

T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

137832

**MESANE KANSERLERİNDE PTEN  
EKSPRESYONUNUN WESTERN BLOT  
YÖNTEMİ İLE GÖSTERİLMESİ**

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU  
BOKÜ MANTASYON MERKEZİ

Duygu YAŞAR

**Yüksek Lisans Tezi**

**Antalya 2003**

**T.C.**  
**AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

# **MESANE KANSERLERİNDE PTEN EKSPRESYONUNUN WESTERN BLOT YÖNTEMİ İLE GÖSTERİLMESİ**

**Duygu YAŞAR**

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanları

Doç. Dr. Sibel Berker KARAÜZÜM

Doç. Dr. Salih ŞANLIOĞLU

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri  
Yönetim Birimi tarafından desteklenmiştir.  
(Proje No : 2002. 0122. 07)

“Kaynakça Gösterilerek Tezinden Yararlanılabilir”

**Antalya 2003**

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Tıbbi Genetik Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 21/07/2003

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Sibel BERKER KARAÜZÜM  
Akdeniz Üniversitesi  
Tıp Fakültesi  
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

II. Danışman ve  
Proje Yürütücüsü: Doç. Dr. Salih ŞANLIOĞLU  
Akdeniz Üniversitesi  
Tıp Fakültesi  
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Üye: Prof. Dr. Güven LÜLECI  
Akdeniz Üniversitesi  
Tıp Fakültesi  
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Üye: Doç. Dr. İbrahim KESER  
Akdeniz Üniversitesi  
Tıp Fakültesi  
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Üye: Doç. Dr. Tıbet ERDOĞRU  
Akdeniz Üniversitesi  
Tıp Fakültesi  
Üroloji Anabilim Dalı

ONAY:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulunun .5.../..8...2003 tarih ve 15/94 sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ramazan DEMİR  
Enstitü Müdürü

## ÖZET

Bu çalışmada mesane kanseri tanısı almış 31 hastada mesane tümör ve kontrol materyalinde Western-blot yöntemi ile PTEN proteininin ekspresyonu araştırılmıştır.

Tümör baskılayıcı PTEN (Phosphatase and Tensin homologue deleted on chromosome ten) fosfoinozitol 3'-kinaz sinyal yolu üzerine etki etmektedir. Bu apoptotik sinyal yolu tümör oluşumunun engellenmesi için çok önemlidir. Bu nedenle, PTEN aktivitesinin kaybı hücre transformasyonu ve neoplastik büyüme ile doğrudan ilişkilidir. Bununla beraber PTEN genindeki mutasyonlar mesane kanseri de dahil olmak üzere prostat, karaciğer, tiroid kanseri gibi çok çeşitli kanser tiplerinde belirlenmiştir. Bu güne kadar yapılan çalışmalar ile yalnızca hücre hatlarında PTEN protein ekspresyonu gösterilmiştir. Bu çalışmada ise mesane kanseri tanısı alan 31 olgudan cerrahi müdahale ile çıkarılan taze tümör dokusunda Western-blot yöntemi ile PTEN ekspresyonunun düzeyi araştırılmıştır. İncelenen 31 tümör materyalinin 4 tanesinde normal mesane dokusu ile karşılaştırıldığında PTEN ekspresyonunun önemli oranda azaldığı belirlendi. PTEN ekspresyon kaybının mesane kanseri gelişimindeki rolü literatür bilgileri ile kıyaslanarak, tartışıldı.

**Anahtar kelimeler:** Mesane kanseri, PTEN, Western-blot

## **ABSTRACT**

In this study, 31 bladder carcinomas and control samples were analyzed with Western-blotting in terms of the level of PTEN expression.

Tumor suppressor PTEN (Phosphatase and Tensin homologue deleted on chromosome ten) plays an important role in the deterrence of tumorigenesis through its action on phosphatidylinositol 3'- kinase signaling pathway. Thus, the loss of PTEN activity directly contributes to the cellular transformation and neoplastic growth. For an instance, the deletion of PTEN has been observed in many human cancers including cancers of bladder, prostate, liver, and that of thyroid glands in addition to gastrointestinal cancers. Recent studies analyzing the level of PTEN expression were only performed with cell lines. In this study, 31 primary tumors obtained from patients with bladder carcinomas were analyzed with Western-blot in terms of the level of PTEN expression. Decrease in PTEN expression was detected in 4 patients with bladder carcinomas compared to those obtained from the healthy individuals. Importance of the failure of PTEN synthesis in the manifestation of bladder carcinomas was discussed in detail and compared to what is known in literature.

**Key words:** Bladder cancer, PTEN, Western-blot

## TEŞEKKÜR

Çalışmamın gerçekleşmesi için tüm şartları sağlayan, bilgi ve deneyimleri ile destek, ilgi ve hoşgörüsünü eksik etmeyen sayın Prof. Dr. Güven LÜLECI' ye,

Yardımları ve yönlendirmeleri ile desteğini hep yanımda hissettiğim sevgili danışmanım Doç. Dr. Sibel BERKER KARAÜZÜM'e,

Çalışmanın oturtulmasında bulunduğu katkılar, tüm yardım ve teşvikleri için 2. danışman hocam sayın Doç. Dr. Salih ŞANLIOĞLU' na,

Çalışmamda kullandığım materyalleri sağlayan ve klinik yaklaşımları ile çalışmama katkılarından dolayı, Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı başkanı sayın Prof. Dr. Mehmet BAYKARA ve Yrd. Doç. Türker KÖKSAL' a,

Tanımdan onur duyduğum, bilgi ve yetenekleri ile hayatım boyunca örnek alacağım sevgili hocam Doç. Dr. Nidai Osman ÖZEŞ'e, Yüksek Lisans eğitimime ve çalışmama verdiği tüm destekler için,

Laboratuvar çalışmalarında yardım ve desteğini hiç eksik etmeyen sevgili arkadaşım Arş. Gör. Ercüment DİRİCE' ye

Tez çalışmam süresince gösterdikleri anlayış ve yardımlarından dolayı tüm bölüm arkadaşlarıma, hocalarıma ve sekreterimize,

Tüm eğitim hayatım boyunca hep yanımda olan aileme,  
TEŞEKKÜR EDERİM.

## İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
<b>ÖZET</b>	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>v</b>
<b>TEŞEKKÜR</b>	<b>vi</b>
<b>İÇİNDEKİLER DİZİNİ</b>	<b>vii</b>
<b>KISALTMALAR DİZİNİ</b>	<b>x</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	<b>xii</b>
<b>TABLolar DİZİNİ</b>	<b>xiii</b>
<b>GİRİŞ ve AMAÇ</b>	<b>1</b>
<b>GENEL BİLGİLER</b>	<b>3</b>
1.1. Kanserin Gelişimi	4
1.2. Kanserin Nedenleri	5
1.3. Kanserde Genomik Değişimler	6
1.3.1. Kansere Neden Olan Genler	6
1.3.1.1. Onkogenler	6
1.3.1.2. Tümör Baskılayıcı Genler	7
1.4. Mesane Kanseri	7
1.5. Mesanenin Yapısı	8
1.6. Mesane Kanserlerinin Sınıflandırılması	10
1.7. Mesane Kanserinde Genetik Değişimler	11
1.8. Tümör Baskılayıcı Gen PTEN ve Ürünü	13
1.8.1. PTEN Sinyal Yolu	16
1.9. Mesane Kanseri ve PTEN	20
<b>MATERYAL VE METOD</b>	<b>24</b>
2.1. Tümör Ve Kontrol Materyallerinin Western-Blot Yöntemi İçin Hazırlanışı	24
2.1.1. Kullanılan Solüsyonlar	24
2.1.1.1. Triton-X-100 Tamponu	24
2.1.2. İşlemler	25

<b>2.2. Tümör Materyalinde Protein Miktar Tayini</b>	
Ve Standart Grafik Hazırlanışı	<b>26</b>
<b>2.2.1. Kullanılan Solüsyonlar</b>	<b>26</b>
<b>2.2.1.1. Stok BSA</b>	<b>26</b>
<b>2.2.1.2. Protein Assay Kit</b>	<b>26</b>
<b>2.2.2. Standart Grafik Hazırlanışı</b>	<b>26</b>
<b>2.2.3. Tümör Materyalinde Protein Miktar Tayini</b>	<b>27</b>
<b>2.3. Western-Blot</b>	<b>27</b>
<b>2.3.1. Protein Elektrofözezi</b>	<b>27</b>
<b>2.3.1.1. Kullanılan Solüsyonlar</b>	<b>27</b>
<b>2.3.1.1.1. Ayırıştırma Jeli Tamponu</b>	<b>27</b>
<b>2.3.1.1.2. Yükleme Jeli Tamponu</b>	<b>28</b>
<b>2.3.1.1.3. 10X Elektroförez Tamponu</b>	<b>28</b>
<b>2.3.1.1.4. 2X Yükleme Tamponu</b>	<b>28</b>
<b>2.3.1.1.5. Akrilamid</b>	<b>28</b>
<b>2.3.1.1.6. %10 SDS</b>	<b>29</b>
<b>2.3.1.1.7. %10 APS</b>	<b>28</b>
<b>2.3.1.2. Jellerin Hazırlanışı</b>	<b>29</b>
<b>2.3.1.2.1. %10'luk Ayırıştırıcı Jel</b>	<b>29</b>
<b>2.3.1.2.2. Yükleme Jeli</b>	<b>30</b>
<b>2.3.1.3. Örneklerin Yükleme İçin Hazırlanışı</b>	<b>30</b>
<b>2.3.1.4. İşlemler</b>	<b>31</b>
<b>2.3.1.1.2. Membrana Transfer (Islak Transfer)</b>	<b>32</b>
<b>2.3.2.1. Kullanılan Solüsyonlar</b>	<b>32</b>
<b>2.3.2.1.1. 1X Protein Transfer Tamponu</b>	<b>32</b>
<b>2.3.2.2. İşlemler</b>	<b>32</b>
<b>2.3.1.1.2. Membranların Blotlanması</b>	
(Antikorla İşaretleme)	<b>33</b>
<b>2.3.3.1. Kullanılan Solüsyonlar</b>	<b>33</b>
<b>2.3.3.1.1. PBS</b>	<b>33</b>
<b>2.3.3.1.2. % 0.1' lik PBST</b>	<b>33</b>
<b>2.3.3.1.3. % 3'lük Süt Tozu (Bloklama Çözeltisi)</b>	<b>34</b>



2.3.3.2. İşlemler	34
2.4. Tümör ve Kontrol Örneklerinde PTEN Ekspresyonlarının Belirlenmesi	35
<b>BULGULAR</b>	<b>36</b>
3.1. Tümör Materyalinin Patolojik Ve Histolojik Olarak Sınıflandırılması	36
3.2. Tümör Ve Kontrol Materyalinde Protein Miktar Tayini	38
3.3. Tümör Ve Kontrol Örneklerinde PTEN Ekspresyonu Düzeyleri	39
<b>TARTIŞMA ve SONUÇLAR</b>	<b>41</b>
<b>KAYNAKLAR</b>	<b>46</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>62</b>

## KISALTMALAR DİZİNİ

<b>AKT</b>	Protein Kinase B
<b>APS</b>	Amonyumpersülfat
<b>BSA</b>	Bovine Serum Albumin
<b>C</b>	Cinsiyet
<b>CD</b>	Cowden Disease
<b>CDKN2<math>\alpha</math></b>	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 4
<b>CK2</b>	Casein kinase II
<b>EGTA</b>	Etilenbis(oksietilennitrilo)tetraasetikasit
<b>FAK</b>	Focal Adhesion Kinase
<b>GAPDH</b>	Gliseraldehitdehidrogenaz
<b>GSK-3<math>\beta</math></b>	Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$
<b>HCl</b>	Hidroklorik asit
<b>Hepes</b>	N-(2-hidroksietil)piperazin-N-(2-etan-sulfonikasit)
<b>HRP</b>	Horseradishperoxydase
<b>I<math>\kappa</math>B</b>	Inhibitor of NF- $\kappa$ B
<b>IKK</b>	I $\kappa$ B Kinaz
<b>IRS-1</b>	Insulin Receptor Substrate 1
<b>KCl</b>	Potasyumklorür
<b>LDD</b>	Lhermitte-Duclos Disease
<b>LOH</b>	Loss Of Heterozigosity
<b>MAPK</b>	Mitogen-activated Protein Kinase
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Magnezyumklorid
<b>MMAC1</b>	Mutated in Multiple Advanced Cancers 1
<b>NaCl</b>	Sodyumklorür
<b>NaF</b>	Sodyumflorid
<b>NaOH</b>	Sodyumhidroksit
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Nuclear Factor- $\kappa$ B
<b>PBS</b>	Phosphate Buffered Saline
<b>PDK 1-2</b>	3- Phosphoinositid Dependent Protein Kinase 1- 2

<b>PI(3)K</b>	Fosfoinozitol-3Kinaz
<b>PIP2</b>	Fosfatidilinozitol 4,5-bifosfat
<b>PIP3</b>	Fosfoinozitol 3,4,5-trifosfat
<b>PKC</b>	Protein Kinaz C
<b>PLC-<math>\gamma</math></b>	Phosphalipase C- $\gamma$
<b>PMSF</b>	Fenilmetansulfonilflorid
<b>PTEN</b>	Phosphatase and Tensin Homolog deleted from Chromosome Ten
<b>PVDF</b>	Polivinildifluorid
<b>RB</b>	Retino-Blastoma
<b>SDS</b>	Soydum Doedesil Sulfat
<b>SH2</b>	Src-homology 2
<b>Shc</b>	SH2-containing collagen-related proteins
<b>SRC</b>	Steroid Receptor Coactivator
<b>TCC</b>	Transitional Cell Carcinoma
<b>TEMED</b>	N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamine
<b>TEP1</b>	TGF $\beta$ regulated and Epitelial cell enriched Phosphatase 1
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Transforming Growth Factor- $\beta$
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tumor Necrosis Factor- $\alpha$
<b>TNM</b>	Tumor Node Metastasis
<b>Tween 20</b>	Polioksietilen-sorbitanmonolaurat
<b>UICC</b>	Union Internationale Contre le Cancer
<b>VEGF</b>	Vascular Endothelial Growth Factor
<b>WHO</b>	World Health Organization

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b><u>Şekil</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
<b>1.1</b> Karsinogenezin Şeması	<b>5</b>
<b>1.2</b> Üriner Sistem	<b>9</b>
<b>1.3</b> PTEN Proteinin Üç Boyutlu Yapısı	<b>14</b>
<b>1.4</b> PTEN Sinyal Mekanizması	<b>18</b>
<b>4.1</b> 23, 24 Ve 25 Numaralı Olguların Westren-Blot Sonucu PTEN ve GAPDH Band Paterni	<b>40</b>
<b>4.2</b> 7, 8, 9, 10, 11, 12 Ve 13 Numaralı Olguların Westren-Blot Sonucu PTEN ve GAPDH Band Paterni	<b>40</b>

## TABLolar DİZİNİ

<b><u>Tablo</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
<b>1.1</b> Mesane Kanserlerinin Histolojik Derecelerine Göre Sınıfları ve Özellikleri	<b>11</b>
<b>4.1</b> Klinik Bulgular	<b>37</b>
<b>4.2</b> 1-19 Numaralı Tümör Materyallerinin Protein Miktarları ve % PTEN Ekspresyonları	<b>38</b>
<b>4.3</b> 12 Tümör ve Kontrol Örneğinde Protein Miktarları ve % PTEN Ekspresyonları	<b>39</b>

## GİRİŞ ve AMAÇ

Kanser multifaktöriyel ve multistep etkileşimler sonucu ortaya çıkan genetik bir hastalıktır. Malign tümörlerin sahip oldukları yayılma ve metastaz yetenekleri nedeni ile kanser yirminci yüzyılın en tehlikeli hastalıklarından birisidir.

1997 yılında yeni bir tümör baskılayıcı gen olarak tanımlanan PTEN geninin kromozomal lokalizasyonu 10q23.3 olarak belirlenmiştir. PTEN geninin inaktivasyonu glioblastoma, endometriyum, prostat ve diğer birçok kanser tipinde gösterilmiştir. İnaktivasyonun endometriyal karsinogenezde erken evrelerde ortaya çıkarken glioblastoma, prostat ve diğer birçok kanser tipinde ileri evrelerde ortaya çıktığı sitogenetik ve moleküler analizlerle gösterilmiştir. PTEN geninde heterozigosite kaybı mesane kanserlerinde görülen genetik değişimlerden birisidir. 10q 'da heterozigosite kaybı da daha çok kasa invaze olan TCC' lerde görülmektedir ve genellikle ileri evrelerde gerçekleşmektedir.

