteini hücresel transformasyon oluşturabilen gendir. Onkoprotein adı verilen ve onkogenler tarafından kodlanan proteinlerin büyük çoğunluğu büyüme faktörlerinden gelen uyarılarıyla hücre çoğalmasını ve sağ kalımını düzenleyen sinyal ileti yollarının birer üyesi olarak görev yaparlar (Geoffrey 2007).

Hücre yüzeyi, sinyal iletim yolu veya nükleusta görevli olabilen onkogenlerin büyük bir bölümü tirozin kinaz aktivitesi gösteren reseptörleri kodlar. Bu reseptörlerin hücre dışı büyüme faktörleri ile etkileşen amino uçlarında gerçekleşen değişiklikler bunların birer onkogen proteinine dönüşmesine neden olur. Büyüme faktörlerinin uyarılmasıyla aktive olan hücre içi sinyal iletim yolları, sonunda hücre döngüsü bileşenlerini düzenleyerek, G₁'deki kontrol noktasından geçişi sağlar ve büyüme faktörü uyarımına yanıt olarak hücre döngüsü ilerlerler (Geoffrey 2007, Cotran ve Robbins 2006).

Meme Kanseri Patogenezinde Rol Oynayan Başlıca Onkogenler;

- **Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü (EGFR):** Hücre membran reseptörü olan EGFR ailesi; EGFR, HER2, HER3 ve HER4'den oluşur. EGFR, TK aktivitesine sahiptir (Klijn 1992). Ligandı olan peptid büyüme faktörleri gelip bağlandığında reseptör homo ya da heterodimerizasyonu gerçekleşir ve bunu TK bölgelerindeki otofosforilasyon izler. EGFR'nin otofosforilasyonu diğer hücre içi substratların fosforilasyonuna yol açar. Bu aktivasyon sonucunda nükleusta bulunan transkripsiyon faktörleri uyarılır ve aşırı hücre bölünmesi gerçekleşir (Bhargava 2005). EGF (Epidermal Büyüme Faktörü) ve EGFR (Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü)'nin meme ve çeşitli karsinom tiplerinin progresyonu ve patogenezinde

merkezi bir role sahip olduğu yapılan calışmalarda gösterilmiştir (Normanno 2006). Meme karsinomlarının %16- 36'sında EGFR aşırı ifade edilmesi durumu vardır (Bhargava 2005; Park 2007).

- **CerbB-2 (HER-2/neu):** HER-2/neu (İnsan Büyüme Faktör Reseptörü) veya p185, bir proto-onkogen olup, kromozom 17q21'de lokalize olmuştur ve sinyal iletiminde görevli 185 kDa'luk (p185) bir transmembran proteini kodlamaktadır. HER-2/neu proteini, normal hücre proliferasyonunda önemli bir role sahiptir. HER-2/neu proteininin aşırı ifadelenmesi ya da genin amplifikasyonu meme kanserlerinde kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (Sahin 2006).

- **Ras (Rat Sarkoma virüsü onkogeni):** Ras bir proto-onkogen üründür. Aktif GTP-bağlı (Guanozin trifosfat) halde ya da inaktif GDP-bağlı (Guanozin difosfat) durumda bulunmaktadır. Plazma membranından, nukleusa sinyal iletiminde önemli bir aracı moleküldür. Ras mutasyonları malign transformasyonda önemli bir yere sahiptir (Von Lintig 2000).

- **c-Myc (Myelomatosıs virüs onkogeni):** c-Myc proto-onkogeni kromozom 8q24.1'e yerleşmiştir. Hücre proliferasyonu ve apoptoziste görevli genlerin transkripsiyonunu düzenler. c-Myc geni meme tümörlerinin %15-25'inde aşırı ifadelenmekte ve kötü prognoz ile ilişkilendirilmektedir (Osborne 2004; Rodríguez-Pınilla 2007).

- **Siklinler, Siklin Bağımlı Kinazlar ve İnhibitorleri:** Siklinler, siklin bağımlı kinazlar (CDK) ve inhibitorleri (CDKI) hücre döngüsünü doğrudan kontrol eden proteinlerdir. Meme kanserlerinde siklin D1 ve siklin E'nin aşırı ifadelendiği saptanmış ve prognostik faktör arasında yer alabileceği ileri sürülmüştür (Sweeney 1998).

2.5.2. Tümör Baskılayıcı Genler

Hücre bölünmesini yavaşlatan genler olarak bilinen tümör baskılayıcı genler, bu genlerdeki bozukluklar halinde anormal hücrelerin gelişimini baskılayamayacağından kanser gelişimi söz konusu olur (Geofrey 2007).

Tümör baskılayıcı genler, büyüme inhibitör yolunun değişik bileşenlerini kodlamaktadır. Normalde hücre bölünmesini baskılayan proteinleri kodlayan tümör baskılayıcı genlerin, birinde veya birkaçındaki mutasyon tümör oluşumuna neden olmaktadır. Protoonkogenlerden onkogenleri oluşturan mutasyonların aksine, tümör baskılayıcı genler onkogeneze fonksiyon kayıpları ile katkıda bulunur. Yine onkogenlerin aksine mutant tümör baskılayıcı genlere bağlı kontrolsüz hücre büyümesi, genetik olarak resesiftir ve etkili olması için her iki kromozom çiftinin de defektif geni içermesi gerekmektedir. Kromozom çiftlerinden biri sağlamsa hastalık ortaya çıkmamakta fakat bu bireyin her hücresinde genin bir hasarlı kopyası bulunmaktadır. pRb, P53 veya p21 proteinini kodlayan genlerin her iki kopyasında bulunan mutasyonun, hücre büyümesinin baskılanmasını engellemesi sonucu tümör oluşmaktadır. Tümör süpresör genler, ilk kez kalıtsal kanserlerde tanımlanmıştır. İlk bulunan kanser baskılayıcı gen, Rb genidir. Rb loküsünde heterozigot olan hücre normaldir ve normal Rb geninde heterozigotluğun kaybı kanser gelişmesine yol açmaktadır. Rb geni normal kopyalarının her ikisinin kaybı ile neoplastik değişim ortaya çıktığı için, bu ve diğer kanser baskılayıcı genler sıklıkla resesif kanser genleri olarak isimlendirilmektedir. Kalıtsal olarak geçen tümör baskılayıcı genlerdeki defektler, çocukluk çağında artmış tümör insidansına yol açabilir. Tümör baskılayıcılarını şifreleyen lokusdaki her iki normal allelin kaybı/inaktivasyonu, çocukluk ve erişkin dönem kanserlerini oluşturabilir (BP 2000; Almasan ve ark. 1995) Rb geni gibi bir mutant P53 alelinin kalıtımla geçmesi kişiyi malign tümör gelişimine duyarlı kılmaktadır. DNA hasarında ilk olarak çekirdekte etkili olan P53 etkili olmaktadır. p21 gen transkripsiyonunun artmasıyla pRb fosforilasyonu oluşmamakta ve hücre G1 fazında bekletilmektedir. Bu durum DNA hasarının onarılması için hücreye zaman kazandırmaktadır. Onarım gerçekleşmezse hücreler apoptoza yönelmektedir. P53 kaybı veya mutasyonu olan hücrelerde ise DNA

onarımı gerçekleşmemekte ve hasarlı hücreler proliferasyon olarak tümör dokusu oluşturmaktadır (Bos 1992).

Meme Kanseri Patogenezinde Rol Oynayan Başlıca Tümör Supresör Genler

- **P53 (Protein53, TP53, Tümör Protein53):** P53 geni 17. kromozomun p13-1 bandına yerleşmiştir ve moleküler ağırlığı 53 kDa'luk nuklear bir proteini kodlayarak ; UV ışık, karsinojenler ve sitostatiklerin DNA'da oluşturdukları hasarı ortadan kaldırmak üzere aktifleşir. Hasar düzeltilemez ise hücre apoptoza girer. Meme kanserlerinde, p53 genindeki bozukluklar veya her iki alleldeki kaybı kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (Sjogren 1996).
- **ATM (Mutant Ataksi-Telanjiyektazi):** Kromozom 11'de yerleşmiştir ve resesif olarak kalıtılır. Meme kanserlerinin %2-7'sinde bu gen sorumludur (Ahmed ve Rahman 2006).
- **PTEN (Fosfataz ve Tensin Homologları):** Germline mutasyonu 10. Kromozomun 10q23 lokusunda bulunur. Cowden sendromuna neden olur. DNA tamirinde de rol alır (Matros 2005).
- **BRCA1 ve BRCA2:** Erken başlangıç gösteren ailevi meme kanserli olguların genetik bağlantı çalışmaları ile kromozom 17q21'de BRCA1'in ve kromozom 13'ün uzun kolunda lokalize BRCA2'nin mutasyonlarının keşfi sağlanmıştır. BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki germ soyu mutasyonlar, yüksek risk oluşturan faktörler olarak birçok çalışmada gösterilmiştir. Bu iki kansere yatkınlık geninin mutasyonlarını taşıyan kadınlar %60-80 ihtimalle hayatı boyunca meme kanseri olma riskine sahiptir Ailesel meme kanseri saptanan olguların çoğunda hastalık, BRCA1 ve BRCA2 tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen mutasyon kaynaklıdır (Teng 2008). BRCA1 ve BRCA2 proteinleri genomik stabilitenin sağlanmasında, DNA hasarında hücresel cevapta, transkripsiyonel düzenlemede ve hücresel proliferasyonda görev alırlar (Quinn ve ark. 2010). Birçok meme ve over kanseri sporadiktir (kalıtsal değildir), ancak kalıtsal olan meme kanserlerinin üçte birinden BRCA1 ve BRCA2 mutasyonları sorumlu tutulmaktadır (King ve ark. 2003).

2.6. Fosfataz Ve Tensin Homolog (*PTEN*)

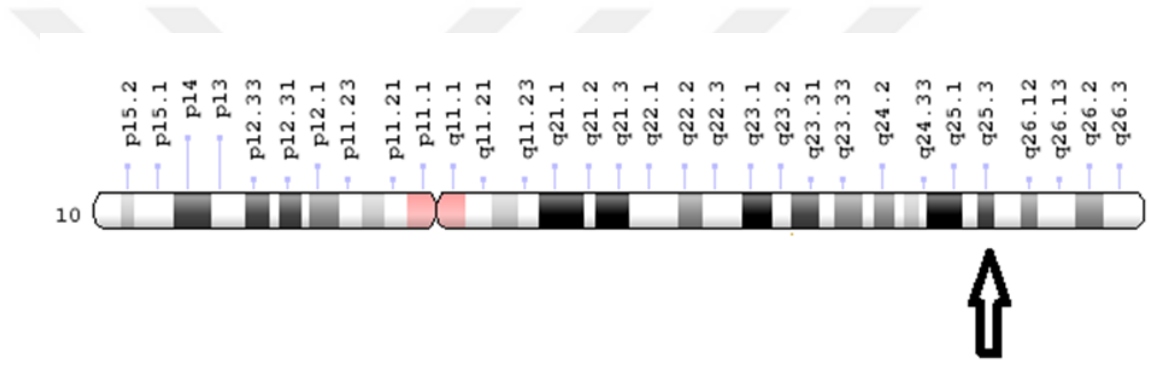
PTEN geni ilk kez 1997 yılında tanımlanan bir tümör baskılayıcı gendir (Turan ve ark. 2009; Abdulkareem 2013; Govender ve ark. 2012). Sıklıkla somatik kanserlerde inaktive olur (Salvesen 2001) ve en çok mutasyona uğrayan tümör baskılayıcı gen olan *P53*'den sonra ikinci sırada yer alır (Govender ve ark. 2012; Georgescu 2010).

Kromozom 10'un kısmi veya tamamen kaybının varlığını ortaya koyan ilk olgulara 1980'lerde sitogenetik ve moleküler çalışmalarla, beyin, mesane ve prostat kanserlerinde rastlanmıştır. Homozigot mutasyonların 10. kromozom üzerinde haritalandırılması, ancak 1997 yılında, 10q23 lokusunda yeni bir aday tümör baskılayıcı geni olarak tanımlamıştır (Cristofano ve ark. 1998). Aynı yıl, fosfataz ve tensin homologu *PTEN*'in, çok sayıda sporadik tümör tipinde sıklıkla delesyona uğradığı belirlenmiş ve Cowden hastalığı gibi kanser yatkınlık sendromları olan hastalarda germ hattı mutasyonlarının gözlenmesi ile daha çok araştırılması gereken bir hedef haline gelmiştir (Cristofano ve ark. 1998). Bundan hemen sonra, *PTEN* geni susturulmuş farelerinin üretimi, çoklu doku tiplerinde *PTEN*'in temel tümör baskılayıcı rolünü göstermiştir (Suzuki ve ark. 1998). Özellikle, bir dizi hipomorfik *PTEN* fare modelinin analizi, *PTEN* seviyelerinin, kanser duyarlılığını belirleyen ve tümör ilerlemesi ile ilgili ilişkileri gösteren fonksiyonel sonuçları ortaya çıkarmıştır (Song ve ark. 2012).

2.6.1. Yapısı

Çift etkili bir fosfataz olan *PTEN*, hem lipid fosfataz hem de protein fosfataz aktivitesine sahiptir (Knobbe, 2002). Protein fosfataz aktivitesinin lipid fosfataz aktivitesinden daha az olduğu bilinmektedir. *PTEN*, 403 amino asitten oluşur ve diğer protein tirozin fosfatazlarının aktif bölgelerinde de bulunan HCXXGXXR (X'in herhangi bir amino asit olduğu) bir katalitik motif içerir. *PTEN* geni, hücrede bölünmenin kontrolü, hücre döngüsünün düzenlenmesi ve apoptozda rol alan ve bu bakımdan pek çok fonksiyonu olan önemli bir tümör baskılayıcıdır.

İnsanda *PTEN* geni 10q23 lokasyonundan kodlanan ve 9 ekzonu bulunan bir gendir (Şekil 2.2). Genomik uzunluğu yaklaşık 100 kb'dır. 3417 baz çifti uzunluğunda bir transkript ve 403 aminoasitlik bir protein kodlar. Transkripsiyonel bölgesi -951. ve -925. nükleotid bölgesinden başlar, pozitif düzenlenmesi -1001 ve -427 nükleotid dizisinde görev alır (Knobbe 2002). *PTEN*'in transkripsiyonu promotorunun -947 ve -939 arasındaki GCGGCGGCG dizisine Egr1 transkripsiyon faktörünün bağlanması ile başlar. *PTEN* promotoru, CpG dinükleotidleri bakımından zengin olduğundan DNA metilasyonu bu bölgede meydana gelmektedir.



Şekil 2.2: 10. Kromozomdaki lokasyonu (<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/PTEN#location>, Erişim tarihi: 06.07.2020)

2.6.2. Fonksiyonu

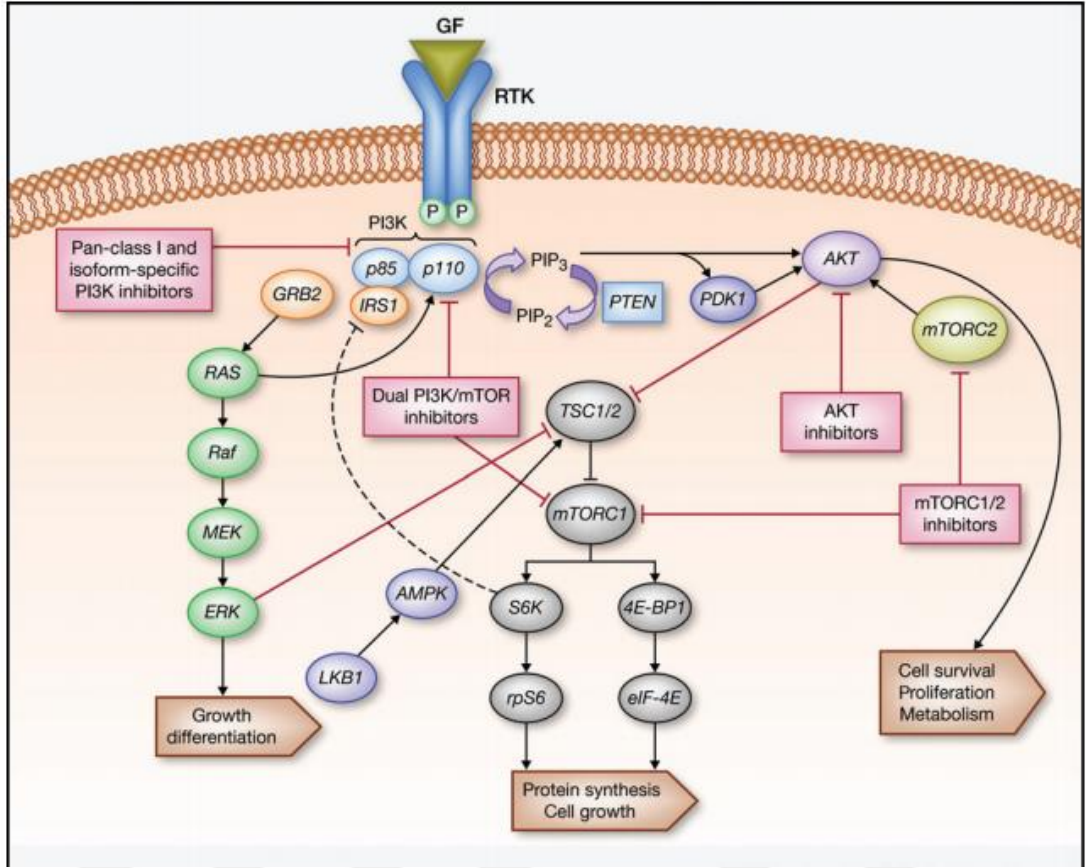
PTEN, yaşlanma, anjiogenez, apoptozis, hücre döngü ilerlemesi, hücre kasılması, DNA hasarına yanıtı içeren sayısız süreçte görev alır. *PTEN* geni hem lipid hem de proteinleri defosforile etme yeteneğine sahip bir çift spesifik fosfataz kodlar (Govendar 2012) ve bir enzimatik fonksiyonu olduğu bilinen ilk tümör baskılayıcı moleküldür (Myers 1998). *PTEN* geni (RefSeq NM_000314) 10. Kromozomun q (Govendar 2012) kolunda lokalize olan ve çeşitli kanserlerde önemli bir mediatördür. Tam anlamıyla tanımlanacak olursak; tümör baskılayıcı genlerin kaybı gelişmekte olan tümörlerin artışından bahseder. Bu genler, allellerden birisinin kalıtsal olarak inaktif olması sebebiyle ailesel kanser sendromları ile ilişkili genlerdir ve artan kanser riski otozomal dominant biçimdeki her bir nesil boyunca tasınabilir (Jelovač 2010). Yabani tip *PTEN* fosfoinositol 3-kinaz (PI3K)/Akt sinyal yolağının ana

negatif düzenleyicisidir (Zhou ve ark. 2006) ve bunu fosfatidil inositol trifosfatı (PIP3) defosforilleyerek yapar böylece PI3K aktivitesine ters olarak Akt yolağı baskılanmış olur (Kanomari ve ark. 2001; Georgescu 2010). PTEN/PI3K/Akt yolağı şekil 2.1'de sematik olarak gösterilmektedir. Fosfoinositilleri üç yerden defosforilleyerek hücre büyümesini ve hücrenin hayatta kalmasını sağlar (Black ve ark. 2005; Zhou ve ark. 2006). Araştırmacılar, *PTEN*'in hücre döngüsü ve apoptoz gibi hücresel süreçler üzerindeki etkisini araştırmak için, farklı hücre hatlarında *PTEN* ifadesine bakmışlardır. *PTEN* geni susturulmuş glioma hücre hatlarında, *PTEN* ekspresyonu büyüme baskılanmasına neden olmuştur. Apoptotik ve hücre döngüsü analizi amacı ile yapılan çalışmalarda, *PTEN* aracılı büyüme baskılanmasının G1 tutukluğuna bağlı olduğu gösterilmiştir (Georgescu, 2010).

PI3K/AKT/mTOR Yolağı:

AKT'nin aşağı doğru (down stream) hedefleri, hücre büyümesi, anjiyogenez, hücre metabolizması, protein sentezi ve apoptozun doğrudan baskılanması veya mTOR'un aktivasyonu ile ilgilidir (Georgescu 2010). PI3K/AKT/mTOR yolağı Şekil 2.3'de verilmiştir.

