

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**ENDOMETRİUM KANSERİNDE FOSFOTAZ VE TENSİN
HOMOLOG (*PTEN*) GENİ PROMOTÖR METİLASYONU**

**Tezi Hazırlayan
Keziban KORKMAZ**

**Tezi Yöneten
Doç. Dr. Çetin SAATÇİ**

Yüksek Lisans Tezi

**Ağustos 2013
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**ENDOMETRİUM KANSERİNDE FOSFOTAZ VE TENSİN
HOMOLOG (*PTEN*) GENİ PROMOTÖR METİLASYONU**

**Tezi Hazırlayan
Keziban KORKMAZ**

**Tezi Yöneten
Doç. Dr. Çetin SAATÇİ**

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Birimi tarafından TSY-12-4018 nolu proje ile desteklenmiştir.**

Yüksek Lisans Tezi

**Ağustos 2013
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

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

Adı-Soyadı: Keziban KORKMAZ

İmza: 

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“Endometrium Kanserinde Fosfataz ve Tensin Homolog (*PTEN*) Geni Promotör Metilasyonu” adlı Yüksek Lisans tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.



Tezi Hazırlayan
Keziban KORKMAZ



Danışman
Doç. Dr. Çetin SAATÇI



Anabilim Dalı Başkanı
Prof. Dr. Munis DÜNDAR

Doç. Dr. Çetin SAATÇİ danışmanlığında **Keziban KORKMAZ** tarafından hazırlanan “**Endometrium Kanseriinde Fosfataz ve Tensin Homolog (PTEN) Geni Promotör Metilasyonu**” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Tıbbi Genetik** Anabilim Dalında **yüksek lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

13 / 08/2013

JÜRİ:

Danışman : Doç. Dr. Çetin SAATÇİ (Tıbbi Genetik Anabilim Dalı)

Üye : Prof. Dr. Munis DÜNDAR (Tıbbi Genetik Anabilim Dalı)

Üye : Prof. Dr. İptisam İpek MÜDERRİS (Kadın Has. Doğum AD)

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun 15 AĞU 2013, tarih ve 592

sayılı kararı ile onaylanmıştır.

15 AĞU 2013

Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR
Enstitü Müdürü



TEŞEKKÜR

Tezimin meydana gelişinde yardım ve desteğini esirgemeyen değerli hocam ve danışmanım Doç. Dr. Çetin SAATÇİ'ye çok teşekkür ederim.

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa başladığım ilk günden beri eğitimime katkı sağlayan hocalarım sayın Prof. Dr. Munis DÜNDAR ve Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL'a teşekkür ederim.

Bu tez için gerekli materyalin sağlanmasında elinden geleni yapan ve yardımını esirgemeyen sayın Gökhan AÇMAZ'a, tez materyalimin ön hazırlık aşamasında laboratuvar desteğini esirgemeyen sayın Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR'a teşekkür ederim.

Bu süreçte yanımda olduklarını her zaman hissettiren sevgili anne babama ve varlıkları ile bana güç veren kardeşlerime çok çok teşekkür ederim.

Keziban KORKMAZ

Kayseri 2013

ENDOMETRİUM KANSERİNDE FOSFOTAZ VE TENSİN HOMOLOG (*PTEN*) GENİ PROMOTÖR METİLASYONU

KEZİBAN KORKMAZ

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi, Ağustos 2013

Danışman: Doç.Dr. Çetin SAATÇI

KISA ÖZET

Endometrium kanseri kadın genital sisteminin dünyada en sık rastlanan kanseridir. Endometrium kanseri çok görülmesine rağmen moleküler mekanizması ile ilgili bilgi çok azdır. Günümüzde endometrium kanseri için rutin klinik kullanımda olan moleküler bir belirteç yoktur. Son yıllarda kanserin genetik bir hastalık olduğunun daha iyi anlaşılmış olması ile birlikte kanser genetiği ile ilgili çalışmalar hız kazanmıştır. Bununla birlikte, Endometrium kanser gelişiminde çeşitli genetik faktörler rol oynamaktadır.

Bu faktörlerin başında, tümör baskılayıcı bir gen olan fosfataz ve tensin homolog (*PTEN*) gelmektedir. Bu gen hücre döngüsünde, sinyal iletim yolunda, DNA tamiri ve apoptozisde görev alır. *PTEN*; tümörögenезis boyunca epigenetik mekanizmalardan DNA metilasyonu seviyesinin transkripsiyon düzeyinde sessizleşmesinde etkin rol alan bir genidir. DNA metilasyonunun, kanserin başlangıcı ve gelişimi ile ilişkili önemli bir moleküler belirteç olduğu bildirilmektedir. Endometrium karsinogenезisinde *PTEN* inaktivasyonunun erken dönemde karşımıza çıkabilecek bir durum olduğu düşünülmektedir.

DNA Metiltransferaz (DNMT) enzimleri tarafından katalizlenmektedir. DNMT'ler genellikle CpG adacıklarındaki sitozinin beşinci karbon atomuna bir metil grubu bağlamaktadır. CpG adacıkları genlerin özellikle promotör bölgelerinde bulunan korunmuş dizilerdir. Tümör baskılayıcı genlerin promotör bölgelerindeki DNA dizilerinin hipermetilasyonu ile genlerin ifadesi baskılanmaktadır. Bu nedenle *PTEN* geni promotör metilasyonu ve Endometrium kanseri arasında herhangi bir ilişki olup olmadığını belirlemek için bu çalışma planlanmıştır.

Çalışmamızda *PTEN* geninin promotör bölgesindeki beş CpG adacığının metilasyonunun tespiti için Endometrium kanserli hastaların tümör dokularından elde edilen DNA örneklerine bisülfıt modifikasyonu yapıldıktan sonra, Pyrosekans metodu kullanılmıştır.

PTEN geninin endometrium kanserinin pronozundaki önemini vurgulamak için farklı evrelerdeki endometrium kanserli hastalar ve sağlıklı kontroller seçilerek; aralarındaki *PTEN* geni promotör bölgesi metilasyon farklılığı araştırılmak istenmiştir. Ancak hasta ve kontrol grubunda *PTEN* geni promotöründeki beş CpG adasında metilasyon tespit edilmemiştir. Bakılan bölgedeki metilasyon açısından hem endometrium kanseri evreleri arasında hem de hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı fark görölmemiştir.

Anahtar Kelimeler: Endometrium Kanseri, *PTEN*, DNA Metilasyonu, CpG Adacıkları, Bisülfıt Modifikasyonu

**PROMOTOR METHYLATION OF THE PHOPHOTASIS AND TENSIN
HOMOLOGOUS (*PTEN*) GENE IN ENDOMETRIUM CANCERS**

KEZİBAN KORKMAZ

Erciyes University, Institute of Health Sciences

Medical Genetics Department

Master Thesis, August 2013

Advisor: Doç.Dr. Çetin SAATÇI

ABSTRACT

Endometrium cancer is the most common type of female genital system cancers throughout the world. Nevertheless, despite its frequency, little information is available regarding its molecular mechanism. Currently, there exists no molecular marker routinely in use in clinical practice for endometrium cancer. With the recent understanding and realization that cancer is a genetic disease, studies in this field have gained impetus. With that, the role of genetic factors in the development of endimetrium cancer have also come under scrutiny.

Chief among these factors, a tumor suppressor gene *PTEN*, active in in cell transformation, signal communication trails, DNA reparation and apostosis plays a role. *PTEN* is a gene that actively participates in silencing the DNA methylation levels in epigenetic mechanisms, at the transcription level during tumorigenesis. It is reported that DNA methylation is an important molecular marker of the onset and development of cancer. It is considered here that PTEN inactivation is a situation that can be observed in the early stages endofometrium carsinogenesis. DNA metilation is catalyzed by DNA methyl transferasis (DNMT) enzymes. DNA DNMT's usually connect a methyl group to the fifth carbon atom of the cytosis in the CpG islets. CpG islets are protected series found particularly in the promotor regions of genes.

The expression of genes is suppressed through the hypermetilation of DNA series in the promotor zones of tumor suppressor genes. Thus, this study was planned to investigate whether any relationship can be established between the promotor methylation of the *PTEN* gene and endometrium cancer.

In our study, bisulfite modification was applied on DNA samples obtained from the tissues of patients with endometrium cancer previous to testing by Pyrosequencing method in order to determine the methylation of the five CpG islets in the promotor zone of the *PTEN* gene.

In order to emphasize the importance of the *PTEN* gene in the prognosis of endometrium cancer, patients at differing stages of the disease were selected, along with healthy controls, to study the methylation difference in the *PTEN* gene promotor zone

However, no methylation was found either in the patient or the control groups, in the five CpG islets of the *PTEN* gene promotor. No significant difference could be discerned regarding the various stages of endometrium cancer or among patients and controls as far as methylation in the zone under study is concerned.

Key words: Endometrium cancer, PTEN, DNA Methylation, CpG Islets, Bisulfide Modification

İÇİNDEKİLER

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
ONAY:.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
TEŞEKKÜR.....	iv
KISA ÖZET	v
ABSTRACT.....	vii
İÇİNDEKİLER	ix
KISALTMALAR.....	xiii
TABLO ve ŞEKİL LİSTESİ.....	xiv
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1.Karsinogeneziste Meydana Gelen Başlıca Genetik Değişiklikler.....	4
2.1.1. Büyüme Faktörleri ve Reseptörlerine İlişkin Genlerde Meydana Gelen Değişiklikler	5
2.1.2. Onkogenlerin Aktivasyonu.....	5
2.1.3. Tümör Baskılayıcı Genlerin İnaktivasyonu.....	6
2.1.4. DNA Tamirinde Görev Alan Genlerdeki Değişiklikler	7
2.2. ENDOMETRİUM KANSERİ	7
2.2.1. Epidemiyoloji	7
2.2.2. Klinik.....	9
2.2.3. Risk Faktörleri.....	10
2.2.3.1. Uzun süreli karşılanmamış östrojene maruz kalma	10
2.2.3.2. Endometrial Hiperplazi	10
2.2.3.3. Obezite.....	11
2.2.3.4. Erken Menarş - Geç Menopoz.....	11
2.2.3.5. Nulliparite.....	11
2.2.3.6. Diyabet	11
2.2.3.7. Polikistik over sendromu - hormon salgılayan tümörler	12
2.2.3.8. Radyoterapi.....	12
2.2.3.9. Eksojen Östrojen	12
2.2.3.10. Sigara.....	12
2.2.3.11. Oral kontraseptif kullanımı.....	13
2.2.3.12. Heredite ve aile öyküsü	13
2.2.3.13. Tamoxifen.....	13
2.2.4. SEMPTOMLAR.....	13

2.2.5. Patoloji	14
2.2.5.1. Yayılım.....	14
2.2.5.1.1. Lokal yayılım:.....	14
2.2.5.1.2. Lenfatik Yayılım:.....	14
2.2.5.1.3. Hematojen Yayılım:.....	14
2.2.5.1.4. Peritoneal yayılım:	14
2.2.6. Evreleme.....	14
2.2.6.1. Klinik Evreleme:	15
2.2.6.2. Cerrahi Evreleme:.....	16
2.2.6.2.1. Endometriyum Karsinomunda 1988-FIGO Cerrahi Evrelemesi	16
2.2.6.3. Endometriyum Karsinomunda FIGO'nun Grade Tanımlaması-1989	16
2.2.7. Endometriyal Karsinomda Prognostik Faktörler	17
2.2.7.1. Yaş.....	17
2.2.7.2. Irk	17
2.2.7.3. Histolojik tip:.....	18
2.2.7.4. Histolojik grade:	18
2.2.7.5. Myometrial invazyon:	18
2.2.7.6. Lenfo-vasküler alan invazyonu:	18
2.2.7.7. İstmus-serviks yayılımı	18
2.2.7.8. Adneksiyal tutulum:	18
2.2.7.9. Lenf nodu metastazı:	18
2.2.7.10. İntraperitoneal tümör:	19
2.2.7.11. Tümör büyüklüğü:	19
2.2.7.12. Periton sitolojisi:.....	19
2.2.7.13. Hormon reseptör yapısı:	19
2.2.7.14. DNA ploidi / Proliferatif index:.....	19
2.2.7.15. Genetik/moleküler tümör markırları:.....	19
2.3. EPİGENETİK FAKTÖRLER.....	20
2.3.1. Histon Değişimleri	23
2.3.1.1. Histon Asetilasyonu:	25
2.3.1.2. Histonların deasetillenmesi	25
2.3.1.3. Histonların metillenmesi	25
2.3.1.4. Histonların fosforillenmesi.....	25
2.4. RNA ile indüklenen sessizleşme (RNA-induced silencing):	26

2.5. DNA METİLLENMESİ.....	27
2.5.1. DNA Metiltransferazlar (DNMT)	30
2.5.1.1. DNMT1	31
2.5.1.2. DNMT2	32
2.5.1.3. DNMT3	32
2.5.1.3.1. DNMT3a ve DNMT3b:	32
2.5.1.3.2. DNMT3L	33
2.5.2. GENOMDA SİTOZİN METİLASYONUNUN ÖNEMLİ OLDUĞU BÖLGELER.....	33
2.5.2.1. CpG ADACIKLARI.....	34
2.5.2.3. CpG Sıcak Noktaları.....	35
2.5.3. DNA Metilasyonunun Görev Aldığı Biyolojik Düzenlemeler.....	36
2.5.3.1. DNA Metilasyonu Ve Gen Regülasyonu	37
2.5.3.1.1. Metil-CpG Bağlayan Proteinler (MBD) ve Histon Deasetilazlar (HDAC).....	39
2.5.4. DNA Metilasyonu ve Kanser	42
2.5.5. Hipometilasyon/Hipermetilasyon.....	45
2.5.5.1. DNA'nın Hipometilasyonu.....	46
2.5.5.2. DNA Hipermetilasyonu.....	47
2.6. FOSFATAZ VE TENSİN HOMOLOG.....	49
2.6.1. Yapısı	49
2.6.2. Fonksiyonu	50
2.6.3. PTEN'in İnaktivasyonu	53
2.6.4. Tümörlerde Pten Anormallikleri	54
2.6.5. Pten Tümör Baskılayıcı Geninin Hipermetilasyonu.....	54
2.7. KANSERİN ERKEN TANISINDA DNA METİLASYONU	55
2.8. METİLASYONU BELİRLEMEDE KULLANILAN YÖNTEMLER.....	55
2.8.1. Southern Blot.....	55
2.8.2. Mikroarray.....	56
2.8.3. Restriksiyon Enzim PZR	56
2.8.4. Metilasyon Özgül PZR (MS-PZR).....	56
2.8.5. Metilasyona-Hassas Tek Nükleotid Primer Uzaması.....	58
2.8.6. Bisülfid DNA Dizi Analizi.....	58
3. GEREÇ VE YÖNTEM	61
3.1. GEREÇLER	61
3.1.1. Demirbaş Malzemeler	61

3.1.2.Sarf Malzemeleri	62
3.2. YÖNTEM.....	62
3.2.1. Doku Kesiti Alınması (Mikrotom Cihazı).....	62
3.2.2. Genomik DNA İzolasyonu.....	63
3.2.2.1. Prosedür:.....	63
3.2.3. Genomik DNA'ya Bisulfit Uygulanması	64
3.2.3.1. Prosedür:.....	64
3.2.4. Bisülfittenmiş DNA'nın Temizlenmesi.....	65
3.2.4.1. Prosedür:.....	65
3.2.5. PZR.....	66
3.2.6. PZR Ürünlerinin Streptavidin Sepharose Yüksek Performans Boncuklarıyla Immobilizasyonu	67
3.2.7. PyroMark Q96'daki Örneklerin Pyrosekans Analizine Hazır Hale Getirilmesi	68
4.BULGULAR.....	69
4.1. PYROSEKANS BULGULARI	69
5. TARTIŞMA	1
6.KAYNAKLAR	75
ÖZGEÇMİŞ	83