PTEN geni 403 amino asitlik yaklaşık 55 kD ağırlığında bir peptid kodlar. PTEN proteini fosfolipid fosfataz olarak tanımlanan ilk proteindir. PTEN özgül bir şekilde PIP3 (fosfoinozitol 3,4,5-trifosfat)'ı D3 pozisyonununundaki inozitol halkasından defosforile etmektedir. PIP3 yaşam ve büyüme sinyali regülasyonunda kritik rol oynamaktadır. Bir serin/threonin protein kinaz olan PDK1 (3-Phosphoinositid Dependent Protein Kinase 1) ve onun devamındaki AKT (Protein Kinase B) üzerine doğrudan etkilidir. PTEN aşırı ekspresyonu AKT aktivitesinin downregülasyonu ile sonuçlanmaktadır. AKT aktivasyonunun engellenmesi hücrenin çoğalma ve bölünme eğilimini yavaşlatır ve hücrenin apoptozise uğramasına neden olur. PTEN proteinin ikincil işlevi protein fosfataz aktivitesidir ve hedef proteinler hücre adezyon ve göçünde işlev gören

FAK (Focal Adhesion Kinase) ve adaptör molekül Shc' dir. PTEN, FAK ve Shc'nin defosforilasyonunun kontrolünde işlev görmektedir.

PTEN' in mesane kanserlerinde moleküler ve işlevsel analizleri oldukça sınırlıdır ancak yapılan çalışmalar özellikle geç evre mesane tümörlerinde PTEN' in önemli rol oynayan bir tümör baskılayıcı gen olduğunu göstermektedir. PTEN proteininin geç evre mesane tümörlerinde rol oynuyor olması özellikle migrasyon ve invazyonda önemini göstermektedir.

Mesane kanseri ile bu güne kadar yapılan çalışmalar LOH ve mutasyonların belirlenmesi ile sınırlı kalmıştır. PTEN proteininin ekspresyonu ile mesane kanseri prognozu arasındaki ilişki araştırılmamıştır. Çalışmamızda cerrahi operasyon ile alınan mesane tümör örneklerinde Western-blot yöntemi ile PTEN ekspresyonundaki değişimler araştırılmıştır. PTEN'in etki mekanizmalarının aydınlatılması ve mesane kanseri ile ilişkisinin anlaşılması, tedavi için yeni hedeflerin bulunmasına öncülük edecektir.

## GENEL BİLGİLER

İnsan vücudu tüm organizmanın ihtiyaçlarını karşılamak üzere hücrelerin oluşturduğu mükemmel bir sistemdir. Bu sistemde çoğalma, farklılaşma ve yaşamı devam ettirmek gibi karmaşık olaylar özenle düzenlenir (1). Bir hücrenin ne zaman çoğalacağını, farklılaşacağını ve ne zaman öleceğini ise genetik program belirler. Genetik programda veya bu programın uygulanmasında ortaya çıkan bir bozukluk hücre işlevlerinin hatalı düzenlenmesi ile sonuçlanır (2). Hücrede proliferasyon kontrolünün kaybı oluşan bozukluklardan biridir (3). Kanseri hücre bu şekilde ortaya çıkar. Hücre yüzeyinde bulunan ve hücreye biyokimyasal kimliğini kazandıran glikoproteinler, glikolipidler ve polisakkaritlerin de sentezi genetik kontrol altındadır. Transforme olan bir hücrede hücrenin biyokimyasal kimliği de genellikle değişmiştir (4).

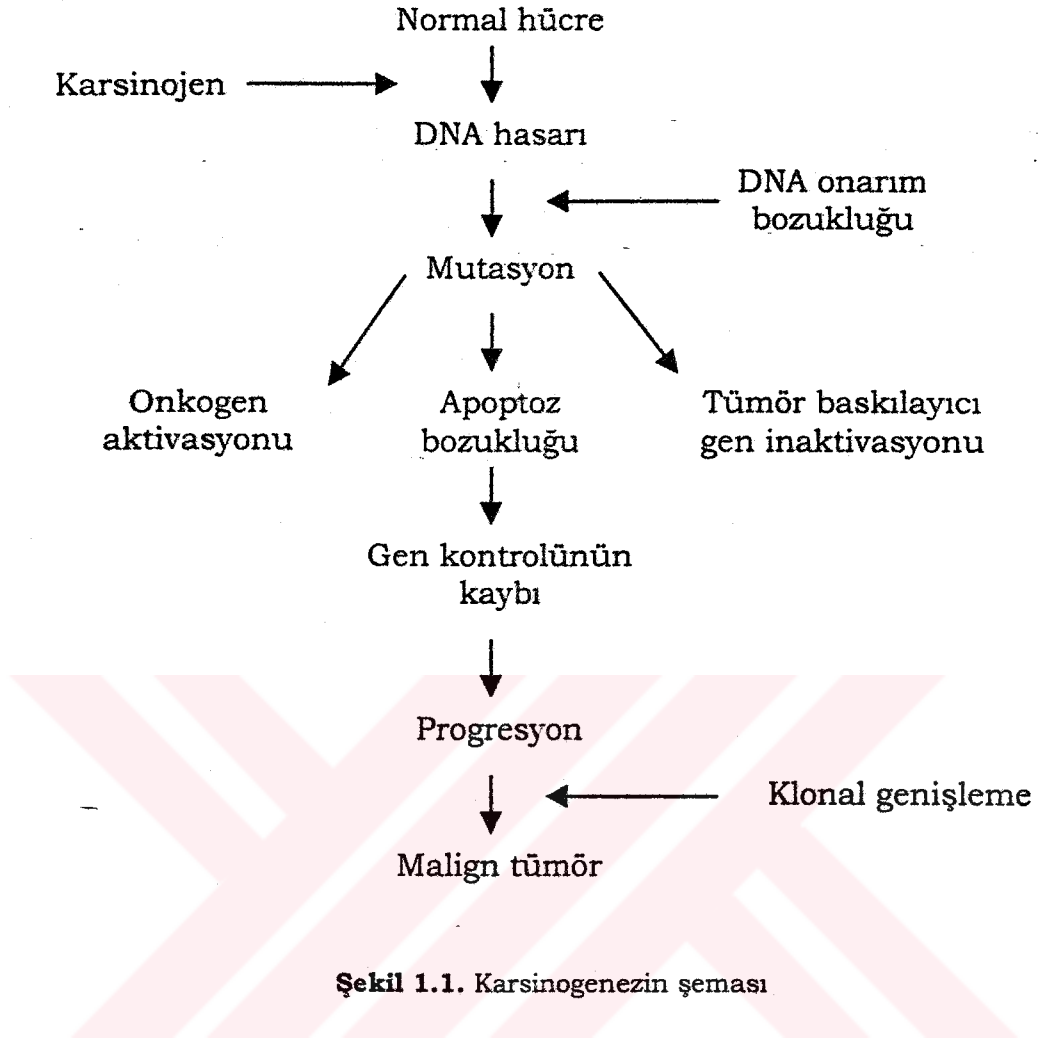
Kanser vücudun herhangi bir hücresinin anormal çoğalması ile ortaya çıktığından davranışı ve tedaviye cevapları çeşitlilik gösteren birçok tipi bulunmaktadır (1). Bu nedenle patolojinin doğru belirlenmesi kanser tanı ve tedavisi için önem taşımaktadır. Kanseri patolojisinde en önemli noktalardan biri benign ve malign tümör ayırımını yapmaktır (3, 5). Benign tümör ortaya çıktığı bölgeye sınırlıdır. Çevresindeki normal doku veya organlara yayılım göstermez. Fakat malign bir tümör çevresindeki doku ve vücuda yayılma yeteneğine sahiptir. Kan veya lenf yoluyla diğer doku veya organlara göç eder yani metastaz yapar (4). Bu hücrelerin sahip oldukları yayılma ve metastaz yetenekleri nedeni ile kanser yirminci yüzyılın en tehlikeli hastalıklarından birisidir (4, 5).



Hem benign hem de malign tümörler köken aldıkları hücre ve dokuların çeşidine göre sınıflandırılırlar. Hemen hemen tüm kanser tipleri üç temel grupta toplanırlar (6). Bu gruplar: insan kanserlerinin %90'nını oluşturan ve epitelyal hücrelerden köken alan *karsinomalar*, daha nadir görülen kas, kemik, kıkırdak ve fibroblast gibi bağ doku hücrelerinden köken alan *sarkomalar* ve kan hücrelerinden köken alan *lösemi* veya *lenfomalar*dır. Kanserlerin alt sınıflandırmaları ortaya çıktıkları doku veya organa göre yapılmaktadır (3, 4, 7).

### 1.1. Kanserinin Gelişimi

Kanser multifaktöriyel ve multistep etkileşimler sonucu ortaya çıkmaktadır. Kanserinin birçok faktörün ve basamağın yer aldığı bir gelişim gösterdiğini çoğu kanser tipinin hayatın geç evrelerinde ortaya çıkması doğrulamaktadır. Örneğin kolon kanserlerinin insidansı 30 ve 50 yaşları arasında on kat artar ve 50 ile 70 yaşları arasında da on kat daha artar (7). Yaşa bağlı olarak insidansın bu kadar önemli oranda artması kanserinin yıllar boyunca birçok genetik anormalliğinin birikmesi ile geliştiğini göstermektedir. Hücresel düzeyde kanser gelişimi mutasyon, proliferasyon, invazyon ve metastaz yeteneğini kazanan hücrelerin seçilmesini içeren multistep bir olaydır. İlk basamak tümör başlangıcıdır, genetik bir değişim geçiren tek hücrenin proliferasyonudur. Bir popülasyon oluşturan tümör hücrelerinde daha farklı mutasyonlar gerçekleşir ve tümör progresyonu devam eder. Daha fazla üreme yeteneğine sahip hücreler popülasyon içinde dominant konum alırlar. Bu durum klonal seçim olarak da adlandırılır. Klonal seçim devam ettikçe hücreler hızla gelişen ve malignansi gösteren bir duruma (karsinogenez) geçmektedirler (5, 7, 8). Karsinogenezin sadeleştirilmiş bir şeması Şekil 1.1'de gösterilmektedir.



## 1.2. Kanserin Nedenleri

İnsan kanserleri biyolojik ve klinik bakımlardan birbirlerinden çok farklı özellikleri olan ortalama 100 değişik hastalıktan oluşmaktadır (8). Karmaşık, multistep bir gelişim yolu izleyen kanser gibi bir hastalıkta, tek bir etken veya karsinojen ile kanser oluşumunu açıklamak mümkün olmamaktadır. İnsan kanserlerinin ortalama % 30-60'nın çevresel etkenlere bağlı olarak geliştiği ileri sürülmektedir (1, 9). Kansere neden olan ajanlar yani karsinojenler, deney hayvanlarıyla in vivo ve in vitro olarak yapılan çalışmalar ve epidemiyolojik çalışmalarla tanımlanmıştır. Karsinojenleri temel olarak üç grup altında toplamak mümkündür (2, 5). Fiziksel ve kimyasal ajanlar ile virüslerin insan ve hayvanlarda kansere neden

olan başlıca ajanlar olduğu kanıtlanmıştır. Karsinojenler DNA'ya hasar vererek mutasyon oluşumuna neden olabilir veya hücre bölünmesini uyarabilirler (5).

### **1.3. Kanserde Genomik Değişimler**

Kanser hücresinin karakterini oluşturan genetik değişimleri sağlayan olaylar 'genomik instabilite' olarak adlandırılmaktadır. En az üç grup genetik bozukluk genomik instabiliteye neden olmaktadır. Bunlar: DNA tamiri, replikasyon hataları, hücre döngüsünün kontrolünde ortaya çıkan hatalar, kromozomal değişimler ve gen düzeyindeki değişiklikler olarak gruplandırılabilir (8).

#### **1.3.1. Kansere Neden Olan Genler**

##### **1.3.1.1. Onkogenler**

- Hücre çoğalması, farklılaşması ve yaşamı protoonkogen olarak adlandırılan özgül genlerin kontrolü altındadır. Bu genler mutasyona uğradıklarında veya anormal derecede sentezlendiklerinde onkogenleri oluşturmaktadır. Onkogenler transformasyonu uyararak kansere öncülük etmektedir (8).

İnsan kanserlerinde hücre sel onkogenler değişik mekanizmalar ile aktive olabilirler. Bu aktivasyon ile normal gen ürününün miktarında artış veya proteinin işlevini değiştiren yapısal değişiklikler ortaya çıkabilir (1). Protein miktarındaki artış, gen amplifikasyonu veya ekspresyon artışı şeklinde ortaya çıkabilmektedir. Protein yapıdaki değişimler ise birçok farklı mekanizma ile ortaya çıkabilmektedir. Bu mekanizmalar, normal proteini kodlayan dizilerin aktif genlerin promotor veya enhancer bölgelerinin kontrolü altına girmesini sağlayan kromozom translokasyonları, farklı kromozomlardan gelen genlerin birleşmesi ile daha aktif füzyon

proteinlerin oluşması, protein aktivitesini etkileyen nokta mutasyonu veya gen amplifikasyonları olarak özetlenebilmektedir.

İnsan kanserlerinin % 80'inden fazlası virüsler dışındaki etkenler nedeni ile ortaya çıksa da viral onkogenlerin de kanserde rol oynadığı belirlenmiştir (1, 10).

#### **1.3.1.2. Tümör Baskılayıcı Genler**

Tümör baskılayıcı genler hücre büyümesini baskılayan, durduran veya sınırlayan proteinleri kodlamaktadırlar (1, 2). Tümör baskılayıcı genler de onkogenler gibi hücre içi sinyal yollarında anahtar fonksiyonlardan sorumludur. Hücre döngüsünü belirli aşamalarda durduran, DNA onarımı için hücre döngüsünü belirli noktalarda denetleyen veya apoptozisi indükleyen proteinler, hormon reseptörleri ve DNA onarımında görev alan enzimler tümör baskılayıcı genler tarafından kodlanmaktadır. Tümör baskılayıcı genlerin ortadan kalkmasına veya inaktivasyonuna yol açan mutasyonlar hücre çoğalması üzerindeki düzenlemenin kaybedilmesi ile sonuçlanmaktadır (1, 2). Onkogenlerin aksine tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu için genellikle her iki allelde de birbirinden bağımsız iki mutasyonun gerçekleşmesi gerekmektedir (10).

#### **1.4. Mesane Kanseri**

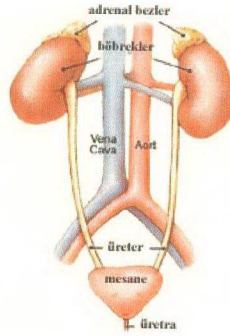
Mesane kanseri Amerika'da her yıl 50,000'den fazla yeni olgu ile en sık gözlenen beşinci kanserdir (11, 12). Mesane tümörleri genellikle 60-70 yaşlarında ortaya çıkmakta ve Amerika'da erkeklerde görülen kanserlerin % 6 ve kadınlarda görülen kanserlerin % 2'sini oluşturmaktadır. Ayrıca kanser nedeni ile ölümlerin % 2'sinden mesane kanseri sorumludur (5). Fidaner ve arkadaşlarının İzmir bölgesinde yaptığı çalışma sonucunda bu bölgede mesane kanserlerinin görülme sıklığı erkeklerde % 6.8 ve kadınlarda % 1.5 olarak belirlenmiştir (13).

Mesane kanseri gelişiminde birçok çevresel etken, sigara kullanımı, endüstriyel maddelere maruz kalma, kronik mesane infeksiyonları risk faktörleri olarak tanımlanmaktadır (5, 12, 14). Endüstri ürünlerine maruz kalınması ile tümör transformasyonu arasında 6-20 yıl kadar uzun latent bir periyot gözlenmiştir. Sigara kullanımının mesane kanseri insidansını 6 kat arttırdığı bildirilmiştir (5).