PI3K/AKT yolağının aktivasyonu, fosfatidilinositol 3-kinazın (PI3K) düzenleyici alt birimi olan p85'in SH2-alanlarının, EGFR gibi aktive edilmiş reseptör tirozin kinazların, fosfotirozin kalıntılarına bağlanması yoluyla gerçekleşir. Alternatif olarak aktivasyon, PI3K'nin aktif RAS'a bağlanmasıyla gerçekleşebilir. Mutasyon ve daha yaygın olarak, PI3K'nin katalitik alt birimini kodlayan PIK3CA'nın amplifikasyonu, daha sıklıkla skuamöz hücreli karsinomlarda ortaya çıkmaktadır. PI3K'den aşağı doğru hareket eden bir serin/treonin kinaz olan AKT, aynı zamanda, bu yolda sürekli aktivasyonuna yol açan mutasyonlara da sahip olabilir (Kandasamy ve Srivastava 2002).



Şekil 2.3: PI3K/AKT/mTOR yolağı

(<https://mct.aacrjournals.org/content/molcanther/13/5/1021.full.pdf>, Erişim tarihi:06.07.2020)

AKT'nin primer efektörlerinden biri, proliferasyonu, hücre döngüsü ilerleyişini, mRNA translasyonunu, sito-iskelet organizasyonunu ve hayatta kalmayı düzenleyen bir serin / treonin kinaz olan mTOR'dur (Larsen ve Minna 2011).

PI3K/AKT yolunu, PI3K, fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfat (PIP3) üzerindeki fosfataz aktivitesi ile PI3K/AKT yolunu negatif olarak düzenleyen tümör baskılayıcı *PTEN* geni, akciğer kanserinde mutasyonları ya da ekspresyon kaybını etkisiz hale getirerek sık sık tümörogenezi bastırır. Bu yolak ve ilgili tüm genler Şekil 2.3'te şematize edilmiştir (Larsen ve Minna 2011).

2.6.3. *PTEN* Protein Yapısı

Tam uzunluktaki *PTEN* mRNA'sı, 47 kDa'lık bir moleküler kütleye sahiptir ve 403 amino asitlik bir protein kodlar. *PTEN*'in NH₂-terminalinin yarısı, tensin ve auksilin yanı sıra fosfataz domainine homoloji içeren alan içerir. *PTEN* kristal yapısının belirlenmesi, fosfataz domeinin protein fosfatazlarına yapısal olarak benzer olduğunu ve fosfoinositid substratlarının barındırılması için gerekli olan genişletilmiş bir aktif alana sahip olduğunu göstermiştir (Lee ve ark. 1999). *PTEN*'nin COOH terminali ise, katalitik aktiviteye sahip değildir, fakat protein stabilitesinin, yarı ömrünün ve fonksiyonel aktivitenin düzenlenmesiyle ilgili olarak önemli işlevlere sahiptir (Georgescu 2010).

Normal dokuda *PTEN* ekspresyonunu inceleyen araştırmacılar, *PTEN* ekspresyonunu embriyonik ve fetal gelişim boyunca beyinde yüksek seviyede olduğunu, erişkinlerin normal dokusunda ise daha düşük bir seviyede olduğunu tespit etmişlerdir (Gimm ve ark. 2000).

Araştırmacılar fareler üzerinde yaptıkları çalışmalar sonucu, fare beyinde, *PTEN*'in sadece glial hücrelerde değil, nöronlarda da ifade edildiğini ve nöronal farklılaşmanın, hücre büyüklüğünün ve apoptozun düzenlenmesinde rol oynayabileceğini bildirmişlerdir (Lachyankar ve ark. 2000).

2.6.4. *PTEN* Gen Mutasyonları

Tümör Süpresör Gen fonksiyonunun kaybedilmesi, akciğer karsinogenezinde önemli bir adımdır. Genellikle her iki allelin kromozomal delesyonu veya bir allel inaktivasyonu, ikinci alleli inaktive eden nokta mutasyonu ya da, epigenetik veya transkripsiyonel susturma ile inaktivasyonundan kaynaklanır. Akciğer kanserinde yaygın olarak inaktive edilmiş tümör süpresör genler arasında *TP53*, *RB1*, *STK11*, *CDKN2A*, *FHIT*, *RASSF1A* ve *PTEN* bulunur (Breuer ve ark 2005). *PTEN* geninin her iki allelindeki mutasyonlar, beyin, prostat, meme ve endometriyal kanserler ve ayrıca melanom dâhil olmak üzere pek çok kanser türlerinde, kanserin ilerlemesi

sırasında ortaya çıkar; bazı kanserlerde her iki allelde mutasyon sıklığının % 50'ye ulaştığı bildirilmiştir (Simpson ve Parsons 2001).

PTEN geni aynı zamanda, Cowden Sendromu gibi kalıtsal kanser sendromlarında ve heterozigot *PTEN* geni mutasyona uğramış fareler ile ilgili çalışmalar sırasında karşımıza çıkar. Bu da *PTEN*'in tümör baskılayıcı rolünü desteklemektedir. *PTEN* geninin hem erken ve daha sonra tümöröjenezde (kalıtsal kanser sendromlarında olduğu gibi) hem de ileri kanserlerde mutasyona uğramış olabileceği dikkat çekicidir. Yapılan bir çalışmaya göre, *PTEN*'deki hasarların, ister kalıtsal ya da somatik mutasyon ile isterse epigenetik indirgeme ile ortaya çıkmış olsun, diğer tümör baskılayıcılarının kaybı ve/veya maligniteyi teşvik etmek için onkojenlerin aktivasyonu ile birden çok aşamada işbirliği yapabildiğini göstermiştir (Di Cristofano ve ark. 2001).

Bir başka çalışmada, *PTEN* ile p27 veya Wnt-1'deki mutasyonlar arasındaki işbirliğinin onkogenezi teşvik ettiği gösterilmiştir (Li ve ark. 2001). Bazı çalışmalarda buna ilave olarak, *PTEN*'in hücre dışı matriksle hücre etkileşimlerini düzenleyen tanımlanmış fonksiyonlarının, kanser ilerlemesinin sonraki aşamalarında, özellikle önemli olabileceği gösterilmiştir. Matriks proteinlerine hücre yapışmasında değişiklikler, göç ve apoptoz sonrası matriks ile temas kaybı, tümör invazyonu ve metastazında rol oynamıştır. *PTEN* kaybının, bu tür değişiklikler için merkezi bir mekanizma olduğu bildirilmiştir (Kandasamy ve Srivastava 2002). Mutasyonlarla ya da diğer mekanizmalarla *PTEN* fonksiyonunun kaybedilmesi, endometriyal tümör oluşumunda bilinen endokrin risk faktörlerine cevap olarak erken ortaya çıkabilen ve premalign hastalık için immünohistokimyasal biyobelirteç olarak kabul edilen bir olaydır (Mutter ve ark. 2000).

PTEN'in somatik intragenik mutasyonları, endometrial karsinomlarda, malign gliomlarda ve melanomlarda sık görülen bir olaydır. Ayrıca, meme kanseri hücre hatlarını kullanan ilk çalışmalar *PTEN*'in biallelik kaybına sahip olduğunu göstermektedir (Perren ve ark 1999). Araştırmacılar bu nedenle, bir *PTEN* allel kaybının tümör oluşumu için yeterli olup olmadığını ya da ikinci allelin inaktivasyonunun mutasyon olaylarından daha çok epigenetik olarak gerçekleşip gerçekleşmeyeceğini sorgulamışlardır.

2.6.5. *PTEN* Geni ve Kanser İlişkisi

PTEN'i bir aday tümör baskılayıcı olarak tanımlayan ilk raporlar, *PTEN*'deki mutasyonlar için, bazı hücre hatlarının ve primer tümörlerin incelenmesi ile ortaya çıkmıştır (Steck ve ark. 1997). Bu çalışmalar glioblastoma hücre hatlarının ve primer tümörlerin heterozigozite kaybı (LOH) eşliğinde yüksek oranda *PTEN* mutasyonlarına sahip olduğunu göstermişlerdir. Multiform glioblastoma, gliomanın en agresif formu olup, hastalık teşhisi konan hastalar için genellikle sağ kalım süresi en fazla 2 yıldır. Glioblastomaların büyük çoğunluğunda *PTEN*'in lokalize olduğu 10q kaybı olduğu gösterilmiştir (Baeza ve ark. 2003).

PTEN promotörü, transkripsiyonel düzenlenmede ve DNA metilasyonunda rolü olan CpG nükleotidleri açısından zengindir. Farklı kanser türlerinde yapılan çalışmalarda, promoter hipermetilasyonun neden olduğu *PTEN*'in epigenetik susturulmasının, tümörogeneze katkıda bulunabileceğine dair kanıtların olduğu bildirilmiştir (Salvesen ve ark. 2001; Whang ve ark 1998). Ayrıca Fults ve arkadaşları gliomlarda yaptıkları bir çalışma ile *PTEN* ekspresyon seviyelerinin artan malignite derecesiyle birlikte azaldığını ve bununla birlikte, promoter hipermetilasyonunun gliomlarda *PTEN* inaktivasyonunun bir mekanizması olup olmadığının araştırılması gerektiğini bildirmişlerdir (Fults ve Pedone 2000).

PTEN ekspresyon kaybı, prostat ve servikal kanserde sık görülür (Harima ve ark 2001). *PTEN* AKT ve PI3K (fosfatidilinositol-3 kinaz) yollarını akış yönünde düzenlediğinden, *PTEN*-null tümörler daha yüksek proliferatif aktiviteye ve büyümeye sahiptir. 109 prostat kanseri olgusunda yapılan bir çalışmada, *PTEN* ekspresyonu immünohistokimyasal olarak değerlendirilmiş ve *PTEN* proteininin kaybı, kötü prognozun patolojik belirteçleri ile ilişkilendirilmiştir (Mazure ve ark. 1997).

PTEN'de yüksek mutasyon sıklığına sahip başka bir tümör tipi, endometriyal karsinomdur. Endometriyal karsinomları inceleyen araştırmacılar, yaygın olarak delesyona uğramış olan iki bölgede 10q22–24 ve 10q25-26 anlamlı LOH olduğunu bildirmişlerdir. Buna ek olarak, endometrioid endometriyal karsinomlar vakaların %

61'inde *PTEN* protein ekspresyonunun tamamen kaybını ve % 97'sinde ekspresyonun azaldığını da göstermişlerdir (Mutter ve ark 2000).

10. kromozomun uzun kolunun sıklıkla kaybını sergileyen bir başka kanser türü melanomadır. Sporadik tümörler 10q22–10qter bölgesinde değişiklik gösterir ve LOH çalışmaları sık sık erken 10q kaybını gösterir. *PTEN* kaybı ya da mutasyonu, malign melanom hücre hatlarında yüksek olsa da (%40), primer tümörlerde *PTEN* aberasyonlarının sıklığı daha düşüktür (Guldberg ve 1997). Diğer bazı tümörlerde olduğu gibi, *PTEN* mutasyonlarının geç evre hastalık ile ilişkili olduğu görülmektedir.

2.7. İmmünohistokimyasal Yöntem ve Tanısal Belirleyiciler

2.7.1. Biotin-Streptavidin Sistemi

Glikoprotein yapısında olan avidin yumurta akından elde edilir ve biotine karşı aşırı ilgisi vardır. Biotinin saptanmasında ilk adım işaretleyici molekülü ya da sinyali taşıyan avidinin, biotinle işaretlenmiş proba bağlanmasıdır. Bir avidin molekülü dört biotin molekülü bağladığından güçlü bir sinyal verir. Avidinden farklı olarak yüksüz bir molekül olan streptavidin ise *Streptococcus avidini*'den elde edilmiştir. Bu molekülün biotine karşı ilgisi daha azdır ve daha az dayanıklıdır (Selma Yılmaz 2017).

2.7.2. Sinyal Oluşturan Sistemler

Proben hibridize olduğu bölgenin görünürlülüğü antikora ya da avidine bağlanan sinyaller ile sağlanır. Bu aracı moleküller florokomlar, metaller veya enzimlerdir. Sinyale uygun olan dalga boyundaki ışıpta floresan yayan florakromların avidine ya da antikora bağlanabilen farklı tipleri vardır. Bunlardan en sık kullanılanlar Teksas kırmızısı, rodamin kırmızısı, floresein izotiyosiyanat (FITC) yeşil ve amino-metil-kumarin asetik asit (AMCA) ise mavi renk verir (Selma Yılmaz 2017)

2.7.3. Belirteçler

2.7.3.1. P53 Tümör Süpressör Geni

P53 geni, 17. kromozomun kısa kolunda lokalize olmuştur (17p 13,1). Herhangi bir nedenle meydana gelen DNA hasarlanmasında p53 aktive olup farklı mekanizmaları başlatır. Bu mekanizmalar ile hasarlı hücre G1/S fazında durur (Ambros 1994; Lipponen 1994; Hoang 2013).

2.7.3.2. *Cerb-B2*

HER2/neu (cerbB-2) kromozom 17q21 de bulunan bir protoonkogendir. İntrinsik tirozin kinaz aktivitesi olan, epidermal büyüme faktör reseptörüne (EGFR) benzeyen transmembran glikoproteinini kodlamaktadır. Cerb-B1, cerb-B2, cerb-B3 ve cerb-B4 aynı onkogen ailesinden olup normal hücre büyümesinde ve diferansiasyonunda görevlidirler. Bu protoonkogenlerin düzenleyici fonksiyonlarının bozulması; büyüme faktörü reseptörlerinin aşırı ekspresyonuna ve artmış sinyal iletimine neden olarak karsinogeneizde etkin rol oynar (Iqbal 2014)

HER ailesi onkoproteinlerinin ekspresyonu normal dokuya kıyasla solid tümörlerde artmış olarak izlenmektedir. Cerb-B2'nin; mide, meme, endometrium, over karsinomlarında ve vulvar paget hastalığında artışı saptanmıştır. HER reseptör ekspresyonlarını göstermek için ise, İHK'sal yöntemler ve kromozomal amplifikasyonu gösteren floresan insitu hibridizasyon (FISH) yöntemi kullanılır (Iqbal 2014; Reyes 2014).

2.7.3.3. *Ki67*

10. kromozomun uzun koluna lokalize (10q 25) bir gen Ki-67 proteinini kodlar. Hücre siklusunda, hücrelerin prolifer olmadığı G0 fazı dışında, tüm aktif fazlarda (G1, S, G2 ve mitoz) eksprese edilen, nükleer non-histon proteinlere karşılık gelen antijen ile reaksiyona giren monoklonal antikordur. (Ambros 2000). İmmunhistokimya ile Ki67 için pozitif nükleer boyanma hücre proliferasyonunu ölçmede kullanılan önemli bir belirleyicidir. Bu oranın özellikle agresif tümörlerde

yüksekliği bildirilmiştir. Yüksek Ki67 oranı birçok tümörde (meme, akciğer, özofagus, böbrek, prostat ve endometrium kanseri, malign melanom, nonhodgkin lenfoma, glial tümörler) kötü prognostik faktör olarak gösterilmiştir (Bai 2001)

2.7.3.4. Östrojen / Progesteron Reseptör (ER/PR)

Östrojen Reseptör ve Progesteron Reseptör değerlendirmesi meme karsinomunun patolojik değerlendirmesi için temel öneme sahiptir. Östrojen Reseptör, östrojen tarafından aktive edilen nükleer transkripsiyon faktörüdür. Meme kanserlerinin yaklaşık % 75'i hormon reseptörleri açısından pozitifdir. Tübüler karsinom, iyi diferansiye duktal karsinom ve klasik invaziv lobüler karsinom gibi düşük dereceli invaziv karsinomlar genellikle Östrojen Reseptör ve Progesteron Reseptör pozitifdir. Düşük dereceli adenoskuamöz karsinom, adenoid kistik karsinom ve sekretuar karsinom gibi bazı düşük dereceli invaziv karsinomlar tipik olarak negatiftir. Östrojen Reseptör, tümörün metastatik potansiyelini öngörmez ancak sakın bir klinik gidişe sahip olacağını ve rekürrens süresinin daha uzun olacağını gösterir. Östrojen Reseptör pozitif tümörler daha çok kemik, yumuşak doku ve genitoüriner sisteme metastaz yaparken Östrojen Reseptör negatif tümörler visceral organlara ve beyine metastaz yaparlar. Östrojen Reseptör ve Progesteron Reseptör, zayıf prognostik ancak endokrin terapi için güçlü prediktif faktörlerdir (Anderson 2002; Clark 1984; Chu 2002; Joslyn 2002; Ernst 2002). Rutin pratikte, Östrojen Reseptör ve Progesteron Reseptör formalin fikse, parafine gömülü dokularda immunhistokimyasal yöntemlerle değerlendirilir. Östrojen Reseptör ve Progesteron Reseptör değerlendirmesinde pozitif diyebilmek için tümör hücrelerinin en az %1' inde ekspresyon olmalıdır (Hoda 2010).

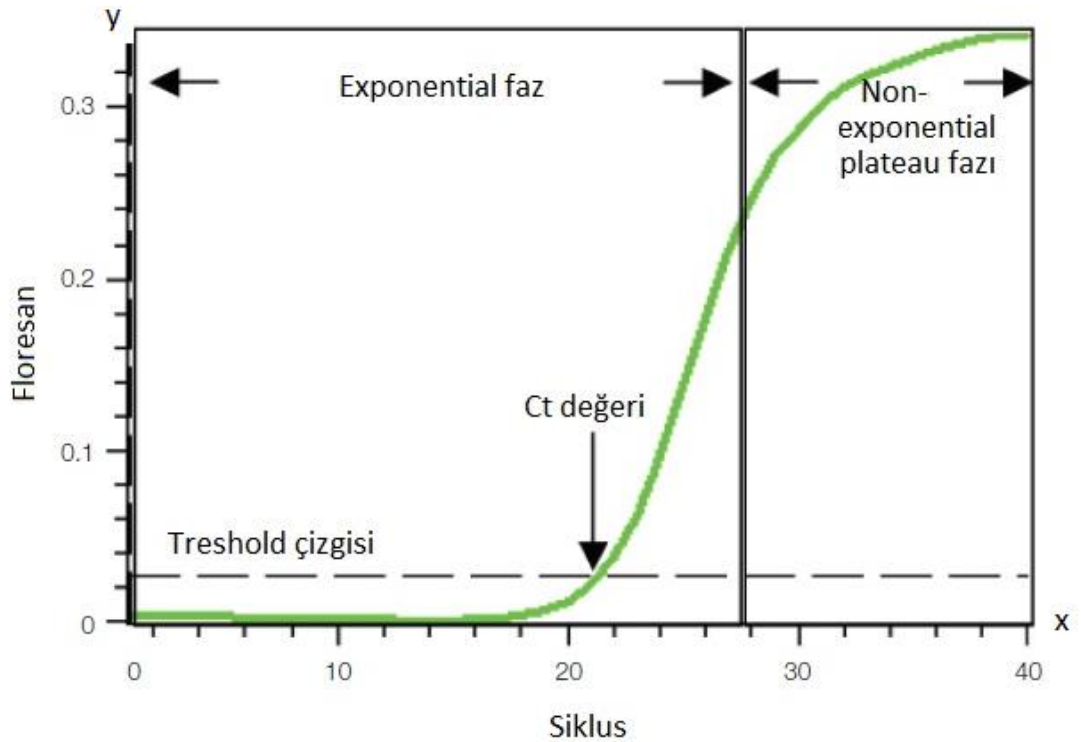
2.8. Eş-Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Yöntemi (Real-Time Polymerase Chain Reaction)

Eş-zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Eş-Zamanlı PZR) yöntemi araştırmalarda ve rutin uygulamalarda nükleik asitlerin miktar ve karakterizasyonunu belirlemek

için altın-standart metod haline gelmiştir. Eş-zamanlı PZR'nin tipik kullanımı patojen belirlenmesi, gen ifadenme analizleri, Tek Nükleotid Polimorfizm analizleri, kromozom aberasyon analizleri ve son zamalarda eş-zamanlı immüno PZR ile protein belirlenmesi gibi analizleri içermektedir (Kubista ve ark., 2006).

Nasıl çalışır?

