

**ENDOMETRİAL KANSERDE LİPOGENEZ İLE
AMPK/AKT/MTOR SİNYAL İLETİM YOLU İLİŞKİSİ**

DOKTORA TEZİ

Ş. EFSUN ANTMEN

MERSİN ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ECZACILIK BİYOKİMYA
ANABİLİM DALI**

**MERSİN
HAZİRAN-2019**

ENDOMETRİAL KANSERDE LİPOGENEZ İLE AMPK/AKT/MTOR SİNYAL İLETİM YOLU İLİŞKİSİ

DOKTORA TEZİ

Ş. EFSUN ANTMEN

MERSİN ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

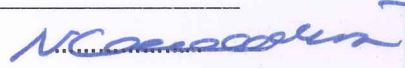
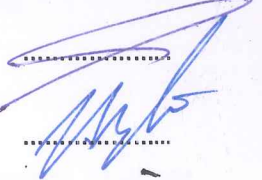
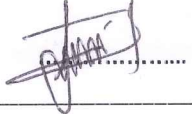
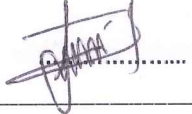
**ECZACILIK BİYOKİMYA
ANABİLİM DALI**

**Danışman
Prof. Dr. Necmiye CANACANKATAN**

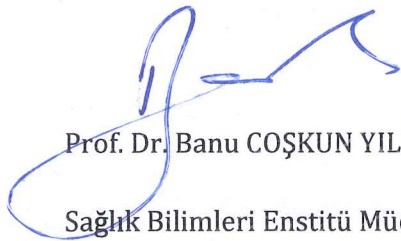
**MERSİN
HAZİRAN-2019**

ONAY

Ş. Efsun ANTMEN tarafından Prof. Dr. Necmiye CANACANKATAN danışmanlığında hazırlanan “Endometrial Kanserde Lipogenez ile AMPK/Akt/mTOR Sinyal İletim Yolu İlişkisi” başlıklı çalışma aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından 26 Haziran 2019 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavı sonucunda oy birliği/çokluğu ile Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Görevi	Ünvanı, Adı ve Soyadı	İmza
Başkan	Prof. Dr. Necmiye CANACANKATAN	
Üye	Prof. Dr. Serap YALIN	
Üye	Prof. Dr. Hakan AYTAN	
Üye	Prof. Dr. İclal GÜRSES	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Çınar SEVERCAN	

Yukarıdaki Jüri kararı Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ...25.07.2018... tarih ve ...18-330... sayılı kararıyla onaylanmıştır.


Prof. Dr. Banu COŞKUN YILMAZ
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

Bu tezde kullanılan özgün bilgiler, şekil, tablo ve fotoğraflardan kaynak göstermeden alıntı yapmak 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu hükümlerine tabidir.

ETİK BEYAN

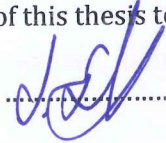
Mersin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliğinde belirtilen kurallara uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlâk kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak kullandığımı,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü Mersin Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı,
- Tezin tüm telif haklarını Mersin Üniversitesi'ne devrettiğimi beyan ederim.

ETHICAL DECLARATION

This thesis is prepared in accordance with the rules specified in Mersin University Graduate Education Regulation and I declare to comply with the following conditions:

- I have obtained all the information and the documents of the thesis in accordance with the academic rules.
- I presented all the visual, auditory and written informations and results in accordance with scientific ethics.
- I refer in accordance with the norms of scientific works about the case of exploitation of others' works.
- I used all of the referred works as the references.
- I did not do any tampering in the used data.
- I did not present any part of this thesis as an another thesis at Mersin University or another university.
- I transfer all copyrights of this thesis to the Mersin University.

 /

İmza / Signature

Şerife Efsun ANTMEN

ÖZET

ENDOMETRİAL KANSERDE LİPOGENEZ İLE AMPK/AKT/MTOR SİNYAL İLETİM YOLU İLİŞKİSİ

Endometrial kanser dünya genelinde kadınlar arasında oldukça yaygınlık gösteren bir kanser tipidir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, sağlıklı hücreler ile kanser hücreleri arasındaki lipid metabolizması arasındaki farklılıklara ait kanıtlar oldukça artmıştır. Lipid metabolizmasındaki değişimler hücrede büyüme, çoğalma ve farklılaşma gibi önemli süreçleri etkiler. Bu çalışma kapsamında endometrial kanser tanısı konmuş ve sağlıklı endometrial dokularda lipogenez ile ilişkili enzim ve sinyal ileti yolu üyelerinin gen ekspresyon düzeyleri incelenmiştir. Bu çalışma kapsamında kullanılan dokularda lipogenez ile ilişkili olarak yağ asit sentaz (FASN) ve Sterol düzenleyici element bağlayıcı protein (SREBP) molekülü ile PI3K/Akt/mTOR sinyal ileti yolu mediyatörleri, fosfatidilinozitol 3-kinaz (PI3K), memeli rapamisin hedef kompleksi (mTOR) ve Protein kinaz B (Akt) ve ayrıca AMP- aktive edici protein kinaz (AMPK) belirteçleri değerlendirilmiştir. Bu çalışmaya, endometrioid adenokarsinom tanısı almış Grade 1 (n=20), Grade 2 (n=20), Grade 3 (n=20) dokuları; endometrial kanser tanısı almamış kontrol 1(n=15) sekretuar faz ve kontrol 2 (n=15) proliferatif faz sağlıklı endometrium dokuları dahil edildi. Gen ekspresyon analizleri Real time PCR yöntemi kullanılarak yapıldı. PI3K gen ekspresyon düzeylerinde Grade 3 grubunda göre Grade 1 ve 2 gruplarına göre azalma belirlendi (p<0,05). Akt ve mTOR gen ekspresyonlarında Grade 3' de Kontrol gruplarına göre azalma gözlemlendi. SREBP ve FASN ekspresyon düzeylerinde kontrol gruplarına göre ve benzer şekilde AMPK gen ekspresyon düzeylerinde de kontrol gruplarına göre azalma saptandı. (p<0,05). Sonuç olarak bütün bu bilgiler doğrultusunda lipogenezin endometrial kanserle doğrudan ilişkisinin olduğu fakat bazı yollarla ilgili olarak dokuya özgü farklı davranış gösterebileceğini düşündürdü. Bu nedenle endometrial kanserde PI3K/Akt/mTOR akışı ve bu akıştan etkilenen SREBP1-2, FASN, AMPK gen ekspresyonlarının ayrıntılı olarak incelenmesinin daha etkin olacağı sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelime: Endometrial kanser, lipid metabolizması, SREBP,PI3K/Akt/mTOR, FASN, AMPK.

Danışman: Prof. Dr. Necmiye CANACANKATAN

ABSTRACT

RELATION BETWEEN LIPOGENESIS AND AMPK/AKT/MTOR IN ENDOMETRIAL CARCINOMA

Endometrial cancer is a very common type of cancer among women worldwide. In recent years, evidence of differences in lipid metabolism between healthy cells and cancer cells has increased considerably. Alterations in lipid metabolism effect important processes such as cell growth, proliferation and differentiation. In this study, diagnosed endometrial cancer and healthy endometrial tissues were examined for the gene expression levels of enzymes and signaling pathway members related to lipogenesis. In this study diagnosed endometrial carcinoma and the healthy endometrial tissues will be analyzed for lipogenesis in terms of fatty acid synthase (FASN) and sterol regulatory element binding protein (SREBP) molecule; besides phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), mammalian rapamycin target complex (mTOR) and protein kinase B (Akt) as PI3K / Akt / mTOR signaling pathway mediators and as well as AMP-activating protein kinase (AMPK) were defined. Grade 1 (n = 20), Grade 2 (n = 20), Grade 3 (n = 20) tissues diagnosed with endometrioid adenocarcinoma; Control 1 (n = 15) secretory phase and control 2 (n = 15) proliferative phase healthy endometrial tissues without endometrial cancer were included. Gene expression analysis were carried out by Real time PCR. PI3K gene expression levels were decreased in Grade 3 group compared to Grade 1 and 2 groups (p <0.05). Akt and mTOR gene expressions were decreased in Grade 3 compared to control groups. SREBP and FASN expression levels were decreased compared to control groups and similarly AMPK gene expression levels were also decreased compared to control groups (p <0.05). As a result, it was suggested that lipogenesis may have a direct relationship with endometrial cancer but it may show different tissue-specific behaviors related to some pathways. Therefore, it is concluded that detailed investigation of PI3K / Akt / mTOR flow and genes that affected by this flow, SREBP1-2, FASN, AMPK, will be more effective in endometrial cancer.

Key Words: Endometrial carcinoma, lipid metabolism, SREBP, PI3K/mTOR/Akt, FASN, AMPK.

Advisor: Prof. Dr. Necmiye CANACANKATAN

TEŞEKKÜR

Mersin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliğinde belirtilen kurallara uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğim, endometrial kanserde lipogenez ile AMPK/Akt/mTOR sinyal iletim yolu ilişkisi araştırılmıştır. Tez çalışmam boyunca değerli bilgilerini ve zamanını benimle paylaşan saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Necmiye CANACANKATAN'a şükranlarımı sunarım.

Yine çalışmamda bana sürekli yardımda bulunarak yol gösteren Öğr. Gör. Dr. Cem YALAZA'ya da sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmama 2018-1-TP3-2825 nolu proje ile verdiği destekten dolayı MEÜ. Bilimsel Araştırma Proje Birimine teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmam boyunca bana olan desteğini ve güvenini esirgemeyen abim Dr. Ersel GEÇİOĞLU'na, teşekkürlerimin az kalacağı kıymetli arkadaşlarım Sevinç APAYDIN ve Sema ERDEN ERTÜRK'e, beni yetiştiren biricik babama ve anneme, son olarak bu hayattaki en büyük şansım olan eşim Barış ANTMEN'e sonsuz teşekkürler.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK	ii
ONAY	iii
ETİK BEYAN	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
TABLolar DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
KISALTMALAR ve SİMGELER	xii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI	3
2.1. Endometrial Kanser	3
2.1.1. Endometrial Kanser Epidemiyolojisi	3
2.1.2. Endometrial Kanser Etiyolojisi ve Risk Faktörleri	3
2.1.3. Endometrial Kanseri Sınıflandırma ve Derecelendirme	4
2.2. Lipogenez	7
2.2.1. Lipogenezde Görevli Moleküller ve Yapıları	9
2.2.1.1. Yağ Asiti Sentaz	10
2.2.1.2. Sterol Bağlayıcı Protein	12
2.3. AMPK/Akt/mTOR sinyal ileti yolağı	13
2.3.1. Fosfoditilinozitol 3 Kinaz	13
2.3.2. Protein Kinaz B	15
2.3.3. Rapamisin Protein Kompleksinin Memeli Hedefi	16
2.3.4. Adenozin Monofosfat Aktive Edici Protein Kinaz	19
2.4. Endometrial Kanser ve Lipogenez İlişkisi	21
3. MATERYAL ve YÖNTEM	25
3.1. Materyal	25
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar	25
3.1.2. Çalışmada Kullanılan Sarf Malzemeleri ve Kimyasallar	25
3.2. Yöntem	26
3.2.1. Çalışma Grupları	26

	Sayfa
3.2.2. Parafinli Arşiv Dokudan Çalışma Örneklerinin Alınması	26
3.2.3. Primer Dizaynı	28
3.2.4. Örneklerin Deparafinizasyonu ve Örneklerden RNA İzolasyonu	28
3.2.5. cDNA sentezi ve Preamplifikasyon	29
3.2.6. Array Çipin Hazırlanması, Örneklerin ve Primerlerin Yüklenmesi	31
3.2.7. RT-PCR Uygulaması	32
3.2.8. İstatistiksel Analiz	32
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	34
4.1. Bulgular	34
4.1.1. Lipogenez belirteçlerine ait bulgular	35
4.1.1.1. FASN Ekspresyon Düzeyleri	35
4.1.1.2. SREBF1 ekspresyon düzeyleri	36
4.1.1.3. SREBF2 ekspresyon düzeyleri	37
4.1.2. AMPK/Akt/mtor sinyal ileti yolağına ait bulgular	38
4.1.2.1. PIK3CA ekspresyon düzeyleri	38
4.1.2.2. AKT ekspresyon düzeyleri	39
4.1.2.3. mTORC1 ekspresyon düzeyleri	40
4.1.2.4. PRKAA1 ekspresyon düzeyleri	41
4.1.2.5. PRKAA2 ekspresyon düzeyleri	42
4.1.2.6. PRKAB1 ekspresyon düzeyleri	43
4.2. Tartışma	44
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	53
KAYNAKLAR	55
ÖZGEÇMİŞ	66

TABLolar DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1. Endometrial kanserin histolojik alt tipleri.	5
Tablo 2.2. Uluslararası Jinekoloji ve Obstetrik Federasyonu (FIGO) evreleme	7
Tablo 2.3. SREBP, aktive ettiği genler	12
Tablo 2.4. PI3K sınıfları	14
Tablo 2.5. PI3K-Akt yolağı genlerinde tümör tipine göre anlamlı artış gösteren somatik mutasyon oranları	16
Tablo 2.6. AMPK substratları ve fonksiyonel önemleri	20
Tablo 4.1. Grade 1, Grade 2, Grade 3 prognostik faktörleri	34

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Histolojik derecelendirmesi yapılan endometrioid karsinoma Hematoksilen-Eozin (H&E) boyalı preparatları.	6
Şekil 2.2 Lipit biyosentezi (<i>De nova</i> sentez)	8
Şekil 2.3. Sinyal yollarıyla lipit metabolizmasının düzenlenmesi	10
Şekil 2.4. FASN domain organizasyon modelleri	11
Şekil 2.5. PI3K/Akt sinyali ve SREBP-1 aracılığıyla lipit metabolizmasının regülasyonu	13
Şekil 2.6. PI3K/AKT/mTOR yolu şematik gösterimi	18
Şekil 2.7. Tümör beslenmesi damarlara yakınlık ile düzenlenir.	22
Şekil 3.1. Arşiv preparatlarında hedef dokuların işaretlenmesi	27
Şekil 4.1. FASN ekspresyon değerleri	35
Şekil 4.2. SREBF1 ekspresyon değerleri	36
Şekil 4.3. SREBF2 ekspresyon değerleri	37
Şekil 4.4. PIK3CA ekspresyon değerleri	38
Şekil 4.5. AKT1 ekspresyon değerleri	39
Şekil 4.6. MTORC1 ekspresyon değerleri	40
Şekil 4.7. PRKAA1 ekspresyon değerleri	41
Şekil 4.8. PRKAA2 ekspresyon değerleri	42
Şekil 4.9. PRKAB1 ekspresyon değerleri	43

KISALTMALAR VE SİMGELER

Kısaltma/Simgesi	Tanım
4EBP1	eIF4E bağlı protein 1
ACC	Asetil-koA karboksilaz
ACLY	ATP sitrat liyaz
ACP	Asil taşıyıcı protein
AH	Protein kinaz B-homoloji domain
Akt	Protein kinaz B
AMP	Adenozin mono fosfat
AMPK	Adenozin mono fosfat aktive edici protein kinaz
ATGL	Adipoz trigliserid lipaz
ATP	Adenozin trifosfat
BMI	Vücut kütle indeksi
C75	Yağ asiti sentaz inhibitörü
CaMKK	Kalsiyum / kalmodulin bağımlı protein kinaz
c-AMP	Siklik adenozin monofosfat
CTNNB1	Catenin beta 1
DH	Dehidrogenaz
DNAPK	Deoksiribonükleik asit-aktif protein kinaz
ER	Enoil redüktaz
ETZ	Elektron transport zinciri
FADH	Flavin adenin dinükleotid
FAS	Yağ asiti sentaz
FGFR2	Fibroblast büyüme faktörü reseptörü 2
FKBP-12	FK506 bağlayıcı protein-12
FOXO	Forkhead box transkripsiyon faktörleri
GSK-3	Glikojen sentaz kinaz-3
HIF	Hipoksi ile indüklenen faktör

Kısaltma/Simgesi	Tanım
HMG-CoA	Hidroksi 3-metil glutarilkoenzim A
HNPCC	Herediternonpolipoid kolorektal karsinomlar
HSL	Hormon sensitif lipaz
Ki-67	Antijen Ki-67
KR	β -ketoasil redüktaz
KS	β -ketoasil sentaz
LKB1	Karaciğer kinaz B1
MAP3K5	Mitojen aktive protein kinaz 5
MAT	Malonil/asetiltransferaz
mTOR	Rapamisin Protein Kompleksinin Memeli Hedefi
mTORC1	mTOR kompleks 1
mTORC2	mTOR kompleks 2
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit
p53	Transkripsiyon faktörü
PDK1	Fosfoinozidit-bağımlı protein kinaz 1
PFK2	Fosfofruktokinaz 2
PH	Plekstrin homoloji domain
PI(3,4)P ₂	Fosfatidilinositol 3,4 bisfosfat
PI(3,4,5)P ₃	Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfat
PI3K	Fosfatidilinositol 3-kinaz
PI3P	Fosfatidilinositol 3 fosfat
PI4P	Fosfatidilinositol 4 fosfat
PIKK	PI3K-iliskili kinaz
PIP	Fosfatidilinositol 4 fosfat
PKOS	Polikistik over sendromu
PLD1	Fosfolipaz D1
PRAS40	Prolin-zengin protein kinaz B substrat
PRKAA1	Adenozin mono fosfat aktive edici protein kinaz alfa1 alt ünitesi

Kısaltma/Simgesi	Tanım
PRKAA2	Adenozin mono fosfat aktive edici protein kinaz alfa2 alt ünitesi
PRKAB1	Adenozin mono fosfat aktive edici protein kinaz beta1 alt ünitesi
PTEN	Fosfataz ve tensin homologu
RTK	Reseptör tirozin kinaz
S6K	Ribozomal S6 kinaz
SCAP	SREBP klivaj aktivite edici protein
SREBP	Sterol Bağlayıcı Protein
TAK1	Aktive edilmiş kinaz
TCA	Trikarboksilik asit
TE	Tiyoesteraz
TGF- β	Transforme edici büyüme faktörü β
TSC2	Tuberöz skleröz-2
VEGF	Vasküler endotelial büyüme faktörü

1. GİRİŞ

Endometrium kanseri kadın genital sisteminin en sık görülen kanseridir. En yaygın endometrial kanser tipi ağrısız ve hiperplazi prekürsörlerinden önce gelen Tip 1 endometrial adenokarsinomdur. Tip 2 endometrial kanserler seröz ve şeffaf hücre karsinomaları olup tanı konulan hastaların yaklaşık %10-15'ini içeren agresif tiplerdir [1]. Endometrial kanserin en önemli risk faktörleri ortamda progesteronla dengelenmemiş gereğinden fazla bulunan östrojen (karşılanmamış östrojen), tamoksifen, obezite, yaş, erken menarj ve geç menopozdur [2].

Biyolojik yaşamda önemli fonksiyonları olan lipitler, suda son derece zayıf çözünmelerine karşılık, eter, kloroform, benzen, aseton gibi organik çözücülerde kolayca çözünen heterojen bileşiklerdir [3].

Kanser gelişiminde metabolik aktivitelerde değişiklikler gözlenir. Her ne kadar farklı tipte ve etiyolojide kanserler olsa da tüm kanser hücreleri ortak nitelikte metabolik anormallikler gösterir. Değişen metabolik programlanma protein, nükleik asit ve lipit sentezi için gerekli ara ürün yapımının artışına sebep olur [4]. Kanser gelişiminde enerji sağlayıcı molekül olarak lipit metabolizmasında gerçekleşen değişiklikler de büyük önem taşımaktadır. Kanserde yağ mobilizasyonunun artışı, yağ asiti metabolizmasında hiperaktiviteye neden olur. Açlık, glukoz kullanımı yetersizliği, yetersiz beslenme durumunun uzaması, adrenal ve büyüme hormonlarının sekresyonuna bağlı olarak plazma serbest yağ asiti konsantrasyonunu arttırır [5].

Kanser hücrelerinin proliferasyonundaki artış biyolojik membranların yapımı için lipit sentezinin hızlanmasını gerektirir. Enerji bakımından zengin olan lipitler besin azlığında kanser hücrelerine enerji sağlarlar [6]. Yağ asiti yapıtaşları eksojen olarak ya da *de nova* sentez ile sağlanır. Normal hücreler eksojen yağ asiti alımını tercih ederken, tümör hücreleri yağ asitini *de nova* yoluyla sentezler [7].

Bu çalışmada en fazla araştırılan kanser yollarından biri olan fosfotidil inozitol fosfat (PI3K), protein kinaz B (Akt) ve memeli rapamisin hedef kompleksi (mTOR) ile lipit metabolizması yollarında görevli yağ asit sentaz (FASN) ve sterol düzenleyici element bağlayıcı protein (SREBP), ayrıca bu enzim ve molekülleri etkileyen sinyal ileti yolu moleküllerinden AMP-aktif edici protein kinaz (AMPK) seçilmiş belirteçlerdir.

Kansere karşı en fazla çalışan lipit metabolizması enzimlerinden biri FASN'dır [8]. SREBP ise yolda önemli transkripsiyon düzenleyici faktörlerdendir [9]. PI3K yolağı hücre metabolizmasının kontrolünde özellikle glukoz transportu ve kullanımı, hücre büyümesinin regülasyonu, protein biyosentezi ve apoptozu önlemede fonksiyon görürler. Akt çeşitli alt hedefler vasıtasıyla hücre metabolizmayı düzenler [10]. mTOR hücre büyümesi ve

metabolizmasında önemli role sahiptir [11]. PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağının düzensizliği birçok kanser tipinin patogenezinde rol oynamaktadır. AMPK başlangıçta lipit anabolizmasının pek çok anahtar enziminin negatif regülasyonunu düzenleyen serin/treonin kinaz olarak adlandırılmıştır. Zaman içerisinde AMPK lipit, karbohidrat, protein biyosentezi gibi pekçok anabolik yolu eş zamanlı bir şekilde inhibe ederken glukoz alımı ve metabolizması gibi çeşitli multisellüler organizmalarda gerçekleşen katabolik yolları ise aktive eden enerji hassasiyetli kinaz olarak kabul edilmiştir [12].

Kanser tüm dünyada özellikle gelişmiş ülkelerde başlıca ölüm nedeni oluşturan bir hastalıktır. Endometrial kanser ise erken teşhisin yüksek oranda mümkün olduğu, tedavinin iyi sonuçlar verdiği bir kanser türüdür. Kanseri oluşturan ve ilerleten nedenler ortadan kaldırıldığında veya kontrol altına alındığında kişinin yaşam kalitesini düşürmeden tedavi edilebilebilmesi; kanser yolaklarını çalışmaların hedefi haline getirmiştir [13].

Bu nedenle yaptığımız çalışmada endometrial kanser ve FASN, SREBP, PI3K, Akt, mTOR, ve AMPK ilişkisi araştırılmıştır. Bu sonuçlar ile lipogenez ve PI3K/Akt/mTOR sinyal iletim yolu mediyatörlerinin endometrial kanserin tanı, tedavi ve prognozunun değerlendirilmesinde ileriki çalışmalara ışık tutacağı düşünülmektedir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI

2.1. Endometrial Kanser

2.1.1. Endometrial Kanserin Epidemiyolojisi

Endometrial kanser gelişmiş ülkelerde sıklığı dördüncü sırada olan jinekolojik kanserdir ve yaygınlığı gittikçe artmaktadır [14]. Avrupa ve Kuzey Amerika kadınları arasında her yıl yaklaşık %6 oranında endometrial kanser tanısı alan hasta ve yaklaşık %3 oranında endometrial kanserden ölen hasta mevcuttur [15].

Endometrial kanserin en yaygın semptomu anormal uterin kanamadır. İleri evre endometrial kanser hastalarında abdominal veya pelvik ağrısı, abdominal şişkinlik, bağırsak veya idrar kesesi fonksiyonlarında değişiklik gibi ileri düzey over kanserlerine benzer semptomlar gözlenebilir [16].

Gelişmiş ülkelerde 1950' li yıllardan bu yana endometrial kanser görülme sıklığında artış belirlenmiş, 1970' li yıllardan bu yana ise batı ülkelerinde yapılan çalışmalarda sık görülen ve özellikle perimenopozal kadınları etkileyen genital sistem kanseri olarak bildirilmiştir [17].

Hastalık 40 yaş altında oldukça az gözlenir [18]. Pek çok kadın endometrial kanser tanısını menopoza sonrası alırken, 50 yaş öncesi tanı oranı sadece %15 ve 40 yaş öncesi tanı oranı ise sadece %5' tir [19]. Hastaların %70-80' inde hastalık erken evrede tespit edilebilmektedir. Grade 1-2 endometrioid histoloji varlığında erken evrelerde %70-90 beş yıllık sağ kalım oranları vardır [20].

2.1.2. Endometrial Kanserin Etiyolojisi ve Risk Faktörleri

Endometrial kanserin etiyolojisi kesin olarak bilinmemektedir. Endometrial kanser gelişimi ile ilişkili en yaygın risk faktörleri ise uzun süreli karşılanmamış östrojen maruziyeti, obezite, diyabet, erken menarji, nulliparite, geç başlangıçlı menapoz, ileri yaş ve tamoksifen kullanımıdır [21].

Özellikle obezite, nulliparite ve polikistik over sendromu (PKOS) hikayesi başta olmak üzere risk faktörlerinin etki alanı 40 yaş ve altı genç kadınlarda daha yüksektir [22].

Uzun süreli karşılanmamış östrojen maruziyeti Tip 1 endometrial kanser ile ilişkilidir. Menopozal semptomların kontrolü için uygulanan östrojen replasman tedavisinin endometrial kanser gelişim riskini 2 ila 20 kat arttırdığı saptanmıştır [19]. Progestinlerin sürekli olarak veya aralıklı olarak (10 ila 15 gün / ay) uygulanması artan kanser riskini önemli ölçüde azaltır [23].

