

T1584

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

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

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
MERKEZ KÜTÜPHANESİ

Ercüment DİRİCE

T 1584

Yüksek Lisans Tezi

Antalya 2003

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

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

**Ercüment DİRİCE**

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanları  
Prof. Dr. Güven LÜLEÇİ  
Doç. Dr. Salih ŞANLIOĞLU

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim  
Birimi tarafından desteklenmiştir. (Proje No : 2002. 0122. 06)

“Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir”  
([www.pten.gen.tr.tc](http://www.pten.gen.tr.tc))

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  
...../...../ 2003

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

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

Üye : Doç. Dr. Sibel BERKER KARAÜZÜM  
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. Tibet 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 15/24 sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ramazan DEMİR  
Enstitü Müdürü



## ÖZET

Prostat kanseri erkeklerde ölüme sebebiyet veren kanserler arasında akciğer kanserinden sonra ikinci sırayı almaktadır. Bir tümör süpressör olarak klonlanan, ürünü tirozin ve lipid fosfataz aktivitesine sahip PTEN geninde meydana gelen mutasyonların glioblastoma, endometrium, mesane ve prostat kanseri gibi birçok kanserin gelişiminde etken olduğu belirtilmektedir.

Bu çalışmada prostat kanseri tanısı konmuş 43 BPH, 15 organa sınırlı ve 18 ileri evre prostat kanseri olmak üzere toplam 76 hastanın tümör materyallerindeki PTEN ekspresyon miktarının belirlenmesi için Western-Blot tekniği uygulanmıştır. Kontrol örnekleri ise organa sınırlı prostat kanseri olgularından radikal prostatektomi ile patolojik bulgusu olmayan bölgeden temin edilmiştir. Western-Blot tekniği sonrasında PTEN ekspresyon düzeyi dansitometrik analizler ile tespit edilmiştir. BPH ve organa sınırlı prostat kanseri olguları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç bulunamazken, ileri evre prostat kanseri olgularında PTEN ekspresyon miktarının oldukça azaldığı saptanmıştır.

Sonuç olarak, Western-Blot tekniği kullanılarak PTEN ekspresyonunun belirlenmesinin prostat kanseri progresyonunun saptanmasında ve ileri evre prostat kanseri tedavisinde kullanılabilecek yeni yöntemlerin geliştirilmesine yardımcı olabileceği düşüncesindeyiz.

**Anahtar Kelimeler :** PTEN, BPH, Prostat Kanseri, Western-Blot

## ABSTRACT

Prostate cancer is the second leading cause of death in men from cancer following lung carcinoma. PTEN has been cloned as a tumor suppressor gene and displays tyrosine and lipid phosphatase activity. Deletion of the gene encoding PTEN has been implicated in the development of various human tumors such as glioblastoma, endometrium, bladder and prostate cancer.

In this study Western-Blotting was performed to detect PTEN expression levels of patients with BPH, organ confined prostate cancer (OCPCa) and advanced prostate cancer (APCa), and to control samples obtained from OCPCa patients by radical prostatectomy from regions with no pathological finding. Total proteins were extracted from prostate samples of 76 patients obtained through TURP or radical prostatectomy. After Western-Blotting densitometric analysis were performed to determine PTEN expression levels. Densitometric analysis of Western Blotting results exhibited no statistically important divergence between BPH and OCPCa patients in terms of PTEN expression but only APCa patients displayed such a disparity.

As a result determining PTEN expression levels by Western-Blot might be useful to determine prostate cancer progression and may give physicians better opportunity to choose and employ various new treatment modalities before the advanced form of prostate carcinoma develops.

**Key Words :** PTEN, BPH, Prostate Cancer, Western-Blot

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim esnasında ve tez çalışmamda gerekli tüm şartları sağlayan, tez yazımında bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen saygıdeğer danışman hocam Sayın Prof. Dr. Güven LÜLECİ' ye,

Bu çalışmada kullanılan tekniğin oturtulmasında ve tezin yazımında büyük emeği ve özverisi bulunan, gösterdiği anlayışa saygı duyduğum, desteğini her zaman yanımda hissettiğim II. danışman hocam ve proje yürütücüsü Sayın Doç. Dr. Salih ŞANLIOĞLU' na,

Bu çalışmanın konusunu belirleyen ve tanımaktan gurur duyduğum ancak bilgi, beceri ve deneyimlerini çok kısa bir süre tattığım çok değerli hocam Sayın Doç. Dr. Nidai Osman ÖZEŞ' e,

Bu çalışma kapsamındaki olguların teminini ve klinik olarak değerlendirilmesini sağlayan, tezin yazımında desteklerini esirgemeyen Üroloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Mehmet BAYKARA' ya ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Türker KÖKSAL' a,

Tez çalışmamın başlangıcından itibaren hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan, emeği ve özverisi tartışılmaz değerli çalışma arkadaşım Arş. Gör. Duygu YAŞAR' a

Tezimin web sayfasının hazırlanmasında tartışılmaz desteğinden dolayı çok değerli arkadaşım Suat ÖZBEK' e

Eğitimim boyunca verdikleri destek ve gösterdikleri sevgi için Sinop' ta bulunan sevgili aileme ve arkadaşlarıma,

Göstermiş oldukları anlayış ve yardımlarından dolayı Anabilim Dalımız hocalarına, sekreterine, tüm asistan ve teknisyen arkadaşlarıma en içten dileklerle teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
KISALTMALAR DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	3
2.1.    Kanser	3
2.1.1.    Kanser Hücrelerinin Özellikleri	3
2.1.2.    Kanser Tipleri	4
2.2.    Prostat	6
2.2.1.    Prostat Dokusunun Anatomisi ve Görevi	6
2.2.2.    Benign Prostat Hiperplazisi (BPH)	7
2.3.    Prostat Kanseri	8
2.3.1.    Prostat Kanserinin Sınıflandırılması	10
2.4.    Prostat Kanseri Genetiği	12
2.4.1.    Prostat Kanseri Oluşumu ile İlgili Genler	13
2.4.1.1.    Onkogenler	13
2.4.1.2.    Tümör Süpressör Genler	14
2.5.    PTEN	15
2.5.1.    PTEN Geninin Klonlanması	15
2.5.2.    PTEN Proteininin Yapısı	17
2.5.3.    PTEN Proteininin Fonksiyonu	19
2.5.3.1.    Apoptosis ve PTEN	20
2.5.3.2.    Hücre Proliferasyonu ve PTEN	22

2.5.3.3. Hücre Migrasyonu, İnvazyonu ve PTEN	23
2.5.3.4. Embriyonik Gelişimde PTEN Proteininin Önemi	24
2.5.4. PTEN Proteininin Regülasyonu	25
2.6. PTEN ve Prostat Kanseri	26
<b>MATERYAL - METOD</b>	<b>30</b>
3.1. Protein Miktarının Tayin Edilmesi	30
3.1.1. Kullanılan Malzemeler	30
3.1.2. Protein Miktar Tayininde Standart Grafik Hazırlanması	31
3.1.3. Protein Miktar Tayini	32
3.2. Western Blot	32
3.2.1. Jelin Hazırlanması	32
3.2.1.1. Solüsyonların Hazırlanması	33
3.2.1.2. Jel Hazırlamak İçin Kullanılan Kimyasal Miktarları	34
3.2.1.3. İşlemler	35
3.2.2. Elektroforez İşlemi	36
3.2.2.1. Solüsyonların Hazırlanması	36
3.2.2.2. Elektroforeze Konacak Örneklerin Hazırlanması	36
3.2.2.3. İşlemler	37
3.2.3. Elektroforez Jelinin Membrana Aktarılması	38
3.2.3.1. Solüsyonların Hazırlanması	38
3.2.3.2. İşlemler	38
3.2.4. Membranların Antikor ile İşaretlenmesi	39
3.2.4.1. Solüsyonların Hazırlanması	39
3.2.4.2. İşlemler	40
<b>BULGULAR</b>	<b>42</b>
<b>TARTIŞMA VE SONUÇLAR</b>	<b>50</b>
<b>KAYNAKLAR</b>	<b>55</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>69</b>



## KISALTMALAR DİZİNİ

AKT/PKB	Protein Kinase B
APS	Amonyum Per Sülfat
AR	Androjen Reseptör
Bcl-2	B Cell Leukemia oncogene-2
BPH	Benign Prostate Hyperplasia
BSA	Bovine Serum Albumine
CGH	Comparative Genomic Hybridization
CDK-2	Cyclin Dependent Kinase-2
CREB	cAMP Response Element-Binding Protein
ECL	Enhanced Chemi-Luminescence
EGTA	Etilenbis(oksietilennitrilo)tetraasetikası
ERK	Extracellular Signal-Regulated
FAK	Focal Adhesion Kinase
FISH	Fluorescence <i>In Situ</i> Hybridization
Grb2	Growth Factor Receptor-2
GSK-3	Glycogen Synthase Kinase-3
Hepes	N-(2-hidroksietil) piperazin-N-(2-etan sulfonikası)
İEPKa	İleri Evre Prostat Kanseri
LOH	Loss Of Heterozygosity
MAGI	Membrane Associated Guanylate kinase Inverted
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MgCl <sub>2</sub>	Magnesium-Cloride (Magnezyumklorid)
MMAC1	Mutated in Multiple Advanced Cancer-1
NaCl	Natrium-Cloride (Sodyumklorür)
NaF	Natrium-Florid (Sodyumflorid)
Na-O-Va	Natrium-Orto-Vanadat (Sodyumortovanadat)
NIH	National Institute of Health
OSPKa	Organa Sınırlı Prostat Kanseri

<b>PBST</b>	<u>Phosphate-Buffered Saline</u> / <u>I</u> ween-20
<b>PDGF</b>	<u>Plat</u> ellet <u>D</u> erived <u>G</u> rowth <u>F</u> actor
<b>PDK-1</b>	<u>3</u> Phosphoinositide <u>D</u> ependent protein <u>K</u> inase- <u>1</u>
<b>PI(4,5)P<sub>2</sub></b>	<u>Phosphatidyl-Inositol</u> 4,5- biphosphat
<b>PI(3,4,5)P<sub>3</sub></b>	<u>Phosphatidyl-Inositol</u> 3,4,5 triphosphate)
<b>PI3K</b>	<u>Phosphatidyl-Inositol</u> <u>3</u> <u>K</u> inase
<b>PMSF</b>	<u>Fenilmetansulfonilflorid</u>
<b>PSA</b>	<u>Prostate</u> <u>S</u> pecific <u>A</u> ntigen
<b>PTEN</b>	<u>Phosphatase</u> and <u>T</u> ensin homolog deleted on chromosome <u>ten</u>
<b>PTP</b>	<u>Protein</u> <u>T</u> irozin <u>F</u> osfataz
<b>PVDF</b>	<u>PoliVinilDiFluorid</u>
<b>RB</b>	<u>RetinoBlastoma</u>
<b>SDS</b>	<u>Sodyum</u> <u>D</u> odesil- <u>S</u> ulfat
<b>SH2</b>	<u>Src-Homology</u> <u>2</u>
<b>TEMED</b>	<u>N, N, N', N'</u> -tetrametiletilendiamin
<b>TEP1</b>	<u>Transforming</u> growth factor- $\beta$ -regulated and <u>E</u> pithelial cell-enriched <u>P</u> rotein tyrosine phosphatase- <u>1</u>
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	<u>Tumor</u> <u>G</u> rowth <u>F</u> actor- $\beta$
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<u>Tumor</u> <u>N</u> ecrosis <u>F</u> actor- $\alpha$
<b>TNM</b>	<u>Tumor</u> <u>N</u> od <u>M</u> etastasis
<b>TRUS</b>	<u>TransRectal</u> <u>U</u> ltra <u>S</u> onography
<b>TUR</b>	<u>TransUrethral-</u> <u>R</u> esection
<b>UICC</b>	<u>Union</u> <u>I</u> nternationale <u>C</u> ontre le <u>C</u> ancer (International Union Against Cancer)
<b>WT</b>	<u>Wild-Type</u>

## TABLolar DİZİNİ

Tablo	Sayfa
2.1. Amerika Birleşik Devletleri' nde en sık görülen kanserler	5
2.2. TNM sınıflaması	11
3.1. Ayrışma jeli tamponları ve miktarları	34
3.2. Yükleme jeli tamponları ve miktarları	34
4.1. Organa sınırlı prostat kanserli tümör materyallerinin klinik sınıflandırılması ve PTEN ekspresyon düzeyi	43
4.2. İleri evre prostat kanseri materyallerinin klinik sınıflandırılmaları, PTEN ekspresyon düzeyleri ve hormon duyarlılıkları	43
4.3. BPH materyallerinin klinik değerleri ve PTEN ekspresyon düzeyi	44

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
2.1. Alt üriner sistem – yandan görünüş	6
2.2. Adenom dokusunun büyüme sırasında yarattığı basınç ile gerçek prostat dokusu ve uretrayı sıkıştırması	7
2.3. Çeşitli dönemlerde prostat dokusunda gelişen kanser odakları	9
2.4. PTEN proteininin yapısal görüntüsü	18
2.5. PTEN proteininin fonksiyonu	21
4.1. Prostat dokusunun histo-patolojik analizi	46
4.2. Serum PSA miktar analizi	47
4.3. BPH, OSPKa ve İEPKa örneklerini Western- Blot analizi	48
4.4. PTEN ekspresyon profilleri	49

## GİRİŞ VE AMAÇ

Bilindiği gibi kanser, genetik ve çevresel faktörlerin beraber rol oynadığı multigenik bir hastalıktır. Günümüzde kanser çeşitleri arasında prostat kanseri özellikle 50 yaş üzerindeki erkeklerde % 32 sıklıkla görülmektedir. Prostat kanseri erkeklerde ölüme sebebiyet veren kanserler arasında ise ikinci sırayı almaktadır. Prostat kanserlerinde tanı amaçlı kullanılan markırların başında PSA (prostate specific antigen) gelmesine rağmen, her zaman tanıda yeterli olmamaktadır. Bu nedenle, tanı güvenilirliğinin geliştirilmesi için, yeni biyomarkırlara ihtiyaç duyulmaktadır.

Etiyolojisi tam olarak ortaya konamayan prostat kanserinde muhtemelen iyi huylu epitel hücre kökenli tümörlerin, çok basamaklı bir süreç sonucunda, adenokarsinomaya transformasyonu söz konusudur. Prostat kanseri dahil kanser hücrelerinde bir veya birçok protoonkogenin ekspresyonunun artışı ya da tümör süpressör genlerin ekspresyonunun azalışı hücre içi kontrol mekanizmalarının dengesini bozmaktadır. Bu genlerin ürünleri hücre proliferasyonunda, DNA tamir mekanizmalarının düzenlenmesinde ve apoptoziste rol oynayan moleküllerdir. Bunun yanı sıra hücre bölünmesini baskılayan tümör süpressör genlerin her iki allelinde de fonksiyon kaybı kontrolsüz hücre bölünmesine ve tümör gelişimine neden olmaktadır.

Dört yıl önce lokalizasyonu 10q23.3 olarak belirlenen PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog deleted on Chromosome Ten) geni yeni bir tümör baskılayıcı gen olarak klonlanmıştır. PTEN çeşitli büyüme faktörlerinin etkileriyle PI3-K (phosphatidylinositol-3-kinase) fosfatidil inozitol 4,5-bifosfatlardan, fosfatidil inozitol 3,4,5-trifosfatların oluşumunu ve birikimini sağlar. 3,4,5-trifosfatlar, PDK-1 (3Phosphoinositide dependent protein kinase-1)' i a eder. Fosforile edilen

PDK-1 ise bir serin-treonin kinaz olan protein kinaz B (AKT)' yi aktif hale geçirir. Aktive olan AKT hem hücre büyümesini ve bölünmesini stimüle eder hem de apoptozisi inhibe eder. AKT'nin aşırı ekspresyonu ise hücrenin transforme olmasına neden olur. Bu mekanizma içerisinde PTEN gen ürünü bir fosfataz olarak rol alır ve fosfatidil inozitol 3,4,5-trifosfatları parçalayarak PI3-kinaza zıt çalışır. Sonuç olarak AKT aktivasyonunu engelleyerek apoptozisin oluşmasını sağlar.

Prostat kanseri tanısı için, serum PSA düzeyi ve Gleason skoru gibi bilinen markırların yetersiz olmasından dolayı ilave markırlara ihtiyaç vardır. Normal prostat hücrelerinde kansere sebebiyet veren moleküler mekanizmaların aydınlatılması, prostat kanserinin daha iyi değerlendirilmesini sağlayacaktır. Prostat kanserine tanı konulmasında yeni prognostik markırların rollerini belirlemek ve kontrollerle kıyaslamak önemli olacaktır. Çalışmamızda radikal prostatektomi ve biyopsi örneklerinde Western-Blot metodu ile PTEN ekspresyon seviyesi ve kanserin seyri ile olan ilişkisi araştırılmaktadır. Proje kapsamında Western-Blot metodu ile PTEN ekspresyon derecesinin belirlenmesi, prostat kanserinin moleküler patogenezinin tanımlanması, klinisyene kanserin seyri ve uygulanacak tedavinin belirlenmesinde yol gösterici olup olmayacağını araştırılması amaçlanmıştır.

## GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kanser

Çok hücreli bütün hayvanlarda olduğu gibi, insan vücudu da çeşitli hücrelerin oluşturduğu bir ekosistem olarak görülmektedir. Bu hücreler bölünerek çoğalır ve belirli işbirliği içerisinde girerek dokuları meydana getirir. Hücrelerden herhangi birisinde, diğerlerinin aleyhine sebep olacak bir mutasyon, tüm işbirliğinin geleceğini tehlikeye sokar. Bu şekildeki bir mutasyon sonucunda, somatik hücre popülasyonu içerisinde başlayan rekabet felaket için başlangıç olur. Sonuç olarak, bir hücrede başlayan ve komşu hücreleri harcama pahasına bencilce gelişen ve sonunda tüm hücreli birliği hasara uğratarak bazen ölüme sebebiyet veren hastalık, kanser olarak tanımlanmaktadır (1-3).

Bir organizmadaki her bir hücrenin proliferasyonu, farklılaşması, hayatta kalması ve bunun gibi diğer normal işlevleri mükemmel bir şekilde düzenlenmektedir. Bu düzen, kendi normal büyüme ve bölünme mekanizması bozulmuş, kontrolsüz bir şekilde bölünüp çoğalan, yeni karakterlere sahip olmuş kanser hücrelerinde kaybolmaktadır (2).