Şekil 2.2'de PZR siklus (döngü) sayısı x ekseninde, reaksiyon tüpü içindeki amplifiye olan ürünün oransal miktarı ile oluşan floresan sinyal y ekseninde gösterilmiştir. Amplifikasyon grafiği iki fazı göstermektedir. Ekspozitional faz sırasında her siklusta PZR ürün miktarı hemen hemen iki katına çıkmaktadır. Reaksiyon sürerken reaksiyon ürünleri azalmaya başlar. Bir veya iki ürün sınıra yaklaşır. Bu noktada reaksiyon yavaşlar ve plato fazına girer (siklus 28-40). Başlangıçta floresan seviyesi düşüktür (1-18 siklus) ve floresandaki artış tespit edilemez. Amplifiye olan ürün biriktikçe tespit edilebilir floresan sinyal üretilir. Bunun gerçekleştiği siklus Treshold cycle (Ct: treshold siklus) olarak isimlendirilir (Bio-Rad, 2006)



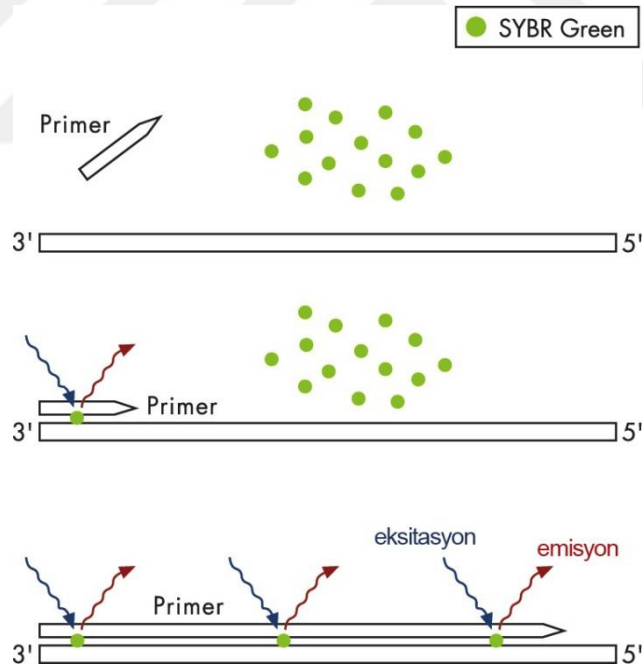
Şekil 2.4: Amplifikasyon grafiği

mRNA'dan üretilmiş cDNA'nın amplifikasyonunda kullanılan Eş zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu düşük miktardaki gen ifadenmesinin çalışılmasında rutin bir araç olarak önem kazanmıştır. Reverse transkripsiyonu (RT) takip eden Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) çok çeşitli kaynaklardan elde edilen mRNA ekspresyonunun analiz edilmesinde kullanılmaktadır (Pfaffl, 2001).

Eş Zamanlı PZR'de yeni sentezlenen PZR ürünlerinin basit bir şekilde belirlenmesinde SYBR Green I floresan boyası kullanılmaktadır.

2.8.1. SYBR Green PZR Nedir?

Floresan bir boya olan SYBR Green I tüm çift dallı DNA molekülüne bağlanır, bağlandığı noktada belirli bir dalga boyunda floresan bir sinyal yayar (Şekil 2.4).



Şekil 2.5: SYBR Green PZR prensibi (Qiagen, 2014)

SYBR Green I'in emilimi ve yayılması sırasıyla 494 nm ve 521 nm'de olur ve tüm Eş Zamanlı PZR teknolojilerinde kullanılabilir. SYBR Green I kullanıldığında belirleme Eş Zamanlı PZR'nin ekstansiyon (elongation: taq DNA polimerazın primerleri ekleme aşaması) basamağında olmaktadır. Sinyal yoğunluğu

PZR ürününün artmasıyla her siklusta artmaktadır. SYBR Green boyasının kullanılması hedefe spesifik etiketli prob sentezlenmesine gerek kalmadan çok farklı sayıda hedefin analiz edilmesini sağlamaktadır. Bununla birlikte, spesifik olmayan PZR ürünleri ve primer dimerleri floresan sinyali etkilemektedir. Bu nedenle, SYBR Green boyaları kullanılırken yüksek PZR özgüllüğü gereklidir (Qiagen, 2014).

Ekspresyon/ İfadelenme analizlerinde tercih edilen kuantifikasyon (belirleme) yöntemi, hedef diziye, dokuda mevcut olan mRNA miktarının beklenen aralığına, gereken doğruluk derecesine ve nicemelemenin rölatif (göreceli) veya absolü olması gerekip gerekmediğine bağlıdır.

Genel olarak Eş zamanlı PZR için **iki tip kuantifikasyon** yöntemi mevcuttur:

(i) Hedef genin referans gene olan rölatif ekspresyonunu temel alan **rölatif kuantifikasyon**. Gen ekspresyonundaki fizyolojik değişikliklerin araştırılmasında kullanılmaktadır.

(ii) **Absolü kuantifikasyon** ise içsel veya dışsal kalibrasyon eğrisini temel almaktadır (Morrison ve ark., 1998; Pfaffl, 2001).

Housekeeping gen, endojen standart veya referans gen ile hedef genin normalizasyonu tavsiye edilmektedir. Housekeeping genler tüm temel hücre yaşamı için gerekli olmalarından dolayı tüm çekirdekli hücre tiplerinde mevcuttur. Bu genlerin mRNA sentezlerinin deneysel koşullarda dahi stabil olduğu düşünülmektedir. *GAPDH* (Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz), albümin, aktinler, tubulinler, siklofilin, 18S rRNA veya 28S rRNA çok sıklıkla kullanılan referans genlerdir (Marten ve ark.,1994; Foss ve ark., 1998; Thellin ve ark., 1999).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Örnek Toplanması

Çalışma kapsamında, Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı'nda gerçekleşen meme operasyonu sırasında herhangi bir ek müdahale gerekmeden ve/veya herhangi bir ek medikal ajan uygulanmadan rutin ameliyatı sırasında çıkartılan ve patolojik tanısı için kullanılmayan meme tümörü dokusundan arta kalan benzer özellikteki kısımlar RNA izolasyonu için kullanılmıştır.

Dokularından histopatolojik inceleme sonucunda Meme Kanseri teşhisi konmuş 31 olguya ait tümör dokusu örnekleri ile histopatolojik inceleme sonucunda normal saptanan 5 bireye ait doku örnekleri kullanılmıştır. Yine meme kanseri tanılı her olgu ile kontrol grubunda yer alan her bireyin, Cerrahi girişim sırasında açılmış olan venöz damar yolundan da 5cc EDTA'lı tüpe RNA izolasyonu için kan örneği alınmıştır.

3.2. Histolojik Grade Belirlenmesi ve İmmünohistokimyasal İnceleme

Olgulara ait yaş, tümör çapı, lenf nodu tutulumu, tutulan lenf nodu sayısı, ektrakapsüler yayılım, lenfovasküler invazyon, perinöral invazyon, nekroz varlığı, histolojik subtip gibi prognostik parametreler ve immünohistokimyasal ER, PR, CerB-B2, ki67 ve p53 boyanma sonuçlarına ait bilgiler hasta patoloji raporlarından elde edilmiştir. Meme kanser nedeniyle önceden kemoterapi ya da immunoterapi almış hastalar çalışma dışı bırakılmıştır.

Histolojik grade: Bloom-Richardson sisteminin Nottingham modifikasyonu kullanılmaktadır. Buna göre tubul formasyonu değerlendirilirken tümörün %75'inden fazlasında lümenleri belirgin tubul yapısı görülüyorsa 1 puan, solid alanlarla birlikte %10-%75 arasında tubul yapısı varsa 2 puan, %10'un altında tubul yapısı var ya da hiç yoksa 3 puan verilmektedir. Mitoz sayısı 10 büyük büyütme

alanında 0-9 ise 1 puan, 10-19 ise 2 puan, 20 ve üzeri ise 3 puan verilmektedir. Bu parametrelere göre elde edilen toplam skor 3-5 ise grade I, 6-7 puan ise grade II, 8-9 puan ise grade III olarak değerlendirilmektedir (Tablo3.1).

Tablo 3.1: Nottingham dereceleme sistemi

	Skor (puan)
Tubül oluşumu	
Tümörün büyük kısmında (>75)	1
Orta derecede (%10-75)	2
Minimal veya hiç yok (<10)	3
Çekirdek özellikleri	
Küçük, uniform hücreler	1
Orta derecede boyut ve şekil farkı, nukleolus varlığı	2
Belirgin boyut ve şekil farkı, sıklıkla çok sayıda Nukleolus	3
Mitoz sayısı (40x objektif, alan çapı 0.52 mm,-10 alan)	
0-7	1
8-15	2
>16	3

Toplam skor; 3-5: Derece I, 6-7: Derece II, 8-9: Derece III

Aksiller lenf nodu tutulumu: Aksiller küraj materyalinden ayıklanan lenf nodlarında tutulum yok ise N0, 1-3 aksiller veya intramammarien lenf nodu tutulumu varsa N1, 4-9 aksiller tutulum veya intramammarian lenf nodu tutulumu varsa N2, 10 veya daha fazla aksiller ya da ipsilateral supraklavikuler lenf nodu tutulumu varsa N3 kabul edilmiştir.

İmmünohistokimyasal İnceleme: Östrojen reseptörü (ER) durumu, progesteron reseptörü durumu (PR), cerb-B2 pozitifitesi ile P53 ve Ki-67 ekspresyonu incelenmiştir. İmmünohistokimyasal inceleme %10'luk formalin solüsyonunda fikse edilmiş olan dokuların parafin bloklarından hazırlanan kesitlerde yapılmıştır. Her bir antikor için immünohistokimyasal uygulama tüm olgulara tek seansta uygulanmakta ve pozitif ve negatif kontrol ile birlikte çalışılmıştır. Streptavidin-biotin-peroksidaz saptama yöntemiyle gerçekleştirilmektedir (Leica Bond-max otomatik immünohistokimya boyama cihazı kullanılarak yapılmaktadır).

ER ve PR durumları Quick skor ile belirlenmektedir. Reaksiyon gösteren nükleus yüzdesi ve immün boyanmanın şiddetine dayanan semikantitatif bir yöntemle Quick skor hesaplanır. Boyanma yüzdesi şu şekilde değerlendirilmektedir:

0 = nükleer boyanma yok,

1 = <%1 nükleer boyanma,

2 = %1-10 nükleer boyanma,

3 = %11-33 nükleer boyanma,

4 = 34-66% nükleer boyanma,

5 = %67-100 nükleer boyanma.

Boyanma yoğunluğu şu şekilde değerlendirilmektedir: 0 = boyanma yok, 1 = zayıf boyanma, 2 = orta dereceli boyanma, 3 = kuvvetli boyanma. Boyanma yüzdesi ve boyanma yoğunluğundan elde edilen dereceler toplanarak Quick skor elde edilmektedir (Leake et al. 2000).

C-erbB2 ekspresyonu değerlendirilirken 4 grupta skorlanmaktadır (Ellis et al 2001):

Skor 0: Tümör hücrelerinde boyanma yok ya da %10' dan az hücrede membranöz boyanma var.

Skor 1: %10' dan fazla tümör hücresinin hücre membranının bir kısmında soluk boyanma var.

Skor 2: %10' dan fazla tümör hücresinin hücre membranının tamamında zayıf-orta dereceli boyanma var.

Skor 3: %10' dan fazla tümör hücresinin hücre membranının tamamında güçlü boyanma var.

p53 ve Ki67 ekspresyonları için nükleer boyanma izlenen olgularda, nükleer boyanma gösteren tümör hücrelerinin yüzde oranı değerlendirilmektedir.

Tıbbi Patoloji AD tarafından histolojik grade, aksiller lenf nodu tutulumu ve tanımlanan immünohistokimyasal parametrelere ilişkin incelemeler rutin olarak yapılmaktadır.

3.3. Meme Kanserinde Evreleme

Genel cerrahi AD tarafından hastaların evrelelemeleri rutin olarak yapılmaktadır. (Tablo 3.2)

Tablo 3.2: Meme kanseri TNM evrelemesi (AJCC 2002).

Evre 0	Tis	N0	M0
Evre 1	T1	N0	M0
Evre 2A	T0,T1	N1	M0
Evre 2A	T2	N0	M0
Evre 2B	T2	N1	M0
Evre 2B	T3	N0	M0
Evre 3A	T0,1,2	N2	M0
Evre 3A	T3	N1,2	M0
Evre 3B	T4	N0,1,2	M0
Evre 3C	TX	N3	M0
Evre 4	TX	NX	M1

3.4. Dokulardan Total RNA İzolasyonu

Meme tümörü dokularından Trizol RNA Ekstraksiyon Metodu kullanılarak aşağıdaki basamaklara göre EZ-RNA Total RNA izolasyon kiti (BI, İsrail, Kat. No: 20-400-100) ile total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir:

1. Ependorf tüplere tartılarak alınmış her bir 50 mg tümör dokusu üzerine 500 µl denatürasyon solüsyonu eklendi.
2. Homojenizatör ile 30-60 saniye süreyle dokular homojenize edildi. Her bir uygulama sonrasında homojenizator ucu sırasıyla 8 ml DEPC su, 8 ml %70 EtOH, 8 ml 0,1 M NaOH ve 8ml DEPC (BI, İsrail, Kat. No: 01-852-1) sudan geçirilerek temizlenmesi sağlanarak bir sonraki dokuya geçildi.
3. Homojenizatlar 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
4. İnkübasyon süresi sonunda üzerlerine 500µl ekstraksiyon solüsyonu eklendi. 15 saniye hızlı bir şekilde elde çalkalanarak 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.

5. 10 dakikalık inkübasyon sonrasında, homojenatlar 4°C’de 12.000 x g’de 15 dakika santrifüj edildi.
6. Üst kısımdaki şeffaf faz temiz ependorf tüplere aktarıldı. Şeffaf faz içindeki RNA’nın presipite olması için üzerlerine 500µl izopropanol eklendi.
7. Oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyondan sonra 4°C’de 12.000 x g’de 8 dakika santrifüj edildi.
8. Santrifüjden sonra süpernatantlar atıldı ve RNA ependorf tüplerin dibinde beyaz pellet olarak gözlemlendi.
9. RNA pelletini yıkamak amacıyla üzerine 1’er ml DEPC su ile hazırlanmış %75’lik etanol eklendi ve vortexlendi.
10. Tüpler 7500 x g’de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatantlar atıldı.
11. Pelletler belirli süre kurumaya bırakıldı ve 30-50µl DEPC su eklendi.
12. RNA pelletinin tamamen çözülmesi için kuru ısıtıcıda 55°C’de 10 dakika inkübe edildi.
13. Elde edilen RNA’ların miktarları ve saflığı NanoDrop ND-1000 V.3.7 Spektrofotometre cihazında ölçülerek kullanılıncaya kadar -80°C’lik derin dondurucuda saklandı.

3.5. Kandan Total RNA İzolasyonu

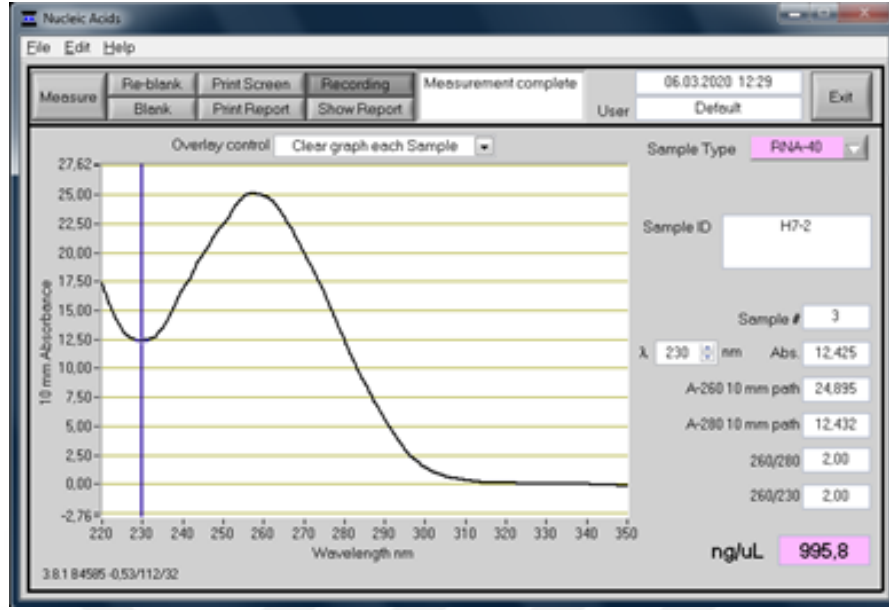
Meme tümör dokularının alındığı olgulara ait periferik kanlardan, Trizol RNA Ekstraksiyon Metodu kullanılarak aşağıdaki basamaklara göre EZ-RNA Total RNA izolasyon kiti (BI, İsrail, Kat. No: 20-400-100) ile total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

1. 500µl periferik kanın üzerine 1ml RBC Lysis Solution (BI, İsrail, Kat. No: 01-888-1) eklendi.
2. 10 dakika oda sıcaklığında arada sırada pipetaj yapılarak inkübe edildi.
3. İnkübasyon süresinin sonunda 300 x g’de 10 dakika santrifüj edildi.
4. Süpernatant atılarak üzerine 500 µl denatürasyon solüsyonu eklendi ve pipetaj yapılarak 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.

5. İnkübasyon süresi sonunda üzerlerine 500µl ekstraksiyon solüsyonu eklendi. 15 saniye hızlı bir şekilde elde çalkalanarak 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
6. 10 dakikalık inkübasyon sonrasında, homojenatlar 4°C’de 12.000 x g’de 15 dakika santrifüj edildi.
7. Üst kısımdaki şeffaf faz temiz ependorf tüplere aktarıldı. Şeffaf faz içindeki RNA’nın presipite olması için üzerlerine 500µl izopropanol eklendi.
8. Oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyondan sonra 4°C’de 12.000 x g’de 8 dakika santrifüj edildi.
9. Santrifüjden sonra süpernatantlar atıldı ve RNA ependorf tüplerin dibinde beyaz pellet olarak gözlendi.
10. RNA pelletini yıkamak amacıyla üzerine 1’er ml DEPC su ile hazırlanmış %75’lik etanol eklendi ve vortexlendi.
11. Tüpler 7500 x g’de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatantlar atıldı.
12. Pelletler belirli süre kurumaya bırakıldı ve 30-50µl DEPC su eklendi.
13. RNA pelletinin tamamen çözülmesi için kuru ısıtıcıda 55°C’de 10 dakika inkübe edildi.
14. Elde edilen RNA’ların miktarları ve saflığı NanoDrop ND-1000 V.3.7 Spektrofotometre cihazında ölçülerek kullanılıncaya kadar -80°C’lik derin dondurucuda saklandı.

3.6. cDNA Sentezi

Elde edilen RNA’lar NanoDrop ND-1000 V.3.7. spektrofotometre cihazında ölçülerek mikrolitredeki mikrogram değerleri belirlendi (Şekil 3.1). cDNA eldesi iScript Reverse Transcription Supermix cDNA sentez kiti (Biorad, USA, Kat. No:1708841) kullanılarak (Tablo 3.3), 1µg total RNA’dan Tablo 3.4’deki protokol doğrultusunda gerçekleştirildi. Elde edilen cDNA’lar Eş Zamanlı PZR’de kullanılıncaya kadar -20°C’lik derin dondurucuda saklandı.



Şekil 3.1: Çalışmaya aldığımız bir olguya ait RNA ölçüm bilgileri

Tablo 3.3: cDNA sentez reaksiyon karışımı

iScript RT Supermix	4 µl
RNA Template (1µg-1pg total RNA)	Her örnek için farklı miktarda
Nuclease free water	Her örnek için farklı miktarda
Toplam	20 µl

Tablo 3.4: cDNA sentezi reaksiyon protokolü

Priming	5 dakika 25°C
Reverse Trankripsiyon	20 dakika 46°C
RT inaktivasyon	1 dakika 95°C

3.7. *PTEN* ve *GAPDH* için Reaksiyon Etkinliklerinin Belirlenmesi

PTEN ve *GAPDH* genlerinin reaksiyon etkinliklerinin belirlenebilmesi için 6 tüpte 1:10 cDNA dilüsyonu hazırlandı. Her bir gen ve housekeeping gen, ilgili konsantrasyonlarda aynı Eş Zamanlı PZR reaksiyonunda amplifiye edildi. Reaksiyon

sonunda elde edilen slope değerlerine göre reaksiyon etkinlikleri belirlendi. Amplifikasyon Etkinliği (E) = $(10^{-1/\text{slope}} - 1) \times 100$

3.8. PTEN genine ait mRNA seviyelerinin Eş Zamanlı PZR ile Ölçülmesi

PTEN geninin mRNA düzeyleri, Eş-Zamanlı PZR yöntemi ile RotorGeneQ cihazı kullanılarak belirlendi. Amplifikasyonlar 10 µL toplam tepkime hacmi içerisinde; cDNA, bölgeye özgü primerler (Oligomer, Ankara) (Tablo 3.5), iTaq Universal SYBR Green Supermix (Biorad, USA, Kat. No: 1725122) ve nuklease free su kullanılarak gerçekleştirildi (Tablo 3.6). Her bir gene ait analizlerin yapılması için, Eş Zamanlı PZR reaksiyon karışımları hazırlandıktan sonra 0.2 ml'lık PZR tüplerine dağıtıldı, üzerine ilgili cDNA'lar eklendi ve cihaza yerleştirildikten sonra Tablo 3.7'da belirtilen amplifikasyon programı kullanılarak PZR reaksiyonları gerçekleştirildi. Reaksiyonlar sonucunda, ilgili genlere ait mRNA düzeylerini gösteren treshold Cycle (Ct) değerleri belirlendi. *PTEN* geni ifade düzeyleri *GAPDH* geni ifade düzeylerine göre normalize edildi.