Karşılanamayan endojen östrojen ise periferik yağ dokusunda östrojene dönüşen androjenlere bağlı olarak obez kadınlarda veya östrojen salgılayan over tümörlerinde gözlenir. PKOS tanılı kadınlarda da endometrial karsinom riskinin 5 kat arttığı bildirilmektedir [21].

Yaş endometrial kanser gelişimi için ayrıca bir risk faktörüdür. Genç kadınlar, daha çok obez ve nulliparite olan, endometrioid histolojisi iyi diferansiye ve ileri yaşlara göre erken evre endometrial kanser tanısı alırlar [22].

Tamoksifen östrojen reseptör düzenleyicisi olarak meme dokusunda östrojen antagonisti, kemik ve endometrial dokuda ise östrojen agonisti olarak davranır. Tamoksifen kullanımında ortaya çıkan östrojen dengesizliği endometrial kanser riskini 6 ila 8 kat arttırmaktadır [24].

Diyabet ve endometrial kanser ilişkisi tartışmalıdır [25]. Vücut kütle indeksi (BMI) ilişkili yapılan dört kohort çalışmasından yalnızca bir tanesinde endometrial kanser ile diyabet arasında ilişki belirlenmiştir [26].

Genç yaş kadınlarda endometrial kanserin diğer bir gelişim sebebi ise genetik yatkınlıktır. Herediternonpolipoid kolorektal karsinomlar (HNPCC) DNA uyumsuz tamir genleri mutasyonlarından kaynaklı otozomal dominant bir hastalıktır. HNPPC hastalığı olan kadınlar %40-60 endometrial kanser gelişim riskine sahiptir [27]. Tümör supresör gen olan protein tirozin fosfotaz ve tensin homoloğu (PTEN) geninin germ-line mutasyonu sonucu Cowden sendromu oluşur. PTEN geninde oluşan mutasyonun endometrium kanseri de dahil pekçok neoplazi ile ilişkili olduğu ve riski arttırdığı belirtilmiştir [21].

Literatürde belirtilen yüksek endometrial kanser riski taşıyan gruplar için önerilen tarama testleri endometrial biyopsi ve ultasonografi genel taramasıdır [28].

2.1.3. Endometrial Kanseri Sınıflandırma ve Derecelendirme

Endometrial kanserin geleneksel sınıflandırması Tip 1 ve Tip 2 gibi klinik ve endokrin özellikleri ya da endometrioid, seröz veya clear-cell adenokarsinoma gibi histopatolojik karakteristikleri temel almaktadır. Farklı sınıflandırma sistemleri tarafından tanımlanmış alt tipler belli dereceye kadar korelasyon göstermektedir. Ancak tümör tipleri biyolojik, patolojik ve moleküler özellikler açısından her iki sınıflandırma sisteminde önemli heterojenite göstermektedir [29]. 1983 yılında Bokhman, tümörün histopatolojisine göre endometrial kanseri Tip 1 ve Tip 2 olarak iki sınıfa ayırmıştır (Tablo 2.1) [30].

Tip 1 tümörler östrojen seviyesi, obezite, hormon-reseptör pozitifliği ve endometrial hiperplazi ile ilişkilidir, orta veya çok yüksek seviyede farklılaşmıştır ve tedavide olumlu sonuçlara sahiptir. Tip 2 tümörler ise obez olmayan kadınlarda daha yaygındır, endokrin

eksikliği ve metabolik bozukluklarda ortaya çıkar, atrofik endometrium ile ilişkilidir, az farklılaşmıştır ve tedavide olumlu sonuçlar daha azdır [29].

Endometrial kanserlerin yaklaşık %80-90 gibi büyük bir kısmını Tip 1 tümörler oluşturur. Tipik olarak normal büyüklükte ya da miyohiperplastik uterus içerisinde ve düzensiz proliferatif ya da hiperplastik endometrium ile ilişkilidir. İkinci olarak yetişkin granüloza tümör hücrelerine benzer olan tümörün etkisi, anovulator döngülere bağlı kalıcı foliküllerden kaynaklanabilen, yüksek BMI ortamında adipoz dokuda bulunan aromataz tarafından yapılan veya östrojenle yapılan hormon replasman terapisi ile ortaya çıkan karşılanmamış östrojenik uyarıdır. Dolayısıyla Tip 1 karsinomalı hastaların tipik yaşı peri ve postmenopozal periyottadır. Hasta ayrıca yüksek serum serbest östrojen seviyesine sahiptir [31].

Tip 2 tümörler çoğunlukla ileri seviyede tanı konulan ve kötü sonuçlanan tiplerdir. Tümörler az diferansiyedir, östrojenik uyarımla ilişkili değildir, genellikle atrofik uterusda oluşur ve atrofik veya inaktif endometriyumla ilişkilidir. Bu hastalarda serum östrojen seviyesi düşüktür [29-31]. Tip 2 kanserler atrofik endometrial durumda ortaya çıkar, derin miyometrial penetrasyonu ve lenf nodu yayılımı göstermektedir. Tip 2 endometrial kanser ayrıca p53, p16, epidermal büyüme faktörü (HER)-2/neu ve E-cadherinde gerçekleşen genetik değişikliklerle de karakterizedir [32].

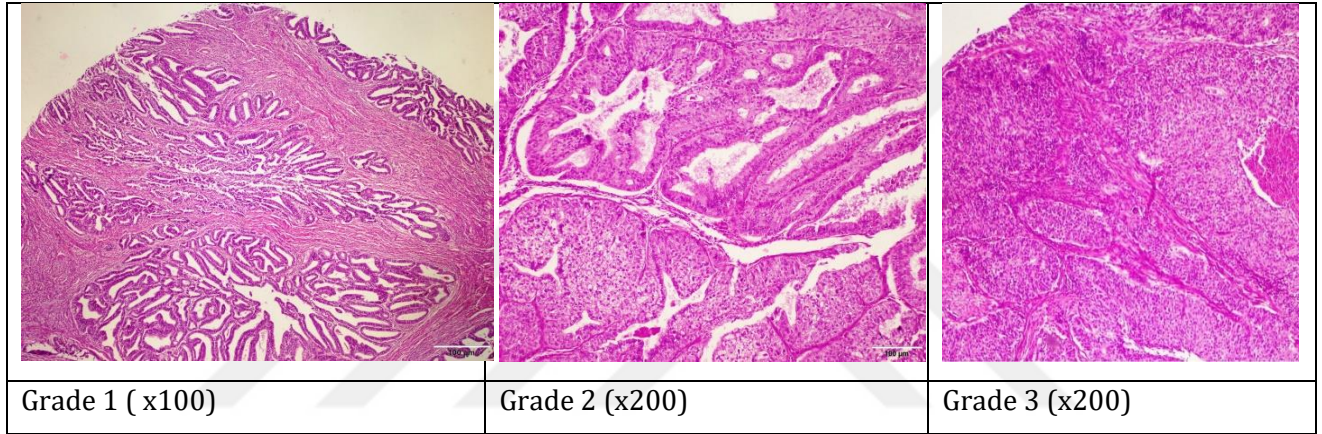
Tablo 2.1. Endometrial kanserin histolojik alt tipleri [33].

Endometrial kanserin histolojik alt tipleri	
Tip 1-Endometrioid adenokarsinoma (%87-90)	Tip 2-non-endometrioid karsinomalar
Skumöz differansiasyonun varyantları	Seröz adenokarsinoma (%2.9-10.5)
Villoglandular differansiasyon	Clear-cell adenokarsinoma (%2.2-3.2)
Sekretuar varyant	Karsinosarkoma (Metaplastik adenokarsinoma; <%2)
Siliyate -hücre varyantı	Musinöz adenokarsinoma (%0.6)
	Skumöz-hücre karsinoması (%0.2)
	Diğer; karışık adenokarsinomalar, transisyonel-hücre karsinoması, küçük hücre karsinoması ve undifferansiye karsinoma (%6.7)

Endometrioid karsinomlarda histopatolojik derecelendirme, tümörde görülen solid alanların oranına ve nükleer atipiyeye göre yapılır. Solid alanlar;

- Grade 1; %5 ve altında ise
- Grade2; %6-50 arasında ise
- Grade 3; %50'nin üzerinde olarak derecelenir (Şekil 2.1).

Tümör hücrelerinin %50'sinden fazlasında; belirgin nükleer pleomorfizm, kaba kromatin, nükleol belirginliği var ise derece bir basamak yükseltilir [34].



Şekil 2.1. Histolojik derecelendirmesi yapılan endometrioid karsinoma Hematoksilen-Eozin (H&E) boyalı preparatları.

Tümörün histolojik diferansiyasyonunun değerlendirilmesi

Grade 1: Lezyonlar önemli ölçüde farklılaşmış ise iyi diferansiye tümör,

Grade 2: Lezyonlar kısmen solid alanlı ise kısmen ya da orta derece diferansiye tümör,

Grade 3: Lezyonlar, solid ya da tamamen farklılaşmamış ise indiferansiye tümör olarak tanımlanırlar [35].

Miyometrial invazyon derinliği, tümör derecesi, lenf nodu metastazı varlığı ve genel hasta sağkalımı ile ilişkili en önemli morfolojik prognostik faktördür. Lenf nodu metastazlarının prevalansı yüzeysel miyometrial invazyon ile %3' ten derin miyometrial invazyon ile %46' ya yükselmektedir [36].

Endometrioid adenokarsinom tümörleri çoğunlukla miyometrial invazyon göstermezler. Bunun yerine komşu miyometriuma doğru gelişir, sınırları düzgündür, invazyon kolay farkedilir, ancak bazı vakalarda yaygın invazyon nedeni ile endometrium- miyometrium sınırı net olarak değerlendirilemez. Tümörlerin %20'sinde servikse uzanım mevcuttur [37].

Endometrial kanserler için cerrahi evreleme 1988 yılında önerilmiş, daha sonra evreleme sistemi 2009 yılında güncellenerek evre I tümörleri alt gruplara ayrılmıştır (Tablo 2.2)[36].

Tablo 2.2. Uluslararası Jinekoloji ve Obstetrik Federasyonu (FIGO) evreleme [39]

EVRE	
I IA IB	Korpus uteri içerisinde sınırlı tümör. Miyometrial invazyon yok ya da %50'den az %50 ya da daha fazla Miyometrial invazyon
II	Servikal stromal invazyon var ancak tümör uterusla sınırlı
III IIIA IIIB IIIC	Lokal ve/veya bölgesel yayılım Seroza ve /veya adneks invazyonu Vajinal ve / veya parametrijal tutulum Pelvik/paraaortik lenf nodu metastazı IIIC1: Pelvik lenf nodu metastazı IIIC2: Paraaortik lenf nodu metastazı
IV IVA IVB	Mesane ve/veya barsak mukoza invazyonu ya da uzak metastaz Mesane ve/veya barsak mukoza invazyonu Uzak metastaz; intraabdominal metastaz ve inguinal lenf nodu

Evre I genel olarak, lezyonların orijin organıyla sınırlı görüldüğü erken evre hastalığı olarak adlandırılmıştır. Evre II, bitişik organları veya yapıları içermek üzere orijin alanının dışına lokal olarak yayılan hastalığın genel bir tanımıdır. Evre III daha geniş tutulumu temsil eder ve evre IV ise metastatik hastalığı temsil eder. Temel aşamalar daha sonra genellikle belirli bir aşamadaki spesifik prognostik faktörlerin bir yansıması olan, alt gruplara sınıflandırılır [38].

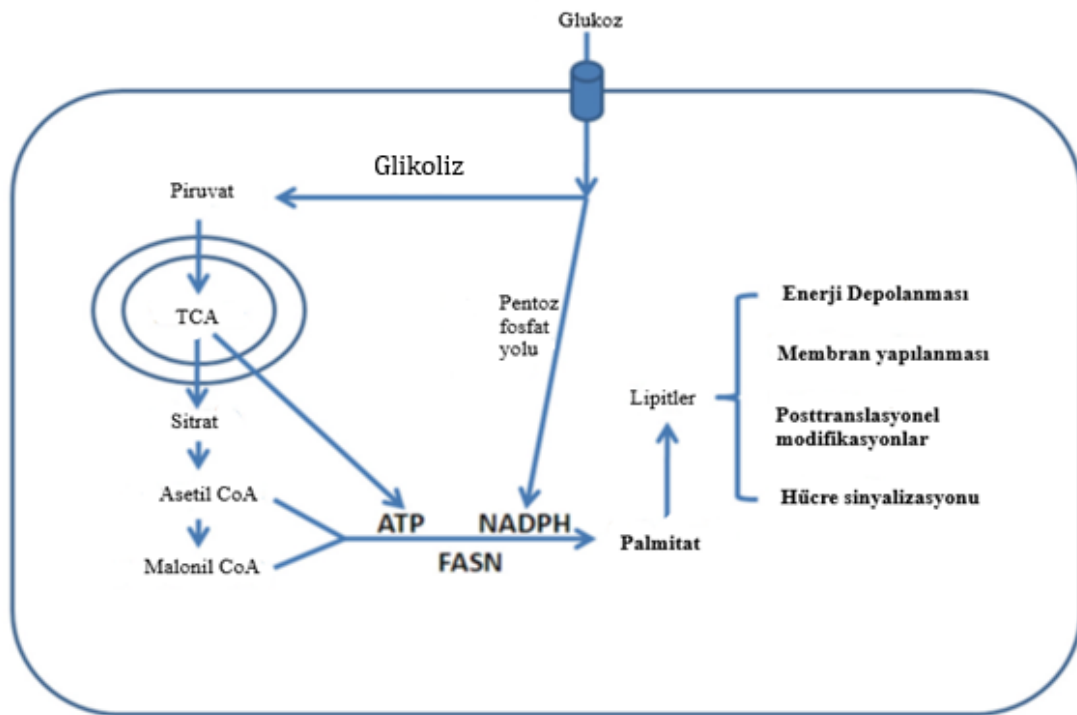
2.2. Lipogenez

Lipitler yapıtaşları yağ asitleri olan hidrokarbon yapısında büyük biyolojik molekül sınıflarından birisidir. En önemli ortak özellikleri suya karşı ya çok az çekim göstermeleri ya da hiç göstermemeleridir. Lipitler organizma için önemli enerji deposudur, karbohidratların iki katından fazla enerji sağlarlar. Diğer bir önemli özellikleri ise fosfolipit yapılarının hücre zarını oluşturmasıdır [40].

Lipit sentezi besinlerden elde edilen farklı moleküllerin yağ asitlerine dönüştürülme sürecini açıklar [41]. Lipogenez karaciğer, beyin, akciğer, meme dokusu ve adipoz doku dahil birçok dokuda gerçekleşmektedir. Biyosentez için gerekli kofaktörler nikotinamid adenin dinükleotit (NADPH), adenosin trifosfat (ATP), Mn^{2+} , biyotin ve CO_2 kaynağı olarak bikarbonat (HCO_3^-), substrat asetil-KoA' dır ve son ürün serbest palmitattır [42]. Yağ asiti sentez yolağının;

fazla enerji alımında depolama yapmak, lipitten fakir diyetle karbohidrat veya proteinden lipid sentezlemek ve laktasyon için lipid sentezlemek olmak üzere üç ana fonksiyonu vardır [43].

Glukoz glikoliz yoluyla piruvata dönüşür. Piruvattan oluşan Asetil-KoA' lar ise trikarboksilik asit (TCA) döngüsüne girer. Glukozdan yağ asidine dönüşüm metabolizması yaklaşık 25 enzim içermesine rağmen ana yolak asetil-coA karboksilaz (ACC), sitrat liyaz, malik enzim ve FASN enzimleri ile yürütülür [43]. ACC, asetil-KoA'yı malonil-KoA'ya dönüştürür, daha sonra yedi ayrı enzimatik aktiviteye sahip bir multienzim sistemi olan FASN, bir asetil-KoA ve yedi malonil-KoA molekülünden palmitat oluşumunu katalize eder [42]. Palmitattan zincir uzama ve çift bağ eklenme reaksiyonları ile memeli hücrelerde farklı spektrumlarda uzun zincirli, doymuş ve doymamış yağ asitlerinin oluşumunu sağlar (Şekil 2.2) [41].



Şekil 2.2. Lipit biyosentezi (*De nova* sentez) [44]

Asetil KoA karboksilaz tarafından katalizlenen tepkime lipogenezde hız sınırlayıcı basamaktır ve enzim önemli düzenleme bölgesidir. Lipogenezin başlıca ürünü olan palmitoil-KoA enzimin geri beslemeli inhibitörü olarak davranır ve sitrat hızı arttıran allosterik bir aktivatördür. Sitrat ATP ve asetil KoA derişimi yükseldiği zaman sitrat mitokondri dışına taşınarak hem sitozol asetil KoA'nın öncülü olur hem de ACC' nin aktifleşmesi için allosterik sinyal oluşturur. ACC kovalent modifikasyonla da düzenlenir. Glukagon ve epinefrin hormonları tarafından tetiklenen fosforillenme enzimi inaktifleştirerek yağ asiti sentezinin yavaşlamasına neden olur [45]. Uzun zincirli yağ asiti sentezi kısa vadede enzimlerin allosterik ve kovalent

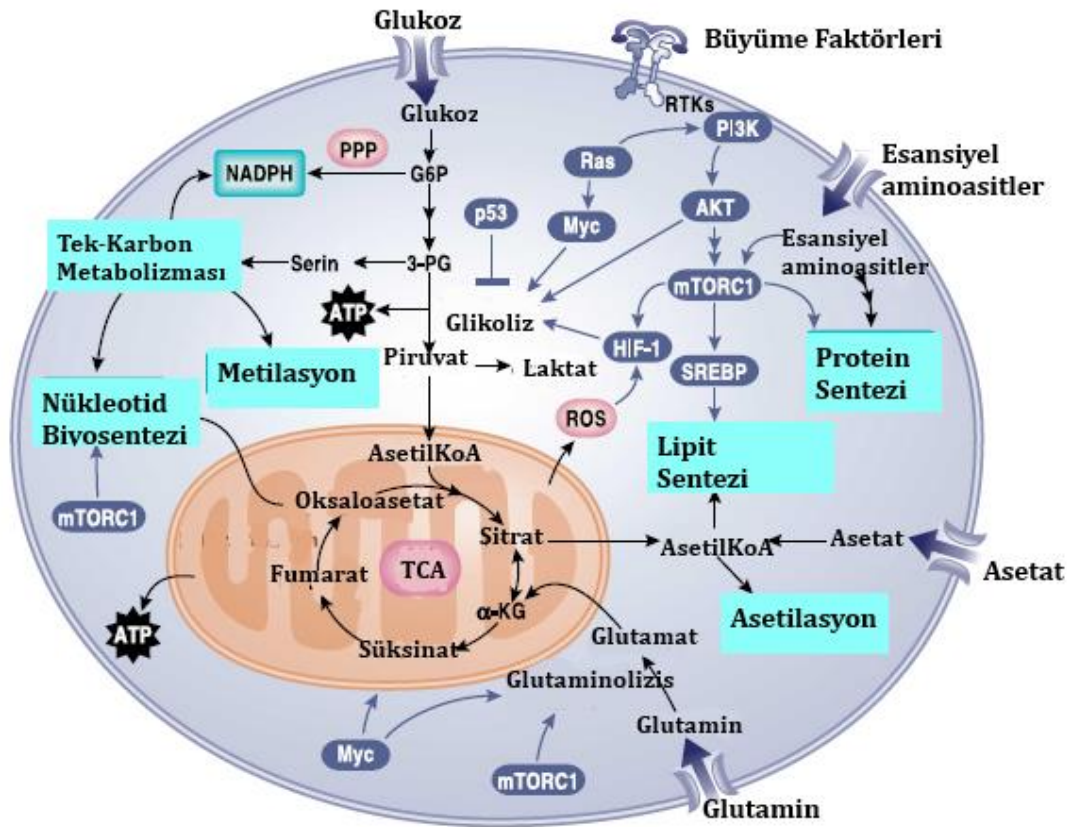
modifikasyonu ile uzun vadede enzimlerin sentez hızını yöneten gen ekspresyonu ile düzenlenir [42].

2.2.1. Lipogenezde Görevli Moleküller ve Yapıları

Lipit düzeyi lipogenez ve lipoliz arasındaki denge ile sağlanır. Lipogenez yağ asiti sentezini ve bunu izleyen trigliserit sentezini kapsar [46].

Lipogenezde kullanılan asetil-CoA'nın çoğu glukozdan oluşan piruvatın TCA döngüsünde sitrata dönüşümü ile elde edilir. Bununla beraber yapılan çalışmalar göstermektedir ki kanser hücreleri ayrıca indirgeyici glutamin metabolizması aracılığı ile yağ asiti sentezi için gerekli sitratı oluşturabilmektedir [47]. Dahası asetatin doğrudan dahil edilmesi kanser hücrelerinde lipit biyosentezinde kullanılan sitoplazmik asetil KoA havuzuna katkıda bulunur [48].

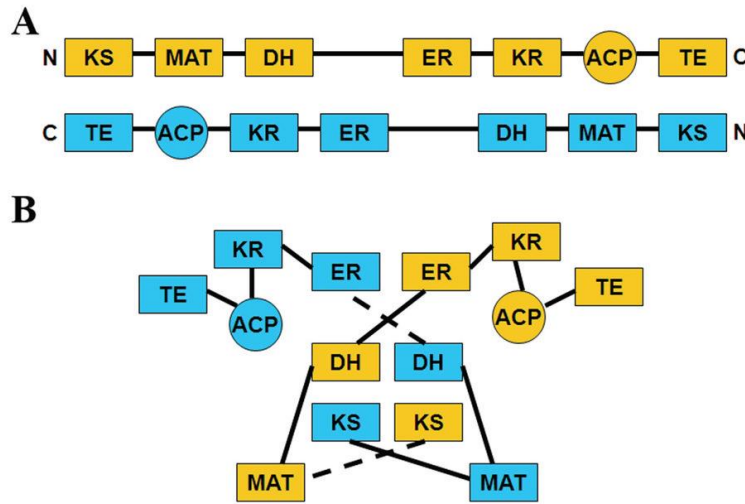
Birçok kanser hücresi yüksek oranda *de novo* lipit sentezi yapar. Hücre zarlarını oluşturmak için kolesterol ile birlikte kullanılabilecek fosfolipitlerin üretimi için yağ asitleri gerekir. Yağ asiti sentez yolağının kontrol enzimlerinden biri FASN' dir. Yağ asiti ve kolesterol biyosentezi yollarındaki birçok enzim SREBP' ler tarafından düzenlenir. PI3K/Akt yolağının onkogenik aktivasyonu, SREBP' nin aktivasyonu ile glukoz alımını ve lipit sentezinde kullanımını teşvik eder. AMPK, düşük hücresel enerji seviyelerine cevap olarak aktive edilir ve lipit sentezini önler ve ACC inhibisyonu yoluyla β -oksidasyonu uyarır. AMPK ayrıca doğrudan fosforilasyon ile SREBP' i de inhibe edebilir. Bunun aksine mTOR ise SREBP aktivasyonunu sağlar. Karmaşık ve birbiri içine geçmiş olan bu sinyal yolları hücre oluşum ve devamlılığı için oldukça önemlidir (Şekil 2.3)[6].



Şekil 2.3. Sinyal yollarıyla metabolizmanın düzenlenmesi [49]

2.2.1.1 Yağ asiti sentaz

Diyet karbonhidratlarının yağ asitlerine anabolik dönüşümünde gerekli olan majör enzim FASN' dır. Karaciğerde, metabolik olarak aktif dokular için veya adipoz dokuda depolanması için lipid üretimini sağlar [50]. Farklı doku dağılımı ve olağandışı enzimatik aktivitesi FASN enzimini hastalıkların iyileştirici uygulamalarında hedef haline getirmiştir. Memeli FASN yapısında yedi katalitik domain, β -ketoasil sentaz (KS), malonil/asetiltransferaz (MAT), dehidrogenaz (DH), enoil redüktaz (ER), β -ketoasil redüktaz (KR), asil taşıyıcı protein (ACP), tiyoesteraz (TE), ve bir 4'-fosfopantetein prostetik grup bulunduran 260000 Da ağırlığında polipeptid yapıda karmaşık multifonksiyonel bir enzimdir (Şekil 2.4)[43, 51, 52].



Şekil 2.4. FASN domain organizasyon modelleri (A) FASN'nin geleneksel dimerik modeli. Bu modelde, homo-dimerik FASN içerisindeki iki alt birim, tamamen genişletilmiş bir başa kuyruk organizasyonunda düzenlenmiştir. (B) Revize edilmiş bir model. Bu düzeltme modelinde, FASN çoklu intra ve inter alt birimi etkileşimlerine izin vermek için sarmal yapıdaki her bir monomer ile X-şeklinde bir dimerik form alır. β -ketoasil sentaz (KS), malonil/asetiltransferaz (MAT), dehidrogenaz (DH), enoil redüktaz (ER), β -ketoasil redüktaz (KR), asil taşıyıcı protein (ACP), tiyoesteraz (TE) [44].

Sağlıklı yetişkinlerde FASN öncelikle hormon-sensitif hücrelerde ve yüksek lipid metabolizmasının olduğu hücrelerde eksprese edilir [53]. Karaciğer ve adipoz dokuda FASN ekspresyonu esas olarak beslenme ile ilgili sinyallerle kontrol edilir. İyi bir beslenmede normal hücreler diyetten gelen serbest yağ asitlerini kullanmayı tercih ederler. Dolayısıyla *de nova* yağ asiti sentezine çok ihtiyaç duyulmaz ve yağ asiti sentaz protein seviyesi düşüktür. FASN ekspresyonunu karbohidrat alımı, tiroid hormonu, insülin ve glukokortikoidler arttırırken, doymamış yağ asitleri, siklik adenosin monofosfat (c-AMP) ve glukagon düşürür [44].

Endometrium proliferatif fazda FASN ekspresyonu yüksek iken sekretuar diferansiasyon fazında düşmektedir. Proliferatif gland ve stroma hücrelerinin yüksek FASN seviyesine, östrojen ve progesteron reseptörlerinin ve Ki-67 seviyesinin yüksekliği eşlik eder, bu durum FASN ekspresyonunun hormon kontrolünde olduğunu ve proliferasyonla ilişkili olduğunu gösterir [50]. Ayrıca süt salgılayan meme dokusunda da FASN ekspresyonu süt yağı yapabilmek için artmıştır [54].