KISALTMALAR

PTEN	: fosfataz ve tensin homolog
DNMT	: DNA metiltransferaz
FIGO	: international federation of gynecology and obstetrics
SAM	: S-adenozil metiyonindeki
5mC	: 5-metil sitozin
SAH	: S-adenozil homosistein
LINE	: long interspersed repetitive elements
SINE	: short interspersed repetitive elements
HDAC	: Histon Deasetilaz
DMAP1	: (DNMT1–Associated Protein)
HMTASE	: histon metiltransferaz
TAF	: Trans-activating faktörler
HAT	: histon asetil transferazlarını
MBD	: metil-binding domain
ENCODE	: Encyclopedia of DNA Elements
PI3K	: fosfoinositol 3-kinaz
PIP3	: fosfotidil inositol trifosfatı
PKB	: Protein Kinaz B
PIP2	: fosfotidil inozitol bifosfatı
PZR	: polimeraz zincir reaksiyonu
MSP	: Metilasyona Spesifik PZR
ERK	: Extracellular signal-Regulated Kinase

TABLO ve ŞEKİL LİSTESİ

Tablo 2.1.	Klinik Evreleme	15
Tablo 2.2.	Cerrahi Evreleme.....	16
Şekil 2.1.	Tümör baskılayıcı gen inaktivasyonunda rol oynayan Knudson'ın çift vuruş hipotezi	6
Şekil 2.2.	Sağlıklı Endometrium Görünüşü	9
Şekil 2.3.	Endometrium Kanseri Görünüşü	9
Şekil 2.4.	Gen ekspresyonunda epigenetik regülasyon.....	22
Şekil 2.5.	Epigenetik Mekanizmalar.....	22
Şekil 2.6.	Histon oktameri ve nükleozom yapısı	23
Şekil 2.7.	Paketlenme ile kromozom oluşumu	24
Şekil 2.8.	Yazılımsal olarak etkin ve etkin olmayan kromozomal yapı	26
Şekil 2.9.	SAM üretimi için gerekli olan enzimatik reaksiyonların şematik gösterimi	28
Şekil 2.10.	DNA metilasyon mekanizması	29
Şekil 2.11.	DNMT1	32
Şekil 2.12.	DNMT'lerin DNA Metilasyon mekanizmaları	33
Şekil 2.13.	Promotör bölgesinde metile ve unmetile durum.....	37
Şekil 2.14.	Metilasyonun transkripsiyonu etkileme mekanizması.....	40
Şekil 2.15.	DNA metilasyonunun transkripsiyonel represyona neden olmasına ilişkin önerilen mekanizma.....	41
Şekil 2.16.	Metilasyon-Tümör Baskılayıcı Gen İlişkisi.....	43
Şekil 2.17.	DNA Metilasyonundaki biyokimyasal yollar	44
Şekil 2.18.	DNA Metilasyonu ve Kanseri	46
Şekil 2.19.	Kansere neden olabilen DNA metilasyonunun dört farklı mekanizması	49
Şekil 2.20.	PTEN yapısı ve domainleri	50
Şekil 2.21.	PTEN/PI3K/Akt yolağı.....	51
Şekil 2.22.	Metilasyon Özgül primer dizaynı	57
Şekil 2.23.	Metilasyon Özgül PZR	58
Şekil 2.24.	Bisülfid modifikasyonu	59
Şekil 3.1.	Çalışma yöntemimize ait genel bakış	63
Şekil 4.1.	Hasta ve kontrol grubunun PTEN metilasyon görüntüsü	69
Şekil 4.2.	Metile kontrol DNA görüntüsü	70
Şekil 4.3.	Yarı-Metile kontrol DNA görüntüsü	70

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Jinekolojik ve over kanserler kadının genital organlarının maling hastalıklarıdır. Bu grupta başlıca endometrium ve serviks kanserleri yer alır (1). Endometrium kanser, rahim içi dokudan köken alır. Hastaların çoğunda erken evre ve düşük grade endometrium kanseri görülmektedir. Rahim kanseri genel olarak iki grupta sınıflandırılır. Tip I östrojen fazlalığı, obezite, hormon reseptör pozitifliği ile ilişkili iken, Tip II ise sıklıkla yaşlılarda ve obez olmayan kadınlarda görülen seröz tümörlerdir (2).

Endometrium kanseri esas olarak postmenopozal kadınlarda görülen ve yaş arttıkça ilerleyişi hızlanan bir hastalıktır (1, 3). Endometrioid adenokarsinom en sık görülen tipidir. Hastalığın evresi sağ kalımı etkileyen en önemli etkidir. (1). Son yıllarda beklenen hayat süresindeki uzama, postmenopozal hormon tedavisi, servikal karsinomlarda erken tanı yapılabilmesi ve östrojen benzer etkileri olan ilaçların kullanımında artışa bağlı olarak insidansında gerçek ve rölatif anlamda artış kaçınılmaz olmuştur (3).

Meme, kolon ve akciğer kanserlerinden sonra en sık görülen dördüncü kanser olduğu bildirilmektedir (1, 4). Ülkemizde insidansını yansıtabilecek güvenilir istatistiksel veriler olmamakla birlikte, Türkiye Sağlık İstatistikleri 2006 yılı verilerine göre endometrium kanser ikinci sıklıkla görülen kadın genital sistem karsinomudur (5, 6). Bu kadar sık görülmesine rağmen endometrium kanserinin moleküler mekanizması henüz tam olarak anlaşılamamıştır (7-12).

Son yıllarda kanserin genetik bir hastalık olduğunun anlaşılması ile birlikte kanser genetiği ile ilgili çalışmalar hız kazanmıştır. Endometrium kanserinin gelişiminde çeşitli genetik faktörlerin rol oynadığı bilinmesine rağmen, günümüzde endometrium kanseri için rutin klinik kullanımda olan moleküler bir belirteç yoktur (4). Kanser hücrelerinde genetik değişiklikler yapan moleküler belirteçlerin saptanmasının erken tanı, sağ kalım ve nüksü belirlemede yol gösterici olabileceği düşüncesi bu yüksek lisans projesini ortaya çıkarmıştır.

Endometrium kanserinin gelişiminde rol alan faktörlerin başında, tümör baskılayıcı bir gen olan *PTEN* gelmektedir. Bu gen hücre döngüsünde, sinyal iletim yolunda, DNA tamiri ve apoptozisde görev alır (13).

Tümör baskılayıcı genler kanser hücrelerinde mutasyon ya da delesyon ile inaktive olabilmesine rağmen promotör bölgeleri içindeki CpG adacıklarının anormal metilasyonunu kapsayan epigenetik mekanizmalar genin sessizleşmesine katkı sağlar (14). Bu yüzden tümörögenesis boyunca *PTEN* ekspresyonunun azalmasında epigenetik bir mekanizmanın sorumlu olduğu fikrini oluşturmuştur (15).

Tümörögenesis boyunca epigenetik mekanizmalardan DNA metilasyonu *PTEN* seviyesinin transkripsiyon düzeyinde sessizleşmesinde etkin rol alır (16). DNA metilasyonunun, kanserin başlangıcı ve gelişimi ile ilişkili önemli bir moleküler belirteç olduğu bildirilmektedir. Endometrium karsinogenezinde *PTEN* inaktivasyonunun erken dönemde karşımıza çıkabilecek bir durum olduğu düşünülmektedir (4).

DNA metilasyonu, DNMT enzimleri tarafından katalizlenmekte ve DNA genellikle CpG bölgelerindeki sitozinden metillenmektedir (17). Erken tanı olanağı sağlayabilmesi, kanserin sınıflandırılması, prognozu ve tedavisi ile ilgili olarak yol gösterici olabilmesi nedeniyle metilasyon, kanser araştırmalarında önemli bir yere sahiptir (18). DNA metilasyonu ve kanser arasındaki ilişki ilk kez 1983 yılında ortaya çıkartılmış. Kanser hücrelerinde gene özgül hipermetilasyonlar görülmektedir. Hipermetilasyon, genellikle CpG adacıklarında meydana gelmekte, kromatin yapısını değiştirerek gen ifadesini baskılamaktadır (17). Tümör baskılayıcı genlerin özellikle promotör bölgelerindeki metilasyon, transkripsiyon faktörlerinin tanıma bölgelerinde değişiklikler meydana getirerek bu faktörlerin bağlanmasını engellemekte ve bu şekilde gen ifadesinin baskılanmasında rol oynamaktadır (17, 19). *PTEN* gibi tümör baskılayıcı genlerin promotor bölgelerindeki hipermetilasyon ile bu genlerin ifadesi

baskılanmaktadır. Bu durum kanser hücrelerine büyüme ve çoğalma avantajı sağlamakta, metastazı kolaylaştırmaktadır (17).

Aşırı metillenmiş genler kanserin moleküler patogeneğinde yer aldığı ve tümör oluşumundaki erken moleküler değışikliklerden biri olduğu için metillenmiş olan bu genlerin tanımlanması kanserin tanımlanması ve izlenmesinde önemli bir hedef olmuştur (20).

Bu çalışma ile endometrium kanser vakalarının evreleri arasındaki *PTEN* geni promotör bölgesindeki metilasyon farklılığı araştırılmak istenmektedir. Bu çalışmanın sonuçlanması ile birlikte söz konusu kanserin evrelendirmesinde *PTEN* geni promotör bölgesindeki metilasyon analizinin önemi araştırılmış olacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

Kanser, normal hücrelerin çoğalma, hayatta kalma, büyüme gibi yaşamsal işlevlerinin kontrol edilememesi sonucu ortaya çıkar (20). Tümör hücreleri, hızlı ve sınırsız çoğalabilen, çevre dokuya yayılabilen ve özgün mikroçevresinden bağımsız olarak yaşamını devam ettirerek metastatik özellik kazanabilen hücrelerdir. Tümör hücreleri bu özelliklerini hücrenin, canlılığını devam ettirebilmesi, büyümesi ve farklılaşması gibi biyolojik olayları etkileyen pek çok mutasyonun birikmesi sonucu, genetik yapılarının değişmesi ile kazanmaktadır (21). Onkogenlerin aktivasyonu ve tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu tümör gelişimi için anahtar mekanizmalar olarak kabul edilmektedir. Ayrıca tümör gelişimi; çok aşamalı hücresel onkogeneze, telomeraz reaktivasyonu gibi ölümsüzlük için gerekli olan ilave değişiklikleri de kapsar (9).

2.1.Karsinogenezi Meydana Gelen Başlıca Genetik Değişiklikler

Normal bir hücrenin yaşamsal fonksiyonunda rol oynayan genlerdeki değişiklikler karsinogeneze neden olmaktadır. Bu değişiklikler belirli başlıklar altında toplandığı zaman aşağıdaki gibi sıralanabilmektedir (21);

- Büyüme faktörleri ve reseptörlerine ilişkin genlerde meydana gelen değişiklikler
- Onkogenlerin aktivasyonu
- Tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu
- Hücre siklusunun düzenlenmesinde ve kontrolünde görev alan genlerdeki değişiklikler
- DNA tamirinde görev alan genlerdeki değişiklikler
- Epigenetik mekanizmalar ve imprinting

2.1.1. Büyüme Faktörleri ve Reseptörlerine İlişkin Genlerde Meydana Gelen Değişiklikler

Pek çok büyüme faktörü ve reseptörü birçok farklı tümör hücresi ve normal hücreler tarafından eksprese edilmektedirler (21). Bu büyüme faktörleri otokrin ve parakrin yollarla tümör gelişiminde rol oynamaktadırlar (22). Eğer bir tümör hücresi, hem büyüme faktörü hem de onun reseptörünü taşıyorsa, kendisini uyaran büyüme halkasına sahip demektir. Buna ‘Otokrin Büyüme Halkası’ denir. Normal hücrelerde otokrin büyüme halkası belirli düzenleyici sistemler tarafından kontrol edilirken, kanser hücrelerinde bu denge bozulmuştur. Ancak tek bir büyüme faktörü değil pek çok büyüme faktörü ve reseptörü karsinogenezi birlikte etki gösterirler. İnvazyon ve metastazın da bu büyüme faktörleri ve reseptörlerinin etkileşimi sonucunda ortaya çıktığı kabul edilmektedir (21, 22).

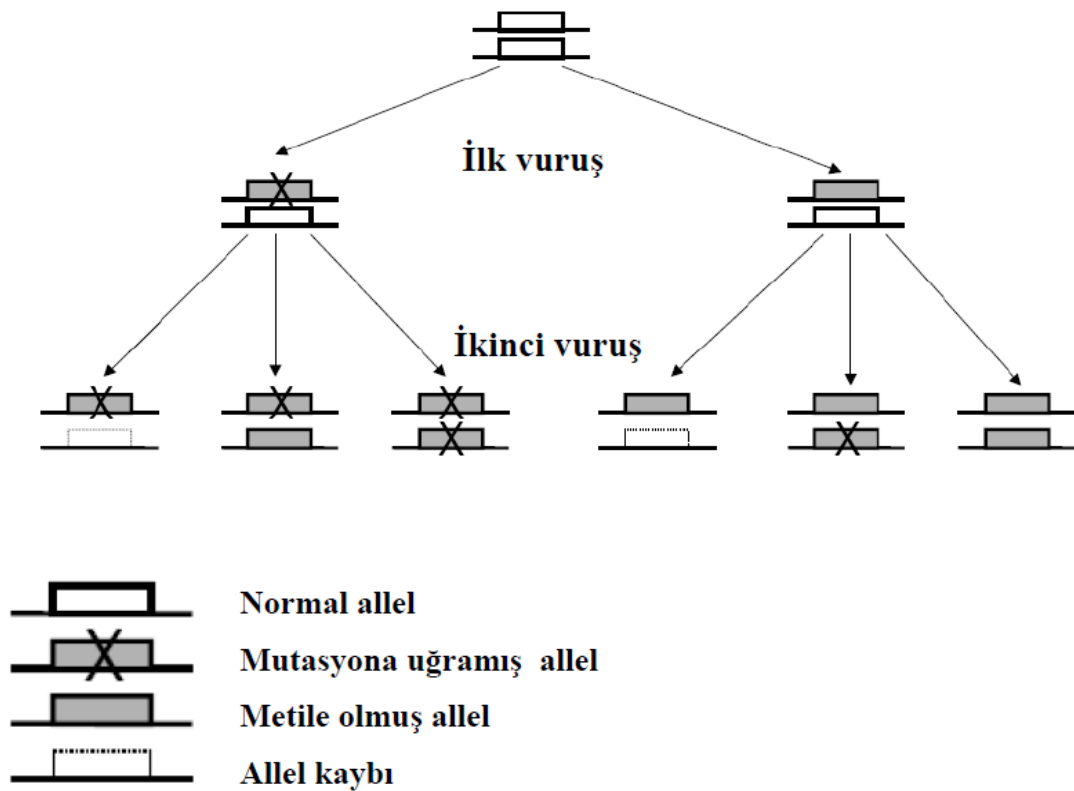
2.1.2. Onkogenlerin Aktivasyonu

Huebner ve Tadora 1968 yılında ilk olarak kanser gelişiminde onkogenlerin rolünün olabileceğini ileri sürmüşlerdir (21, 23). Protoonkogenler; nükleer transkripsiyon faktörleri, hücre siklusunu kontrol eden proteinler, büyüme faktörleri, hormonlar ve reseptörlerinin regülasyonunda önemli rol oynayan genler olup, yapılarında meydana gelen genetik değişiklikler sonucunda, aktivasyon kazanırlar. Genetik değişiklikler sıklıkla nokta mutasyonları sonucunda oluşmaktadır ve bu durum onkogen ürünü proteinde yapısal değişikliklere neden olup, protein ekspresyonunu etkilemektedir (21).