#### 2.1.1. Kanser Hücrelerinin Özellikleri

İnsan vücudunu oluşturan milyarlarca hücrenin her biri, ne zaman çoğalacağını ve nasıl gelişeceğini bildiren karmaşık bir genetik program taşımakta ve bunu okuyabilmektedir. Bu programı okuma fonksiyonu bozulduğu zaman bir çok hastalık ortaya çıkmaktadır. Buradan hareketle kanser hücrelerinin bazı genel özellikleri şu şekilde tanımlanabilmektedir;

- a) Kanser hücresi, kendi normal büyüme ve bölünmesini düzenleme mekanizması bozulmuş bir hücredir.
- b) Kanser hücreleri hızla çoğalan fakat farklılaşmalarını tamamlayamamış hücrelerdir. Transforme hücre olarak isimlendirilen bu hücrelerden oluşmuş bir hücre popülasyonu, genellikle genlerinde değişimler olan bir tek hücrenin bölünüp çoğalması sonucunda meydana gelmektedir. Bu nedenle ki, kanser her zaman için transforme bir hücre ile başlamaktadır.
- c) Normal hücrelerin plazma zarı yüzeyinde bulunan glikoproteinler, glikolipidler ve polisakkaritler hücreye biyokimyasal bir kimlik kazandırmakta ve genetik kontrol altında bulunmaktadır. Bu moleküllerin bir görevi de, hücre reseptörü olarak iş görmek ve kontak inhibisyonu sağlamaktır. Kanser hücresinde, yeni yüzey karakterleri kazanıp kontak inhibisyonun ortadan kalkması ile sürekli olarak çoğalmaktadır.

### 2.1.2. Kanser Tipleri

Kanser, organizma içerisindeki herhangi bir hücrenin anormal proliferasyonu sonucu oluşmakta ve bu durum yüzden fazla farklı kanser çeşidinin ortaya çıkmasına neden olmaktadır.

Kanserin patolojisinde en önemli nokta benign ve malign tümörler arasındaki farktır. Tümör, ister benign olsun ister malign olsun hücrenin anormal proliferasyonu sonucu oluşmaktadır. Benign tümörler, orijinal lokalizyonları ile sınırlı kalan, çevresindeki normal dokulara ya da vücudun diğer bölgelerine yayılmayan tümörlerdir (2). Malign tümör ise çevre dokulara ya da dolaşım ve lenf kanalları aracılığı ile vücudun diğer bölgelerine yayılabilen (metastaz) tümörlerdir. Kanser olarak adlandırılmalarının nedeni de budur.



Benign ve malign tümörler köken aldıkları hücrenin tipine bağlı olarak karsinoma, sarkoma, lösemi ve lenfoma olarak dört grup altında toplanmaktadır. İnsan kanserlerinin % 90' a yakın bir kısmını oluşturan karsinoma epitel kökenli iken sarkoma, bağ doku ve destek doku kökenli solid tümörlerdir. Lösemi ve lenfomalar ise immün sistem hücreleri ve kan yapım hücreleri kökenlidir.

Günümüzde birçok kanser çeşidi bulunmakta ve bazı kanser çeşitlerinin sıklığı oldukça yüksek gözlenmektedir. Amerika Birleşik Devletleri' nde her yıl yaklaşık bir milyondan fazla hastaya kanser tanısı konmakta ve bu olguların yaklaşık 500,000' i ölmektedir. Tablo-1' de görülen 13 farklı dokuda meydana gelen kanserler, tüm kanserlerin yaklaşık % 85'ini oluşturmakta ve prostat kanseri % 23 ile en sık gözlenen kanser olarak dikkat çekmektedir.

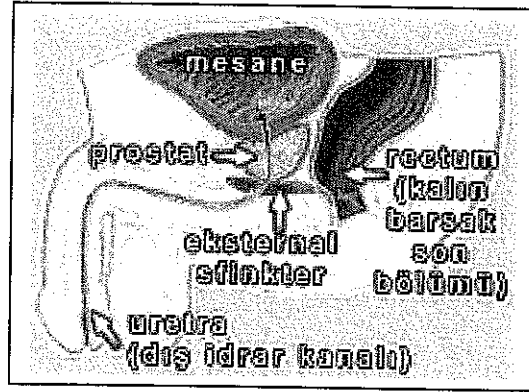
**Tablo 2.1.** Amerika Birleşik Devletleri' nde en sık görülen kanserler (2).

Kanser Bölgesi	Yıllık Olgu Sayısı	Yıllık Ölüm Oranı
Prostat	317.000 (% 23)	41.000 (% 7.4)
Meme	186.000 (% 14)	45.000 (% 8.1)
Akciğer	177.000 (% 13)	159.000 (% 29)
Kolon / Rektum	134.000 (% 10)	55.000 (% 9.9)
Lenfoma	60.000 (% 4.4)	25.000 (% 4.5)
Mesane	53.000 (% 3.9)	12.000 (% 2.2)
Uterus	50.000 (% 3.7)	11.000 (% 2.0)
Deri (melanoma)	38.000 (% 2.8)	7.000 (% 1.3)
Dalak	31.000 (% 2.3)	12.000 (% 2.2)
Oral	29.000 (% 2.1)	8.000 (% 1.4)
Lösemi	28.000 (% 2.1)	21.000 (% 3.8)
Over	27.000 (% 2.0)	15.000 (% 2.7)
Pankreas	26.000 (% 1.9)	25.500 (% 5.0)
<b>Toplam</b>	<b>1.156.000 (% 85)</b>	<b>439.000 (% 79)</b>
<b>Genel Toplam</b>	<b>1.359.000 (% 100)</b>	<b>555.000 (% 100)</b>

## 2.2. Prostat

### 2.2.1 Prostat Dokusunun Anatomisi ve Görevi

Prostat, fibromusküler bir stroma içerisinde 30 ile 50 adet tubulo-alveolar glandın bulunduğu sekretuar bir organdır. Prostat şekil olarak tabanı mesane boynuna oturan tepesi ise ürogenital diyafragma üzerinde bulunan ve membranöz uretra ile devam eden ters bir piramide benzemektedir (Şekil 2.1.). Normal prostat ağırlığı 18-20 gr olup bu ağırlık 10-15 kata varan oranlarda artabilmektedir. Prostatın anterior, posterior ve her iki yanda da inferio-lateral olmak üzere 4 adet yüzeyi bulunmaktadır. Vücudun normal işleyişinde üstlendiği görev sperm canlılığını ve hareketini artırıcı salgılar üretmek şeklinde olup cinsel fonksiyonla ilgilidir.



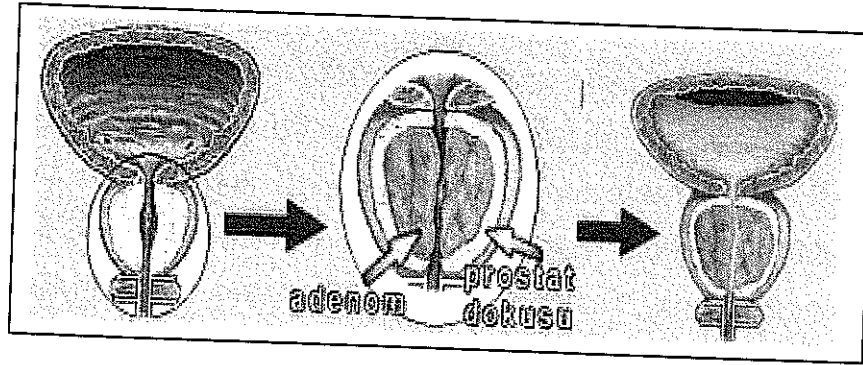
Şekil 2.1. Alt üriner sistem - yandan görünüş (4).

Prostatın yaklaşık %70'ini glandüler yapı, %30'unu ise de fibromusküler stroma oluşturmaktadır. Stroma kapsül ile devam etmekte olup, kollajenin yanı sıra fazla miktarda düz kas da içermektedir. Uretra prostatı boylu boyunca geçer ve genellikle de anterior yüzeye daha yakındır (5-7).

### 2.2.2. Benign Prostat Hiperplazisi (BPH)

Prostatta ortaya çıkan hücresel farklılaşmalar sonucu prostat içerisinde adenom adı verilen dokunun gelişmesi, benign prostat hiperplazisi (BPH) olarak isimlendirilmektedir. Bu durum aslında hemen hemen tüm erkeklerde meydana gelirse de erkeklerin ancak 1/3'ünde tedavi gerektirecek ölçüde üriner obstrüksiyona yol açmaktadır. Bu büyüme üç önemli sonuç doğurmaktadır.

- 1- Prostatik uretra çevresinde gelişmekte olan adenom dokusu infravezikal obstrüksiyonun başlamasına yol açmaktadır.
- 2- Prostat bir bütün halinde genişlemeye ve büyümeye başlamaktadır.
- 3- Gerçek prostat dokusu adenom tarafından dışarı doğru itildikçe incelmekte ve adenom'un çevresini saran bir kabuk haline dönüşerek prostat kapsülü olarak adlandırılmaktadır (Şekil 2.2.).



Şekil 2.2. Adenom dokusunun büyüme sırasında yarattığı basınç ile gerçek prostat dokusu ve uretrayı sıkıştırması (8).

İnfravezikal obstrüksiyon ile hastada:

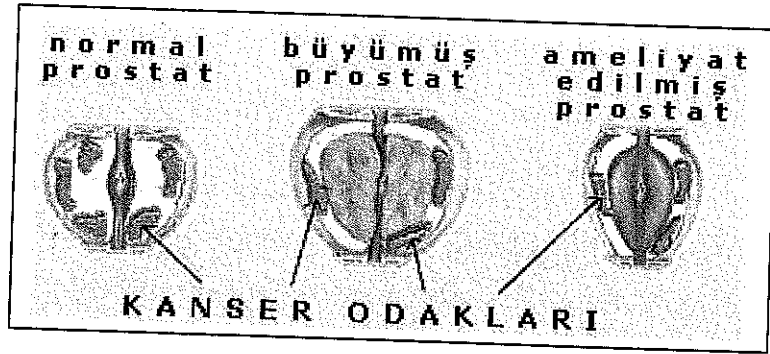
- Sık idrara çıkmak
- Zor idrar yapmak
- İdrara başlarken bir süre beklemek
- Geceleri idrar hissi ile uyanmak
- Mesanenin tam boşalmadığını hissetmek
- İdrarı kesik kesik boşaltmak
- Miksiyondan çok kısa bir süre sonra tekrar idrar hissi duymak
- Ani idrar sıkışmaları hissetmek, bazen idrarı tutamamak

gibi belirtiler ortaya çıkar ve bu belirtilerin şiddeti giderek artmaktadır. Belirtiler yıllar içinde yavaş yavaş geliştiğinden ve bu duruma adapte oldukları için ciddi obstrüksiyonu olan hastalar bile bazen bu durumu normal olarak kabul edebilirler.

## 2.2. Prostat Kanseri

Prostat kanseri de prostat büyümesi gibi 40 yaşından sonra ortaya çıkmaya başlayan ve oldukça sık görülen bir hastalıktır. A.B.D'nde prostat kanseri, erkeklerde ölüme sebebiyet veren kanserler arasında akciğer kanserinden sonra ikinci sırayı almaktadır (9). A.B.D'de her yıl yaklaşık 198.100 prostat kanseri teşhisi konmakta ve bu hastaların yaklaşık 31.500'ü ölmektedir (10). Buna karşılık Fidaner ve arkadaşlarının İzmir için çeşitli yaş grupları arasında yaptıkları çalışmada, prostat kanseri sıklığını % 3-4 olarak belirtilmişlerdir. Prostat kanserine erken dönemde tanı konulabilmesi için yapılan çalışmalar son dönemde oldukça artmış olsa da, prostat kanseri tanısı konmuş ve tedavi edilen hasta sayısı 1/5' i geçmemektedir (11). Yeni üretilen ya da geliştirilmiş kemoterapotikler ile yapılan klinik çalışmalar, prostat kanseri hastalarının yaşam süresinin uzatılabilmesi konusunda hala başarılı olamamıştır (12).

BPH' nin aksine kanser odakları adenom dokusu ile ilişkili değildir, gerçek prostat dokusundan kaynaklanmaktadır. Bu özelliğinden dolayı normal büyüklükteki bir prostatta, adenom nedeni ile büyümüş bir prostatta, hatta BPH nedeni ile ameliyat geçirmiş bir prostatta da kanser ortaya çıkabilir, aynı prostatta kanser ve adenom birlikte bulunabilmektedir (Şekil 2.3.).



Şekil 2.3. Çeşitli dönemlerde prostat dokusunda gelişen kanser odakları (13).

Prostat kanseri özellikle erken dönemlerinde çok sinsi bir hastalıktır. Kişide kanserle birlikte BPH ve buna bağlı şikayetler mevcut değilse kanserin kendisine özgü hiç bir belirtisi bulunmayabilir. Kanser, erken dönemde tanı konulmazsa öncelikle bölgesel olarak yayılarak prostat dokusunun dışına ve sonrasında komşu organlar olan uretra, mesane ve rektuma yayılarak çok ciddi idrar yapma sorunlarına, idrarla birlikte gelen şiddetli kanamalara ve dışkılama problemlerine yol açmaktadır. Erken dönemde yakalanan prostat kanserini radikal prostatektomi ile tüm prostatı çıkartarak tamamen tedavi etmek mümkündür. Genelde, ürologlar organa sınırlı prostat kanserinde radikal prostatektominin en güvenilir tedavi olduğu yönünde hemfikir olsalar da ilk 10 yıl içerisinde hastaların % 30-56' sında hastalık nüksetmektedir (14,15).

Prostat kanseri sadece lokal olarak yayılmakla kalmaz, kanser hücreleri lenfatik damarlar ve kan damarları ile vücuda dağılarak uzak organlara da yerleşirler. Uzak metastaz olarak adlandırılan bu durumdan en çok kemikler, akciğerler, karaciğer gibi iç organlar ve beyin etkilenmektedir. Hepsi çok önemli işlevler yüklenmiş olan bu organlarda kanserli hücrelerin yerleşip büyümesi ile, organın yüklendiği göreve göre değişen bozukluklar, örneğin şiddetli kemik ağrıları, kan yapım bozuklukları, solunum problemleri ve hemoptizi, karaciğer yetmezliği gibi ciddi problemler ortaya çıkmaktadır ve sonuçta hasta kaybedilmektedir.

### **2.3.1. Prostat Kanseri' nin Sınıflandırılması**

Prostat Kanserinin anatomik sınıflandırılması, UICC (Union Internationale Contre le Cancer = International Union Against Cancer) organizasyonu tarafından belirlenen ve tüm dünyada kullanılan ve Tablo 2.2.' de görülen TNM (Tumor Nod Metastasis) sınıflaması ile yapılmaktadır. Sınıflandırılma sadece adenokarsinomaları içermekte ve prostat dokusunun transitional hücre karsinomları, uretral tümörler olarak kabul edilmektedir.

Tablo 2.2. TNM sınıflaması ( American Joint Committee on Cancer 1997) (16)

Primer Tümör (T)

TX	Primer tümörün değerlendirilememesi
TO	Primer tümöre ait bulgu yok
T1	Klinik olarak tesbit edilemeyen tümör (palpe edilemeyen ve görüntüleme yöntemleri ile tesbit edilemeyen tümör)
I1a	Tümörün, TUR ile rezeke edilen materyalin % 5' inden daha azında bulunması
I1b	Tümörün, TUR ile rezeke edilen materyalin % 5' inden daha fazlasında bulunması
I1c	Serum PSA yüksekliğine bağlı TRUS-biyopsi ile tespit edilen tümör
I2	Palpe edilen ve prostata sınırlı tümör
I2a	Bir lobu tutan tümör
I2b	Her iki lobu tutan tümör
I3	Tümörün prostatik kapsül dışına yayılımı
I3a	Ekstrakapsüler yayılım (tek ya da çift taraflı)
I3b	Veziküla-seminalis invazyonunun bulunması
I4	Tümörün veziküla-seminalis dışında diğer komşu yapılara invazyonu veya fiksasyonu

Bölgesel Lenf Nodülleri (N)

NX	Bölgesel bir lenf nodu değerlendirilemedi
NO	Bölgesel bir lenf nodu metastazı yok
N1	Lenf nodu ya da nodlarında metastaz

Uzak Metastazlar (M)

MX	Uzak metastatik yayılım değerlendirilemedi
MO	Uzak metastatik yayılım yok
M1	Uzak metastatik yayılım
M1a	Bölgesel olmayan lenf nodu tutulumu
M1b	Kemik metastazı
M1c	Diğer organların metastazı

**T- kategorileri:** Fiziksel muayene, görüntüleme, endoskopi, biyopsi ve biyokimyasal testleri, **N-Kategorileri:** Fiziksel muayene ve görüntüleme, **M-Kategorileri:** Fiziksel muayene, görüntüleme, iskelet sistemi çalışmalarını ve biyokimyasal testleri içermektedir (16).

Prostat kanserinin histopatolojik sınıflandırılmasında ise, tümörün glandular farklılaşması göz önüne alınarak yapılan Gleason Skorlaması sistemi kullanılmaktadır. Gleason skorları, 2-10 arasında değişmektedir (17).

#### 2.4. Prostat Kanseri Genetiği

Moleküler temelinin oldukça karmaşık ve heterojen bir hastalık olmasından dolayı prostat kanserinin nedeni hala bilinmemektedir. Kanserin gelişiminde, iyi huylu epitel hücre kökenli tümörlerin, çevresel ve genetik etkileşimler sonucunda çok basamaklı bir süreç ile adenokarsinomaya transformasyonu ileri sürülmektedir (3). Son dönemde yapılan genetik çalışmalar, tüm prostat kanseri olguları arasında yaklaşık % 10' unun otozomal dominant bir kalıtım ile ailesel geçiş gösterdiğini belirtmektedir (18,19). Kansere yakalanmanın riski, ailede prostat kanseri olan birinci dereceden akrabaların varlığına bağlı olarak 2 - 11 kat artmaktadır (20). Çevresel faktörler de riskin artmasında rol oynamaktadır (21,22). Asyalılar prostat kanseri riski açısından daha şanslıdırlar. Japon erkeklerinde prostat kanseri görülme riski Amerikalı' lardan yaklaşık 40 kez daha azdır. Ancak ilginç olan Amerika' ya göç etmiş Asya' lılarda riskin arttığı görülmüştür. Bu da çevre ve beslenme faktörlerinin önemini göstermektedir (23,24). Prostat kanseri ile erkeklik hormonu arasında bir ilişki olduğu ileri sürülmektedir. Kısırlaştırılmış erkeklerde prostat kanserinin görülmemesi buna delil olarak gösterilmektedir.

Prostat kanserinde CGH (Comparative Genomic Hybridization), FISH (Fluorescence *In Situ* Hybridization) ya da LOH (Loss Of Heterozygosity) ile yapılan çalışmalarda birçok kromozomal bölge delesyonları tespit edilmiş ve bunlar içerisinde LOH, özellikle tümör süpressör gen lokuslarının belirlenmesinde kullanılmıştır. Şu ana kadar prostat kanserinde 2q13-q33, 5q14-23, 6q16-q22, 7q22-q32, 8p21-22,



9p21-22, 10q23-q24, 12p12-13, 13q14-q21, 16q22-24 ve 18q21-q24 kromozomal bölgelerinde delesyonların daha sık olduğu görülmüştür (25).