Tablo 3.5: Hedef genlere ve referans gene ait baz dizileri

Gen Adı	Baz dizisi 5→3'	Baz Uzunluğu	Tm Derecesi
<i>PTEN-F</i>	TGGATTCTGACTTAGACTTGACCT	23	59°C
<i>PTEN-R</i>	GGTGGGTTATGGTCTTCAAAAGG	23	61°C
<i>GAPDH-F</i>	CATTGCCCTCAACGACCACTTT	22	64°C
<i>GAPDH-R</i>	GGTGGTCCAGGGGTCTTACTCC	22	64°C

Tablo 3.6: Eş zamanlı PZR reaksiyon karışımı

İçerik	Hacim
iTaq Universal SYBR Green Supermix	5 µl
cDNA	1 µl
Forward ve Reverse primerler (250-500nm her bir primer)	1+1 toplam 2 µl
Nuclease free water	2µl
Total Hacim	10 µl

Tablo 3.7: *PTEN* ve *GAPDH* amplifikasyon protokolü

	Basamak	Süre	Sıcaklık
	Enzim Aktivasyonu/ Denatürasyon	30sn	95°C
40 döngü	Denatürasyon	5 sn	95°C
	Annealing/Ekstensiyon (Veri Toplanması)	30 sn	60°C
	+Melting Curve Analizi	65-95°C, 0,5°C/5 sn	

İstatistiksel Değerlendirme:

Olgular ile kontrol grubu bireyleri arasında, hedef genlere ait izole edilen mRNA miktarlarındaki rölatif kat değişimlerini hesaplamak için, her bir gene ait amplifikasyon etkinlik değeri ile ortalama Ct değerleri REST 2009 software programına girilmiştir. Program Pfaffl vd., (2002) yöntemi temelinde Qiagen tarafından geliştirilmiştir. Analiz edilecek genlerin ifadenme oranları anlamlılık açısından **Pair Wise Fixed Reallocation Randomizasyon testi** © ile test edilmiştir (Pfaffl vd., 2002).

4. BULGULAR

4.1. Olgulara Ait Klinik ve Demografik Özellikler

Çalışmamızda, dokularından histopatolojik inceleme sonucunda Meme kanser teşhisi konmuş 31 olgu ile patoloji raporu sonucu normal çıkan ve kontrol grubunda yer alan 5 bireye ait patolojik/normal doku ve kan örneklerinde *PTEN* genine ait mRNA ekspresyon analizleri gerçekleştirilmiştir. Olgulara ait klinik ve demografik özellikler Tablo 4.1’de verilmiştir.

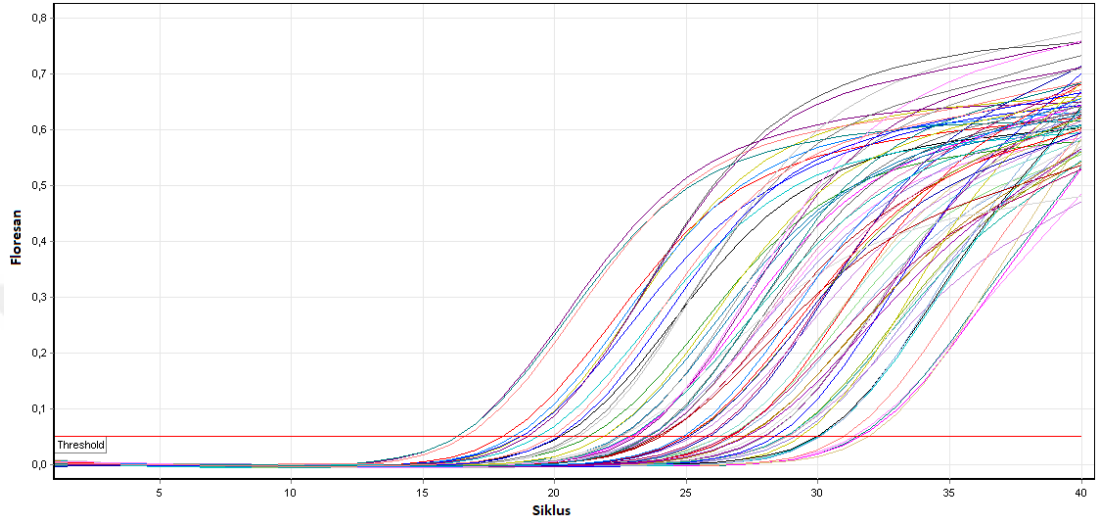
Tablo 4.1: Olgulara ait klinik ve demografik özellikler

Klinik Özellikler	Meme Kanserli Hasta Sayısı N=31	
Ortalama Yaş (SD)	53,16 (±12,02)	
27-65	26/31	%83,87
66-90	5/31	%16,12
Cerrahi Evreleme		
Evre I	10/31	%32,3
Evre IIA	14/31	%45,2
Evre IIB	4/31	%12,9
Evre IIIA	2/31	%6,5
Evre IIIB	1/31	%3,2
Histolojik Grade		
Grade I	11/31	%35,5
Grade II	13/31	%41,9
Grade III	6/31	%22,6
Tümör Yerleşimi		
Sol Meme	14/31	%45,2
Sağ Meme	17/31	%54,8

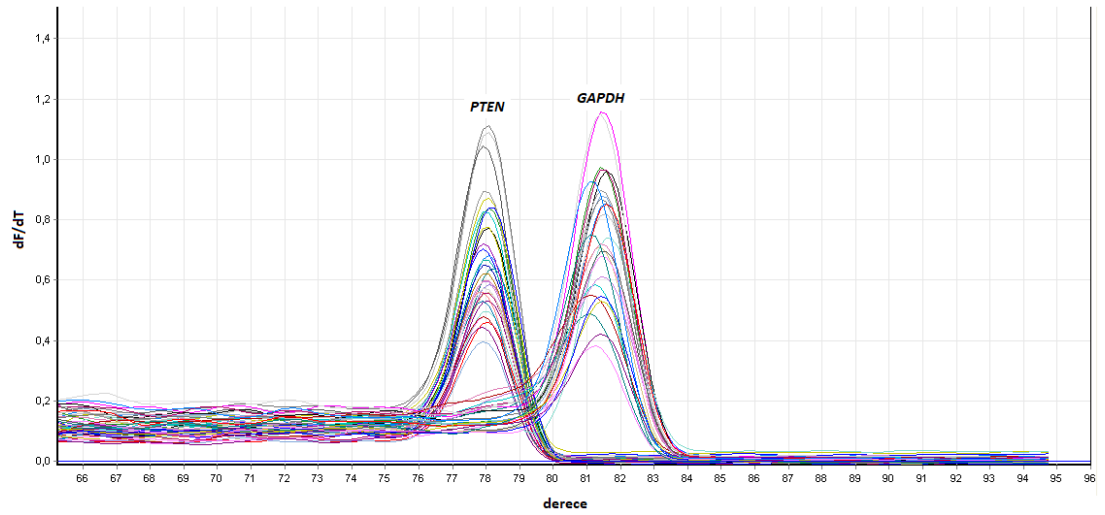
4.2. *PTEN* Genine İlişkin mRNA Analizleri

Çalışmamızda yer alan olgular ile kontrol grubu bireylerden izole edilen RNA moleküllerinden sentez edilen cDNA moleküllerinin, ilgili protokoller doğrultusunda amplifikasyonları yapılmıştır (Şekil 4.2). Her reaksiyon sonunda **melting curve (erime eğrisi)** analizleri yapılarak, primerlerde dimerleşme olmadığı ve alınan floresans değerlerin ilgili gen bölgesine ait olduğu teyit edilmiştir (Şekil 4.2, 4.3). Kontrole ait hedef genler ve referans gene ait Ct değerleri ile hastalara ait hedef

genler ve referans gene ait Ct değerleri Rotor gene-Q Software programından elde edilmiştir. Her bir analiz 3 tekrarlı olarak hem intraassay hem de interassay olarak yapılmıştır. Elde edilen kat değişim değerleri logaritmik olarak hesaplanarak, artış veya azalışları grafik halinde hazırlanmıştır



şekil 4.1: Eş Zamanlı PZR ekspresyon reaksiyon rneği

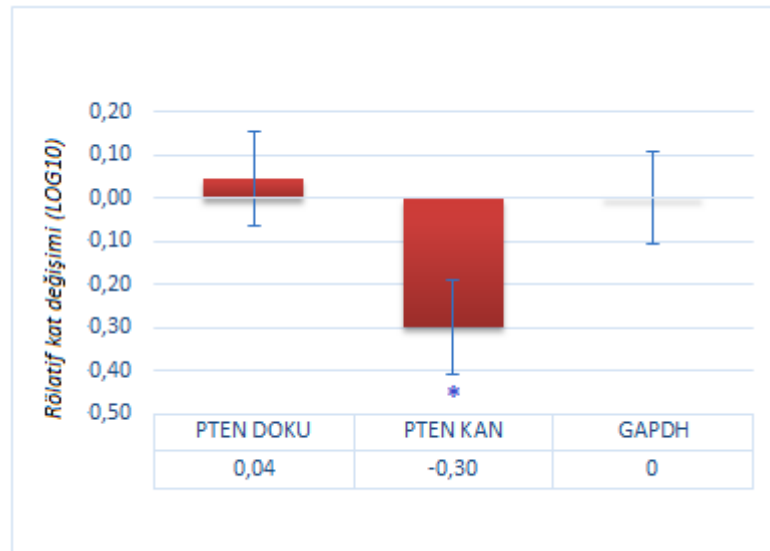


şekil 4.2: *PTEN* ve *GAPDH* erime eğrisi rneği

4.3. Meme Kanserli Olguların Tümör Dokularında ve Periferik Kanlarında İfade Edilen *PTEN* Genine İlişkin mRNA Analizleri

Meme kanserli hastaların tümör dokularında *PTEN* gen ekspresyon değişimleri değerlendirildiğinde toplam 31 hastanın 15'inde down regülasyon, 16'sında up regülasyon gözlenmiştir. Bu değişimlerin %32,3'ü istatistiksel olarak önemli seviyededir ($P<0,05$). Önemli seviyedeki bu değişimlerin %30'u down regülasyon %70'i up regülasyondur. Meme kanserli hastaların periferik kan örneklerinde *PTEN* gen ekspresyon değişimleri değerlendirildiğinde ise toplam 31 hastanın 23'ünde down regülasyon, 8'inde up regülasyon gözlenmiştir. Bu değişimlerin %58,1'i istatistiksel olarak önemli seviyededir ($P<0,05$). Önemli seviyedeki bu değişimlerin %83,3'ü down regülasyon, %16,7'si up regülasyondur.

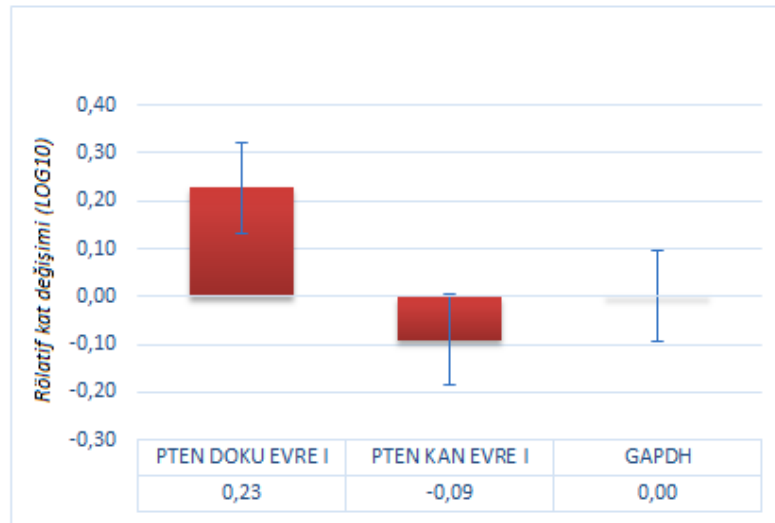
Meme kanserli olguların tümör dokularında ve periferik kan örneklerinde ifade edilen *PTEN* geninin kontrol grubu bireylerin dokularına göre mRNA düzeylerindeki değişimler belirlenmiştir. Periferik kan örneklerinde *PTEN* geninin mRNA düzeyi, kontrole göre **önemli derecede azalmışken** (0,501 kat) ($P<0,05$), tümör dokularında **artmıştır** (1,109 kat) ($P>0,05$) (Grafik 4.1). (Kat değişimleri $\log_{10}$ düzeyinde gösterilmektedir).



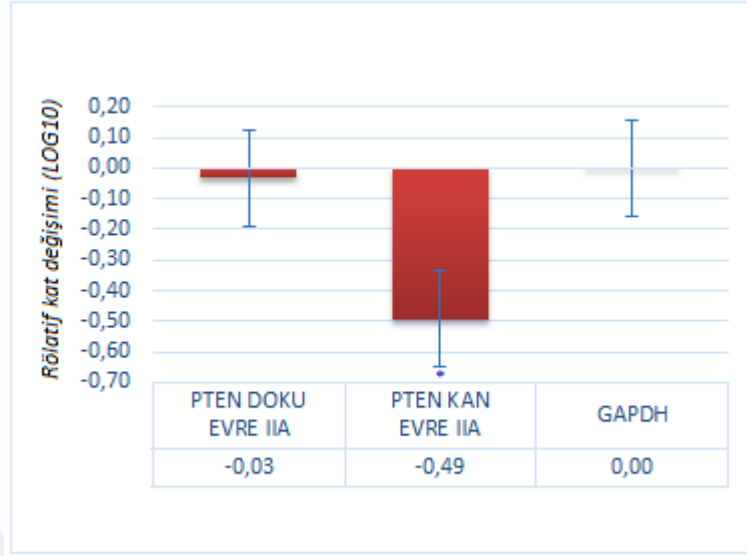
Grafik 4.1: Meme kanserli olguların tümör dokuları ile periferik kan örneklerinde, kontrole göre *PTEN* gen ekspresyonundaki değişimler. *GAPDH* normalizasyon için referans geni olarak kullanılmıştır. (* $P<0,05$).

4.4. Farklı Evrelerde Bulunan Meme Kanserli Olguların Tümör Dokularında ve Periferik Kanlarında İfade Edilen *PTEN* Genine İlişkin mRNA Analizleri

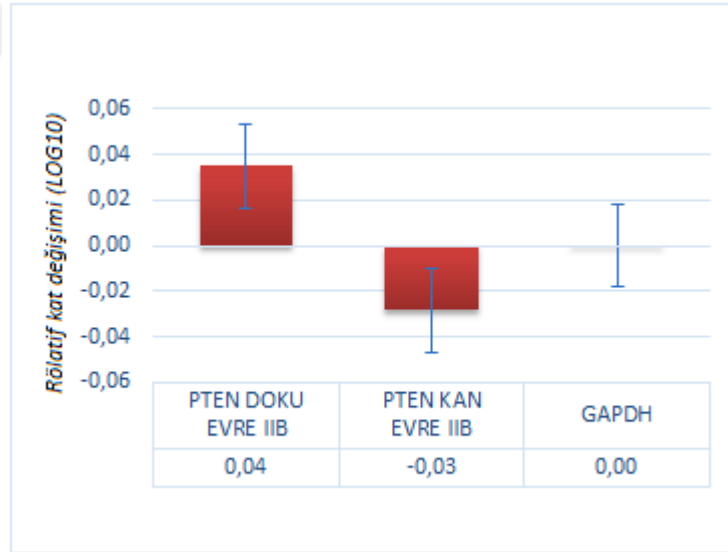
Farklı evrelerde bulunan meme kanserli olguların tümör dokularında ve periferik kan örneklerinde ifade edilen *PTEN* geninin kontrol grubu bireylerin dokularına göre mRNA düzeylerindeki değişimler belirlenmiştir. **Evre I** meme kanserli olguların tümör dokularında *PTEN* geninin mRNA düzeyi, kontrole göre **artmışken** (1,693 kat), periferik kan örneklerinde **azalmıştır** (0,813 kat) ($P>0,05$) (Grafik 4.2). **Evre IIA** meme kanserli olguların periferik kan örneklerinde *PTEN* geninin mRNA düzeyi, kontrole göre **önemli derecede azalmıştır** (0,813 kat) ($P<0,001$). İlaveten tümör dokularında da **azalmıştır** (0,927 kat) ($P>0,05$). Ancak bu azalma önemli değildir ($P>0,05$) (Grafik 4.3). **Evre IIB** meme kanserli olguların tümör dokularında *PTEN* geninin mRNA düzeyi, kontrole göre **artmışken** (1,084 kat), periferik kan örneklerinde **azalmıştır** (0,937 kat) ($P>0,05$). (Grafik 4.4). **Evre IIIA** meme kanserli olguların tümör dokularında ve periferik kan örneklerinde *PTEN* geninin mRNA düzeyi, kontrole göre **artmıştır** (sırasıyla 1,112 kat ve 1,332 kat) ($P>0,05$). (Grafik 4.5). **Evre IIIB** meme kanserli olguların tümör dokularında *PTEN* geninin mRNA düzeyi, kontrole göre **önemli derecede artmışken** (2,231 kat) ($P<0,001$), periferik kan örneklerinde **önemli derecede azalmıştır** (0,371 kat) ($P>0,05$). (Grafik 4.6).



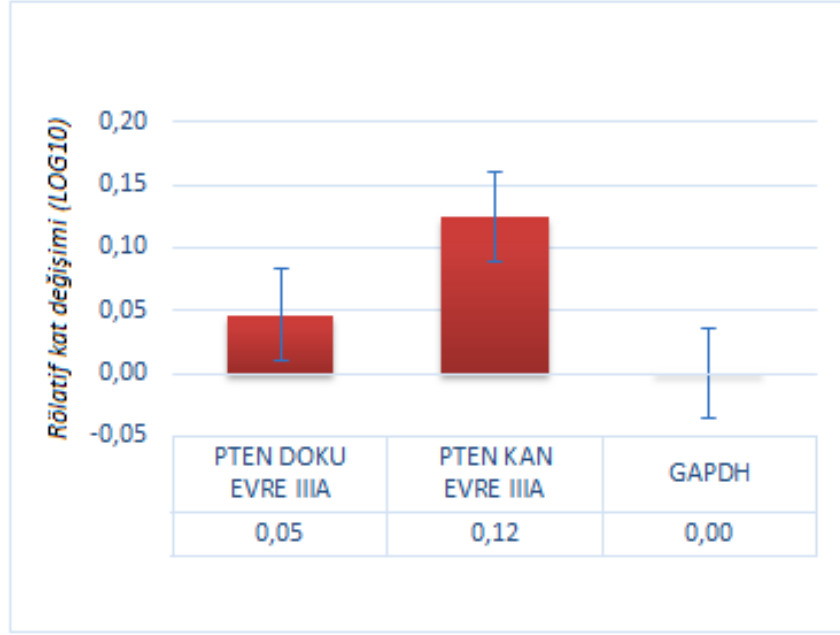
Grafik 4.2: Evre I meme kanserli olguların tümör dokuları ile periferik kan örneklerinde, kontrole göre *PTEN* gen ekspresyonundaki değişimler. *GAPDH* normalizasyon için referans geni olarak kullanılmıştır.