Onkogenik aktivasyonda rol oynayan mekanizmalardan ikincisi ise kromozomal translokasyonlar olup genel olarak iki farklı yolla onkogenik aktivasyona neden olurlar (24). Bu translokasyonların bir tipinde, translokasyon sonucu yer değiştiren genin yapısı değişmeden, fakat yeni yerleştiği yerdeki genin promotörü tarafından sürekli ve kontrolsüz protein sentezinin eksprese edilebilir hale gelmesidir ve sonucunda onkogenik protein ürününün aşırı ekspresyonu sözkonusudur (21). Diğer tip translokasyonda ise, genin yapısı değişerek füzyon gen oluşmakta, bu gen ürünü füzyon protein karsinogeneziye neden olmaktadır.

2.1.3. Tümör Baskılayıcı Genlerin İnaktivasyonu

Tümör baskılayıcı genlerin ürünleri normalde hücre siklusunu kontrol ederek veya hasarlı hücreleri apoptozise yönlendirerek hücre proliferasyonunu inhibe etmektedirler. Bu yüzden bu genler tümör ve metastaz gelişimini engellemektedirler (21, 24). Karsinogenezisteki Knudson'ın klasik 'çift vuruş' hipotezine göre, tümör baskılayıcı genin her iki kopyasının kaybı neoplastik hücrelerin gelişimi için gerekli normal hücresel fonksiyonların kaybına neden olmaktadır. (21, 25). Bu modele göre, ailesel geçiş gösteren kanserlerde ilk vuruş parental eşey hücrelerinde tümör baskılayıcı genin bir allelinin mutasyona uğraması, ikinci vuruş ise diğer allelin farklı genetik mekanizmalar ile somatik mutasyonudur (21). Sporadik kanserlerde ise tümör baskılayıcı genin her iki allelinde iki farklı mutasyon meydana gelmesi, tümör baskılayıcı gen kaybına neden olmaktadır (25). Çift Vuruş hipotezi Şekil 1'de şematik olarak gösterilmektedir.



Şekil 2.1.Tümör baskılayıcı gen inaktivasyonunda rol oynayan Knudson'ın çift vuruş hipotezi (21) 2007:5.

2.1.4. DNA Tamirinde Görev Alan Genlerdeki Değişiklikler

Gerek endojen gerekse ekzojen karsinojenler hücre siklusunda yavaşlamaya neden olmaktadır. Normal koşullarda bu yavaşlama sürecinde hücreler, DNA hasarını tamir etme fırsatı bulmaktadırlar. Eğer DNA hasarı tamir edilmezse, hücre ya apoptozise uğrar ya da hasarlı DNA'yı içeren hücre bölünmeye devam ederek mutasyon birikimine ve dolayısıyla karsinogeneze neden olur (21).

DNA hasar tamir geni olan *MLH1* metilasyonu (44) ve *hMSH6*'da mutasyon taşıyan kadınlarda da endometriyal kanser geliştirme riski yükselir (20).

2.2. ENDOMETRİUM KANSERİ

2.2.1. Epidemiyoloji

Endometrium kanseri kadın genital sistem hastalıkları içinde en sıklıkla karşılaşılan kanserlerden biridir (7, 12, 26-28). Kanser gelişim süreci boyunca genetik defektler birikir ve hücrel homeostaziye regüle eden birçok hücre içi yollarının değişen aktivitesi gözlenir (28). *PTEN* hücre döngüsünü G1 fazında durdurarak hücreyi apoptozise yönlendirir (26). Şekil 2'de sağlıklı bir endometrium, Şekil 3'te ise endometrium kanser gelişmiş rahim gösterilmektedir.

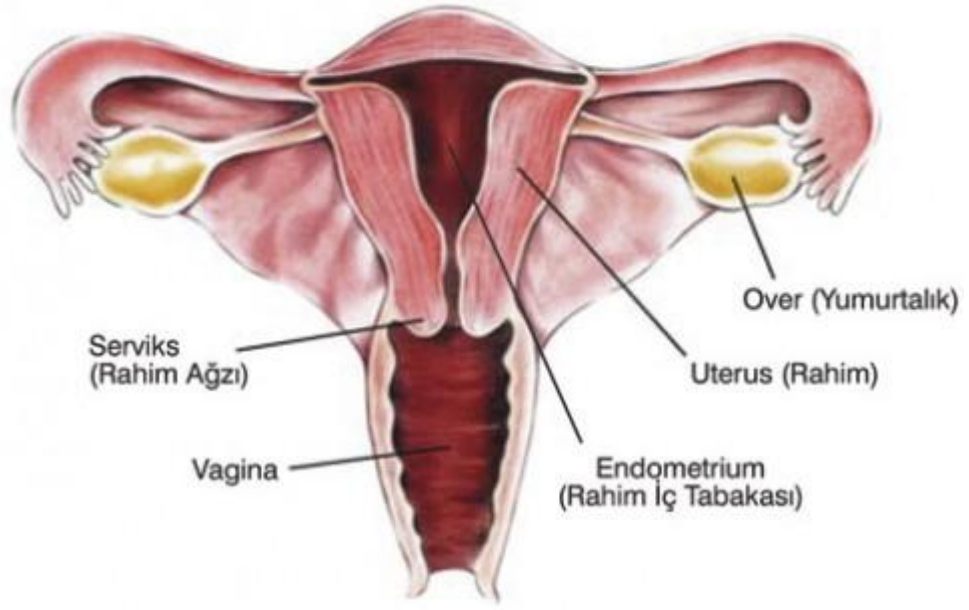
40 yaşın altında nadir görülen, en sık 55-64 yaş arasında ortaya çıkan ve ortalama yaşın 60 olduğu hastalığın sıklığı etnik gruplara ve ülkelere göre değişir. Bir kadının hayatı boyunca endometrium kanserine yakalanma riski beyazlarda %2.7, zencilerde %1.6'dır (6, 9).

1969'li yıllardan sonra gelişmiş ülkelerin yayınlarında, bu ülkelerde en sık görülen kadın genital sistem kanseri haline geldiği bildirilmektedir (1, 5, 29). Amerika Birleşik Devletleri'nde kadınlarda görülen tüm jinekolojik kanserlerin yarısına yakını oluşturmaktadır (1). Birleşik Devletlerde ve Batı ülkelerinde, kadın genital sisteminin en sık izlenen tümörü endometrium karsinomudur (9). İnsidansı coğrafik olarak değişkenlik göstermekte olup Asya'da, Afrika ülkelerinde ve Japonya'da Avrupa, Kuzey Amerika ülkelerinden 4-5 kez daha düşüktür (1). Japonya'da ikinci en sık rastlanan kanserdir (10). Ülkemizde ise insidansı yansıtabilecek güvenilir istatistiksel veriler olmamakla birlikte, Türkiye Sağlık İstatistikleri 2006 yılı verilerine göre endometrium kanseri ikinci sıklıkla görülen kadın genital sistem karsinomudur (5, 6).

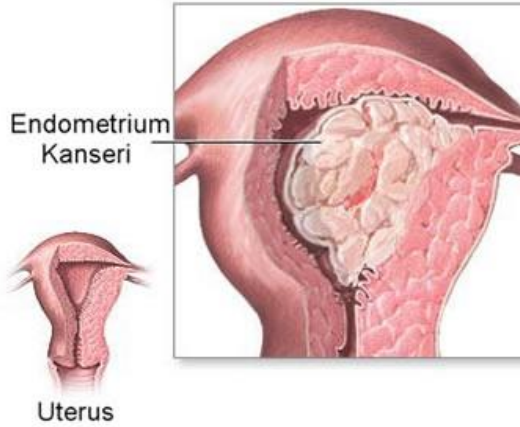
Endometriyum karsinomu, kadınlarda akciğer, meme ve barsak kanserlerinden sonra dördüncü en sık görülen tümördür (5, 6). Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan çalışmalara göre her yıl 49.500 yeni olguya tanı konmakta (30, 31) ve 8200'den fazla kadının endometriyum karsinomundan öldüğü bildirilmektedir (2). Yüksek insidansına karşılık, ölüme neden olan kanserler arasında alt sıralarda yer almaktadır. Kadındaki tüm kanser ölümlerinin % 1.3'ünden sorumludur (5, 29). ABD'de kanser ölümlerinin sekizinci en sık nedenidir. Türkiye Kanser İstatistikleri verilerine göre kanser ölümlerinin yedinci en sık nedenidir (5).

Bu kadar sık görülmesine rağmen endometrium kanserinin moleküler mekanizması henüz tam olarak anlaşılamamıştır (7-10, 12). Endometrium kanserin moleküler genetiği hakkındaki bilinenler *PTEN*, *K-RAS*, *CTNNB1* (β - *catenin*) ve *TP53* gibi genlerdeki mutasyonların keşfi ile artmıştır (8, 20). Son yıllarda özellikle DNA tamirinde görev alan genler ile hücresel proliferasyondan sorumlu bazı genlerin endometrial karsinogeneze önemli olduğu düşünülmektedir. Bu risk faktörlerinden bazıları artmış östrojen uyarısına işaret eder. Gerçekten de süreye ve doza bağlı olarak, uzun süreli östrojen replasman tedavisi ve östrojen salgılayan over tümörleri (granüloza hücreleri) endometrium kanseri riskini arttırmaktadır. Karsinom sıklıkla endometrial hiperplazi zemininden gelişir. Bu tümörlerin büyük bir bölümü, köken aldığı endometrial yapılara benzeyen adenokarsinomlardır (9).

Obezite, beslenme şekli, hipertansiyon, diyabet (27), nulliparite (doğum yapmamışlık) sık görülen risk faktörleridir (9).



Şekil 2.2. Sağlıklı Endometrium Görünüşü (32)



Şekil 2.3. Endometrium Kanseri Görünüşü (33)

2.2.2. Klinik

Olguların çoğu anormal vajinal kanama nedeniyle erken evrede tanınır (1, 34, 35). Bunlar çoğunlukla postmenopozal kanama şeklindedir. Anormal vaginal kanama ile kliniğe başvuran endometrial hiperplazili olgular %25 oranında iyi diferansiye endometrial adeno karsinomlar ile birliktelik göstermeleri nedeniyle önem taşımaktadırlar (1, 35).

2.2.3. Risk Faktörleri

2.2.3.1. Uzun süreli karşılanmamış östrojene maruz kalma

Patogenetik olarak endometriyum kanserinin iki farklı tipinin olduğu ileri sürülmektedir. En sık rastlanan tipi endojen ya da eksojen karşılanmamış östrojene maruz kalma öyküsü olan daha genç perimenopozal kadınlarda görülmektedir (1, 5, 6, 29). Karşılanmamış östrojen eksojen olabileceği gibi endojen de olabilir (1, 5, 6). Karşılanmamış östrojen genetik bozuklukların birikmesine ve hücre proliferasyonuna yol açar. Bu durum endometriumda malign bozuklukların ortaya çıkması ile sonuçlanır (8). Kadınlarda tümör hiperplazik endometrium olarak başlamakta ve kansere ilerlemektedir (1, 5).

Diğer endometrium karsinomu tipi, endometriumu stimüle edecek östrojen kaynağı bulunmayan kadınlarda ortaya çıkmaktadır. Kendiliğinden oluşan bu kanserler patolojik olarak endometrial hiperplazi ile birlikte değildir (1, 5, 6, 29).

Menopoza genç bir yaşta girilmesi ve östrojen replasman tedavisinin verilmesiyle endometriyum daha uzun bir süre eksojen östrojen stimülasyonuna maruz kalır. Karşılıksız östrojenin iki yıldan fazla kullanılmasıyla endometriyum kanser gelişme riski 2-3 kat artmaktadır (1, 5, 6).

Kültüre endometrial stromal hücrelerin progesteron ile tedavisinin PTEN seviyesini baskıladığı gözlenmiştir. Hücre içinde estradiol PTEN fosforilasyonunu başlatır. Bu yüzden endometrial kanserin gelişmesi ve ilerlemesinde PTEN şiddetle gerekmektedir (8).

2.2.3.2. Endometrial Hiperplazi

Endometrial hiperplazi, hafif proliferasyondan karsinom başlamasına kadar sıralanan endometrial anormallikleri ifade eder (36).

Endometrial adenokarsinomlarda, normal endometrium ve belign hiperplaziler arasında ara derecede olan erken lezyonlarda bile dolaysız öncül lezyonlar olduğu düşünülen kompleks atipik hiperplazilerin %30'unda PTEN değişiklikleri gözlenir (37).

2.2.3.3. Obezite

Çeşitli analizler açıklamaktadır ki, tüm risk faktörleri arasında sadece obezite endometriyum karsinomu olgularında gerçek risk faktörü olarak gösterilebilir. Wynder ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada; 21-50 pound (10-13 kg) fazla kilosu olan kadınlarda endometrium karsinomu riski 3 kat, 50 pound ve üzerinde fazla kilosu olanlarda risk 9-10 kat artmıştır (5, 6). Onsrud ve arkadaşları, ideal kilosunun % 30 fazlası bulunan kadınlarda prognozun daha kötü olduğunu göstermişlerdir (5).

2.2.3.4. Erken Menarş - Geç Menopoz

İleriye dönük yapılan çalışmalarla ortalama menopoz yaşı 50-52 olarak tespit edilmiştir (5, 6). Kaplan ve Cole yaptıkları epidemiyolojik bir çalışmada; 52 yaşından sonra menopoza giren kadınlarda, 49 yaşından önce menopoza girenlere oranla endometriyum karsinomu riskinin 2.4 kat arttığını göstermişlerdir (3, 58). Bu durum, endometriyal kavitenin daha uzun süre östrojen ile uyarılması sonucunu doğurur. Ayrıca bazı çalışmalarda 12 yaşından önce menarş olanlarda, endometriyum kanseri riskinin 1.6 kat arttığı bulunmuştur (5, 6).

2.2.3.5. Nulliparite

Nulliparlarda daha çok anovulasyonun olması risk artışının olası nedenidir. Gebelik esnasında progesteronun yüksek düzeyde seyretmesi östrojeni dengelemesi ve endometriyumu proliferatif etkiden uzak tutması sonucu gebelik sayısı arttıkça endometriyum kanseri sıklığının düşmesi beklenebilir. Eğer gebe kalmamış kadında neden infertilite ise ve bu nedenle medikal tedavi uygulanmış ise risk yaklaşık 8 kat artmaktadır. Son doğumdaki geç yaşın endometrium kanserin görülme riskini azalttığı gösterilmiştir (5). Parazzini ve ark. 567 hastada yaptıkları çalışma ile de 35 yaş ve üzerinde son doğumunu yapan kadınlarda rölatif risk 0.5 olarak bulunmuştur (3, 59).