Yağ asiti sentez yolundaki tüm lipogenik enzimler arasında FASN doku dağılımı ve sıradışı enzimatik aktivitesi nedeniyle tıbbi uygulamalar için en iyi fırsatı sağlar. Normal insan dokusunda, süt salgılayan meme ve endometrium hariç, diyetle alınan yağ asitlerinden dolayı FASN ekspresyonu düşer, buna zıt olarak kanser hücrelerinde ise sıklıkla FASN ekspresyonu yüksektir [43].

Yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda FASN hedef alınarak lipogenezin inhibisyonunun seçici olarak kanser hücrelerinde apoptozisi uyardığını göstermiş, bu nedenle de kanser hücrelerinin *de nova* yağ asiti sentezine oldukça bağımlı olduğu belirtilmiştir. Kanser ve normal hücreler arasındaki FASN ekspresyonundaki farklılıklar ve bununla birlikte FASN inhibisyonunda oluşan farklı tepkiler FASN' ı kanser tedavisinde iyi tedavi edici indeks ile birlikte uygun bir hedef haline getirmiştir. C75, serulenin, orlistat, polifenoller, flavonoidler ve triklosan farmakolojik FASN inhibitörlerinden bazılarıdır [44].

2.2.1.2. Sterol Bağlayıcı Protein

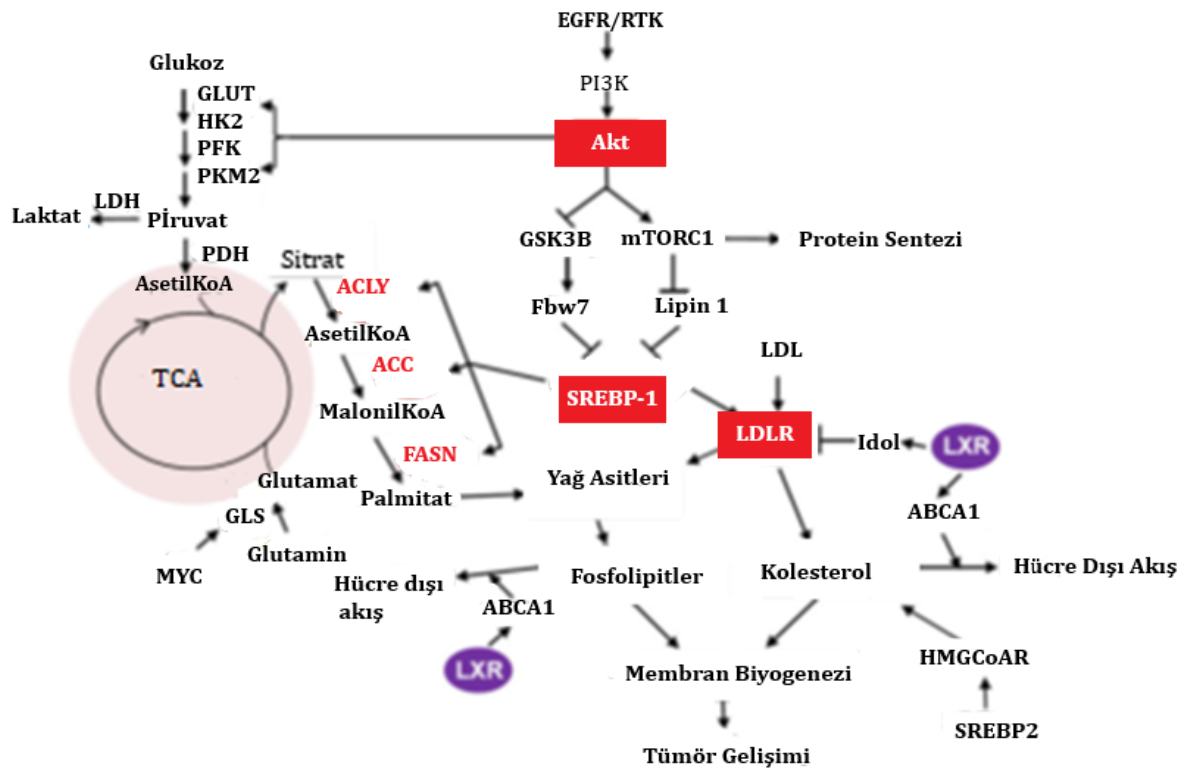
Yağ asiti sentaz enzimi de dahil çoğu enzimi kodlayan genler ve kolesterol biyogenezi, hücrel lipit homeostazisi için kritik rolü olan transkripsiyon faktör ailesi, SREBP'in hedefidir (Tablo 2.3) [55].

Tablo 2.3. SREBP, aktive ettiği genler [56]

Kolesterol metabolizması	Yağ asiti metabolizması	Plazma lipoprotein metabolizması
LDL reseptörü	Asetil coA karboksilaz	Lipoprotein lipaz
HMG-Co A sentaz	Yağ asit sentaz	HDL reseptör
HMG-Co A redüktaz	Stearil CoA desatüraz 1,2	
Farnesildifosfat sentaz	AsilCoA bağlayıcı protein	
Skualen sentaz	ATP sitrat liyaz	
Lanosterol14 α -demetilaz	Malik enzim	
	PPAR gama	
	AsetilCoA sentaz	
	Gliseril-3-fosfat asiltransferaz	

Sterol bağlayıcı proteinler transkripsiyon faktörlerinin temel sarmal-heliks-sarmal lösin fermuar (basic-helix-loop-helix leucine zipper) sınıfına aittirler. Endoplazmik retikulumun membranına SREBP klivaj aktivite edici protein (SCAP) aracılığı ile bağlanır, 125 kDa öncüller olarak okunurlar. SREBP'in memelilerde belirlenmiş üç izoformu vardır, SREBP1a, SREBP1c ve SREBP2 [57]. SREBP1a ve SREBP1c farklı eklemelerle oluşturulur ve dokularda ekspresyon düzeyleri farklılık göstermektedir [58]. SREBP1a ve SREBP1c SREBF1 geni tarafından kodlanırken SREBP2 ise SREBF2 geni tarafından kodlanır [59]. Hedef genlerinin çakışmasına rağmen SREBP1 asıl olarak yağ asiti, fosfolipit ve triasilgliserol sentezini regüle ederken, SREBP2 kolesterol sentez genlerini ekspresyonunun kontrol altında tutar [60]. Bunlara ek olarak hücre siklusunun ve hücre proliferasyonunun düzenlenmesinde de rol alır [61, 62].

İntrasellüler sterol konsantrasyonu SREBP aktivitesini negatif feedback etkisiyle sıkıca kontrol edilir [63]. SREBP-1' in sterollerle kontrolünün yanı sıra kanserde PI3K/Akt onkogenik sinyal yolağı tarafından da stabilize ve aktive edildiği gösterilmiştir [63, 64]. Bu regülasyon iki yol ile açıklanabilir. Birinci yol aktive olan Akt, SREBP-1 nükleer formunu stabilize edebilir ve hedef gen ekspresyonunun yükselmesini Fwb-7, SREBP-1-N terminal degradasyonuna regülatörü olan glikojen sentaz kinaz 3 (GSK3) β izoformunun inhibisyonuyla aracılık eden ubiquitin enzim E3 regülasyonunun düşürülmesiyle sağlar. Diğer yol ise bir fosfotidik asit fosfataz olan, Lipin 1'i düzenleyen mTORC1 ile SREBP-1'in nükleer lokalizasyonunu ve transkripsiyonel aktivitesini kontrol altında tutmak için PI3K/Akt sinyalizasyonudur (Şekil 2.5) [63].



Şekil 2.5. PI3K/Akt sinyali ve SREBP-1 aracılığıyla lipit metabolizmasının regülasyonu [63].

2.3. AMPK/Akt/mTOR Sinyal İleti Yolağı

2.3.1. Fosfotidilinositol 3-kinaz

Fosfotidilinositol 3-kinazlar hücre membranındaki fosfoinositidlerin 3'-OH grubunu fosforilleyen lipit kinaz ailesidirler [65]. Yapı, substrat, spesifite ve lipit ürünleri bakımından farklılık gösteren 3 ayrı PI3K sınıfı bulunmaktadır, sınıf I, II, III (Tablo 2.4). Sınıf IA PI3-kinazlar

en çok çalışan gruptur ve kanserde oldukça yaygınlık gösterir. Heterodimer yapıları regülatör p85 ve katalitik p110 subunitelerinden oluşurlar [66]. İçerdikleri subunitelerden sonra kullanılarak isimlendirilen dört izoform PI3K bulunur, α , β , γ , δ . Regülasyon ve yapıları temel alınarak sınıf IA ve sınıf IB olarak alt sınıflandırmaları yapılır [67].

Tablo 2.4. PI3K sınıfları [68]

	İzoformu	Doku Dağılımı	Substrat	Ürün
Sınıf IA	p110 α	Yaygın dağılım	PI(4,5)P ₂	PI(3,4,5)P ₃
	p110 β	Yaygın dağılım		
	p110 δ	Lökositler, nöronlar		
Sınıf IB	P110 γ	Lökositler, kardiyak miyositler	PI(4,5)P ₂	PI(3,4,5)P ₃
Sınıf II	C2 α	Epitelyum, endotelyum	PI, PI4P	PI3P, PI(4,5)P ₂
	C2 β	Yaygın dağılım		
	C2 γ	Hepatosit		
Sınıf III	VPS34	Yaygın dağılım	PI	PI3P

Sınıf I PI3-kinazlar immün regülasyonda önemli role sahiptir, farklı isimlerdeki alt gruplar doku dağılımları ve fonksiyonları bakımından farklılık gösterirler. PI3K α yaygın doku ekspresyonuna sahiptir, anjiyogenez ve insülin sinyalizasyonunda önemlidir [69]. PI3K α ayrıca B hücrelerinin erken gelişim sürecinde PI3K δ kaybını kompanse edebilmektedir [70]. PI3K α gibi PI3K β da yaygın olarak eksprese edilir. PI3K δ ve PI3K γ ekspresyonu lökositlerde yoğundur, ekspresyon düzeyleri ve fonksiyonları hücre tipine ve aktivasyon durumuna göre çeşitlenir. PI3K δ , erişkin B hücrelerinin gelişiminde, T hücreleri efektörü ve T hücrelerinin farklılaşma ve fonksiyon regülasyonunda etkindir [68, 70].

Sınıf II PI3-kinazlar tarafından fosfatidilinositol 4 fosfat (PI4P) sırasıyla fosfatidilinositol 3 fosfat (PI3P) ve fosfatidilinositol 3,4 bisfosfat (PI(3,4)P₂) formuna fosforillenir. Sınıf II PI3K sinyal mekanizmaları tam olarak anlaşılmamakla beraber son gelişmeler PI3KC2 izoformlarının immün hücre sinyallerinde ve tümör gelişiminde rol aldığını göstermektedir [71].

Bazı bulgularda Sınıf II enzimlerin Sınıf I PI3-kinazlar gibi dış uyaranlarla aktive olduğu gösterilmiştir. Buna zıt olarak insanda tek tür olan sınıf III PI3-kinazların ise hücre dinlenme durumundayken bile düzenli yüksek aktivite gösterdikleri belirtilir. Sınıf II PI3-kinazlar gibi sınıf III enzimleri de PIP' i substrat olarak kullanırlar ve PI3P yaparlar. Sınıf III PI3-kinazlar düşük ökaryotlardan bitkilere ve memelilere kadar korunarak kalan ve PI3-kinazların en eskisi olarak tanımlanır. Sınıf I ve II PI3-kinazlar fagositoz, makropinositoz ve regüle edilmiş ekzositoz gibi reseptör ile indüklenen süreçleri tetikler. Sınıf I PI3-kinazlar aynı zamanda otofajiyi de

inhibe eder. Bunun aksine, Sınıf III PI3-kinazlar esas olarak endositik membran alış verişi, fagozom olgunlaşması ve otofaji ile ilişkili olan reseptöre bağlı alış veriş olaylarına aracılık eder [72].

Reseptör tirozin kinaz (RTK), G-proteinle eşleşen reseptörler ve bazı onkogenler PI3-kinazları aktive eder. Aktive olmuş PI3K, PIP2'ı fosforiller ve fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfata (PI(3,4,5)P3) dönüşümünü sağlar [66]. Normal hücrelerde PI(3,4,5)P3 büyüme hormonu sitümülasyonu ile kısa süreli uyarılır ve hızlıca PI3K sinyalini PIP3'ten 3-fosfat taşınması yoluyla yok eden PTEN ve lipid fosfatazlar ile metabolize edilir. Kanser hücrelerinde ise sıklıkla artmış PIP3 miktarından dolayı onkogenik sinyal proteinlerindeki artış PI3K yapımında artışa ya da PI3K'nın mutasyonel aktivite göstermesine neden olur. Pek çok kanser türünde bazal ve uyarılmış PIP3 artışına neden olan PTEN fonksiyon kaybı gözlenmektedir. Bu ikincil mesajcının turnover sayısının azalması ile PIP3 artışı gözlenir [69].

2.3.2. Protein kinaz B

Büyüme hormonlarıyla aktive olan Akt ya da protein kinaz B 1991 yılında belirlenen 60 kDa'luk bir serin/treonin kinazdır. Apoptozis, glukoz ve glikojen metabolizmasında rolü olduğu gibi hücrede devamlılık, büyüme, farklılaşma, metabolizma, döngü ve kalıtım gibi önemli işlevleri de regüle eder. Protein kinaz C (%73) ve protein kinaz A (%68) ile homolojisinden dolayı protein kinaz B (PKB) veya Rac-PK (A ve C ilişkisi) olarak da isimlendirilmiştir. Akt ayrıca T hücre lenfomada bulunan transform retrovirüs Akt8' in onkogen v-akt ürünü olarak da tanımlanmıştır [73]. Memeli genomunda üç AKT/PKB izoformu bulunmaktadır. AKT1 (PKB α), AKT2 (PKB β) ve AKT3 (PKB γ) [74].

Protein kinaz B, NH₂ terminal plekstrin homoloji domain (PH) ve COOH terminal katalitik domain ile kompoze olur [75]. PH domain, 1-147 aminoasit kalıntılarını kapsayan ve Akt-homoloji domain (AH) olarak adlandırılan Akt amino-terminal düzenleyici alanının büyük kısmını oluşturur. Kinaz domain ise 148-411 aminoasit residüleri arasında karboksi terminali kuyruk bölgesi ile uzanır [73].

Büyüme ve sağkalım faaliyetlerinin genişçe bir kısmını kontrol eden Akt sıkıca düzenlenir [76, 77]. PI3-kinaz ürünü olan PIP3, 3-fosfoinozidit-bağımlı protein kinaz 1(PDK1) Akt aktivasyonunun önemli bir aracıdır. Akt ve PDK1'de bulunan PH domainleri PIP3'e bağlanabilir ve bu öncül lokalizasyon durumu PDK1' in Akt' ı katalitik fosforilasyon alanı T308' den fosforillemesine izin verir [77, 78]. Akt ayrıca hidrofobik motifi S473 alanından memeli rapamisin hedefi C2 (mTORC2) ve DNA-aktive protein kinaz (DNAPK) ve rapamisin-insensitif TORC1 tarafından fosforillenebilir. S473 fosforilasyonu enzimatik aktiviteyi artırır ve ayrıca

substrat kapsamında S473 fosforilasyonunun olmadığı zaman fosforillenmeyen forkhead box (FOXO) transkripsiyon faktörleri ve prolin-zengin Akt substrat (PRAS40) da bulunur. Üçüncü fosforilasyon alanı T450'dir. mTORC2 aktivitesi ile kontrol edilir [79].

Protein kinaz B 100'den fazla alt yolak substratını hedef alarak hücre metabolizmasını, büyümesini, hayatta kalmasını ve proliferasyonunu etkileyen önemli bir sinyal iletim merkezidir [80, 81]. Örneğin Akt glukoz alımını ve glikojen olarak depo edilmesini glikojen sentaz-3 (GSK-3) üzerindeki etkisi ile kolaylaştırır [82]. Akt, GSK-3A' nın Ser21 ve GSK-3B' nin Ser9 fosforilasyonuna aracılık ederek glikojen sentaz aktivitesinde önemli bir basamak olan GSK3 kinaz aktivitesi kaybına neden olur. GSK3 inaktivasyonunun hücre siklus progresyonuna aracılık ettiği düşünülmektedir [83].

Protein kinaz B kanser hücrelerinde Bad ve kaspaz 9'un inhibisyonu aracılığı ile bozulan apoptozis ve hücre siklusuna katkıda bulunur [84, 85]. Ayrıca Akt hücrenin hayatta kalmasına apoptozis sinyal ilişkili kinazın (mitojen aktive protein kinaz 5- MAP3K5) Ser83 fosforilasyonu yoluyla oksidatif stresi etkileyerek de etkili olur [83].

Pek çok kanser türünde PTEN fonksiyon kaybı mutasyonları, metilasyonla baskılanması ve diğer epigenetik modülasyonlar oldukça yaygındır (Tablo 2.5). PI3K-Akt yolağının çeşitli bileşenlerinin karmaşık işleyişinden dolayı PTEN ve PI3KCA da meydana gelen mutasyonlar tam olarak ayrışık görülmemektedir [83].

Tablo 2.5. PI3K-Akt yolağı genlerinde tümör tipine göre anlamlı artış gösteren somatik mutasyon % oranları [83]

Kanser Tipi	PIK3CA	PTEN	PIK3R1	PIK3CG	AKT1
Meme	33,6	3,8	2,5	0,4	2,5
Akciğer Adenokarsinom	4,4	2,2	1,3	0,7	0,5
Akciğer skuamoz	14,9	8,1	0,6	7,5	0,6
Kolorektal	17,6	1,0	2,1	0,5	0,0
Endometrial	52,2	63,5	39	1,3	1,3
Over	0,6	0,6	0,3	1	0,0
Baş Boyun	20,6	1,3	1,7	2,7	0,7
Renal	2,9	4,3	0,5	0,7	0,5
Glioblastoma	11	30,7	11,4	2,4	0,3
AML	0	0	0	0	0,0
Mesane	17,4	3,1	1	2,0	0,0
Karma	17,8	9,7	4,4	1,7	0,9

2.3.3. Rapamisin Protein Kompleksinin Memeli Hedefi

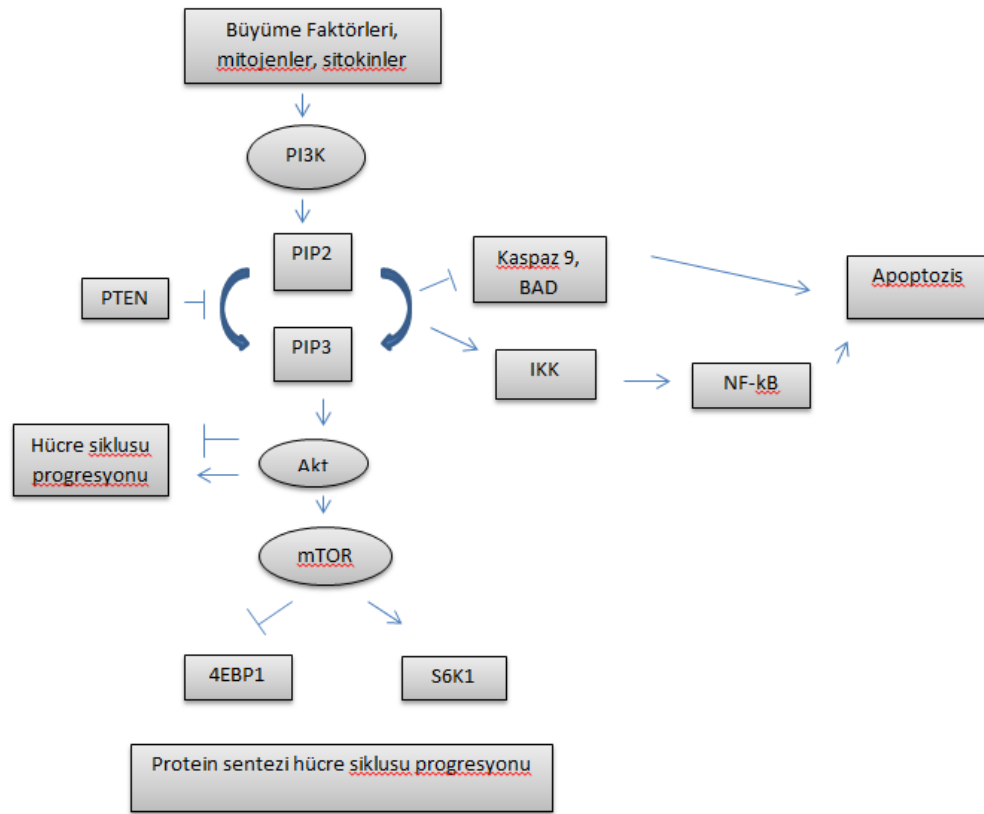
Rapamisin Protein Kompleksinin Memeli Hedefi, serin/treonin kinaz PI3K-iliskili kinaz (PIKK) ailesine ait bir üyedir. Bu korunmuş protein, mRNA translasyonu, ribozom biyogenezi,

otofaji ve metabolizma dahil olmak üzere büyüme ile ilişkili süreçleri düzenlemek için çeşitli yukarı sinyalleri entegre eder [86].

Farklı girişlere ve alt akış etkilerine sahip olmak üzere mTOR iki komplekste toplanır. mTOR kompleks 1 (mTORC1) RAPTOR altbirimi ile, mTOR kompleks 2 (mTORC2) RICTOR altbirimi ile tanınır. Her iki kompleks de mLST8 alt birimini içerir, ancak bunlar RAPTOR veya RICTOR ile etkileşime giren diğer alt birimlerde farklılık gösterirler [87].

Translasyon, ribozom biyogenezi ve otofajiyi kolaylaştıran mTORC1 hücre büyümesini düzenler. mTORC1 substratları eIF4E bağlı protein 1 (4EBP1) ve ribozomal S6 kinaz (S6K)'dır ve sırasıyla cap bağımlı translasyonu, başlamayı ve uzamayı kontrol ederler. mTORC2, esas olarak, hücre döngüsü girişini, hücre sağkalımını, aktin hücre iskelet polarizasyonunu ve anabolik çıkışı teşvik eden büyüme faktörlerine cevap verir. Substratları, S6K ile hidrofobik motif fosforilasyon alanını paylaşan Ser / Thr protein kinazları Akt, SGK ve PKC'yi içerir [87].

Kanser yolaklarından PI3K/Akt/mTOR yolağı büyüme faktörlerine yanıt olarak reseptör tirozin kinaz aktivasyonu ile başlar ki bu aktivasyon karsinogenez sürecinde kontrolsüz olarak gelişir. RTK aktivasyonu tirozin rezidülerinde otofosforilasyona ve adaptör proteinlerin transfosforilasyonuna yol açar [88]. (Şekil 2.6) Otofosforilasyon ile PI3K alt birimi P85 etkinleşir, diğer alt birim P110 ise PIP2'yi PIP3'e dönüştürür. Akt, PDK1 tarafından fosforillenerek aktive olur. Akt'ın efektörlerinden en önemlisi mTOR' dur. mTOR, Akt tarafından tuberöz skleröz-2 (TSC2) direk fosforilasyonu veya AMPK inhibisyonu ile aktive edilir [11].



Şekil 2.6. PI3K/AKT/mTOR yolu şematik gösterimi [88]

Rapamisin Protein Kompleksinin Memeli Hedefi aktivasyon kontrolünün bozulmasında PTEN fonksiyonu kaybı, PI3K p110 katalitik ünitesinin mutasyonu veya amplifikasyonu, PI3K p85 düzenleyici ünitesinin mutasyonu, AKT1 ve AKT2 her hangi birisinin amplifikasyonu ve TSC1 veya TSC2 gibi AKT ile ilişkili mTOR düzenleyici proteinlerin inaktivasyonu ya da mutasyonları etkindir [89]. Aktifleşen p53 mTOR negatif düzenleyicisi olarak etkide bulunur. Bu nedenle kanserde p53 ile ilgili fonksiyon kaybı mTOR aktivasyonunu arttırıcı yöndedir [11].

Kanser tedavisinde de sıkça kullanılan mTOR inhibitörü ilaçlar, hücre içi protein olan FK506 bağlayıcı protein-12 (FKBP-12) ile kompleks oluşturarak raptor'un mTOR'a bağlanmasını engelleyerek mTOR aktivitesini önlerler. mTOR inhibitörleri sadece mTORC1' i inhibe edip, mTORC2' yi etkilememektedir [90].

Aktive olan mTOR apoptozu düzenleyen molekülleri inhibe eder, bu nedenle kanserde farklı kanallarla artan mTOR aktivasyonu apoptozisi engeller. PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağının düzensizliğine sebep olan mekanizmalardan biri de vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve anjiyogenezi artıran Hipoksi ile indüklenen faktörlerin (HIF) artan ekspresyonu ile tümörögenezi oluşturmaktadır. mTORC1 and mTORC2 komplekslerinin aktivitesi HIF-1a ve HIF-2a' nın transkripsiyonundan sorumludur [91].

2.3.4. Adenozin mono fosfat aktive edici protein kinaz

Adenozin mono fosfat aktive edici protein kinaz, yüksek oranda korunmuş bir katalitik α altünitesi ve iki regülatör altüniteden, β ve γ , oluşan serin/treonin kinazdır ve iskelet kası, karaciğer dahil çeşitli dokularda PRKAA1, PRKAA2, PRKAB1, PRKAB2, PRKAG1, PRKAG2, ve PRKAG3 genleri tarafından eksprese edilir [92]. AMPK' nın α -alt-birimi, yukarı akışlı protein kinazların fosforilasyonunun AMPK aktivasyonu ile sonuçlandığı korunmuş bir treonin kalıntısı (Thr172) içerir. AMPK' yı aktive edebilen kinazlar arasında karaciğer kinaz B1 (LKB1), kalsiyum / kalmodulin bağımlı protein kinaz (CaMKK) ve transforme edici büyüme faktörü β (TGF- β) ile aktive edilmiş kinaz (TAK1) bulunur [93, 94].