#### **2.4.1. Prostat Kanseri Oluşumu İle İlgili Genler**

Kanser, bazı genlerin kusurlu bir şekilde işlenmesi sonucu ortaya çıkan genetik bir hastalıktır. Genlerin kusurlu bir şekilde fonksiyon görmesi, kalıtsal kanser modellerinde olduğu gibi kalıtsal bir geçiş gösterebilmekte, sporadik kanserlerde olduğu gibi karsinogenik faktörler ile indüklenebilmekte ya da DNA metilasyonu veya imprinting gibi epigenetik mekanizmalar sonucu oluşabilmektedir (25). Kanser ile ilişkili genler, hücre içerisindeki fonksiyonlarına bağlı olarak iki gruba ayrılmaktadırlar. Bunlar proto-onkogenler ve tümör süpressör genlerdir.

Proto-onkogenler ve tümör süpressör genler normal hücre döngüsü ve proliferasyonunu kontrol eden çeşitli proteinleri kodlarlar. Proto-onkogenlerin onkogenlere dönüşümüne ve tümör süpressör genlerin fonksiyon kaybına neden olan mutasyonlar, hücrenin kanserleşmesi ile sonuçlanmaktadır (26). Hücrelerde bir veya birçok proto-onkogenin ekspresyonunun artışı ya da tümör süpressör genlerin ekspresyonunun azalışı, hücre içi kontrol mekanizmalarının dengesini bozmaktadır. Bu genlerin ürünleri hücre proliferasyonunda, DNA tamir mekanizmalarının düzenlenmesinde ve apoptoziste rol oynayan proteinlerdir (26,27).

##### **2.4.1.1. Onkogenler**

Normal hücresel fonksiyonlarda görev alan proto-onkogenlerin mutant formlarıdır. Proto-onkogenler, büyüme faktörleri ve reseptörlerini, transkripsiyon faktörleri, hücre döngüsü proteinlerini ve sinyal iletim proteinleri gibi hücre içi fonksiyonlarda oldukça önemli olan proteinleri kodlarlar.

Onkogen aktivasyonunda çeşitli mekanizmalar rol oynamaktadır. Nokta mutasyonlar, kromozomlarda yeniden düzenlenmeler, gen

amplifikasyonları, retroviral onkogenler ve insersiyonel mutagenesisler, onkogen aktivasyonunu sağlamaktadırlar (28).

Yapılan çalışmaların sonucunda şu ana kadar rodent veya insan prostat kanserine spesifik ya da aktivasyon ile fonksiyon gören bir onkogen tanımlanmamıştır (29).

#### 2.4.1.2. Tümör Süpressör Genler

Tümör süpressör genler, normal olarak hücre bölünmesini yavaşlatan, DNA' nın hasarlı ya da kromozomların anormal olduğu durumda hücre döngüsünü durduran kontrol noktası genlerini kodlarlar (27). Bu şekilde hücrenin kontrolsüz büyüüp çoğalmasını ve migrasyonunu engellemiş olurlar.

Kromozomal delesyonlar, kanser hücreleri içerisinde en sık rastlanan genetik değişimlerdir. Böylesine bir kayıp, kromozomun belirli bir bölgesinin yanısıra tamamını da içerebilmektedir (30). Tümör süpressör genlerin lokalizasyon tesbitinde kullanılan bölgesel kromozomal kayıplar üç şekilde meydana gelmektedir. Birinci durumda, delesyon normal allelde meydana gelmekte, resesif mutant olan diğer allelin duplikasyonu ile kayıp telafi edilmekte ve toplam genomda bir kayıptan söz edilmemektedir. LOH' un meydana geldiği bu durumda resesif mutasyon kendini göstermektedir. İkinci durumda normal allelde delesyon oluşur ancak duplikasyon yoktur. Bu durum resesif mutasyonun kendisini göstermesi dışında yetersiz ürün oluşmasına da neden olmaktadır. *Hemizigot delesyon* olarak tanımlanan bu mekanizmada o lokus için genomun yarısı kayıp edilmektedir. Son kromozomal delesyon oluşum mekanizması ise her iki allelin de aynı lokus için delesyona uğramasıdır. *Homozigot delesyon* olarak adlandırılan bu olayda o lokus için genom kayıp edilmektedir (25). Bunun sonucunda tümör süpressör genin, her iki allelinin işlev kaybetmesinden sonra o hücredeki etkisi ortadan kalkar ve kontrolsüz olarak bölünmeye başlayan hücre kanserleşir (31).

CGH, FISH ve LOH analizleri ile prostat kanseri dokularında ve hücre kültürlerinde yapılan çalışmalar ile tümör süpressör gen işlevi olan ve 11p11.2 kromozomal lokalizasyon gösteren KAI1' in, 12p13'de p27/Kip1' in, 8p21'de NKX3.1' in ve 10q23.3 kromozom bölgesinde yer alan PTEN (Phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosome ten)' in prostat kanserinde rol aldığı düşünülmektedir (25,29). Bunların arasında PTEN, prostat kanserinde en sık mutasyona uğrayan gen olarak bildirilmiştir.

## 2.5. PTEN

### 2.5.1. PTEN Geninin Klonlanması

Tümör, ileri evrelere geçildikçe daha fazla genetik değişimlere sahip olmaktadır. 1997 yılında Li ve arkadaşlarınca yapılan çalışmalarda, 10q23 bölgesinde birçok insan tümöründe sıklıkla ortaya çıkan genetik değişikliklerden birisinin heterozigosite kaybı olduğu belirtilmiştir. 10q23 bölgesinde LOH, düşük dereceli gliyal tümörlerde ve erken evre prostat kanserlerinde seyrek görünse de glioblastomalarda yaklaşık % 70 ve ileri evre prostat kanserinde yaklaşık % 60 olduğu belirtilmektedir. Fare glioblastoma hücrelerinde WT (Wild-Type) 10 nolu kromozomun tümörleşmeyi baskıladığının rapor edilmesi (32) ve bu bölgedeki heterozigosite kayıplarının gösterilmiş olması, 10q23 bölgesinde bir tümör süpressör genin kodlandığı fikrini ortaya koymuştur. İnsan hücre hattı ve ksenograflarda 10q23 bölgesinde homozigot delesyonlar bakımından yapılan çalışmalar sonucunda PTEN, bir tümör süpressör aday gen olarak klonlanmıştır. Yapılan sekans analizleri sonucunda *PTEN* geni' nin bir tirozin fosfataz domaininin olduğu, tensin ve oksilin proteinlerine büyük bir homoloji gösterdiği belirtilmiştir. Aynı grubun PTEN mutasyonları için yaptıkları çalışma sonucunda ise glioblastoma hücre hattı ve ksenograflarda % 31 (13/42), prostat kanserinde % 100 (4/4), meme kanseri hücre hattı ve ksenograflarında % 6 (4/60) ve primer glioblastomalarda % 17 (3/18) PTEN mutasyonu rapor edilmiştir (33).

Li ve arkadaşlarının yaptığı çalışmadan bağımsız olarak yine 1997 yılında Steck ve ekibi aynı geni MMAC1 (mutated in multiple advanced cancer-1) olarak izole etmişlerdir (34,35). Bu grup, MMAC1 geni için araştırmalarına sıklıkla insan glioblastoma olgularında ortaya çıkan ve 10q23-24 kromozom bölgesini içeren delesyonları inceleyerek başlamıştır. İnsan hücre hattı ve tümör örnekleri ile yapılan çalışmalarda, 4 glioma hücre hattındaki homozigot delesyon lokalizasyonun belirlenmesini sağlamıştır. MMAC-1 geninin de bu bölgede bulunduğunu ve 403 amino asitlik, 5.5 kb büyüklüğünde bir mRNA'ya sahip olduğunu tanımlamışlardır. Aynı araştırmacılar, proteinin fosfatazların katalitik domainlerine ve hücre iskeleti proteini tensin ile oksiline önemli derecede homoloji gösterdiğini rapor etmiştir. MMAC-1 kodlayan-bölge mutasyonları birçok glioma, prostat, böbrek ve meme kanseri hücre hattında ya da tümör örneklerinde tanımlanmıştır (34,35). MMAC1 geninin 10q23.3 bölgesinde lokalize olduğu belirlenmiştir. Steck ve arkadaşları MMAC1 fare ve köpek homologlarının klonlanmasının yanı sıra, Hansen ve Justice PTEN geninin farenin 19 nolu kromozomunda lokalize olduğunu belirtmişlerdir (36).

Bahsedilen iki grubun dışında aynı tarihlerde üçüncü bir grubun bağımsız olarak protein tirozin fosfatazlara homolojisi olan moleküller ile ilgili tarama çalışmalarında, TEP1 (transforming growth factor- $\beta$ -regulated and epithelial cell-enriched protein tyrosine phosphatase) izole edilmiştir. TEP1' in protein tirozin fosfataz motifini içermesi dışında tensin ve oksilin ile yüksek homolojisi olduğu gösterilmiştir. Sitoplazmik bir protein olarak tanımlanan TEP1 proteininin ekspresyonu TGF $\beta$ 'ya duyarlı hücrelerde TGF $\beta$  ile çok hızlı bir şekilde negatif regüle edildiği belirtilmiştir (37).

Üç ayrı araştırma grubu tarafından farklı isimlendirilen fakat hepsi aynı görevi yapıp 10. kromozomun aynı bölgesinde lokalize olan gen, 1998 yılından itibaren sıklıkla PTEN olarak tanımlanmaya başlanmıştır.

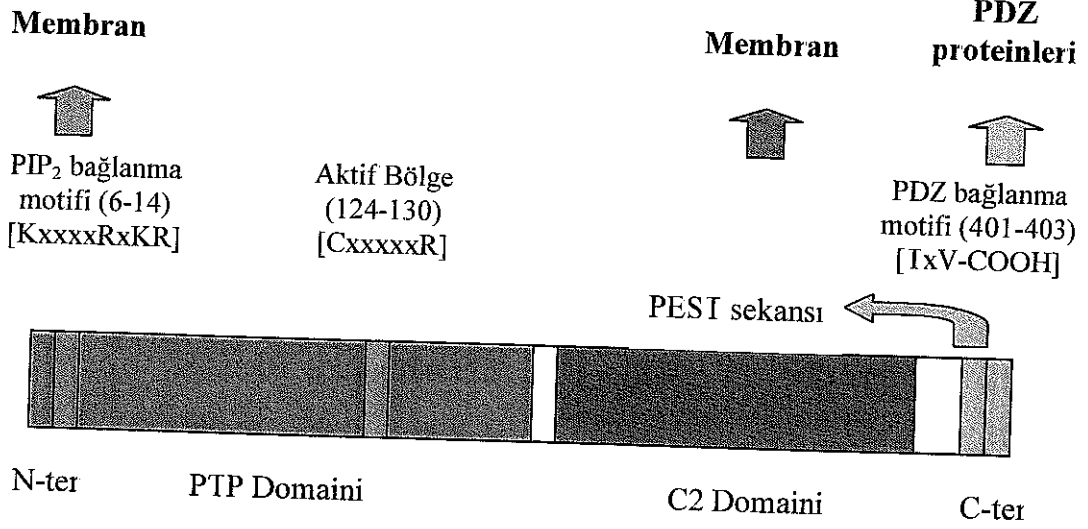
### 2.5.2. PTEN Proteininin Yapısı

Memeli *PTEN* geni, dokuz ekzondan oluşmaktadır. Kristal yapısının çözülmesi ile PTEN proteininin amino-terminal PTP (Protein Tyrosine Phosphatase) katalitik domaini ve karboksi-terminal C2 domaininden meydana geldiği belirtilmektedir (Şekil 2.4.) (37-39). Genin ürünü, 403 amino asitlik bir proteindir ve tüm bilinen PTEN ortologları yaklaşık 40-50 kD' dur (40). Sadece yine PTEN ortoloğu olan DAF-18 proteinini kodlayan (*Caenorhabditis elegans*) 120 kD' luktur.

PTEN proteini içerisindeki C2-domaininin, fosfolipid-aracılı sinyal transdüksiyonunda ya da fosfolipid metabolizmasında rol alan birçok proteinde bulunduğu ve evrimsel süreç içerisinde metazoalar ile sınırlı olarak korunduğu belirtilmektedir (40,41).

PTEN, PTP aktif bölgesinde protein tirozin fosfataz süperailisi ile önemli bir benzerlik olan değişken Cx<sub>5</sub>R motifini paylaşmaktadır (38,40). PTP domaini ayrıca iskelet proteini tensin ve sinaptik vezikül transportunda rol alan oksilin proteinine yüksek homoloji göstermektedir.

PTEN proteini fosfataz ve C2 domainlerinin dışında proteinin aktivasyonunu ya da işlevini düzenleyen ve lokalizasyon sinyali olarak işlev gören çeşitli motifleri içermektedir (40). PTEN' in amino terminal bölgesinde aktin düzenleyici protein olarak bulunan ve bazik amino asitlerden oluşan PI(4,5)P<sub>2</sub> (phosphatidylinositol 4,5-biphosphat) bağlama motifi (Lys/Arg-x<sub>4</sub>-Lys/Arg-x-Lys/Arg-Lys/Arg-) mevcuttur. Vilin, gelsolin, kortaktin ve korteksilin gibi aktin düzenleyicilerde korunmuş olan bu yapının, hücre iskeleti ve plazma membranında bu proteinlere olan ihtiyacın düzenlenmesinde önemli olduğu belirtilmektedir (42). Bu yapıya ek olarak insan PTEN proteininin karboksi terminalinde, 350-375 ve 379-396 amino asitleri arasında iki PEST homoloji bölgesi tanımlanmıştır (43).



Şekil 2.4. PTEN proteininin yapısal görüntüsü (40).

PEST domainlerinin proteolitik yıkım için sinyal oluşturduğu bilinmektedir. Bu sekansların delesyonu, artan protein stabilitesi ile orantılı iken PTEN proteininde bir ya da her iki PEST domainde delesyon PTEN protein seviyesinin azalmasına neden olmaktadır. Bu durum, PEST sekansının PTEN' in işlevindeki rolünde diğer PEST sekanslarından oldukça farklı olduğunu göstermektedir (43). Kesin mekanizma hala açık değildir.

PTEN proteinin karboksi terminal bölgesinde PEST bağlama bölgesinin dışında protein-protein etkileşimini sağlayan bir PDZ bağlama bölgesi (Thr/Ser-x-Val-COOH) mevcuttur (44,45). Bu domainler sinyal transdüksiyonunda rol alan birçok proteinde mevcut olup plazma membranında protein komplekslerinin oluşması için önemlidirler. PTEN' nin hDLG, hMAST205, MAGI-2 ve MAGI-3 gibi çeşitli PDZ proteinleri ile olan etkileşimi gösterilmiştir (44,45). PDZ proteinlerinin PDZ bağlama domaini içeren proteinler ile etkileşimi, bu proteinlerin plazma membranında protein kompleksi oluşturması için

önemlidir. Bu durumun PTEN' nin PDZ bağlama domaininin fonksiyonu için önemli olabileceği belirtilmektedir. Bununla beraber PTEN PDZ-bağlama domaininin, proteinin morfolojik değişimi ve PDGF (Platlet Derived Growth Factor) ile indüklenen membran hareketlenmesi (membrane ruffling) için önemli olduğu rapor edilmiştir (46).

### 2.5.3. PTEN Proteininin Fonksiyonu

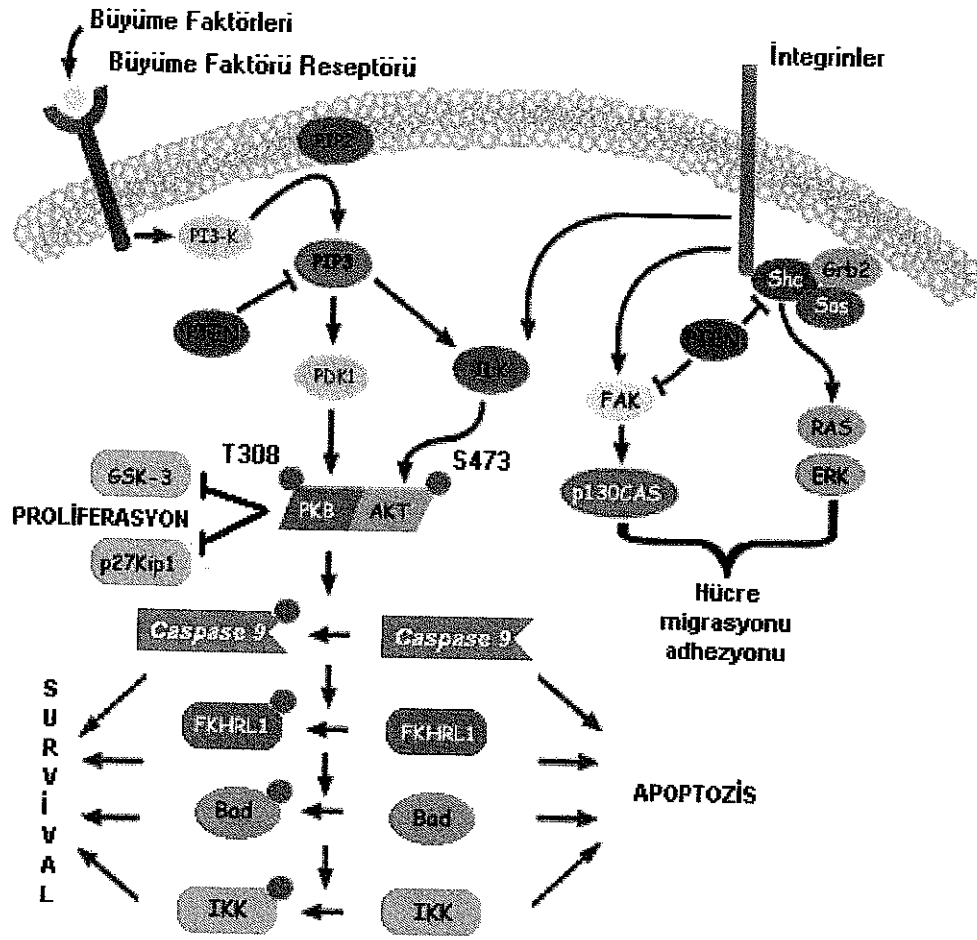
PIP<sub>3</sub> (phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphate) hücre büyümesi ve hücrelerin yaşamsal mekanizmalarında önemli bir rol üstlenmektedir. Protein fosfataz özelliğinin yanı sıra PTEN' nin lipid fosfataz aktivitesi bu sinyal yolu üzerinde etkili olmaktadır. PIP<sub>3</sub>, çeşitli büyüme faktörlerinin etkileriyle PI3-K (phosphatidylinositol 3 kinase)' ın PI(4,5)P<sub>2</sub>' ları fosforillemesi ile oluşmaktadır (47,48). PIP<sub>3</sub>' ın p85 regülatör alt üniteleri, tirozin fosforilasyonuna uğrayan reseptörlere SH2 domainleri aracılığı ile bağlanmak için önemlidir. Bu bağlanma gerçekleşikten sonra PI3-K, PIP<sub>2</sub> fosforilasyonu ile PIP<sub>3</sub> oluşumunu sağlamaktadır. PIP<sub>3</sub>' ın birçok efektörü olmasına rağmen en iyi tanımlanmış olanı Ser/Thr protein kinaz olan AKT/PKB (Protein Kinase B)' dir (49,50). AKT, PH domaini aracılığı ile plazma membranına lokalize olmakta ve PIP<sub>3</sub> ile aktive edilmektedir. Membrana lokalize olan AKT, PIP<sub>3</sub> ile direk aktive olabilen PDK-1 (3-Phosphoinositide dependent protein kinase-1) tarafından Thr-308 ve Ser-473' den fosforile edilmektedir (51). Aktive olan AKT spesifik sinyal yollarını stimüle eden ya da baskılayan çeşitli efektörleri fosforile etmektedir. Bu şekilde hücre büyümesini ve bölünmesini indüklerken apoptozisi inhibe etmektedir (48,52). AKT' nin aşırı ekspresyonu ise hücrenin transforme olmasına neden olur. Bu mekanizma içerisinde *PTEN* gen ürünü bir lipid fosfataz olarak rol alır ve PIP<sub>3</sub>' ları parçalayarak PI3-K ile zıt çalışır (Şekil 2.5.) (53,54).