2.2.3.6. Diyabet

Frick ve ark. hastaların % 5-41'inde anormal glukoz toleransı saptamıştır. Kaplan ve Cole sosyo-ekonomik durum, yaş ve ağırlık için düzeltme yaptıktan sonra diyabeti olanlar için endometriyum kanseri açısından rölatif risk oranını 2.8 olarak bildirmişlerdir (5, 6, 38). Diyabeti olan yaşlı kadınlarda risk artmaktadır (5, 6).

2.2.3.7. Polikistik over sendromu - hormon salgılayan tümörler

Artmış endojen östrojen seviyelerine sahip kadınlar artmış endometriyal kanser riskine sahiptir (5, 6). İlk olarak sendromun tanımlanmasından 14 yıl sonra endometriyum kanseri riski ile arasındaki ilişki ortaya konmuş, sonrasında yapılan birçok çalışma ise bu ilişkiyi destekler yönde olmuştur (5, 40). Premenopozal kadınlardan oluşan bir grupta polikistik over sendrom ile endometriyum kanseri birlikteliği %30 oranında saptanmıştır (5).

2.2.3.8. Radyoterapi

Endometriyal kanser gelişiminde nadir predispozan faktörlerden birisi pelvik radyasyondur. Önceleri radyoterapinin kanser riskini arttırdığı söylenirken, son zamanlarda bu düşünceden uzaklaşmıştır (5, 6).

2.2.3.9. Eksojen Östrojen

Günümüze kadar yapılan olgu-kontrol ve aynı yaştaki bir grup insanın bir arada bulunduğu çalışmalarda incelenen progesteron ile karşılanmamış östrojen tedavisi alan kadınlarda endometriyal kanser görülme sıklığı hiç replasman tedavisi almayanlara göre 1.4 ile 10 kat oranında artış göstermektedir (5, 41). Grady ve ark. 5 yıla kadar kullanılan östrojen tedavisi ile endometriyum kanseri riskinin 2.3 kat, tedavi süresi 10 yılı aştığında ise yaklaşık 10 kat arttığını ve tedavinin kesilmesini izleyen 5 yıl ve üzerinde halen yüksek kaldığını tespit etmişlerdir (5, 6).

Östrojenin karsinojenik etkisi mitotik aktiviteyi hızlandırmasının sonucudur (6). Endometriyum hücrelerindeki DNA çeşitli karsinojenik uyarılar ile bozulmaya adaydır. Ancak bu DNA bozulması genellikle süratle tamir edilir ve östrojen etkisi ile hücre bölünmesi yani DNA replikasyonu hızlanır. Bu bölünme DNA'nın tamir hızını aşarsa DNA'da meydana gelmiş bu mutasyonlar stabil bir hale gelir ve replikasyonla devamlı şekilde kopyalanır. Buna ilave olarak DNA'nın östrojenik impulsla replikasyonu kendi içinde de kopyalama hataları yani mutasyon potansiyeli taşımaktadır (5).

2.2.3.10. Sigara

Daha önceden sigara içmiş olan kadınlarda endometriyal kanser görülme riski azalmaktadır (1, 5, 6). Bu azalmış riskin olası nedeni, nikotin karaciğerde östrojen metabolizmasını hızlandırması ve yıkımını arttırmasıdır (5, 6). Sigara içen kadınlarda

östrojen seviyesi düşüktür ve erken menopoz görülür. Bu nedenle sigara içenlerde endometrium kanser riskinin azaldığı tespit edilmiştir (1).

2.2.3.11. Oral kontraseptif kullanımı

Gebeliği önlemek amacıyla kullanılan ilaçların endometriyum kanseri riskini azalttığı kesin bir şekilde rapor edilmiştir (5, 6). Birçok olgu kontrollü çalışmada oral kontraseptif kullanımının endometriyal kanser oluşturmadaki azalma oranının %40-50 olduğu tespit edilmiştir (5, 6, 42). Bu koruyucu etki en az 1 yıl kullanıldığında başlar ve bırakıldıktan sonra en az 10 yıl daha devam eder (5, 42).

2.2.3.12. Heredite ve aile öyküsü

Endometriyum karsinomunda heredite ve aile öyküsünün rolü açık değildir (6). Bazı çalışmalar, endometriyal kanser ile aile öyküsü arasında bağlantının görülme riskinde küçük bir artış olduğunu göstermiştir (5). İngiltere'de yapılan çalışmalarda hastaların % 15'inde aile öyküsünün olduğu gösterilmiştir (6). *HNPCC* genlerinde bir mutasyonu olan bir kadında genellikle 50 yaş öncesinde endometriyal kanser görülmektedir. Bu kişilerin hayatları boyunca endometriyal kanser geliştirme riski %22-50'dir. Ailesel Adenokarsinoma Sendromu (Lynch tip II) varlığında hastalar endometriyum karsinomu açısından taranmalı ya da anormal kanama olması halinde vakit geçirmeden değerlendirilmelidir (5, 6).

2.2.3.13. Tamoxifen

Bildirilen 15 çalışma içinde 12'si, meme kanseri tedavisinde kullanılan tamoksifen kullanımı ile arasında hiç ilişki kuramazken, bir tanesinde hastalık insidansı azalmış ve iki çalışmada ise artmış endometriyal kanser insidansına rastlamışlardır. Son olarak National Surgical Adjuvant Breast And Bowel Project, randomize bir çalışma ile tamoxifen kullanımı ile endometriyal karsinoma riskinin yaklaşık 6 kez arttığını ortaya koymuştur (5, 6).

2.2.4. SEMPTOMLAR

Endometrial karsinomu ileri yaşlarda ortaya çıkmaktadır, ortalama yaş 60'tır (1). Yaklaşık % 90 olguda tek yakınma anormal vaginal kanama ve kahverengi sulu bir akıntıdır (et yıkantı suyu) (1, 5). Özellikle yaşlı kadınlarda var olan servikal daralma nedeniyle, kanama olmamakta ve kanlı, pürülan bir akıntı meydana gelmektedir. Bu bulgu sıklıkla kötü prognoz ile birlikte (5).

2.2.5. Patoloji

Endometrium karsinomu sıklıkla fundustan köken alır. Endometrial kavitenin herhangi bir yerinde küçük bir odak şeklinde ya da tüm endometriumu kaplayacak şekilde difüz olarak gelişebilir. Bazen polipoid yapı gösterir. Nadiren polip zemininde gelişir (5).

2.2.5.1. Yayılım

Endometrium karsinomlarının yaklaşık % 50'si endometriumdaki sınırlıdır. % 26'sı yüzeysel ve % 12'si derin myometrial invazyon gösterir. Uterus dışına yayılım oranı ise % 12 olarak bildirilmiştir (3, 5).

2.2.5.1.1. Lokal yayılım:

Tümörün komşu organlara yayılımıdır. Bu yolla myometrium, serviks ve adnekslere yayılım olabilir. İyi diferansiye tümörler genellikle uterus kavitesine doğru büyürken, kötü diferansiye olanlar myometriumu invaze etme eğilimindedir (3, 5).

2.2.5.1.2. Lenfatik Yayılım:

Lenfatik tutulum tümörün histolojik farklılaşma derecesi (grade), myometrial invazyon gibi risk faktörlerinden etkilenmektedir (3, 5). Uterus fundusundaki tümörlerde, hem eksternal iliak lenf nodlarına hem de doğrudan paraaortik lenf nodlarına yayılım söz konusudur (3).

2.2.5.1.3. Hematojen Yayılım:

Hematojen yayılım en sık akciğerlere olmaktadır (% 8.4). Karaciğer, beyin ve kemik metastazları da bu yolla görülebilmektedir (3, 5).

2.2.5.1.4. Peritoneal yayılım:

Tubal orifislerden periton boşluğuna düşen tümör hücrelerinin yayılımda önemli olduğu ve bu nedenle periton sitolojisinin prognostik önemi bulunduğu savunulmaktadır (3, 5).

2.2.6. Evreleme

Tümörün diferansiasyon derecesi grade olarak da bilinmektedir. Endometrial karsinomlarda önemli bir prognostik göstergedir. Derecelendirme histolojik ve nükleer özelliklere göre yapılır. Histolojik grade solid alanların varlığına göre belirlenir.

Nükleer derecelendirme nükleer boyut ve şekil, kromatin dağılımı, nükleolusun boyutuna göre yapılır (34).

Endometrium kanserinde evre; kesin olarak bilinen en önemli prognostik faktördür (1). Günümüzde kullanılmakta olan ve 1988'de yeni düzenlemelerin yapıldığı "International Federation of Gynecology and Obstetrics" (FIGO) evreleme sistemine göre hastalıksız 5 yıllık sağkalım; evre I hastalarda %91, Ib %88 ve Ic %81; evre II hastalarda IIa %76 ve IIb %66; evre III hastalarda IIIa %60, IIIb %41 ve IIIC hastalarda %32; evre IV hastalarda ise IVa %20 ve IVb %5 olarak bildirilmiştir (1).

2.2.6.1. Klinik Evreleme: Endometrium karsinomu evrelemesinde 1988 yılına kadar klinik evreleme kullanılmıştır. Klinik FIGO evrelemesi (1970), standart uterin kavite uzunluğu ve hastalığın uterus dışı ve pelvik yayılımı gibi klinik bulgulara göre yapıldı (3, 5). Tablo 1'de klinik evreleme gösterilmektedir.

Tablo 2.1. Klinik Evreleme (3) 2005:24.

Evre 0:	Karsinoma insitu
Evre I*:	Karsinom korpusta sınırlı
	Ia: Uterin kavite uzunluğu 8 cm veya daha az
	Ib: Uterin kavite uzunluğu 8 cm'den fazla
Evre II:	Karsinom serviks ve korpusu tutmuş ancak uterus dışı yayılım yok
Evre III:	Karsinom uterus dışında fakat küçük pelviste sınırlı
Evre IV:	Küçük pelvis dışına yayılım yada mesane veya rektal mukozal tutulum (büllöz ödem olguyu Evre IV yapmaz)
	IVa: Komşu organ yayılımı
	IVb: Uzak metastaz

*Evre I olgular histolojik grade'e göre alt gruplara ayrılırlar

Cerrahi evreleme sistemi kullanılarak yapılan değerlendirmelerde, kanserden ölenlerden çoğunun klinik Evre 1'deki hastalar olması, klinik evreleme sisteminin değerini azaltmıştır (3, 5). Klinik evreleme ile cerrahi evreleme arasında büyük farklar olmakta ve cerrahi evre genellikle daha yüksek bulunmaktadır. Bu nedenle FIGO, 1988'de cerrahi evreleme sistemini önermiştir (3, 5, 43).

2.2.6.2. Cerrahi Evreleme:

Histerektomi sonrası uterus açılarak intraoperatif olarak tümörün büyüklüğü, myometrial invazyon derinliği ve servikal yayılım değerlendirilmelidir (3, 5). Kuşku tüm lenf nodları, cerrahi evreleme kapsamı içinde çıkarılmalıdır. (5). Tablo 2’de cerrahi evreleme kriterleri özetlenmiştir.

2.2.6.2.1. Endometriyum Karsinomunda 1988-FIGO Cerrahi Evrelemesi

Tablo 2.2. Cerrahi Evreleme (3) 2005:25

Evre Ia	G123	Tümör endometriumda sınırlı
Ib	G123	Myometriumun yarısından azında invazyon
Ic	G123	Myometriumun yarısından fazlasında invazyon
Evre IIa	G123	Endoservikste sadece glandüler tutulum
IIb	G123	Servikal stromal invazyon
Evre IIIa	G123	Serozaya ve/veya adnekslere invazyon ve/veya batın sitolojisi pozitifliği
IIIb	G123	Vajinal metastaz
IIIc	G123	Pelvik ve/veya paraaortik lenf nodu metastazı
Evre IVa	G123	Mesane ve/veya barsak mukozasında tümöral tutulum
IVb	G123	İntraabdominal ve/veya inguinal lenf nodlarını içeren uzak metastaz

2.2.6.3. Endometriyum Karsinomunda FIGO'nun Grade Tanımlaması-1989

Farklılaşmanın histopatolojik derecesi

Grade 1: Nonskuamöz veya nonmorüler solid büyüme şekilleri < % 5

Grade 2: Nonskuamöz veya nonmorüler solid büyüme şekilleri % 5 - 50

Grade 3: Nonskuamöz veya nonmorüler solid büyüme şekilleri > % 50

(3, 5, 34).

2.2.7. Endometriyal Karsinomda Prognostik Faktörler

- 1- Yaş
- 2- Irk
- 3- Histolojik tip
- 4- Histolojik grade
- 5- Myometrial invazyon
- 6- Lenfo-vasküler alan invazyonu
- 7- Isthmus-serviks yayılımı
- 8- Adneksiyal tutulum
- 9- Lenf nodu metastazı
- 10- Intraperitoneal tümör
- 11- Tümör büyüklüğü
- 12- Periton sitolojisi
- 13- Hormon reseptör yapısı
- 14- DNA ploidi / Proliferatif index
- 15- Genetik/moleküler tümör markırları

2.2.7.1. Yaş:

Ortalama görülme yaşı 60'tır bu hastaların %69'i postmenopozal dönemdedir. Yaş arttıkça kötü prognostik faktörlere sahip olma şansı artmaktadır (1, 34). Genelde genç hastalarda daha iyi prognoz ile seyrederken yaşlı hastalarda prognoz kötü seyretmektedir (1, 5, 34).

2.2.7.2. Irk

Beyazlarda siyahlardan daha fazla görülmektedir ancak siyahlarda; daha ileri evre daha yüksek derece ve daha derin myometrial invazyon yapma eğilimi vardır (1, 34). Yaşlı ve siyah ırka mensup hastalar en kötü prognostik özelliklere sahiptir (1).

2.2.7.3. Histolojik tip:

Endometriyal karsinomlu hastalar arasında en sık görülen histolojik tip endometrioid tip adenokarsinomdur (5, 27). Beslenme, hipertansiyon, diyabet, karşılanmamış östrojen ile uyarı ve obezite ile ilişkili bulunmuştur (27). Olguların yaklaşık % 86.4 kadarını oluşturur (5).

2.2.7.4. Histolojik grade:

Prognoz üzerinde çok etkili bir faktördür (1, 5). Hemen her zaman artmış nüks riski ile beraberdir. Grade 3 tümörlü hastalarda nüks gelişme riski, grade 1 ve 2' den 5 kat daha fazladır (3, 54).

2.2.7.5. Myometrial invazyon:

Myometrial invazyon derinliği tümör hacmini en iyi yansıtan parametredir (1). Daha önceki FIGO evrelemelerinde yüzeysel, orta, derin olarak değerlendirilmesine karşın 1988 FIGO evrelemesinin kullanımıyla %50 iç, %50 dış myometrial invazyon olarak değerlendirilmektedir (1, 5).

2.2.7.6. Lenfo-vasküler alan invazyonu:

Lenfovasküler alan invazyonu endometriyum kanseri için nüks ve sağkalım açısından bağımsız prognostik risk faktörüdür (1, 5, 34). Erken evre endometriyum kanserlerinde lenfovasküler alan invazyonu sıklığı yaklaşık %15'dir (3, 54).

2.2.7.7. İstmus-serviks yayılımı:

Tümöral kitle orjininin uterustaki lokalizasyonu önemlidir (5). Serviksin tutulumu FIGO evreleme sisteminde evre II'yi gösterir (1).

2.2.7.8. Adneksiyal tutulum:

Adneksiyal (yumurtalık kökenli) tutulum olan hastaların çoğunda bunları yüksek risk grubuna sokacak diğer kötü prognostik faktörler mevcuttur (1, 34). Endometrium kanserli hastaların sadece %20'sinde yüksek risk olarak adneksiyal tutulum tespit edilmiştir (1).