ATP tükenmesi, düşük glukoz ve NADPH seviyeleri gibi ekstrasellüler değişikliklerle de AMPK aktive olur. Bunların yanısıra ilaç uygulamaları ve doğal olarak oluşan bazı bileşikler de AMPK' yı aktive eder [95].

Aktive edildikten sonra AMPK, kanser patogenezeine katkıda bulunan çeşitli düzenleyici süreçlerde yer alan birçok efektör proteinini etkileyebilir. Kanser metabolizması ile ilgili olarak mTOR, önemli bir AMPK hedefidir [96]. AMPK ayrıca p53' ü de düzenleyebilir ve hücre döngüsünü kontrol eden transkripsiyon faktörleri ve ko-regülatörlerin aktivitesini düzenler [95]. Yapılan çalışmalar, AMPK'nin, inflamasyonu modüle ederek, tümör oluşumu sırasında meydana gelen ve doğrudan hücre döngüsü tutukluğunu indükleyen metabolik değişikliklere karşı bir tümör baskılayıcısı olarak hareket edebileceğini düşündürmektedir [97].

Hücrel enerji dereglasyonu ile karakterize olan kanserde AMPK önemli bir moleküldür çünkü metabolizma içinde enerji seviyelerini etkileyerek, hücre büyümesi inhibisyonuyla metabolik tümör baskılayıcı gibi görev yapabilmektedir [95]. AMPK, metabolik, büyüme faktörü eksikliği ve onkogenik stres de dahil olmak üzere, hücrelerin stresle başa çıkmasına yardımcı olur [92].

p53 asetilasyonu ve fosforilasyonunu düzenlemesinde tümör baskılayıcı olarak AMPK' nın işlevi olduğu düşünülmektedir [98, 99]. AMPK aktivasyonu, serin 15 üzerinde p53'ün fosforilasyonunu indükler ve bu fosforilasyon, AMPK bağımlı hücre siklus arestinin başlaması için gereklidir. AMPK ile indüklenen p53 aktivasyonu, glikoz yoksunluğuna cevap olarak hücrel hayatta kalmayı teşvik eder ve p53 bağımlı metabolik areste girmiş hücreler bu glikoz restorasyonundan sonra tekrar hücre siklusuna girebilirler [100].

Adenozin mono fosfat aktive edici protein kinaz katabolizmayı aktive eder, anabolizmayı inhibe eder. AMPK, yüksek oranda aktive edildiğinde, hücre proliferasyonunu ve tümör büyümesini güçlü bir şekilde inhibe edebilmesine rağmen; AMPK kaybı, yeterli besin ve büyüme faktörlerinin yokluğunda hücre çoğalmasını sağlamak için yeterli değildir. [101]

Aktive edilen AMPK, iki farklı mekanizma yoluyla enerji homeostazını kolaylaştırır; hücre metabolik enzimlerinin doğrudan fosforilasyonu ve gen ekspresyonunun düzenlenmesi. Metabolik strese cevap olarak, AMPK, kısmen, sözü edilen ACC ve HMG-CoA redüktaz aktivitelerini ve fosforilasyon yoluyla glikoz ve lipit homeostazisi ile bağlantılı diğer metabolize edici enzimlerin aktivitelerini modüle ederek metabolik yeniden programlamayı kolaylaştırır. Ayrıca AMPK SREBP1 fosforilasyonunu sağlayarak yağ dokularında lipojenik gen ekspresyonunun transkripsiyonel indüksiyonunu baskılar (Tablo 2.6) [101].

Tablo 2.6. AMPK substratları ve işlevsel önemleri [101]

AMPK Substratı	İşlevsel Önemi
Glukoz metabolizması (Glukoz alımı ve glikoliz artışı; glikojen biyosentezinin düşmesi)	
Fosfofruktoknaz 2 (PFK2)	Ser-466'da fosforilasyon yoluyla AMPK aracılı PFK-2 aktivasyonu, iskemi sırasında kalp hücrelerinde glikolizin uyarılmasında veya nitrik okside cevaben nöronal hücrelerde rol oynar. Kanser hücrelerinde, PFK2'nin ana formu olan PFKBP3, glikolizi artırmak için fosforilasyon için AMPK tarafından hedeflenmiştir.
TCB1D1	TCB1D1, GLUT4 translokasyonunu düzenleyerek yakıt homeostazı regülatörü olarak işlev görür ve AMPK tarafından insülin ve büzülme uyarımlı sinyalleme bir parçası olarak çok bölgesel fosforilasyon yoluyla aktive edilir.
Glikojen sentaz	AMPK ile GYS1 / 2'nin fosforilasyonu, substratları, UDP Glc ve Glc-6-P için afinitesini hafifleterek enzimin etkisizleşmesine neden olmuştur.
Lipit metabolizması (Yağ asidi oksidasyonu artışı; yağ asidi ve kolesterol biyosentezinde düşüş)	
ACC	AMPK, yağ asidi biyosentezinin hız sınırlayıcı basamağını düzenleyen anahtar enzim olan ACC 'yi fosforile eder ve etkisizleştirir.
HMG-CoA redüktaz	AMPK, HMG-CoA redüktazı fosforile eder ve etkisizleştirir, bu da kolesterol biyosentezinin inhibisyonuna yol açar.
Hormon sensitif lipaz (HSL)	HSL, diasilgliseroller adipoz ve iskelet kaslarında monoasilgliserollere hidrolize ederek triasilgliserol bozulmasını kolaylaştırır. AMPK Ser-565'te HSL'yi fosforile eder, böylece protein kinaz A aracılı Ser-660 fosforilasyonunu bloke ederek adrenerjik agonist kaynaklı HSL aktivasyonunu önler.
Adipoz trigliserit lipaz (ATGL)	ATGL, kahverengi adipoz dokulardaki lipolizi artırmak için AMPK ile fosforile edilir ve aktive edilir; bu, yağ asidi oksidasyonunu ve termogenez için UCP-1 indüksiyonunu uyarır.
Fosfolipaz D1 (PLD1)	AMPK, Ser-505'te fosforilasyon yoluyla PLD1'i aktive eder ve bu AMPK ile indüklenen PLD1 aktivasyonu, glukoz yoksunluğu koşulları altında kas hücrelerinde artan glukoz alımı için gereklidir.

Metabolik bir tümör baskılayıcı rolü genel olarak kabul edilen AMPK'nın, kanser tedavisi için terapötik kullanılmasına artan bir ilgi vardır. Bununla birlikte, ortaya çıkan kanıtlar, tümör hücrelerinin, AMPK aktivasyonunu enerji ya da hipoksik stresler karşısında metabolik adaptasyona maruz kalmak için bir hayatta kalma stratejisi olarak da kullanabileceğini göstermektedir. AMPK'nın metabolik tümör baskılayıcı fonksiyonu, düşük pH ve AR, Src ve MYC'den sinyal verme gibi tümör hücrelerinde stres veya onkogenik sinyaller tarafından geçersiz kılınabilir. Bu nedenle, araştırmacılar kanser tedavisinde hangi koşullar altında, örneğin tümörögenез evreleri ve kanser progresyonu veya genetik anormallikler gibi, AMPK inhibisyonunun AMPK aktivasyonundan daha yararlı bir strateji olduğunu belirlemeye yönelik çalışmalar yapmaktadır [101].

2.4.Endometrial kanser ve lipogeneз ilişkisi

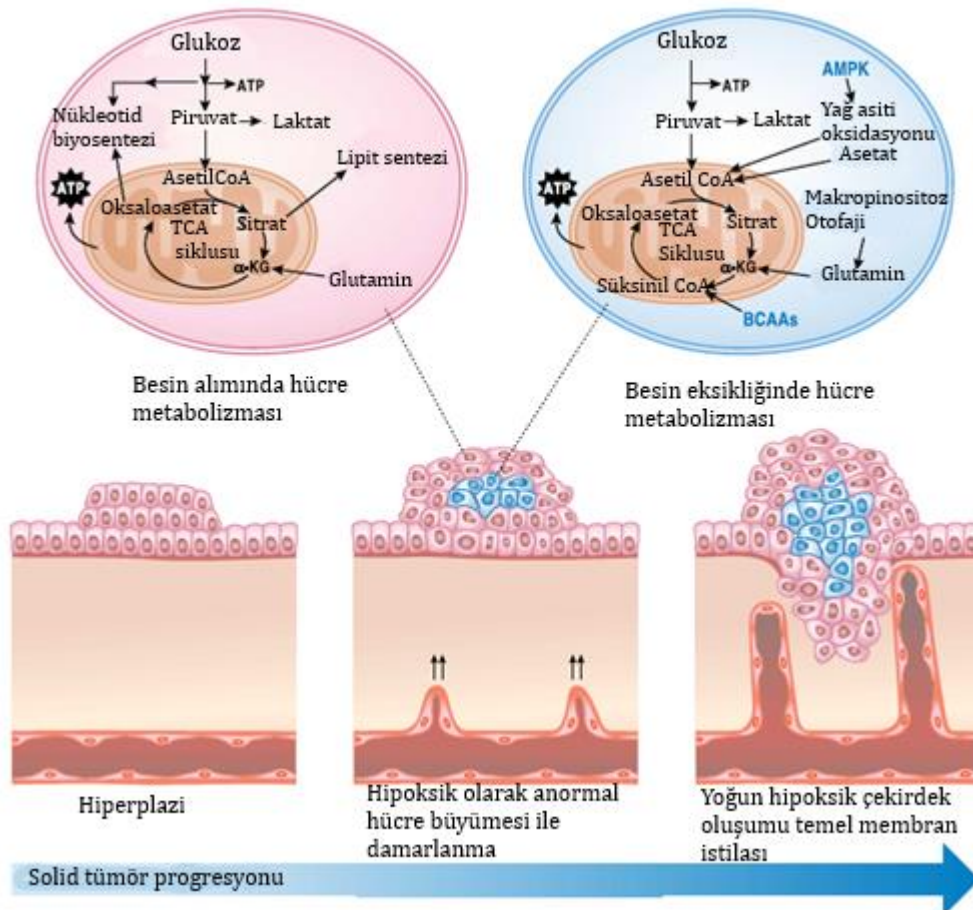
Kanser hücreleri olumsuz ortamlarda çoğalmak, çoğaltmak ve hayatta kalmak için üç büyük makromoleküller olan nükleik asitlere, proteinlere ve lipitlere olağanüstü şekilde ihtiyaç duyarlar. Bu nedenle metabolizmanın yenilenmesi malign hücreler için oldukça önemlidir ve düzeni bozulmuş enerji metabolizması gelişen bir kanser göstergesidir [102]. Kanıtlar, her üç sınıfın biyosentezinin, hücre büyümesini yöneten ve özellikle PI3K-mTOR sinyalleme ve tümörögenik mutasyonlar yoluyla kanserde aktive edilen aynı sinyal yollarının kontrolü altında olduğunu gösterir [49].

Ayrıca kanserde enerji metabolizmasında belirlenen değişimler yapılan çalışmalarla farklı açılardan araştırılmıştır. Warburg etkisi olarak bilinen, kanser hücrelerinde metabolik yeniden programlama belirleyicisi olarak, mitokondrinin varlığına rağmen artan oksijen bağımsız glukoz alımı ve glukozun laktata fermentasyonunun gerçekleştiği aerobik glikolizle ilgili yapılan çalışmalar enerji metabolizması araştırmalarının en dikkat çekici örneklerindendir [102].

Kanserde gözlenen bir başka değişiklik de artan glutamin metabolizmasıdır. Memeli hücrelerde Krebs siklusuna giren α -ketoglutarat glutamin metabolizması ile oluştuğu için glutamin önemli enerji substratıdır. Glutaminden oluşan α -ketoglutarat krebs yoluyla ilerleyen sitrat yapımına ve malik enzim bağımlı piruvat yapımına katkıda bulunur [103]. Glutamin izositrat dehidrogenaz ve akonitaz enzimlerinin katalizlediği TCA döngüsü ile sitrata dönüşebilir ve sonrasında yağ asidi sentezinde asetil grup oluşturulmasında kullanılabilir [7].

Kanser hücreleri, hayatta kalmak için tüm bunların yanında mitokondriyal fonksiyonu da sürdürmek zorundadır ve bunu sağlayabilmek için birçok farklı mekanizma uyarlamıştır.

Örneğin, mitokondriyal elektron transport zinciri (ETZ) optimal olarak % 0,5 oksijen (O_2) miktarı gibi düşük seviyelerde çalışabilir [104]. Ayrıca, hipoksik tümör hücreleri ($< 2\% O_2$) oksidatif ATP üretimi için yakıt olarak glutamin kullanmaya devam edebilir [105, 106]. Besin tüketilebilen şartlarda kanser hücreleri, hücre sağkalımı ve büyümesi için TCA döngüsünü beslemek için glutamin ve diğer amino asitleri üretmek için hücre dışı alandan atılan proteinleri invazyonla kullanır [107]. Damarlara yakın hücreler, proliferasyonu destekleyen anabolik yolları beslemek için besinleri ve oksijeni kullanır. Bununla birlikte, damarlardan uzaktaki hücreler besinlere ve oksijene erişebilirlik azaldığı ve hücre canlılığını desteklemek için otofaji ve makropinozis yoluyla makromoleküler degradasyonun yanı sıra yağ asitlerinin ve dallı zincirli aminoasitlerin oksidasyonu dahil alternatif metabolizma formlarına girebilir (Şekil 2.7) [49]. Ayrıca, eğer asetil-CoA için piruvat oksidasyonu hipoksi veya ETZ bozukluğu ile riske girerse, glutamin, tümör büyümesini sürdürmek için asetil-CoA'yı biyosentetik bir prekürsör olarak sağlayabilir [49].



Şekil 2.7 Tümör beslenmesi damarlara yakınlık ile düzenlenir [49].

Tüm bunlara ek olarak glikolizden türetilmiş piruvatın yanı sıra, yağ asitleri ve amino asitler kanser hücrelerinde mitokondriyal ATP üretimini sürdürmek için TCA döngüsüne substratlar sağlayabilir. Mitokondride yağ asitlerinin parçalanması (β -oksidasyon) asetil-CoA'yı ve ETZ tarafından mitokondriyal ATP üretmek için kullanılan indirgen eşdeğerleri NADH ve FADH₂'yi üretir [49].

1950'lerin başında yağ asiti sentezinin kanser hücrelerinde, benzer sağlıklı hücrelerle karşılaştırıldığında çarpıcı şekilde arttığı gösterilmiştir [108]. Ayrıca kanser hücreleri normal hücreler gibi yağ asitlerini dışardan almayıp, gereken lipid ve yağ asitini *de nova* sentezi ile kendi kendilerine sentezlerler [109].

Diyetten elde edilmiş yağ asitleri çoklu doymamış yağ asitleri iken kanser hücrelerinin sentezlediği yağ asitleri çoğunlukla doymuştur. Bu değişim hücre membranının fiziksel ve kimyasal yapısını etkilemektedir. Hücre membranı fosfolipitlerindeki doymamış yağ asitleri membran akışkanlığının sağlanmasında büyük önem taşır. Yağ asitlerinde doymunluğa kaymanın kanser hücrelerini kemoterapi ve reaktif oksijen türevlerine karşı duyarsız hale getirdiği belirtilmiştir [110].

Hem yağ asitleri hem de lipidler, membran biyosentezi sağlamak için hücre dışı alandan da elde edilebilir. PI3K sinyalleme, yağ asiti alımını aktive eder ve yağ asiti oksidasyonunu bastırır, böylece proliferasyon hücrelerinde büyüme faktörlerinin kontrolü altında lipogenezi maksimize eder [111]. Lipit alımı, biyosentez için onkogene bağlı talepleri yerine getirme kabiliyetinin tehlikeye girmesi durumunda, metabolik stres koşulları sırasında daha fazla önem kazanabilir. Ayrıca, mTORC1 sinyalini oluşturan kanser hücrelerinde, hipoksi, protein biyosentezini desteklemek için endoplazmik retikulum bütünlüğünü korumak için hücre dışı doymamış yağ asitlerine erişimine bağımlılık durumuna neden olur [112].

Yağ asiti sentezinde yer alan genlerin transkripsiyonu SREBP-1 transkripsiyon faktörü tarafından düzenlenir. SREBP-1, yalnızca asetil-CoA'yı yağ asitlerine dönüştürmek için gereken enzimleri değil, aynı zamanda asetat ve glutamini asetil-CoA'ya dönüştürmek için gereken yolları ve pentoz fosfat yolu enzimlerini de düzenler. Bu nedenle bu transkripsiyon faktörü, yağ asidi sentezini katalize eden veya kolaylaştıran proteinleri kodlayan genleri düzenler [49].

Kanser hücrelerindeki yüksek enerji talebini karşılamak için lipogenez ve lipoliz süreçlerinin birbirleriyle dinamik olarak etkileşim içerisinde olması, kanser araştırma stratejilerinde lipid metabolizmasının hedef alınmasını ve bu süreçleri ilgilendiren genlerin araştırılmasını teşvik etmiştir [113].

Yağ asitlerinin membran yapısı oluşturma, ikincil mesajcı ve hormon olarak görev yapabilme, enerji depolama ve lipid tabakası oluşturma gibi pekçok hücresel süreçte rol alması;

lipit metabolizmasındaki değişikliklerin proliferasyonu, motiliteyi, anjiyogenezi, oksidatif stres direncini, hücre büyümesini, farklılaşmasını ve hayatta kalabilmeyi etkilemesi kanser tedavisinde lipogenezin hedef alınabileceğini ortaya koymuştur [113]



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

- Mikropipet Seti (10-100-200-1000 µl)
- 8 kanallı mikropipet (Viaflo)
- 16 kanallı mikropipet (Viaflo)
- Işık Mikroskobu
- 96 Kuyucuklu Blok Karıştırıcı (Philekorea)
- Santrifüj Cihazı (Nüve)
- Vorteks (ISOLAB)
- Steril Kabin (Nüve)
- Isı Bloğu (Philekorea)
- PCR Thermal Cycler cihazı (BIOER, Gene Pro)
- Fluidigm IFC Controller
- RT-PCR (Fluidigm, BIOMARK HD)

3.1.2. Çalışmada Kullanılan Sarf Malzemeler ve Kimyasallar

- 2.0 ml Ependorf Tüpler
- Steril 8'li Strip Tüpler
- 96 Kuyucuklu Piko Plate
- Steril Pipet Uçları
- Steril Örnek Saklama Kapları
- Bistüri
- Ksilen
- Etanol %100
- Fluidigm Kontrol Sıvıları
- QIAGEN miRNeasy FFPE Kit (Cat.No.217504)
- FLUIDIGM PreAmp Kit (Fluidigm, 100-5580)
- Reverse Transcription Master Mix (P/N: 100-6298)
- Array çip (Dynamic Array Cat.No: BMK-M-96.96)
- TaqMan GE Master Mix (Applied Biosystems, 4369016)
- 20x DNA Binding Dye Sample Loading Reagent (Fluidigm, PN 100-3738)
- 2X Assay Loading Reagent (Fluidigm, PN 100-7611)

- EvaGreen Boyası (Biotium)
- Primer Karışımı
- DNase ve RNase İçermeyen Su (Qiagen)
- Ekzonükleaz I (New England Biolabs Inc., Cat. No: M0293S)
- Ekzonükleaz I Reaksiyon Tamponu (New England Biolabs Inc., Cat. No: B0293S)
- DNA süspansiyon tamponu (Teknova, Cat. No: T0223)

3.2. Yöntem

3.2.1. Çalışma Grupları

Çalışmaya hasta grubuna ait 3 alt grup ve kontrol grubuna ait 2 alt grup olmak üzere toplam 5 grup dahil edildi. Endometrioid adenokarsinom tanısı konmuş hastalardan alınan örnekler differansiasyonuna göre Grade 1, 2, 3 olarak derecelendirilerek her bir grupta 20 hasta olacak şekilde 3 hasta grubu, sağlıklı bireylerden alınmış 15 proliferatif ve 15 sekretuar fazdaki örneklerle kontrol grubu oluşturuldu.

Bu çalışmada, 01.06.2012 - 30.04.2018 tarihleri arasında Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'na gelen ve histerektomi operasyonu olan endometrioid adenokarsinom tanısı konmuş hastaların arşivde bulunan endometrium dokuları ile kontrol grubunu oluşturan sağlıklı kişilerin arşivde bulunan endometrium dokuları kullanıldı. Çalışmada kullanılacak örneklerin çalışmaya dahil edilmesi aşağıda belirtilen kriterlere göre gerçekleştirildi.

1. Kontrol 1; Sağlıklı bireylerin sekretuar fazdaki endometrium dokuları
2. Kontrol 2: Sağlıklı bireylerin proliferatif fazdaki endometrium dokuları
3. Grade 1: Endometrioid Adenokarsinom tanısı konmuş Grade 1 hastalarının endometrium dokuları
4. Grade 2: Endometrioid Adenokarsinom tanısı konmuş Grade 2 hastalarının endometrium dokuları
5. Grade 3: Endometrioid Adenokarsinom tanısı konmuş Grade 3 hastalarının endometrium dokuları

3.2.2.Parafinli Arşiv Dokulardan Çalışma Örneklerin Alınması

Çalışmayı oluşturan hasta ve kontrol grubu belirlenirken yanlılığı önlemek amacıyla kontrol grubunun yaş ortalaması hasta grubunun yaş ortalamasına mümkün olduğunca yakın belirlendi. Endometrial kanser tanısı konmuş arşiv dokular histopatolojik olarak incelenerek tanının kontrolü yapıldı. Örnekler 2018 yılından başlanarak 2014 yılına kadar toplandı. Çalışma

gruplarına dahil edilecek doku örnekleri belirlendikten sonra çalışmada kullanılacak arşiv dokuların kodları ile arşivden çıkarılması sağlandı. Her örnek için aynı miktarda doku kullanıldı. Sonrasında aşağıdaki sıra izlendi:

Modifiye doku mikrodizini (tissue microarray) yöntemi ile aynı tümöre ait farklı alanlardan örnekler alınıp değerlendirilebilmekte ve aynı parafin blokta farklı olgulara ait doku örnekleri birlikte incelenebilmektedir. Bu amaçla çalışmamızda blokların hazırlanmasında deri biyopsilerinin alınımı için tasarlanmış punch biyopsi aleti kullanıldı. Rezeksiyon materyallerine ait tümör içeren tüm Hematoksilen-Eozin (H&E) boyalı preparatlar incelendi. Tespit-takip artefaktı içermeyen, nekrozun az olduğu veya bulunmadığı preparatlar üzerinde uygun alanlar ışık mikroskopunda işaretlendi. Bu alanlar 4 farklı bloktan seçildi. Preparatlar üzerinde işaretli alanlara karşılık gelen parafin blok alanlarından 4 milimetre çapında doku deri punch biyopsi aleti ile çıkartıldı. Aynı olguya ait farklı bloklardan çıkarılan 4 doku aynı satırda olacak şekilde 5 farklı olgu bir blok üzerinde haritalandırılarak yeni parafin bloklar elde edildi. Her bir blok 5 satır ve 4 sütun içeren 20 dokudan oluşturuldu. Hazırlanan yeni bloklardan ve kontrol bloklarından mikrotom ile 15 µm kalınlığında kesitler alındı ve kesitler temiz lamaların üzerine aktarıldı (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Arşiv preparatlarında hedef dokuların işaretlenerek belirlenmesi

Lam üzerindeki kesitlerden doku örnekleri bistüri yardımıyla çıkartıldı. Kontaminasyondan korunmak için bistüri ucu her örnek alımında değiştirildi ve pens ucu alkolle temizlendi. Alınan örnekler ependorf tüplere pens yardımıyla aktarıldı.

Tüplere her örnekten çıkarılan dokunun büyüklüğüne bağlı olarak 15 µm'lik 6-8 yaprak doku aktarıldı. Tüplere aktarılabilecek miktar çalışmada kullanılan kitin protokolüne (QIAGEN miRNeasy FFPE Kit, Cat.No.217504) ve çalışma öncesinde yapılan ön çalışma sonuçlarına göre belirlendi. Eppendorf tüplere aktarılan doku örnekleri oda sıcaklığında korundu.

3.2.3. Primer Dizaynı

Çalışma içeriğinde yer alan genlerin primer dizaynı için National Center for Biotechnology Information (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)' da bulunan uygun gen sembolleri kullanılmıştır. Belirlenen primerlerin dizayn edilebilirlik raporu "FLUIDIGM D3 Assay Design" servisi aracılığı ile alınmıştır. Çalışmada kullanılan primerler Forward (FP) ve Reverse (RP) karışık olarak 100 µM konsantrasyonda ve 100 µl final hacimde teslim alınmıştır. Primerler, EvaGreen boyası ile çalışılmış ve aşağıda gösterilmiştir.

FASN	FP: GGAGGGGACAGTGCATCAA,	RP: GTTTACACTCCTCCAGGACAA
SREBF1	FP: CAGCAACCAGAACTCAAGCA,	RP: GCCGACACCAGATCCTTCA
SREBF2	FP:CGCTCCTCCATCAATGACAA,	RP:TCAATGGCCTTCCTCAGAAC
PIK3CA	FP:CTGCAGTTCAACAGCCACAC,	RP: ACAGGTCAATGGCTGCATCA
AKT1	FP:CACACACTCACCGAGAACC,	RP:TCGTGGGTCTGGAAAGAGTA
MTOR	FP:CCAAACCCAGGTGTGATCAA,	RP:TCCTCATTTCCAGGCCACTA
PRKAA1	FP:CCAACTATGCTGCACCAGAA,	RP: AGAATAACCCCACTGCTCCA
PRKAA2	FP:ACCTGGTTGATAACAGGAGCTA,	RP:ACCAGATCTCTGCTCCACTAC
PRKAB1	FP:GGGTCCTTCAACAACTGGAGTA,	RP: GCAGATCCAGGATGGCTACAA
GAPDH	FP:GAACGGGAAGCTTGTCATCAA,	RP: ATCGCCCCACTTGATTTTGG

3.2.4. Örneklerin Deparafinizasyonu ve Örneklerden RNA izolasyonu

Parafin bloktan örnek ayırma işlemi QIAGEN miRNeasy FFPE Kit Protokolü (Cat No: 217504) protokolüne göre gerçekleştirildi.