### 2.5.3.1. Apoptozis ve PTEN

AKT/PKB' nin aktive edilmesi çeşitli altyol efektör moleküllerinde aktive edilmesini ya da inaktive edilmesini sağlamaktadır. Bu efektör proteinlerden biri AKT substratı olan proapoptotik Bad' dir. Bad/Bcl-2 dimerizasyonu bir apoptotik sinyal oluştururken, AKT' nin Bad fosforilasyonu bu kompleksin oluşmasını ve hücrelerin apoptoza gitmesini engellemektedir (55). Bad' ın dışında AKT, antiapoptotik sinyal mekanizmasının pozitif regülatörlerinden GSK-3 (Glycogen Synthase Kinase-3) ve p70<sup>S6K</sup> ı fosforillemektedir (49). Çalışmalar, PTEN aşırı ekspresyonunun, PIP<sub>3</sub> seviyesini düşürerek efektörü olan AKT' nin fosforilasyonu ve aktivasyonunu engellediğini ve bu yolla Bad, GSK-3 ve p70<sup>S6K</sup> ın fosforilasyonunu düşürdüğünü belirtmiştir (40). Bu sonuçlar ile beraber, aşırı ekspresyon ile PTEN aktivitesindeki artış, hücrelerin apoptozise olan hassasiyetlerini önemli oranda artırdığı tahmin edilmektedir.

Çeşitli hücre hatlarında yapılan çalışmalarda PTEN aşırı ekspresyonunun apoptozisi indüklediği belirtilmektedir. Meme kanseri (MCF-7, MDA-MB-468), prostat kanseri (LNCaP) ve lösemi (Jurkat) hücre hatlarında PTEN aşırı ekspresyonu apoptozisi indüklerken, lipid fosfataz aktivitesinden yoksun olan mutant PTEN' nin apoptozisi indüklemediği dolayısı ile PTEN' nin apoptotik etkisinin lipid fosfataz aktivitesine bağlı olduğu belirtilmektedir (40,47). Stambolic ve arkadaşlarının fare embriyonik fibroblastlarında yaptıkları çalışmada *PTEN*<sup>-/-</sup> hücrelerinin, TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ), UV, anisomisin, ozmotik şok ve ısı ile muamelesinde apoptotik uyarıya direnç gösterdikleri ancak PTEN ekspresyonunun tekrar sağlanması ile hücrelerin apoptotik indüksiyona olan hassasiyetlerinin onarıldığı belirtilmektedir (57).





Şekil 2.5. PTEN proteininin fonksiyonu (56)

Her ne kadar  $PIP_3$ /AKT aracıli yaşamsal sinyallerinin baskılanmasında PTEN lipid fosfataz aktivitesi gerekli ise de istisnalar da rapor edilmiştir. BT549, meme kanseri hücre hattında PTEN aşırı ekspresyonunun apoptozisi ancak düşük serumda indükleyebildiği, normal büyüme koşullarına etkisinin olmadığı belirtilmiştir (58). U87MG, glioblastoma hücre hattı AKT' nin PTEN ile negatif regüle edildiği düşük serum ortamında bile apoptozise yüksek direnç göstermektedir (59,60). Bu hücrelerde PTEN, ekstraselüler matriks ile

ilişkinin kesilmesi ile başlayan ve bir tür apoptozis formu olan anoikisi artırmaktadır. Apoptozise karşı olan bu farklı duyarlılıklara olası bir açıklama ; kesintisiz aktivite gösteren, AKT-bağımsız bir anti-apoptotik sinyal yolunun olmasıdır.

### 2.5.3.2. Hücre Proliferasyonu ve PTEN

PTEN' nin AKT regülasyonu ile apoptotik sinyal yolunu pozitif yönde indüklemesinin yanı sıra bazı tümör hücrelerinde proliferasyonu baskıladığı belirtilmektedir (53,59). Meme kanseri (BT549, MCF-7), glioblastoma (U87MG,U251MG,U373), böbrek kanseri hücreleri ve PTEN yoksun hücre hatlarında, PTEN aşırı ekspresyonunun hücre döngüsünü G<sub>1</sub> evresinde durdurduğu rapor edilmiştir (48,59,61-64). Lipid fosfataz aktivitesi olmayan mutant PTEN kullanıldığında proliferasyonun baskılanamaması PTEN' nin hücre döngüsünü G<sub>1</sub> evresinde durdurma etkisinin tamamen lipid fosfataz aktivitesine bağlı olduğunu göstermektedir (59,62,64).

AKT' nin PTEN ile negatif regülasyonu, Forkhead ailesi transkripsiyon faktörleri tarafından siklin-bağımlı kinaz (CDK2) inhibitörlerinin (p27Kip1, p21Waf1, p57Kip2) transkripsiyonunu artırmaktadır. p27Kip1, CDK2/silkinE kompleksinin oluşmasını engellemekte ve düşük RB protein fosforilasyonuna neden olmaktadır. Sonuç olarak hücre döngüsü G<sub>1</sub>/S evresinde durdurulmaktadır (61,62,65). Bu durum PTEN' nin G<sub>1</sub>/S geçişini, CDK2/pRB regülasyonu ile etkilediğini göstermektedir (62,66). PTEN, her ne kadar hücre döngüsünü durdurma etkisine sahipse de LN229 ve LN18 gibi bazı spesifik hücre hatlarında etkisinin olmadığı, endojen PTEN geninin mutant olduğu U87MG glioblastoma hücre hattında ise ancak çok düşük serum varlığında (%2) G<sub>1</sub>/S geçişini engelleyebildiği belirtilmektedir (59,67). Bu farklı *in vitro* çalışmalar PTEN' nin hücre döngüsü üzerine olan etkisinde hücre tipi ve PTEN dozaj bağımlı farklılıkların var olduğu fikrini vermektedir.

PTEN' nin bir tümör süpressör olarak klonlanması ile antionkogenik etkisi çeşitli gruplar tarafından ıpalama-bağımsız (anchorage-independent) büyüme yöntemleri kullanılarak çalışılmıştır. PTEN' nin aşırı ekspresyonu, U87MG, U373 ve MDA-MB-468 hücrelerinin ıpalama-bağımsız büyümelerini baskılamıştır (39,40,66). PTEN lipid fosfataz aktivitesinden yoksun H93A mutantlarının, U87MG hücrelerinin ıpalama-bağımsız büyümesinin baskılanmasında başarısız olmaları lipid fosfataz aktivitesine ihtiyaç olduğunu göstermiştir (39). Bununla beraber aktif bölgesinde sistein mutant (C124S) PTEN' nin aşırı ekspresyonu aynı şartlar altında büyümeyi hızlandırmıştır (66).

MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) yolunun AKT aracılı büyüme sinyaline alternatif olduğu bilinmekte ve MAPK aracılı büyüme mekanizmasının çeşitli hücre hatlarında aşırı PTEN ekspresyonunun proliferasyon üzerine etkisini karşıladığı düşünülmekte iken yapılan çalışmalarda U87MG, LNCaP ve MCF-7 gibi birçok hücre hattında aşırı PTEN ekspresyonunun MAPK aracılı sinyal yolu üzerinde hiçbir etkisinin olmadığı belirtilmiştir (63,66).

### 2.5.3.3. Hücre Migrasyonu, İnvazyonu ve PTEN

AKT sinyal mekanizması üzerine etkilerinin dışında PTEN aşırı ekspresyonunun migrasyon, invazyon ve fibronektin ile indüklenen aktin stres fiberlerinin formasyonunu inhibe edebilmektedir (68-71). Bu süreçlerin inhibisyonu FAK ve p130<sup>CAS</sup> fosforilasyonun düşürülmesine bağlıdır (70). p130<sup>CAS</sup> sinyal transdüksiyon proteini, FAK ile indüklenen hücre migrasyonunda önemli bir araçtır. p130<sup>CAS</sup> direk olarak FAK (Focal Adhesion Kinase)' a bağlanmakta ve fosforillenmektedir (şekil-2.5.).

FAK proteininde Tyr-397 fosforilasyonu PI3K regülatör alt ünitesinin SH2 domaini için bağlanma bölgesi oluşturmakta ve FAK' ın PI3K ile ilişkisi bu sinyal yolunun çalışmasını tetiklemektedir (72). Tyr-925 fosforilasyonu ise Grb2 (Growth Factor Receptor-2) proteini için

bağlanma bölgesi oluşturmakla Sos bağlanmasını ve Ras aktivasyonunu sağlamaktadır. Aktive olan Ras, ERK/MAP (Extracellular Signal-Regulated/Mitogen Activated Protein) kinaz sinyal mekanizmasının çalışmasını sağlamakla migrasyon, invazyon ve adhezyon gibi hücresele olayları başlatmaktadır (şekil 2.5.) (73). Tamura M. ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda, PTEN' nin direk olarak FAK ile etkileştiği ve tirozin fosfatını defosforile ettiği belirtilmiştir. Sonuç olarak, integrin aracılı hücre migrasyonu, invazyonu, yayılımı ve hücre iskeleti organizasyonu inhibe edilmektedir (68,70). Bu inhibisyon için PTEN' nin protein fosfataz domaininin önemli olduğu belirtilmiştir.

FAK ekspresyonunun invazif insan tümörlerinde arttığı ve endotel hücre migrasyonunun FAK fosforilasyonu ve fonksiyonu ile pozitif olarak etkilendiği açıklanmıştır (73). FAK'tan yoksun fare hücrelerinde ve FRNK enjeksiyonu ile FAK inhibisyonunun sağlandığı hücrelerde düşük hücre migrasyonu ve yayılımı olduğu belirtilmiştir. PTEN overekspresyonun, FRNK enjeksiyonu ile yaklaşık aynı sonucu verdiği rapor edilmiştir (68). Bu sonuçların dışında PTEN' nin FAK defosforilasyonunu sağlamadığı ancak invazyon üzerindeki inhibe edici etkisinin olduğu çalışmalar rapor edilmiştir (71).

#### 2.5.3.4. Embriyonik Gelişimde PTEN Proteininin Önemi

PTEN proteininin ortaya çıkmasından hemen sonra *in vivo* fonksiyonunun belirlenmesi için çeşitli laboratuvarlar farelerde *PTEN* geni açısından null mutasyonlar oluşturmuşlardır. Fenotipler oldukça farklılık göstermiş ve bunun muhtemel sebeplerinden biri olarak her grubun kullandığı fareler arasındaki genetik farklılıklar gösterilmiştir. Bununla beraber tüm *PTEN*-knockout farelerin doğmadan öldükleri rapor edilmiştir (74,76). Bir çalışmada ektoderm, mezoderm ve endodermin organizasyonu ve erken farklılaşmasında majör defektlerin bulunduğu ve embriyonun 7,5. günde öldüğü işaret edilmiştir (74). Diğer bir çalışmada ise sefalik ve kaudal bölgelerde çeşitli malformasyonlar tespit edilmiş ve embriyonik yaşamın 9,5. gününde ölüm saptanmıştır

(76). Üçüncü bir çalışmada ise embriyonun, henüz 6,5 günlük döneminde çeşitli defektler içerdiği ve sağlıklı embriyonik gelişim için erken embriyonik dönemde düşük seviyede PTEN proteinine ihtiyaç olduğu belirtilmiştir (75). Bu sonuçların ışığı altında PTEN' nin embriyonik gelişimde önemli bir rol üstlendiği söylenebilir.

#### 2.5.4. PTEN Proteininin Regülasyonu

PTEN' nin bir tümör süpressör olarak nasıl rol aldığı açık olmakla beraber kendi aktivitesinin nasıl regüle edildiğinin mekanizması net değildir. Glioblastoma, prostat kanseri, meme kanseri ve Cowden sendromu ile ilişkili birçok PTEN mutasyonu, karboksil-terminal bölgesinde fonksiyon eksikliği gösteren 354-403 amino asitleri arasındaki kısalma ile sonuçlanır (77). Bu bölge daha önce tanımlandığı gibi PEST, PDZ-bağlanma domainlerini içermekte ve protein stabilitesinin düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır (43). Sonrasında yapılan çalışmalarda, bu etkinin proteinin uç kısmında bulunan Ser/Thr dizilerinden fosforilasyona bağlı olduğu ve muhtemelen kazein kinaz-2 ile regüle edildiği yayınlanmıştır (78,79). Protein stabilitesinin regülasyonuna ek olarak C-terminal bölgenin, PDZ-bağlanma bölgesi aracılığı ile protein-protein ilişkisinde rol aldığı belirtilmiştir. PTEN, hDLG, hMAST205, MAGI-2 ve MAGI-3 proteinleri ile PDZ domaini ile etkileşmektedir. Bu etkileşmenin fonksiyonel önemi henüz açık olmamakla beraber söz konusu proteinlerin PTEN' nin spesifik hücresel bölgelere geçişini sağlayabileceği ve PTEN proteininde değişikliğe yol açabileceği belirtilmektedir (44,45,80).

PTEN' nin posttranslasyonel regülasyonuna ilave olarak transkripsiyonel seviyesinin regülasyonundan da bahsedilmektedir. İnsan PTEN mRNA' sının ekspresyonu, hücrelerin TGF $\beta$  (Tumor Growth Factor- $\beta$ ) muamelesi sonucu önemli ölçüde azaldığı belirtilmektedir (37). PTEN' nin transkripsiyonel regülasyonu hala açık değildir.

## 2.6. PTEN ve Prostat Kanseri

Günümüzde prostat kanserinin ileri evreleri ile mücadelede etkili bir yöntemden söz edilememektedir. Prostat kanseri gelişimi ile ilgili bilgileri artırmak amacı ile kromozomal değişimleri belirleyen sitogenetik çalışmalar yapılmıştır (81-83). Kromozomal 7q, 8p, 10, 13q ve 16q bölgelerini sıklıkla içeren birçok değişiklik gözlenmiştir (82). Spesifik olarak 10q23-25 bölgesi ile ilişkili allelik delesyonlar gözlenmiş ve bu kromozomal bölgenin rat prostat kanseri hücrelerine verilmesi tümörleşme sürecini değiştirmezken, spesifik olarak metastatik özelliklerini inhibe ettiği belirtilmiştir (83). Birçok çalışmada, tümör süpressör *PTEN* geninin 10 numaralı kromozomdaki delesyonlar ile ilişkili biyolojik etkilerde önemli olduğu belirtilmiştir. Tüm bu çalışmaların sonucunda *PTEN* geninde meydana gelen delesyonların ve mutasyonların glioma, prostat, meme, melanoma, endometriyum ve over kanserlerini içeren birçok kanserde meydana geldiği gösterilmiştir (35). Endometriyum kanseri hariç *PTEN*' de meydana gelen değişiklikler hastalığın ileri evresinde oluşmaktadır. Bu sonuca bağlı olarak tümörleşme sürecinin başlangıcında *PTEN* fonksiyonunun kaybına gerek duyulmaz iken, tümörün ilerlemesi için oldukça önemli bir ajan olarak göze çarpmaktadır.

Prostat kanserinin ilerlemesi sürecinde *PTEN* kaybını gösteren birçok çalışma yapılmıştır. *PTEN* geninde homozigot genetik inaktivasyon ilk olarak metastatik lezyonlardan oluşturulan LNCaP ve PC3 (*PTEN* null) insan prostat hücre hatlarında gözlenmiştir (34). Prostat tümörlerinde yapılan birçok çalışmada, organa sınırlı prostat kanseri hücrelerinde düşük oranlarda *PTEN* mutasyonu ve delesyonu rapor edilmiştir (84,85). Bununla beraber metastatik prostat kanserlerinin yaklaşık % 60' ında *PTEN* için LOH olduğu belirtilmiştir (86,87). İleri evre prostat kanserlerinde *PTEN* ekspresyonundaki bu kaybın metilasyon aracılı transkripsiyonel baskılanmaya (silencing) bağlı olduğu da belirtilmiştir (88). Whang ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, *PTEN* kodlayan bölgede mutasyon olmayan prostat

tümörlerinin, % 50' sinden fazlasında PTEN mRNA ve protein seviyesinin düşürüldüğü açıklanmıştır (88). Buna bağlı olarak mutasyon ya da PTEN ekspresyon kaybının olduğu LNCaP ve PC3 prostat kanseri hücre hatlarında sürekli olarak apoptozise direnç sağlayan AKT ve anti-apoptotik sinyal mekanizmasının çalışması söz konusudur. Adenoviral aracılı PTEN verilmesi ile apoptozisin indüklendiği belirtilmiştir (89).

Genetik olarak tasarlanmış PTEN<sup>+/-</sup> farelerde yapılan çalışmalarda spontan olarak lenfoid hiperplazilerinin, çeşitli tümör tipleri ve otoimmün sendromlarının geliştiği görülmüştür (90). Bu farelerin prostatları, hiperplazilerin yanısıra sık bir şekilde invazif prostat kanserinin başlangıcı olan prostatik intraepitelyal hiperplaziler oluşturmaktadırlar (74). Bu farelerin, genetik olarak PTEN<sup>+/-</sup> ve p27<sup>+/-</sup> ya da <sup>-/-</sup> olmaları için p27<sup>+/-</sup> fareler ile çiftleştirilmesi, invazif tümörleri içeren % 100 prostat kanseri ile sonuçlanmıştır. Knockout fareler ile yapılan bu çalışmalar sonucunda PTEN' nin prostat proliferasyonda bir regülatör olduğu belirtilmiştir (91).