2.2.7.9. Lenf nodu metastazı:

Klinik olarak erken evre endometrium kanserinde en önemli prognostik faktördür. Lenfatik metastazın olması nüks ihtimalini yaklaşık 6 kat artırır (3, 54).

2.2.7.10. İntraperitoneal tümör:

Intraperitoneal yayılım lenf nodu metastazı ile yüksek düzeyde ilişki gösterir (5). Klinik Evre I hastaların %4-6'sında peritoneal sitoloji ve lenf nodu metastazını içeren ekstrauterin metastaz görülür (34).

2.2.7.11. Tümör büyüklüğü:

Endometrium kanserinde tümör büyüklüğü, lenf nodu metastazı, sağkalım için önemli bir prognostik faktördür (34).

2.2.7.12. Periton sitolojisi:

Malign periton sitolojisinin önemi konusundaki bilgiler çelişkilidir (34). Genellikle uterus dışına taşmış olgularda sitoloji pozitifdir (3, 54).

2.2.7.13. Hormon reseptör yapısı:

Yapılan çalışmalarda östrojen ve progesteron reseptör düzeylerinin, endometriyal kanser hücrelerinin diferansiyasyonundan bağımsız olarak prognoz üzerine etkisi gösterilmiştir (3, 54).

2.2.7.14. DNA ploidi / Proliferatif index:

Endometriyal adenokarsinomların yaklaşık üçte ikisinde DNA içeriği diploiddir (3, 54). Aneuploid hücre popülasyonu içeren tümörü olan kadınlarda ölüm oranları genellikle daha yüksek olarak bildirilmektedir (3, 54).

2.2.7.15. Genetik/moleküler tümör markırları:

Endometrium kanserinde *PTEN*, *CTNNB1* (28), *KRAS* (28, 10), ve *P53* genlerinde değişiklikler rapor edilmiştir (7). Bu değişiklikler; tümör supresör gen *P53*'de %20 hastada oluşurken, onkojen *KRAS*'da ise kodon 12 ya da kodon 13'e ait mutasyonlar endometriyal adenokarsinomlarda % 10-20 oranında tespit edilmiştir. Bir çalışmada, *KRAS* mutasyonu varlığı kötü prognoza işaret eden bağımsız bir faktör olarak bulunmuştur (3, 54). *HER 2/neu* onkojeni ekspresyonu da %10-15 oranında görülmektedir. Metastatik hastalığı olan hastalarda daha sık rastlanmaktadır. Aşırı ekspresyonu hastalığın progresyonunu artırmaktadır (34).

Tip I ve Tip II tümörlerini ayırt eden spesifik moleküler genetik değişiklikler biyolojik seviyedeki bu sınıflandırmayı destekler. Tip I endometrium kansere ait genetik

değişiklikler *KRAS* ve *CTNNB1* onkogenlerinin mutasyonları, DNA hasar tamir geni olan *MLH1* metilasyonu ve *PTEN* tümör baskılayıcı geninin mutasyonları iken Tip II kanser ise *ERBB2* (*HER 2/neu*) onkogen aktivasyonu ve *TP53* tümör baskılayıcı geni mutasyonunu içerir (44).

Endometrium kanserlerinin eş zamanlı olarak oluşumunda önemli moleküler hedef *PTEN* olarak tanımlanmıştır. Endometrium karsinogenezinde inaktive tümör baskılayıcı *PTEN* en sık rastlanan durumdur (45). Endometrium kanserine dair tanımlanan en yaygın mutasyon *PTEN* genine aittir (2, 26, 44). Bu gende oluşan mutasyonlarda dolayı endometrium kanserlerinin %50'sinden daha fazlasında *PTEN*'in fonksiyonu bozulur (28). Birçok çalışma germline *PTEN* mutasyonunun endometrium kanser gelişme riskini arttırdığını göstermektedir (44). Erken evre endometrium kanserlerinin yaklaşık %30-60'ında *PTEN* mutasyon ile inaktive durumdadır (30). Endometrium kanserinin öncülü olan endometrial hiperplazilerin %20'sinde bu mutasyonlar görülür (8). *PTEN* ekspresyonunun kaybolması endometrium kanser ile ilişkilendirilen en yaygın moleküler anormalliktir (30).

2.3. EPIGENETİK FAKTÖRLER

Eski Yunanca'da, epi- ön eki üstünde, üzerinde, ötesinde anlamını taşımaktadır. Bundan dolayı adı genetiğin üzerinde ya da ötesinde anlamına gelmektedir (46). 'Epigenetik' kavramı ilk defa 1942 yılında Conrad Waddington tarafından ortaya atılmış ve 'genotipin fenotipe dönüşmesi aşamasındaki işlemler' olarak tanımlanmıştır (18, 47). 1999'da Jones ve ark. modern epigenetik kavramını ilei sürmüştür (48). Günümüzde ise tüm makro moleküler yapılar, genom nükleotid dizileri tarafından belirlenirken, gen ifadesini belirleyen, kalıtılma yeteneğine sahip, hücreden hücreye aktarılabilen mekanizmaya epigenetik kod denilmektedir. (20, 49). Bu kodun oluşturulmasında DNA dizisi herhangi bir şekilde değişime uğramamaktadır (20, 47, 48, 50). Yani epigenetik regülasyon DNA sekansında hiçbir değişiklik olmaksızın birbirini takip eden hücre bölünmeleri boyunca hücrelerin gen ekspresyon profillerini hatırlamalarına olanak sağlar (51).

DNA'ya metil grubu bağlanması, epigenetik kavramının ortaya atılmasından günümüze kadar ana epigenetik mekanizma olarak kabul edilmiştir. Metilasyon spesifik restriksiyon enzimlerinin keşfi ile de metilasyonun fonksiyonunu anlamak amacıyla

yapılan çalışmalar hız kazanmıştır. En son olarak da ‘epigenomik’ kavramı bilim terminolojisine girmiştir (18).

Epigenetik genellikle kalıtsal olarak gen ifadesini regüle eden DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve kromatin yapısını içeren kromatin tabanlı olayları tarif eder (51).

DNA’da herhangi bir sekans değişikliği olmaksızın gen ekspresyonunu düzenleyen epigenetik mekanizmalar, genomun üstündeki ya da üzerindeki modifikasyonları kapsar (16). Gen ifadesi temel olarak iki mekanizmayla düzenlenmektedir. Bu mekanizmalar; transkripsiyonu aktive eden ve baskılayan proteinlerin aktivitelerinin düzenlenmesi ve DNA ile kromatinde meydana gelen modifikasyonlardır (epigenetik kontrol) (35).

Genetik mutasyonlar geri dönüşümsüzken epigenetik değişiklikler geri dönüşümlü olabilir (52). Yani epigenetik ve genetik mekanizmalar arasındaki en büyük fark epigenetik değişikliklerin kimyasal ajanlarla geri döndürülebilmesidir. Buna ek olarak epigenetik değişimlerin kalıtım şekli henüz bilinmemektedir. (49).

Epigenetik alanındaki son çalışmalar microRNA’ların da (miRNA) epigenetik regülasyonda rol alabileceğini göstermiştir (51). DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları gen regülasyonuna transkripsiyonel seviyede yeni bir boyut kazandırırken post transkripsiyonel seviyedeki regülasyonda miRNA’lar görev almaktadır (47, 52). Buna göre epigenetik mekanizmalar, üç ana başlıkta toplanmaktadır;

Transkripsiyonel

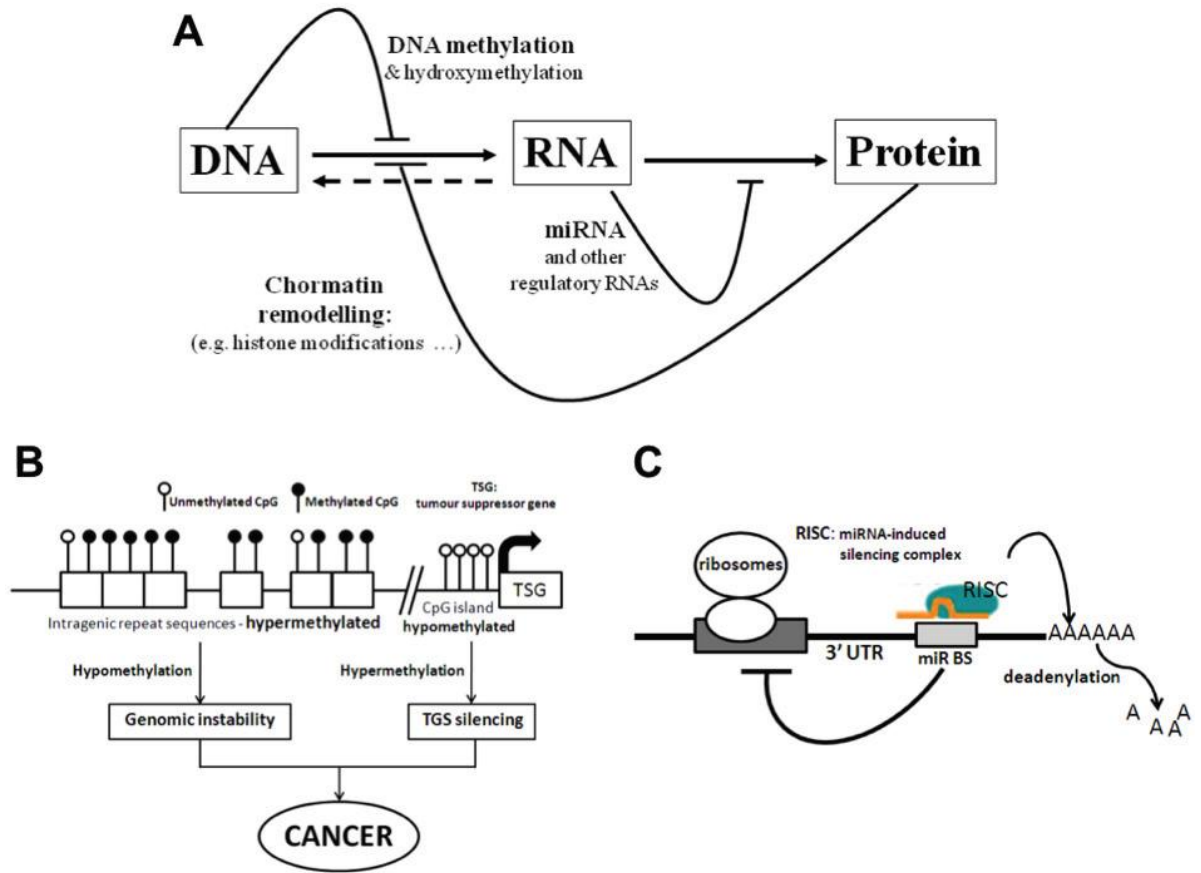
1- Histon modifikasyonları

2- DNA metilasyonu

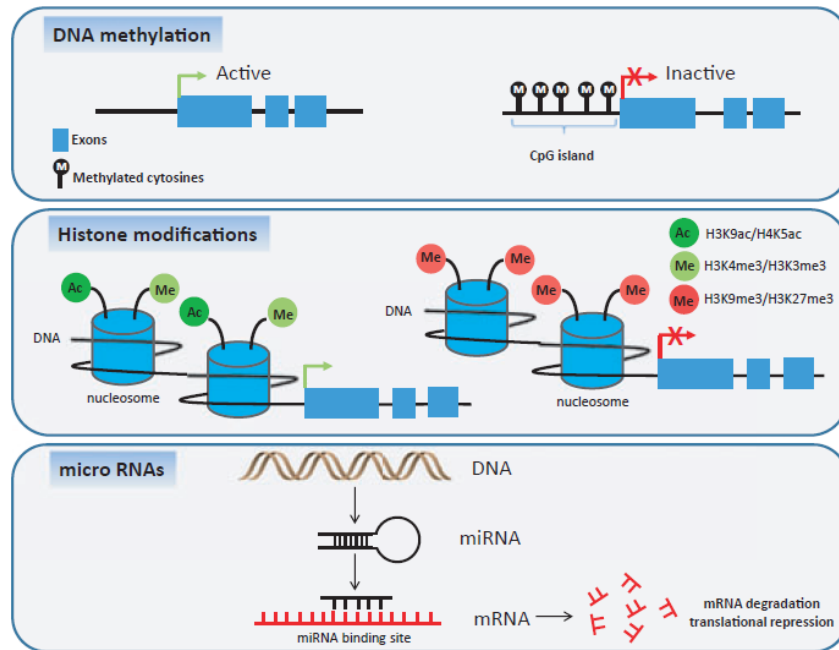
Post-Transkripsiyonel

RNA ile indüklenen sessizleşme (RNA-induced silencing) (53)

Bu mekanizmaların birlikte çalışması sonucu gen ifadesinde kalıtsal değişiklikler meydana gelmektedir. Mekanizmaların herhangi birindeki hata, genlerin ifadesinin aşırı artmasına veya baskılanmasına neden olarak epigenetik hastalıklara yol açmaktadır (35). Şekil 4’de gen ekspresyonunun epigenetik olarak regülasyonu gösterilmektedir. Şekil 5’de ise epigenetik faktörler şematize edilmiştir.



Şekil 2.4. Gen ekspresyonunda epigenetik regülasyon (52) 2011:3



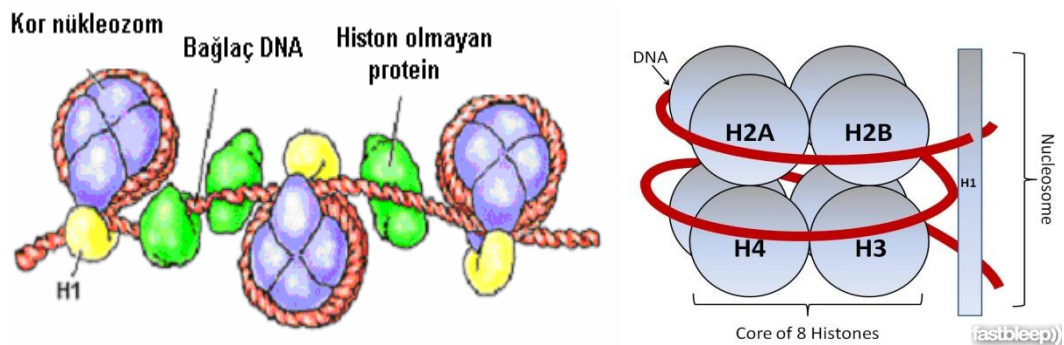
Şekil 2.5. Epigenetik Mekanizmalar (47) 2013:4

2.3.1. Histon Değişimleri

Kromatin yapı ve işlevini değiştirdiği için epigenetik düzenleyiciler olarak bilinmektedir (35). Histon modifikasyonları, DNA metilasyonu ile birlikte çalışarak gen ifadesinin düzenlenmesinde rol alırlar (17). Modifikasyonlar, histonların elektrostatik yükünü etkileyerek kromatin yapısını değiştirmektedir ve histon-DNA, histon-histon ilişkisini etkileyerek, DNA'nın paketlenmesi, replikasyonu, tamiri ve gen ifadesinin kontrolü gibi birçok biyolojik olayı kontrol edebilmektedir (35). Histon modifikasyonları, histonların DNA'ya bağlanma kapasitelerini ve düzenleyici faktörlerin DNA'ya erişebilirliğini değiştirerek gen ifadesinin de değişimine neden olmaktadır (46).