Örnekler 1.5-2.0 ml santrifüj tüplerine alındı. Örneğe 160 µl deparafinizasyon solüsyonu eklendi, iyice vortekslendi ve santrifüj edilerek örneğin tüpün tabanında toplanması sağlandı. Örnek üzerine 1 ml ksilen eklendi. Güçlü bir şekilde 10 sn. vortekslendi ve maksimum hızda 2 dk. santrifüj edildi. Süpernatanı pellete zarar vermeden tüpten uzaklaştırıldı. Pellete %96-100 etanolden 1 ml eklendi. Vorteks ile karıştırılıp ve maksimum hızda 2 dk. santrifüj edildi. Kullanılan etanol örnekte kalmış olabilecek ksileni uzaklaştırmak amacıyla kullanıldı.

Süpernatan pellete zarar vermeden tüpten uzaklaştırılıp, tüpteki tüm alkol uygun pipet ile alındı. Tüpün kapağı açık bırakılarak oda koşullarında tüm etanol uzaklaşana kadar inkübe edildi. Tüpe 150 µl PKD tamponundan eklendi, vorteks ile karıştırıldı. Ardından tüpe 10 µl

proteinaz K eklendi, pipetaj ile karıştırıldı. Tüp ısı bloğunda 56°C'de 15 dk, sonra 80°C'de 15 dk inkübe edildi.

İnkübasyon sonrası tüp buz üzerinde 3 dk bekletildi, 13.500 rpm'de (20.000 g) 15 dk santrifüj edildi. Süpernatanı, pellete zarar vermeden yeni bir santrifüj tüpüne alındı.

DNA Booster tampondan, toplam örnek hacminin 1/10 u kadar (yaklaşık olarak 16 µl), DNaz I solüsyonundan da 10 µl tüpe eklendi. DNase I fiziksel denaturasyona karşı çok hassas olduğundan karıştırma işlemi vorteks ile değil nazıkçe tüp alt üst edilerek yapılmalıdır. Tüp, kenarlarda kalan sıvının toplanması için kısaca santrifüj edildi.

Tüp oda sıcaklığında 15 dk inkübe edildi. Tüpe 320 µl Tampon RBC eklendi, vortekslendi. Tüpe 1120 µl %100 etanol eklenip, pipetaj ile iyice karıştırıldı; santrifüj edilmeden, hızlıca RNA'ları yoğunlaştırmak için uygulanan bir adıma geçildi.

MinElute spin kolonlara, tüpteki içerikten varsa çökelti ile beraber 700 µl, eklendi, ≥10.000 rpm'de (≥8000 g'de) 15 sn. santrifüj edildi. Süzüntü atılır. Tüp içerisindeki tüm materyal bitene kadar işlem tekrar edildi. Tampon RPE'den 500 µl kolona eklendi, ≥10.000 rpm'de (≥8000 g'de) 15 sn. santrifüj edilip, süzüntü atıldı.

Tampon RPE konsantredir, kullanmadan önce gerekli miktarda %100 etanol eklediğinizden emin olunmalıdır. Tampon RPE'den 500 µl kolona eklendi, ≥10.000 rpm'de (≥8000 g'de) 2 dk. santrifüj ederek membran yıkandı. Süzüntü ve toplama tüpü atıldı. Yeni bir 2 ml'lik santrifüj tüpü alarak (paket içerisinde bulunan), içerisine kolon yerleştirildi ve kapağı açık şekilde, maksimum hızda 5 dk santrifüj edildi. Sonrasında süzüntü ve toplama tüpü atıldı.

Kolon, 1.5 ml kit içerisinde bulunan santrifüj tüpüne alındı. Kolon membranının tam ortasına gelecek şekilde yaklaşık 20 µl RNaz içermeyen su membrana pipetlendi. Maksimum hızda 1 dk santrifüj ederek cDNA eldesi için kullanılacak RNA tüpe süzüldü.

3.2.5. cDNA Sentezi ve Preamplifikasyonu

Doku örneklerinden izole edilen RNA'ları "Fluidigm cDNA üretimi" protokolüne göre ters transkripsiyon (Reverse Transcription) yöntemi kullanılarak cDNA'ya çevirmek için Reverse Transcription Master Mix (P/N: 100-6298) kullanıldı. Temiz bir 96 kuyuluk Piko plate in kuyularına 1 er µl Fluidigm Reverse Transcription Master Mix pipetlendi. Bu kuyular üzerine 4 µl RNA örneklerinden pipetlendi. Plate yapışkan film ile iyice kaplandı. Plate karıştırıcıda 2.000 rpm de 3 dakika karıştırıldı. Vorteks üzerinde 2 sn. karıştırıldı, 4-5 sn. beklenip bir kez daha karıştırıldı. Plate santrifüjde 1 dakika 1.000 rpm de santrifüj edildi. Sonrasında örnekler aşağıdaki protokol ile thermal programa alındı.

PreAmp Thermal Program

5 dakika	25 °C
30 dakika	42 °C
5 dakika	85 °C
4 °C	∞

Thermal program sonunda plate plate karıştırıcıda 60 sn. santrifüj edildi. cDNA örnekleri -20 °C de saklanabilir. cDNA sentezlendikten sonra preamplifikasyon aşamasına geçildi. Bu basamakta Fluidigm PreAmp Kit (Fluidigm, 100-5580) protokolü uygulandı. Protokole göre araştırılmak istenen genlerin primerlerinin de bulunduğu 96 örnek için aşağıdaki karışım hazırlandı.

PreAmp Master Mix	115.00 µl
Primer Pool *	143.75 µl DNase,
RNase İçermeyen su	172.50 µl
TOTAL	431.25 µl

Platede bulunan cDNA örneklerinden 8 kanallı pipet ile 1.25 µl miktarında temiz bir 96 kuyuluk Piko plate'e aktarıldı.

Bir adet 8'li strip tüp (0.2 ml) yukarıda hazırlanan karışımdan strip tüpün her bir kuyusuna 52 şer µl pipetlendi.

Hacmi 3.75 µl ye ayarlanan 8 kanallı pipet yardımıyla, hazırlanan 8 li strip tüpden alarak cDNA ların üzerine pipetlendi. Plate yapışkan film ile iyice kaplandı ve karıştırıcıda 3.000 rpm de 3 dakika karıştırıldı. Sonrasında plate santrifüjde 1 dakika 1.000 rpm de santrifüj edildi.

Aşağıdaki protokolü üstten ısıtma özelliği olan thermal cyclerde çalıştırıldı.

PreAmp Thermal Program (14 Döngü)

2 dakika	95 °C
15 saniye	94 °C
4 dakika	60 °C
∞	4 °C .

Plate oda sıcaklığına getirilerek 60 saniye santrifüj edildi. Bu aşamadan sonra ekzonükleaz adımı ile çalışmaya devam edildi.

Ekzonükleaz reaksiyonu için öncelikle aşağıda belirtilen 96 örneğin karışımı hazırlandı.

Ekzonükleaz I Reaksiyon Tamponu	24.00 µl
Ekzonükleaz I	48.00 µl
DNaz, RNaz İçermeyen Su	168.00 µl
Toplam Hacim	240.00 µl

Bu karışım 8'li strip tüpün 8 kuyusuna 30 µl olarak transfer edildi. Buradan 8 kanallı pipet yardımı ile preamplifiye ürünlerinin üzerine 2 µl eklendi. Plate yapışkan film ile kaplanıp karıştırıcıda 3000 rpm'de 3 dakika karıştırılır. Plate vorteks ile 2 saniye karıştırıldıktan sonra, 1 dakika da santrifüj edildi. Plate thermal cycler cihazına konularak aşağıdaki protokolde çalıştırıldı.

30 dakika	37 °C
15 dakika	80 °C
∞	4 °C

Termal programın sonunda plate yüzeyi sıcak olabileceğinden oda sıcaklığında bekletildi. Plate santrifüjde 1 dakika santrifüj edildi, üzerindeki yapışkan film açılarak her bir kuyuya 18 µl DNA süspansiyon tamponu eklendi. Yeni bir yapışkan film ile kaplanan plate karıştırıcıda 3000 rpm'de 3 dakika, vorteks ile 2 saniye karıştırıldı. Vorteks ile karıştırma 2 kez daha her seferinde 4-5 saniye ara vererek tekrarlanır. Son olarak birkaç kez el ile alt üst edilerek karıştırıp, santrifüjde 1 dakika santrifüj edildi. Bu aşamaların sonunda örnekler çipe yüklemeye hazır hale getirilmiş olur.

3.2.6. Array Çipin Hazırlanması, Örneklerin ve Primerlerin Yüklenmesi

Dynamic Array çipe (Dynamic Array Cat.No: BMK-M-96.96) örnekler ve primerlerin doğru kuyucuklara gitmesini sağlayan kontrol sıvıları enjekte edildi ve ardından Dynamic Array IFC Controller cihazında 20 dakikalık PRIME programında yürütüldü. Bu işlemten sonra örnekler ve primerler çipe yüklenmek üzere hazırlandı.

Örneklerin Hazırlanması:

- 96 örnek için aşağıdaki karışım hazırlandı.

TaqMan GE Master Mix	360 µl
20x DNA Binding Dye Sample Loading Reagent	36 µl
EvaGreen Boyası	36 µl

DNA Süspansiyon Tamponu

108 µl

Toplam Hacim

540 µl

- Yeni bir piko plate kuyularına hazırlanan bu karışımdan 4.5 µl pipetlendi. cDNA örneklerinden 1.5 µl plate içerisinde bulunan karışımın üzerine eklendi. Plate, plate karıştırıcıda 3000 rpm’de 3 dakika karıştırıldı.

Primerlerin Hazırlanması:

- 10 µM’lık primerlerden 3 µl 96 kuyucuklu bir plate kuyucuklarının her birine pipetlendi Bu primerler üzerine 3er µl 2X Assay Loading Reagent eklendi.
- Plate yapışkan film ile kapatıldı. Plate karıştırıcıda manuel olarak 10 saniye vortekslendi. Bu işlem 3 kez her defasında 4-5 saniye ara verilerek tekrarlandı. Plate santrifüjde 2 dakika santrifüj edildi.

Örnekler ve primerler yüklemeye hazır hale getirildikten sonra, 16 kanallı mikropipet kullanılarak yükleme işlemi gerçekleştirildi. Örnekler ve primerlerden 4.25 µl Dynamic Array çip üzerinde kendilerine ait kuyucuklara pipetlendi. Dynamic Array çip IFC Controller cihazına yerleştirildikten sonra, RT-PCR öncesi son yürütme işlemi olan LOAD programı uygulandı.

3.2.7. RT-PCR Uygulaması

LOAD programı bittikten sonra Dynamic Array çip IFC Controller cihazından alındı. Çipin altında bulunan mavi film uzaklaştırıldıktan sonra çip yüzeyinin temiz olup olmadığı kontrol edildi. Dynamic Array çip BioMark HD Real Time Reader cihazına barkod kısmı dışarı bakacak şekilde yerleştirildi.

RT-PCR aşaması BioMark Data Collection yazılımı ile gerçekleştirildi. Program tamamlandıktan sonra elde edilen ct değerleri istatistiksel analizde kullanılmak üzere dosyalandı.

3.2.8. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler Free Trial IBM SPSS istatistik paket program kullanılarak yapıldı. Pfaffl [114] yöntemi ile $2^{\Delta ct}$ değerleri hesaplanan verilerin normal dağılımını kontrol etmek amacıyla Shapiro-Wilk normallik testiyle analiz edildi ve test sonucunda Kontrol 1 ve Kontrol 2 grupları normal dağılım gösterirken ($p>0.05$); Grade 1, Grade 2 ve Grade 3 gruplarının ise normal dağılım göstermediği tespit edildi ($p<0.05$). Çalışmamızda gruplar arasında gen ekspresyonları bakımından farklılıkları saptamak amacıyla nonparametrik yöntem olan Kruskal

Wallis çoklu karşılaştırma testi ve Kruskal Wallis Dunn's post hoc test kullanıldı. $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Çalışmamızda gen ekspresyon düzeylerini ölçtüğümüz FASN, SREBF1, SREBF2, PIK3CA, AKT1, MTORC1, PRKAA1, PRKAA2 ve PRKAB1 parametrelerinin gruplar içerisinde korelasyonunu belirlemek için grupların dağılımlarına uygun korelasyon analizleri yapıldı.



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. BULGULAR

Bu çalışmada hasta grubu (n=60); endometrioid adenokarsinom tanısı almış Grade 1 (n=20), Grade 2 (n=20), Grade 3 (n=20) dokularından, kontrol grupları ise (n=30); endometrial kanser tanısı almamış sekretuar faz (n=15) kontrol 1 grubu ve proliferatif faz (n=15) kontrol 2 grubu olarak sağlıklı kişilerin endometrium dokularından oluşturuldu. Gruplar belirlenirken yaş ortalamaları birbirine yakın olacak şekilde belirlendi. Hasta grubunun yaş ortalaması 62.67 ± 11.082 ve kontrol grubunun yaş ortalaması 42.90 ± 4.163 olarak saptandı. Grade 1, Grade 2 ve Grade 3 grupları arasında miyometrial invazyon, serozaya uzaklık, yaş ve lenf nodu tutulumu gibi prognostik faktörler karşılaştırılarak değerlendirildi (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Grade 1, Grade 2, Grade 3 prognostik faktörleri.

	Grade1(mean $\pm$ SEM) (n:20)		Grade2 (mean $\pm$ SEM) (n:20)		Grade3(mean $\pm$ SEM) (n:20)		p
Miyometrial Invazyon	0.435 $\pm$ 0.114		1.065 $\pm$ 0.149 ^a		1.01 $\pm$ 0.168 ^a		0,004*
Serozaya uzaklık	0.620 $\pm$ 0.125		0.797 $\pm$ 0.207		0.565 $\pm$ 0.131		0.814
Yaş	56.45 $\pm$ 10.99		65 $\pm$ 8.627 ^a		66.55 $\pm$ 11.128 ^a		0.013*
Lenf Nodu Tutulumu	Pozitif (n,%)	Negatif (n,%)	Pozitif (n,%)	Negatif (n,%)	Pozitif (n,%)	Negatif (n,%)	p
	4, %20	16, %80	1, %5	19, %95	2, %10	18, %90	

Sonuçlar ortalama $\pm$ SEM olarak ifade edilmiştir. SEM; standart hata oranı. a; Grade 1 grubu ile istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) farklılık göstermektedir.

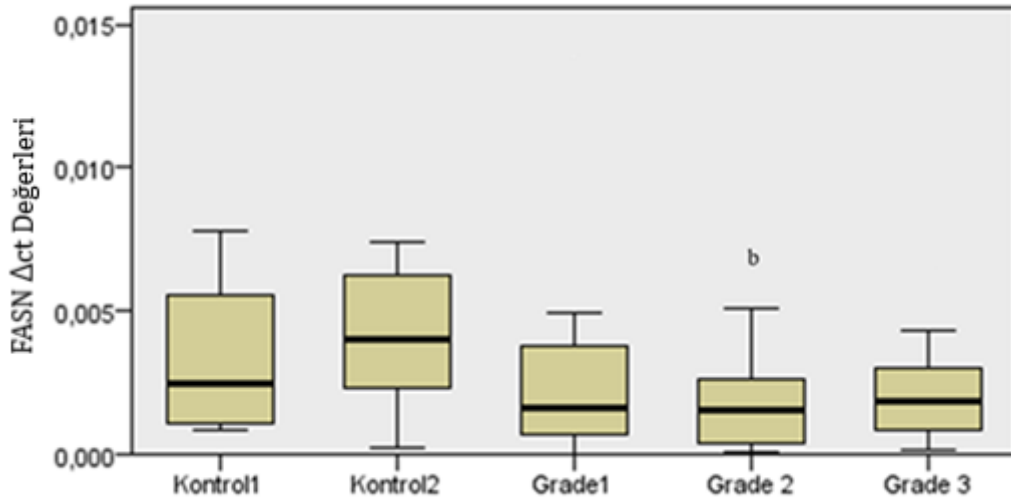
Grade 1, Grade 2 ve Grade 3 grupları miyometrial invazyon, serozaya uzaklık, yaş ve lenf nodu tutulumu bakımından karşılaştırıldı. Gruplar arasında miyometrial invazyon bakımından anlamlı farklılık tespit edildi ($p = 0.004$). Miyometrial invazyonun Grade 1 ile Grade 2 arasında ($p = 0.005$) ve Grade 1 ile Grade 3 arasında ($p = 0.028$) anlamlı farklılık gösterdiği tespit edildi. Başka bir prognostik faktör olan yaş bakımından Grade 1, 2 ve 3 arasında anlamlı fark belirlendi ($p = 0.013$). Yaş bakımından Grade 1 ile Grade 2 arasında ($p = 0.047$) ve Grade 1 ile Grade 3 arasında ($p = 0.022$) anlamlı farklılık belirlendi. Lenf nodu tutulumu ve serozaya uzaklık bakımından gruplar arasında anlamlı bir fark tespit edilmedi.

Bu çalışmada lipid metabolizma yollarında işlevi olan FASN, SREBF1 ve SREBF2 bu enzim ve molekülleri etkileyen AMPK/Akt/mTOR yolağı üyelerinden PIK3CA, AKT1, mTORC1, PRKAA1, PRKAA2 ve PRKAB1 gen ekspresyon düzeyleri belirlendi.

4.1.1. Lipogenez Belirteçlerine Ait Bulgular

4.1.1.1. FASN Ekspresyon Düzeyleri

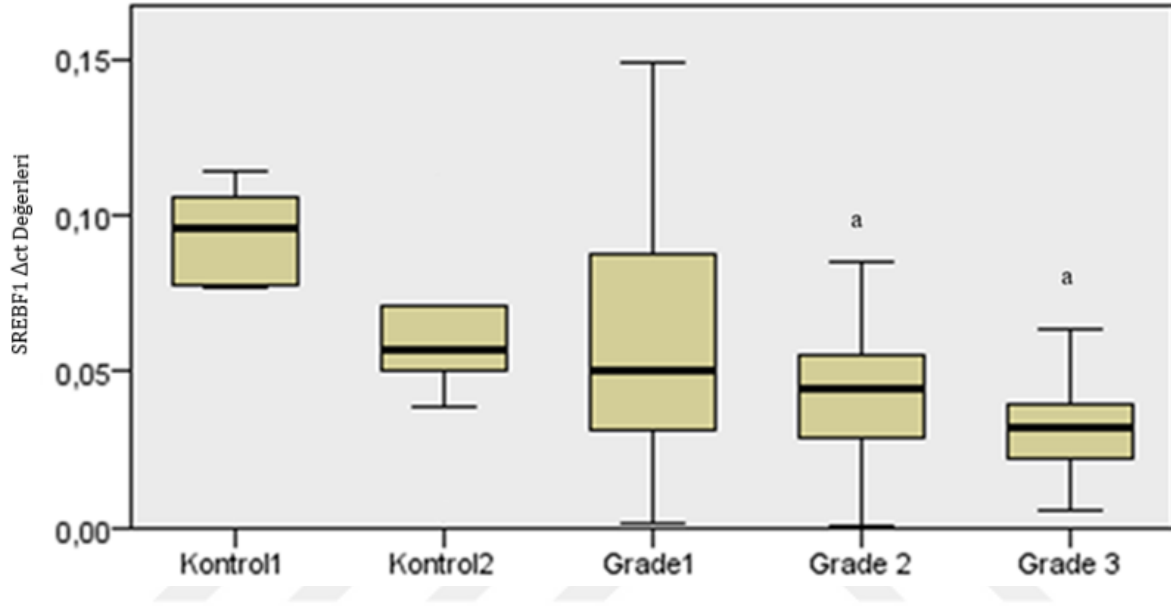
Lipitlerin *de nova* sentezinde kontrol enzimlerinden biri olan FASN ekspresyon düzeyleri gruplar arasında karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı farklılık tespit edildi ($p=0.034$). FASN ekspresyonunun hasta gruplarında Kontrol gruplarına göre azalma olduğu belirlendi. Gruplar karşılaştırıldığında ise Grade 2 grubunda Kontrol 2 grubuna göre anlamlı fark belirlendi ($p=0.028$) (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. FASN Δct değerleri. Sonuçlar ortalama $\pm$ SEM olarak ifade edilmiştir. b; Kontrol 2 grubu ile istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) farklılık göstermektedir.

4.1.1.2. SREBF1 Ekspresyon Düzeyleri

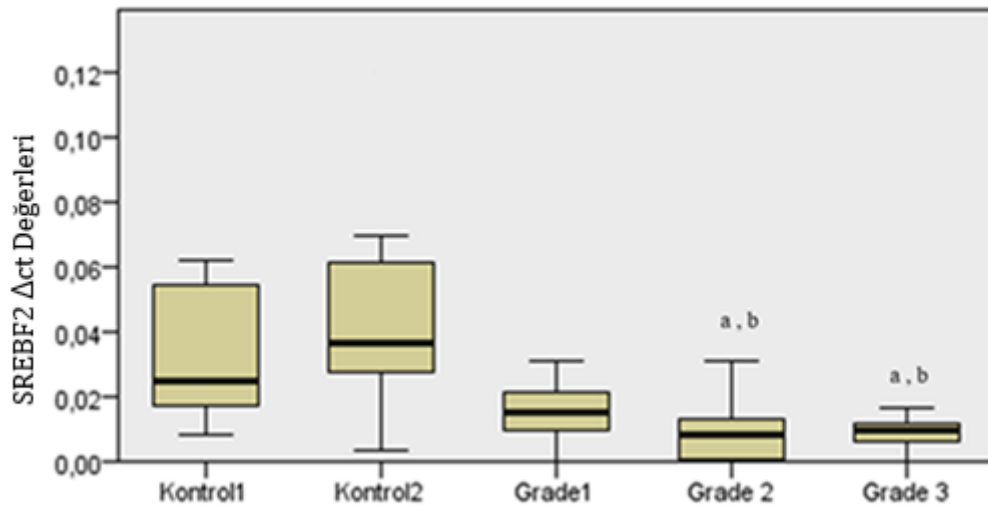
Yağ asiti sentezini uyaran SREBF1 gen ekspresyonunda gruplar arasında anlamlı farklılık belirlendi ($p=0.0001$), genel ortalamalar değerlendirildiğinde hasta grubunda SREBF1 ekspresyon düzeylerinde azalma gözlenmiştir. Hasta ve kontrol grupları karşılaştırıldığında ise Grade 2 ile Kontrol 1 arasında ($p=0.012$) ve Grade 3 ile kontrol 1 arasında ($p=0.0001$) anlamlı fark tespit edildi (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. SREBF1 Δ ct değerleri. Sonuçlar ortalama $\pm$ SEM olarak ifade edilmiştir. a; kontrol 1 grubu ile istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) farklılık göstermektedir.

4.1.1.3. SREBF2 Ekspresyon Düzeyleri

Kolesterol metabolizması uyaranlarından SREBF2 gen ekspresyonu değerlendirildiğinde gruplar arasında anlamlı farklılık belirlendi ($p=0.0001$). Hasta grubunda kontrol grubuna göre SREBF2 ekspresyon düzeylerinde azalma gözlemlendi. Kontrol ve hasta grupları arasında ise Grade 2 ile Kontrol 1 ($p=0.002$) ve Kontrol 2 ($p=0.0001$) arasında; benzer şekilde Grade 3 ile Kontrol 1 ($p=0.003$) ve Kontrol 2 ($p=0.0001$) arasında anlamlılık belirlendi (Şekil 4.3).

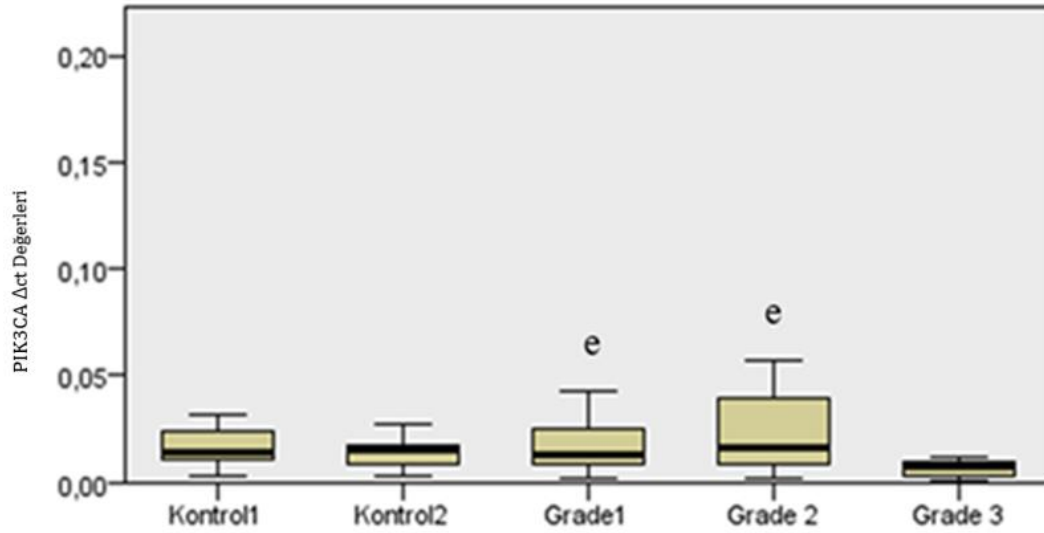


Şekil 4.3. SREBF2 Δct değerleri. Sonuçlar ortalama $\pm$ SEM olarak ifade edilmiştir. a; Kontrol 1 grubu ile istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) farklılık göstermektedir. b; Kontrol 2 grubu ile istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) farklılık göstermektedir.