Bilindiği gibi androjenler, erkek fenotipi ve üreme fizyolojisinin gelişimi ile regülasyonundan sorumludurlar. Androjenlerin fizyolojik fonksiyonları dışında prostat kanserini içeren birçok patolojik olayda rol aldığı bilinmektedir. Belirli bir seviyede tutulan androjen seviyesinin, proliferasyon oranını stimüle ederek ve prostat epitel hücre ölüm oranını inhibe ederek total prostat hücre sayısını düzenlediği belirtilmiştir (92). Her iki durum da, hücre sayısında artışa neden olmaktadır. Prostat epitel hücrelerinde homeostasinin korunabilmesi için androjenlerin bu etkilerini karşılayacak bir frenleme sistemine ihtiyaç vardır. PTEN ektopik ekspresyonunun hücre döngüsünü durdurma ve apoptozisi indüklemedeki rolü göz önüne alındığında PTEN' nin bu etkileri androjenlerin gösterdikleri etkilere zıt olduğu ve prostat hücrelerinde AR (Androjen Reseptör) fonksiyonunun dengelenmesinde düşünülen fren sistemi olduğu düşünülebilir (93). Li P. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada prostat kanseri hücrelerinde PTEN ve AR' ü arasında

karşılıklı bir rekabetten söz edilmekte ve bu şekilde yetişkin erkeklerde prostat epitel hücrelerinde homeostasinin sağlandığı belirtilmiştir. Fonksiyonel PTEN' nin yokluğunda AR' nün daha aktif bir görüntü çizmesi, PTEN kaybı ile karşılanamayan AR aktivitesinin prostatik tümörleşmeye neden olduğunu açıklamaktadır. LNCaP hücrelerinde PTEN ekspresyonunun sağlanması ile apoptozisin yeniden indüklenmesi sadece androjen yokluğunda gerçekleşmektedir. Bu sonuç, AR pozitif prostat kanseri hücreleri ile mücadele yönteminin etkili olabilmesinin PI3-K/AKT ve androjen reseptör sinyal mekanizmalarının beraber bloke edilmesi ile açıklanmıştır (93).

Huang H. ve arkadaşlarını yaptığı çalışmada ise malignant prostat dokusu ve hücre hatlarında PTEN kaybı ile Bcl-2 aşırı ekspresyonunun negatif bir korelasyon gösterdiği belirtilmiştir (94). PTEN' nin PTEN null prostat kanseri hücrelerine transferinin Bcl-2 ekspresyonunda azalmayı indüklediği ve bu etkisinde PTEN' nin lipid fosfataz fonksiyonuna gereksinim olduğu açıklanmıştır. Bu etkinin AKT ve CREB (cAMP Response Element-Binding Protein) aktivitelerini inhibe etmek yolu ile olduğu ve Bcl-2 ekspresyonunun baskılanması ile prostat kanseri hücrelerinde kemosenitivite sağlandığı belirtilmiştir. Bu şekilde prostat kanseri hücrelerindeki Bcl-2 onkogen aşırı ekspresyonunu açıklamışlardır (94).

Prostat kanserine erken dönemde tanı koyabilmenin tek yolu 40 yaşından sonra her erkeğin düzenli olarak yılda bir kez prostat muayenesi ve PSA (prostate specific antigen) adı verilen kan tahlilini yaptırmaları sonucu olmaktadır. Prostat kanseri erken dönemde makattan yapılan prostat muayenesinde prostat içindeki sert alanların hissedilmesiyle de yakalanabilmektedir. Prostat kanserlerinde tanı amaçlı kullanılan markırların başında PSA gelmesine rağmen, PSA her zaman tanıda yeterli olmamaktadır (95). Bu nedenle, tanı güvenirliliğinin geliştirilmesi için, yeni biyomarkırlara ihtiyaç duyulmaktadır. Prostat kanseri ile ilgili olduğu düşünülen bazı büyüme faktörleri, proliferasyon



ilişkili antijenler ve diğer markırların yanısıra prostat kanseri gelişimi sırasında negatif regülasyona uğrayan farklı markırlar da mevcuttur. Bu markırlar arasında E-cadherin, CD44 ve KAI1 gibi hücre adhezyon molekülleri (96-100) ve p53, p27KIP1 gibi tümör süpressör genler (101-103) en önemli olanlarıdır. PTEN' nin tümör süpressör özelliğinin yanısıra apoptozis, embriyonik gelişim, hücre göçünde rol alması ve PTEN ekspresyonunun prostat başta olmak üzere akciğer, meme, böbrek ve glioblastoma tümörlerinde oldukça değişiklik göstermesi önemini oldukça artırmıştır.

## MATERYAL VE METOD

Akdeniz Üniversitesi Üroloji Anabilim Dalı'na başvuran ve prostat kanseri tanısı konan hastalardan, radikal prostatektomi, TUR (transurethral-resection) ya da TRUS (transrectal ultrasonography) biyopsisi ile alınan 43 BPH ve 33 tümör materyali Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda protein miktarları tayin edildikten sonra Western-Blot yöntemi ile analiz edildi.

Çalışma kapsamına alınan tümör, kontrol ve BPH materyalleri ile yapılan çalışma sonucu gözlenen PTEN ekspresyon miktarları, hastaların histopatolojik bulguları ve klinik evreleri ile karşılaştırıldı.

### 3.1. Protein Miktarının Tayin Edilmesi

#### 3.1.1. Kullanılan Malzemeler :

##### Triton X-100 Tamponu :

- 200 ml 0.5 M NaF (Sodyumflorid) (Sigma),
- 50 ml 1M HEPES (N-(2-hidroksietil) piperazin-N-(2-etansulfonikası)) (Sigma),
- 50 ml 3 M NaCl (Sodyumklorür) (Sigma),
- 2 ml 0.5 M MgCl<sub>2</sub> (Magnezyumklorid) (Sigma),
- 4 ml 0.25 M EGTA (Etilenbis(oksietilennitrilo)tetraasetikasit) (Sigma),
- 10 ml 0.1 M PMSF (Fenilmetansulfonilflorid) (Sigma),
- 10 ml 0.1 M Na-O-Va (Sodyumortovanadat) (Sigma),
- 20 ml 0.5 M Pyrophos (Sigma),
- 10 mg/ml' lik Leupeptin (Sigma)' den 1 ml,
- 10 mg/ml' lik Aprotinin (Sigma)' den 1 ml,

- 10mg/ml' lik Pepstantin-A' dan 100 µl,
- 100 ml % 10' luk Gliserol,
- 12 ml Triton X-100

Triton X-100 tamponu, yukarıdaki malzemelerin tümüne son hacim 1L olacak şekilde bidistile su ilavesi yapılarak hazırlandı.

#### **Protein Assay Solüsyonu :**

BioRad marka hazır solüsyon 1/5 oranında bidistile su ile sulandırıldı.

#### **3.1.2. Protein Miktar Tayininde Kullanılan Standart Grafik Hazırlanması**

- 0.1 gr BSA ( Bovine Serum Albumine ) tartılarak 10 ml bidistile su içerisinde çözüldü.
- Bu çözültiden 1 ml alındı ve 9 ml bidistile su ile seyreltildi. Son karışım içerisinde 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 ve 15µl alınarak ependorflara konuldu.
- Herbir ependorf içerisinde birer dakika ara ile 1ml protein assay solüsyonu eklenerek bekletildi. İlk örneğin beş dakikası dolduğunda daha öncesinde 595nm dalga boyunda protein assay solüsyonu ile sıfırlanan Shimatzu marka spektrofotometre kullanılarak absorbanlar ölçüldü.
- Alınan sonuçlar grafiğe aktarıldı. Standart grafikte elde edilen doğru yardımı ile absorban değerine göre mikrolitredeki mikrogram protein miktarı saptandı.

### 3.1.3. Protein Miktar Tayini

- Triton X-100 tamponu içerisinde saklanan tümör materyalleri bistüri ve penset yardımı ile iyice parçalandıktan sonra el homojenizatörü ile homojenize edildi.
- Parçalanmış dokular ependorf tüpüne alınarak 10.000 rpm' de, 5 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonunda dökelti temiz bir ependorf tüpüne alındı.
- Herbir örneğin dökeltisinden 1µl ependorflara alındı.
- Dökeltiler üzerine birer dakika ara ile 1ml protein assay solüsyonu eklenerek bekletildi. İlk örneğin beş dakikası dolduğunda daha öncesinde 595nm dalga boyunda protein assay solüsyonu ile sıfırlanan spektrofotometre kullanılarak absorbanslar ölçüldü.
- Elde edilen absorbans değerleri, standart grafiğin yardımı ile örneklerin mikrolitresindeki mikrogram protein miktarının tayininde kullanıldı.

## 3.2. Western-Blot

Tümör materyallerine Western-Blot tekniği uygulanarak PTEN ekspresyon seviyesi belirlendi.

### 3.2.1. Jelin Hazırlanması

Bu çalışmada, ayrışma ve yükleme kısımlarından oluşan iki fazlı akrilamid jel kullanıldı.

### 3.2.1.1 Solüsyonların Hazırlanması

#### **Ayrıştırma Jeli Tamponu ( Resolving Buffer );**

Son konsantrasyon 1.5 M olacak şekilde 90.75 gr Tris-Base (Sigma) tartılarak 500 ml bidistile suda çözüldü. Solüsyonun pH' sı, HCl kullanılarak, 8.8' e ayarlandı.

#### **Yükleme Jeli Tamponu ( Stacking Buffer );**

Son konsantrasyon 0.5 M olacak şekilde 30.25 gr Tris-Base (Sigma) tartılarak 500 ml bidistile suda çözüldü. Solüsyonun pH' sı, HCl kullanılarak, 6.8' e ayarlandı.

#### **%10'luk Sodyum Dodesil-sülfat (SDS);**

10 gr SDS (Boehringer Mannheim) tartılarak 68 °C' de 100 ml bidistile su içerisinde çözüldü. pH = 7.2' ye ayarlandı.

#### **%10' luk Amonyum Persülfat (APS);**

1 gr APS tartılarak 10 ml bidistile su içerisinde çözüldü. Hazırlanan solüsyon +4 °C' de saklandı.

#### **Akrilamid/bis akrilamid (29:0.8);**

29 gr akrilamid (Sigma) ve 0.8 gr bis akrilamid tartılarak 100 ml bidistile suda çözüldü. Hazırlanan solüsyon alüminyum folyo ile sarılarak +4 °C' de saklandı.

#### **TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletildiamin);**

Amonyum persülfattan serbest radikaller oluşmasını sağlayarak akrilamid ve bis akrilamidin polimerizasyonunu katalizleyen hazır solüsyon kullanıldı.

### 3.2.1.2. Jel Hazırlamak İçin Gerekli Olan Kimyasal Miktarları

#### Ayrışma Jeli ;

% 7' lik ve %10' luk olarak aşağıda verilen miktarların karıştırılması ile elde edildi.

Tablo 3.1. Ayrışma Jeli tamponları ve miktarları

	% 7		% 10	
Su	10	ml	7,7	ml
Resolving buffer	5	ml	5	ml
Akrilamid (29:0,8)	4,7	ml	7	ml
% 10 SDS	0,2	ml	0,2	ml
% 10 APS	0,2	ml	0,2	ml
TEMED	20	λ	20	λ

#### Yükleme Jeli (%5) ;

5 ml ve 10 ml olarak aşağıda verilen miktarların karıştırılması ile elde edildi.

Tablo 3.2. Yükleme Jeli tamponları ve miktarları

	5 ml		10 ml	
Su	3	ml	6	ml
Stacking buffer	1,25	ml	2,5	ml
Akrilamid (29:0,8)	0,625	ml	1,25	ml
% 10 SDS	50	λ	100	λ
% 10 APS	50	λ	100	λ
TEMED	5	λ	10	λ

### 3.2.1.3. İşlemler

- Jelin döküleceği camlar, üzerlerinde olabilecek partiküllerin jeli bozmaması ve proteinlerin düzgün bir şekilde yürümesini sağlamak için distile su ile yıkandı ve kurutuldu.
- Camlar hazır hale geldikten sonra ön ve arka cam arasına ayırıcı (spacer) yerleştirildi ve kenarlarından sıkıştırıldı.
- Jelin sızıntısını engellemek için camların alt kısmı bantlandı, iyice sıkıştırıldı ve dikey olarak yerleştirildi.
- Ayırma jeli hazırlandı. TEMED eklendikten hemen sonra jel karıştırılıp camlar arasına üstten 1-1.5 cm kalacak şekilde döküldü. TEMED polimerizasyon başlangıcında önemli bir rol oynadığından karışıma en son eklendi.
- Jelin hava ile temasını kesmek ve düzgün donmasını sağlamak için jelin üzerindeki boş bırakılan kısma % 0.1' lik SDS yavaş yavaş döküldü.
- Jel oda ısısında yaklaşık 30 dakika sonra dondu. Üst jel (yükleme jeli) hazırlandı. Alt jelin üzerindeki SDS boşaltılarak distile su ile yıkandı.
- Üst jel, TEMED eklendikten hemen sonra hava kabarcığı kalmayacak şekilde cam plakların kenarından döküldü. Üst jelin tarağı yine hava kabarcığı bırakmayacak şekilde yerleştirildi.
- Üst jel oda ısısında tamamen donduktan sonra tarak çıkartıldı ve jel artıkları temiz bir kağıt peçete ile silindi.
- Camların altında bulunan bant çıkartıldı ve jel hemen elektroforez tankına yerleştirildi.

### 3.2.2. Elektroforez İşlemi

#### 3.2.2.1. Solüsyonların Hazırlanması

##### 2X Yükleme Boyası (Loading Dye);

1 ml Gliserol (Sigma), 3 ml % 10' luk SDS, 1.25 ml 1M Tris, 0.5 ml  $\beta$ -merkaptolanol (Sigma) karıştırıldı ve pH: 6.7' ye ayarlandı. 1.5  $\mu$ gr Bromfenolblue tartılarak solüsyona eklendi. Hazırlanan karışım filtre edildikten sonra ependorf tüplerde  $-20^{\circ}\text{C}$ ' de saklandı.

##### 10X Elektroforez Tamponu;

15 gr Tris-Base (Sigma) ve 94 gr Glisin (Sigma) tartılarak 850 ml distile suda çözüldü. Bu solüsyona, 50 ml %10' luk SDS (Sigma) ilave edildi. Son hacim 1L olacak şekilde bidistile su eklendi.

#### 3.2.2.2 Elektroforeze Konacak Örneklerin Hazırlanması

- Protein miktarları tayin edilmiş örneklerin dökeltisi  $-80^{\circ}\text{C}$ ' den alınarak buz içeren bir kaba kondu.
- Örnekler çözüldükten sonra otoklav edilmiş ependorflara her numuneden 100  $\mu$ g proteine karşılık gelen miktar kadar çekildi. Her ependorfa 3-4  $\mu$ l yükleme boyası pipetlendi.
- Hazırlanan örnekler 1-2 dakika kaynar suda bekletildi. Bu işlem esnasında ependorf kapaklarının açılmaması için etrafı parafilm ile sarıldı.
- Süre sonunda, yüklemede kolaylık olması açısından örnekler 30 saniye 10.000 rpm' de santrifüj edildi.



### 3.2.2.3. İşlemler

- Elektroforez tankı, elektroforez tamponu ile, kısa olan ön camın üst seviyesine kadar dolduruldu. Tarağın oluşturduğu kuyucukların içerisine girebilecek bir pipet yardımı ile tampon pipetlenerek kuyucuklar temizlendi.
- Daha önce protein konsantrasyonu hesaplanmış örneklerden alınıp yükleme boyası ile karıştırıldı.
- İlk kuyucuğa molekül ağırlıkları bilinen proteinlerden oluşan markır pipetlendikten sonra diğer kuyucuklara da örnekler yüklendi.
- Örneklerin yüklenmesi tamamlandıktan sonra akım 80 V' a 50 mA ayarlandı. Proteinler ayrışma jeline ulaştığında akım 110 V' a ve yaklaşık 60 mA yükseltildi.
- Yükleme boyası jelden çıktığında elektroforez sona erdirildi. Bu süre yaklaşık 3-4 saat kadar sürdü.
- Önce camlar arasındaki spacer' lar ardından camlar jel üzerinden alındı.
- Yükleme jeli kesilerek atıldı.
- Proteinleri içeren ayırma jeli protein transfer tamponuna konuldu. Bu aşamadan sonra jel, proteinlerin membrana transferi için hazır hale geldi.

### 3.2.3. Elektroforez Jelinin Membrana Aktarılması

#### 3.2.3.1. Solüsyonların Hazırlanması

##### 1X Protein Transfer Tamponu;

3.75 gr Glisin ve 7.25 gr Tris-Base tartılarak 800 ml distile suda çözüldü. 200 ml Metanol eklenerek son hacim 1L' ye eşitlendi.

##### Metanol (Merck);

Transfer sırasında membranın şişmesi ve yapışan proteinlerin korunabilmesi için gereklidir. Hazır solüsyon.

#### 3.2.3.2. İşlemler

- Polivinildifluorid (PVDF) membran metanol ile ıslatıldı.
- Sandviç aparatının arasına gelecek şekilde en alta, transfer tamponu ile doyurulmuş sünger konuldu.
- Süngerin üzerine yine transfer tamponu ile doyurulan transfer kağıdı (Whatmann 3MM olabilir) konuldu.
- Transfer kağıdının üzerine jel yerleştirildi. Düz, cam bir silindir, hava kabarcıklarını uzaklaştırmak amacı ile jelin üzerinden geçirildi.
- Jel üzerine metanol ile ıslatılan PVDF membran yerleştirildi ve yine silindir ile üzerinden geçildi.
- Üzerine bir adet daha transfer tamponu ile doyurulan transfer kağıdı kondu ve silindir ile üzerinden geçildi.
- Son olarak üzerine transfer tamponu ile doyurulan bir sünger daha konuldu ve sandviç aparatı üzerinden sıkıştırılarak kapatıldı.

- Hazırlanan sandviç, jelin anot tarafında ve membranın katot tarafında olmasına dikkat edilerek elektroforez tankına yerleştirildi. Tank protein transfer tamponu ile dolduruldu.
- Bir gece +4 °C' de 40 V' ta ve yaklaşık 75mA' de yürütüldü.
- Sabah akım kesildikten sonra sandviç tanktan çıkartıldı ve böylece membran antikor ile işaretlemeye hazır hale getirildi.

### 3.2.4. Membranların Antikor ile İşaretlenmesi

#### 3.2.4.1. Solüsyonların Hazırlanması

**% 0.1 PBST ( Phosphate-Buffered Saline / Tween-20 );**

1X PBS için; 8 gr NaCl (Merck), 0.2 gr KCl (Merck), 1.44 gr Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck), ve 0.24 gr KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck), tartılarak 800 ml distile su içerisinde çözüldü. Solüsyonun pH' sı, HCl kullanılarak, 6.8' e ayarlandı. Son hacim 1L olacak şekilde distile su eklendi.

Hazırlanan PBS içerisine 1ml /L olacak şekilde 1 ml Tween-20 eklendi.

**% 5' lik Süt Tozu Çözeltisi (Bloklaama Çözeltisi);**

5 gr yağsız süt tozu tartılarak PBST içerisinde çözüldü. Son hacim 100 ml olacak şekilde PBST eklendi. 15 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırıldı.

**PTEN  $\alpha$ -mouse Primer Antikoru;**

Hazır olarak alınan Santa Cruz marka antikor +4 °C' de saklandı.

**GAPDH (Glyceraldehyde-3-PDH) $\alpha$ -mouse Primer Antikoru;**

Hazır olarak alınan Santa Cruz marka antikor +4 °C' de saklandı.

**HRP (Horse,Radish Proxydase)  $\alpha$ -mouse Sekonder Antikoru;**  
Hazır olarak alınan Santa Cruz marka antikor +4 °C' de saklandı.