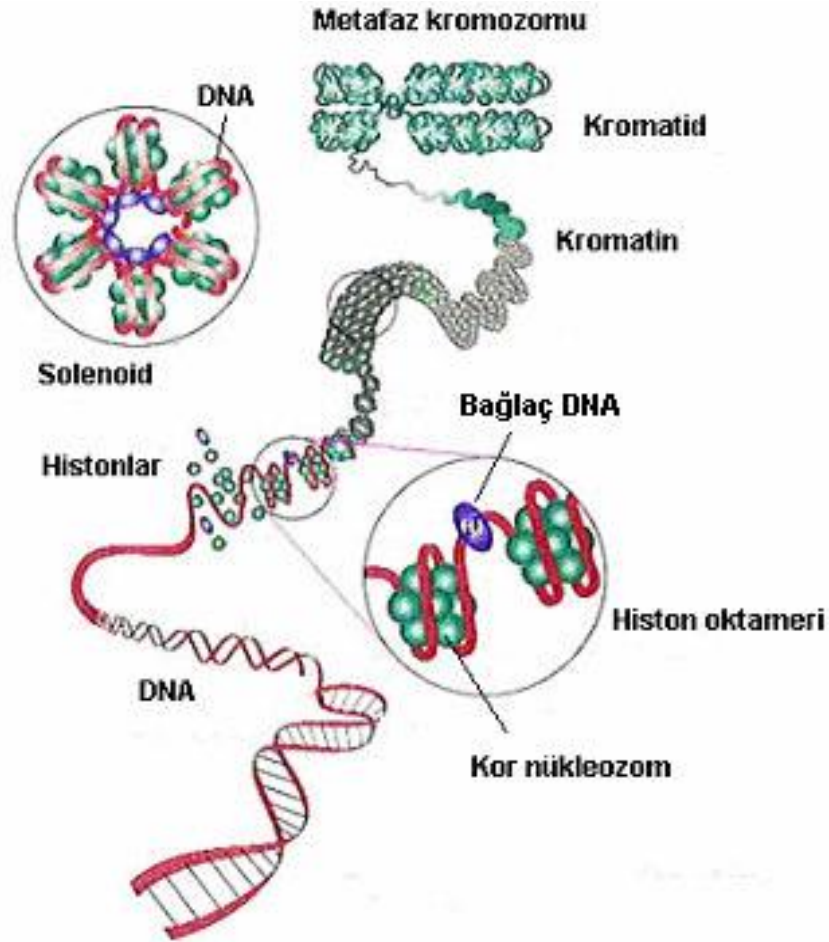
Kromatin yapısını oluşturan proteinler histonlar ve non-histonlardır (54). Histonlar lizin ve arjinin aminoasitlerince zengin olup, bazık yapıda, 102-135 aminoasit içeren küçük proteinlerdir ve pozitif yükleri sayesinde negatif yüklü olan DNA'ya kolayca bağlanabilirler (17).

Kromatin yapısının en basit birimi nükleozomlardır (20, 46, 51, 54). Nükleozomlar histon kompleksleridir ve H2A, H2B, H3, H4 dimerlerinden oluşan bir oktomer yapısındadır. DNA paketlenirken bu oktomerin etrafında yaklaşık 1.64 kez sarılır (17, 54). Yani nükleozom, yaklaşık 147 baz çiftlik (51) DNA dizisinin H2A, H2B, H3 ve H4 merkez histon proteinlerinin üzerine sarılıp H1 histon proteininin yapıyı bağlamasıyla oluşur (17, 20, 47). Şekil 6'da histon oktomeri ve nükleozom yapısı gösterilmektedir.



Şekil 2.6. Histon oktameri ve nükleozom yapısı (55)

Kromatin nükleusta açık, 10 nm'lik bir nükleozom iplikçığı halinden paketlenirken 30 nm'lik süpersarmal oluşturarak solenoid hal kazanır ve her dönüşte yaklaşık 6 nükleozom vardır. Böylece DNA daha sıkı şekilde paketlenmiş olur (54). Şekil 7'de paketlenme ve kromozom oluşumu özetlenmiştir.



Şekil 2.7. Paketlenme ile kromozom oluşumu (17)

Merkez histon proteinlerinin kuyruk bölgelerinde bulunan amino asitlerde görülen kovalent değişimler epigenetik kodu oluşturur (47). Bu değişimler sonucu, kromozom yapısında farklılıklar gözlenir veya yazılımsal olarak etkin olmayan heterokromatin yapıya da ökromatin olarak adlandırılan etkin, açık yapı oluşturulur. Histon değişimleri asetillenme, metillenme, fosforillenme, (48) ubikutinlenme ve glutamik asitlerin ADP-ribozilasyonu (53) olarak sıralanabilir (20, 47). Fosforilasyon, metilasyon, asetilasyon

ve ubikinyon histon kuyruklarında yer alan lizin ve serin rezidülerinin primer modifikasyonlarıdır (46).

2.3.1.1. Histon Asetilasyonu:

En sık gözlenen epigenetik modifikasyondur. Transkripsiyonel aktivasyon ile ilişkilendirilen ve histon H3 lizinlerinin (K9, K14, K18 ve K25) ve histon H4'lerin (K5, K8, K12 ve K16) farklı pozisyonlarında oluşur (47).

2.3.1.2. Histonların deasetillenmesi:

Histon deasetilazlar asetil gruplarını uzaklaştırır. Histonlardaki “+” yükün artmasına neden olurlar. Bu da “-” yüklü DNA ile “+” yüklü histonların ilişkisini arttırır. Histonlar sıkıca paketlenir ve transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya ulaşması engellenir (35). Asetilasyon ve deasetilasyon histon asetiltransferaz ve histon deasetilazlar arasındaki dengeye bağlıdır (47).

2.3.1.3. Histonların metillenmesi:

Histon H4'ün metilasyonu katalizör enzimler keşfedilene kadar ilk gözlemlenen post translasyonel modifikasyon olmuştur (56). Histonların metilasyonu hem aktif hem de inaktif kromatin bölgelerinde yer almaktadır (46). Histonların metilasyonu, N terminal kuyrukta bulunan lizin ve arjinin birimlerinin histon metil transferaz enzimi tarafından metillenmesi ile gerçekleşir (35).

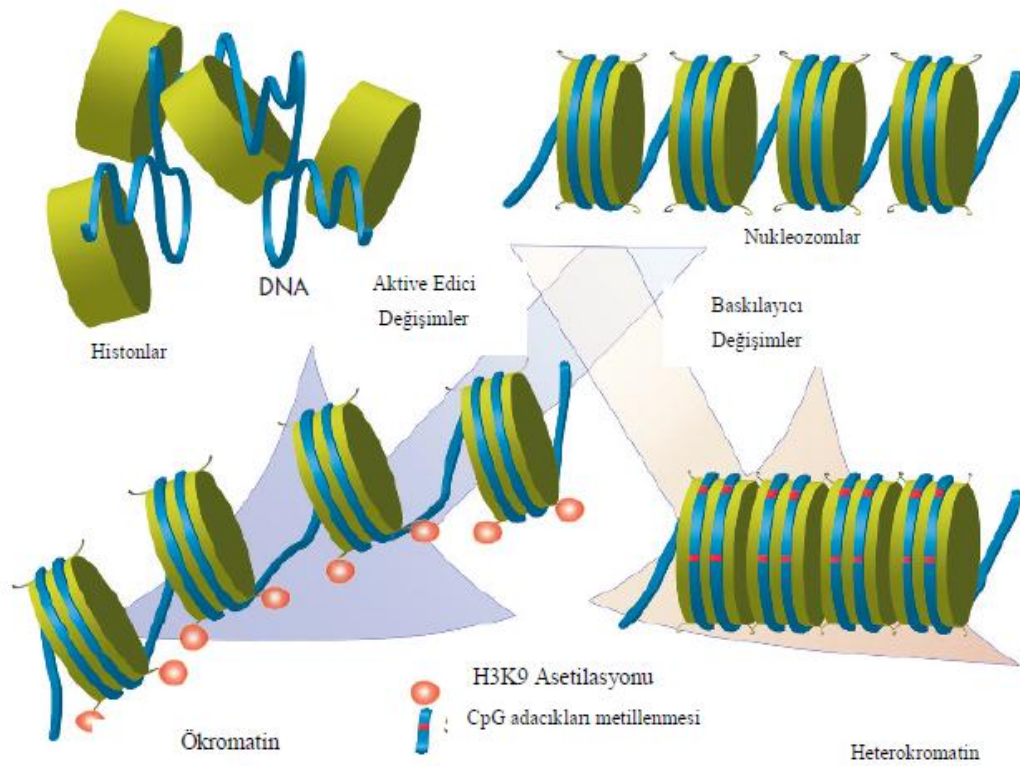
2.3.1.4. Histonların fosforillenmesi:

Histonlar, mitoz esnasında ve sinyal iletiminde kinazlar aracılığı ile serin rezidülerinden fosforillenirler (35).

Değişimler merkez histon proteinlerinin N-uç ve C-uçlarında görülür ve geri dönüşebilme özelliği de taşırlar (20).

Etkin kromatin yapısı artan yazılımsal etkinlikle ilgilidir. Bu etkinlik histon asetillenmesi ile bağlantılıdır. Şekil 8'de yazılımsal olarak etkin olan ve etkin olmayan kromozomal yapı gösterilmektedir. Histon asetil transferazlar H3 ve H4 proteinlerinin lizin uçlarının asetillenmesini katalizler (56). Histon asetil transferazlar ve histon deasetilazlar, de novo metil transferazlarla etkileşerek yazılımsal sessizleşmeye neden olabilirler (20). Yani histon asetilasyonu ve histon metilasyonu çoğunlukla metilasyon bölgesine bağlı olarak gen ekspresyonunu ya aktive eder ya da baskılar. Örneğin Histon

H3'ün amino terminalindeki 9. lizinin (H3-9K) ve Histon H3'ün amino terminalindeki 27. lizinin (H3-K27) metilasyonu transkripsiyonel sessizleşme ile ilişkilidir (16, 46, 47). Histon H3'ün amino terminalindeki 9. lizinin metilasyonu (H3-9K) DNA'nın sessizleştirmesine yol açmakta ve heterokromatik bölgelere yayılmaktadır (46). H3'ün K4, K36 ve K79 metilasyonu genin aktivasyonu ile ilişkilidir (16, 46, 47). Diğer yandan, histon H3 proteininin 4. lizinin (H3-4K) metilasyonu aktivasyonla ilişkili olup ağırlıklı olarak aktif genlerin promotör bölgelerinde yer almaktadır (46).



Şekil 2.8. Yazılımsal olarak etkin ve etkin olmayan kromozomal yapı (20) 2009:13

2.4. RNA ile indüklenen sessizleşme (RNA-induced silencing):

Bazı özel RNA'ların, histon modifikasyonlarının ve DNA metilasyonunun başlaması için tetikleyici olduğu ileri sürülmüştür. Heterokromatin bölgenin oluşumuna katkı sağlayarak kalıtsal olarak sessizleştirilmesine neden olduğu düşünülmektedir (35). Son yıllarda, kodlamayan RNA adı verilen bazı küçük RNA moleküllerinin epigenetik süreçte rol aldıkları gösterilmiştir (35, 47, 52). Örneğin; RNA interferans olarak bilinen, posttranskripsiyonel ve posttranslasyonel sessizleştirilmelerde görevli olan miRNA ve

X kromozom inaktivasyonundan sorumlu olan XIST RNA bu süreç için örneklerdir (35).

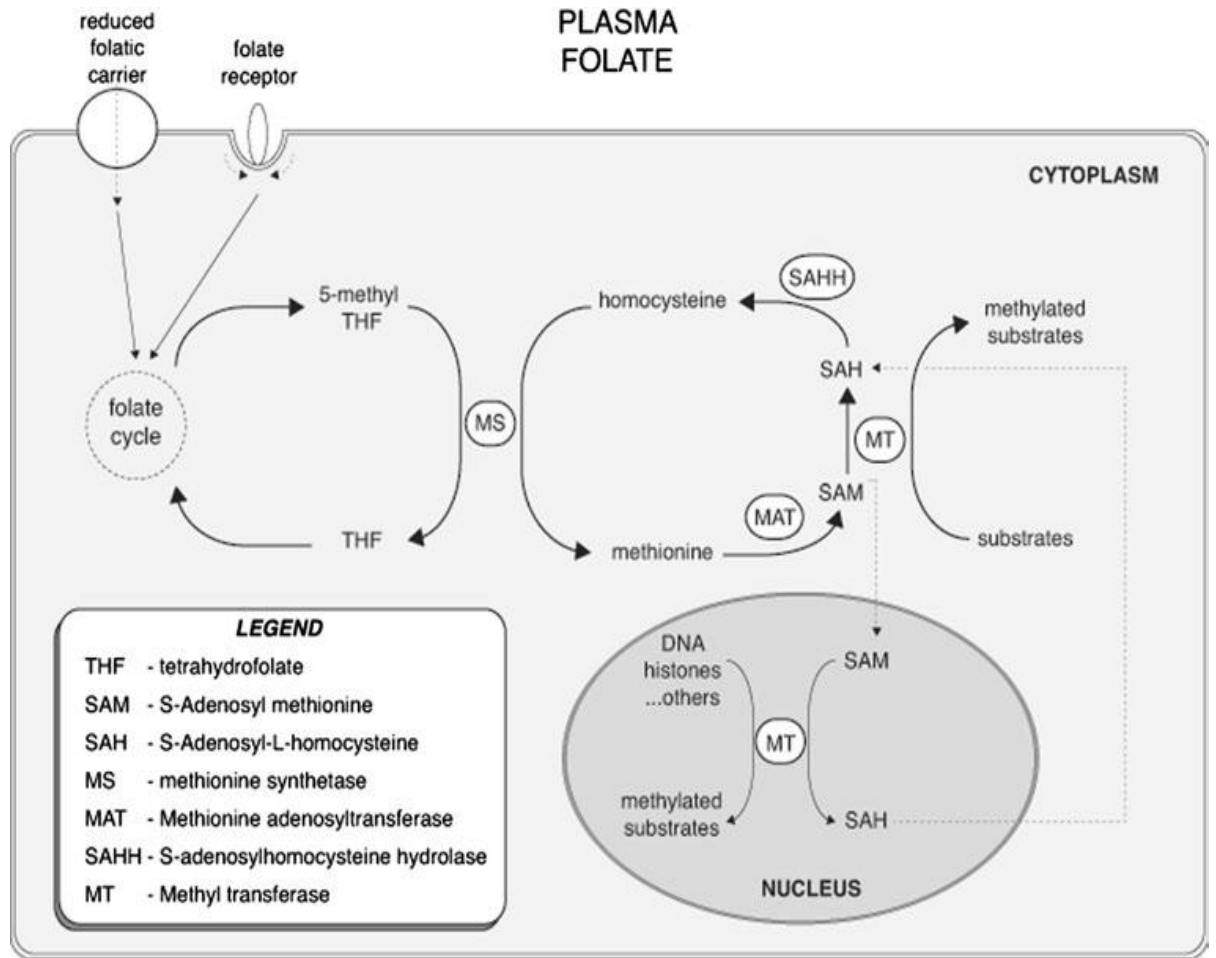
2.5. DNA METİLENMESİ

DNA metilasyonu memeli genomunda meydana gelen epigenetik olaylarının en yaygınıdır (48). İlk olarak 1948 yılında tanımlanmıştır. Transkripsiyonel kontrolün önemli bir mekanizmasıdır (57).