4.1.2. AMPK/Akt/mTOR Sinyal İleti Yolağına Ait Bulgular

4.1.2.1. PIK3CA Ekspresyon Düzeyleri

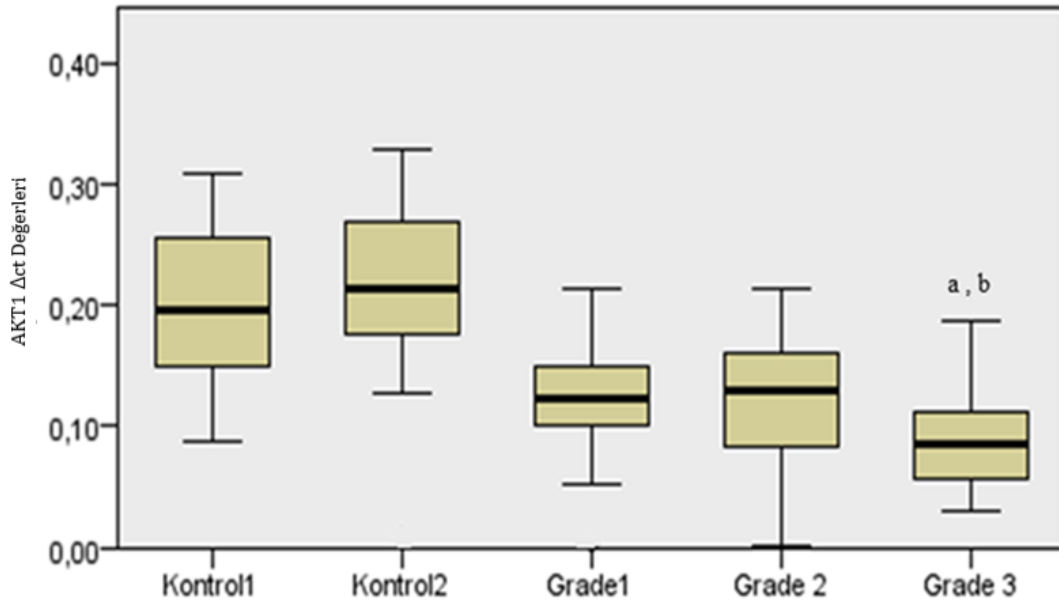
PIK3CA gen ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark tespit edildi ($p=0.002$). İstatistiksel olarak anlamlı olmasa da hasta gruplarından Grade 1 ve Grade 2'nin Kontrol gruplarına göre ekspresyon düzeylerinin yüksek olduğu; Grade 3 grubunun ise Grade 1 ($p=0.014$) ve Grade 2 ($p=0.003$) gruplarına göre anlamlı azalış gösterdiği belirlendi. Bu sonuç kanserin başlangıç evrelerinde beklendiği gibi PI3K'nın arttığı, tümör ilerledikçe ise azaldığını şeklinde değerlendirilebilir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. PIK3CA Δ ct değerleri. Sonuçlar ortalama $\pm$ SEM olarak ifade edilmiştir. e; Grade 3 grubu ile istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) farklılık göstermektedir.

4.1.2.2. Akt Ekspresyon Düzeyleri

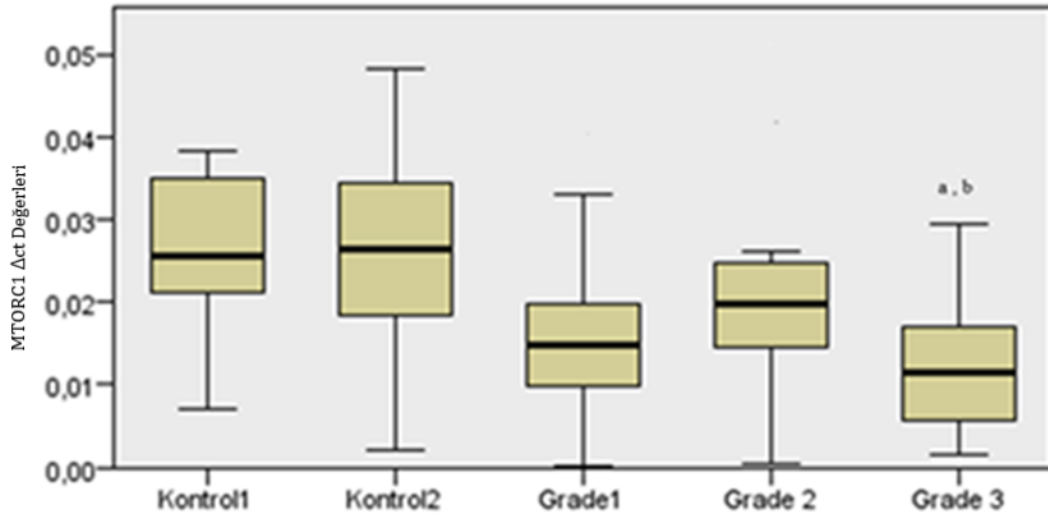
PI3K/Akt/mTOR yolağın üyelerinden AKT ekspresyon düzeyi değerlendirildiğinde ise gruplar arasında anlamlı bir fark tespit edildi ($p=0.0001$). Her ne kadar istatistiksel olarak anlamlı olmasa da hasta gruplarının AKT1 ekspresyon düzeylerinin kontrol gruplarına göre azaldığı belirlendi. Grade 3 ile Kontrol 1 grubu ($p=0.002$) ve Kontrol 2 grubu arasında ($p=0.001$) anlamlı farklılık tespit edildi (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. AKT1 Δ ct değerleri. Sonuçlar ortalama $\pm$ SEM olarak ifade edilmiştir. a; Kontrol 1 grubu ile istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) farklılık göstermektedir. b; Kontrol 2 grubu ile istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) farklılık göstermektedir.

4.1.2.3. mTOR Ekspresyon Düzeyleri

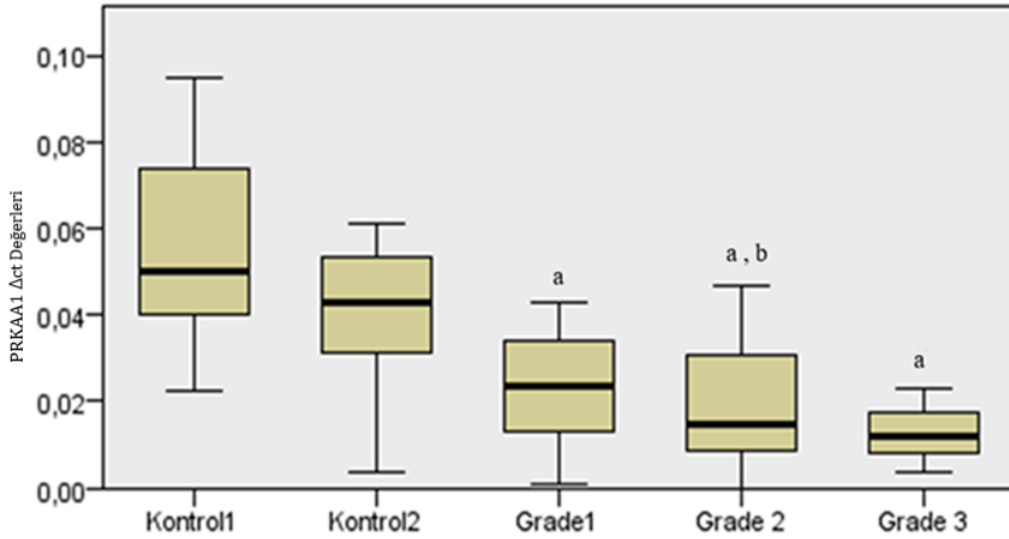
Sinyal yolağının devamı olarak MTORC1 kompleksinin gen ekspresyonunda gruplar arasında anlamlı farklılık bulundu ($p=0.001$). İstatistiksel bakımdan anlamlı olmasa da hasta gruplarında kontrol gruplarına göre MTORC1 ekspresyon düzeylerinde azalma belirlendi. Hasta gruplarından Grade 3 ise Kontrol 1 ($p=0.005$) ve Kontrol 2 ($p=0.015$) gruplarına göre anlamlı farklılık gösterdi (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. mTORC1 Δ ct değerleri. Sonuçlar ortalama $\pm$ SEM olarak ifade edilmiştir. a; Kontrol 1 grubu ile istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) farklılık göstermektedir. b; Kontrol 2 grubu ile istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) farklılık göstermektedir.

4.1.2.4. PRKAA1 Ekspresyon Düzeyleri

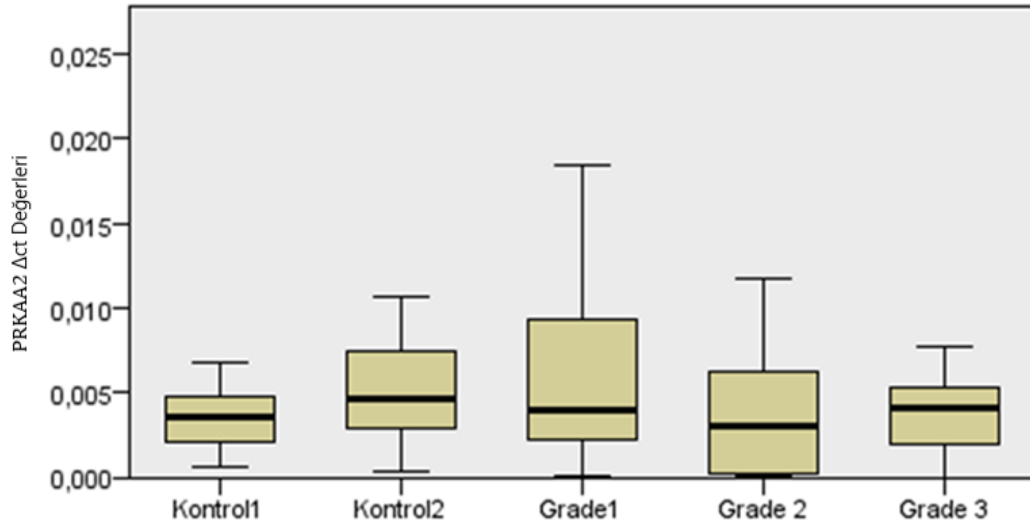
PRKAA1 ekspresyon düzeylerinde; Grade 1’de Kontrol 1’e göre ($p=0.022$); Grade 2’de Kontrol 1 ve Kontrol 2’ye göre ($p=0.003$) ve Grade 3’de Kontrol 1’e göre ($p=0.0001$) anlamlı azalma gözlenmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. PRKAA1 Δct değerleri. Sonuçlar ortalama $\pm$ SEM olarak ifade edilmiştir. a; Kontrol 1 grubu ile istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) farklılık göstermektedir. b; Kontrol 2 grubu ile istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) farklılık göstermektedir.

4.1.2.5. PRKAA2 Ekspresyon Düzeyleri

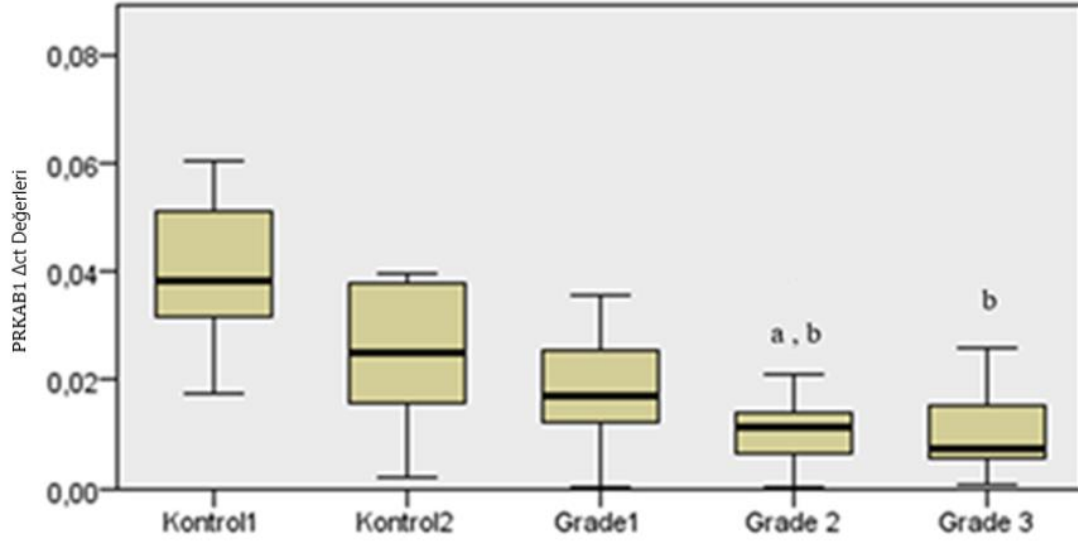
Enerji metabolizması sensörü ve düzenleyicisi olarak bilinen AMPK'nın alfa ve beta alt üniteleri AMPK aktivasyonunu sağlar. Bu çalışmada hasta ve kontrol gruplarında AMPK alfa 1 (PRKAA1), alfa 2 (PRKAA2) ve beta (PRKAB1) alt ünitelerinin ekspresyon düzeyleri analiz edildi. Elde edilen sonuçlarda PRKAA2 bakımından gruplar arasında anlamlı farklılık belirlenmedi (Şekil 4.8) ($p=0.603$).



Şekil 4.8. PRKAA2 Δ ct değerleri. Sonuçlar ortalama $\pm$ SEM olarak ifade edilmiştir.

4.1.2.6. PRKAB1 Ekspresyon Düzeyleri

AMPK alt üniteleri arasında köprü görevi gören PRKAB1 genini ekspresyon düzeylerinde Grade 2' de Kontrol 1 ve Kontrol 2' ye göre ($p=0.001$), Grade 3'de ise Kontrol 2' ye göre anlamlı azalma ($p=0.034$) belirlendi (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. PRKAB1 Δct değerleri. Sonuçlar ortalama $\pm$ SEM olarak ifade edilmiştir. a; Kontrol 1 grubu ile istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) farklılık göstermektedir. b; Kontrol 2 grubu ile istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) farklılık göstermektedir.

4.2. TARTIŞMA

Endometrial kanser kadın üreme sisteminin en sık görülen malignitesidir. Dünyada her yıl yaklaşık 320.000 yeni vaka teşhis edilmekte ve her yıl 76.000 hasta endometrial kanser nedeni ile ölmektedir [14, 115]. Geleneksel olarak endometrial kanser farklı klinik, patolojik, histolojik ve moleküler davranışa sahip olup Tip 1 ve Tip 2 olmak üzere iki alt gruba ayrılmıştır [30, 116].

Tip 1 endometrial kanser endometrioid morfolojili düşük dereceli, östrojen bağımlı, hormon reseptör pozitif adenokarsinomlardır ve genellikle endometrioid endometrial kanserler olarak adlandırılır. Endometrioid endometrial kanserler bütün endometrial kanserlerin % 85'ini oluşturmaktadır. Ayrıca, çoğunlukla erken bir aşamada teşhis edilirler ve genellikle iyi bir prognozla karakterize edilirler [14, 117].

Tip 1 endometrial kanserlerde yaygın olarak mutasyona uğramış genler arasında PIK3CA, KRAS proto-onkogen, GTPaz, fibroblast büyüme faktörü reseptörü 2 (FGFR2) ve Catenin beta 1 (CTNNB1) bulunur [118]. En sık değiştirilen tümör baskılayıcı gen olan PTEN olup tüm vakaların yaklaşık %50' sinde, en yaygın değiştirilmiş onkogen ise KRAS olup vakaların %25' inde değişmiştir [119].

Tip 1 endometrial kanserlerde en sık değişen moleküler yolak PI3K / PTEN / AKT yolu olduğu gösterilmiştir [120]. PI3K / PTEN / AKT yolagında PIK3CA mutasyonları en çok ekson 9 ve ekson 20'de oluşur [121, 122]. Endometrial kanserlerde PIK3CA mutasyon tipi histolojik Grade derecesine göre farklılık göstermektedir; yüksek Grade endometrial kanserlerde mutasyonlarının %67'si ekson 20'de oluşurken, düşük Grade de ise bu oran %33'dür [122, 123].

Tip 2 endometrial kanserlerde ekson 20 mutasyonları %21 oranındayken, ekson 9 mutasyonu raporlanmamıştır [123]. PIK3CA' yı bulunduran kromozomal bölgenin çoğalması, Tip 1' in % 2-14'ünde ve Tip 2 endometrial kanserlerin % 46' sında bildirilmiştir [124, 125].

Tip 2 endometrial kanserler endometrioid olmayan histoloji ile karakterizedir ve karsinosarkomlar, seröz ve berrak hücreli karsinomlar ve farklı histolojik ve moleküler özelliklere sahip tüm tümörleri içerir [117]. Tip 2 endometrial kanserler genellikle yüksek derecelidir, hormon reseptörü negatiftir ve hayatta kalma oranları iyi değildir [14]. Tip 2 endometrial kanserde en çok karşılaşılan değişimler ise, hücre siklusu düzensizliğine ve genetik istikrarsızlığa neden olan tümör supresör p53 ve p16' nın birinde ya da her ikisinde oluşan mutasyonlardır [33].

Tümör baskılayıcı gen olan PTEN, Akt bağımlı yol vasıtasıyla hücre bölünmesini baskılamak ve apoptozu etkinleştirmek için etki eden kromozom 10 (10q23) üzerinde bulunan çift

özgüllüklü bir fosfatazdır [126]. Tümör baskılayıcı gen olan PTEN' deki mutasyonlardan dolayı endometrial karsinomlarda PI3K/Akt yolu sıklıkla aktive olur [127]. PTEN, PI3K/Akt yolunu fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfatın defosforilasyonu yoluyla antagonize eder ve Akt'nin hücrel membranlara translokasyonunun azalmasına ve daha sonra Akt fosforilasyonunun ve aktivasyonunun aşağı regülasyonuna yol açar [128].

PI3K-Akt-mTORC1 yolağı kanser hücrelerinin çoğalmasını, büyümesini ve hayatta kalmasını uyarır. Aynı zamanda anabolik ve katabolik süreçleri kontrol eder ve neoplastik hücrelerin bir özelliği olan aerobik glikolizi (Warburg etkisi) ve lipid biyosentezini destekler [129].

Her PI3K enzimi, bir düzenleyici alt birim p85 ve bir katalitik alt birim p110'dan oluşur. P110'un üç izoformu vardır: alfa, beta ve sigma. PIK3CA geni, PI3K katalitik alt ünite p110 alfa' yı kodlar ve PIK3CA' nın aktive edici mutasyonları birçok kanserde sıklıkla belirlenmiştir. PIK3CA'nın aktive edici mutasyonları, yüksek oranda protein aktiviteleriyle sonuçlanan yüksek aktif PI3K formunu ürettiği tespit edilmiştir. PIK3CA'nın aktive edici mutasyonları epitel hücrelerinin ve kanserin büyümesi ile ilişkilendirilmiştir [130].

Bu çalışma sonucunda gruplar arasında PIK3CA gen ekspresyon düzeyleri bakımından gruplar karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir fark tespit edildi ($p=0.002$). İstatistiksel olarak anlamlı olmasa da hasta gruplarından Grade 1 ve Grade 2' nin kontrol gruplarına göre ekspresyon düzeylerinin yüksek olduğu; Grade 3 grubunun ise Grade 1 ($p=0.014$) ve Grade 2 ($p=0.003$) gruplarına göre anlamlı azalış gösterdiği belirlendi. Bu da PIK3CA'nın tümörün başlangıç evrelerinde farklı faktörlerin etkisiyle aktifken tümörün ilerleyen aşamalarında aynı aktivasyonu göstermediği şeklinde yorumlanabilir.

PIK3CA aktive edici mutasyonlar endometrial kanserde de pekçok çalışma ile araştırılmıştır. Bu çalışmalardan Velosco ve arkadaşları endometrial kanser örneklerinin %24'ünde PIK3CA mutasyonları saptamıştır [128]. Konopka ve arkadaşları ise 196 endometrial karsinom örneğinde %20 mutasyon, %12.2 amplifikasyon tespit etmiştir [131]. PTEN ve PIK3CA gen mutasyonları araştıran Oda ve arkadaşları 66 endometrial kanser hastasının %36' sında PIK3CA mutasyonu ve %26' sında hem PTEN hem de PIK3CA mutasyonu belirlemiştir [121]. Meme kanseri ve kolon kanserinde PIK3CA mutasyonu sağkalım oranını düşündürmektedir [130], ancak endometrial kanserde, sadece PIK3CA mutasyonunun sağkalım oranını etkilemediği, TP53 mutasyonu olan hastalarda sağkalım oranını azalttığı bulunmuştur. PIK3CA' nın aktive edici mutasyonu ve PTEN eksikliği, sinerjistik etkiye sahiptir [128]. Çalışmalarda PTEN eksikliği olan; Ras veya PIK3CA mutasyona uğramış hücrelerde pAkt artması ile iki mutasyonun sinerjik etkisi açıklanmıştır [121].

PIK3CA mutasyonlarının ilk tanımlandığı çalışmada, PIK3CA mutasyonlarının meydana geldiği evreyi belirlemek için 76 premalign kolorektal tümörde incelenmiştir. Çalışmada belirlenen iki mutasyonun her ikisinde ileri adenomda tanımlanmış; bu, PIK3CA mutasyonlarının, invazyondan hemen önce veya eşzamanlı olarak tümörigenezde geç evrede meydana geldiğini ortaya koymuştur [132]. Daha sonraları meme kanseri ile ilgili yapılan çalışmalar, sadece metastatik lezyonlarda değil aynı zamanda primer olanlarda da PIK3CA mutasyonlarının varlığını bildirmiştir [133, 134].

Farklı çalışmalar, PIK3CA deregülasyonunun tümör evriminde erken bir olay olduğunu belirtmiştir. Mutasyon veya amplifikasyonla bu PIK3CA deregülasyonu, kolorektal adenokarsinomlarda ve akciğer skuamöz hücreli karsinomlarında tam genom iki katına çıkmadan önce meydana geldiği belirtilmiştir [132, 134].

Kanser sürücü genlerinden oluşan bir panel üzerinde 453 örnek ile yapılan bir başka çalışma, PIK3CA'daki mutasyonların subklondan iki kez daha fazla klonal olduğunu bulmuştur. Bu nedenle, primer lezyonlarda PIK3CA mutasyonlarının varlığı kansere bağlı olabileceği bildirilmiştir [132]. Tersine, McGranahan ve arkadaşları tarafından, TCGA veri setini, kanserin intratumor heterojenitesini (ITH) yansıtan klonal ve subklonal sürücülerini tanımlamak için dokuz farklı kanser tipinde 2694 tümörün bir pan-kanser analizi yapmak için kullanılmış, PIK3CA'da subklonal mutasyonlar bulunmuştur. Bu çalışmada, hangi mutasyonların erken klonal olduğunu ve hangi mutasyonların daha sonra subklonal olduğunu ortaya çıkarmanın tıptaki zorluklardan biri olduğunu vurgulanmıştır [135]. Yapılan çalışmalar mutasyonun mevcut olup olmadığını bulmaktan çok tümör hücrelerinin hangi oranda mutasyona, klonal subklonal mutasyonlar, sahip olduğunu belirlemenin terapötik yanıtta daha verimli sonuçlar ortaya koyacağını göstermiştir [132].

Birçok inceleme ve çalışma, non-p110 α izoformlarında mutasyon olmadığını ve diğer p110 izoformlarında mutasyon raporlarının çok sınırlı olduğunu not etmiştir. Bununla birlikte, bazı çalışmalarda, p110 β kodlayan gen olan PIK3CB' deki kanser mutasyonları tanımlanmıştır. Bu çalışmalarda, PIK3CB mutasyonlarının aktif ve onkogenik olduğu gösterilmiştir [136, 137]. Ayrıca, p110 δ kodlayan gen olan PIK3CD' deki heterozigot fonksiyon kazancı mutasyonları, Aktif fosfoinositid 3-kinaz δ sendromunda ve yaşlanan T hücrelerinde, lenfadenopati ve immün yetmezlik hastalığında tanımlanmıştır [132]. p110 α' yı kodlayan genin kanserde neden bu kadar seçici mutasyon geçirdiği bilinmemektedir. PTEN, PIK3CA, PIK3R1 ve diğer bazı yukarı akış alıcı reseptör tirozin kinazlar da dahil olmak üzere PI3K sinyaline yönelik fazla miktarda mutasyon, bu yolu, kanserdeki en sık rastlanan deregüle yollardan biri yapar [130].

Somatik mutasyonların tanımlanmasına ek olarak, PIK3CA birçok kanserde amplifiye olmuştur. PIK3CA, akciğer kanserlerinin %33-42' sinde, yumurtalık kanserlerinin %15-27' sinde, nöroendokrin prostat kanserlerinin %21-27' sinde, özofagus kanserlerinin %14-19'unda, servikal kanserlerin %10-17' sinde ve baş-ve boyun kanserlerinin %2-16'sında amplifiyedir [138, 139].

Evrimsel olarak korunmuş serin / treonin kinaz Akt, aynı zamanda PKB olarak da bilinir, kanserde en sık aktive olan protein kinazlarından biridir. Akt' ın hiperaktivasyonu apoptoz direnci, artan hücre büyümesi, hücre proliferasyonu ve hücrel enerji metabolizması ile ilişkilidir [140].

Büyüme faktörü reseptörleri, yoluyla PI3K' nın katalitik p110 alt birimini aktive etmesi ya p85 düzenleyici alt birimin aktivasyonu veya doğrudan p110' u aktif hale getirebilen Ras aktivasyonu ile gerçekleşir. Sonrasında P110 inozitol halkasının D3 pozisyonunda PIP3 oluşturmak için fosfotidil inozitolu fosforiller. Akt'ın aktive olması PIP3'ün Akt'ın PH domainine bağlanması ve Akt'ın plazma membranına translokasyonu ile başlar. Akt sonrasında PDK1 ile katalitik domainde Thr308 residüsünde ve PDK2 ile de Ser473 residüsünde fosforillenir. İki residüde de fosforillenmek Akt' ın full aktivasyonunu sağlar [141]. Bunların aksine PI3K'nın antagonize edici aktivitesi, Akt aktivitesini negatif olarak düzenler. Gerçekten de, Akt aktivitesi, PI3K' nın PIP3' ü aktive ederek PI3K' nın aktivitesini antagonize eden bir fosfolipit fosfataz olan tümör baskılayıcı PTEN ile negatif olarak düzenlenir [140].