Mesane kanserlerinin erken belirtileri arasında hematuri en sık karşılaşılan bulgu olarak bildirilmektedir. Tanıda görüntüleme sistemleri, üriner sitoloji, sistoskopi ve TUR (Trans-uretral Rezeksiyon) kullanılmaktadır (15, 16). Mesane kanserlerinde tümör sayısı, rekurrens oranı, tümör büyüklüğü ve tümörün anaplazi derecesi prognostik faktörler olarak bildirilmektedir (17, 18).

### **1.5. Mesanenin Yapısı**

Mesane böbreklerin ürettiği idrarı depolayan, pelviste yer alan kese benzeri bir organdır. İdrar, üreter olarak adlandırılan iki kanal ile böbreklerden mesaneye taşınır, depolanan idrar bir başka kanal olan üretra ile mesanenin içeriğini dışarıya boşaltır.



Şekil 1.2. Üriner sistem (19)

Mesane dört tabakadan oluşmaktadır.

- 1- Epitelyum:** Değişici epitel veya ürotelyum olarak adlandırılır ve mesanenin iç yüzeyini kaplar. Mesane kanserlerinin çok büyük bir kısmı bu hücrelerden köken almaktadır. Uretra, üreterler ve böbreklerin toplama kanalları da değişici epitel ile kaplanmıştır ve bu bölgelerde görülen kanser tipleri de mesanede görülen kanser tipleri ile benzerlik gösterir.
- 2- Lamina propria:** Epitelyum altında yer alan Lamina propria bağ doku ve kan damarlarından oluşan bir tabakadır. Lamina propria içinde ince ve genellikle sürekli olmayan musküler mukoza olarak adlandırılan düz kas tabakası yer alır.
- 3- Muscularis propria:** Düz kas hücrelerinden oluşan bu kalın kas tabakası mesane duvarını oluşturmaktadır.
- 4- Perivesikal yumuşak doku:** Bu en dışta yer alan tabaka yağ, fibröz doku ve kan damarlarından oluşmaktadır.

Bu tabakaların bilinmesi, tümörün mesanede ne kadar invazyon gösterdiğini belirlemekte ve kanseri derecelendirmekte oldukça önemli olmaktadır.

### **1.6. Mesane Kanserlerinin Sınıflandırılması**

Mesane kanserlerinin histolojik derecesi, tümörün mesane duvarına penetrasyonunun derinliğine dayanmaktadır. Bu, lezyonun prognozunun belirlenmesinde en önemli faktördür (5).

Mesane kanseri olgularının en sık rastlanan tipi (% 85) mesanenin değişici epitel hücre (TCC: Transitional Cell Carcinoma) karsinomudur, daha az sıklıkta ise yassı (Squamous) hücre karsinomu (% 5) ve adenokarsinoma (% 1) gözlenmektedir. Mesanenin değişici epitel hücre karsinomalarının iki farklı klinik fenotipi gözlenir (20, 21). Çoğunluğu oluşturan ilk fenotip (yaklaşık % 80) düşük dereceli invaziv olmayan lezyonlar halindedir (yüzeyel mesane kanserleri) ve lokal olarak ortaya çıkarlar. Bu tip kanserlerde progresyon nadiren gerçekleşir. Diğer fenotip daha nadir görülen (% 20) kasa invaze olan mesane kanserleridir ve bu tipte progresyon çok hızlı gerçekleşir (21).

UICC (Union Internationale Contre le Cancer: Uluslararası Kanserle Savaş Birliği) ve WHO (World Health Organization) kriterlerine göre mesane kanserleri patolojik evre ve histolojik derecelerine göre sınıflandırılmaktadır. Mesane kanserlerinin patolojik evrelerine göre sınıfları ve özellikleri tablo 1.3' te özetlenmiştir. Patolojik evre TNM (Tumor Node Metastasis) sistemi ile belirlenmektedir (22). Histolojik olarak ise mesane kanserleri derece I, II ve III olarak sınıflandırılmaktadır.

#:

**Tablo 1.1.** Mesane Kanserlerinin Patolojik Evrelerine Göre Sınıfları Ve Özellikleri

Patolojik Evre	Özellikleri
<b>Ta</b>	Tümör epitelde sınırlı
<b>Tis</b>	İn situ: yassı tümör
<b>T1</b>	Tümör Lamina propria'ya ilerlemiştir
<b>T2</b>	
<b>T2a</b>	Tümör kas dokunun %50'den azına invaze olmuştur
<b>T2b</b>	Tümör kas dokunun %50'den fazlasına invaze olmuştur
<b>T3</b>	
<b>T3a</b>	Tümör mikroskopik olarak adventisyaya invaze olmuştur
<b>T3b</b>	Tümör makroskopik olarak adventisyaya invaze olmuştur
<b>T4</b>	Komşu organlar; periferik yağ doku
<b>T4a</b>	Prostat, uterus, vajina vb. invazyonu
<b>T4b</b>	Pelvik duvar, abdominal duvar invazyonu

### 1.7. Mesane Kanserinde Genetik Değişimler

Mesane kanseri oluşumu ve prognozunda çoklu gen değişimleri rol oynamaktadır. Farklı kromozom kolları ile ilişkili birçok değişim saptanmıştır. Moleküler değişimler en sıklıkla 1, 3p, 4, 5q, 6q, 7, 8, 9p, 9q, 10q, 11p, 13q, 14q, 16, 17p ve 18q'da gözlenmiştir (11, 12). Mesane kanserlerinin farklı dereceleri ile ilişkili olarak en sık rastlanan genetik değişim 9p ve/veya 9q da heterozigosite kaybı (LOH: Loss Of Heterozigosity) olup, mesane kanserlerinin % 60-70'inde tanımlanmıştır (11, 23). Kromozom 9'da lokalize olan tümör baskılayıcı genler olan p15 (INK4A), p16 (INK4B) ve p14 (ARF)' ün, mesane karsinogenezinde erken evrelerde anormal üroepitelyal proliferasyon ve farklılaşmadan sorumlu olabileceği ileri sürülmektedir (24, 25, 26). Aktin hücre iskeletinin düzenlenmesinde işlev gören gelsolin geni de 9q33'te yer almaktadır ve tümör baskılayıcı işlevi mesane kanseri hücre hatlarında in vitro ve in vivo olarak gösterilmiştir. 9. kromozomda yer alan ve mesane kanseri gelişimi ile ilişkisi tanımlanan bir diğer gen, protein ürünü hücre



döngüsünün düzenlenmesinde fonksiyon gören CDKN2 $\alpha$  (Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2 $\alpha$ ) genidir (27, 28, 29).

Mesane kanseri progresyonunda fonksiyon gören bir diğer tümör baskılayıcı, 17p'de yer alan p53 proteindir. p53 geninin mutasyonları kasa invaze olan tümörlerin yaklaşık % 50'sinde ve CIS+ (Carcinoma in Situ +) TCC' lerde belirlenmiştir. p53 inaktivasyonu ile bozulan genetik instabilitenin progresyonun hızlanmasından sorumlu olduğu düşünülmektedir (30, 31). 13q da yer alan RB (Retinoblastoma) geninin mesane kanseri ile ilişkisi gösterilmiştir (20, 30).

9. kromozomdaki değişimler dışında diğer kromozomlardaki değişimler daha çok kasa invaze olan tümörlerde görülmektedir (14, 32).

Glioblastomaların yaklaşık % 90'ında ve astrositik tümörlerin çoğunda 10. kromozomun q kolunda delesyonlar saptanmıştır. Bu sonuçlar 10. kromozomun q kolunda bir tümör baskılayıcı genin varlığına işaret etmiştir. 1997 yılında farklı teknik ve yaklaşımlarda bulunan üç ayrı grup birbirine yakın zamanlarda bu bölgedeki tümör baskılayıcı geni izole etmişlerdir. Bu gen üç farklı grup tarafından PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog deleted from Chromosome Ten) /MMAC1 (Mutated in Multiple Advanced Cancers 1) /TEP1 (TGF $\beta$  regulated and Epitelial cell enriched Phosphatase 1) şeklinde isimlendirilmiştir (26, 27). Proteinin yapı ve fonksiyonunu en iyi açıklayan isim PTEN olduğu için 1999 yılından itibaren literatürde çok daha sık kullanılmaya başlanmıştır. Klonlanan PTEN geninin kromozomal lokalizasyonu 10q23.3 belirlenmiştir (25, 26, 27, 28, 29).

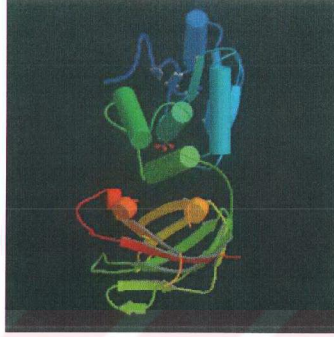
PTEN geninde heterozigosite kaybı mesane kanserlerinde görülen bir diğer genetik değişimdir (11, 32). 10q'da heterozigosite kaybı da daha çok kasa invaze olan TCC'lerde görülmektedir ve genellikle ileri evrelerde gerçekleşmektedir (12, 32). Mesane kanserinin aksine endometriyal karsinogenez ve diğer bazı kanser tiplerinde 10q'da LOH ile PTEN inaktivasyonu, erken evrelerde ortaya çıkmaktadır (32, 33).

### 1.8. Tümör Baskılayıcı Gen PTEN ve Ürünü

PTEN fosfolipid fosfataz olarak tanımlanan ilk proteindir (34). Transkripsiyonu TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor- $\beta$ ) tarafından düzenlenen PTEN geni 403 amino asitlik bir peptid kodlar ve bu proteinin moleküler ağırlığı yaklaşık 55 kD'dur (24, 34, 35, 36, 37). *C.elegans* hariç bilinen tüm PTEN ortologları yaklaşık 40-50 kD'luk proteinler kodlamaktadır ve memeli PTEN proteinleri oldukça büyük benzerlik göstermektedirler. (27). Bu güne kadar bildirilen tek PTEN homoloğu testise özgül bir protein olan PTEN2'dir. Bununla beraber PTEN ve PTEN2 dışında C-terminal varyantı PTEN homologları olabileceği ileri sürülmektedir (26, 38, 39).

PTEN proteininin kristal yapısı Lee ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. PTEN, protein tirozin fosfatazlara özgül bir fosfataz bölgesi ve PIP3 (fosfoinozitol 3,4,5-trifosfat)'lara bağlanabilen bir katalitik bölge içerir (24, 26, 40). PTEN' in protein tirozin fosfataz domaini IHCKAGKGRTG motifi içerir. Bu motif PTEN gibi hem lipid hem de proteinler üzerine etkili fosfatazlara özgüdür (27, 41, 42). PTEN' in fosfolipidlerle bağlanabilen bir diğer majör domain, C2 domainidir. Katalitik domainin PIP3' lar ve diğer substratlarla ilişkiye girmesini düzenler. PTEN proteininin N-terminalinde, bir hücre iskeleti proteini olan tensin ve sinaptik veziküllerin taşınmasında işlev gören oksiline homoloji gösteren yaklaşık 175 amino asitlik bir bölgesi bulunmaktadır (26, 34). Bu bölgenin biyolojik işlevi henüz

tam olarak aydınlatılmamış olmakla beraber hücre adezyonu ve göçünde işlev gördükleri düşünülmektedir (25, 26, 43).



**Şekil 1.3.** PTEN Proteinin Üç Boyutlu Yapısı (44)

PTEN proteini, lokalizasyonunu sağlayan birçok farklı motifi içerir. Memeli, kurbağa, solucan ve maya PTEN proteininin ortak olduğu düşünülen ve N-terminal bölgede yer alan PIP2 (fosfatidilinozitol 4,5-bifosfat) bağlayıcı bir motifleri (Lizin/Arjinin-X4-Lizin/Arjinin -X- Lizin/Arjinin - Lizin/Arjinin) bulunmaktadır (42, 45). Bu motif genellikle aktini organize eden proteinlerde yer almaktadır. Buna ek olarak PTEN' in C terminal segmentinde iki PEST homoloji bölgesi ve bir PDZ-bağlayıcı bölge (Threonin/Serin-X-Valin-COOH) bulunmaktadır. PTEN proteinindeki bu bölgelerin protein-protein interaksiyonlarını sağladığı düşünülmektedir (25, 42, 46).

Rekombinant PTEN' in enzim karakteri fosforile peptid ve protein substratları ile test edildiğinde zayıf bir katalizör olduğu görülmüştür. Denenen birçok substrat içinde sadece yüksek asiditeye sahip poly(Glu4)Tirozin, belirgin bir şekilde defosforile olmaktadır. PTEN özgül bir şekilde PIP3'ü D3 pozisyonundaki inozitol

halkasından defosforile etmekte ve PIP3 yaşam ve büyüme sinyali regülasyonunda kritik rol oynamaktadır (12, 47). Bir serin/threonin protein kinaz olan PDK1 (3- Phosphoinositid Dependent Protein Kinase 1) ve onun devamındaki AKT (Protein Kinase B) üzerine doğrudan etkilidir. PTEN overekspresyonu AKT aktivitesinin downregülasyonu ile sonuçlanmaktadır (48, 49).

PTEN proteininin C terminal kuyruğundaki 380. aminoasit serin, 382. ve 383. aminoasitler threonin'dir (50). Bu üç aminoasit ve diğer birçok serin ve threonin rezidularının PTEN' in enzimatik aktivitesi ve stabilitesini sağladığı mutagenез çalışmaları ile gösterilmiştir (24, 51). C terminal kuyruğun defosforilasyonu veya delesyonu fosfataz aktivitesinin artışı ve proteinin hızla parçalanması ile sonuçlanmaktadır (26). C terminaldeki serin-threonin rezidularının fosforilasyonunu düzenleyen enzim CK2 (Kazein Kinaz II), proteozom bağımlı degradasyona karşı PTEN stabilitesini sağlamaktadır. C terminal kuyruğundaki PDZ domain, PTEN' in altında yer alan AKT sinyal yolu gibi hedefler üzerindeki etkisini dengelemekte ve AKT sinyal yolu gibi bir diğer yol aracılığı ile işlev gördüğü düşünülmektedir (24, 40, 45, 52).

PTEN geni karsinogenezin erken çevrelerinde ve ilerlemiş kanserlerde mutasyona uğramaktadır (26, 52). PTEN mutasyonlarının çoğu PTEN proteininde kısalma ile sonuçlanan nonsense, çerçeve kayması veya splicing mutasyonlarıdır (54). PTEN' in N terminal bölgesindeki mutasyonlar hiperplazi ve fosfataz domaindeki mutasyonlar ise çoğunlukla malign büyüme ile ilişkili bulunmuştur. (27).

PTEN mutasyonları ve p27<sup>KIP1</sup> veya Wnt1 (Wingless and Int) mutasyonları arasındaki ilişkinin onkogenezi uyardığı, PTEN' in ekstraselüler matriksle hücreler arası interaksyonu düzenleme

işlevinin ise kanserin ileri evrelerinde önemli olduğu düşünülmektedir (26, 51, 55). Hücrenin matriks proteinleri ile ilişkisinde ve hücre adhezyonundaki değişimler bu hücrenin invazyon ve metastazında veya apoptozise uğramasında önemli bir basamağı oluşturmaktadır. Bu değişimlerde PTEN kaybının merkezi bir rol oynadığı gösterilmiştir (26, 51, 56, 57).

### 1.8.1. PTEN Sinyal Yolu

Bir fosfataz enzimi olarak görev yapan PTEN, PIP3' leri PIP2'lere parçalar. PI3K (Fosfoinositid-3 Kinaz) bir protoonkogen ürünüdür. (58, 59). PI3K inozitol fosfolipidlerin D-inozitol halkasını D3 hidroksil grubundan fosforilleyerek PIP2 ve PIP3'leri oluşturmaktadırlar. PI3K'ların memeli hücrelerinde üç sınıf altında incelenen birçok izoformu bulunmaktadır. D3 pozisyonundan fosforillenen fosfoinositidler plekstrin homoloji domaini içeren sinyal proteinlerine yüksek afiniteyle bağlanarak bu proteinlerin hücre membranına akümüülasyonunu sağlamaktadırlar (47). Bu şekilde sinyal proteinlerinin aktivasyonu uyarılmaktadır. Ayrıca fosfotirozin bağlayıcı domain içeren Shc (SH2-containing collagen-related proteins) ve IRS-1 (Insulin Receptor Substrate) gibi proteinler, SH2 (Src-homology 2) domaini içeren SRC (Steroid Receptor Coactivator), p85 ve PLC- $\gamma$  (Phosphalipase C- $\gamma$ )'da fosforillenmiş fosfoinositidler ile bağlanabilmektedir. PI3K aynı zamanda bir serin/threonin kinaz olarak da fonksiyon görmektedir (23, 59, 60, 61). PI3K ile indüklenen mitozda fonksiyon gören AKT, PKC (Protein Kinase C), p70<sup>s6k</sup> ve MAPK (Mitogen-activated Protein Kinase) gibi sinyal moleküllerini fosforilleyerek aktive edebilmektedir. Ancak PTEN proteininden etkilenen tek sinyal yolunun AKT sinyal yolu olduğu düşünülmektedir (23, 62, 63).