DNA metilasyonu, DNA'yı doğrudan etkileyen epigenetik bir mekanizmadır (35). Tüm epigenetik mekanizmalar arasında en çok çalışılmış ve en iyi anlaşılmış olan DNA metillenmesi, enzimatik bir değişim olup sitozinlerin 5'-metil sitozine dönüşmesidir (20). Yani DNA metilasyonu; S-adenozil metiyonindeki (SAM), Metil grubunun, guaninden (G) önce yerleşmiş sitozine (C) transferi ile katalizlenir ve 5-metil sitozin (5mC) oluşur (35, 46-49, 58). 5mC; A, T, G, C'den sonra beşinci baz olarak adlandırılmaktadır (52). 5mC oluşumu kovalent kimyasal bir modifikasyondur (35, 47). Şekil 10'da DNA metilasyon mekanizması gösterilmiştir.

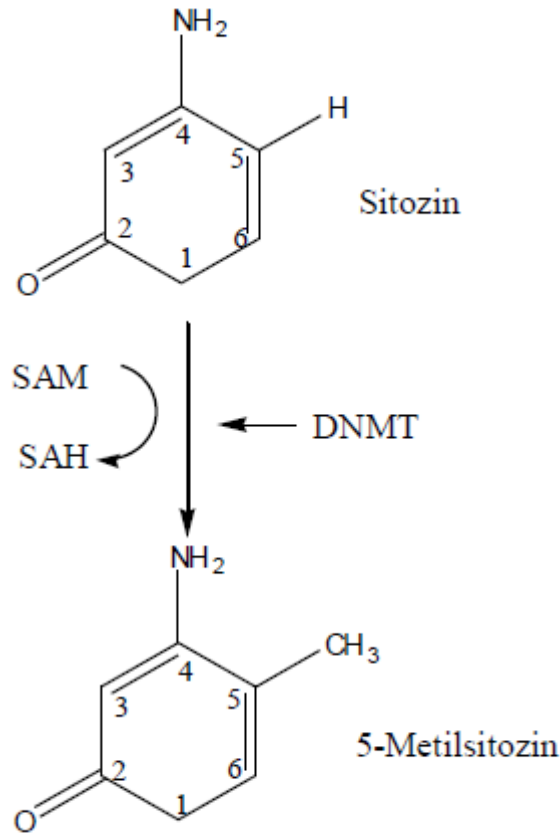
DNA metilasyonunda SAM ve DNA DNMT önemli rol oynamaktadır (47, 48). DNMT ailesi üyeleri, SAM ve DNA'yı co-substrat olarak kullanır. Tüm metilasyon reaksiyonları için gerekli olan metil gruplarını sadece metil donörleri ve kofaktörler sağlar (49, 57). SAM, metionin siklusunda üretilir (49, 57) ve tüm metilasyon reaksiyonlarının kofaktörüdür (50). Yani SAM hücrelerde evrensel metil kaynağı olan metile edici bir ajandır (49, 57). Folatlar ise B grubu vitaminler ve kolinler (beslenmede gerekli olan renksiz bazik madde) ile birlikte metil donörleridir. Kandaki folat hücre içine metil-tetrahidrofolat olarak aktif şekilde taşınır. Vitamin B12 kofaktörü eşliğinde metiyonine dönüşen homosistein ise tetrahidrofolattan oluşur (50). Şekil 9'da SAM üretim yolağı gösterilmektedir. SAM artışı DNA metiltransferazları aktive eder, hipermetilasyonu tetikler ve global hipometilasyona karşı genomu korur (57). S-adenozil homosistein (SAH); metiltransferazların etkisiyle S-adenozilmetiyoninden oluşur (50). SAM/SAH oranı metilasyon durumunun metabolik göstergesi olup metilasyon potansiyeli olarak da ifade edilir (57).

Genomun bir uçtan bir uca hipometile, hipermetile olduğu ve tümör baskılayıcı genlerin sessizleştiği kanserlerde hatalı metilasyon modeline rastlanmıştır (58).



Şekil 2.9. SAM üretimi için gerekli olan enzimatik reaksiyonların şematik gösterimi

(50) 2013:4



Şekil 2.10. DNA metilasyon mekanizması. Sitozinin karbon-5 pozisyonuna SAM'daki bir metil grubunun (CH₃) transferini katalize eden DNA metiltransferazların (*DNMT1*, 3a ya da 3b) etkisi ile 5-metilsitozin meydana gelir (57). 2007:3

Erişkin dokularda spesifik gen ekspresyonunun kontrolü için bir mekanizma olarak işlev gören CpG adacıklarındaki DNA metilasyonu, temel olarak iki küçük gen ailesinin restriksiyonu ile olmaktadır. İlk olarak kadınlarda X kromozomunun inaktivasyonu, inaktif X kromozomundaki CpG adacıklarının yaygın metilasyonu ile ilişkilidir. İkinci olarak, gen allelinin sadece paternal ya da maternal olarak katıldığı imprinte genlerde eksprese edilmeyen allelin inaktivasyonu, genin promotöründeki metilasyon ile ilişkilidir(57, 59). Normal dokularda genlerin çoğunluğu CpG adacıkları ile ilişkili olmakla birlikte bu adacıklar, genlerin eksprese edilip edilmemesine bakılmaksızın metillenmeden kalırlar. Bu durum, CpG adacıklarındaki metilasyonun artmış olduğu insan kanser hücre serileri ile zıtlık göstermektedir (57).

Normal hücrelerde DNA metilasyonu, sıklıkla LINE (long interspersed repetitive elements), SINE (short interspersed repetitive elements) ve satellit DNA'ları içeren tekrarlayan genomik bölgelerde meydana gelir. Hareketli elemanlar ve diğer tekrarlanan DNA dizileri hipermetile olduğundan, hareketli elemanların transpozisyonu engellenir (59). Böylece tekrarlanan diziler arasında rekombinasyon meydana gelmez. Kromozomun kararlı halde kalması sağlanır (35).

2.5.1. DNA Metiltransferazlar (DNMT)

DNA'nın metilasyonu, DNMT ailesi tarafından katalize edilir (20, 49, 57). DNMT'ler metil gruplarını sitozin zincirine transfer ederler ve çok sayıda ökaryotta karakterizedirler (21, 57). SAM tarafından sağlanan metil grubunu sitozinin beşinci karbon atomuna aktaran enzimlerdir (18, 20, 49). DNA molekülünde DNMT'ler için hedef dinükleotidler CpG adacıklarıdır (21, 57). Genomda tüm sitozinlerin %3-4'ü metile halde bulunur (18).

DNMT ailesinin bir DNMT1, bir DNMT2 ve üç DNMT3 (DNMT3a/3b ve DNMT3L) olmak üzere üç üyesi bulunmaktadır (46). Bu enzimler kendi aralarında metillenmiş bölgeyi koruyan ve yeni metil grupları ekleyenler olmak üzere ikiye ayrılırlar (20, 57). DNMT1, DNA replikasyon sırasında DNA metilasyon motifinin devamından sorumludur ve bakım metiltransferazı olarak adlandırılmaktadır. DNMT3'ler metillenmemiş sitozinlerin metilasyonuna de novo olarak aracılık etmekte ve erken embriyonik gelişim döneminde genomik DNA'yı metillemektedir (16, 46, 50, 58). Yani DNMT1, koruma olduğu kadar de novo metiltransferaz aktivitesine de sahiptir (57). DNMT1 eşlenme sırasında yarı metillenmiş DNA'ya bağlanıp yeni sentez edilen zincire metil grubu ekler (20).

DNMT'lerin C terminal bölgesi katalitik aktiviteden sorumlu iken, N terminal bölgesi düzenleyici fonksiyona sahiptir (18).

Yapılan çalışmalarda, kromatin üzerindeki aktif ve inaktif bölgelerin DNA metilasyonunun dağılımı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. İnaktif bölgelerde DNA metile haldeyken, aktif bölgelerde metilasyon gözlenmez (21). Metile dizilerde DNA replikasyonu sırasında baz eşleşmesinde bir değişiklik olmaz ve replikasyon sonrasında atasal zincirin komplementeri olan yeni sentezlenen zincirde yer alan sitozine, metil grubu DNMT1 tarafından takılır ve böylelikle metilasyon oğul döllere aktarılır (21, 46).

DNMT1, DNMT3A ve DNMT3B enzimleri genlerin ilk ekzon ve promotör bölgelerinin metillenmesi için gereklidir. Somatik hücrelerde yüksek oranda korunmuş olan DNA metillenmesi, hücre bölünmesi sırasında DNMT1'ler tarafından sağlanmaktadır. Bu enzim DNA eşlenme bileşenlerinin bir parçası olup yeni sentez edilen DNA'nın CpG ikili nükleotidlerindeki 5' konumunda bulunan sitozinlere metil grupları ekleyerek metillenmiş bölgelerin sonraki hücrelerde korunmasını sağlar (20).

DNMT3A ve DNMT3B enzimleri ise metillenmemiş genomik DNA'ya yeni metil gruplarının eklenmesinden sorumludur. 5- metil sitozin kararsız bir yapı olup kendiliğinden aminsizleşerek timine dönüşme eğilimindedir. Bu durumda DNA metillenmesi bir endojen mutajen gibi etki gösterir (20).

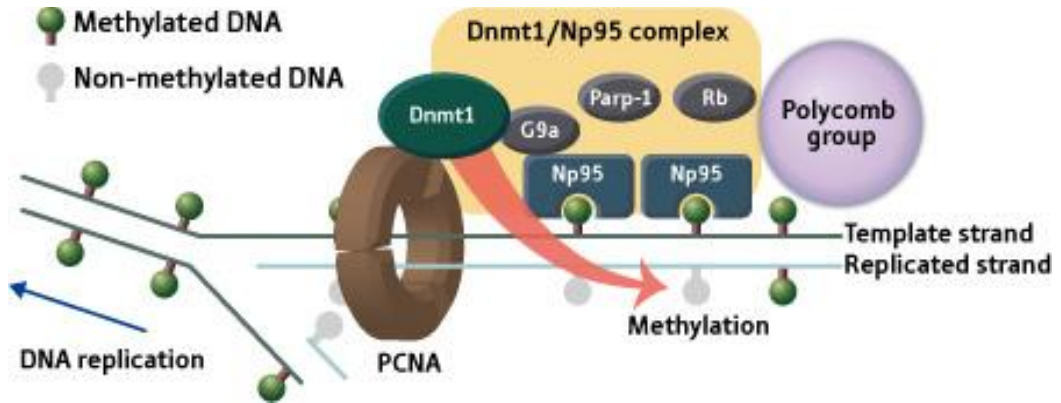
Farelerle yapılan çalışmalarda DNMT1, DNMT3A ve DNMT3B proteinlerini kodlayan genin her iki allelinde gerçekleşen kaybın ölümcül olduğu gözlenmiştir (20, 57). Bu durum DNMT'lerin embriyogenezde ne kadar önemli olduğunu göstermektedir (20). Bununla birlikte erişkin dokularda DNA metilasyon gereksinimi biraz daha az olabilmektedir, bunun primer rolü genom bütünlüğünün korunması ve gen içerisindeki hedef bölgelere transkripsiyon faktörlerinin bağlanma spesifitesini arttırmaktadır (57).

2.5.1.1. DNMT1

Replikasyondan sonra yeni oluşan iplikte DNA metilasyonunun sorumluluğu olan enzimdir (18, 46, 49). Görevi çift sarmal DNA'da simetrik metile CpG adaları oluşturmak için hemimetile bölgeleri metilleyerek metilasyon paternini muhafaza etmektir (16, 50, 58). Yani DNMT1 DNA replikasyonundan sonra oluşan yeni DNA zincirindeki metilasyondan sorumludur (18, 46, 49). Şekil 11'de DNMT1 enzimi şematize edilmiştir.

Eski iplik üzerinde metile olmuş diziler Çoğalan Hücrelerin Çekirdek Antijeni (Proliferating Cellular Nuclear Antigen; PCNA), Histon Deasetilaz 2 (HDAC2) ve DMAP1 (DNMT1-Associated Protein) içeren bir enzim kompleksi ve DNMT1 ile birlikte bulunmaktadır. Replikasyon çatalına yerleşen bu proteinlerin transkripsiyonel baskılanma ile ilişkili oldukları belirlenmiştir (49).

DNMT'lerin N terminal bölgesi DMAP1, PCNA, Rb gibi birçok proteinle ilişki halindedir (18).



Şekil 2.11. DNMT1 (60)

Yapılan fare deneylerinde DNMT1'in kaybının ölümcül olduğu gösterilmiştir. DNMT1'den yoksun fare embriyoları gastrulasyon aşamasından sonra genom genelindeki demetilasyona bağlı olarak öldükleri gösterilmiştir. Bunun yanında enzimin aşırı ekspresyonunun kanser hücre hatlarında *de novo* metilasyona neden olduğu gösterilmiştir. DNMT1'in çift DNA bağlama bölgesi vardır. C terminal ucundaki bölge metile olmayan DNA'ya bağlanırken, N terminal ucundaki bölge metile DNA'ya bağlanmaktadır (18).

2.5.1.2. DNMT2:

Metiltransferazlara ait klasik sekans motiflerini taşımasına rağmen şu ana kadar DNA metilasyonundaki rolü saptanamamıştır (18, 46). Ancak tRNA metiltransferazı olarak etki edebileceği önerilmektedir (46).

2.5.1.3. DNMT3

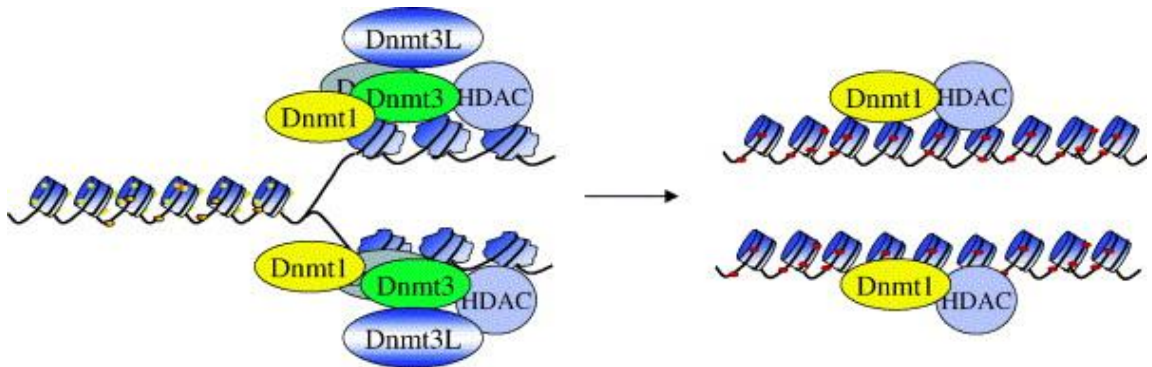
2.5.1.3.1. DNMT3a ve DNMT3b: De novo metilasyondan primer olarak sorumlu olan enzimlerdir (18, 46, 49). Farklılaşmamış embriyonik kök hücrelerde yüksek düzeyde eksprese edilirler. Fakat normal somatik dokularda ekspresyon düzeyi düşüktür (49).