**ECL (Enhanced Chemiluminescence);**

ECL-1 ve ECL-2 olmak üzere hazır alınan Amersham marka kromojenik solüsyon +4 °C' de saklandı.

### 3.2.4.2 İşlemler

- Membran, distile su ile iyice temizlenmiş petri kabına alındı. Membranın yüzeyini örtecek şekilde bloklama çözeltisi ilave edilerek 2 saat *Heidolf UNIMAX 1010* marka çalkalayıcı üzerinde yaklaşık 120 rpm' de çalkalanması sağlandı. Bu şekilde proteinlerin bağlanmamış olduğu bölgeler kapatılmış oldu.
- Bloklama işlemi bittikten sonra çözelti döküldü. Primer antikor bloklama tamponu içerisinde dilüe edildi ve membran yaklaşık 3 saat hafifçe çalkalayıcı üzerinde çalkalandı. Antikorum özgülüğüne göre dilüsyon oranı 1/1000 ile 1/20.000 arasında değişmektedir (PTEN; 1/3000, GAPDH; 1/20.000).
- Süre sonunda antikorlu çözelti döküldü ve membran 15 dakika ara ile 3 kez PBST ile hafifçe çalkalamaya bırakıldı. Böylece zayıf olarak bağlanan ya da bağlanamamış antikorlar membran üzerinden temizlendi.
- Yıkama işlemi bittikten sonra PBST ortamdan uzaklaştırıldı ve enzim işaretli sekonder antikor yine bloklama tamponu içerisinde 1/10.000 olacak şekilde dilüe edilerek membran 1 saat çalkalandı.
- 1 saat sonunda tekrar PBST ile 15 dakika ara ile 3 kez yıkama işlemi yapıldı.

- Yıkama işlemi sonunda membranlar pens yardımı ile yıkama solüsyonu içerisinden alındı ve üzerindeki solüsyonu temiz bir kağıt peçeteye emdirildi.
- Membranlar hızlı bir şekilde temiz ve düzgün bir yüzeye yerleştirildi. Üzerine 1:1 oranında karıştırılan ECL-1 ve ECL-2 tüm yüzeyi kaplayacak şekilde yayıldı.
- Membranlar ECL ile yaklaşık 1 dakika bekletildi.
- Sürenin sonunda membran üzerindeki ECL temiz bir kağıt peçeteye emdirildi ve membranlar streç film üzerine yerleştirildi.
- Hızlı bir şekilde membranın üzeri de streç film ile kaplandıktan sonra membran film kasetinin içerisine bantlandı.
- Bundan sonra hızlı bir şekilde karanlık oda içerisinde fotoğraf filmi membran üzerine yerleştirildi. 5-10 dakika beklendi ve film banyo makinasında banyo edildi.

## BULGULAR

Akdeniz Üniversitesi Üroloji Anabilim Dalı'nda prostat kanseri tanısı konmuş hastalarda patolojik evre ve Gleason skoru Patoloji Anabilim Dalı tarafından belirlendi. BPH, organa sınırlı (OSPka) ve ileri evre prostat kanseri (İEPka) materyallerindeki PTEN ekspresyon düzeyi ise Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında Western-Blot yöntemi ile belirlendi.

Olguların 18'i ileri evre prostat kanseri, 15'i organa sınırlı prostat kanseri ve 43'ü BPH hastası idi. 10 adet kontrol örneği ise organa sınırlı prostat kanseri olgularından radikal prostatektomi ile patolojik bulgusu olmayan bölgeden temin edildi. Tümörlerin klinik evreleri için TNM sınıflandırma sistemi kullanıldı. İleri evre prostat kanseri olgularının patolojik değerlendirmesi sonuçlarında, 15 olgunun pT3aK+ (tümörün prostatik kapsül dışına uzanması), 2 olgunun pT4aK+ (tümörün prostat dışında diğer komşu dokulara uzanması) ve 1 olgunun T3aK+N+ (lenf nod metastazı) olduğu saptandı (Tablo 4.2.).

**Tablo 4.1.** Organa sınırlı prostat kanserli tümör materyallerinin klinik sınıflandırılması ve PTEN ekspresyon düzeyi :

Organa Sınırlı	Yaş	PSA	Patolojik Evre	Gleason Skoru	PTEN miktarında azalma (%)	Nüks	Takip
1	54	6,15	pT2	6	40	-	12 ay
2	68	24,7	pT2	4	34	-	11 ay
3	61	11,4	pT2	5	71	-	11 ay
4	69	12,55	pT2	7	49	-	6 ay
5	63	5,09	pT2	7	69	-	10 ay
6	58	6,0	pT2	5	87	-	11 ay
7	58	15,9	pT2	4	38	-	11 ay
8	55	8,74	pT2	5	85	-	10 ay
9	59	5,39	pT2	4	45	-	6 ay
10	54	17,8	pT2	7	68	-	4 ay
11	70	9,0	pT2	7	52	-	2 ay
12	65	13,8	pT2	4	78	-	12 ay
13	64	5,2	pT2	7	73	-	2 ay
14	75	52,4	pT2	9	67	-	18 ay
15	73	13,5	pT2	8	60	-	24 ay

**Tablo 4.2.** İleri evre prostat kanseri materyallerinin klinik sınıflandırılmaları, PTEN ekspresyon düzeyleri ve hormon duyarlılıkları :

İleri Evre PKa	Yaş	PSA	Evre	Gleason Skoru	PTEN miktarında azalma (%)	Hormon Duyarlı	Hormon Dirençli
1	69	11,5	T4a K+	9	95	+	
2	73	6,5	T3a K+	8	90		+
3	63	403	T3a K+	9	94		+
4	68	173,8	T3a K+	9	97		+

5	75	4,26	T3a K+	7	86		+
6	82	6,52	T3a K+	6	78	+	
7	74	23,4	T3a K+	8	88		+
8	75	20,0	T3a K+	7	85		+
9	68	8,05	T3a K+	7	97	+	
10	77	300	T3a K+	9	97		+
11	70	20,0	T3a K+N+	7	80	+	
12	70	46,0	T3a K+	7	86		+
13	75	30,0	T3a K+	7	84	+	
14	78	35,2	T3a K+	8	67		+
15	74	16,2	T3a K+	9	85		+
16	72	15,0	T4a K+	6	77		+
17	72	169	T3a K+	8	80		+
18	81	400	T3a K+	9	97	+	

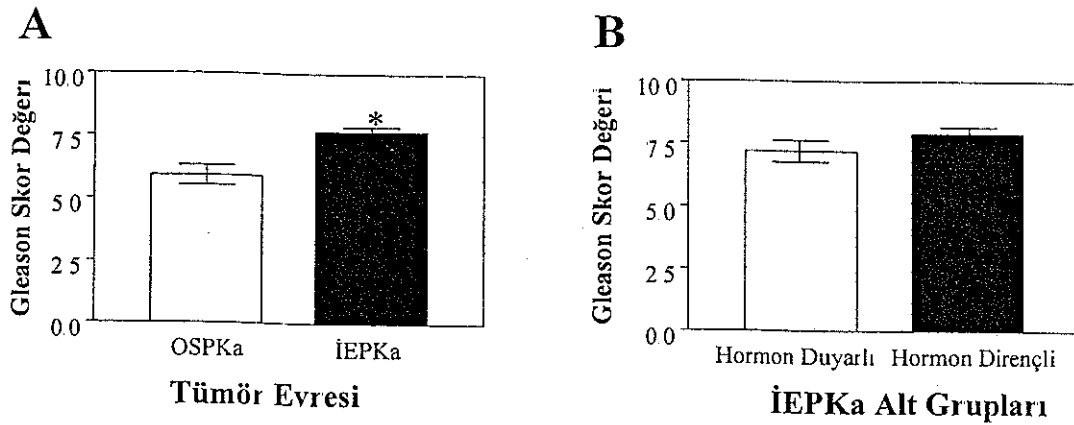
**Tablo 4.3.** BPH materyallerinin klinik değerleri ve PTEN ekspresyon miktarları:

BPH	Yaş	PSA	Patoloji	PTEN miktarında azalma (%)	Boyut cc
1	62	1,9	BPH	96	43
2	67	14,5	BPH	96	45
3	54	1,9	BPH	47	40
4	61	0,83	BPH	35	51
5	56	3,28	BPH	60	73
6	56	17,2	BPH	29	40
7	62	5,99	BPH	63	47
8	62	0,8	BPH	1	27
9	66	2,56	BPH	90	75
10	56	0,48	BPH	95	28,5
11	71	7,41	BPH	60	94



12	78	6,86	BPH	33	58,6
13	72	13,4	BPH	70	60
14	65	2,89	BPH	0	32
15	64	0,58	BPH	32	26,5
16	75	77,1	BPH	41	90
17	75	3,6	BPH	0	46
18	57	15,42	BPH	94	135
19	51	8,8	BPH	55	46,5
20	66	2,58	BPH	81	46
21	72	5,19	BPH	89	74
22	73	5,82	BPH	37	28
23	67	5,8	BPH	68	40
24	75	10,4	BPH	60	133
25	63	34,0	BPH	58	110
26	76	0,67	BPH	49	248
27	56	5,28	BPH	60	36
28	63	4,7	BPH	61	64
29	75	15,0	BPH	62	80
30	69	4,97	BPH	72	50
31	58	7,21	BPH	87	90
32	65	2,89	BPH	59	32
33	72	7,12	BPH	21	88
34	53	14,7	BPH	26	57,3
35	76	13,4	BPH	73	65
36	63	8,09	BPH	49	123
37	72	1,78	BPH	54	40
38	64	1,99	BPH	71	24
39	69	4,49	BPH	64	16,5
40	70	5,0	BPH	82	45
41	82	4,23	BPH	79	32
42	64	8,44	BPH	86	45
43	75	4,27	BPH	50	40

Organa sınırlı prostat kanseri ve ileri evre prostat kanseri hastalarından temin edilen tümör materyalleri, Gleason skoru değerleri dikkate alınarak şekil 4.1.A' daki gibi değerlendirildi. İleri evre prostat kanseri örneklerinin (n=18) analizi ile elde edilen Gleason skoru değerleri ortalama 7.8 (+/- 0.2) ng/ml iken organa sınırlı prostat kanseri olgulardaki (n=15) ortalama 5.93 (+/- 0.4) ng/ml olarak bulundu. İleri evre prostat kanseri olguları hormon terapisine duyarlılık göz önüne alınarak iki alt gruba ayrıldı. Hormona dirençli ve hormona duyarlı prostat kanseri olgularının Gleason skoru değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç bulunamadı (Şekil 4.1.B).



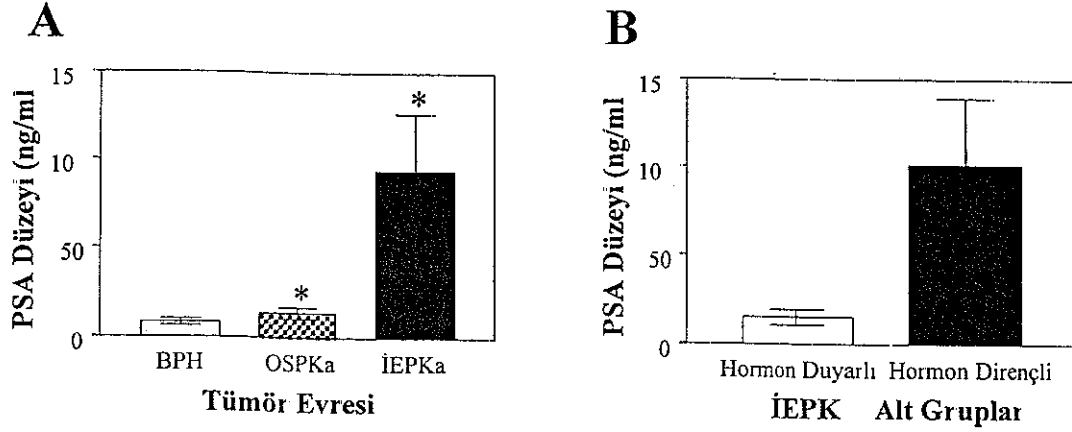
Şekil 4.1. Prostat dokusunun histo-patolojik analizi :

*A*, Organa sınırlı (n=15) ve ileri evre (n=18) prostat kanserlerinin Gleason değerlerinin karşılaştırılması. *B*, Hormon duyarlı (n=6) ve hormon dirençli (n=12) ileri evre prostat kanseri hastalarında ortalama Gleason değeri karşılaştırılması.

\*  $p < 0.05$

Prostat kanserinin ilerlemesinde prognostik faktör olarak kullanılan serum PSA düzeyi ile yapılan analizlerin sonucunda BPH hastalarında serum PSA seviyesinin ortalaması 8.5 (+/- 1.9) ng/ml olarak bulundu. Bununla beraber organa sınırlı prostat kanseri hastaları (13.8 +/- 3.1 ng/ml) ve ileri evre prostat kanseri olguları (94 +/- 32.6 ng/ml) serum PSA düzeyi bakımından önemli ölçüde artış gösterdi (Şekil

4.2.A). İleri evre prostat kanseri olgularının detaylandırılarak yapılan analizi sonucunda hormona dirençli grubun (101 +/- 38 ng/ml) hormona duyarlı gruptan (15.2 +/- 4.4 ng/ml) daha yüksek serum PSA düzeyine sahip olduğunun belirlenmesine rağmen bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Şekil-2B).

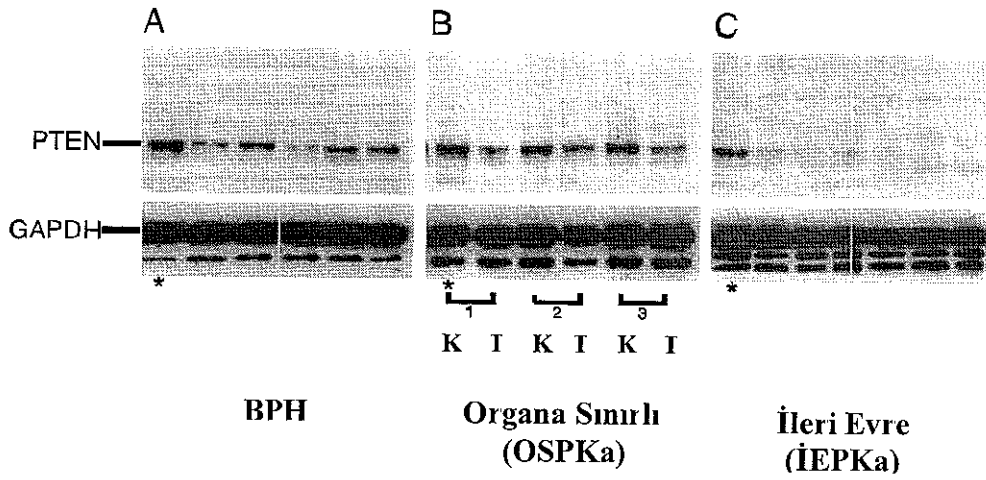


Şekil 4.2. Serum PSA miktar analizi :

A; BPH (n=43), organa sınırlı (n=15) ve ileri evre (n=18) prostat kanserlerinin ortalama PSA düzeyleri. B, İleri evre prostat kanseri alt grupları için ortalama PSA düzeyleri.

\*  $p < 0.05$

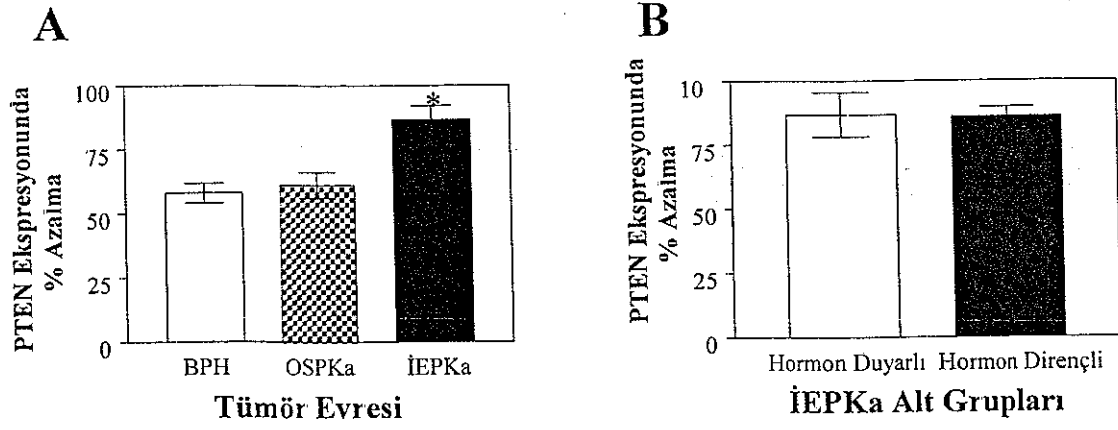
BPH, organa sınırlı ve ileri evre prostat kanseri hasta gruplarında PTEN ekspresyon seviyeleri bakımından farklılık olup olmadığını belirlemek amacı ile Western-Blot yöntemi uygulandı. Western-Blot sonuçları alındıktan sonra dansitometrik analizlerin yapılmasında kullanılan NIH (National Institute of Health) Image tabanlı bir program olan Scion Image yardımı ile her bir hasta için PTEN ekspresyon düzeyi kontrol grubuna orantılanarak hesaplandı. Bu çalışma sonucunda BPH hasta grubu örneklerinde ortalama % 58 azalma tespit edilirken, organa sınırlı prostat kanseri olgularında ortalama % 61 azalma bulundu (Şekil 4.3.A ve B). İleri evre prostat kanseri dokularında ise bu oran daha yüksek ve yaklaşık % 86 olarak saptandı (Şekil 4.3.C).



**ŞEKİL 4.3.** BPH (A), organa sınırlı (B) ve ileri evre (C) prostat kanseri materyallerinin Western Blot analizi. Üst panel PTEN ekspresyonunu, alt panel internal kontrol olarak GAPDH ekspresyonunu göstermektedir.

\* kontrol örnek

Western Blot sonuçlarının dansitometrik analizleri sonucunda organa sınırlı prostat kanseri olguları ile BPH olguları arasında PTEN ekspresyonu bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç olmadığı saptandı (Şekil 4.4.A). Bununla beraber ileri evre prostat kanseri olgularında yapılan dansitometrik analizler diğer iki gruba oranla istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Şekil 4.4.A). İleri evre prostat kanseri olgularının iki alt grubunda PTEN ekspresyonu dikkate alınarak yapılan analiz bulgularında, hormon dirençli ve hormon duyarlı grupların birbirlerine benzer sonuçlar verdiği gözlemlendi (Şekil 4.4.B).



**ŞEKİL 4.4.** PTEN ekspresyon profilleri :

BPH (n=43), organa sınırlı (n=15) ve ileri evre (n=18) prostat kanserlerinde PTEN ekspresyonundaki azalma yüzde olarak şekil-A da gösterilmiştir. B, İleri evre prostat kanseri alt gruplarında PTEN ekspresyonundaki ortalama % azalmanın karşılaştırılması.