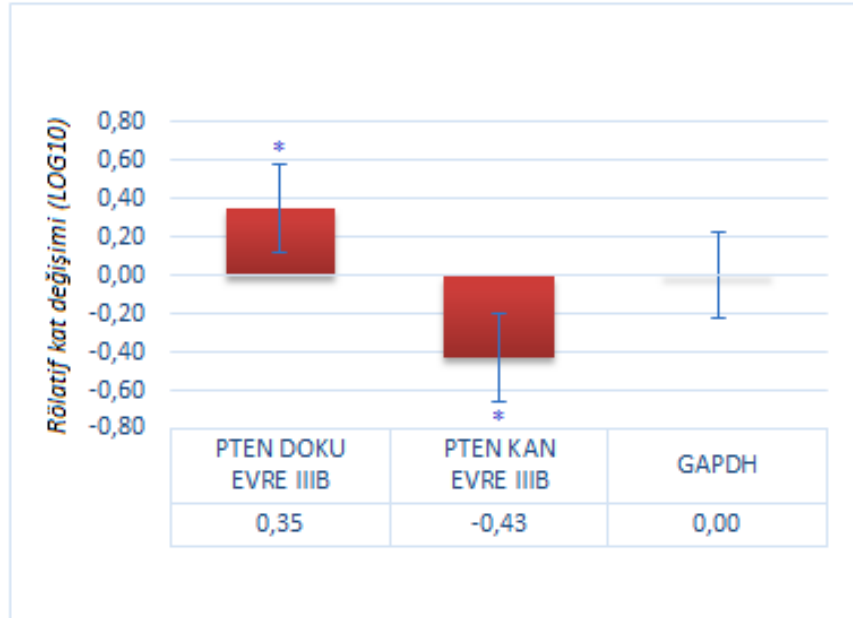
Grafik 4.3: Evre IIA meme kanserli olguların tümör dokuları ile periferik kan örneklerinde, kontrole göre *PTEN* gen ekspresyonundaki değişimler. *GAPDH* normalizasyon için referans geni olarak kullanılmıştır. (* $P < 0,001$).



Grafik 4.4: Evre IIB meme kanserli olguların tümör dokuları ile periferik kan örneklerinde, kontrole göre *PTEN* gen ekspresyonundaki değişimler. *GAPDH* normalizasyon için referans geni olarak kullanılmıştır.



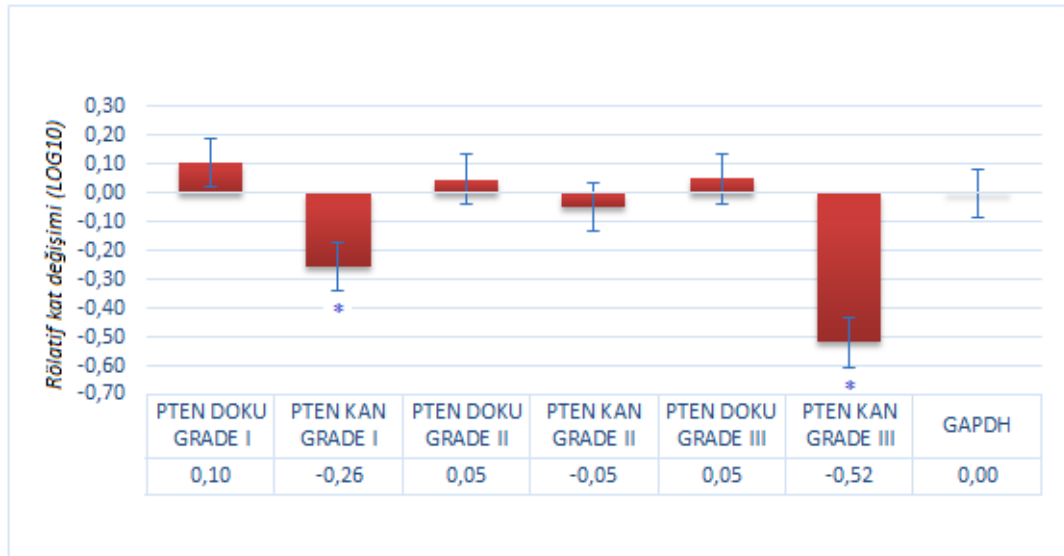
Grafik 4.5: Evre IIIA meme kanserli olguların tümör dokuları ile periferik kan örneklerinde, kontrole göre *PTEN* gen ekspresyonundaki değişimler. *GAPDH* normalizasyon için referans geni olarak kullanılmıştır.



Grafik 4.6: Evre IIIB meme kanserli olguların tümör dokuları ile periferik kan örneklerinde, kontrole göre *PTEN* gen ekspresyonundaki değişimler. *GAPDH* normalizasyon için referans geni olarak kullanılmıştır. (* $P < 0,001$).

4.5. Grade I-II-III'de Bulunan Meme Kanserli Olguların Tümör Dokularında ve Periferik Kanlarında İfade Edilen *PTEN* Genine İlişkin mRNA Analizleri

Farklı histolojik gradelerde bulunan meme kanserli olguların tümör dokularında ve periferik kan örneklerinde ifade edilen *PTEN* geninin kontrol grubu bireylerin dokularına göre mRNA düzeylerindeki değişimler belirlenmiştir. Grade I meme kanserli olguların tümör dokularında *PTEN* geninin mRNA düzeyi, kontrole göre **artmışken** (1,272 kat) ($P>0,05$), periferik kan örneklerinde **önemli derecede azalmıştır** (0,554 kat) ($P<0,05$). Grade 2 meme kanserli olguların periferik kan örneklerinde *PTEN* geninin mRNA düzeyi, kontrole göre **artmışken** (1,114 kat), periferik kan örneklerinde **azalmıştır** (0,897 kat) ($P<0,05$). Grade 3 meme kanserli olguların periferik kan örneklerinde *PTEN* geninin mRNA düzeyi, kontrole göre **artmışken** (1,116 kat), periferik kan örneklerinde **önemli derecede azalmıştır** (0,302 kat) ($P<0,05$) (Grafik 4.7).



Grafik 4.7: Grade I-II-III'de bulunan meme kanserli olguların tümör dokuları ile periferik kan örneklerinde, kontrole göre *PTEN* gen ekspresyonundaki değişimler. *GAPDH* normalizasyon için referans geni olarak kullanılmıştır. (* $P<0,05$).

4.6. Meme Kanserli Hastaların Cerrahi Evre, Histolojik Grade, *PTEN* gen Ekspresyonu, ER, PR, CerbB2, ki67 ve p53 İmmünohistokimyasal Sonuçları

Meme Kanserli hastalara ait *PTEN* gen ekspresyon seviyeleri (Up/down regülasyon), Cerrahi evre, Histolojik grade, ER, PR, CerbB2, ki67 ve p53 immünohistokimyasal durumları Tablo 4.2’de gösterilmiştir. İlâveten, Evre I, Evre IIA, Evre IIB, Evre IIIA ve Evre IIIB’ye göre özellikler sırasıyla Tablo 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7’de gösterilmiştir. Meme kanseri Evre IIA’da bulunan olguların periferik kan örneklerinde gözlenen *PTEN* gen ekspresyonunda gözlenen **down regülasyon %92,9** oranıyla dikkat çekmektedir (Tablo 4.4).

4.6.1. *PTEN* Gen Ekspresyon Değişimlerinin ER ve PR Durumları İle Değerlendirilmesi

Meme kanserli hastaların tümör dokularında down regülasyon gözlenen olguların ER ve PR durumları değerlendirilmiştir. Tümör dokularında *PTEN* geninin down regüle olması ile ER ve PR değerlerinin pozitifliği arasında anlamlı güçlü seviyede bir korelasyon bulunmaktadır (pearson korelasyonu, $r=0,770$, $P<0,01$). Aynı şekilde periferik kan örneklerinde *PTEN* geninin down regüle olması ile ER ve PR değerlerinin pozitifliği arasında anlamlı güçlü seviyede bir korelasyon bulunmaktadır (pearson korelasyonu, $r=0,772$, $P<0,01$). İlâveten periferik kan örneklerinde *PTEN* geninin önemli seviyede down regüle olduğu olguların ER ve PR değerlerinin pozitifliği arasında anlamlı güçlü seviyede bir korelasyon bulunmaktadır (pearson korelasyonu, $r=0,672$, $P<0,01$). CerbB2 pozitif olan 1 olgu mevcuttur. Bu olgu evre IIA’da bulunmaktadır. Hem meme tümör dokusunda hem de periferik kan örneğinde *PTEN* gen ekspresyon düzeyi down regüledir. Bu down regülasyon periferik kanda önemli seviyededir ($P<0,001$). Bunun yanısıra triple negatif olan hastalar (ER (-), PR (-) (HER2(-) değerlendirildiğinde bu hastaların periferik kan örneklerinin hepsinde *PTEN* gen ekspresyonunda down regülasyon gözlenmektedir.

Tablo 4.2: Meme Kanseri hastalarına ait *PTEN* gen ekspresyon seviyeleri (Up/down regülasyon), Cerrahi evre, Histolojik grade, immünohistokimyasal durumları.

Sıra	Cerrahi Evre	Histolojik Grade	ER	PR	CerbB2	<i>PTEN</i> Ekspresyon DOKU	<i>PTEN</i> Ekspresyon KAN	Ki67	P53
H1	2B	1	6	-	-	UP	DOWN	5%	10%
H2	2A	1	-	-	-	DOWN*	DOWN	60%	10%
H3	2A	1	6	8	-	UP*	UP	%2-3	10%
H4	1	2	6	8	-	UP	DOWN*	%3+	10%
H5	2B	2	7	8	-	DOWN	UP	%7-8+	5%
H6	1	1	8	8	-	DOWN	UP	40%+	50%
H7	2A	3	7	8	-	UP	DOWN*	%20+	%1-2
H8	1	2	7	7	-	UP	UP*	20%	80%
H9	2A	3	-	-	-	DOWN*	DOWN*	%80+	100%
H10	2A	1	6	6	-	DOWN	DOWN	%2-3	5%
H11	2A	2	8	8	-	DOWN	DOWN	%4-5	10%
H12	2A	3	8	5	pozitif	DOWN	DOWN*	20%	70%
H13	2A	1	8	8	-	UP*	DOWN*	10%	20%
H14	1	1	8	8	-	UP*	DOWN*	%1-2	%2-3
H15	2A	1	6	6	-	UP*	DOWN*	30%	10%
H16	3A	2	8	8	-	UP	DOWN*	15%	%1-2
H17	2A	3	8	-	-	DOWN*	DOWN*	30%	40%
H18	1	2	8	8	-	DOWN	DOWN	5%	%1-2
H19	2A	1	8	8	-	UP	DOWN*	%1-2	%1-2
H20	1	2	-	-	-	UP	DOWN	80%	60%
H21	2A	1	7	6	-	DOWN	DOWN*	30%	-
H22	3A	1	8	8	-	DOWN	UP*	60%	10%
H23	2B	2	-	-	-	UP	DOWN	80%	80%
H24	1	2	7	7	-	DOWN	UP	%2-3	5%
H25	1	2	8	8	-	DOWN	UP	20%	20%
H26	2B	3	4	4	-	DOWN	DOWN	60%	-
H27	2A	2	6	8	-	DOWN	DOWN*	5%	yok
H28	2A	3	7	7	-	UP*	DOWN*	15%	yok
H29	1	2	-	-	-	UP	DOWN*	20%	yok
H30	3B	2	7	8	-	UP*	DOWN*	%7-8	yok
H31	1	3	6	8	-	UP*	UP*	10%	yok

* Kontrolde göre *PTEN* geni ekspresyon seviyelerindeki önemli değişimi göstermektedir.

Tablo 4.3: Cerrahi Evre I Meme Kanserli hastalara ait *PTEN* gen ekspresyon seviyeleri (Up/down regülasyon), histolojik grade ve immünohistokimyasal durumları.

Sıra	Cerrahi Evre	Histolojik Grade	ER	PR	CerbB2	<i>PTEN</i> Ekspresyon DOKU	<i>PTEN</i> Ekspresyon KAN	Ki67	P53
H4	1	2	6	8	-	UP	DOWN*	%3+	10%
H6	1	1	8	8	-	DOWN	UP	40%+	50%
H8	1	2	7	7	-	UP	UP*	20%	80%
H14	1	1	8	8	-	UP*	DOWN*	%1-2	%2-3
H18	1	2	8	8	-	DOWN	DOWN	5%	%1-2
H20	1	2	-	-	-	UP	DOWN	80%	60%
H24	1	2	7	7	-	DOWN	UP	%2-3	5%
H25	1	2	8	8	-	DOWN	UP	20%	20%
H29	1	2	-	-	-	UP	DOWN*	20%	yok
H31	1	3	6	8	-	UP*	UP*	10%	yok

*Kontrolle göre *PTEN* geni ekspresyon seviyelerindeki önemli değişimi göstermektedir.

Tablo 4.4: Cerrahi Evre IIA Meme Kanserli hastalara ait *PTEN* gen ekspresyon seviyeleri (Up/down regülasyon), histolojik grade ve immünohistokimyasal durumları.

Sıra	Cerrahi Evre	Histolojik Grade	ER	PR	CerbB2	<i>PTEN</i> Ekspresyon DOKU	<i>PTEN</i> Ekspresyon KAN	Ki67	P53
H2	2A	1	-	-	-	DOWN*	DOWN	60%	10%
H3	2A	1	6	8	-	UP*	UP	%2-3	10%
H7	2A	3	7	8	-	UP	DOWN*	%20+	%1-2
H9	2A	3	-	-	-	DOWN*	DOWN*	%80+	100%
H10	2A	1	6	6	-	DOWN	DOWN	%2-3	5%
H11	2A	2	8	8	-	DOWN	DOWN	%4-5	10%
H12	2A	3	8	5	pozitif	DOWN	DOWN*	20%	70%
H13	2A	1	8	8	-	UP*	DOWN*	10%	20%
H15	2A	1	6	6	-	UP*	DOWN*	30%	10%
H17	2A	3	8	-	-	DOWN*	DOWN*	30%	40%
H19	2A	1	8	8	-	UP	DOWN*	%1-2	%1-2
H21	2A	1	7	6	-	DOWN	DOWN*	30%	-
H27	2A	2	6	8	-	DOWN	DOWN*	5%	yok
H28	2A	3	7	7	-	UP*	DOWN*	15%	yok

* Kontrolle göre *PTEN* geni ekspresyon seviyelerindeki önemli değişimi göstermektedir.

Tablo 4.5: Cerrahi Evre IIB Meme Kanserli hastalara ait *PTEN* gen ekspresyon seviyeleri (Up/down regülasyon), histolojik grade, immünohistokimyasal durumları.

Sıra	Cerrahi Evre	Histolojik Grade	ER	PR	CerbB2	<i>PTEN</i> Ekspresyon DOKU	<i>PTEN</i> Ekspresyon KAN	Ki67	P53
H1	2B	1	6	-	-	UP	DOWN	5%	10%
H5	2B	2	7	8	-	DOWN	UP	%7-8+	5%
H23	2B	2	-	-	-	UP	DOWN	80%	80%
H26	2B	3	4	4	-	DOWN	DOWN	60%	-

* Kontrolle göre *PTEN* geni ekspresyon seviyelerindeki önemli değişimi göstermektedir.

Tablo 4.6: Cerrahi Evre IIIA Meme Kanserli hastalara ait *PTEN* gen ekspresyon seviyeleri (Up/down regülasyon), histolojik grade ve immünohistokimyasal durumları

Sıra	Cerrahi Evre	Histolojik Grade	ER	PR	CerbB2	<i>PTEN</i> Ekspresyon DOKU	<i>PTEN</i> Ekspresyon KAN	Ki67	P53
H16	3A	2	8	8	-	UP	DOWN*	15%	%1-2
H22	3A	1	8	8	-	DOWN	UP*	60%	10%

* Kontrolle göre *PTEN* geni ekspresyon seviyelerindeki önemli değişimi göstermektedir.

Tablo 4.7: Cerrahi Evre IIIB Meme Kanserli hastaya ait *PTEN* gen ekspresyon seviyeleri (Up/down regülasyon), histolojik grade ve immünohistokimyasal durumları.

Sıra	Cerrahi Evre	Histolojik Grade	ER	PR	CerbB2	<i>PTEN</i> Ekspresyon DOKU	<i>PTEN</i> Ekspresyon KAN	Ki67	P53
H30	3B	2	7	8	-	UP*	DOWN*	%7-8	yok

*Kontrolle göre *PTEN* geni ekspresyon seviyelerindeki önemli değişimi göstermektedir.

5. TARTIŞMA

Moleküler biyoloji ve genetik, tıbbi onkolojideki en önemli ve en ilginç konulardan birini temsil eder, bu sebeple tümör ilerlemesinde yer alan moleküler değişiklikler hakkında global ve detaylı bir bilgi sağlar, bu da karsinogenez sürecinin daha iyi anlaşılmasına, yeni prognostik belirteçlerin, terapötik hedeflerin keşfedilmesine yol açar (Kheirleiseid 2011).

Gen ekspresyon analizi, kanserdeki global gen dozajı hassasiyetini belirlemiştir. Şimdiye kadar binlerce genetik varyant; kanser, diğer hastalıklar ve karmaşık özellikler ile ilişkilendirilmiştir. Hastalıkla ilişkili tek nükleotid polimorfizmlerinin ve somatik kopya sayısı değişimlerinin, gen ifade seviyelerini sıklıkla etkilediği saptanmıştır (Fehrmann ve ark. 2011; Westra ve ark. 2013; Stranger ve ark. 2007; Ciriello ve ark 2013). Bu sonuçlar, gen ifadesindeki değişikliklerin, genetik varyantların ortaya çıkardığı fenotip üzerindeki etkilerini göstermeleri için önemli bir ara mekanizma olabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte, genlerin ifade düzeylerinin somatik kopya sayısı değişimlerinden ne ölçüde etkilendiği henüz tam olarak belli değildir.

Meme kanseri, kadınlarda en sık görülen kanser olup, tüm kadın malignitelerinin % 30'unu oluşturur ve bu gruptaki kansere bağlı ölümlerin sadece % 16'sından sorumludur, sadece akciğer kanserinden sonra ikincidir (Landis ve ark. 1998). Meme kanseri 25 yaşın altında nadir olup; bu yaştan sonra menapoz kadar devamlı artar ve daha sonraki dönemde bunu yavaş bir yükselme izler. Meme kanserinin ortalama tanı yaşı 64'dür (Kumar ve ark 2010). Son birkaç on yılda, bu hastalığın insidansında önemli bir azalma olmamıştır ve kadın popülasyonunda önemli bir morbidite ve mortalite nedeni olmaya devam etmektedir. Bu, erken teşhis ve yeni tedavilerin, özellikle tümör büyümesinin ve metastazının düzenlenmesinde yer alan ayrı hücresel hedeflere yönelik ajanlar geliştirme araştırma girişimlerini teşvik etmiştir (Peter ve ark. 2001).

Meme kanserlerinde tedavi planlamada ve prognoz belirlemede en önemli parametre kanserin tanı anındaki evresidir. Tümör çapı, tümör tipi, histolojik ve nükleer derece,

lenfatik invazyon, aksiller lenf nodu metastazı da prognozu belirlemede bilinen diğer önemli faktörlerdir (Tavassoli 1999). Meme kanserinin gen ekspresyon veri analizleri; prognoz ve tedavi açısından farklı histolojik alt tiplere ayrılabilceğini göstermiştir (Rao ve ark. 2013). Meme kanserinde klinik doğru yolu öngörmeye ve hastalığın yönetimi için spesifik biyobelirteçlerden olan östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü2 (HER2) durumunun tespiti gerekmektedir. Bu belirteçlerin prognostik ve prediktif önemi kanıtlanmıştır (Choccalingam ve ark.2012). Kötü prognozlu olan meme kanserini tespit etmeye yönelik yapılan analizlerden biri olan İHK yöntemi, gen tarama yöntemiyle karşılaştırıldığında %76 duyarlılık ve %100 özgüllüğe sahiptir (Nielsen ve ark. 2004). Rutin hastanelerde gen profil analizlerinin kompleks ve maliyetli olması nedeniyle İHK analizleri cazip hale gelmiştir.

5.1. Meme Kanser ile *PTEN* Gen İfadesinin İlişkisi

Kanser oluşumunda rol oynayan iki temel gen grubu: onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerdir. Onkogenler çoğunlukla proto-onkogen adı verilen normal hücrel genlerin mutant allelleridir. Onkogenlerin fonksiyon kazandıran mutasyon özelliği ve tümör baskılayıcı genlerin fonksiyon-kaybı malign fenotip oluşumuna sebep olmaktadır. Kanser hücreleri, mutasyonların aktif hale gelmesi (fonksiyon kazanılması), ve/veya bir veya birden fazla hücrel protoonkogenin artmış ekspresyonu, ve/veya mutasyonların inaktive olması (fonksiyon kaybı), ve/veya bir veya birden fazla tümör süpresör genin ekspresyonunun azalması sonucu normal büyüme kontrol mekanizmalarından kaçmaktadır. Çoğu onkogen ve tümör baskılayıcı gen ürünleri hücre döngüsü giriş çıkışlarını kontrol eden, farklılaşmayı yöneten, DNA hasarını tespit edip tamir mekanizmasını başlatan ve/veya apoptozu düzenleyen sinyal iletim yollarının bileşenleridir (Kolasa ve ark. 2006).