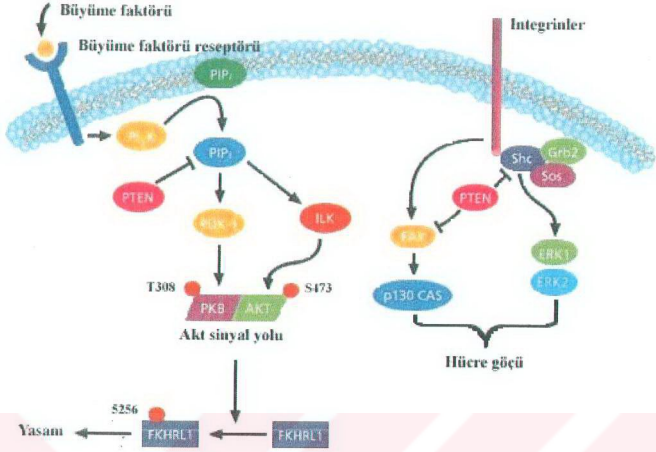
PIP2' lerin hücre içinde birikmesi bir serin-threonin kinaz olan AKT' nin aktivasyonunu engelleyerek hücrenin çoğalma ve bölünme

eğilimini yavaşlatır ve hücrenin apoptoziye uğramasına neden olurlar (34, 64).

Bir protoonkogen olan AKT ürünü çeşitli büyüme faktörleri tarafından aktive edilen sitozolik bir enzimdir (34, 58). AKT' nin aktivasyonu hücrede PIP3 birikimine bağlıdır. PIP3, AKT gibi plekstrin homoloji domaini içeren proteinlerin hücre membranına translokasyonu veya aktivasyonunda işlev gören bir ikincil mesajcıdır (34, 43, 65). PTEN' in normal işlevini kaybetmesi, PIP3'lerin parçalanmadan birikmelerine neden olmaktadır. Bu birikim sonucu aktif hale geçen PDK 1 ve 2 enzimleri AKT' yi fosforile ederek aktif hale geçirirler. AKT; Bad, GSK-3 $\beta$  (Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$ ), Forkhead transkripsiyon faktörleri ve VEGF gibi birçok sitokini fosforile ederek aktive eder (58, 66, 67). Bu şekilde hücre büyümesini ve bölünmesini stimüle ederken apoptozisi de inhibe eder. Aktive olan AKT' nin aşırı ekspresyonu sonucu hücreler transformasyona uğramaktadır (68-71).

PTEN' in tümör baskılayıcı işlevi hücre döngüsünün G1'de durdurulması ve apoptozisin başlatılması, defosforile haldeki AKT sinyal yolu ile gerçekleşir (72, 73). PTEN proteini ve fosfo-AKT'nin hücre içindeki konsantrasyonları ters orantılıdır (64). Hücre döngüsünün G1'de durdurulması ve apoptozisin başlatılması PTEN ve AKT dışında birçok element içerir (27, 62).

PTEN proteinin ikincil işlevi protein fosfataz aktivitesidir ve hedef proteinler hücre adezyon ve göçünde işlev gören FAK (Focal Adhesion Kinase) ve adaptör molekül Shc' dir (72, 74, 75, 76). PTEN, FAK ve Shc'nin defosforilasyonunun kontrolünde işlev görmektedir (26, 27, 62, 77). PTEN' in adhezyona etkisi FAK ve Shc dışında birçok molekülün yer aldığı kompleks bir yol izlemektedir (56, 76, 78).



**Şekil 1.4** PTEN Sinyal Mekanizması

PTEN'in tümör progresyonu ile bir diğer önemli ilişkisi anjiogeneze olan etkisidir. Endotelial hücrelerde PTEN aşırı ekspresyonunun VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)'in antiapoptotik, proliferatif ve kemotaksik etkilerini baskıladığı gösterilmiştir. PTEN'in VEGF sinyal yolunda düzenleyici işlev gördüğü düşünülmektedir. Kanserde anjiogenezi baskılamak için bir terapötik olarak kullanılabilceği öne sürülmektedir (79, 80).

PTEN' in somatik mutasyonları, glioblastoma, melanoma, prostat, meme, endometriyum, akciğer ve tiroit kanserleri gibi çok çeşitli insan tümörlerinde gösterilmiştir (25-27, 32, 81-83). Ayrıca PTEN' in germ-line mutasyonları CD (Cowden Disease) hastalarının % 80'inde, LDD (Lhermitte-Duclos Disease), Bannayan-Zonana sendromlu hastaların % 60'ında ve ailesel kanser predispozisyon sendromlarında gösterilmiştir (25-27, 32, 84, 85). Yine CD, LDD gibi kalıtsal hastalıklarda meme ve tiroid kanseri riskinin çok artması

PTEN mutasyonlarının tümör oluşumunda rol oynadığını kanıtlamıştır. Fare modellerinde de çok çeşitli dokularda heterozigot PTEN delesyonunun hiperplastik veya displastik değişimlere sebep olduğu gösterilmiştir (27, 84, 85).

PTEN inaktivasyonunda epigenetik faktörlerin de rol oynadığı belirlenmiştir (25, 86). PTEN ile ilgili ilk bilgiler sadece mutasyon analizlerine dayanmaktadır. Ovaryum kanserlerinin % 27'sinde PTEN protein ekspresyon kaybına bağlı olarak, PTEN inaktivasyonu gerçekleşmektedir. PTEN ekspresyonu olmayan ovaryum adenokarsinomlarının sadece % 8'inde LOH veya mutasyon gözlenmiştir (9). Bu durum PTEN transkripsiyonunu durduran ve aktivitesini değiştiren epigenetik faktörlerin varlığını doğrulamaktadır (87, 88).

PTEN gen işlevinin diğer sinyal oluşturucu yollarla etkileşimi sonucu hücre tipine veya doku tipine göre farklılık gösterir (11, 87). Ovaryum kanserinde PTEN'in downstreamında yer alan AKT gibi effektörlerin PTEN işlevini etkilediği belirlenmiştir. PTEN ekspresyonu üzerine etkili bir diğer faktör de endokrin sistemdir. Normal endometriyal glandlarda PTEN ekspresyonu menstural siklusun evrelerinde farklılık göstermektedir (87).

PTEN normal embriyonik gelişimin düzenlenmesinde de işlev görmektedir. PTEN protein düzeyi embriyonik gelişimin ilk 11. gününe kadar oldukça düşüktür. Embriyonik gelişim süresince PTEN miktarı birçok dokuda artmaktadır (26). PTEN' in keşfinden sonra proteinin in vivo işlevini göstermek için birçok PTEN knock-out fare çalışması yapılmıştır ancak bu knock-out farelerin hepsi doğumdan önce ölmüştür (26, 59, 70, 89). PTEN  $-/-$  fare embriyo fibroblastları ile yapılan bir çalışmada ultraviyole, TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ), heat shock gibi uyarılara karşı bu hücrelerde



apoptozise hassasiyetin azaldığı, bu hücrelerde yabancı tip PTEN ekspresyonu yeniden sağlandığında ise bu hassasiyetin yeniden düzenlendiği görülmüştür. Bu durum PTEN' in embriyogenez için vazgeçilmez olduğunu göstermektedir (26, 43, 90).

### **1.9. Mesane Kanseri ve PTEN**

Tümör baskılayıcı PTEN geninin inaktivasyonu glioblastoma, endometriyum, prostat ve diğer birçok kanser tipinde gösterilmiştir (83, 86, 91, 92, 93). İnaktivasyonun endometriyal karsinogenezde erken evrelerde ortaya çıkarken glioblastoma, prostat ve diğer birçok kanser tipinde ileri evrelerde ortaya çıktığı sitogenetik ve moleküler analizlerle gösterilmiştir (11, 86, 94, 95).

Mesane kanseri ile yapılan sitogenetik çalışmalarla 10. kromozomdaki delesyonlar belirlenmiş ve bazı olgularda spesifik 10 q delesyonları saptanmıştır. Mesane tümörlerinde 10q'da heterozigosite kaybı % 5-7 sıklıkla görülmektedir (32). Cairns ve arkadaşlarının yaptığı çalışma ile mesane tümörlerinde patolojik evrelere göre, Ta tümörlerin % 8'inde, T1 tümörlerin % 20 ve T2 tümörlerin % 29'unda 10q'da LOH tanımlanmıştır. Bu çalışmada 10q da delesyon görülen mesane primer tümörlerinde PTEN kodlayan bölge mutasyonlar için taranmıştır ve mutasyon bulunan tümörlerin histolojik derecelerinin II veya III olduğu belirtilmiştir (31). Bu bulgular mesane kanseri gelişiminde 10q'da heterozigosite kaybının önemli bir rol oynadığını göstermiştir. Araştırmacılar LOH yanı sıra PTEN geninin mutasyon veya epigenetik faktörlerin etkisi ile inaktivasyonunun mesane kanserinin ilerlemesinde işlev gördüğünü düşünmektedir (31).

Aveyard ve arkadaşlarının çalışması ile 10q23 bölgesinde LOH'un kas invaziv mesane tümörlerinde daha sık görüldüğü saptanmıştır. pT2 ve daha ileri evre tümörlerde LOH veya allélik imbalansın tümörlerin % 32'sinde ve yüzeysel (Ta/T1) tümörlerin

sadece % 6.6'sında görüldüğü belirtilmiştir. Bu çalışmada primer tümörlerde ve mesane kanseri hücre hatlarında SSCP analizi ile mutasyon taraması yapılmıştır. Hücre hatlarında PTEN geninin tamamını veya bir parçasını içeren delesyonlar ve iki primer tümörde delesyon saptanmıştır. Bu bulgular PTEN geninin inaktivasyonunda delesyonla gen kaybının sık rastlanan bir mekanizma olduğunu göstermiştir. 10q'da LOH ile kaybedilen tek gen PTEN olmayabilir ancak hücre hatlarında saptanan gen içi delesyonlar PTEN'in ileri evre mesane tümörlerinin gelişiminde işlev gören önemli bir tümör baskılayıcı gen olduğunu doğrulamaktadır (32, 81).

TCC hücre hatlarında PTEN genini inaktive eden mutasyonların araştırıldığı bir çalışmada, 11 hücre hattının 3'ünde PTEN lokusunda mutasyon saptanmıştır. PTEN inaktivasyonu veya delesyonu saptanan TCC hücre hatlarının T3 ve T4 evrelerinde olduğu belirtilmiştir. Erken evre hücre hatlarında mutasyon saptanamamıştır. Bu bulgu PTEN mutasyonlarının geç evrede ortaya çıktığını gösteren daha önceki bulgularla uyum sağlamaktadır (30).

2000 yılında yapılan bir başka çalışma ile PTEN genindeki değişimlerinin, ileri evre invaziv tümörlerde, toplam frekansı % 23 (8/35) olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada daha önceki çalışmalardan farklı olarak 10q da PTEN gen lokusuna çok yakın bir bölgede bulunan MXI1 geni de mutasyonlar açısından taranmıştır. MXI1 10q24-45'de lokalize olmuştur. Bu gende mutasyon sadece iki hücre hattında saptanmıştır. Mesane tümörlerinde bu genin ekzonlarında herhangi bir sekans değişimine rastlanmamıştır. Bu bulgu MXI1 geninin mesane tümörlerinde 10q da kaybedilen kritik bölgede yer almadığını göstermektedir, oysa prostat kanserlerinde MXI1 geninin mutasyon sıklığının oldukça yüksek olduğu daha önceki çalışmalar ile saptanmıştır. Bu çalışmada mesane hücre hatlarında ve tümörlerinde LOH'a ek olarak PTEN mutasyonları tanımlanmış ve

sadece mesane kanseri hücre hatlarında Western-blot yöntemi ile PTEN ekspresyonu araştırılmıştır. Güdük veya anormal bant veren PTEN proteinine rastlanmamıştır. Paneldeki iki prostat ve iki mesane hücre hattında PTEN ekspresyonu kaybı belirlenmiştir. Ekspresyon kaybının PTEN geninin tamamının veya bir parçasının delesyonu sonucu olduğu düşünülmektedir (12).

Yapılan bir başka çalışma ile mesane kanseri hücre hatlarında adenoviral vektör yoluyla PTEN ekspresyonu arttırılmış ve hücre döngüsü ve büyümenin baskılanması üzerine etkileri araştırılmıştır. Kanser tedavisinde en önemli klinik problemlerden biri ilaca dirençli tümörlerin kemoterapiye cevap vermemesidir. Bu çalışmada kemoterapötik olarak kullanılan doksorubisine dirençli mesane kanseri hücre hattı UM-UC-6dox'da PTEN ekspresyonunun kemosenitiviteye etkileri belirlenmiştir. Sonuda Ad-MMAC ile infekte edilen UM-UC-6dox hücrelerinin doksorubisine 3.6-4.2 kat daha fazla hassasiyet gösterdiği saptanmıştır (11).

Elde edilen veriler PTEN geninin ilaca dirençli mesane kanserlerinde PI3K sinyal yolu ile AKT fosforilasyonunu azaltarak doksorubisinin toksik etkisini arttırdığını göstermektedir. Araştırmacılar PTEN geninin ve sinyal yolunun mesane kanserinde tam olarak aydınlatılmasının bu kanserlerde yeni terapötik hedeflerin belirlenmesinde önemli olacağını ne sürmektedirler (11, 96).

PTEN' in mesane kanserlerinde moleküler ve işlevsel analizleri oldukça sınırlıdır ancak yapılan çalışmalar özellikle geç evre mesane tümörlerinde PTEN' in önemli rol oynayan bir tümör baskılayıcı gen olduğunu göstermektedir (31). PTEN proteininin geç evre mesane tümörlerinde rol oynuyor olması özellikle migrasyon ve invazyonda önemini göstermektedir. Kas invaziv tümörlerde PTEN işlevinin ne zaman kaybedildiği ayrıca PTEN' in tek alelinin kaybının hücreye

etkisi mesane kanserlerinde tam olarak henüz bilinmemektedir (12, 97). PTEN'in etki mekanizmalarının aydınlatılması mesane kanseri ilerlemesinin mekanizmalarının anlaşılmasına ve tedavi için yeni hedeflerin bulunmasına öncülük edecektir.



## MATERYAL VE METOD

Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı tarafından mesane kanseri tanısı ile Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'na gönderilen 31 hastada mesane tümör ve kontrol materyalinde Western-blot yöntemi ile PTEN proteininin ekspresyonu belirlenmiştir.

### 2.1. Tümör Ve Kontrol Materyallerinin Western-Blot Yöntemi İçin Hazırlanışı

#### 2.1.1. Kullanılan Solüsyonlar

##### 2.1.1.1. Triton-X-100 Tamponu

Triton-X-100 tamponu dokunun ve hücrenin parçalanmasını sağlayan deterjan olup proteinlerin stabilizasyonunu sağlayan tuzları ve proteinlerin parçalanmasını engelleyen Aprotinin, Pepstantin A, ve Leupeptin gibi birçok proteaz inhibitörünü içeren bir tampondur. Tümör ve kontrol dokuları bu tampon içerisine alınarak homojenizasyon yapıncaya kadar -80 C°'de saklandı.

Triton-X-100 tampon içerisinde bulunan kimyasal maddeler ve konsantrasyonları aşağıda verilmektedir.