\*  $p < 0.01$

## TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Prostat kanseri, genetik olarak heterojen bir tümör olup moleküler patolojisi oldukça komplekstir. Prostat kanserinin moleküler mekanizmasında tümör genetiği, hücre sinyalizasyonu, apoptozis, anjinogenezis ve immün sistem rol oynamaktadır. Bugüne kadar prostat kanserinin gelişiminin anlaşılması için büyüme faktörleri, proliferasyonla ilişkili antijenler, bazı tümör süpressör genler ve bazı adhezyon molekülleri gibi birçok moleküler marker test edilmesine rağmen bu markırlardan hiçbiri kendi başına kullanıldığında tümörün biyolojik davranışı hakkında yeterli bilgiyi sağlayamamıştır. Mekanizmanın tamamen anlaşılması, prostat kanserinin tedavisinde kullanılabilecek yeni yöntemlerin belirlenmesini sağlayacaktır (104). Son yıllarda prostat kanserinin patogenezinde apoptozis mekanizmasına ve tümör süpressör genlere olan ilgi oldukça artmıştır. Bu nedenle yeni tanımlanmış olan tümör süpressör *PTEN* geninin prostat kanserinde prognostik markır olarak kullanılma fikri, araştırmacılar için oldukça önem taşımaktadır (89,105).

*PTEN* ekspresyonu ile prostat kanserinin gelişimi arasında bir ilişkinin olup olmadığının belirlenmesi için 43 BPH' lı, 15 organa sınırlı ve 18 ileri evre prostat kanserli olmak üzere toplam 76 hastanın serum PSA düzeyi, histopatolojik değerlendirmesi (patolojik evre ve Gleason skoru) yapılarak *PTEN* ekspresyon düzeyi ile karşılaştırıldı.

Daha önceki yapılan çalışmalar prostat kanserinin biyolojik davranışını tahmin etmede Gleason skorunun en etkili prognostik markır olduğunu göstermiştir (106,107). Gleason skoru yükseldikçe tümörün agresifliği de artmaktadır (108,109). Çalışmamızda Gleason skoru

açısından ileri evre prostat kanseri olguları ile organa sınırlı prostat kanseri olguları arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmuştur (Şekil 4.1.A). Ortalama Gleason skoru bakımından hormon duyarlı ve hormon dirençli ileri evre prostat kanserli olgular arasında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç bulunamamıştır (Şekil 4.1.B). Hormon duyarlı ve hormon dirençli ileri evre prostat kanserli olgular ile ilişkili bulgularımız literatürle karşılaştırıldığında Benaim ve arkadaşlarının yaptığı çalışma ile çelişmektedir. Bu araştırmacılara göre yalnızca androjen-bağımsız prostat kanserinin ilerlemesi yüksek Gleason Skor değeri ile korelasyon göstermektedir (110).

Çalışmamızda ikinci bir prognostik markır olarak prostat kanserli her olguda serum PSA düzeyi tespit edilmiştir. BPH olguları için ortalama PSA seviyesi 8.5(+/-1.9) ng/ml olarak tespit edilirken, organa sınırlı prostat kanseri (13.8+/-3.1ng/ml) ve ileri evre prostat kanseri (94+/-32.6ng/ml) olgularının her ikisi serum PSA düzeyi bakımından önemli ölçüde artış göstermiştir (Şekil 4.2.A). Bu sonuçlar, Xess A. ve arkadaşlarının yaptığı ve prostat kanserinde PSA seviyesi ile klinik evresi arasında bir korelasyonun var olduğunu belirten çalışma ile desteklenmektedir (111). Serum PSA düzeyinin tümör evresinin tahmininde her zaman güvenilir bir sonuç sağlamadığı bilinmektedir (112-114). Çalışmamızda, BPH' lı olgularda PSA düzeyi 1 - 77 ng/ml, organa sınırlı prostat kanserli olgularda 5 - 50 ng/ml ve ileri evre prostat kanseri olgularında 4 - 400 ng/ml arasında değiştiği gösterilmiştir. PSA düzeyleri arasındaki bu yüksek farktan dolayı prostat kanserinin klinik evresinin belirlenmesinde serum PSA düzeyi tek başına yetersiz kalmaktadır. PSA düzeyi ile ilişkili bu veriler literatür bulguları ile de uyumludur (115). Bununla beraber çalışmalarımızda hormon dirençli ileri evre prostat kanseri olgularının (101+/-38ng/ml) hormon duyarlı ileri evre prostat kanseri olgularına (152+/-44ng/ml) oranla daha yüksek bir ortalama PSA düzeyi tespit edilmesine rağmen bu sonuç istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır ( $p=0,437$ ) (Şekil 4.2.B).

Çalışmamızda Gleason skoru ve PSA düzeyindeki tüm bu değişiklikler göz önünde bulundurulduğunda, PTEN ekspresyonundaki azalma (%86) ile ileri evre prostat kanseri arasında negatif bir korelasyon olduğu görülmektedir. Literatüre bakıldığında McMenamin ve arkadaşlarının yaptığı çalışma, ileri evre prostat kanserinde 7 ve daha yüksek Gleason Skor değerinin PTEN kaybı ile korele olduğunu belirtmekte ve bu sonuç bulgularımızı desteklemektedir (116). BPH ve organa sınırlı prostat kanseri olgularında ise PTEN ekspresyon düzeyi bakımından istatistiksel bir farklılık gözlenmemiştir. Bu nedenle PTEN ekspresyonu ile prostat kanserinin ilerlemesi arasında ters bir korelasyonun varlığı söz konusudur.

Tümör süpressör olarak tanımlanan *PTEN* geninin ürünü, tirozin fosfataz özelliğinin yanı sıra lipid fosfataz aktivitesi de gösterilmiş bir proteindir (34). PTEN' in PI3K yolu üzerinden lipid fosfataz aktivitesinin hücre büyümesi ve apoptozisin düzenlenmesinde oldukça önemli olduğu bilinmektedir (47,67,117,118). Apoptozis ve hücre büyümesinde lipid fosfataz aktivitesinin kullanılması dışında, PTEN' nin protein tirozin fosfataz aktivitesi ile hücre adezyonu, migrasyonu ve invazyonunda rol aldığı belirtilmektedir (70,73,119). Bu çalışmalardan, PTEN' in sadece hücre büyümesini durdurmada önemli olmadığı, bunun yanında hücre invazyonunda da önemli olabileceği anlaşılmaktadır. O halde, prostat kanserinin gelişim sürecinde PTEN hangi rolü almaktadır? Çalışmamızda BPH ve organa sınırlı prostat kanserli hastalarda PTEN ekspresyonundaki azalma ortalama % 60 olarak tespit edildi. Bilindiği üzere malign değişim sürecinde tümör süpressör genlerin negatif regülasyonu sayıca artmakta olan hücreler için ortak bir mekanizmadır. Bu nedenle yukarıda bahsedilen durumlarda PTEN ekspresyonundaki azalma sürpriz bir sonuç değildir. Tümör oluşumunun erken evresinde bazı hücre toplulukları benign hiperplastik transformasyona uğrarken bazıları malign bir değişim geçirmektedirler. Bizim çalışmamızda BPH ve organa sınırlı prostat kanseri olguları arasında PTEN ekspresyon seviyesi açısından farklılığın olmamasına bağlı olarak PTEN proteininin



prostat kanseri gelişiminin karar sürecinde önemli olmadığını söyleyebiliriz. Diğer yandan ileri evre prostat kanserli olgular PTEN ekspresyon seviyesi bakımından BPH ve organa sınırlı prostat kanseri olgularına oranla istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermektedir. Tamura M. ve arkadaşları yaptıkları moleküler bir çalışmada, PTEN' in hücre invazyonunun kontrolünde görev aldığını belirtmişlerdir (70). Hwang P.H. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise bir hayvan akciğer metastaz modelinde PTEN' in yüksek olasılıkla metastaz oluşumunu kontrol ettiği gösterilmiştir (120). Tüm bu sonuçlar ile beraber bulgularımız kıyaslanırsa PTEN' in organa sınırlı prostat kanserinden ileri evre prostat kanserine geçişin kontrolünde rol oynayabileceğini söyleyebiliriz.

Son yıllarda prostat kanserinde erken tanıya yönelik yapılan çalışmaların artmasına rağmen tanı konulup tedavi edilen hasta sayısı genelde %20' yi geçmemektedir. Klinik evre, Gleason skoru ve serum PSA düzeyi gibi bilinen prognostik markırlar, kanserin biyolojik davranışı hakkında detaylı bilgi vermemektedir. Tedavi seçeneklerinden biri olan radikal prostatektomi, organa sınırlı prostat kanserinde oldukça sık tercih edilen bir yöntem olmasına rağmen prostat kanserinin klinik olarak tanımlanamayan mikrometastazlarda olduğu gibi sistemik bir hastalık haline dönüştüğü durumlarda kullanılmamaktadır. Bu bilgiler dahilinde prostat kanserinde tanı güvenilirliğinin geliştirilmesi ve tedavi seçeneklerinin artırılması için yeni biyomarkırlara ihtiyaç duyulmaktadır.

Bulgularımız, prostat kanserinin gelişimi ile PTEN ekspresyonu arasında negatif bir korelasyonun var olduğunu göstermektedir. PTEN ekspresyonunun belirlenmesi, metastazın gelişebileceği hastaların tespitinde yol gösterici olabilir (89,121). Bu nedenle , serum PSA düzeyi ve Gleason skoru ile birlikte PTEN ekspresyon miktarının da markır olarak tespit edilmesi, prostat kanserinin moleküler patogenezinin belirlenmesi ve prostat kanserine karşı yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi açısından yararlı olacağı kanısındayız.

İleri evre prostat kanserinde PTEN ekspresyonundaki (%86) azalış PTEN' nin prostat kanserindeki önemini artırmaktadır. Prostat kanserinin ileri evrelerinde PTEN protein düzeyinde meydana gelen bu değişiklikler PTEN terapinin kullanılabilceğini gündeme getirmiştir. Tümör süpressör PTEN' nin yüksek miktardaki bu kaybı telafi edilebilirse kanser gelişiminin durdurulmasında önemli olabileceği düşüncesindeyiz. PTEN' nin Bcl-2 ekspresyonunu baskılayarak PTEN- mutant prostat kanseri hücrelerinde kemoterapotiklere olan duyarlılığı artırdığı gösterilmiştir (94). Dolayısıyla prostat kanserinde kullanılacak olan PTEN terapi, hücrelerin kemoterapotik ajanlara karşı olan duyarlılığını artırabilir. Yine bir tümör süpressör gen olan ve prostat kanserinde PTEN gibi kayba uğrayan p53, PTEN ve p53' ten yoksun hücrelere PTEN ile beraber verilerek kombine etkiler oluşturulabilir. Bu şekilde PTEN' nin, prostat kanseri prognozundaki olası önemi daha iyi anlaşılabilir. Bu nedenle benzer çalışmalar dünyanın değişik bölgelerinde, geniş hasta popülasyonlarında yapılması gerekir.

## KAYNAKLAR

1. Bahçeci, Z. Moleküler Biyoloji. Poyraz Ofset, 1. Baskı, Kırşehir, 1997
2. Cooper G.M. The Cell. A molecular approach.1997, ASM Press
3. Murphy,G.P., Lawrence, W. and Lenhard, R.E. Clinical Oncology, 2 nd. Edition, American Cancer Society, Atlanta, 1995.
4. <http://prosmmedcom/y2.html>
5. Brooks, J.D. Anatomy of the lower urinary tract and male genitalia. In Campbell's Urology. Edited by Walsh PC, Retik AB, Stamey TA and Vaughan ED. Philadelphia: WB Saunders Company. Seventh edition. Vol. 1, chapt. 3, pp 89-128, 1997.
6. Hinman, F.Jr. Prostate and urethral sphincters. In Atlas of Urosurgical Anatomy. Edited by Hinman F Jr. Philadelphia: WB Saunders Company. Chapt. 14, pp 345-388, 1993.
7. Tanagho, E.A. Anatomy of the genitourinary tract. In Smith's General Urology. Edited by Tanagho EA and McAninch JW. Fourteenth edition. California: Appleton & Lange Company. Chapt 1, pp 1-16, 1995.
8. <http://prosmmed.com/y3.html>
9. Grenlee, R.T., Hill-Harmon, M.B., Murray, T., and Thun, M. Cancer statistics, 2001, *CA Cancer J Clin.* 51: 15-36., 2001.
10. Fidaner, C., Eser, S.Y., Parkin, D.M. Incidence in Izmir in 1993-1994: first results from Izmir Cancer Registry. *Eur. J. Cancer*, 37: 83-92., 2001

11. Grumet, S.C. and Bruner, D.W. The identification and screening of men at high risk for developing prostate cancer. *Urol Nurs.* 20: 15-8, 23-4, 2000.
12. Devi, G.R. Prostate cancer: status of current treatments and emerging antisense- based therapies, *Curr Opin Mol Ther.* 4: 138-48., 2002.
13. <http://prosmad.com/y9.html>
14. Walsh, P.C., Partin, A.W. and Epstein, J.I. Cancer control and quality of life following anatomical radical retropubic prostatectomy: results at 10 years. *J. Urol.* 152: 1831-6., 1994.
15. Trapasso, J.G., deKernion, J.B., Smith, R.B. and Dorey, F. The incidence and significance of detectable levels of serum prostate specific antigen after radical prostatectomy. *J Urol.* 152: 1821-5., 1994.
16. Bostwick, D.G. Staging prostate cancer. Current methods and limitations. *Eur. Urol.* 32, 2-14., 1997.
17. Paulson, D.F. Uro-Oncology research group. The impact of current Staging procedures in assessing disease extent of prostatic adenocarcinoma. *J. Urol.* 121: 300-302, 1997.
18. Tavtigian, S.V. A candidate prostate cancer susceptibility gene at chromosome 17p. *Nat. Genet.*, 27: 172-80., 2001.
19. Gronberg, H., Damber, L., Damber, J.-E., and Iselius, L. Segregation analysis of prostate cancer in Sweden: support for dominant inheritance. *Am. J. Epidemiol.* 146: 552-557, 1997.
20. Steinberg, G.D., Carter, B.S., Beaty, T.H., Childs, B. and Walsh, P.C. Family history and the risk of prostate cancer. *Prostate* 17: 337-347, 1999.
21. Carter, B.S. et al. Epidemiologic evidence regarding predisposing factors to prostate cancer. *Prostate* 16: 187-197, 1989.

22. La Vecchia, C. Cancers associated with high fat diets. *Monogr Natl Cancer Inst.* 12: 79-85, 1992.
23. Chiarodo, A. National Cancer Institute rountable on prostate cancer: future research directions. *Cncer Res.* 51: 2498-2505, 1991.
24. Muir, C.S., Nectoux, J., Staszewski, J. The epidemiology of prostate cancer: geographic distribution and time trends. *Acta Oncol.* 30: 133-140, 1991.
25. Jin-Tang Dong. Chromosomal deletions and tumor suppressor genes in prostate cancer. *Cancer and Metastasis Reviews* 20: 173-193, 2001.
26. Strachan T., et al. Human Molecular Genetics, BIOS Scientific Pub Ltd., 1996.
27. Lodish H., et al. Molecular Cell Biology, Fourth Edition., W.H. Freeman and Company, 2000.
28. Karüzüm, S.B., Akciğer karsinomlarında kurulan doku kültürlerinde sitogenetik çalışmalar., Doktora Tezi, 1995.
29. Foster, C.S., Cornford, P., Forsyth, L., Djamgoz, M.B.A., and Ke, Y. The cellular and molecular basis of prostate cancer. *Br. J. Urol.* 83, 171-194, 1999.
30. Mitelman, F., Johanson, B., Mertens, F. Mitelman. Database of chromosome aberrations in cancer. <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosome/Mitelman2001>.
31. Thompson MW., et al. Genetics in medicine, W.B. Saunders Company, 1991.
32. Hsu SC, Volpert OV, Steck PA, Mikkelsen T, Polverini PJ, Rao S, Chou P, Bouck, NP. Inhibition of angiogenesis in human glioblastomas by chromosome 10 induction of thrombospondin-1. *Cancer Res* 15; 56., 5684-91, 1996.

33. Li, J., Yen, C., Liaw, D., Podsypanina, K., Bose, S., Wang, S.I., Puc, J., Miliareis, C., Rodgers, L., McCombie, R., Bigner, S.H., Giovanella, B.C., Ittmann, M., Tycko, B., Hibshoosh, H., Wigler, M.H., Parsons, R. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 275: 1943-7, 1997.
34. Steck, P.A., Pershouse, M.A., Jasser, S.A., Yung, W.K., Lin, H., Ligon, A. H., Langford, L.A., Baumgard, M.L., Hattier, T., Davis, T., Frye, C., Hu, R., Swedlund, B., Teng, D. H., and Tavtigian, S. V. Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers, *Nat Genet.* 15: 356-62, 1997.
35. Simpson, L. and Parsons, R. PTEN: life as a tumor suppressor, *Exp Cell Res.* 264: 29-41., 2001.
36. Hansen, G.M. and Justice, M.J. PTEN, a candidate tumor suppressor gene, maps to mouse chromosome 19. *Mammalian Genome* 9: 88-90, 1998.
37. Li, D.M., and Sun, H. TEP1, encoded by a candidate tumor suppressor locus, is a novel protein tyrosine phosphatase regulated by transforming growth factor *B* *Cancer Res.*, 57: 2124-2129, 1997.
38. Wishart, M.J., Taylor, G.S., James, T.S. and Dixon J.E. PTEN and myotubularin phosphoinositide phosphatases: bringing bioinformatics to the lab bench. *Curr Opin Cell Biol.* 13(2):172-81, 2001.
39. Lee, J.O., Yang, H., Georgescu N.M., Di Cristofano, A., Maehama, T., et al. Crystal structure of the PTEN tumor suppressor: implications for its phosphoinositide phosphatase activity and membrane association. *Cell* 29;99 (3) :323-34., 1999.
40. Maehama, T., Taylor, G.S., and Dixon, J.E. PTEN and Myotubularin: Novel phosphoinositide phosphatases. *Annu Rev. Biochem.* 70:247-79., 2001.