Meme kanserinin gelişimine genetik ve çevresel faktörler etki etmektedir. Meme kanserinde aktive edilen genler iki kategoriye ayrılır: *P53* ve *PTEN* genleri gibi tümör baskılayıcıları olarak adlandırılan ve tümör ilerlemesini inhibe eden genler ile

ekspresyonunun artmasıyla tümör ilerlemesi veya hızlanmasına neden olan genlerdir (de Assis ve Isoldi, 2013; Golmohammadi ve ark., 2013).

PTEN 10. kromozomda yer alan tümör supresör gen ailesindendir. Hücre proliferasyonu ile sağkalımında rol oynayan PI3K yolağının en önemli modülatörüdür. Özellikle, meme kanserinde hücre hattı analizleri, *PTEN*'in PI3K'nın aşağı regülasyonu ile sonuçlanan G1 tutuklanması ve hücre ölümü ile meme kanseri büyümesini baskıladığını göstermiştir (Weng ve ark. 1999, Li ve ark. 1998). Embriyonik kök hücrelerin çalışmaları, *PTEN* geninin mutasyonlarına sahip hücrelerin artmış bir büyüme oranı sergilediğini ve S-fazına gelişmiş bir giriş gösterdiğini göstermiştir (Sun ve ark., 1999). *PTEN*, PI3K/AKT (fosfatidilinozitol-3-kinaz/protein kinaz B) yolağını olumsuz yönde etkileyen bir tümör baskılayıcı gen ailesindendir (Ming ve ark. 2010; Blanco-Aparicio ve ark. 2007). Tüm dokularda özellikle meme dokusunda bulunan bu sinyal kaskadı hücre büyümesi, yaşaması, üremesi, göçü ve metabolizması gibi birçok faktörü etkilemektedir (Ming ve He 2009).

Delesyon, mutasyon sonucunda azalmış *PTEN* fonksiyonu insanlarda sporadik kanser ve herediter kanser sendromları saptanmış olup, Cowden Hastalığı olanlarda *PTEN* fonksiyon kaybına yol açan germline mutasyonları tespit edilmiştir (Ferlay ve ark 2012; Murff ve ark. 2004; Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 2001). Yapılan birçok çalışmada *PTEN*'in meme kanserleri için de önemli bir tümör baskılayıcı gen olduğunu ve kaybının memede karsinogenezi indüklediği belirlenmiştir. Sonuç olarak, *PTEN*'in hücre döngüsü ilerlemesini ve hücre sağkalımını düzenlemektedir. **Bizim çalışmamızda da**, meme kanserli hastaların tümör dokularında *PTEN* gen ekspresyon değişimleri değerlendirildiğinde toplam 31 hastanın 15'inde down regülasyon, 16'sında up regülasyon gözlenmiştir. Bu değişimlerin %32,3'ü istatistiksel olarak önemli seviyededir ($P<0,05$). Önemli seviyedeki bu değişimlerin %30'u down regülasyon %70'i up regülasyondur. Meme kanserli hastaların periferik kan örneklerinde *PTEN* gen ekspresyon değişimleri değerlendirildiğinde ise toplam 31 hastanın 23'ünde down regülasyon, 8'inde up regülasyon gözlenmiştir. Bu değişimlerin %58,1'i istatistiksel olarak önemli seviyededir ($P<0,05$). Önemli seviyedeki bu değişimlerin %83,3'ü down regülasyon,

%16,7'si up regüstasyondur. Kan ve doku arasında *PTEN* geni ekspresyon davranışları bakımından zıtlık söz konusudur. Bunun yanı sıra, meme kanseri Evre IIA'da bulunan olguların periferik kan örneklerinde analiz edilen *PTEN* gen ekspresyonundaki down regüstasyon %92,9 oranıyla dikkat çekmektedir.

Yeni çalışmalar bu gen üzerinde yoğunlaşmaktadır. *PTEN* geni, meme kanseri dahil olmak üzere bazı malign tümörlerde deaktive edilir (Bogdanova ve ark., 2013; Yu ve ark., 2015; Zhang ve ark., 2015). Bu genin fonksiyonel rolü, kanser hücrelerinde apoptozun indüklenmesidir. *PTEN* gen ürünü, kemotaksis sinyallerinin üretilmesinde ve hücre proliferasyonunun inhibisyonunda rol oynar. *PTEN* geninin işlev bozukluğu sadece birkaç kanserle ilişkili olmakla kalmaz, aynı zamanda kardiyovasküler hastalıklar, diyabet, Parkinson hastalığı ve şizofreniye de yol açabildiği rapor edilmiştir (Gori ve ark., 2009). *PTEN* lokusundaki genetik değişiklikler, primer merkezi sinir sistemi, meme, prostat ve mesane tümörleri ve Hodgkin dışı lenfoma dahil olmak üzere çeşitli neoplazmalarda tanımlanmıştır (Li ve ark., 1997, McMenamin ve ark., 1999, Nakahara ve ark., 1998, Cairns ve ark., 1998). Ek olarak, *PTEN* geninin germline mutasyonları, Cowden hastalığı olarak bilinen, %25 ila %50 ömür boyu meme kanseri gelişme riski ile ilişkili, nadir, otozomal dominant, ailesel bir kanser sendromu ile ilişkilidir (Peter ve ark. 2001).

PTEN geninin somatik hücrelerdeki değişiklikleri, bazı hücre dizilerinde ve tiroid tümörleri, beyin tümörleri, prostat karsinomları, endometriyal karsinomlar ve melanom dâhil olmak üzere primer tümörlerde yaygındır. Ancak meme kanseri, böbrek karsinomları ve baş-boyun skuamöz hücreli karsinomlarında bu tür değişikliklerin daha az görüldüğü bildirilmiştir (Tachibana ve ark. 2002). Glioblastomalarda *PTEN* geninin mutasyonel inaktivasyonunun *PTEN* ekspresyonu kaybından daha az sıklıkta görüldüğü rapor edilmiştir (Fults ve Pedone, 2000) ve bu durum benzer şekilde endometriyal karsinomlarda (Mutter ve ark., 2000), malign melanomlarda (Poetsch ve ark., 2001; Zhou ve ark., 2000), hematolojik malignitelerde (Dahia ve ark., 1999) ve meme kanserinde (Perren ve ark., 1999) bildirilmiştir. Bu durum, *PTEN* ekspresyonunun mutasyonlar dışında kalan mekanizmalar tarafından da kaybedilebileceğini düşündürmektedir. İnsan neoplazmlarında *PTEN* promotöründe CpG adalarının metillendiği ile ilgili

alışmalar yapılmıştır. Salvesen ve ark. (2001) 138 endometrial karsinomun 26'sında *PTEN* promotöründe metilasyon tespit etmişler ve bunun sıklıkla metastatik hastalıkla ve mikrosatelit unstabil fenotip ile ilişkili olduğunu rapor etmişlerdir. Benzer olarak Kang ve ark. (2002) 66 mide karsinomun 26'sında *PTEN* promotöründe metilasyon tespit etmişler ve metilasyon tespit edilen olguların %73'ünde ise *PTEN* ekspresyonunda kayıp rapor etmişlerdir. Bizim çalışmamızda, Grade I meme kanserli olguların tümör dokularında *PTEN* geninin mRNA düzeyi, kontrole göre artmışken, periferik kan örneklerinde önemli derecede azalmıştır. Grade 2 meme kanserli olguların periferik kan örneklerinde *PTEN* geninin mRNA düzeyi, kontrole göre artmışken, periferik kan örneklerinde azalmıştır. Grade 3 meme kanserli olguların periferik kan örneklerinde *PTEN* geninin mRNA düzeyi, kontrole göre artmışken, periferik kan örneklerinde önemli derecede azalmıştır. Bu sonuçlara göre *PTEN* ekspresyonu değerlendirildiğinde her histolojik gradda tümör dokusunda *PTEN* geni up regüle iken periferik kanda down regüle olduğu öne çıkmaktadır.

PTEN fonksiyonunun kaybı, *PTEN* mutasyonları, 10q23 kromozomu üzerindeki *PTEN* lokusunda LOH ve *PTEN* ekspresyonunun epigenetik susturulmasını içeren farklı mekanizmalar tarafından meydana gelebilir. Her iki alelinde mutasyonel inaktivasyonu veya delesyonu *PTEN* fonksiyonunun kaybı için gereklidir, ancak *PTEN*'in down regülasyonuna TGF- β gibi diğer genler aracılık edilebilir (Li ve Sun, 1997). Baeza ve ark., (2003) glioblastomalarda *PTEN* ifadesinin kaybının *PTEN* metilasyonu ile ilişkili olabileceği ve bunların glioblastomaların gelişimiyle doğrudan ilişkili olmayan geç olaylar olduğu öne sürmüşlerdir.

Genel olarak insan kanserlerinde, *PTEN*, mutasyonun en yaygın hedeflerinden biridir ve mutasyon sıklığı p53'e yaklaşmaktadır. Bununla birlikte, Cowden hastalığı olan hastalarda, *PTEN* mutasyonunun türü ve etkilenen bölgeler meme hastalığı varlığına etki edebilmektedir (Inaba ve ark., 2005). Bu genetik veriler *PTEN* fonksiyonunun normal gelişim için gerekli olduğunu ve *PTEN* kaybının karsinogeneze katkıda bulunduğunu göstermektedir. Gen transferi ve knockout çalışmaları bu fikirleri doğrulamaktadır. İlginç olarak *PTEN*'in farklı tip tümörlerde ayrı mekanizmalarla hücre büyümesini baskıladığı, glioblastoma hücrelerini G1 fazında yakaladığı

(Kupryjanczyk ve ark. 2003) fakat karsinomlarda apoptozu indüklediği rapor edilmiştir (Konopka ve ark. 2002; Hamilton ve ark. 2000)

Cho ve ark. (2003) 105 meme kanseri tümörünün %45'inde *PTEN* ekspresyon kaybı rapor etmişlerdir. Hastalığı tekrarlayan grupta 32 hastanın 19'unda (%59) *PTEN* ekspresyon kaybı mevcuttur. Oysa ki bu oran hastalığı tekrarlamayan grupta %38'dir. *PTEN* ekspresyonundaki kayıp, östrojen reseptörleri, tekrarlamama, HER-2/neu over ekspresyon ile korele olarak rapor edilmiştir. Özellikle HER-2/ neu'nun over eksprese olması durumunda genel hayatta kalma oranının *PTEN* ekspresyonundaki kayıpla korele olduğu bildirilmiştir. Oysa ki HER-2/neu'nun negatif olması durumunda herhangi bir korelasyon yoktur. Progesteron reseptörü ve hastalığın evresi *PTEN* ekspresyonu ile bir ilişki göstermemiştir.

Peter ve ark. (2001). 151 meme tümörünün % 48'inde *PTEN* protein ekspresyonunda kayıp bildirmişlerdir. Yapılan analizlerde, *PTEN* protein ekspresyonundaki kaybın, nod pozitifliğinin, evresinin, tümör derecesinin hastalığa bağlı ölümlerle ilişkili olduğunu rapor etmişlerdir. *PTEN* protein ekspresyonundaki kaybın öngörülen lenf nodu metastazı ve östrojen reseptör boyanmasındaki kayıpla korele olduğu bildirilmiştir. *PTEN* protein ekspresyonundaki kayıp, evre, tümör derecesi, hastalığın nüksetmesi veya progesteron reseptör kaybı ile korele olmadığı bildirilmiştir. Bu sonuçların önerilen *PTEN* geninin meme kanserinde aday bir tümör süpresör olduğunu ve bu belirteç için gelecek çalışmalara ihtiyaç olduğunu göstermektedir. Benzer şekilde sonuçlar farklı araştırmacılar tarafından da rapor edilmiştir (Feilotter ve ark., 1999; Bose ve ark. 1998; Perren ve ark., 1999). *PTEN* kaybının meme neoplazisi ile korelasyonu literatürde iyi tanımlanmamıştır ve az sayıda rapor prognostik parametreleri analiz etmektedir. Perren ve ark. tümör derecesi, tümör boyutu, lenf nodu durumu ve ER/PR durumları ile Bose ve ark. evre, nükleer derece, DNA ploidi ve hormon reseptör durumu ile 10q23'te heterozigotluk kaybını değerlendirmişlerdir. Her iki çalışmada da sağkalım ve hastalık nüksü ile karşılaştırmalar yapılmamıştır. Her iki analizde de *PTEN* kaybının ER kaybı ile ilişkisi bulunmuştur. Ayrıca PR kaybı ile anlamlı bir ilişki bulunmuştur (Perren ve ark.1999). İlaveten Peter ve ark. (2001) yaptıkları çalışmada, 25 ER negatif tümörün 17'sinde anlamlı derecede *PTEN* ekspresyonu kaybı ve PR negatif tümörlerde

neredeyse anlamlı *PTEN* kaybı ile doğrulanmıştır. Bu korelasyonun altında yatan neden açık değildir, ancak *PTEN* ekspresyon kaybının agresif bir ER/PR negatif fenotipe bağlı olduğu görülmektedir. Sonuç olarak, Peter ve ark. (2001) *PTEN* protein kaybı ile steroid reseptör hormonal kaybı, lenf nodu metastazı ve meme kanserinde sağkalım gibi olumsuz prognostik faktörler arasında anlamlı korelasyon saptamışlardır. Bizim çalışmamızda, meme kanserli hastaların tümör dokularında down regülasyon gözlenen olguların ER ve PR durumları değerlendirilmiştir. Tümör dokularında *PTEN* geninin down regüle olması ile ER ve PR değerlerinin pozitifliği arasında anlamlı güçlü seviyede bir korelasyon bulunmaktadır. Aynı şekilde periferik kan örneklerinde *PTEN* geninin down regüle olması ile ER ve PR değerlerinin pozitifliği arasında anlamlı güçlü seviyede bir korelasyon bulunmaktadır. İlaveten periferik kan örneklerinde *PTEN* geninin önemli seviyede down regüle olduğu olguların ER ve PR değerlerinin pozitifliği arasında anlamlı güçlü seviyede bir korelasyon bulunmaktadır. CerbB2 pozitif olan 1 olgu mevcuttur. Bu olgu evre IIA'da bulunmaktadır. Hem meme tümör dokusunda hem de periferik kan örneğinde *PTEN* gen ekspresyon düzeyi down regüledir. Bu down regülasyon periferik kanda önemli seviyededir. Bunun yanı sıra triple negatif olan hastalar (ER (-), PR (-) HER2(-) değerlendirildiğinde bu hastaların periferik kan örneklerinin hepsinde *PTEN* gen ekspresyonunda down regülasyon gözlenmektedir.

Meme kanserli hastalarda yapılan başka bir çalışmada ise *PTEN* kaybı %48 oranında belirtilmiştir. *PTEN* kaybının lenf nodu metastazını predikte ettiği saptanmış ve hastalığa bağlı ölüme artışa neden olduğu bildirilmiştir. Ayrıca ER negatifliğiyle ilişkili bulunurken tümörün evresi, gradı, hastalık rekürrensi ile ve PR negatifliğiyle ilişkili bulunmuştur (Depowski ve ark. 2001). Meme karsinomlu hastalarda ER ve PR durumu tedaviyi belirlemede önemli role sahiptirler. Adjuvan tamoksifene yanıtı öngörmede kullanılmaktadır (Tavassoli ve Devilee 2012).

PTEN kaybı birçok kanserde ve meme kanserlerinden olan triplet negatif grubunda gösterilmektedir (Saal ve ark. 2005). Triplet negatiflerde hormonal tedavi ve anti HER-2 tedavi alternatiflerinin olmaması sebebiyle bu hastalarda *PTEN* disfoksiyonuna bağlı bu yolak aktivasyonları hedef alınarak bununla ilgili ilaç çalışmaları yapılmıştır. *PTEN* kaybı nüks eden meme kanserli hastaların triplet

negatif alt grubunda %66 oranında gözlenirken hormon pozitif ve HER-2 grubunda ise sırasıyla %28, %22 olarak saptanmıştır (Gonzalez-Angulo ve ark. 2011).

Golmohammadi ve ark. (2016) azalmış *PTEN* gen ekspresyonu ile tümör evresi arasında anlamlı bir ilişki olduğunu ve meme kanseri tümörlerinin daha yüksek evrelerde *PTEN* genini daha az ifade ettiğini bildirmişlerdir. İlaveten, önceki çalışmalarda da, *PTEN* gen ekspresyonu olmayan meme kanseri hastalarında kanserli hücrelerin diğer dokulara metastaz riskinin daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Tsutsui ve ark., 2005; Wikman ve ark., 2012). Golmohammadi ve ark. (2016) *PTEN* geni 100 numunenin sadece 70'inde (% 70) ifade edilmiştir. Negatif *PTEN* gen ekspresyon örnekleri, hastalığın daha yüksek evreleri olan hastalarda daha sık gözlenmiştir. Yang ve ark. (2010) Çin'de *PTEN* geninin 50 meme kanseri hastasının 24'ünde eksprese edilmediğini belirtmiştir. Golmohammadi ve ark. (2016) *PTEN* gen ekspresyonu olmayan hastalarda ölüm tehlikesinin yüksek olduğunu ve bu spesifik belirteçin prognoz için kullanılabileceğini öne sürmüşlerdir. Bununla birlikte, patolojik parametreler *PTEN* gen ekspresyonu ile birlikte düşünülmelidir, çünkü mevcut çalışmada yüksek evre ve *PTEN* ekspresyonu arasında ters anlamlı bir ilişki vardır. Bu, yeni belirteçlerin araştırılmasının yanı sıra, genellikle prognozda kullanılan patolojik parametrelerin önemli olduğunu göstermektedir. Diğer çalışmalar bu gerçeği doğrulamaktadır (Sharif ve ark., 2009).

PTEN geninin kapsamlı analizi, sadece bir tümör baskılayıcı olduğunu değil, aynı zamanda meme kanseri prognozunda da rol oynadığını göstermiştir (Jones ve ark. 2013; Mandal ve ark. 2015). Bu çalışmada, *PTEN* geni hastalığın ilerleme evresindeki hastalarda (Evre IV) ifade edilmemiştir. *PTEN* gen ekspresyonu olmayan malign hücrelerde inhibitör faktörlerin hücre bölünmesi döngüsünden çıkarılması nedeniyle, bölünme ve invazivlik oranının önemli ölçüde artması muhtemeldir.

Golmohammadi ve ark. (2016) invaziv duktal tümörlerde *PTEN* gen ekspresyonunun invaziv olmayan tümörlerden daha az olduğunu ve farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğunu rapor etmişlerdir. Bu nedenle, invaziv duktal tümörlerde invazivitenin artmasının nedenlerinden birinin, *PTEN* gen ekspresyonunun olmaması olarak öne sürmüşlerdir. Jones ve ark. tümörlerde *PTEN* proteini fonksiyonunun tamamen kaybının invaziv gücü arttırdığını ve östrojen reseptörlerini önemli ölçüde azalttığını

belirtmiştir (Jones ve ark., 2013). Golmohammadi ve ark. (2016) *PTEN* geninin yüksek derecelerde malign meme tümörlerinde daha az ifade edildiğini rapor etmişlerdir. *PTEN* gen ürünü, hücrel oksidatif streslerin ve apoptozun düzenlenmesinde aktiftir (Kitagishi ve Matsuda. 2013). Yeni çalışmalar *PTEN* geninin sağ kalımın değerlendirilmesi için bir belirteç olarak kullanılabileceğini göstermiştir (Neto ve ark., 2012). Öte yandan, *PTEN* gen ürünü, tedaviye yanıt için meme kanserinde önemli olan diğer genlerin ekspresyonunu etkiler. Bununla birlikte, bu genin bazı eylemleri bugüne kadar bilinmemektedir (Song ve ark, 2012). Başka bir çalışmada, Baig ve ark. (2011) *PTEN* gen mutasyonu gibi genetik değişikliklerin meme kanseri ile ilişkili olduğunu göstermiştir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada, meme kanser tanılı olgularda *PTEN* geninin ifadesindeki değişimler, hem tümör dokularında hem de periferik kan örneklerinde belirlenmiş bulunmaktadır. Meme kanserli olgularda *PTEN*'nin mRNA değişimleriyle ilgili sonuçlara bakıldığında, periferik kan örneklerinde mRNA düzeylerindeki azalma (down regülasyon) dikkat çekmektedir. Meme kanserli olguların periferik kan örneklerinde *PTEN* geni mRNA düzeyindeki azalmanın, meme kanseri potansiyel bir bulgu/biyobelirteç olabileceğini düşünmekteyiz. Bu veriler ilerde yapılacak çalışmalara katkıda bulunacaktır. Meme kanserinde *PTEN* geninin farklı fonksiyonel rolleri göz önüne alındığında, mekanizmasını daha iyi belirlemek için daha fazla tamamlayıcı çalışmaya ihtiyaç vardır.