NaF (Sodyumflorid) (Sigma)	100 mM
Hepes (N-(2-hidroksietil)piperazin-N-(2-etan-sulfonikası)) (Sigma)	50 mM
NaCl (Sodyumklorür) (Sigma)	150 mM
Gliserol (Sigma)	%10

Triton-X-100 (Sigma)	%1,2
MgCl <sub>2</sub> (Magnezyumklorid) (Sigma)	1 mM
EGTA (Etilenbis(oksietilennitrilo)tetraasetikasit) (Sigma)	1 mM
PMSF (Fenilmetansulfonilflorid) (Sigma)	1 mM
Sodyumortovanadat (Sigma)	1 mM
Sodyum-Pirofosfat (Sigma)	10 mM
Leupeptin (Sigma)	10 µg/ml
Aprotinin (Sigma)	10 µg/ml
Pepstantin A (Sigma)	1 µg/ml

4,199g NaF, 13,015g HEPES, 8,766g NaCl, 0,09521g MgCl<sub>2</sub>, 0,3804g EGTA, 0,1742g PMSF, 0,1839g Sodyumortovanadat, 4,461g Sodyum-Pirofosfat, tartılıp, 500 ml bidistile suda çözüldü. 10 mg/ml'lik stoktan 1ml Leupeptin, 10 mg/ml'lik stoktan 1ml Aprotinin, 10 mg/ml'lik stoktan 100 µl Pepstantin A, 100 ml % 10'luk Gliserol ve 12 ml Triton-X-100 eklendikten sonra son hacim 1 litre olacak şekilde bidistile su ile tamamlandı. Küçük hacimlere bölündü ve -20 °C'de saklandı.

### 2.1.2. İşlemler

Tümör ve kontrol materyalleri Triton-X-100 tampon içerisine alındı. Örnekler, içerisindeki proteinlerin parçalanmasını engellemek için taşıma işlemleri de dahil deneyin tüm aşamalarında buz içerisinde tutuldu.

1. Doku Triton-X-100 tamponu içinde lanset yardımı ile parçalandı.
2. El homojenizatörü ile homojenize edildi. Homojenize edilen materyal ependorf tüplerde 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek dökelti alındı, örnek içerisindeki büyük

doku parçaları bu yıkama işlemi ile uzaklaştırıldı. Bu işlem berrak ve partikül içermeyen örnek elde edilinceye kadar tekrarlandı.

3. Elde edilen bu örnekte protein miktarı tayin edildi.

## **2.2. Tümör Materyalinde Protein Miktar Tayini ve Standart Grafik Hazırlanışı**

Protein miktar tayini BSA (Bovine Serum Albumin) ile hazırlanan standart grafik kullanılarak yapıldı. Miktar tayini için BioRad marka Protein Assay Kit kullanıldı.

### **2.2.1. Kullanılan Solüsyonlar**

#### **2.2.1.1. Stok BSA (Bovine Serum Albumin) (Sigma)**

0.1 gram toz BSA tartılıp ve son hacim 10 ml olacak şekilde bidistile suyla tamamlandı. -20 °C'de saklandı.

#### **2.2.1.2. Protein Assay Kit (BioRad)**

Kit bidistile su ile 1/5 oranında seyreltilerek hazırlandı ve her 1 µl protein için 1 ml kit kullanılarak Shimadzu marka spektrofotometrede 595 nm'de absorban değerleri ölçüldü.

### **2.2.2. Standart Grafik Hazırlanışı**

1. Stok BSA 10 kez sulandırıldı.
2. Bu çözeltilerden 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15 µl alınarak 8 adet ependorf tüpe kondu. Tüm bu işlemler buz içinde yapıldı.
3. Her tüpe 1/5 sulandırılan BioRad kitinden 1 ml eklenip, 595 nm'de verdikleri absorban değerleri spektrofotometrede okundu.

4. Standart grafik elde edilen bu değerlere göre X ekseninde protein miktarı= $\mu\text{g}/\text{ml}$  ve Y ekseninde absorbands değerleri olacak Şekilde milimetrik kağıda çizilerek hazırlandı.

### **2.2.3. Tümör Materyalinde Protein Miktar Tayini**

1. Tümör ve kontrol örneklerinden 1  $\mu\text{l}$  ependorf tüpe konuldu.
2. Üzerlerine 1 ml kit konularak 5 dakika inkübe edildi.
3. Inkübasyon süresi sonunda absorbands değerleri spektrofotometrik olarak ölçüldü.
4. rnek içerisindeki protein miktarı hesaplandı. Standart grafikte örneğin verdiği absorbands değerine karşılık gelen  $\mu\text{g}/\text{ml}$  cinsinden BSA miktarı örneğin içerdiği protein miktarını vermektedir.
5. Yükleme miktarı hesaplandı. Her bir örnekten 100  $\mu\text{g}$  protein içerecek kadar örnek 2.6 ile 40  $\mu\text{l}$  arasında deęiŐen miktarlarda jele yüklendi.

## **2.3. Western-blot**

### **2.3.1. Protein Elektroforezi**

#### **2.3.1.1. Kullanılan Solüsyonlar**

##### **2.3.1.1.1. Ayrıştırma Jeli Tamponu (Resolving Buffer)**

Son konsantrasyon 1.5 M olacak Şekilde 181,65 g Tris baz (Sigma) tartılıp 800 ml bidistile su içinde üzüldü. 1 M'lık Asit kullanılarak  $\text{pH}=8.8$ ' e ayarlanıp, hacim bidistile su ile 1 litreye tamamlandı ve oda sıcaklığında saklandı.



### **2.3.1.1.2. Yükleme Jeli Tamponu (Stacking Buffer)**

Son konsantrasyon 0.5 M olacak şekilde 60,55 g Tris baz tartılıp 800 ml bidistile su içinde çözüldü. 1 M'lık Asit kullanılarak pH=6.8'e ayarlanıp hacim bidistile su ile 1 litreye tamamlandı ve oda sıcaklığında saklandı.

### **2.3.1.1.3. 10X Elektroforez Tamponu**

15 g Tris baz, 94 g Glisin (Sigma) tartılıp 500 ml bidistile su ile çözüldü, 50 ml %10 SDS eklendikten sonra son hacim 1 litre olacak şekilde bidistile su ilave edildi.

### **2.3.1.1.4. 2X Yükleme Tamponu**

1 ml Gliserol (Sigma)

3 ml %10 SDS (Soydum Doedesil Sülfat) (Boehringer Mannheim)

1.25 ml (1M) Tris-HCl pH=6.7

20 µl Bromfenol mavisi (Sigma)

0.5 ml β-Merkaptoetanol (Sigma)

Gliserol, SDS, Bromfenol mavisi ve β-Merkaptoetanol 15 ml'lik tüplerde karıştırıldı, enjektöre çekilerek 0.22 µm'lik filtreden geçirilerek partikül içermemesi sağlandı ve yaklaşık 1ml'lik miktarlarda ependorflara bölünerek -20 °C'de saklandı.

### **2.3.1.1.5. Akrilamid**

29 g Akrilamid (Sigma)

1 g N'N' bis (Sigma)

100 ml bidistile suda çözülerek hazırlandı ve aliminyum folye ile sarılarak +4 °C' de muhafaza edildi.

### **2.3.1.1.6.%10 SDS**

10 g SDS 100 ml bidistile suda 68 °C' de çözümlüp 1 M' lık baz (NaOH) veya asit (HCl) kullanılarak pH:7.2' ye ayarlandı ve oda sıcaklığında saklandı.

### **2.3.1.1.7. %10 APS**

10 g APS (Amonyumpersülfat) (Sigma) 100 ml bidistile suda çözümlüp + 4 °C' de saklandı.

### **2.3.1.2. Jellerin Hazırlanışı**

Örnekler ayrıştırıcı jel ve yükleme jelinden oluşan iki fazlı akrilamid jelde elektroforetik olarak yürütüldü. Yükleme jelinin proteinleri ayrıştırma özelliği yoktur, örnek içindeki tüm proteinler bu jelden geçerek eş zamanlı olarak ayrıştırma jeline ulaşırlar. Bu şekilde yükleme süreleri arasındaki farktan doğabilecek deneysel hata da en aza indirildi.

Jellerin hazırlanmasına geçilmeden önce jelin döküleceği camlar hazırlandı. Cam yüzeyinde kalacak herhangi bir partikül jelin homojen bir şekilde polimerleşmesini engelleyebileceği ve jel yüzeyinde kalacak su jelin konsantrasyonunu değiştirebileceği için camlar sabunlu gazlı bez ile iyice temizlendi ve distile suyla yıkanıp kurulandı.

#### **2.3.1.2.1. %10'luk Ayrıştırıcı Jel (Resolving Jel)**

7.7 ml Su

5 ml Ayrıştırma Tamponu

7 ml Akrilamid

0.2 ml %10'luk SDS

0.2 ml %10'luk APS

20 µl TEMED (N,N,N',N'-Tetrametiletildiamine) (Sigma)

Tüp içinde karıştırılarak hazırlandı. TEMED polimerizasyonu çok hızlandıran bir katalizör olduğu için jel dökülmeden hemen önce eklendi.

#### **2.3.1.2.2. Yükleme Jeli (Stacking Gel)**

3 ml Su

1.25 ml Yükleme Jeli tamponu

0.625 ml Akrilamid

50 µl %10'luk SDS

50 µl %10'luk APS

5 µl TEMED

Tüp içinde karıştırılarak hazırlandı.

#### **2.3.1.3. Örneklerin Yükleme İçin Hazırlanışı**

1. Protein miktar tayini tamamlanan örnekler yüklemeye başlamadan 30-45 dakika önce (-20 °C) dondurucudan çıkarıldı.
2. Donmuş örnekler buz içinde çözüldü. 100 µg protein içerecek kadar örnek pipetle çekilerek 1,5 ml'lik ependorf tüplere konuldu.
3. Üzerlerine gerektiği kadar Triton-X-100 tamponu eklenerek tüm örneklerin aynı hacimde olması sağlandı.
4. Örnek ve tamponun toplam hacmi kadar 2X yükleme tamponu eklendi.
5. Ependorfların kapakları parafilmle kapatıldı ve 3 dakika süreyle kaynar suda bekletildi.
6. Süre sonunda santrifüjde 30 saniye 10000 rpm' de çevrilen örnekler yüklemeye hazır hale getirildi.

#### 2.3.1.4. İşlemler

1. Camlar hazırlandıktan sonra ön ve arka cam arasına 1 mm' lik ayırıcı (spacer) yerleştirildi
2. Alt kısım ve yanlar bantlanıp, iyice yapıştırıldı. Her iki yan sıkıştırıldı ve dikey olarak sabitlendi.
3. Ayırma jeli hazırlandı, pipetle üstten 1 cm boşluk kalacak şekilde yavaşça camlar arasına döküldü.
4. Üst kısımda bırakılan boşluk % 0.1' lik SDS çözeltisi ile dolduruldu. Bu işlem jelin üstünün düzgün olması için pipetle ve yavaşça yapıldı. % 0.1' lik SDS ile jelin hava ile teması engellendi ve jelin düzgün polimerize olması sağlandı.
5. Ayırıcı jel 30-45 dakikalık süre sonunda polimerize oldu.
6. Ayırıcı jel üzerindeki SDS döküldü ve distile su ile birkaç kez yıkandı.
7. Yükleme jeli hazırlanıp, ayırıcı jel üzerine döküldü ve tarak hava kabarcığı oluşturmada yavaşça yerleştirildi.
8. Yükleme jeli 30-45 dakikalık süre sonunda polimerize oldu. Jel donduktan sonra tarak dikkatlice çıkarıldı ve eğer camlar üzerinde jel atığı kalmışsa bir kağıt mendil yardımı ile temizlendi.
9. Camın etrafındaki bantlar çıkarılıp hemen elektroforez tankının içine yerleştirildi. Tank ön (kısa) camın üst seviyesine kadar 1X elektroforez tamponu ile dolduruldu, pipetle tarakların oluşturduğu kuyucuklar temizlendi.
10. İlk kuyucuğa molekül ağırlıkları bilinen proteinleri içeren marker (BioRad) yüklendi.
11. Daha önce protein konsantrasyonu hesaplanmış ve yükleme tamponu eklenmiş tümör ve kontrol örnekleri

her biri 50 veya 100 mikrogram protein içerecek şekilde diğer kuyucuklara yüklendi.

12. Örnekler yükleme jelinde iken akım 80-90 volt ve amper 45mA olacak şekilde güç kaynağı ile ayarlandı. Örnekler ayrışma jeline geçtikten sonra akım 100-110 volta ve amper 55 mA ayarlandı ve yürütme işlemi, örneklerin yürüyüşünü izlememizi sağlayan yükleme tamponu içerisinde bulunan Bromfenol mavisi, cam plakaların altından çıkıncaya kadar sürdürüldü.

### **2.3.2. Membrana Transfer (Islak Transfer)**

#### **2.3.2.1. Kullanılan Solüsyonlar**

##### **2.3.2.1.1. 1X Protein Transfer Tamponu**

3 g Glisin, 5,8 g Tris baz tartılıp 800 ml bidistile su içinde çözüldü, hacim 200 ml Metanol (Merck) ile 1L' ye tamamlandı.

##### **2.3.2.2. İşlemler**

Yürütme işlemi tamamlandıktan hemen sonra proteinlerin jelden membrana transferi işlemine geçildi. Deneyler sırasında PVDF (polivinildifluorid) membran kullanıldı. PVDF membran transfer işlemine geçilmeden 10-30 dakika önce metanol ile ıslatıldı.

1. Cam plakalar elektroforez tankından alındı ve içerisinde 1X protein transfer tamponu bulunan geniş bir kaba kondu. Tüm bu işlemler süresince jelin kurumaması sağlandı.
2. Ön cam ve ayırıcılar dikkatlice tampon içerisinde alındı.
3. Kuyucukların bulunduğu yükleme jeli kesilip atıldı ve jel tampon içerisine alındı.
4. Sandviç arasına ilk önce sünger yerleştirildi ve transfer tamponu iyice emdirildi

5. Sünger üzerine transfer kağıdı, tamponla doyurularak yerleştirildi üzerinden deney tüpüyle yavaşça geçilerek hava kabarcığı kalmaması sağlandı
6. Transfer kağıdı üzerine jel büyüklüğünde kesilmiş ve önceden metanolla ıslatılmış membran yerleştirildi ve üzerinden deney tüpüyle yavaşça geçildi. Sandviç sırasında, katlar arasında kalan hava kabarcıkları bu bölgelerde transferin doğru olarak gerçekleşmesini engelleyeceğinden, özellikle membran ve jel yerleştirilirken hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi.
7. Jel kırılmamasına dikkat edilerek membran üzerine yerleştirildi, üzerinden deney tüpüyle geçildi.
8. Membran üzerine transfer kağıdı ve onun üzerine sünger aynı şekilde tampon iyice emdirilerek konuldu ve sandviç sıkıştırılarak kapatıldı.
9. Sandviç transfer tankına yerleştirildi, tank transfer tamponu ile dolduruldu. Sandviç yerleştirilirken jelin anot ve membranın katot tarafında olmasına dikkat edildi.
10. Transfer 1 gece süreyle +4 °C'de 40 volt ve 60-70 mA' de gerçekleştirildi.

### **2.3.3. Membranların Blotlanması (Antikorla İşaretleme)**

Transfer gerçekleştikten sonra PVDF membranının blotlama işlemleri yapıldı.

#### **2.3.3.1. Kullanılan Solüsyonlar**

##### **2.3.3.1.1. PBS (Phosphate Buffered Saline)**

8g NaCl (Merck)

0.2g KCl (Merck)

1.44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck)

0.24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck)

800 ml bidistile su içinde çözülüp, 1M'lık Asit kullanılarak pH= 7.4'e ayarlandı. Hacim 1 L'ye bidistile su ile tamamlandı.

#### **2.3.3.1.2. % 0.1'lik PBST**

1 L %0.1'lik PBS içerisine 500 µl Tween 20 (polioksietilen-sorbitanmonolaurat) (Sigma) eklendi

#### **2.3.3.1.3. % 3'lük Süt Tozu (Bloklayıcı Çözeltisi)**

3 g yağsız süt tozu PBST içinde çözülüp 100 ml'ye PBST ile tamamlandı.