PI3K-Akt yolunun lipogenezle bağlantısını belirlemek amacıyla yapılan hücre kültürü çalışmaları in vitro olarak desteklenmektedir [142]. Farelerde, karaciğerde yapısal olarak aktive edilmiş bir Akt formunun aşırı ekspresyonu, hepatik trigliserit birikimine neden olur [143]. Karaciğerde ifade edilen ana Akt izoformu olan dokuya özgü Akt2 kaybı, PTEN eksikliği veya obezite ya da sistemik insülin direnci ile indüklenen hepatik lipid birikimini azaltır [144, 145].

Bu çalışmamızda PI3K/Akt/mTOR yolağın üyelerinden AKT ekspresyon düzeyi değerlendirildiğinde gruplar arasında anlamlı bir fark tespit edildi. Grade 3 ile Kontrol 1 grubu ve Kontrol 2 grubu arasında anlamlı farklılık tespit edildi.

Sinyal yolağının devamı olarak MTORC1 kompleksinin gen ekspresyonunda gruplar arasında anlamlı farklılık bulundu ($p=0.001$). Hasta gruplarından Grade 3 ise Kontrol 1 ($p=0.005$) ve Kontrol 2 ($p=0.015$) gruplarına göre anlamlı farklılık gösterdi

Kanserle aktive olan PI3K ve aşağı hedeflerinden Akt ve mTOR moleküllerinde sürece paralel olarak artış beklensede, son yıllarda yapılan çalışmalardan farklı yönde sonuçlar da elde edilmektedir. Holst ve arkadaşlarının endometrial kanserli hastalarda yaptığı çalışmada farklı

yöntemlerle PIK3CA mutasyonları (ekson 9 ve 20), gen ekspresyonu, PIK3CA amplifikasyonunun aynı hastalardan ilgili klinik, histolojik ve moleküler verilerle ilişkisini analiz edildiği ve çalışmada PIK3CA amplifikasyonunun PI3K yolu aktivasyonunun bazı özellikleri ile ilişkili olduğunu, ancak Akt ve mTOR aktivitesinin belirleyicileri ile ilişkili olmadığı belirtilmiştir [146].

Aynı şekilde yaptığımız bu çalışmada hasta grupları içerisinde korelasyon katsayılarına araştırıldığında PIK3CA'nın Akt ve mTOR ile ilişkili olmadığı; Akt ve mTOR'un birbiriyle %94 pozitif yönlü ilişkili olduğu saptandı. Korelasyon sonuçları değerlendirildiğinde PI3K/Akt/mTOR yolağının endometrial kanser büyümesini teşvik etmek için baskın bir yol olmadığını düşündürmektedir.

AKT1 ve MTORC1 belirteçlerinin Kontrol gruplarına göre Grade 3'de azaldığı belirlendi, buna dayanarak hastalığın ilerleyen evrelerinde Akt/mTOR yolağının baskılandığı belirtilebilir.

PI3K'nın sinyal iletilde bir sonraki basamaktaki Akt'dan bağımsız sinyalleşmede rolünü anlamının önemli olması ile ilişkili yapılan çalışmada, Akt'ın her zaman kanserde PIP3 seviyelerini yükselten PIK3CA ve PTEN gibi PI3K yolağı bileşenlerinde mutasyonlar bağlamında hiperaktivize edilmediği; pek çok kritik hücrel süreç, kötü huylu fenotipleri teşvik etmek için PI3K'ya bağımlı fakat Akt'den bağımsız sinyallerle yönlendirildiği; PI3K yolu inhibitörlerine direnç mekanizmaları, Akt sinyalinin yerine geçebilen PI3K'ya bağımlı sinyal proteinlerinin aktivasyonunu içerebileceğini açıklamaktadır [147].

Lin ve arkadaşlarının ATP yarışmalı inhibitörler modellemesi, hücrelerde Akt'ın paradoksal hiperfosforilasyonunu indüklerken, ADP analoglarının bunu yapamamasına dayanmaktadır. ATP ve ATP analoglarının T308 ve S473'ü hem in vitro hem de hücrelerde fosforilasyondan koruduğu sonucuna varmışlardır. Kataliz üzerine aktif bölgede ADP - ATP değişiminin, ADP'ye bağlı Akt'ı hücrel fosfatazlar için daha iyi bir substrat haline getirerek "fosfataz koruma kafesi" mekanizmasına müdahale ederek Akt inaktivasyonunu desteklediğini öne sürülmüştür [148]. Bu model ile, kısa bir süre önce tek bir substrat fosforilasyonunun zorlanmasının ardından Akt'ın etkisiz hale geldiğini ortaya koyulmuştur. Hem doğal tipte hem de kinaz-inaktif Akt mutantının, PI3K inhibisyonunda benzer defosforilasyon oranları gösterilmiştir. Bu basit sonuç, Akt katalitik döngüsünde ATP-ADP değiş tokuşunun Akt fosforilasyon oranı üzerinde bir etkisi olmadığını göstermiştir. Aksine, membran ayrışmasının hücrelerde Akt inaktivasyonunu tetikleyen baskın mekanizma olduğu öne sürülmüştür [149].

Normal hücrelerde, RTK aktivasyonu, PI3K'nın aktivasyonuna yol açmaktadır. Daha sonra PI3K, plazma zarına translokasyonunu ve PDK1 ve mTOR-Rictor ile fosforilasyonunu indükleyerek Akt'nin aktivasyonu gerçekleştirir. Yapılan çalışmalar, mTOR-Rictor'un, Akt'ın C-terminal hidrofobik motifinde serin residüsünü fosforile eden ve bu nedenle Akt aktivitesi için

gerekli olan PDK2 aktivitesine sahip olduğunu belirtmektedir [150]. Aktivasyon üzerine Akt, aktif mTOR-Raptor kompleksini uyarmaktadır. mTOR-Raptor aktif kompleksi, mTOR-Rictor aktif kompleksini inhibe ederek Akt' yi inhibe etmektedir. Bu geçici bir inhibisyonudur, çünkü Akt'nin inhibisyonu sonunda mTOR-Raptoru inhibe etmektedir [140]. Akt / mTORC1 akışımının vivo hücre büyümesinin temel bir düzenleyicisi olduğuna dair kanıtlar bulunmaktadır. Akt1 / Akt2 çift devre dışı bırakılmış farelerde, ciddi büyüme eksikliği gözlenmektedir [151]. mTORC1' in epitelyal hücrelerde lipogenez düzenlenmesinde etkisi çalışmalarda gösterilmiştir. mTOR' un susturulması, Akt-bağımlı glikoz, piruvat veya asetatın hücresel lipitlere dahil edilmesini ortadan kaldırmak için yeterli bulunmuştur. Bu etki en çok ACC ve FASN aktivitesi için gerekli olan asetatın yollara katılımı için önemli olduğu bildirilmiştir [152].

PI3K/Akt/mTOR yolağında Akt iki tümör baskılayıcı olduğu bildirilmiştir. Bunlar Akt' ın yukarı akışında fren görevi yapan PTEN ve Akt'ın aşağı, mTOR' un ise yukarı akışında fren görevi yapan TSC1/TSC2 heterodimeridir. TSC1 / TSC2 freninin yokluğunda, mTOR aktivitesi, Akt' yi inhibe edici bir geri bildirim mekanizması ile inhibe etmek için serbest bırakmaktadır [140].

Yapılan tüm çalışmalar değerlendirildiğinde PI3K/Akt/mTOR yolağının kanser gelişiminde önemli olduğunu fakat her doku tipinde ya da her kanser sürecinde aynı aktivasyonu göstermediği gözlenmektedir. Ayrıca yolak üyelerinin birbirinden bağımsız olarak da aktive veya inaktive olması bu üyelerinin kanser belirteci olarak değerlendirilmesi ile ilgili farklı çalışmalar yapılması gerektiğine yönlendirmektedir.

Uzun süredir yapılan çalışmalarda, Akt' ın anahtar lipogenik genlerden SREBP-1' i çoklu seviyelerde kontrol ettiği gösterilmiştir: Akt, SREBP-1' in endoplazmik retikulumdan salınımını teşvik eden ve işlenmesini kolaylaştıran Insig2a' nın, INSIG2' nin karaciğere özgü bir izoformu, ekspresyonunu azaltmaktadır [153-155]. Akt, SREBP-1' in COPII veziküller ile ilişkisini düzenlerken, endoplazmik retikulumdan golgiye taşınmasını desteklediği SREBP-1'i doğrudan fosforile edebilir. Ayrıca Akt, olgun SREBP-1' in GSK3 kaynaklı proteasomal bozunumunu bloke eder [142].

mTORC1, insülin ve besinler tarafından aktive edilir ve transkripsiyon faktörü SREBP-1' i aktive ederek de-novo lipogenezini teşvik eder. mTORC1, SREBP-1 ekspresyonunu, işlenmesini ve nükleer birikimini indükleyerek SREBP-1 aktivitesini teşvik eder. mTORC1'in SREBP-1 aktivitesini kontrol ettiği moleküler mekanizmalar tam olarak belirlenmemiştir, ancak bazı çalışmalar mTORC1 substratı S6K1' in rol oynayabileceğini göstermektedir. Akt ve mTORC1, SREBP-1 aktivasyonunda gerekli fakat ayrı basamakları kontrol eder ve bu sinyaller hepatik de-novo lipogenezin tam aktivasyonu için yeterince dengelenmelidir [142].

Son zamanlarda yayınlanan birçok çalışma, mTORC1'in SREBP-1 aktivitesini teşvik ettiği mekanizmalara ışık tutmaya başlamıştır. Porstmann ve arkadaşları mTORC1'in SREBP-1'i aktive

ederek lipogenezi düzenlediğini gösteren ilk kişidir [10]. Epitel hücreleri kullanarak, rapamisin, Akt kaynaklı SREBP-1 ekspresyonunu ve nükleer birikimini, birkaç lipogenik genin ekspresyonunu ve çeşitli lipit sınıflarının sentezini bloke ettiğini gözlemlemişlerdir. Raptor'un yıkılması, ancak Rictor'un yıkılmaması, SREBP-1 aktivasyonunun esas olarak mTORC1'e bağlı olduğunu fakat mTORC2' ye bağlı olmadığını gösteren benzer etkiler göstermiştir. İlginç bir şekilde, bu bulgular rapamisinin birkaç SREBP-1 hedef geninin in vitro ekspresyonunu azalttığını gösteren önceki gözlemleri doğrulanmıştır [156].

Başka bir çalışmada yine SREBP'nin aktivasyonunun ve Akt bağımlı lipit biyosentezi indüksiyonunun mTORC1'in aktivitesini gerektirdiği gösterilmiştir. Ayrıca SREBP'nin aktivasyonu, in vivo olarak memeli hücrelerinde ve *Drosophila melanogaster*'da Akt bağımlı hücre büyümesine katkıda bulunduğu gösterilmiştir [152].

Bu çalışmamızda yağ asiti sentezini uyaran SREBF1 gen ekspresyonunda hasta ve kontrol grupları karşılaştırıldığında Grade 2 ile Kontrol 1 arasında ve Grade 3 ile Kontrol 1 arasında anlamlı fark tespit edildi. Kolesterol metabolizması uyaranlarından SREBF2 gen ekspresyonu değerlendirildiğinde hasta grubunda kontrol grubuna göre SREBF2 ekspresyon düzeylerinde azalma gözlemlendi. Kontrol ve hasta grupları arasında ise Grade 2 ile Kontrol 1 ve Kontrol 2 arasında; benzer şekilde Grade 3 ile Kontrol 1 ve Kontrol 2 arasında anlamlılık belirlendi.

SREBF1 proteinin hastada downregüle olduğu belirlendi. SREBP aktivasyonunun mTORC1 aktivasyonu ile bağımlı olması ve çalışmada mTOR ve Akt düzeylerinin hasta gruplarında düşmesi bunlara uygun olarak SREBF1 ve SREBF2 düzeylerinin düşmesine neden olduğu düşünülmektedir.

Proliferatif fazda artmış SREBF1 ekspresyonu ve aktivasyonunun gözlemlenmesi, endometriyumdaki proliferatif hücrelerin *de novo* lipogenez gerektirdiği görüşü ile tutarlıdır. Ayrıca SREBF1 proteini, menopoz sonrası endometriyumun çoğunda ve endometriyal fazlardan bağımsız olarak stromal hücrelerde tespit edilememiştir[157]. Fazlarda korelasyon katsayılarına baktığımızda SREBF1' in proliferatif fazda mTOR ile %92 , FASN ile %86, SREBF2 ile %68 oranında pozitif yönlü ilişki gösterdiği gözlenirken SREBF2 ile diğer parametreler arasında anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir.

Yapılan çalışmalarda, SREBF1 ve SREBF2 ekspresyonunun inhibe edilmesinin, ER-stresi, reaktif oksijen türlerinin birikimini ve meme kanseri ve glioblastom hücrelerinde apoptozu indüklediği gösterilmiştir. SREBF1 ekspresyonunun downregüle edilmesi, hücre büyümesini, göçü ve istilayı inhibe eder ve yumurtalık kanseri hücrelerinde apoptozu uyarmaktadır [158]. Diğer bir çalışmada ise gösterilmiştir ki kolon kanseri hücrelerinde lipit biyosentezinin SREBF1 veya SREBF2 inhibe edilmesi anlamlı olarak invitro koşullarda hücre proliferasyonunu ve *invivo*

koşullarda ise tümörögenezi yağ asiti ve kolesterol seviyelerinin düşmesi ile inhibe etmiştir [159]

Glikolitik karbon aksını lipit biyosentezine yönlendirmek için gereken iki anahtar enzim ATP-sitrat liyaz (ACLY) ve FASN' dır. ACLY, sitozolik sitratı asetil-CoA ve oksaloasetata dönüştürür, böylece lipit biyosentezi için gerekli metaboliti sağlar. Akt ACLY' yi fosforile eder ve ACLY aktivitesi hücre büyümesi ve tümörögenez için gereklidir. FASN, uzun zincirli yağ asitleri üretmek için asetil-CoA ve malonil-CoA' nın yoğunlaşmasını katalize eder. FASN ekspresyonu Akt aktivasyonu ile indüklenir [152].

Normal meme bezlerinde laktasyonda FASN' nin uyarılmasının, progesteron üretiminin azalmasıyla kortizol, prolaktin ve insülinin uyarıcı etkilerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Progestinlerin normal alveoler meme eksplantlarında FASN' ın yanı sıra FASN aktivitesini de azalttığı görülmektedir [160, 161]. FASN ekspresyonu, proliferatif erken sekretuar faza kadar endometrial bezlerde ve stromal hücrelerde artar ve ortada geç salgı fazında hücre proliferasyonunun kesilmesinden sonra, endometrial dokuda FASN negatif olur [162, 163].

Bu çalışmada hasta grubunda Kontrol grubuna göre FASN ekspresyonunun azaldığı gözlemlendi. Gruplar karşılaştırıldığında ise Grade 2 grubunda Kontrol 2 grubuna göre anlamlı azalma belirlendi.

AMPK serin / treonin protein kinazdır ve "hücre içi enerji sensörü ve düzenleyici" olarak bilinir. AMPK aktivitesinin down regülasyonunun tümörögenez ile ilişkili olduğu kabul edilmiştir. Tümör oluşumunda AMPK aktivitesinin düşmesine, kendi kendini inhibe etme, transkripsiyon sonrası ve translasyon sonrası modifikasyon dahil olmak üzere birçok mekanizma katkıda bulunur[164] .

AMPK aktivitesi, çeşitli tümör dokularında komşu paratümör veya normal dokulardan daha düşüktür, ve ilerleyen tümör aşamalarıyla daha da azalır [165, 166]. Yumurtalık kanserinde, AMPK β 1 mRNA ve protein ekspresyonu ve ayrıca AMPK aktivitesinin, kanserin malign progresyonu ile yavaş yavaş azaldığı saptanmıştır [167] .

Çeşitli tümörlerde AMPK fosforilasyonu erken evre kanser dokularında (T1/T2) ileri evre kanser dokularına göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Gastrik kanserde ve akciğer kanserinde p-AMPK ekspresyonunun kanser progresyonu ile ilişkili olarak düştüğü gösterilmiştir. Kendi kendine inhibisyon, post-transkripsiyonel ve post-translasyonel modifikasyonlar gibi pekçok mekanizma tümörögenez boyunca AMPK aktivitesi düşüşüne katkıda bulunmaktadır [164]

Diğer protein kinazlar gibi AMPK da kendi kinaz aktivitesine yapısal elementleri ile uyum sağlar. Memeli AMPK $\alpha 1$ katalitik alt birimindeki 313-392 fragmanının neredeyse hiç aktivitesi olmadığını gösterilmiştir. Bununla birlikte, bu fragmanın delesyonu, AMPK katalitik aktivitesini, enzim ekspresyonu üzerinde herhangi bir ilave önemli etki olmadan 30 kat arttırdığı tespit edilmiştir. Bu nedenle, a katalitik alt ünite 313-392 domeni, bir AMPK a alt ünite inhibe edici bölgesi olarak bilinmektedir. Başka bir çalışma, 313-392 sekansının, substratların AMPK kinazın katalitik yarığına erişebilirliğini etkileyerek AMPK fonksiyonunu inhibe edebileceğini gösterilmiştir [168, 169].

Bu çalışmamızda PRKAA1 ekspresyon düzeylerinde; Grade 1’de Kontrol 1’e göre; Grade 2’de Kontrol 1 ve Kontrol 2’ye göre ve Grade 3’de Kontrol 1’e göre anlamlı azalma gözlenmiştir. AMPK alt üniteleri arasında köprü görevi gören PRKAB1 genini ekspresyon düzeylerinde ise Grade 2’ de Kontrol 1 ve Kontrol 2’ ye göre, Grade 3’de ise Kontrol 2’ ye göre anlamlı azalma belirlendi.

Bu sonuçlara göre AMPK ekspresyon düzeyi hasta gruplarında kontrol gruplarına göre daha düşük bulundu. Hasta gruplarında ki bu düşüş tümörün derecesi ile birlikte devam etmiştir. Bu sonuç AMPK’nın endometrial kanser dokularında da diğer tümör dokularında yapılan çalışmalara benzer olarak ekspresyon düzeyinin düştüğünü gösterir. Diğer yandan AMPK’nın inhibe ettiği hedef genlerinden olan SREBP, FASN, mTOR genlerinde AMPK gibi ekspresyon düzeylerinde gözlenen azalma AMPK’ nın endometrial dokuda diğer dokularla aynı etkiyi göstermediğini düşündürmektedir.

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Kanser hücreleri yaşamlarını sürdürmek ve çoğalmak için normal hücrelerden çok daha fazla enerjiye ve oksijene ihtiyaç duyarlar. Bu nedenle tümör gelişiminde enerji metabolizmasında karbonhidrat metabolizmasının yanı sıra lipogeneze oldukça önem taşımaktadır. Lipogeneze ayrıca kanser hücrelerinin hücrenin membranı başta olmak üzere diğer bileşenlerinin yapısal oluşumu için oldukça önemlidir.

Bu çalışmada FASN ekspresyon düzeyinde Grade 2 grubunda Kontrol 2 grubuna göre anlamlı azalma belirlendi.

Yağ asiti sentezini uyaran SREBF1 gen ekspresyonunda Grade 2 ve Grade 3' de Kontrol 1'e göre anlamlı azalma tespit edildi. Kolesterol metabolizması uyaranlarından SREBF2 gen ekspresyonu değerlendirildiğinde Grade 2 ve Grade 3' ün Kontrol 1 ve Kontrol 2' ye göre azaldığı belirlendi. Lipogenezi uyaran FASN ve SREBP gen ekspresyonlarında ilerleyen evrelerde ki azalma tümör derecesi arttıkça dokuda lipogenezin baskılandığı sonucuna ulaştırır.

Çalışmamızda PIK3CA'nın tümörün ileri aşaması olan Grade 3' de Grade 1 ve Grade 2' ye göre anlamlı azaldığı gözlenmiştir. PI3K/Akt/mTOR yolağın üyelerinden AKT ekspresyon düzeyi değerlendirildiğinde Grade 3 grubunun Kontrol gruplarına göre anlamlı azaldığı tespit edildi. Benzeri olarak MTORC1 kompleksinin gen ekspresyonunda Grade 3 grubunun Kontrol gruplarına göre anlamlı olarak azalma gösterdiği tespit edildi.

Bu sonuçlara dayanarak, tümörün ilerleyen evrelerinde PI3K/Akt/mTOR üyelerinin gen ekspresyonunun azalması bu yolağın endometrial kanserin ilerleyen aşamalarında baskılandığını düşündürmektedir.

SREBP aktivasyonunun mTORC1 aktivasyonu ile bağımlı olması ve çalışmada mTOR ve Akt düzeylerinin hasta gruplarında düşmesi bunlara uygun olarak SREBF1 ve SREBF2 düzeylerinin düşmesine neden olduğu düşündürmektedir.

Fazlarda korelasyon katsayılarına baktığımızda SREBF1' in proliferatif fazda mTOR ile %92 , FASN ile %86, SREBF2 ile %68 oranında pozitif yönlü ilişki gösterdiği gözlenirken SREBF2 ile diğer parametreler arasında anlamlı bir ilişki gözlenmedi.

Proliferatif fazda Akt PIK3CA ile korelasyon göstermezken mTOR ile %94,4, SREBP1 ile %86, SREBP2 ile %70, FASN ile %94, PRKAA1 ile %93, PRKAB1 ile %70 pozitif yönlü bir ilişki

göstermiştir. Bu sonuç hücrelerin proliferasyon aşamasında lipogenez ile daha ilişkili olduğunu gösterir.

AMPK alt ünitelerinden PRKAA1 ekspresyon düzeylerinde; Grade 1’de Kontrol 1’ e göre; Grade 2’ de Kontrol 1 ve Kontrol 2’ ye göre ve Grade 3’de Kontrol 1’ e göre anlamlı azalma gözlemlendi. PRKAB1 geninin ekspresyon düzeylerinde ise Grade 2’ de Kontrol 1 ve Kontrol 2’ ye göre, Grade 3’de ise Kontrol 2’ ye göre anlamlı azalma belirlendi.

Çalışmamız sonucunda enerji metabolizması yöneticilerinden AMPK’ nın tümör gelişimi ile downregüle olduğu belirlendi, ancak AMPK’ nın baskıladığı hedef genlerinin AMPK’ nın azalan ekspresyon düzeyine rağmen aktivasyonlarının artmadığı gözlemlendi.

Tümör gelişimi ile lipogenezin baskılanması ve gen ekspresyonunun azalması farklı molekül veya yolların dokuda daha baskın olduğunu akla getirmektedir. Yapılan *invivo* çalışmalar *invitro* çalışmalara nazaran heterojenitesi yüksek çalışmalardır. Bu nedenle özellikle sinyal yollarında farklı ara basamakların ve tümör mikro çevresinin daha detaylı incelendiği çalışmaların yapılması hastalığın tanı ve tedavisinde daha etkin sonuçları ortaya çıkarabilir.

Sonuç olarak bütün bu bilgiler doğrultusunda lipogenezin endometrial kanserle doğrudan ilişkisinin olduğu fakat bazı yollarla ilgili olarak dokuya özgü farklı davranış gösterebileceğini düşündürdü. Bu nedenle endometrial kanserde lipogenezde etkin PI3K/Akt/mTOR akışı ve bu akıştan etkilenen SREBP1-2, FASN, AMPK genlerinin daha ayrıntılı incelenmesinin daha faydalı olacağı sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Bagaria, M., et al., Novel approaches to early detection of endometrial cancer. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology* **2017**, 29 (1), 40-46.
2. Sun, H., et al., Expression profiles of endometrial carcinoma by integrative analysis of TCGA data. *Gynecologic and obstetric investigation* **2017**, 82 (1), 30-38.
3. Gürdol, F., *Tıbbi Biyokimya*. 1th ed.; Nobel Tıp Kitabevleri: Ankara, 2015; p 6.
4. Jones, R. G.; Thompson, C. B., Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes & development* **2009**, 23 (5), 537-548.
5. Erdamar, H., Hacıevliyagil K. F, Gök, S., Biochemical Changes in Cancer. *Journal of Clinical and Analytical Medicine* **2014**, 5, 430-438.
6. Santos R.C, S. A., Lipit metabolism in cancer. *FEBS Journal* **2012**, 279, 2610-2623.
7. Currie Erin, S. A., et al., Cellular fatty acid metabolism and cancer. *Cell metabolism* **2013**, 18 (2), 153-161.
8. Menendez, J. A.; Lupu, R., Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nature Reviews Cancer* **2007**, 7 (10), 763.
9. Horton, J. D., et al., SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *The Journal of clinical investigation* **2002**, 109 (9), 1125-1131.
10. Porstmann, T., et al., SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent cell growth. *Cell metabolism* **2008**, 8 (3), 224-236.
11. Küçüköner, M., Kanser tedavisinde mTOR sinyal yolağı ve mTOR inhibitörleri. *Dicle Tıp Dergisi* **2013**, 40 (1).
12. Alers, S., et al., Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks. *Molecular and cellular biology* **2012**, 32 (1), 2-11.
13. Bireller E, Ç. Z., Endometrium Kanseri ve Gelişimi üzerinde Etkili PI3K-AKT-mTOR ve RAS-RAF-MAPK Sinyal iletim Yolakları. *Deneyisel Tıp Araştırma Enstitü Dergisi* **2015**, 10, 42-50.
14. Morice, P., et al., Endometrial cancer. *The Lancet* **2016**, 387 (10023), 1094-1108.
15. Hüsing, A., et al., An epidemiological model for prediction of endometrial cancer risk in Europe. *European journal of epidemiology* **2016**, 31 (1), 51-60.
16. Burke, W. M., et al., Endometrial cancer: a review and current management strategies: part II. *Gynecologic oncology* **2014**, 134 (2), 393-402.
17. Tezenli, A. Perimenopozal ve postmenopozaldönemde endometrialkalınlık artışı tespit edilmiş hastalarda anormal uterin kanamaendometrial biyopsi sonuçlarının karşılaştırılması. Uzmanlık Tezi, İstanbul, 2009.