Periferik kan örnekleri ile tümör doku örneklerinde mRNA düzeylerindeki majör farklılıklar, muhtemelen bu gen için dokuya özgü spesifik düzenleyici mekanizmaların olduğunu yansıtmaktadır. Meme kanserinde mRNA düzeyindeki azalmanın *PTEN* geninin karsinogeneizde rol oynadığını desteklemektedir. Çalışmalardan elde edilen sonuçlarımız, meme kanseri tanılı olgularda tanı ve prognoz açısından mevcut prosedürlere katkı sağlayabilecek bir dizi genetik veriyi içermektedir. İlaveten çalışmaya dahil edilen tüm olgulara ait histolojik ve patolojik parametreler bir bütün halinde sunulmuştur.

Zamanında tanı ve tedavi için, kadınlarda en ölümcül kanser olan meme kanserinde patolojik parametrelerin araştırılması ile birlikte *PTEN* gen ekspresyonunun incelenmesi gibi yeni belirteçlerin kullanılması gerektiğine dikkat edilmelidir. *PTEN* geninin düzenlenmesi ve performansında epigenetik faktörler dahil olmak üzere farklı genetik ve genetik olmayan mekanizmalar ve henüz tanımlanmamış faktörlerin mevcuttur. Mevcut bireysel biyobelirteçlerin doğruluğu optimal olmadığından, durumunu daha kesin olarak değerlendirmek için DNA, RNA ve protein ekspresyon verilerini içeren kompozit bir biyobelirteç umut verici bir yaklaşım olarak ortaya çıkabilir. Genetik ve çevresel faktörlerin etkisi altında uzun bir süreç sonucu gelişen meme kanserini daha erken evrede yakalanmasıyla, hastanın tanı, prognoz ve

tedavileri açısından daha da olumlu sonuçlar doğuracağı kanısına varılmıştır. Erken evre tanıda moleküler biyobelirteçlerin önemi ortaya çıkmış bulunmaktadır.



7. KAYNAKLAR

Abdulkareem, I.H., Blair, M. (2013) Phosphatase and Tensin Homologue Deleted on Chromosome 10. Niger Med J, 54:79-86.

Ahmed, M., Rahman, N. (2006) ATM and breast cancer susceptibility. Oncogene. 25(43):5906-11.

Almasan, A., Yin, Y., Kelly, R.E., Lee E.Y. (1995) Bradley A, Li W, Bertino JR, Wahl GM. Deficiency of retinoblastoma protein leads to inappropriate S-phase entry, activation of E2F-responsive genes, and apoptosis. Proc Natl Acad Sci U S A, 92: 5436-40.

Ambros, R.A. (2000) Simple hyperplasia of the endometrium: an evaluation of proliferative activity by Ki-67 immunostaining. International Journal of Gynecologic Pathology, 19:206-11.

Ambros, R.A., Vigna, P.A., Figge, J., Kallakury, B.V., Mastrangelo, A., Eastman, A.Y., Malfetano, J., Figge, H.L., Ross, J.S. (1994) Observations on tumor and metastatic suppressor gene status in endometrial carcinoma with particular emphasis on p53. Cancer, 73:1686-92.

Anderson, W.F., Chatterjee, N., Ershler, W.B., et al (2002) Estrogen receptor breast cancer phenotypes in the surveillance, epidemiology, and end results database. Breast Cancer Res Treat, 76:27-36.

Baeza, N., Weller, M., Yonekawa, Y., Kleihues, P., Ohgaki, H. (2003) *PTEN* methylation and expression in glioblastomas. Acta neuropathologica, 106(5), 479-485.

Bai, M., Agnantis, N.J., Kamina, S., Demou, A., Zagorianakou, P., Katsaraki, A., Kanavaros, P. (2001) In vivo cell kinetics in breast carcinogenesis. Breast Cancer Research, 3:276-83.

Baig, R.M., Mahjabeen, I., Sabir, M., et al. (2011) Genetic changes in the *PTEN* gene and their association with breast cancer in Pakistan. Asian Pac J Cancer Prev, 12, 2773-8.

Bhargava, R., Gerald, W.L., Li, A.R., Pan, Q., Lal, P., Ladanyi, M., Chen, B. (2005). EGFR gene amplification in breast cancer: correlation with epidermal growth factor receptor mRNA and protein expression and HER-2 status and absence of EGFR-activating mutations. Modern Pathology. 18(8):1027-1033.

Black, D., Bogomolny, F., Robson, M.E., et al. (2005) Evaluation of Germline *PTEN* Mutations in Endometrial Cancer Patients. Gynecol Oncol., 96:21-4.

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

Bogdanova, N., Helbig, S., Dörk, T. (2013) Hereditary breast cancer: ever more pieces to the polygenic puzzle. Hered Cancer Clin Pract, 11, 12.

- Bos JL. van Kreijl CF. (1992) In: Vainio H, Magee PN, McGregor DB, McMichael AJ. Eds. Genes and Gene Products that Regulate Proliferation and Differentiation: Critical Targets in Carcinogenesis. Mechanisms of Carcinogenesis in Risk Identification. Lyon: International Agency for Research of Cancer. 57–65.
- Bose, S., Wang, S.I., Terry, M.B. (1998) Hibshoosh H, Parsons R. Allelic loss of chromosome 10q23 is associated with tumor progression in breast carcinomas. *Oncogene*, 17:123–7.
- BP, K. (2000) Targets of oncogenes and tumor suppressors: key for understanding basic mechanisms of carcinogenesis. *Biochemistry (Mosc)*, 65: 2-27.
- Breuer, R., Postmus, P. (2005) Smit E, Molecular pathology of non-small-cell lung cancer. *Respiration*, 72(3), 313-330.
- Cho, H.J., Kim, J.S., Kim, K.H., Ahn, C.H, Park, W.C., Oh, S.J., Jung, S.S., Lim, K.W., Im, S.A. (2003) A Clinical Analysis of *PTEN* Expressions in Breast Cancers. *Cancer Res Treat*, 35(2):102-8.
- Choccalingam, C., Rao, L., Rao, S. (2012) Clinico-Pathological Characteristics of Triple Negative and Non Triple Negative High Grade Breast Carcinomas with and Without Basal Marker (CK5/6 and EGFR) Expression at a Rural Tertiary Hospital in India. *Breast Cancer: Basic and Clinical Research*, 6: 21–29.
- Chu, K.C., Anderson, W.F. (2002) Rates for breast cancer characteristics by estrogen and progesterone receptor status in the major racial/ethnic groups. *Breast Cancer Res Treat*, 74:199-211.
- Ciriello, G., Miller, M.L., Aksoy, B.A. (2013) Senbabaoglu Y, Schultz N, Sander C. Emerging landscape of oncogenic signatures across human cancers. *Nat. Genet.*, 45, 1127–1133.
- Clark, G.M., Osborne, C.K., McGuire, W.L. (1984) Correlations between estrogen receptor, progesterone receptor, and patient characteristics in human breast cancer. *J Clin Oncol*;2:1102-1109.
- Cotran, S.R., Kumar, V., Robbins, S.L. (2006) *Pathologic Basis of Disease*. Baskı, 239-306.
- Cristofano, A. D., Pesce, B., Cordon-Cardo, C., Pandolfi, P. P. (1998) *PTEN* is essential for embryonic development and tumour suppression. *Nature genetics*, 19(4), 348.
- Dahia, P.L.M., Aguiar, R.C., Alberta, J., Kum, J.B., Caron, S., Sill, H., Marsh, D.J., Ritz, J., Freedman, A., Stiles, C., Eng, C. (1999) *PTEN* is inversely correlated with the cell survival factor Akt/PKB and is inactivated via multiple mechanisms in haematological malignancies. *Hum Mol Genet*, 8:185–193
- de Assis, L.V., Isoldi, M.C. (2013) The function, mechanisms, and role of the genes *PTEN* and P53 and the effects of asbestos in the development of malignant mesothelioma: a review focused on the genes' molecular mechanisms. *Tumour Biol*, 35, 889-901.

- Depowski, P.L., Rosenthal, S.I., Ross, J.S. (2001) Loss of expression of the *PTEN* gene protein product is associated with poor outcome in breast cancer. *Mod Pathol.*, 14(7):672-6.
- Di Cristofano, A., De Acetis, M., Koff, A., Cordon-Cardo, C., Pandolfi, P. P. (2001) *PTEN* and p27 KIP1 cooperate in prostate cancer tumor suppression in the mouse. *Nature genetics*, 27(2), 222.
- Drake, R.L., Vogl, W., Mitchell, A.W.M. (2005) *Gray's Anatomy for Students*. Toronto, Ontario: Elsevier Churchill Livingstone.
- Ellisen, L., Haber, D., (1998) Hereditary breast cancer. *Ann Rev Med*: 49: 425-436.
- Ernst, M.F., Roukema, J.A., Coebergh, J.W. et al. (2002) Breast cancers found by screening: earlier detection, lower malignant potential or both? *Breast Cancer Res Treat*, 76:19-25.
- Familial breast cancer (2001) collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease. *Lancet*, 358: 1389.
- Fehrmann, R.S.N., Jansen, R.C., Veldink, J.H., Westra, H.J., Arends, D., Bonder, M.J., Fu, J. (2011) Trans-eQTLs reveal that independent genetic variants associated with a complex phenotype converge on intermediate genes, with a major role for the HLA. *PLoS Genet.* 7, e1002197 .
- Feilotter, H.E., Coulon, V., McVeigh, J.L., Boag, A.H., Dorion- Bonnet, F., Duboue, B. et al. (1999) Analysis of the 10q23 chromosomal region and the *PTEN* gene in human sporadic breast carcinoma. *Br J Cancer*, 79:718–23.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin D, and Bray F. (2012) Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN.
- Fults, D., Pedone, C., (2000) Immunocytochemical mapping of the phosphatase and tensin homolog (*PTEN/MMAC1*) tumor suppressor protein in human gliomas. *Neuro-oncology*, 2(2), 71-79.
- Geoffrey, M., Cooper, R.E.H. (2006) *The Cell: A Molecular Approach*. Third edition Baski.
- Geoffrey, M., Cooper, R.E.H. (2007) *The Cell A Molecular Approach*. Fourth Baski, 720-721.
- Georgescu, M.M., (2010) *PTEN* Tumor Suppressor Network in PI3K-Akt Pathway Control. *Genes Cancer*, 1:1170-1177.
- Gimm, O., Perren, A., Weng, L.P., Marsh, D.J., Yeh, J.J., Ziebold, U., Lees, J.A. (2000) Differential nuclear and cytoplasmic expression of *PTEN* in normal thyroid tissue, and benign and malignant epithelial thyroid tumors. *The American journal of pathology*, 156(5), 1693-1700.
- Golmohammadi, R., Namazi, M.J., Nikbakht, M., et al. (2013) Characterization and prognostic value of mutations in exons 5 and 6 of the p53 gene in patients with colorectal Cancers in Central Iran. *Gut Liver*, 7, 295-302.

Golmohammadi, R., Rakhshani, M.H., Moslem, A.R., (2016) Pejhan A, Prognostic Role of *PTEN* Gene Expression in Breast Cancer Patients from North-East Iran, Asian Pac J Cancer Prev, 17 (9), 4527-4531.

Gonzalez-Angulo, A.M., Ferrer-Lozano, J., Stemke-Hale, K., et al. (2011) PI3K pathway mutations and *PTEN* levels in primary and metastatic breast cancer. Mol Cancer Ther., Jun, 10(6):1093-101.

Gori, S., Sidoni, A., Colozza, M., et al. (2009) EGFR, pMAPK, pAkt and *PTEN* status by immunohistochemistry: correlation with clinical outcome in HER2-positive metastatic breast cancer patients treated with rastuzumab. Ann Oncol, 20, 648-54.

Govender, D., Chetty, R. (2012) Gene of The Month: *PTEN*. J Clin Pathol.; 65(7):601-3.

Green, S., Chambon, P. (1991) The oestrogen receptor from perception to mechanism. In: Parker MG. Nuclear hormon receptors. London: AcademicPress,15-38.

Gucalp, A., Traina1, T.A. (2011) Triple-Negative Breast Cancer: Adjuvant Therapeutic Options. Chemotherapy Research and Practice, 1-13.

Guldborg, P., thor Straten, P., Birck, A., Ahrenkiel, V., Kirkin, A.F., Zeuthen, J. (1997) Disruption of the *MMAC1/PTEN* gene by deletion or mutation is a frequent event in malignant melanoma. Cancer research,57(17), 3660-3663.

Güveloğlu. E. (2006) Meme, Over Ve Tuba KArinomlarında BRCA1 VE BRCA2 Protein Ekspresyonlarının Prognostik Önemi İmmünohistokimyasal Ve Klinikopatolojik Çalışma, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi, Adana.

Hamilton, J.A., Stewart, L.M., Ajayi, L., Gray, I.C., Gray, N.E., Roberts, K.G. et al. (2000) The expression profile for the tumour suppressor gene *PTEN* and associated polymorphic markers. Br J Cancer,82:1671-6.

Hanahan, D., Weinberg, R.A. (2000) Hallmarks of cancer: the next generation. Cell, 144: 646-74.

Harima, Y., Sawada, S., Nagata, K., Sougawa, M., Ostapenko, V., Ohnishi, T., (2001) Mutation of the *PTEN* gene in advanced cervical cancer correlated with tumor progression and poor outcome after radiotherapy. International journal of oncology, 18(3), 493-497.

Haybittle, J.L., Blamey, R.W., Elston, C.W., Johnson, J., Doyle, P.J., Campbell, F.C. (1982) Nicholson RI, Griffiths K. A prognostic index in primary breast cancer. British journal of cancer, Mar, 45(3):361-6.

Hoang, L.N., McConechy, M.K, Köbel, M., Han, G., Rouzbahman, M., Davidson, B., Irving, J., Ali, R.H., Leung, S., McAlpine, J.N. (2013) Histotype-genotype correlation in 36 high-grade endometrial carcinomas. The American journal of surgical pathology 2013, 37:1421-32.

Hoda, S.A. (2010) Invasive Ductal Carcinoma: Assessment of prognosis with morphologic and biologic markers. (Ed.) Syed A. Hoda, Edi Brogi, Frederick C.

Koerner, Paul Peter Rosen. testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *JClin Oncol*, 28:2784- 2795.

Hoeflerlin, A.L., Chalfant, C.E., Park, M.A. (2013) Challenges in the treatment of triple negative and HER2-overexpressing breast cancer. *Journal of surgery and science*, 1.1: 3.

Hsieh, C.C., Trichopoulos, D., Katsouyanni, K., Yuasa, S. (1990) Age at menarche, age at menopause, height and obesity as risk factors for breast cancer: associations and interactions in an international case-control study. *Int J Cancer*, 46: 796-800.

Inaba, F., Kawamata, H., Teramoto, T., Fukasawa, I., Inaba, N., Fujimori, T. (2005) *PTEN* and p53 abnormalities are indicative and predictive factors for endometrial carcinoma. *Oncol Rep*, 13:17–24.

Iqbal, N. (2014) Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) in cancers: overexpression and therapeutic implications. *Molecular biology international*.

İtilli, Ö. (2009) Hastanemiz Meme Polikliniğine Başvuran Kadınların Kendi Kendine Meme Muayenesi Uygulama Davranışları ve Mamografi, Meme Ultrasonografi Sonuçlarının Değerlendirilmesi, Sağlık Bakanlığı Dr. Lütfi Kırdar Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Aile Hekimliği Uzmanlık Tezi, İstanbul.

Jernstrom, H., Lubinski, J., Lynch, H.T. et al (2004) Breast-feeding and the risk of breast cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst*; 96: 1094-1098.

Joensuu, H., Toikanen, S., Klemi, P.J. (1990) DNA index and S phase fraction and their combinations as prognostic factors in operable ductal breast carcinoma. *Cancer*, 66: 331-40

Jones, N., Bonnet, F., Sfar, S. et al. (2013) Comprehensive analysis of *PTEN* status in breast carcinomas. *Int J Cancer*, 133, 323-34.

Joslyn, S.A. (2002) Hormone receptors in breast cancer: racial differences in distribution and survival. *Breast Cancer Res Treat*, 73:45-59. 528.

Kandasamy, K., Srivastava, R.K. (2002) Role of the phosphatidylinositol 3'-kinase/*PTEN*/Akt kinase pathway in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in non-small cell lung cancer cells. *Cancer research*, 62(17), 4929-4937.

Kang, Y.H., Lee, H.S., Kim, W.H. (2002) Promoter methylation and silencing of *PTEN* in gastric carcinoma. *Lab Invest*, 82:285– 291

Kelsey, J.L., Fischer, D.B., Holford, T.R., LiVoisi, V.A., Mostow, E.D., Goldenberg, I.S., White, C. (1981) Exogenous estrogens and other factors in the epidemiology of breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 67: 327-333.

Kheirleisid, E.A.H. (2011) Clinical Applications of Molecular Profiling in Colorectal Cancer, Discipline of Surgery College of Medicine, Nursing & Health Sciences National University of Ireland, Galway, PhD.

King, M.C., Marks, J.H. ve Mandell, J.B. (2003). Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. The New York Breast Cancer Study Group. *Science*, 302, 643-646.

- King, W.J., De Sambre, E.R., Jensen, E.V., Greene, G.L. (1985) Comparison of immunocytochemical and steroid binding assays for estrogen receptors in human breast tumors. *Cancer Research*, 45: 293-9.
- Kitagishi, Y., Matsuda, S. (2013) Redox regulation of tumor suppressor *PTEN* in cancer and aging (Review). *Int J Mol Med*, 31, 511-5.
- Klein-Hitpass, L., Scharpp, M., Wagner, J., Ryffel, G.J. (1986) An oestrogen responsive element derived from the 5. region. *Cell*, 46: 1053-61.
- Klijn JGM, Berns PMJJ, Schmits PLM, Foekens JA. (1992) The Clinical significance of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in human breast cancer: a review on 5232 patients. *Endocr Rev* 13:3-17.
- Knobbe, C.B., Merlo, A., Reifenberger, G. (2002) *PTEN* signaling in gliomas. *Neuro-oncology*, 4(3), 196-211.
- Kolasa, I.K., Rembiszewska, A., Janiec-Jankowska, A., Dansonka-Mieszkowska, A., Lewandowska, A.M., Konopka, B., Kupryjańczyk, J. (2006) *PTEN* mutation, expression and LOH at its locus in ovarian carcinomas. Relation to TP53, K-RAS and BRCA1 mutations, *Gynecologic Oncology*, 692–697.
- Konopka, B., Paszko, Z., Janiec-Jankowska, A., Goluda, M. (2002) Assessment of the quality and frequency of mutations occurrence in *PTEN* gene in endometrial carcinomas and hyperplasias. *Cancer Lett*, 178:43–51.
- Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, N., Aster, J.C. (eds), (2010) *Pathologic basic of disease*, 8th edition. Philadelphia: Saunders Elsevier.
- Kupryjanczyk, J., Szymanska, T., Madry, R., Timorek, A., Stelmachow, J., Karpinska, G. et al. (2003) Evaluation of clinical significance of TP53, BCL-2, BAX and MEK1 expression in 229 ovarian carcinomas treated with platinum-based regimen. *Br J Cancer*, 88:848–54.
- Lachyankar, M.B., Sultana, N., Schonhoff, C.M., Mitra, P., Poluha, W., Lambert, S., Nabi, R. (2000) A role for nuclear *PTEN* in neuronal differentiation. *Journal of Neuroscience*, 20(4), 1404-1413.
- Landis, S.H., Murray, T., Bolden, S., Wingo, P.A. (1998) Cancer statistics, *CA Cancer J Clin*, 48:6 –29.
- Larsen, J. E., and Minna, J. D. (2011). Molecular biology of lung cancer: clinical implications. *Clin Chest Med*, 32(4), 703-740. doi:10.1016/j.ccm.2011.08.003
- Larsen, J.E., Minna, J.D. (2003) Molecular biology of lung cancer: clinical implications. *Clin Chest Med*, 32(4), 703-740.
- Lee, J.O., Yang, H., Georgescu, M.M., Di Cristofano, A., Maehama, T., Shi, Y., Pavletich, N.P. (1999) Crystal structure of the *PTEN* tumor suppressor: implications for its phosphoinositide phosphatase activity and membrane association. *Cell*, (3), 323-334.
- Lester, S.C. (2015) Chapter 23: The Breast. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Robbins and Cotran Pathologic Basic of Disease, 9th ed. Saunders Elsevier, Philadelphia, 1043-72.