#### **2.3.3.2. İşlemler**

1. Eldiven giyilerek membranlar temiz küçük kaplara konuldu. Bu işlem için petri kapları kullanıldı. Membranda yanlış bantlar görülmesine sebep olmamak için membranlara çıplak elle dokunulmadı.
2. Membranın üstünü kaplayacak kadar bloklayıcı çözeltisi konuldu ve 2 saat Heidolph marka çalkalayıcı üzerinde prehibridizasyona bırakıldı.
3. Prehibridizasyon bittikten sonra çözelti dökülerek, bloklayıcı çözeltisi içinde 1/1500 oranında seyreltilen PTEN (Santacruz) primer antikoru ve bloklayıcı çözeltisi içinde 1/20000 oranında seyreltilen GAPDH (Gliseraldehitfosfatdehidrogenaz) (Santacruz) primer antikoru konuldu ve 3 saat çalkalanmaya bırakıldı.
4. Süre sonunda yıkama işlemine geçildi. Çözelti döküldü membran birkaç kez PBST ile yıkandı. 15 dakika boyunca her 5 dakikada bir PBST değiştirilmek üzere membran çalkalayıcıda çalkalanarak yıkandı. Böylece ortamdan zayıf bağlanan veya bağlanmayan antikorlar uzaklaştırıldı.

5. Yıkama işleminden sonra yine bloklama çözeltisi içinde 1/10000 oranında seyreltilen sekonder antikor HRP (Horseradishperoxydase) (Santacruz) konuldu ve 1 saat boyunca çalkalandı.
6. Bu işlem bittikten sonra tekrar PBST ile 15 dakika yıkama işlemi yapıldı.
7. İşlem sonunda bir pens ile el değmeden alınan membranların önce kurutma kağıdı ile fazla suyu alındı. Strechfilm üzerine yerleştirildi. Üzerine ECL dökülüp ve 1 dakika bekletildi.
8. Süre sonunda ECL' in de fazlası kurutma kağıdı ile alındıktan sonra membranlar strechfilm üzerine konuldu ve strechfilm ile üzeri örtüldü, kenarları sıkıca kapatıldı. Hemen ardından film kasetinin içine bantlandı.
9. Daha sonra vakit kaybetmeden karanlık odada film membran üzerine yerleştirildi ve 1 veya 8 dakika sonunda banyo edildi.

### **2.3. Tümör ve Kontrol Örneklerinde PTEN Ekspresyonlarının Belirlenmesi**

Banyo sonunda elde edilen filmler Hewlett Peckard marka tarayıcı ile tarandı. PTEN ve eşit yüklemeyi kontrol amacı ile kullanılan GAPDH antikorlarının filmde oluşturduğu bantlar Scion image adlı bilgisayar programı kullanılarak ölçüldü. Tüm tümör ve kontrol örneklerinde % PTEN ekspresyonları belirlendi.



## BULGULAR

Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı tarafından 30 tane değişici epitel hücreli mesane tümörü (TCC: Transitional Cell Carcinoma) ve 1 tane Adenokarsinoma tanısı konulmuş hastadan Transuretral Rezeksiyon (TUR) ve sistektomi ile alınan tümör materyallerinde Western-blot yöntemi kullanılarak % PTEN ekspresyonları belirlenmiştir.

### 3.1. Tümör Materyalinin Patolojik Ve Histolojik Olarak Sınıflandırılması

Çalışmaya alınan tüm tümörler patolojik olarak incelenerek tümörün evresi Tümör Node Metastasis (TNM) sistemine göre, derecesi ise World Health Organization (WHO) sınıflandırmasına göre yapılmıştır. Hastaların hepsinde tümör sayısı ve çapı araştırılmıştır. Olguların cinsiyet, yaş, tümör sayısı, tümörlerin maksimum çapı, uygulanan tedavi, histolojik dereceleri, patolojik evreleri, nüks ve takip sürelerini içeren diğer klinik bulguları tablo 4.1' de verilmiştir.

Çalışmaya alınan 5 kadın ve 26 erkek hastanın yaşları 40 ve 86 (ortalama 65) arasında değişmektedir. PTEN ekspresyonunda azalma 4 erkek olguda saptanmıştır. Ayrıca bu olgularda tümör sayısının 1-5 ve tümörlerin maksimum çaplarının ise 1-3 cm arasında değiştiği gözlenmiştir. PTEN ekspresyonunda azalma saptanan olgulardan yalnızca birinde 24 aylık süre sonunda tümör tekrarı gözlenmiştir. Ancak tümör tekrarı gözlenen diğer olgularda ekspresyonda azalma saptanamamıştır.

Olgulardan 12 tanesi yüzeysel mesane tümörü (pTa ve pT1) ve 19 tanesi invaziv mesane tümörü (pT2 ve pT3) olarak belirlenmiştir.

**Tablo 4.1 Klinik Bulgular**

No	C	Yaş	Tümör Sayısı	Max. Çap	Tedavi	Histoloji	Derece	Patolojik Evre	Nüks/ Süre	Takip
1	E	77	1	2 cm	TUR	TCC	II	pT2	-	6 ay
2	E	83	1	3 cm	TUR	TCC	I	pTa	-	7 ay
3	E	49	4	3 cm	Sistektomi	Adeno ca.	III	pT2	-	1 ay
4	K	67	4	1 cm	TUR/BCG	TCC	II	pTa	-	6 ay
5	K	56	2	7 cm	Sistektomi	TCC	III	pT2a	-	3 ay
6	E	73	2	4 cm	TUR	TCC	III	pT2	-	8 ay
7	E	67	1	1,5 cm	TUR/BCG	TCC	II	pT1	-	5 ay
8	K	75	3	2 cm	TUR/RT	TCC	II	pT2	-	9 ay
9	E	73	4	2 cm	TUR/RT	TCC	III	pT2	-	-
10	E	58	5	2 cm	TUR/BCG	TCC	II	pTa	-	3 ay
11	K	79	3	6 cm	TUR/BCG	TCC	III	pT1	-	9 ay
12	E	73	4	5 cm	TUR	TCC	III	pT3a/K+	2 ay	6 ay
13	E	73	3	4 cm	Sistektomi	TCC	III	pT1	-	3 ay
14	E	72	1	3 cm	TUR/BCG	TCC	II	pTa	-	2 ay
15	E	46	1	3 cm	Sistektomi	TCC	III	pT2a	-	1 ay
16	E	70	2	2 cm	TUR/MuAc	TCC	III	pT2a	-	2 ay
17	E	55	3	3 cm	TUR/BCG	TCC	III	PT1	-	2 ay
18	E	61	2	7 cm	Sistektomi	TCC	III	pT2b	-	2 ay
19	E	58	1	3 cm	Sistektomi	TCC	III	pT2b	-	7 ay
20	E	53	4	2 cm	Sistektomi	TCC	III	pT2	6 ay	8 ay
21	K	68	5	3,5 cm	TUR	TCC	III	pT3a	2 ay	12 ay
22	E	54	1	4 cm	Sistektomi	TCC	II	pT1	-	12 ay
23	E	86	2	1 cm	TUR/RT	TCC	III	pT2	24 ay	18 ay
24	E	64	5	2 cm	TUR/RT	TCC	III	pT2	-	18 ay
25	E	52	1	3 cm	TUR/BCG	TCC	II	pTa	-	19 ay
26	E	61	1	1 cm	TUR/BCG	TCC	III	pT1	-	18 ay
27	E	64	4	3 cm	Sistektomi	TCC	III	pT2b	-	6 ay
28	E	58	1	3 cm	Sistektomi	TCC	III	pT2b	-	7 ay
29	E	73	3	5 cm	Sistektomi	Tcc%10y	III	pT3a/K+	-	3 ay
30	E	66	2	5 cm	Sistektomi	TCC	III	pT3b N+	-	3 ay
31	E	40	4	1 cm	TUR/BCG	TCC	II	pTa	3 ay	4 ay

### 3.2. Tümör Ve Kontrol Materyalinde Protein Miktar Tayini

BioRad Bratford kit kullanılarak 31 tümör ve 12 kontrol materyalinde protein miktar tayini yapılmıştır. Her bir örnek için spektrofotometrik olarak ölçüm yapılmış ve içerdiği protein miktarı standart grafikten yararlanılarak hesaplanmıştır. 19 tümör materyaline ait bulgular tablo 4.2'de ve 12 tümör ile aynı hastadan alınan 12 kontrol materyaline ait bulgular tablo 4.3'te görülmektedir.

**Tablo 4.2.** 1-19 Numaralı Tümör Materyallerinin Protein Miktarları ve % PTEN Ekspresyonları

Hasta No	Materyal	Absorbans	$\mu\text{g}/\mu\text{l}$	100 $\mu\text{g}$ protein	% PTEN ekspresyonu
1	Tümör	1,211	31,1	3,2	100
2	Tümör	0,833	21,4	4,7	100
3	Tümör	1,214	31,2	3,2	100
4	Tümör	0,677	17,4	5,7	100
5	Tümör	0,509	13,1	7,6	100
6	Tümör	0,878	22,3	4,9	100
7	Tümör	0,486	12,5	8	100
8	Tümör	1,122	28	3,8	100
9	Tümör	1,011	25,5	4	64
10	Tümör	1,007	25,5	4	100
11	Tümör	1,377	34,4	3	100
12	Tümör	0,828	21,3	4,7	100
13	Tümör	0,346	9	11,1	100
14	Tümör	0,608	17,5	5,7	100
15	Tümör	0,719	18,5	5,4	100
16	Tümör	0,261	6,7	14,9	100
17	Tümör	0,924	23,6	4,2	100
18	Tümör	1,263	33,4	3,06	100
19	Tümör	0,795	20,5	4,9	100

**Tablo 4.3.** 12 Tümör Ve Kontrol Örneğinde Protein Miktarları ve % PTEN Ekspresyonları

Hasta No	Materyal	Absorbans	$\mu\text{g}/\mu\text{l}$	100 $\mu\text{g}$ protein	% PTEN ekspresyonu
20	Tümör	0,691	18	5,5	100
	Kontrol	0,277	7	14,3	100
21	Tümör	0,531	13,5	7,4	100
	Kontrol	0,099	2,5	40	100
22	Tümör	0,622	15,9	6,3	100
	Kontrol	1,495	38,2	2,6	100
23	Tümör	0,482	12,3	8,2	58,8
	Kontrol	0,608	15,7	6,4	100
24	Tümör	0,224	5,7	17,6	21,9
	Kontrol	0,212	5,4	18,6	100
25	Tümör	0,319	8,2	12,2	5
	Kontrol	0,645	16,6	6	100
26	Tümör	0,794	20	5	100
	Kontrol	0,203	5	20	100
27	Tümör	0,942	25	4	100
	Kontrol	0,951	25	4	100
28	Tümör	0,822	21,1	4,7	100
	Kontrol	0,833	21,3	4,7	100
29	Tümör	1,011	25,6	4	100
	Kontrol	0,865	22,6	4,5	100
30	Tümör	1,387	34,7	2,8	100
	Kontrol	1,327	33,2	3	100
31	Tümör	0,111	2,8	35,7	100
	Kontrol	0,387	10	10	100

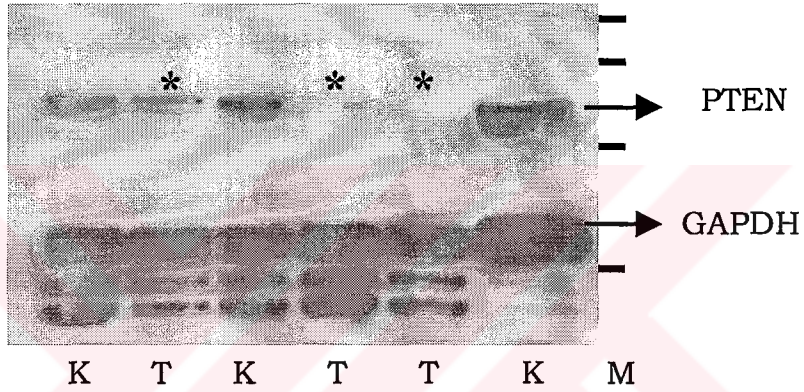
### 3.3. Tümör ve Kontrol Örneklerinde PTEN Ekspresyonu Düzeyleri

İncelenen 31 tümör materyalinin 4 (%13) tanesinde PTEN ekspresyonunda azalma saptanmıştır. PTEN ekspresyonunda azalma 3 invaziv mesane tümöründe ve 1 TCC'de gözlenmiştir.

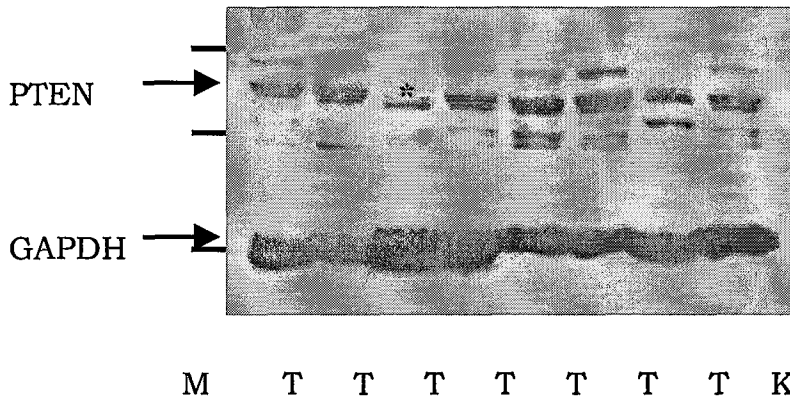
PTEN ekspresyonunun %95 oranında azaldığı 25 numaralı tümör örneğinin patolojik evresi pTa ve derecesi II' dir. Azalma

saptanan diğer tümörlerin patolojik evreleri pT2 ve dereceleri III' tür (tablo 4.2 ve 4.3).

PTEN proteini ekspresyonunda azalma saptanan 9 numaralı hastada PTEN ekspresyonu %64, 23 numaralı hastada %58.8, 24 numaralı hastada % 21.9 ve 25 numaralı hastada % 5 olarak belirlenmiştir (tablo 4.2, 4.3). Bu olgular için yapılan Western-blot analizi sonunda PTEN ve GAPDH band paternleri şekil 4.1 ve 4.2' de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. 23, 24 Ve 25 Numaralı Olguların Western-blot Sonucu PTEN ve GAPDH Band Paterni. T: Tümör, K: Kontrol, M: Marker, \*:Azalma saptanan örnekler.



Şekil 4.2. 7, 8, 9, 10, 11, 12 ve 13 Numaralı olguların Western-blot sonucu PTEN ve GAPDH Band Paterni. T: Tümör, K: Kontrol, M: Marker, \*:Azalma saptanan örnekler.

## TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Geleneksel tümör gelişimi modellerinde, düşük dereceden yüzeysel yüksek dereceli tümöre ve daha sonra invaziv tümöre doğru bir ilerleme görülür. Mesanenin değişici epitel hücre karsinomunda tümör gelişimi iki farklı şekilde gerçekleşmektedir. Birinci tip, düşük ve orta dereceli yüzeysel lezyonlar şeklinde gelişir ve bu tümörler sıklıkla tekrarlamakta fakat nadiren invazyon göstermektedir. İkinci tip gelişim ise yüksek dereceli lezyonlar şeklindedir. Ürotelyumdan köken alan tümörler dışında bu tip lezyonlar çoğunlukla invaziv tümörlerdir. Ayrıca mesane kanserlerinin prelinik süreci çok kısa sürmektedir. Bu kanserlerin karakteristik karmaşıklığı tümör başlangıcı ve ilerlemesi arasında geçen olayların anlaşılmasını güçleştirmektedir. Bu nedenle mesane kanserlerinde prognostik faktör olarak kullanılacak moleküler markırlar üzerinde çalışılmaktadır. Hücre döngüsü markırları p53, p21 ve Ki-67'nin anormal ekspresyonunun mesane kanseri tekrarlamasında etkilerinin çok az olduğu düşünülmektedir (11, 98, 99). Yinede p53 ve p21 genlerinin hastalığın ilerlemesi ve hayatta kalmada etkili olduğu öne sürülmektedir. Bu sebeple mesane kanserinin tanısında kullanılacak ve tedavisine yön verebilecek FGFR3 (Fibroblast Growth Factor Receptor 3), PTEN ve VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) gibi yeni markır adaylarının tanımlanması ve etki mekanizmalarının belirlenmesi önem kazanmıştır (11, 98).