18. Engelsen, I. B., et al., Biologic markers in endometrial cancer treatment. *Apmis* **2009**, 117 (10), 693-707.
19. Burke M. W. , O. J., Leitao M.,; Salom E., Endometrial cancer: A review and current management strategies: Part I. *Gynecologic Oncology* **2014**, 134 (2014), 385–392.
20. Kaban A, T. S., Survival Results Of Patients With High-Grade And Advanced-Stage Endometrial Cancer. *Türk Jinekolojik Onkoloji Dergisi* **2016**, 4, 139-144.
21. Kaaks, R., et al., Obesity, endogenous hormones, and endometrial cancer risk: a synthetic review. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers* **2002**, 11 (12), 1531-1543.
22. Soliman, P. T., et al., Risk factors for young premenopausal women with endometrial cancer. *Obstetrics & Gynecology* **2005**, 105 (3), 575-580.
23. Pike, M. C., et al., Estrogen-progestin replacement therapy and endometrial cancer. *Journal of the National Cancer Institute* **1997**, 89 (15), 1110-1116.
24. Fisher, B., et al., Endometrial cancer in tamoxifen-treated breast cancer patients: findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) B-14. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* **1994**, 86 (7), 527-537.
25. Friberg E, O. N., Mantzoros C. S. , Wolk A., Diabetes mellitus and risk of endometrial cancer: a meta analysis. *Diabetologia* **2007**, 50, 1365-1374.
26. Luo, J., et al., Association between diabetes, diabetes treatment and risk of developing endometrial cancer. *British journal of cancer* **2014**, 111 (7), 1432.
27. Arora, V.; Quinn, M. A., Endometrial cancer. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* **2012**, 26 (3), 311-324.
28. Şık, B. A., et al., Retrospective analysis of cases with Endometrial Cancer. *Journal of Human Sciences* **2016**, 13 (3), 5492-5499.
29. Murali, R., et al., Classification of endometrial carcinoma: more than two types. *The Lancet Oncology* **2014**, 15 (7), e268-e278.
30. Bokhman, J. V., Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecologic oncology* **1983**, 15 (1), 10-17.
31. T. Deavers, M.; M. Coffey, D., Classification of Endometrial Carcinoma. In *Precision Molecular Pathology of Uterine Cancer*, Deavers M. T., D. M., C., Ed. Springer International Publishing: 2017.
32. Lobo, F. D.; Thomas, E., Type II endometrial cancers: A case series. *J Midlife Health* **2016**, 7 (2), 69-72.
33. Dedes, K. J., et al., Emerging therapeutic targets in endometrial cancer. *Nature reviews Clinical oncology* **2011**, 8 (5), 261.
34. ÖZAKINCI, H. Endometriyal Karsinogenezde Östrojen Reseptör Alt Tiplerinin (Alfa, Beta, Gpr30) Araştırılması. Tıpta Uzmanlık Tezi, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, 2015.

35. Ayhan, S. Endometrium kanserli hastalarda operasyon öncesi değerlendirmede PET-BT nin yeri. Uzmanlık Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, İzmir, 2009.
36. Beddy, P., et al., FIGO staging system for endometrial cancer: added benefits of MR imaging. *Radiographics* **2011**, 32 (1), 241-254.
37. Kurman, R. J., et al., WHO classification of tumours of female reproductive organs. *Lyon: International Agency for Research on Cancer* **2014**, 172.
38. Benedet, J., et al., FIGO staging classifications and clinical practice guidelines in the management of gynecologic cancers. *International Journal of Gynecology & Obstetrics* **2000**, 70 (2), 209-262.
39. Oncology, F. C. o. G., FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix, and corpus uteri. *International Journal of Gynecology and Obstetrics* **2014**, 125 (2), 97-98.
40. Reece, C., *Biyoloji*. 6th Edition ed.; Palme Yayıncılık: ANKARA, 2008.
41. Baenke, F., et al., Hooked on fat: the role of lipid synthesis in cancer metabolism and tumour development. *Dis Model Mech* **2013**, 6 (6), 1353-63.
42. R, M., *Harper'in Biyokimyası*. 29th ed. ed.; Nobel Tıp Kitabevleri: İstanbul, 2015.
43. Kuhajda, F. P., Fatty-acid synthase and human cancer: new perspectives on its role in tumor biology. *Nutrition* **2000**, 16 (3), 202-208.
44. Liu, H., et al., Biochemistry, molecular biology, and pharmacology of fatty acid synthase, an emerging therapeutic target and diagnosis/prognosis marker. *International journal of biochemistry and molecular biology* **2010**, 1 (1), 69.
45. Nelson D, C. M. M., *Lehninger Biyokimyanın İlkeleri*. 3rd ed.; Palme Yayıncılık: Ankara, 2005.
46. Kersten, S., Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *EMBO reports* **2001**, 2 (4), 282-286.
47. Metallo, C. M., et al., Reductive glutamine metabolism by IDH1 mediates lipogenesis under hypoxia. *Nature* **2012**, 481 (7381), 380.
48. Zaidi, N., et al., ATP-citrate lyase: a key player in cancer metabolism. *Cancer research* **2012**, 72(15).
49. DeBerardinis, R. J.; Chandel, N. S. J. S. a., Fundamentals of cancer metabolism. *Sci. Adv.* **2016**, 2 (5), 2-18.
50. Pizer, E. S., et al., Fatty acid synthase expression in endometrial carcinoma: correlation with cell proliferation and hormone receptors. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society* **1998**, 83 (3), 528-537.
51. Wakil, S. J., Fatty acid synthase, a proficient multifunctional enzyme. *Biochemistry* **1989**, 28 (11), 4523-4530.

52. Smith, S., The animal fatty acid synthase: one gene, one polypeptide, seven enzymes. *The FASEB journal* **1994**, 8 (15), 1248-1259.
53. Kusakabe, T., et al., Fatty Acid Synthase Is Expressed Mainly in Adult Hormone-sensitive Cells or Cells with High Lipid Metabolism and in Proliferating Fetal Cells1. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **2000**, 48 (5), 613-622.
54. Anderson, S. M., et al., Key stages in mammary gland development. Secretory activation in the mammary gland: it's not just about milk protein synthesis! *Breast Cancer Research* **2007**, 9 (1), 204.
55. Bengoechea-Alonso, M. T.; Ericsson, J., SREBP in signal transduction: cholesterol metabolism and beyond. *Current opinion in cell biology* **2007**, 19 (2), 215-222.
56. Bengoechea-Alonso, M. T.; Ericsson, J., SREBP in signal transduction: cholesterol metabolism and beyond. *Curr Opin Cell Biol* **2007**, 19 (2), 215-22.
57. Brown, M. S.; Goldstein, J. L., The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* **1997**, 89 (3), 331-340.
58. Shimomura, I., et al., Differential expression of exons 1a and 1c in mRNAs for sterol regulatory element binding protein-1 in human and mouse organs and cultured cells. *The Journal of clinical investigation* **1997**, 99 (5), 838-845.
59. Li, W., et al., Repression of endometrial tumor growth by targeting SREBP1 and lipogenesis. *Cell cycle* **2012**, 11 (12), 2348-2358.
60. Horton, J., Sterol regulatory element-binding proteins: transcriptional activators of lipid synthesis. *Biochemical Society Transactions* **2002**, 30 (6) 1091-1095.
61. Nakakuki, M., et al., A transcription factor of lipid synthesis, sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-1a causes G1 cell-cycle arrest after accumulation of cyclin-dependent kinase (cdk) inhibitors. *The FEBS journal* **2007**, 274 (17), 4440-4452.
62. Motallebipour, M., et al., Novel genes in cell cycle control and lipid metabolism with dynamically regulated binding sites for sterol regulatory element-binding protein 1 and RNA polymerase II in HepG2 cells detected by chromatin immunoprecipitation with microarray detection. *The FEBS journal* **2009**, 276 (7), 1878-1890.
63. Guo, D., et al., Targeting SREBP-1-driven lipid metabolism to treat cancer. *Current pharmaceutical design* **2014**, 20 (15), 2619-2626.
64. Porstmann, T., et al., PKB/Akt induces transcription of enzymes involved in cholesterol and fatty acid biosynthesis via activation of SREBP. *Oncogene* **2005**, 24 (43), 6465.
65. Yuan, T.; Cantley, L. J. O., PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene* **2008**, 27 (41), 5497.
66. Slomovitz Brain M, C., Robert L The PI3K/AKT/mTOR pathway as a therapeutic target in endometrial cancer. *J Clinical Cancer Research* **2012**, 18(21).

67. Hawkins, P., et al., PI3K signalling in inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta* **2015**, 1851 (6), 882-897.
68. Stark, A.-K., et al., PI3K inhibitors in inflammation, autoimmunity and cancer. *Current opinion in pharmacology* **2015**, 23, 82-91.
69. Fruman, D. A., et al., The PI3K pathway in human disease. *Cell* **2017**, 170 (4), 605-635.
70. Ramadani, F., et al., The PI3K isoforms p110 α and p110 δ are essential for pre-B cell receptor signaling and B cell development. *Sci Signal* **2010**, 3 (134), ra60-ra60.
71. Maffucci, T.; Falasca, M., New insight into the intracellular roles of class II phosphoinositide 3-kinases. *Biochemical Society Transactions* **2014**, 42, 1378-1382.
72. Lindmo, K.; Stenmark, H., Regulation of membrane traffic by phosphoinositide 3-kinases. *Journal of Cell Science* **2006**, 119 (4), 605-614.
73. Net, D. E.; George, L., PROTEIN KINASE B/AKT: Structure, Functions and Regulation. *Ankara Ecz. Fak. Derg* **2001**, 30 (4), 31-40.
74. Manning, B. D.; Toker, A. J. C., AKT/PKB signaling: navigating the network. *Cell* **2017**, 169 (3), 381-405.
75. Jones, P. F., et al., Molecular cloning and identification of a serine/threonine protein kinase of the second-messenger subfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1991**, 88 (10), 4171-4175.
76. Meier, R., et al., Regulation of protein kinase B. *J. OF RECEPTOR & SIGNAL TRANSDUCTION IRESEARCH* **1999**, 19 (1-4), 121-128.
77. Bozulic, L.; Hemmings, B. A. J. C. o. i. c. b., PIKKing on PKB: regulation of PKB activity by phosphorylation. *Current Opinion in Cell Biology* **2009**, 21 (2), 256-261.
78. DiNitto, J. P., et al., Membrane and juxtamembrane targeting by PH and PTB domains. *Biochimica et Biophysica Acta* **2006**, 1761 (8), 850-867.
79. Hart, J. R.; Vogt, P. K. J. O., Phosphorylation of AKT: a mutational analysis. *Oncotarget* **2011**, 2 (6), 467.
80. Fresno, J. V., et al., PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treatment Reviews* **2004**, 30 (2), 193-204.
81. Manning Brendan D; Lewis, C., AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* **2007**, 129 (7), 1261-1274.
82. Roberts, M. S., et al., Protein kinase B/Akt acts via glycogen synthase kinase 3 to regulate recycling of $\alpha\text{v}\beta 3$ and $\alpha 5\beta 1$ integrins. *Molecular And Cellular Biology* **2004**, 24 (4), 1505-1515.
83. Mundi, P. S. S., Jasgit McCourt, Carolyn Kalinsky, Kevin AKT in cancer: new molecular insights and advances in drug development. *British Journal of Clinical Pharmacology* **2016**, 82 (4), 943-956.
84. Gottlieb, T. M., et al., Cross-talk between Akt, p53 and Mdm2: possible implications for the regulation of apoptosis. *Oncogene* **2002**, 21 (8), 1299.

85. Mayo, L. D.; Donner, D. B., A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2001**, 98 (20), 11598-11603.
86. Yip, C. K., et al., Structure of the human mTOR complex I and its implications for rapamycin inhibition. *Molecular Cell* **2010**, 38 (5), 768-774.
87. Yang, H., et al., mTOR kinase structure, mechanism and regulation. *Nature* **2013**, 497 (7448), 217.
88. Morgensztern, D.; McLeod, H. L., PI3K/Akt/mTOR pathway as a target for cancer therapy. *Anti-Cancer Drugs* **2005**, 16 (8), 797-803.
89. Faivre, S., et al., Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents. *Nature Reviews Drug Discovery* **2006**, 5 (8), 671.
90. Hay, N., et al., Upstream and downstream of mTOR. *Genes & development* **2004**, 18 (16), 1926-1945.
91. Toschi, A., et al., Differential dependence of hypoxia-inducible factors 1 α and 2 α on mTORC1 and mTORC2. *Biological Chemistry* **2008**, 283 (50), 34495-34499.
92. Liang, J.; Mills, G. B., AMPK: a contextual oncogene or tumor suppressor? *Cancer research* **2013**, 73 (10), 2929-2935.
93. Shaw, R. J., et al., The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. *PNAS* **2004**, 101 (10), 3329-3335.
94. Chen, Z., et al., TAK1 activates AMPK-dependent cell death pathway in hydrogen peroxide-treated cardiomyocytes, inhibited by heat shock protein-70. *Molecular and cellular biochemistry* **2013**, 377 (1-2), 35-44.
95. Li, W., et al., Targeting AMPK for cancer prevention and treatment. *Oncotarget* **2015**, 6 (10), 7365.
96. Wullschleger, S., et al., TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* **2006**, 124 (3), 471-484.
97. O'Neill, L. A. J.; Hardie, D. G., Metabolism of inflammation limited by AMPK and pseudo-starvation. *Nature* **2013**, 493, 346-355.
98. Jones, R. G., et al., AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. *Molecular cell* **2005**, 18 (3), 283-293.
99. Lee, C. W., et al., AMPK promotes p53 acetylation via phosphorylation and inactivation of SIRT1 in liver cancer cells. *Cancer research* **2012**.
100. Jones, R. G., et al., AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. *Molecular cell* **2005**, 18 (3), 283-293.
101. Chuang, H.-C., et al., AMPK as a potential anticancer target-friend or foe? *Curr Pharm Des.* **2014**, 20 (15), 2607-2618.

102. Warburg, O., et al., The metabolism of tumors in the body. *The Journal of general physiology* **1927**, 8 (6), 519.
103. DeBerardinis, R. J., et al., Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2007**, 104 (49), 19345-19350.
104. Chandel, N. S., et al., Cellular respiration during hypoxia role of cytochrome oxidase as the oxygen sensor in hepatocytes. *Journal of Biological Chemistry* **1997**, 272 (30), 18808-18816.
105. Fan, J., et al., Glutamine-driven oxidative phosphorylation is a major ATP source in transformed mammalian cells in both normoxia and hypoxia. *Molecular systems biology* **2013**, 9 (1), 712.
106. Le, A., et al., Tumorigenicity of hypoxic respiring cancer cells revealed by a hypoxia–cell cycle dual reporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2014**, 111 (34), 12486-12491.
107. Kamphorst, J. J., et al., Human pancreatic cancer tumors are nutrient poor and tumor cells actively scavenge extracellular protein. *Cancer research* **2015**, 75 (3), 544-553.
108. Medes, G., et al., Metabolism of neoplastic tissue. IV. A study of lipid synthesis in neoplastic tissue slices in vitro. *Cancer research* **1953**, 13 (1), 27-29.
109. Swinnen, J. V., et al., Increased lipogenesis in cancer cells: new players, novel targets. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care* **2006**, 9 (4), 358-365.
110. Rysman, E., et al., De novo lipogenesis protects cancer cells from free radicals and chemotherapeutics by promoting membrane lipid saturation. *Cancer research* **2010**, 0008-5472. CAN-09-3871.
111. DeBerardinis, R. J., et al., Phosphatidylinositol 3-kinase-dependent modulation of carnitine palmitoyltransferase 1A expression regulates lipid metabolism during hematopoietic cell growth. *Journal of Biological Chemistry* **2006**, 281 (49), 37372-37380.
112. Young, R. M., et al., Dysregulated mTORC1 renders cells critically dependent on desaturated lipids for survival under tumor-like stress. *Genes development* **2013**, 27 (10), 1115-1131.
113. Braig, S., Chemical genetics in tumor lipogenesis. *Biotechnology advances* **2018**.
114. Pfaffl, M. W., A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic acids research* **2001**, 29 (9), e45-e45.
115. Ferlay, J., et al., Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **2015**, 136 (5), E359-E386.

116. Lax, S.; Kurman, R. J., A dualistic model for endometrial carcinogenesis based on immunohistochemical and molecular genetic analyses. *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie* **1997**, 81, 228-232.
117. Buhtoiarova, T. N., et al., Endometrial carcinoma: role of current and emerging biomarkers in resolving persistent clinical dilemmas. *American journal of clinical pathology* **2015**, 145 (1), 8-21.
118. Levine, D. A., Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature* **2013**, 497 (7447), 67.
119. Ellenson, L. H.; Wu, T.-C., Focus on endometrial and cervical cancer. *Cancer cell* **2004**, 5 (6), 533-538.
120. Hecht, J. L.; Mutter, G. L., Molecular and pathologic aspects of endometrial carcinogenesis. *Journal of Clinical Oncology* **2006**, 24 (29), 4783.
121. Oda, K., et al., High frequency of coexistent mutations of PIK3CA and PTEN genes in endometrial carcinoma. *Cancer research* **2005**, 65 (23), 10669-10673.
122. Catusus, L., et al., PIK3CA mutations in the kinase domain (exon 20) of uterine endometrial adenocarcinomas are associated with adverse prognostic parameters. *Modern pathology* **2008**, 21 (2), 131.
123. Catusus, L., et al., Concomitant PI3K-AKT and p53 alterations in endometrial carcinomas are associated with poor prognosis. *Modern Pathology* **2009**, 22 (4), 522.
124. Salvesen, H., et al., Integrated genomic profiling of endometrial carcinoma associates aggressive tumors with indicators of PI3 kinase activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2009**, 106 (12), 4834-4839.
125. Miyake, T., et al., PIK3CA gene mutations and amplifications in uterine cancers, identified by methods that avoid confounding by PIK3CA pseudogene sequences. *Cancer letters* **2008**, 261 (1), 120-126.
126. Yang, H. P., et al., PTEN expression in benign human endometrial tissue and cancer in relation to endometrial cancer risk factors. *Cancer Causes Control* **2015**, 26 (12), 1729-1736.
127. Kanamori, Y., et al., Correlation between loss of PTEN expression and Akt phosphorylation in endometrial carcinoma. *Clinical Cancer Research* **2001**, 7 (4), 892-895.
128. Velasco, A., et al., PIK3CA gene mutations in endometrial carcinoma. Correlation with PTEN and K-RAS alterations. *Human pathology* **2006**, 37 (11), 1465-1472.
129. Grunt, T. W., Interacting Cancer machineries: cell signaling, lipid metabolism, and epigenetics. *Trends in Endocrinology Metabolism* **2018**, 29 (2), 86-98.
130. Chen, J., et al., Activation of PI3K/Akt/mTOR pathway and dual inhibitors of PI3K and mTOR in endometrial cancer. **2014**, 21 (26), 3070-3080.

131. Konopka, B., et al., PIK3CA mutations and amplification in endometrioid endometrial carcinomas: relation to other genetic defects and clinicopathologic status of the tumors. **2011**, 42 (11), 1710-1719.
132. Arafeh, R.; Samuels, Y. In *PIK3CA in cancer: the past 30 years*, Seminars in cancer biology, Elsevier: 2019.
133. Yates, L. R., et al., Genomic evolution of breast cancer metastasis and relapse. **2017**, 32 (2), 169-184. e7.
134. Berenjeno, I. M., et al., Oncogenic PIK3CA induces centrosome amplification and tolerance to genome doubling. **2017**, 8 (1), 1773.
135. McGranahan, N., et al., Clonal status of actionable driver events and the timing of mutational processes in cancer evolution. **2015**, 7 (283), 283ra54-283ra54.
136. Whale, A. D., et al., Functional characterization of a novel somatic oncogenic mutation of PIK3CB. **2017**, 2, 17063.
137. Nakanishi, Y., et al., Activating mutations in PIK3CB confer resistance to PI3K inhibition and define a novel oncogenic role for p110 β . **2016**, 76 (5), 1193-1203.
138. Engelman, J. A., et al., The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. **2006**, 7 (8), 606.
139. Massion, P. P., et al., Early involvement of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in lung cancer progression. **2004**, 170 (10), 1088-1094.
140. Hay, N. J. C. c., The Akt-mTOR tango and its relevance to cancer. **2005**, 8 (3), 179-183.
141. Brazil, D. P.; Hemmings, B. A. J. T. i. b. s., Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow. **2001**, 26 (11), 657-664.
142. Bakan, I.; Laplante, M. J. C. o. i. l., Connecting mTORC1 signaling to SREBP-1 activation. **2012**, 23 (3), 226-234.
143. Ono, H., et al., Hepatic Akt activation induces marked hypoglycemia, hepatomegaly, and hypertriglyceridemia with sterol regulatory element binding protein involvement. **2003**, 52 (12), 2905-2913.
144. He, L., et al., The critical role of AKT2 in hepatic steatosis induced by PTEN loss. **2010**, 176 (5), 2302-2308.
145. Leavens, K. F., et al., Akt2 is required for hepatic lipid accumulation in models of insulin resistance. **2009**, 10 (5), 405-418.
146. Holst, F., et al., PIK3CA Amplification Associates with Aggressive Phenotype but Not Markers of AKT-MTOR Signaling in Endometrial Carcinoma. **2019**, 25 (1), 334-345.
147. Lien, E. C., et al., PI3K signaling in cancer: beyond AKT. **2017**, 45, 62-71.
148. Lin, K., et al., An ATP-site on-off switch that restricts phosphatase accessibility of Akt. *Sci. Signal.* **2012**, 5 (223), ra37-ra37.

149. Yudushkin, I. J. B., Getting the Akt Together: Guiding Intracellular Akt Activity by PI3K. **2019**, 9 (2), 67.
150. Sarbassov, D. D., et al., Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. **2005**, 307 (5712), 1098-1101.
151. Peng, X.-d., et al., Dwarfism, impaired skin development, skeletal muscle atrophy, delayed bone development, and impeded adipogenesis in mice lacking Akt1 and Akt2. **2003**, 17 (11), 1352-1365.
152. Porstmann, T., et al., SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent cell growth. **2008**, 8 (3), 224-236.
153. Yecies, J. L., et al., Akt stimulates hepatic SREBP1c and lipogenesis through parallel mTORC1-dependent and independent pathways. **2011**, 14 (1), 21-32.
154. Yabe, D., et al., Liver-specific mRNA for Insig-2 down-regulated by insulin: implications for fatty acid synthesis. **2003**, 100 (6), 3155-3160.
155. Yellaturu, C. R., et al., Insulin enhances the biogenesis of nuclear sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-1c by posttranscriptional down-regulation of Insig-2A and its dissociation from SREBP cleavage-activating protein (SCAP)-SREBP-1c complex. **2009**, 284 (46), 31726-31734.
156. Mauvoisin, D., et al., Role of the PI3-kinase/mTor pathway in the regulation of the stearoyl CoA desaturase (SCD1) gene expression by insulin in liver. **2007**, 1 (2), 113-125.
157. Li, W., et al., Repression of endometrial tumor growth by targeting SREBP1 and lipogenesis. *Cell Cycle* **2012**, 11 (12), 2348-58.
158. Nie, L.-Y., et al., Sterol regulatory element-binding protein 1 is required for ovarian tumor growth. **2013**, 30 (3), 1346-1354.
159. Wen, Y. A., et al., Downregulation of SREBP inhibits tumor growth and initiation by altering cellular metabolism in colon cancer. *Cell Death Dis* **2018**, 9 (3), 265.
160. Chalbos, D., et al., Regulation of fatty acid synthetase by progesterone in normal and tumoral human mammary glands. **1990**, 46 (1), 43-46.
161. Lupu, R.; Menendez, J. A., Targeting fatty acid synthase in breast and endometrial cancer: An alternative to selective estrogen receptor modulators? *Endocrinology* **2006**, 147 (9), 4056-66.
162. Escot, C., et al., Regulation of fatty acid synthetase ribonucleic acid in the human endometrium during the menstrual cycle. **1990**, 70 (5), 1319-1324.
163. Pizer, E. S., et al., Expression of fatty acid synthase is closely linked to proliferation and stromal decidualization in cycling endometrium. **1997**, 16 (1), 45-51.
164. He, X., et al., Down-regulation of adenosine monophosphate-activated protein kinase activity: A driver of cancer. *Tumour Biol* **2017**, 39 (4), 1010428317697576.

165. Hadad, S. M., et al., Histological evaluation of AMPK signalling in primary breast cancer. **2009**, 9 (1), 307.
166. Cheng, J., et al., AMP-activated protein kinase suppresses the in vitro and in vivo proliferation of hepatocellular carcinoma. **2014**, 9 (4), e93256.
167. Li, C., et al., Reduced expression of AMPK- β 1 during tumor progression enhances the oncogenic capacity of advanced ovarian cancer. **2014**, 13 (1), 49.
168. Crute, B. E., et al., Functional domains of the α 1 catalytic subunit of the AMP-activated protein kinase. **1998**, 273 (52), 35347-35354.
169. Hamilton, S. R., et al., AMP-activated protein kinase kinase: detection with recombinant AMPK α 1 subunit. **2002**, 293 (3), 892-898.



6. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Ş. Efsun ANTMEN

Doğum Tarihi: 23/05/1978

Email adresi: eantmen@gmail.com

Öğrenim Durumu

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Biyoloji	Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi	1997-2001
Yüksek Lisans	Tıbbi Biyokimya	Çukurova Üniversitesi	2002-2005
Doktora	Biyokimya	Mersin Üniversitesi	2015-2019

Görevler

Görev Ünvanı	Görev Yeri	Yıl
Öğretim Görevlisi	Mersin Üniversitesi Sağlık Hizmetleri MYO	2006-....