41. Rizo, J., Südhof T.C. C2-domains, structure and function of a universal Ca<sup>2+</sup>\_binding domain. *J Biol Chem* 26;273(26):15879-82.,1998.
42. He, H., Watanabe, T., Zhan, X., Huang, C., Schuurin, E. Role of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in Ras/Rac-induced disruption of the cortactin-actomyosin II complex and malignant transformation. *Mol Cell Biol* 18(7): 3829-37., 1998.
43. Georgescu, M.M., Kirsch. K.H., Akagi. T., Shishido. T., Hanafusa. H. The tumor-suppressor activity of PTEN is regulated by its carboxyl-terminal region. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 31;96(18): 10182-7., 1999.
44. Wu,Y., Dowbenko, D., Spencer, S., Laura, R., Lee, J. Interaction of the tumor suppressor PTEN/MMAC with a PDZ domain of MAGI3, a novel membrane-associated guanylate kinase. *J Biol Chem* 14;275(28): 21477-85., 2000.
45. Adey, N.B., Huang, L., Ormonde, P.A., Baumgard,,M.L., Pero, R. Threonine phosphorylation of the MMAC1/PTEN PDZ binding domain both inhibits and stimulates PDZ binding. *Cancer Res* 1;60(1): 35-7., 2000.
46. Leslie, N.R., Gray, A., Pass, I., Orchiston, E.A., Teng D.H.F., Downes C.P. Analysis of the cellular functions of PTEN using catalytic domain and C-terminal mutations: differential effects of C-terminal deletion on signalling pathways downstream of phosphoinositide 3-kinase. *Biochem J* 346: 827-33., 2000.
47. Myers MP, Pass I, Batty IH, Van der Kaay J, Stolarov JP, Hemmings BA, Wigler MH, Downes CP, Tonks NK. The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for its tumor supressor function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 10: 95, 13513-8.,1998.
48. Davies MA, Koul D, Dhese H, Berman R, McDonnell TJ, McConkey D, Yung WK, Steck PA Regulation of Akt/PKB activity, cellular growth, and apoptosis in prostate carcinoma cells by MMAC/PTEN. *Cancer Res* 59(11): 2551-6.,1999.

\*,

49. Coffey, P.J., Lin, J., Woodgett, J.R. Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. *Biochem J.* 335 : 1-13., 1998.
50. Cantley, L.C., Neel, B.G. New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Apr 13;96(8):4240-5.
51. Stephens, L., Anderson, K., Stokoe, D., Erdjument-Bromage, H., Painter, G.F. Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent activation of protein kinase B. *Science.* 279: 710-4., 1998.
52. Dahia P.L. PTEN, a unique tumor suppressor gene. *Endocr. Rel. Canc.* 7(2): 15-29., 2000.
53. Rmasawamy, S., Nakamura, N., Vazquez, F., Batt, D.B., Perera, S., Roberts, T.M. and Sellers, W.R. Regulation of G1 progression by the PTEN tumor suppressor protein is linked to inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Proc. Natl. AcadSci. USA.* 96:2110-5, 1999.
54. 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. *Proc Natl Acad Sci USA.* 28;97 (7): 3207-12., 2000.
55. Datta, S.R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell.* 91(2) :231-41., 1997.
56. [http://www.sigmaaldrich.com/Area\\_of\\_Interest/Life\\_Science/Cell\\_Signaling/Pathway\\_Slides\\_and\\_Charts/PTEN\\_Pathway.html](http://www.sigmaaldrich.com/Area_of_Interest/Life_Science/Cell_Signaling/Pathway_Slides_and_Charts/PTEN_Pathway.html)
57. Stambolic V., Suzuki A., de la pompa J.L., Brothers GM., Mirtsos C., Sasaki T., Ruland J., Penninger J.M., Siderovski D.P. and Mak T.W. Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell.* 95(1) : 29-39., 1998.



58. Lu Y., Lin Y.Z., LaPushin R., Cuevas B., Fang X., et al. The PTEN/MMAC1/TEP tumor suppressor gene decreases cell growth and induces apoptosis and anoikis in breast cancer cells. *Oncogene*. 18(50): 7034-45., 1999.
59. Furnari F.B., Huang H.J. and Cavenee W.K. The phosphoinositol phosphatase activity of PTEN mediates a serum-sensitive G1 growth arrest in glioma cells. *Cancer Res.*, 58(22): 5002-8., 1998.
60. Wick W., Furnari F.B., Naumann U., Cavenee W.K. and Weller M. PTEN gene transfer in human malignant glioma: sensitization to irradiation and CD95L-induced apoptosis. *Oncogene*. 18 (27) : 3936-43., 1999.
61. Paramio J.M., Navarro M., Segrelles C., Gomez-Casero E., Jorcano J.L. PTEN tumor suppressor is linked to the cell cycle control through the retinoblastoma protein. *Oncogene*. 18 : 7462-7468., 1999.
62. Cheney I.W., Neuteboom S.T., 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 p27Kip1 into cyclin E/CDK2 complexes. *Cancer Res*. 59 : 2318-2323, 1999.
63. Weng L.P., Smith W.M., Dahia P.L., Ziebold U., Gil E., Lees J.A., Eng C. PTEN suppresses breast cancer cell growth by phosphatase activity-dependent G1 arrest followed by cell death. *Cancer Res*. 59(22) : 5808-14, 1999.
64. Weng L.P., Brown J.L. and Eng C. PTN 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. *Hum. Mol. Genet.* 10(6) : 599-604, 2001.
65. Sun H., Leshe R., Li D.M., Liliental J., Zhang H., Gao J., Gavrilova N., Mueller B., Liu X. and Wu H. PTEN modulates cell cycle progression and cell survival by regulating phosphatidylinositol 3,4,5,-triphosphate and Akt/protein kinase B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 : 6199-6204, 1999.

66. Li D.M. and Sun H. PTEN/MMAC1/TEP1 suppresses the tumorigenicity and induces G1 cell cycle arrest in human glioblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 : 15406-15411, 1998.
67. Wu, X., Senechal, K., Neshat, M. S., Whang, Y. E., and Sawyers, C. L. The PTEN/MMAC1 tumor suppressor phosphatase functions as a negative regulator of the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 15587-91, 1998.
68. Tamura M., Gu J., Matsumoto K., Aoto S., Parsons R., Yamada K.M. Inhibition of cell migration, spreading and focal adhesions by tumor suppressor PTEN. *Science* 280 : 1614-7, 1998.
69. Maier D., Jones G., Li X., Schonthal A.H., Gratzl O., et al. The PTEN lipid phosphatase domain is not required to inhibit invasion of glioma cells. *Cancer Res* 59 : 5479-82, 1999.
70. Tamura, M., Gu, J., Takino, T., and Yamada, K. M. Tumor suppressor PTEN inhibition of cell invasion, migration, and growth: differential involvement of focal adhesion kinase and p130Cas, *Cancer Res* 59: 442-9, 1999.
71. Ignatoski K.M., Maehama T., Markwart S.M., Dixon J.E., Livant D.L. et al. ERBB-2 overexpression confers PI 3' kinase-dependent invasion capacity on human mammary epithelial cells. *Br J Cancer* (3) : 666-74, 2000.
72. Chen H.C., Appeddu P.A., Isoda H., Guan J.L. Phosphorylation of tyrosine 397 in focal adhesion kinase is required for binding phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* 271 : 26329-34, 1996.
73. Tamura, M., Gu, J., Tran, H., and Yamada, K. M. PTEN gene and integrin signaling in cancer, *J Natl Cancer Inst* 91: 1820-8, 1999.
74. Di Cristofano A, Pesce B, Cordon-Cardo C, Pandolfi PP. Pten is essential for embryonic development and tumour suppression. *Nat Genet* (4) : 348-55, 1998.

75. Podsypanina K., Ellenson L.H., Nemes A., Gu J., Tamura M., Yamada K.M., Cordon-Cardo C., Catoretti G., Fisher P.E. and Parsons R. Mutation of *Pten / Mmac1* in mice causes neoplasia in multiple organ systems. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96 : 1563-1568, 1998.
76. Suzuki A, de la Pompa JL, Stambolic V, Elia AJ, Sasaki T, del Barco Barrantes I, Ho A, Wakeham A, Itie A, Khoo W, Fukumoto M, Mak TW. High cancer susceptibility and embryonic lethality associated with mutation of the PTEN tumor suppressor gene in mice. *Curr Biol* 8(21) : 1169-78, 1998.
77. Di Cristofano, A. and Pandolfi P.P. The multiple roles of PTEN in tumor suppression. *Cell*. 100 : 387-390, 2000.
78. Vasquez F., Ramaswamy S., Nakamura N., Sellers W.R. Phosphorylation of PTEN tail regulates protein stability and function. *Mol Cell Biol*. 20 : 5010-5018, 2000.
79. Torres J., Pulido R. The tumor suppressor PTEN is phosphorylated by the protein kinase CK2 at its C terminus. Implications for PTEN stability to proteasome-mediated degradation. *J Biol Chem*. 276(2) : 993-8, 2001.
80. Wu X., Hepner K., Castelino-Prabhu S., Do D., Kaye M.B., Yuan X.-J., 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. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97(8) : 4233-8, 2000.
81. Peters M.A. and Ostrander E. Prostate cancer : simplicity to complexity. *Nat. Genet.*, 27 : 134-135, 2001.
82. Bergerheim U.S., Kunimi K., Collins V.P. and Ekman P. Deletion mapping of chromosomes 8, 10, and 16 in human prostatic carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 3 : 215-220, 1997.
83. Nihei N., Ichikawa T., Kawana Y. et al. Localization of metastasis suppressor gene(s) for rat prostatic cancer to the long arm of human chromosome 10. *Genes Chromosomes Cancer*. 14 : 112-119, 1995.

84. Dong, J.T., Sipe, T.W., Hyytinen, E.R., Li, C.L., Heise, C., McClintock, D.E., Grant C.D., Chung, L.W., Frierson, H.F. Jr. PTEN/MMAC1 is infrequently mutated in pT2 and pT3 carcinomas of the prostate. *Oncogene* 17(15) : 1979-82, 1998.
85. Pesche, S., Latil, A., Muzeau, F., Cussenot, O., Fournier, G., Longy, M., Eng, C., Lidereau, R.. PTEN/MMAC1/TEP1 involvement in primary prostate cancers. *Oncogene*, 16(22) : 2879-83, 1998.
86. Suzuki, H., Freije, D., Nusskern, D.R., Okami, K., Cairns, P., Sidransky, D., Isaacs, W.B., Bova, G.S. Interfocal heterogeneity of PTEN/MMAC1 gene alterations in multiple metastatic prostate cancer tissues. *Cancer Res.* 58(2) : 204-9, 1998.
87. Cairns, P., Okami, K., Halachmi, S., Halachmi, N., Esteller, M., Herman, J.G., Jen, J., Isaacs, W.B., Bova, G.S., Sidransky, D. Frequent inactivation of PTEN/MMAC1 in primary prostate cancer. *Cancer Res.* 57(22) : 4997-5000, 1997.
88. Whang, Y.E., Wu, X., Suzuki, H., Reiter, R.E., Tran, 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. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(9) : 5246-50, 1998.
89. Davies, M.A., Kim, S.J., Parikh, N.U., Dong, Z., Bucana, C.D., and Gallick, G.E. Adenoviral-mediated Expression of MMAC/PTEN Inhibits Proliferation and Metastasis of Human Prostate Cancer Cells, *Clin Cancer Res.* 8 : 1904-14., 2002.
90. Cristofano A., Kotsi P., Peng Y.F., Cordon-Cardo C., Elkon K.B. and Pandolfi P.P. Impaired Fas response and auto immunity in PTEN<sup>+/-</sup> mice. *Science*, 285 : 2122-2125, 1999.
91. Di Cristofano, A., De Acetis, M., Koff, A., Cordon-Cardo, C., and Pandolfi, P. P. Pten and p27KIP1 cooperate in prostate cancer tumor suppression in the mouse. *Nat Genet.* 27: 222-4., 2001.
92. Saacs J.T. *Prostate.* 5 : 545-557, 1984

93. Li P., Nicosia S. V. and Bai W. Antagonism between PTEN/MMAC1/TEP-1 and Androgen Receptor in Growth and Apoptosis of Prostatic Cancer Cells. *Clin Canc Res*. 276(23) : 20444-20450, 2001.
94. Huang H., Cheville J.C., Pan Y., Roche P.C., Schmidt L.J. and Tindall D.J. PTEN induces Chemosensitivity in PTEN-mutated Prostate Cancer Cells by Suppression of Bcl-2 Expression. *J Biol Chem*. 276(42) : 38830-38836, 2001.
95. Partin AW, Yoo J, Carter HB, Pearson JD, Chan DW, Epstein JI, Walsh PC. The use of prostate specific antigen, clinical stage and Gleason score to predict pathological stage in men with localized prostate cancer. *J Urol* 150(1): 110-4., 1993
96. Schmelz, M., Cress, A. E., Scott, K.M., Burger, F., Cui, H., Sallam, K., McDaniel, K.M., Dalkin, B.L., and Nagle, R.B. Different Phenotypes in Human Prostate Cancer: alpha6 or alpha3 Integrin in Cell-extracellular Adhesion Sites, *Neoplasia*. 4: 243-54., 2002.
97. Cooper, C.R., Chay, C.H., and Pienta, K.J. The Role of alpha(v)beta(3) in Prostate Cancer Progression, *Neoplasia*. 4: 191-4., 2002.
98. Mason, M.D., Davies, G., and Jiang, W.G. Cell adhesion molecules and adhesion abnormalities in prostate cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 41: 11-28., 2002.
99. Kallakury, B.V., Sheehan, C.E., Winn-Deen, E., Oliver, J., Fisher, H.A., Kaufman, R.P., Jr., and Ross, J.S. Decreased expression of catenins (alpha and beta), p120 CTN, and E-cadherin cell adhesion proteins and E-cadherin gene promoter methylation in prostatic adenocarcinomas. *Cancer*. 92: 2786-95., 2001.
100. Koksall, I.T., Ozcan, F., Kilicaslan, I., and Tefekli, A. Expression of E-cadherin in prostate cancer in formalin-fixed, paraffin- embedded tissues: correlation with pathological features. *Pathology*. 34: 233-8., 2002.
101. Dong, J.T. Chromosomal deletions and tumor suppressor genes in prostate cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 20: 173-93, 2001.

102. Shi, X.B., Nesslinger, N.J., Deitch, A.D., Gumerlock, P.H., and deVere White, R. W. Complex functions of mutant p53 alleles from human prostate cancer. *Prostate*. 51: 59-72., 2002.
103. Qian, J., Hirasawa, K., Bostwick, D.G., Bergstralh, E.J., Slezak, J.M., Anderl, K.L., Borell, T.J., Lieber, M.M., and Jenkins, R.B. Loss of p53 and c-myc overrepresentation in stage T(2-3)N(1-3)M(0) prostate cancer are potential markers for cancer progression, *Mod Pathol*. 15: 35-44., 2002.
104. Morris, M.J. and Scher, H.I. Novel therapies for the treatment of prostate cancer: current clinical trials and development strategies, *Surg Oncol*. 11: 13-23., 2002.
105. Fernandez, M. and Eng, C. The Expanding Role of PTEN in Neoplasia: A Molecule for All Seasons? : Commentary re: M. A. Davies, et al., Adenoviral-mediated Expression of MMAC/PTEN Inhibits Proliferation and Metastasis of Human Prostate Cancer Cells. *Clin Cancer Res.*, 8: 1904-1914, 2002.
106. Fowler, J.E., Jr., Bigler, S.A., White, P.C., and Duncan, W.L. Hormone therapy for locally advanced prostate cancer, *J Urol*. 168: 546-9., 2002.
107. Sweat, S.D., Bergstralh, E.J., Slezak, J., Blute, M.L., and Zincke, H. Competing risk analysis after radical prostatectomy for clinically nonmetastatic prostate adenocarcinoma according to clinical Gleason score and patient age, *J Urol*. 168: 525-9., 2002. \
108. Egevad, L., Granfors, T., Karlberg, L., Bergh, A., and Stattin, P. Prognostic value of the Gleason score in prostate cancer, *BJU Int*. 89: 538-42., 2002.
109. Aprikian, A.G. Risk stratification in clinically localized prostate cancer, *Can J Urol*. 9: 18-20., 2002.
110. Benaim EA, Pace CM, Roehrborn CG: Gleason score predicts androgen independent progression after androgen deprivation therapy. *Eur Urol*; 42(1): 12-7., 2002.

111. Xess, A., Singh, M., Raghwendra, K.H., Sharma, H.P., and Shahi, S.K. Prostate specific antigen as tumor marker: relationship with histologic grading, *Indian J Pathol Microbiol.* 44: 261-4., 2001.
112. Okegawa, T., Yoshioka, J., Morita, R., Nutahara, K., Tsukada, Y., and Higashihara, E. Molecular staging of prostate cancer: comparison of nested reverse transcription polymerase chain reaction assay using prostate specific antigen versus prostate specific membrane antigen as primer, *Int J Urol.* 5: 349-56., 1998.
113. Noldus, J. and Stamey, T.A. Histological characteristics of radical prostatectomy specimens in men with a serum prostate specific antigen of 4 ng./ml or less, *J Urol.* 155: 441-3., 1996.
114. Noldus, J. and Stamey, T. A. Limitations of serum prostate specific antigen in predicting peripheral and transition zone cancer volumes as measured by correlation coefficients, *J Urol.* 155: 232-7., 1996.
115. Partin, A.W., Mangold, L.A., Lamm, D.M., Walsh, P.C., Epstein, J.I., Pearson, J.D. Contemporary update of prostate cancer staging nomograms (Partin Tables) for the new millennium. *Urology*, 58(6): 843-8., 2001.
116. McMenamin, M.E., Soung, 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 Res*, 59(17): 4291-6., 1999.
117. Li, J., Simpson, L., Takahashi, M., Miliareisis, C., Myers, M.P., Tonks, N., and Parsons, R. The PTEN/MMAC1 tumor suppressor induces cell death that is rescued by the AKT/protein kinase B oncogene, *Cancer Res.* 58: 5667-72, 1998.
118. Tamura, M., Gu, J., Danen, E. H., Takino, T., Miyamoto, S., and Yamada, K. M. PTEN interactions with focal adhesion kinase and suppression of the extracellular matrix-dependent phosphatidylinositol 3-kinase/Akt cell survival pathway, *J Biol Chem.* 274: 20693-703, 1999.

119. Yamada, K.M. and Araki, M. Tumor suppressor PTEN: modulator of cell signaling, growth, migration and apoptosis, *J Cell Sci.* 114: 2375-82, 2001.
120. Hwang, P.H., Yi, H.K., Kim, D.S., Nam, S.Y., Kim, J.S., and Lee, D.Y. Suppression of tumorigenicity and metastasis in B16F10 cells by PTEN/MMAC1/TEP1 gene, *Cancer Lett.* 172: 83-91., 2001.
121. Seki, M., Iwakawa, J., Cheng, H., and Cheng, P.W. p53 and PTEN/MMAC1/TEP1 Gene Therapy of Human Prostate PC-3 Carcinoma Xenograft, Using Transferrin-Facilitated Lipofection Gene Delivery Strategy, *Hum Gene Ther.* 13: 761-73., 2002



## ÖZGEÇMİŞ

Ercüment DİRİCE, 07.09.1977 tarihinde Almanya' nın Bremen kentinde doğmuştur. İlköğrenimini 1984-1989 yılları arasında Bremen Arbergen İlkokulunda ve Sinop Cumhuriyet İlkokulunda, orta ve lise öğrenimini 1989-1996 yılları arasında Sinop Anadolu Lisesinde yapmıştır. 2000 yılında Akdeniz Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden mezun olmuştur. 2000 yılında Akdeniz Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü' nde Tıbbi Genetik yüksek lisans programına başlamış ve Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı' na araştırma görevlisi olarak atanmıştır. Halen araştırma görevlisi olarak görevine devam etmektedir.

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
MERKEZ KÜTÜPHANESİ