Mesane kanserlerinde bazı genetik değişimlerin düşük ve orta derecede yani erken evrede ortaya çıktığı belirlenmiştir. Mesane kanserlerinde en sık 9. kromozomda genetik değişimler gerçekleşmektedir (11). 9p ve/veya 9q'da LOH mesane kanserlerinin

%60-70' inde tanımlanmıştır. PTEN geninde heterozigosite kaybı mesane kanserlerinde %5-7- sıklıkla görülen bir diğer genetik değişimdir (11, 32). 10q' da heterozigosite kaybı da daha çok kasa invaze olan TCC' lerde görülmektedir ve genellikle ileri evrelerde gerçekleşmektedir (12, 32). Cairns ve arkadaşlarının yaptığı çalışma ile mesane tümörlerinde patolojik evrelere göre, Ta tümörlerin %8'inde, T1 tümörlerin %20 ve T2 tümörlerin %29'unda 10q'da LOH tanımlanmıştır. Bu bulgular mesane kanseri gelişiminde 10q'da heterozigosite kaybının etkin bir rol oynadığını göstermektedir (31). Aveyard ve arkadaşları ile Cairns ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaların sonuçları birbirine uyumlu olup, ayrıca PTEN geninin inaktivasyonunda delesyonla gen kaybının sık rastlanan bir mekanizma olduğu gösterilmiştir (32).

Çalışmamızda Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı tarafından tanı konulan 30 TCC ve 1 Adenokarsinoma materyalinde Western-blot yöntemi kullanılarak % PTEN ekspresyonları araştırılmıştır. 31 olgunun sadece 4'ünde PTEN ekspresyonunda azalma saptanmıştır. PTEN ekspresyonunda azalma saptanan 4 materyalden %95 oranında PTEN ekspresyonunda azalma gözlenen 25 numaralı tümörün, makroskopik incelemesinde tümör sayısının 1, çapının maksimum 3 cm olduğu saptanmıştır. Bu yüzeysel mesane tümörü patolojik evresi pTa olduğundan düşük risk grubuna dahildir. Azalma saptanan 9, 23 ve 24 numaralı tümörlerin patolojik evreleri pT2 ve dereceleri III' tür. Bu tümörlerde maksimum tümör çapının 2 cm ve tümör sayısının ise 2-5 arasında değiştiği görülmüştür. Bu olgularda PTEN seviyesinde azalma %78.1 ile %36 arasında değişmektedir. Bu yüksek risk grubundaki invaziv tümörlerde PTEN ekspresyonunda azalma literatür bulguları ile karşılaştırıldığında beklenen bir sonuçtur. LOH görülme sıklığı ve PTEN gen mutasyonları patolojik evre ilerledikçe artmaktadır. Ancak

PTEN ekspresyonunda en fazla azalmanın bir pTa tümörde saptanmasının örneklemeden kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz.

İncelenen olgularda PTEN ekspresyonundaki azalma miktarı ile tümörlerin histolojik dereceleri, patolojik evreleri veya dahil oldukları risk grupları arasında doğrudan bir ilişki saptanamamıştır.

PTEN geninin inaktivasyonu glioblastoma, endometriyum, prostat ve diğer birçok kanser tipinde gösterilmiştir. İnaktivasyonun endometriyal karsinogeneizde erken evrelerde ortaya çıkarken glioblastoma, prostat ve diğer birçok kanser tipinde ileri evrelerde ortaya çıktığı sitogenetik ve moleküler analizlerle gösterilmiştir (11). Mesane kanseri ile bu güne kadar yapılan çalışmalar da PTEN geni inaktivasyonunun mesane kanseri prognozunda etkili olabileceği gösterilmiştir. Ancak yapılan çalışmalar mesane tümörlerindeki LOH ve mutasyonların belirlenmesi ile sınırlı kalmıştır. PTEN proteininin ekspresyonu ile mesane kanseri prognozu arasındaki ilişki araştırılmamıştır. Bu nedenle bulgularımız literatürle karşılaştırılamamaktadır.

Tanaka ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, mesane kanseri hücre hatlarında adenoviral vektör yoluyla PTEN ekspresyonu arttırılmış ve hücre döngüsü ve büyümenin baskılanması üzerine etkileri araştırılmıştır (11). Çalışmada SV-HUC, UMUC-1, UMUC-2, UMUC-3, UMUC-6, UMUC-9, UMUC-14, T24 ve RT-4 hücre hatlarında PTEN ekspresyonu Western-blot yöntemi ile gösterilmiştir. Bu hücre hatlarından sadece UMUC-3'te PTEN ekspresyonunun hiç olmadığı belirlenmiştir. Diğer hücre hatlarında ise farklı düzeylerde PTEN ekspresyonu saptanmıştır (11). Tanaka ve arkadaşlarının çalışması ile çalışmamızın verileri kıyaslandığında 31 olgunun sadece 4'ünde PTEN ekspresyonunda azalma saptanmasının kullanılan materyalden kaynaklandığını düşünmekteyiz. Daha önce



yapılan çalışmalarda sadece mesane kanseri hücre hatlarında PTEN proteini ekspresyonu araştırılmış ancak hasta numuneleri incelenmemiştir. Patolojik tanıları ve histolojik dereceleri heterojen bir dağılım gösteren tümör panelinde farklı düzeylerde PTEN ekspresyonunun temel sebebinin hücre tipleri arasındaki varyasyondan kaynaklandığını düşünmekteyiz. PTEN aşırı ekspresyonu prostat ve glioblastoma hücrelerinde hücre döngüsünün G1'de durması ve apoptozisi sağlarken U251 insan glioblastoma hücre hatlarında apoptozisin gerçekleşmesi için PTEN aşırı ekspresyonuna ek olarak farklı uyarıların da bulunması gerektiği gözlenmiştir (11). Bu durum PTEN gen fonksiyonunun hücre tipine ve PTEN sinyal yolunun diğer apoptotik sinyal yolları ile etkileşimine bağlı olarak değişebileceğini göstermektedir.

Mesane kanserine erkeklerde kadınlara oranla daha sık rastlanmaktadır. Millan-Rodriguez ve arkadaşlarının çalışması sonucunda erkek: kadın oranı 9:1 olarak saptanmıştır. Bu sonuç daha önce yapılan popülasyon temelli çalışmalardan elde edilen 3:1 oranına karşılık göstermektedir (5, 97). Çalışmamız kapsamındaki 31 olgunun 5'i kadın ve 26'sı erkektir. PTEN ekspresyonunda azalma yalnızca 4 erkek hastada saptanmıştır ancak çalışılan tümör paneli içinde kadın ve erkek sayısının dağılımı PTEN ekspresyonu ile cinsiyet arasında bir istatistiksel bir ilişki saptamak için uygun bulunmamaktadır.

Çalışmamız ile mesane tümörlerinde sadece PTEN proteini ekspresyon düzeyi belirlenmiştir. pT2 tümörlerde ekspresyonda azalma saptanırken daha ileri evre pT3 tümörlerde azalma görülmemiştir. Ancak Western-blot ile ekspresyonu saptanan bir proteinde mutasyon olup olmadığı belirlenememektedir. Çalışılan ileri evre mesane tümörlerinde PTEN proteininin fonksiyonu araştırılmamıştır. Bu olgularda PTEN ekspresyonu olsa bile PTEN

geninde nokta mutasyonlar sonucu fonksiyon kaybı gerçekleşmiş olabilir. İncelenen tümör panelinde güdük bir PTEN proteinine rastlanmamıştır.

Bir biyolojik markırın klinikte kullanılabilmesi için klinik parametreleri tamamlayan prognostik bilgi sağlaması gerekmektedir (97). Bu sebeple PTEN ekspresyon düzeyinin mesane kanserlerinde bir markır olarak kullanılması tavsiye edilmemektedir. Ancak PTEN' in hücre göçü ve metastaza etkisi göz önüne alındığında mesane kanserlerinde PTEN sinyal yolunun daha detaylı çalışılması gerekmektedir. PTEN geninin mutasyon veya epigenetik faktörlerin etkisi ile inaktivasyonunun mesane kanserinin ilerlemede işlev gördüğü düşünülmektedir (11). PTEN'in etki mekanizmalarının aydınlatılması mesane kanseri ilerlemede mekanizmalarının anlaşılmasına ve tedavi için yeni hedeflerin bulunmasına öncülük edecektir.

## KAYNAKLAR

- 1- Sherbet G.V.; The Genetics of Cancer. Academic Press, 1997
- 2- Sherman C.D., Calman K.C., Eckhardt S., Elsebai I., Fırat D., Hossfeld D.K., Salvadori P.J-P. B.; Klinik Onkoloji, Sağlık bakanlığı Türk Kanser Araştırma ve Savaş Kurumu Ortak Yayını, 4. Baskı, 1990
- 3- Kraus G.; Biochemistry of signal transduction and regulation, Willey Inc., Germany, 2001
- 4- O'Connor R., Fennelly C., Krause D.; Cell survival and apoptosis: Biochemical Society Transactions, 28 (2), 2000
- 5- Murphy G.P., Lawrence W., Lenhard R.E.; Clinical Oncology: American Cancer Society, 2<sup>nd</sup> Edition, 1995
- 6- Bahçeli Z., Moleküler Biyoloji, Öğrenci Kitapevi Yayınları, 1999
- 7- Cooper M.G; Cell, Asm. Press, 1996
- 8- Klug W.S., Cummings M.R., Concepts of Genetics, Prentice-Hall, Inc.,1997
- 9- Saga Y., Suzuki M., Machida S., Ohwada M., Sato I.; Establishment of a new cell line (TAYA) of Clear Cell Adenocarcinoma of the ovary and its Radiosensitivity: Oncology, 62: 180-184, 2002

- 10- Bringold F., Serrano M.; Tumor suppressors and oncogenes in cellular senescence: *Experimental Gerontology*, 35: 317-329, 2000
- 11- Tanaka M., Koul D., Michael A.D., Liebert M., Steck P:A. and Grossman H.B.; MMAC1/PTEN inhibits cell growth and induces chemosensitivity to doxorubicin in human bladder cancer cells: *Oncogene*, 19: 5406-5412, 2000
- 12- Wang D. S., Rieger-Christ K., Latini J. M., Moinzadeh A., Stoffel J., Pezza J.A., Saini K., Libertino J.A., Summerhayes I. C.; Molecular analysis of PTEN and MXI1 in primary bladder carcinoma: *International Journal of Cancer*, 88: 620-625, 2000
- 13- Fidaner C., Eser S.Y., Parkin D.M.; Incidence in Izmir in 1993-1994: first results form Izmir Cancer Registry: *European Journal of Cancer*, 37: 83-92, 2001
- 14- Brandau S., Böhle A.; Bladder cancer: *European Urology*, 39: 491-497, 2001
- 15- Kaush I., Böhle A.; Bladder Cancer: II. Molecular aspects and diagnosis: *European Urology*, 39: 498-506, 2001
- 16- Oosterlinck W.; The management of superficial bladder cancer: *British Journal of Urology International*, 87: 135-140, 2001
- 17- Oosterlinck W., Lobel B., Jakse G., Malmström P., Stöcle M., Stenberg C.; Guidelines on bladder cancer: *European Urology*, 41: 105-112, 2002

- 18- Kausch I, Böhle A.; Molecular aspects of bladder cancer III. Prognostic markers of bladder cancer: *European Urology*, 41: 15-29, 2002
- 19- [http://pathology2.jhu.edu/bladder\\_cancer/index.cfm](http://pathology2.jhu.edu/bladder_cancer/index.cfm)
- 20- Numahata K., Satoh M., Handa K., Saito S., Ohyama C., Ito A., Takahashi T., Hoshi S., Oriyasa S., Hakomori S.; Sialosyl-Lx expression defines invasive and metastatic properties of bladder carcinoma, *Cancer*: 94(3): 673-685, 2002
- 21- Cheng L., Gu J., Ulbright T.M., MacLennan G.T., Sweeney C.J., Zhang S., Sanchez K., Koch M.O., Eble J.N.; Precise microdissection of human bladder carcinomas reveals divergent tumor subclones in the same tumor: *Cancer*, 94 (1): 104-110, 2002
- 22- Wittekind Ch., Henson D.E., Hutter R.V.P., Sobin L.H.; TNM Supplement, Willey-Liss Inc, 2001
- 23- Weng L-P., Brown J.L., Eng C.; PTEN coordinates G<sub>1</sub> arrest by down-regulating cyclin D1 via its protein phosphatase activity and up regulating p27 via its lipid phosphatase activity in a breast cancer model: *Human Molecular Genetics*, 10(6): 599-604, 2001
- 24- Ali I.U., Schriml L.M., Dean M.; Mutational spectra of PTEN/MMAC1 gene: a tumor suppressor with lipid phosphatase activity: *Journal of the National Cancer Institute*, 91(22): 1922-1932, 1999

- 25- Davies M.A., et al.; The expanding role of PTEN in neoplasia ; A molecule for all seasons?: *Clinical Cancer Research*, 8: 1695-1698, 2002
- 26- Yamada K.M., Araki M.; Tumor supressor PTEN: modulator of cell signaling, growth, migration and apoptosis: *Journal of Cell Science*, 114(13): 2375-2382, 2001
- 27- Maehama T., Taylor G.S., Dixon J.E.; PTEN and MYOTUBULARIN: Novel phophoinositide phosphatases: *Annual Reviews of Biochemistry*, 70: 247-279, 2001
- 28- Tamura M., Gu J., Tran H., Yamada K.M.; PTEN gene and integrin signaling in cancer: *Journal of the National Cancer Institute*, 91 (21), 1999
- 29- Cheney I.W., Johnson D.E., Vaillancourt M., Avanzini J., Morimoto A., Demers G.W., Wills K.N., Shabram P.W., Bolen J.B., Tavgian S.V., Bookstein R.; Suppression of tumorigenicity of glioblastoma cells by adenovirus-mediated MMAC1/PTEN gene transfer: *Cancer Research*, 58: 2331-2334, 1998
- 30- Liu J., Babaian D.C., Liebert M., Steck P.A., Kagan J.; Inactivation of MMAC1 in bladder transitional-cell carcinoma cell lines and specimens, *Molecular Carcinogenesis* November; 29(3): 143-50, 2000
- 31- Cairns P., Evron E., Okami K., Halachmi N., Esteller M., Herman J.G., Bose S., Wang S.I., Parsons R., Sidransky D.; Point mutation and homozygous deletion of PTEN/MMAC1 in

primary bladder cancers, *Oncogene*, Jun 18, 16(24): 3215-3218, 1998

- 32- Aveyard J.S., Skilleter A., Habuchi T., Knowles M.A.; Somatic mutation of PTEN in bladder carcinoma: *British Journal of Cancer*, 80 (5/6): 904-908, 1999
- 33- Scarisbrick J.J., Woolford A.J., Russell-Jones R., Whittaker S.J.; Loss of heterozygosity on10q and microsatellite instability in advanced stages of primary cutaneous T-cell lymphoma and possible association with homozygous deletion of PTEN: *Blood*, 95: 2937-2942, 2000
- 34- Besson A., Robbins S.M., Yong V.W.; PTEN/MMAC1/TEP1 in signal transduction and tumorigenesis, *European Journal of Biochemistry*, 263: 605-611, 1999
- 35- Wen S., Stolarov J., Myers M.P., su J.D., Wigler M.H., Tonks N.K., Durden D.L.; PTEN controls tumor-induced angiogenesis: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(8): 4622-4627, 2001
- 36- Stambolic V., Suziki A., Pompa J. L., Brothers G.M., Mirtsos C., Sasaki T., Ruland J., Penninger J.M., Siderovski D.P., Mak T.W.; Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN, *Cell*, 95:29-39, 1998
- 37- Furnari F.B., Lin H., Huang H-J.S., Cavenee W.K.; Growth suppression of glioma cells by PTEN requires a functional phosphatase catalytic domain: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(23): 12479-12484, 1997