- Li, D.M., Sun, H. (1997) TEP1, encoded by a candidate tumor suppressor locus, is a novel protein tyrosine phosphatase regulated by transforming growth factor β . *Cancer research*, 57(11), 2124-2129.
- Li, J., Simpson, L., Takahashi, M., Miliareis, C., Myers, M.P., Tonks, N., et al. (1998) The *PTEN/MMAC1* tumor suppressor induces cell death that is rescued by the AKT/protein kinase B oncogene. *Cancer Res*, 58:5667-72.
- Li, J., Yen, C., Liaw, D., Podsypanina, K., Bose, S., Wang, S. et al. (1997) *PTEN*, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science*, 275:1943-7.
- Li, Y. (2001) Podsypanina K, Liu X, Crane A, Tan LK, Parsons R, Varmus HE, Deficiency of *PTEN* accelerates mammary oncogenesis in MMTV-Wnt-1 transgenic mice. *BMC molecular biology*, 2(1), 2.
- Lipponen P, Eskelinen M. (1994) Expression of epidermal growth factor receptor in bladder cancer as related to established prognostic factors, oncoprotein (c-erbB-2, p53) expression and long-term prognosis. *British journal of cancer*, 69:1120.
- Lynch, H.T., Watson, P., Conway, T.A., Lynch, J.F. (1990) Clinical/genetic features in hereditary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*; 15: 63-71.
- Mandal, R.K., Akhter, N., Irshad, M. et al. (2015) Association of the *PTEN* IVS4 (rs3830675) gene polymorphism with reduced risk of cancer: evidence from a meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev*, 16, 897-902.
- Matros, E., Wang, Z. C., Lodeiro, G., Miron, A., Iglehart, J. D., Richardson, A. L., (2005) BRCA1 promoter methylation in sporadic breast tumors: relationship to gene expression profiles, *Breast Cancer Research and Treatment*, 91: 179-186
- Mazure, N.M., Chen, E.Y., Laderoute, K.R., Giaccia, A.J. (1997) Induction of vascular endothelial growth factor by hypoxia is modulated by a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway in Ha-ras-transformed cells through a hypoxia inducible factor-1 transcriptional element. *Blood*, 90(9), 3322-3331.
- 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*, 59:4291-6.
- Merino, M.J., Livolsi, J.A. (1981) Signet-ring carcinoma of the female breast: A clinicopathologic analysis of 24 cases. *Cancer*, 48: 1830-7.
- Ming, M., Han, W., Maddox, J., Soltani, K., Shea, C.R., Freeman, D.M., He, Y. (2010) UVB induced ERK/AKT-dependent *PTEN* suppression promotes survival of epidermal keratinocytes. *Oncogene*, 29(4):492-502.
- Ming, M., He, Y. (2009) *PTEN*: New Insights into Its Regulation and Function in Skin Cancer. *J Invest Dermatol*, 129(9):2109-2112.
- Modan, B., Ron, E., Lerner-Geva, L., Blumstein, T., Menczer, J., Rabinovici, J., Oelsner, G., Freedman, L., Mashiach, S., Lunenfeld, B. (1998) Cancer incidence in a cohort of infertile women. *Am J Epidemiol*; 147: 1038-1042.

Murff, H.J., Spiegel, D.R. (2004) Syngal S. Does this patient have a family history of cancer? An evidence-based analysis of the accuracy of family cancer history. JAMA, 292: 1480-1489.

Mutter, G.L., Lin, M.C., Fitzgerald, J.T., Kum, J.B., Baak, J.P., Lees, J.A., Weng, L.P., Eng, C. (2000) Altered *PTEN* expression as a diagnostic marker for the earliest endometrial precancers. J Natl Cancer Inst, 92 :924–930.

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

Nakahara, Y., Nagai, H., Kinoshita, T., Uchida, T., Hatano, S., Murate, T. et al. (1998) Mutational analysis of the *PTEN/MMAC1* gene in non-Hodgkin's lymphoma. Leukemia, 12:1277– 80.

NCCN (2009) Clinical Practice Guidelines in Oncology, Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast and Ovarian.

Neto, J.C., Ikoma, M.M., Carvalho, K.C., et al. (2012) MGMT and *PTEN* as potential prognostic markers in breast cancer. Exp Mol Pathol, 92, 20-6.

Nielsen, T.O., Hsu, F.D., Jensen, K. et al. (2004) Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. Clin Cancer Res, 15;10(16):5367-74.

Normanno, N., De Luca, A., Bianco, C., Strizzi, L., Mancino, M., Marello, M.R., Carotenuto, A., De Feo, G., Caponigro, F., Salomon, D.S. (2006). Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. Gene. 366(1):2-16.

Osborne, C, Wilson, P, Tripathy, D. (2004). Oncogenes and tumorsupressor genes in breast cancer: Potential diagnostic and therapetic applications. Oncologist. 9(4):361-77.

Önder, S.Ç., (2003) Diffüz Büyük B Hücreli Lenfomalarda Morfolojik Özellikler ve *PTEN* İmmünekspresyonu, Uzmanlık Tezi, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, Ankara;65.

Park, K., Han, S., Shin, E., Kim, H.J., Kim, J.Y. (2007). EGFR gene and protein expression in breast cancers. Eur J Surg Oncol. 33(8):956-960.

Perren, A., Weng, L.P., Boag, A.H., Ziebold, U., Thakore, K., Dahia, P.L., Komminoth, P., Lees, J.A., Mulligan, L.M., Mutter, G.L., Eng. C. (1999) Immunohistochemical evidence of loss of *PTEN* expression in primary ductal adenocarcinomas of the breast. Am J Pathol,155:1253–1260.

Peter, L., Depowski, M.D., Seth, I., Rosenthal, M.D., Jeffrey, S., Ross, M.D. (2001) Loss of Expression of the *PTEN* Gene Protein Product Is Associated with Poor Outcome in Breast Cancer Mod Pathol,14(7):672–676.

Poetsch, M., Dittberner, T., Woenckhaus, C. (2001) *PTEN/MMAC1* in malignant melanoma and its importance for tumor progression. Cancer Genet Cytogenet; 125:21–26.

Quinn, G.P., Vadaparampil, S.T., Tollin, S., Miree, C.A., Murphy, D., Bower, B., Silva, C. (2010) BRCA carriers' thoughts on risk management in relation to

preimplantation genetic diagnosis and childbearing: when too many choices are just as difficult as none, *Fertility and Sterility*, 94(6), 2473-2475.

Rao, C., Shetty, J., Prasad, H.L.K. (2013) Immunohistochemical Profile and Morphology in Triple Negative Breast Cancers. *J Clin Diagn Res*, 7: 1361-1365.

Reyes, H.D., Thiel, K.W., Carlson, M.J., Meng, X., Yang, S., Stephan, J.M., Leslie, K.K. (2014) Comprehensive profiling of EGFR/HER receptors for personalized treatment of gynecologic cancers. *Molecular diagnosis & therapy*, 18:137-51.

Rodríguez-Pinilla, S.M., Jones, R.L., Lambros, M.B., Arriola, E., Savage, K., James, M., Pinder, S.E., Reis-Filho, J.S. (2007). MYC amplification in breast cancer: a chromogenic in situ hybridisation study. *J. Clin. Pathol.* 60(9):1017-1023.

Rosai, J. (2011) Chapter 20: Breast. Rosai and Ackerman's Surgical Pathology, 10 th ed. Elsevier, China, 1660-770.

Roskoski, R. Jr. (2004). The ErbB/HER receptor protein-tyrosine kinases and cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 319(1):1-11.

Rosner, B., Colditz, G.A., Willett, W.C. (1994) Reproductive risk factors in a prospective study of breast cancer: The Nurses' Health Study. *Am J Epidemiol*, 139: 819-835.

Rossing, M.A., Daling, J.R., Weiss, N.S., Moore, D.E., Self, S.G. (1996) Risk of breast cancer in a cohort of infertile women. *Gynecol Oncol*; 60: 3-7.

Saal, L.H., Holm, K., Maurer, M., et al. (2005) PIK3CA mutations correlate with hormone receptors, node metastasis, and ERBB2, and are mutually exclusive with *PTEN* loss in human breast carcinoma. *Cancer Res.*, 65(7):2554-9.

Safarpour, D., Tavassoli, F.A. (2014) A Targetable Androgen Receptor-Positive Breast Cancer Subtype Hidden Among the Triple-Negative Cancers. *Arch Pathol Lab Med*, 139: 612-617.

Sahin, F.I., Yılmaz, Z., Yagmurdu, M.C., Atac, F.B., Ozdemir, B.H., Karakayalı, H., Demirhan, B., Haberal, M. (2006). Clinical Findings and HER-2/neu Gene Amplification Status of Breast Carcinoma Patients. *Pathology Oncology Research*. 12(4):211-215.

Salvesen, H.B., Macdonald, N., Ryan, A. et al. (2001) *PTEN* Methylation is Associated With Advanced Stage and Microsatellite Instability in Endometrial Carcinoma. *Int J Cancer*, 91:22-6.

Selma Yılmaz, M. Ö., Fatma Kaya Dağıstanlı. (2017). In situ Melezleme. In N. A. Güler Temizkan (Ed.), *Temel ve İleri Moleküler Biyoloji Yöntemleri* (1 ed., pp. 166-169). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri.

Sharif, M.A., Mamoon, N., Arif, A. et al. (2009) Histological and immunohistochemical study of male breast carcinoma in Northern Pakistan. *J Pak Med Assoc*, 59, 67-71.

Simpson, L., Parsons, R., (2001) *PTEN*: life as a tumor suppressor. *Experimental cell research*, 264(1), 29-41.

Sjogren, S., Inganas, M., Norberg, T., Lindgren, A., Nordgren, H., Holmberg, L., Bergh, J. (1996). The p53 Gene in Breast Cancer: Prognostic Value of Complementary DNA Sequencing Versus Immunohistochemistry. *J Natl Cancer Inst.* 88(3-4):173-82.

Song, M.S., Salmena, L., Pandolfi, P.P. (2012) The functions and regulation of the *PTEN* tumour suppressor. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13, 283-96.

Steck, P.A., Pershouse, M.A., Jasser, S.A., Yung, W.A., Lin, H., Ligon, A.H., Davis, T. (1997) Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nature genetics*, 15(4), 356-362.

Stranger, B.E., Forrest, M.S., Dunning, M., Ingle, C.E., Beazley, C., Thorne, N., et al. (2007) Relative impact of nucleotide and copy number variation on gene expression phenotypes. *Science*; 315, 848–853.

Stuebe, A.M., Willett, W.C., Xue, F., Michels, K.B. (2009) Lactation and incidence of premenopausal breast cancer: a longitudinal study. *Arch Intern Med*; 169: 1364-1371.

Sun, H., Lesche, R., Li, D.M., Ciliental, J., Zhang, H., Gao, J. et al. (1999) *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 U S A*, 96:6199–204.

Suzuki, A., de la Pompa, J.L., Stambolic, V., Elia, A.J., Sasaki, T., del Barco Barrantes, I., Fukumoto, M. (1998) High cancer susceptibility and embryonic lethality associated with mutation of the *PTEN* tumor suppressor gene in mice. *Current Biology*, 8(21), 1169-1178.

Sweeney, K.J., Swarbrick, A., Sutherland, R. L., Musgrove, E.A. (1998). Lack of relationship between CDK activity and G1 cyclin expression in breast cancer cells. *Oncogene*. 16(22):2865-2878.

T.C.Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu (2016) Türkiye Kanseri İstatistikleri Ankara.

Tavanssol, F. (1999) Pathology of the breast. 2nd Ed. Stamford, Connecticut: Appleton & Lange, 52-3.

Tavassoli, A. (1999) Pathology Of The Breast-2nd ed. Stamford, Connecticut.

Tavassoli, A., Devilee, P. (2012) World Health Organisation Classification of Tumours, Tumours of the Breast and Female Genital Organs. Lyon, France: IARC pres.

Teng, L.S., Zheng, Y., Wang, H.H. (2008) BRCA1/2 associated hereditary breast cancer. *J Zhejiang Univ Sci B*. 9(2):85-9.

Tsutsui, S., Inoue, H., Yasuda, K. et al. (2005) Reduced expression of *PTEN* protein and its prognostic implications in invasive ductal carcinoma of the breast. *Oncol*, 68, 398-404.

Turan, Ç., Soylu, F., Erkan, L. ve ark. (2009) Endometrial Adenokarsinomlarda *PTEN* Gen Mutasyon Ekspresyonunun Araştırılması Ve Klinik Önemi. İzmir Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, 47; 17-27.

U.S. Cancer Statistics (2016) SEER Data.

Walker, R.A. (1999) Estrogen receptor and its potential role in breast cancer development. J Pathol, 188:229-230.

Weng, L.P., Smith, W.M., Dahia, P.L.M., Ziebold, U., Gil, E., Lees, J.A., et al. (1999) *PTEN* suppresses breast cancer cell growth by phosphatase activity-dependent G1 arrest followed by cell death. Cancer Res, 59:5808-14.

Westra, H.J., Peters, M.J., Esko, T., Yaghootkar, H., Schurmann, C., Kettunen, J. et al. (2013) Systematic identification of trans eQTLs as putative drivers of known disease associations. Nat. Genet, 45, 1238-1243.

Whang, Y.E., Wu, X., Suzuki, H., Reiter, R.E., Tran, C., Vessella, R.L., Sawyers, C.L., (1998) Inactivation of the tumor suppressor *PTEN/MMAC1* in advanced human prostate cancer through loss of expression. Proceedings of the National Academy of Sciences, 95(9), 5246-5250.

Wikman, H., Lamszus, K., Detels, N., et al. (2012) Relevance of *PTEN* loss in brain metastasis formation in breast cancer patients. Breast Cancer Res, 14, R49.

Yang, J., Ren, Y., Wang, L., et al. (2010) *PTEN* mutation spectrum in breast cancers and breast hyperplasia. J Cancer Res Clin Oncol, 136, 1303-11.

Yılmaz, S., Dağıstanlı, F. (2017) In situ Melezleme. In N. A. Güler Temizkan (Ed.), Temel ve İleri Moleküler Biyoloji Yöntemleri (1 ed., pp. 166-169). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri.

Yu, L., Yang, Y., Hou, J., et al. (2015) Micro RNA-144 affects radiotherapy sensitivity by promoting proliferation, migration and invasion of breast cancer cells. Oncol Rep, 34, 1845-52.

Zhang, A.X., Lu, F.Q., Yang, Y.P., et al. (2015) Micro RNA-217 over expression induces drug resistance and invasion of breast cancer cells by targeting *PTEN* signaling. Cell Biol Int.

Zhou, C., Bae-Jump, V.L., Whang, Y.E., et al. (2006) The *PTEN* Tumor Suppressor inhibits Telomerase Activity in Endometrial Cancer Cells by Decreasing HTERT mRNA Levels. Gynecol Oncol., 101:305-10.

Zhou, X.P., Gimm, O., Hampel, H., Niemann, T., Walker, M.J. Eng C. (2000) Epigenetic *PTEN* silencing in malignant melanomas without *PTEN* mutation. Am J Pathol., 157:1123-1128.

EKLER

Ek. 1. İntihal Raporu

FARKLI EVRE VE DERECELERDEKİ MEME KANSERLİ HASTALARDA PTEN GENİNİN İFADELENME DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ORIJINALLIK RAPORU

% 16	% 18	% 9	% 5
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	www.googleish.com İnternet Kaynağı	% 10
2	www.portanna.org İnternet Kaynağı	% 2
3	ftp.esrf.eu İnternet Kaynağı	% 1
4	jtphillips.com İnternet Kaynağı	% 1
5	M. Tanabashi, K. Hagiwara, K. Hikasa, K. Nakamura et al. "Review of Particle Physics", Physical Review D, 2018 Yayın	% 1
6	www.istanbulsaglik.gov.tr İnternet Kaynağı	% 1

Ek. 2. Etik Kurul İzin Raporu

T.C.
AFYONKARAHİSAR SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ

Toplantı Tarihi	04.05.2018	Toplantı Numarası	2018/5	Toplantı Saati	09:00	Etik Kurul Kodu
						2011-KAEK-2

144- Dr. Öğr. Üyesi Evrim Suna ARIKAN TERZİ' nin sorumluluğunda yürütülecek olan "**Farklı Evre ve Derecelerdeki Meme Kanseri Hastalarda PTEN Geninin İfade Düzeylerinin Araştırılması**" konulu **Girişimsel Olmayan** Klinik Araştırmalar için başvuru dosyası incelendi. Araştırma protokolüne uyularak, Sağlık Bakanlığı'nın 13.04.2013 tarih 28617 sayılı Klinik Araştırmalar Hakkındaki Yönetmeliği ve yayımlanan kılavuzlarında belirtilen hususlar dikkate alınarak, sorumluluk araştırmacılara ait olmak üzere araştırmanın yapılmasında etik sakınca olmadığına toplantıya katılan üyelerin **oy birliği** ile karar verildi.

ASLİ GİBİDİR
04.05.2018
Yrd. Doç. Dr. Evrim Suna ARIKAN TERZİ
Raporör

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı : Hatice Arzu ÖZYÜREK

Uyruğu : TC

Doğum Tarihi ve Yeri: 21.03.1991-Çankaya/ANKARA

Medeni Durumu : Bekar

Telefon : 05302004376

E-posta : harzu_ozyurek@hotmail.com

Yazışma Adresi : AFSÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı B Blok Dörtüol mah. Afyonkarahisar

EĞİTİM

Lisans : Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi (2013)

Yüksek Lisans : Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı (2016)

Yüksek Lisans : Afyon Sağlık Bilimleri Üniversitesi Sağlık bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı (2020)

İŞ DENEYİMLERİ

2009-2014 AKÜ TIP FAKÜLTESİ BİYOKİMYA Laboratuvar Sorumlusu

2014-2014 AKÜ VETERİNER FAKÜLTESİ

ANALİZ TEŞHİS LABORATUVARI Laboratuvar Sorumlusu

2014- Halen AFSÜ TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI Uzm. Kimyager

YAYINLAR / BİLİMSEL ETKİNLİK

Çelik S, Özyürek A, Keşli R, Ulaşlı S, Günay E, Ünlü M, Resveratrol, Thymoquinone And Cafeic Acid Phenethyl Ester Inhibit Pseudomonas Aeruginosa Lipopolysaccharide-Induced Inflammation And Cell Death In Human Alveolar Epithelial A549 Cells, IFCC Wordlab Istanbul2014.

Çelik S, Özyürek A, P-036 Aspirinin Er Stres Modelli Pankreas Beta Hücre Kültüründe Dna Hasarı Ve Oksidan Denge Üzerine Etkisi, 25. Ulusal biyokimya kongresi, 2013.

Ulasli S, Celik S, Gunay E, Ozdemir M, Hazman O, Ozyurek A, Koyuncu T, Unlu M, Anticancer Effects of Thymoquinone, Caffeic Acid Phenethyl Ester and Resveratrol on A549 Non-Small Cell Lung Cancer Cells Exposed to Benzo(a)pyren, Asian Pac J Cancer Prev. 2013;14(10):6159-64.

Günay E, Celik S, Sarinc-Ulasli S, Özyürek A, Hazman Ö, Günay S, Özdemir M, Ünlü M, Comparison of the Anti-inflammatory Effects of Proanthocyanidin, Quercetin, and Damnacanthal on Benzo(a)pyrene Exposed A549 Alveolar Cell Line, 2016 Apr;39(2):744-51.

İnce S, Arslan-Acaröz D, Demirel HH, Varol N, Özyürek HA, Zemheri F, Küçükkurt İ, Taurine Alleviates Malathion Induced Lipid Peroxidation, Oxidative Stress, And Proinflammatory Cytokine Gene Expressions İn Rats, Biomedicine & Pharmacotherapy Volume 96, December 2017, Pages 263-268

Özyürek HA, Avcı G, Varol N, Gempitabin Uygulanan Prostat Kanseri Hücre Hatlarında Oxaliplatin Ve Sisplatinin Kemoterapötik Etkilerinin Belirlenmesi, Kocatepe Vet J (2017) 10(1): 7-13