- 38-** Marshall A.J., Niiro H., Yun T.J., Clark E.A.; Regulation of B-cell activation and differentiation by the phosphatidylinositol 3-kinase and phospholipase C $\gamma$  pathways: Immunological Reviews, 176: 30-46, 2000
- 39-** Lee S., Yang K., Kwon J., Lee C., Jeong W., Rhee S.G.; Reversible inactivation of the tumor suppressor PTEN by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Journal of Biological Chemistry, 277(23): 20336-20342, 2002
- 40-** Vazquez F., Ramaswamy S., Nakamura N., Sellers W.R.; Phosphorylation of the PTEN tail regulates protein stability and function: Molecular and cellular biology, 20(14): 5010-5018, 2000
- 41-** Koul D., Yao Y., Abbruzzese J.L., Yung W.K.A., Reddy S.A.G.; Tumor suppressor MMAC/PTEN inhibits cytokine-induced NF $\kappa$ B activation without interfering with the I $\kappa$ B degradation pathway: Journal of Biological Chemistry, 276(14): 11402-11408, 2001
- 42-** Maehama T., Dixon J.E.; The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate: The Journal of Biological Chemistry: 273(22): 13375-13378, 1998
- 43-** Stambolic V., Mak T.W., Woodgett J.R.; Modulation of cellular apoptotic potential: contributions to oncogenesis, Oncogene, 18: 6094-6103, 1999
- 44-** <http://www.rcsb.org/>



- 45- Vazquez F., Grossman S.R., Takanahashi Y., Rokas M.V., Nakamura N., Sellers W.R.; Phosphorylation of the PTEN tail acts as an inhibitory switch by preventing its recruitment into a protein complex: *The Journal of Biological Chemistry*: 276(52): 48627-48630, 2001
- 46- Tolkacheva T., Boddapati M., Sanfiz A., Tsuchida K., Kimmelman A.C., Chan A.M-L.; Regulation of PTEN binding to MAGI-2 by two putative phosphorylation sites at threonine 382 and 383: *Cancer Research*, 61: 4985-4989, 2001
- 47- Ozes O.N., Akca H., Mayo L.D., Gustin J.A., Maehama T., Dixon J.E., Donner D.B.; A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mTOR pathway mediates and PTEN antagonizes tumor necrosis factor inhibition of insulin signaling through insulin reseptor substrate-1: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(8): 4640-4645, 2001
- 48- Matsushima-Nishiu M., Unoki M., Ono K., Tsunoda T., Minaguchi T., Kuramoto H., Nishida M., Satoh T., Tanaka T., Nakamura Y.; Growth and gene expression profile analyses of endometrial cancer cells expressing exogenous PTEN: *Cancer Research*, 61:3741-3749, 2001
- 49- Mills G.B., Lu Y., Kohn E.C.; Linking molecular therapeutics to molecular diagnostics: Inhibition of the FRAP/RAFT7TOR component of the PI3K pathway preferentially blocks PTEN mutant cells in vitro and invivo: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98 (18): 10031-10033, 2001

- 50-** Georgescu M., Kirsch K.H., Akagi T., Shishido T., Hanafusa H.; The tumor suppressor-activity of PTEN is regulated by its carboxyl-terminal region: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(18): 10182-10187, 1999
- 51-** Wick W., Furnari F.B., Naumann U., Cavenee W.K., Weller M.; PTEN gene transfer in human malignant glioma: sensitization to irradiation and CD95L-induced apoptosis: *Oncogene*, 18: 3936-3943, 1999
- 52-** Thakkar H., Chen X., Tyan F., Gim S., Robison H., Lee C., Pandey S.K., Nwokorie C., Onwudiwe N., Srivastava R.K.; Pro-survival function of Akt/Protein Kinase B in prostate cancer cells: *The Journal of Biological Chemistry*: 276(42): 38361-38369, 2001
- 53-** Mayo M.W., Madrid L.V., Westerheide S.D., Jones D.R., Yuan X., Baldwin A.S., Whang Y.E.; PTEN blocks tumor necrosis factor induced NF- $\kappa$ B dependent transcription by inhibiting the transactivation potential of the p65 subunit, *The Journal of Biochemical Chemistry*, 277(13): 11116-11125, 2002
- 54-** Ardelt P., Böhle A.; Molecular aspects of bladder cancer IV: Gene therapy of bladder cancer: *European Urology*, 41: 372-381, 2002
- 55-** Teng D.H., Hu R., Lin H., Davis T., Iliev D., Frye C., Swedlund B., Hansen K.L., Vinson V.L., Gumpfer K.L., Ellis L., El-Naggar A., Frazier M., Jasser S., Langford L.A., Lee J., Mills G.B., Pershouse M.A., Pollack R.E., Tornos C., Troncoso P., Yung W.K.A., Fujii G., Berson A., Bookstein R., Bolen J.B., Tavitgian

S.V., Steck P.A.; MMAC1/PTEN mutations in primary tumor specimens and tumor cell lines: *Cancer Research*, 57: 5221-5225, 1997

- 56-** Li D-M., Sun H.; PTEN/MMAC1/TEP1 suppresses the tumorigenicity and induces G<sub>1</sub> cell cycle arrest in human glioblastoma cells: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(26): 15406-15411, 1998
- 57-** Sun H., Lesche R., Li D., Liliental J., Zhang H., Gao J., Gavrilova N., Mueller B., Liu X., Wu H.; PTEN modulates cell cycle progression and cell survival by regulating phosphatidylinositol 3,4,5,-trisphosphate and Akt/protein kinase B signaling pathway: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(11): 6199-6204, 1999
- 58-** Zundel W., Schindler C., Haas-Kogan D., Koong A., Kaper F., Chen E., Gottschalk A.R., Ryan H.E., Johnson R.S., Jefferson A.B., Stokoe D., Giaccia A.J.; Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression, *Genes and Development*, 14: 391-396, 2000
- 59-** Seminario M., Wange R.L.; Signaling pathways of D3-phosphoinositide-binding kinases in T cells and their regulation by PTEN: *Immunology*, 14: 27-36, 2002
- 60-** Cheney I.W., Neuteboom S.T.C., Vaillancourt M-T., Ramachandra M., Bookstein R.; Adenovirus-mediated gene transfer of MMAC1/PTEN to glioblastoma cells inhibits S phase

entry by the recruitment of p 27Kip1 into cyclin E/CDK2 complexes: *Cancer Research*, 59: 2318-2323, 1999

- 61-** Hellowell G.O., Turner G.D.H., Davies D.R., Poulson R., Brewster S.F., Macaulay V.M.; Expression of the type 1 insulin-like growth factor receptor is up-regulated in primary prostate cancer and commonly persist in metastatic disease: *Cancer Research*, 62: 2942-2950, 2002
- 62-** Tamura M., Gu J., Takino T., Yamada K.M.; Tumor suppressor PTEN inhibition of cell invasion, migration and growth: Differential involvement of focal adhesion kinase and p130<sup>Cas</sup>: *Cancer Research*, 59: 442-449, 1999
- 63-** Sable C.L.; Filippa N., Hemmings B., Obberghen E.V.; cAMP stimulates protein kinase B in a Wortmannin-insensitive manner; *Federation of European Biochemical Societies*, 409: 253-257, 1997
- 64-** Myers M.P., Pass I., Batty I.H., Kaay J., Stolarov J.P., Hemmings B.A., Wigler M.H., Downes C.P., Tonks N.K.; the lipid phosphatase activity of PTEN is critical for its tumor suppressor function, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95 (23): 13513-13518, 1998
- 65-** Podsypanina K., Ellenson L.H., Nemes A., Gu J., Tamura M., Yamada K.M., Cordon-Cardo C., Catoretti G., Fisher P.E., Parsons R.; Mutation of *Pten/Mmac1* in mice causes neoplasia in multiple organ systems: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(4): 1563-1568, 1999

- 66-** Jiang B-H., Zheng J.Z., Aoki M., Vogt P.K.; Phosphatidylinositol 3-kinase signaling mediates angiogenesis and expression of vascular endothelial growth factor in endothelial cells: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 97 (4): 1749-1753, 2000
- 67-** Kandel E.S., Hay N.; the regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB: Experimental Cell Research, 253: 210-229, 1999
- 68-** Ramaswamy S., Nakamura N., Vazquez F., Batt D.B., Perera S., Roberts T.M., Sellers W.R.; Regulation of G1 progression by the PTEN tumor suppressor protein is linked to inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 96(5): 2110-2115, 1999
- 69-** Wu X., Senechal K., Neshat M.S., Whang Y.E., Sawyers C.L.; The PTEN/MMAC1 tumor suppressor phosphatase functions as a negative regulator of the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 95(6): 15587-15591, 1998
- 70-** Cristofano A., Kotsi P., Peng Y.F., Cordon-Cardo C., Elkon K.B., Pandolfi P.P.; Impaired Fas response and autoimmunity in PTEN +/- mice: Science, 285: 2122-2125, 1999
- 71-** Kops G.J.P.L., Burgering B.M.T.; Forkhead transcription factors: new insights into protein kinase B (c-akt) signaling: Journal of Molecular Medicine, 77: 656-665, 1999

- 72-** Cristofano A., Pandolfi P.P.; The multiple roles of PTEN in tumor suppression: *Cell*, 100: 387-390, 2000
- 73-** Persad S., Attwell S., Gray V., Delcommenne M., Troussard A., Sanghera J., Dedhar S.; Inhibition of integrin-linked kinase (ILK) suppresses activation of protein kinase B/ Akt and induces cell cycle arrest and apoptosis of PTEN-Mutant prostate cancer cells: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*: 97(7): 3207-3212, 2000
- 74-** Cantley L.C., Neel B.G.; New insights into suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/ AKT pathway: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96: 4220-4245, 1999
- 75-** Wu X., Hepner K., Castelino-Prabhu S., Do D., Kaye M.B., Yuan X., Wood J., Ross C., Sawyers C.L., Whang Y.E.; Evidence for regulation of the PTEN tumor suppressor by a membrane-localized multi-PDZ domain containing scaffold protein MAGI-2: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(8): 4233-4238, 2000
- 76-** Tamura M., Gu J., Matsumoto K., Aota S-I., Parsons R., Yamada K.M.; Inhibition of cell migration, spreading and focal adhesions by tumor suppressor PTEN: *Science*, 280: 1614-1617, 1998
- 77-** Li J., Simpson L., Takanashi M., Miliareis C., Myers M.P., Tonks N., Parsons R.; The PTEN/MMAC1 tumor suppressor

induces cell death that is rescued by the AKT/Protein kinase B oncogene: *Cancer Research*, 58: 5667-5672, 1998

- 78- McMenamin M.E., song P., Perera S., Kaplan I., Loda M., Sellers W.R.; Loss of PTEN expression in paraffin-embedded primary prostate cancer correlates with high gleason score and advanced stage: *Cancer Research*, 59: 4291-4296, 1999
- 79- Huang J., Kontos C.D.; PTEN modulates Vascular endothelial growth factor mediated signaling and angiogenic effects; *The Journal of Biochemical Chemistry*, 277(13): 10760-10766, 2002
- 80- Wen S., Stolarov J., Myers M.P., Su J.D., Wigler M.H., Tonks N.K., Durden D.L.; PTEN controls tumor-induced angiogenesis: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98 (8): 4622-4627, 2001
- 81- Robertson G.P., Furnari F.B., Miele M.E., Glendening M.J., Welch D.R., Fountain J.W., Lugo T.G., Huang H-J.S., Cavenee W.K.; In vitro loss of heterozygosity targets the PTEN/MMAC1 gene in melanoma: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(16): 9418-9423, 1998
- 82- Sherman M.E.; Theories of endometrial carcinogenesis: A multidisciplinary approach: *Modern Pathology*, 13 (3): 295-308, 2000
- 83- Mutter G.L.; Histopathology of genetically defined endometrial precancers: *International Journal of Gynecological Pathology*, 19: 301-309, 2000

- 84- Murata J., Tada M., Sawamura Y., Mitsumori K., Abe H., Nagashima K.; Dysplastic gangliocytoma (Lhermitte-Duclos disease) associated with Cowden disease: Report of a case and review of the literature for genetic relationship between two diseases: *Journal of Neuro-oncology*, 41: 129-136, 1999
- 85- Robinson S., Cohen A.R.; Cowden Disease and Lhermitte-Duclos disease: Characterization of a new phakomatosis: *Neurosurgery*, 46(2): 371-383, 2000
- 86- Perren A., Weng L-P., Boag A.H., Ziebold U., Thakore K., Dahia P.L.M., Komminoth P., Lees J.A., Mulligan L.M., Mutter G.L., Eng C.; Immunohistochemical evidence of loss of PTEN expression in primary ductal adenocarcinomas of the breast: *American Journal of Pathology*, 155(4): 1253-1260, 1999
- 87- Mutter G.L.; PTEN, a protean tumor suppressor: *American Journal of Pathology*, 158(6): 1895-1899, 2001
- 88- Zhou X-P., Gimm O., Hampel H., Niemann T., Walker M.J., Eng C.; Epigenetic PTEN silencing in malignant melanomas without PTEN mutation: *American Journal of Pathology*, 157: 1123-1128, 2000
- 89- Li Y., Podsypanina K., Liu X., Crane A., Tan L.K., Parsons R., Varmus H.E.; Deficiency of Pten accelerates mammary oncogenesis in MMTV-Wnt-1 transgenic mice, *BMC Molecular Biology* 2(2), 2001
- 90- Podsypanina K., Lee R.T., Politis C., Hennessy I., Crane A., Puc J., Neshat M., Wang H., Yang L., Gibbons J., Frost P.,



- Dreisbach V., Blenis J., Gaciong Z., Fisher P., Sawyers C., Hedrick-Ellenson L., Parsons R.; An inhibitor of mTOR reduces neoplasia and normalizes p70/S6 kinase activity in PTEN +/- mice: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 98(18): 10320-10324, 2001
- 91-** Pap T., Franz J.K., Hummel K.M., Jeisy E., Gay R., Gay S.; Activation of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis: lack of expression of the tumour suppressor PTEN at sites of invasive growth and destruction: Arthritis Research, 2: 59-64, 2000
- 92-** Furnari F.B., Huang H-J.S., Cavenee W.K.; The phosphoinositol phosphatase activity of PTEN mediates a serum-sensitive G<sub>1</sub> growth arrest in glioma cells: Cancer Research, 58: 5002-5008, 1998
- 93-** Whang Y.E., Wu X., Suzuki H., Reiter R.E., Tan C., Vessella R.L., Said J.W., Isaacs W.B., Sawyers C.L.; Inactivation of the tumor suppressor PTEN/MMAC1 in advanced human prostate cancer through loss of expression: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 95(9): 5246-5250, 1998
- 94-** Ellenson L.H.; The molecular biology of endometrial tumorigenesis: does it have a message?: International Journal of Gynecological Pathology, 19: 310-313, 2000
- 95-** Mutter G.L., Ince T.A., Baak J.P.A., Kust G.A., Zhou X., Eng C.; Molecular identification of latent precancers in histologically normal endometrium: Cancer Research, 61: 4311-4314, 2001

- 96-** Huang H., Chevillat J.C., Pan Y., Roche P.C., Schmidt L.J., Tindall D.J.; PTEN induces chemosensitivity in PTEN-mutated prostate cancer cells by suppression of Bcl-2 expression: *The Journal of Biological Chemistry*, 276(42): 38830-38839, 2001
- 97-** Tachibana M., Shibakita M., Ohno S., Kinugasa S., Yoshimura H., Ueda S., Fujii T., Rahman M.A., Dhar D.K., Nagasue N.; Expression and prognostic significance of PTEN product protein in patients with esophageal squamous cell carcinoma, *Cancer*, 94: 1955-1960, 2002
- 98-** Fradet Y., Lacombe L.; Can biological markers predict recurrence and progression of superficial bladder cancer?; *Current Opinions in Urology*, September;10(5): 441-5, 2000
- 99-** Van Brussel J.P., Mickisch G.H.J.; Prognostic factors in renal cell and bladder cancer: *British Journal of Urology International*, 83: 902-909, 1999

## ÖZGEÇMİŞ

Duygu YAŞAR, 21.09.1978 tarihinde Ankara'da doğdu. 1989-1996 tarihleri arasında orta ve lise öğrenimini Ankara Yıldırım Bayezit Anadolu Lisesinde tamamladı. 1996-2000 yılları arasında Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümünde öğrenim gördü. 2000 yılında Akdeniz Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsünde Tıbbi Genetik programında lisans üstü eğitimine başladı. 2001 yılında Akdeniz Üniversitesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'na Araştırma Görevlisi olarak atandı.

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