Fertilizasyondan hemen sonra fare genomunda genel bir demetilasyon oluşmaktadır. Bunu takip eden implantasyon sırasında gelişen genom genelindeki *de novo* remetilasyondan ise DNMT3A ve DNMT3B sorumludur ve bu de novo metilasyon

memeli gelişimi için hayati önem taşımaktadır. DNMT3A ve DNMT3B'den yoksun farelerde morfolojik bozukluklar gözlenmekte ve bu fareler erken gelişim evrelerinde ölmektedir.

2.5.1.3.2. DNMT3L:

DNMT3L gametogenez sırasında eksprese edilir; DNMT3A ve DNMT3B ile benzer homolojiyi paylaşıp da ağırlıklı olarak maternal genomik imprintlenmede rolü bulunmaktadır (18). Diğer DNMT3'leri gibi erken embriyonik dönemde hayli ekspresyonu olan bir enzimdir ancak herhangi bir intrinsek DNA metil transferaz aktivitesi göstermez. DNMT3L, 3A ve 3B aktivitesini modüle eder. İmprinted ve repeated sekansı bölgelerinde oluşmuş bulunan DNA metilasyonunu pozitif olarak regüle eder. Erişkin hücrelerde DNMT3 üyelerinin rolü tam olarak belli değildir (49). Şekil 12'de DNMT'lerin DNA metilasyon mekanizmaları gösterilmektedir.



Şekil 2.12. DNMT'lerin DNA Metilasyon mekanizmaları (61)

2.5.2. GENOMDA SİTOZİN METİLASYONUNUN ÖNEMLİ OLDUĞU BÖLGELER

Memeli genomunda görülen sitozin uç metillenmesi genellikle CpG ikili nükleotidleri olarak da isimlendirilen 5'-CG-3' ikili nükleotidlerinde, nadiren de 5'-CA-3' veya 5'-CT-3' uçlarında gerçekleşir (20, 35, 57).

DNA metilasyonu esas olarak CpG dinükleotid bölgelerinde yerleşmiş olan Sitozin rezidülerinde meydana gelir. CpG dinükleotidleri genomda istatistiksel olarak az sayıda bulunmakla birlikte, CpG adaları olarak adlandırılan sıklıkla promotör veya gen regülatör bölgelerde bulunan C+G'den zengin bölgelerde yoğunlaşmıştır. Bununla

birlikte CpG dinükleotidlerinin tek tek olanlarının çoğu, özellikle tekrar dizileri ve transposable elementlerin içinde olmak üzere DNA'nın intergenik veya intronik bölgelerinde bulunur. İnsanda normal somatik hücrelerde CpG dinükleotidlerin %69-90'ı metiledir (49).

Genomda sitozin metilasyonunun önemli olduğu bölgeler; (18)

- 1) CpG adaları
- 2) G+C izokorları
- 3) CpG sıcak noktaları

2.5.2.1. CpG ADACIKLARI

Genomdaki toplam CpG'nin küçük bir bölümü CpG adalarında yoğunlaşmış şekildedir (18). Metilasyon, CpG dinükleotidlerindeki sitozin birimlerinde meydana gelir. Çoğu gen promotörü CpG dinükleotitler açısından zengindir. Promotörlerde CpG dinükleotidlerinin yoğunlaştığı bölgeler, CpG adaları olarak tanımlanır (35). CpG adaları 0.5 ile 5 kb uzunluğundadır ve genellikle 100 kb'de bir gözlenirler (35, 57). Bu bölgeler metile olmayan, GC zengin, CpG'nin GpC'ye oranının en az 0,6 olduğu bölgelerdir. CpG adacıkları fonksiyonel genlerin 5' ucuna lokalizedir. İnsanlarda tüm genlerin neredeyse yarısı CpG adalarına sahiptir (57). CpG adaları ile ilişkili olmayan CpG dinükleotidleri yoğun bir biçimde metile iken, promotörlardaki CpG adaları metilasyondan korunurlar (35).

İnsan genomunun tüm CpG ikili nükleotidlerinin %69 kadarı metilenmiş durumdadır. Geriye kalanlar ise yaklaşık 200 baz çifti büyüklüğünde CpG'ce zengin promotör veya genlerin ilk ekzonlarında bulunan bölgelerdir. Bu bölgeler CpG adacıkları olarak da isimlendirilir (20, 49). Tersine global CpG bölgeleri genomun sentromer ve telomer bölgelerine yakın yerler gibi konstitüsyonel heterokromatin bölgeleri gibi protein kodlamayan bölgeler ve transkribe olmayan intronlar içerisinde (50).

Bir çok housekeeping gen ve doku-spesifik geni kapsayan insan promotörlarının %60'ı CpG adacıklarına sahiptir (16). CpG adaları, genomun %1-2'sini oluşturur ve metile olmamış CpG bölgelerinin %50'den fazlasını oluşturur. CpG adalarının sayısının 29.000 kadar olduğu tahmin edilmektedir (18, 49, 57). Memeli genomunda CpG dizilerinin 5 kat daha az oldukları ve bu durumun CpG yapısında bulunan 5-mC fazla mutabl olmasından kaynaklandığı sanılmaktadır (57). Ayrıca kromozomların Megabaz

(Mb) başına 5-15 CpG adasına sahip olduğu hesaplanmıştır. Bir genomik bölgede bulunan CpG adası sayısı ile o bölgedeki genlerin sayısı arasında doğru orantılı bir ilişki vardır (18).

Metilasyonun sıklıkla transkripsiyonun baskılanmasına neden olduğu düşünülürse, promotör bölgelerde bulunan CpG adaları içerisindeki CpG dinükleotidlerinin niçin sıklıkla metillenmemiş durumda olduğu daha rahat anlaşılabilir. Metillenmemiş durumda bulunan CpG adalarındaki yeniden metillenmeler, yaşlanma süreci ve kanser gibi bazı hastalıkların ortaya çıkmasında önemli rol oynamaktadır. CpG adalarının normal olarak metile halde bulunduğu 4 yer vardır; (18, 59).

- 1- İmprintlenmiş genler
- 2- Kadınlarda inaktif X kromozomu
- 3- Germline spesifik genler
- 4- Doku spesifik genler

2.5.2.2. G+C izokorları

İnsan genomu G+C içeriği açısından farklı bölgelere ayrılabilir. Bu farklı bölgeler (izokorlar) kendi içinde benzer G+C içeriğine sahipken, gruplar arasında belirgin farklılıklar vardır. Bu anda 5 izokor ailesi bulunmaktadır: L1 ve L2, G+C içeriği fakir (%40); H1 ve H2 G+C içeriği zengin (sırasıyla %45 ve %50); H3 ise G+C içeriği çok zengin (%53) bölgeler olarak tanımlanabilirler. G+C içeriğinin gen yoğunluğu ile ilişkisi olduğu bilindiğinden H3 izokorlar en fazla gene, CpG adasına ve CpG dinükleotidine sahip bölgelerdir (18).

2.5.2.3. CpG Sıcak Noktaları

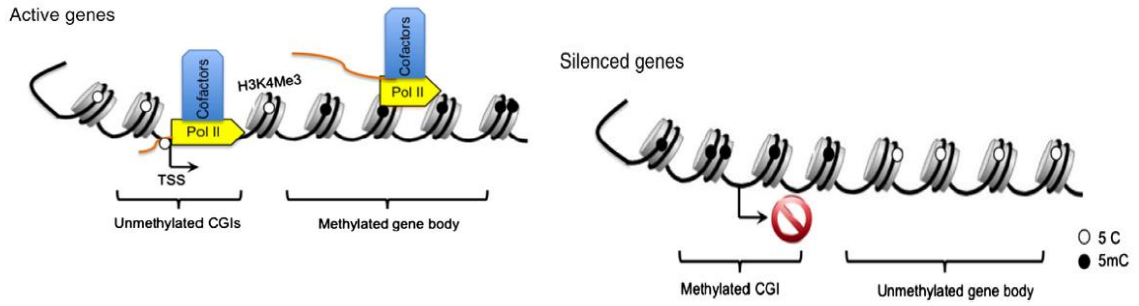
CpG bölgelerinin mutasyonlar için sıcak noktalar oldukları bilinmektedir (18, 62). Germline nokta mutasyonların %30'unun 5-metilsitozinin spontan deaminasyonu sonucu oluşan metile CpG-TpG transisyonu sonucu olduğu gösterilmiştir. *P53* geninde gözlenen inaktive edici nokta mutasyonların yaklaşık %50'si CpG dinükleotidlerinde meydana gelir. Ayrıca sigara ilişkili akciğer kanserinde, metile sitozinler karsinojenleri CpG dinükleotidlerine yönlendirerek G-T transversiyonuna neden olmaktadır. Bunlar DNA metilasyonunun kansere yol açan genetik değişiklikler ile olan ilişkisini açıklamaktadır (18).

2.5.3. DNA Metilasyonunun Görev Aldığı Biyolojik Düzenlemeler

DNA metilasyonunun ökaryot canlılardaki rolünün ne olabileceği uzun süreden beri tartışılmaktadır. Prokaryotlarda olduğu gibi, konakçı hücre savunma mekanizması olarak yabancı DNA'ya karşı restriksiyon modifikasyon sisteminin bir parçası olarak görev yapmaktadır (62). Ayrıca ökaryotik hücrelerde epigenetik kalıtım kapsamında bir çok biyolojik olayların; Somatik hücre farklılaşması, onkogenezi (18, 49), Mutajenez (49), yaşlanma (18, 20, 49), kromozom paketlenmesi, DNA replikasyonu ve tamiri, transkripsiyonun başlatılması, çift heliks DNA stabilitesinin sağlanması, (49), genetik regülasyon, dokuya özgü gen ekspresyonunun ve gelişim süresince gen ekspresyonunun düzenlenmesi (20, 49, 57), nükleer parçalanmanın engellenmesi, (49), X kromozom inaktivasyonu (20, 49, 50, 59, 62), imprinting (49, 50, 59, 62), germline spesifik genlerin ekspresyonunun düzenlenmesi (18), transpozon sessizleşmesi (50, 59) gibi biyolojik düzenlenmelerde de görev alır.

Hücresel seviyedeki DNA metilasyonu nesil kısıtlamasını çoğaltmak ve genomik stabiliteyi sürdürmek için esansiyeldir. Ayrıca moleküler seviyede 5mC'nin rolü promotör ve ekzon gibi lokal CpG ve kromatin modifikasyon yoğunluğu olan genomik bölgeleri içeren çoklu parametreler tarafından belirlenir. CpG metilasyonu kadınlarda inaktif X kromozomu üzerindeki CpG açısından yoğun promotörlerin transkripsiyonel sessizleşmesi ve genomik imprintingün düzenlenmesinde anahtar role sahiptir. Ancak sadece promotör bölgesinde transkripsiyonel baskılamaya yol açmaz buna karşıt olarak nadiren gen aktivasyonuna da yol açtığı gözlenmiştir (59). Şekil 13'de Promotör bölgesindeki CpG adacıklarının unmetile oluşunun geni aktif kılarken, metile oluşunun geni sessizleştirdiği şematik olarak gösterilmektedir.

Memelilerde DNA metilasyonu embriyonik gelişim için esansiyeldir (59, 62). CpG metillenmesi erken embriyonik dönemde programlanmakta ve daha sonraki dönemlerde de korunmaktadır (20). Embriyonik gelişimin çok erken safhalarında henüz tanımlanmamış bir moleküler mekanizma ile hızlı bir şekilde metilasyon ortadan kalkar (demetilasyon) ve implantasyondan hemen sonra bu bölgelerde yeniden metilasyon oluşur (49).



Şekil 2.13. Promotör bölgesinde metile ve unmetile durum. Promotör bölgesindeki CpG adacıklarının unmetile oluşu geni aktif kılarken, metile oluşu geni sesizleştirir (63) 2013:3

2.5.3.1. DNA Metilasyonu Ve Gen Regülasyonu

Metilasyon, DNA ve proteinler arasında bir ilişki sağlayarak transkripsiyonu etkileyen kromatin yapı değişiklikleri ortaya çıkartır. Bir gen üç şart sağlanırsa eksprese olabilir:

- Uygun transkripsiyon faktörleri ortamda olmalıdır,
- Histonlar asetile ve metillenmemiş durumda olmalıdır,
- CpG adalarındaki sitozinler metillenmemiş olmalıdır (18).

Ökaryotik gen ekspresyonunun regülasyonu kompleks bir işlemdir. Transkripsiyonun başlaması çok sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir. Cis-acting ve trans-acting faktörleri içeren olaylarla tamamlanmaktadır. Cis-acting elemanlar trans-acting faktörler için substrat olarak rol oynayan DNA dizileridir ve DNA etrafında transkripsiyon için hazırlanırlar. Genin promotör bölgesindeki artmış metilasyon ekspresyonun azalmasına yol açarken, transkribe edilmiş bölgedeki metilasyon gen ekspresyonunda çeşitli etkilere neden olabilirler (57).

DNA metilasyonu fizyolojik ve patolojik şartlar altında gen ekspresyonunun sessizleşmesinde önemli bir mekanizmadır. DNA'ya regülatör elemanların alınımını sağlayarak ya da engel olarak genin sessizleşmesinde stabil bir mekanizma oluşturur (16).

Gen ifadesinin düzenlenmesinde etkili olduğu için normal hücre işlevlerinin yerine getirilmesinde CpG metillenmesinin önemi oldukça büyüktür. Örneğin etkin olmayan X kromozomu üzerinde bulunan genlerin sessizleştirilmesi, yaşla ilgili veya dokuya özel

genlerin ifadesinin düzenlenmesinde DNA metillenmesi önemli rol oynamaktadır (20, 50).

DNA metilasyon paterni, DNA'nın metilasyon ve demetilasyonu arasında bir denge sonucu oluşur. DNA metil transferaz ve demetilazlar tarafından katalizlenen dinamik bir süreçtir. DNA'nın metilasyon durumu birçok faktör tarafından belirlenir. Trans-acting reseptörlerin (TR) etkileşmesi, histon deasetilaz (HDAC) ve histon metiltransferaz (HMTASE) gibi histon modifikasyon enzimlerini aktive eder. HDAC ve HMTASE'lerin aktivasyonu DNMT ve MeCP2 gibi metile DNA'ya bağlanan proteinleri aktive eder. Bu etkileşim dengeyi metilasyon yönüne çeker. Diğer yandan Trans-activating faktörler (TAF) ise spesifik genlerin histon asetil transferazlarını (HAT) aktive eder. HAT'ların varlığı histonların asetilasyonuna yol açar, kromatin yapısı gevşer (49).

Sitozin metilasyonu tek haldeki nükleozomları daha kondanse hale getirebilen dinamik süreçte kromatin değişimleri yaparak gen regülasyonunda önemli bir rol alır. DNA metilasyonu kromatini sıkıştırarak gen ekspresyonunu baskılayabilir. Genomun üç boyutlu yapısındaki bu dinamik değişiklikler gen ekspresyonunun kontrolü için esansiyeldir (63).

Bu iki epigenetik düzenleyici mekanizma, DNA metilasyonu ve histon modifikasyonu, gen ekspresyonunda birbiriyle sıkı şekilde ilişkilidir. Gen ekspresyonunun başarılı epigenetik kontrolü sıklıkla her iki mekanizmanın işbirliği ve etkileşimine ihtiyaç duyar (46).

DNA metilasyonu ile transkripsiyonel represyon için çeşitli mekanizmalar ileri sürülmüştür (18, 57). İlk görüşe göre metilasyon, transkripsiyon faktörlerinin bağlanma özelliğini inhibe eder. Pek çok transkripsiyon faktörünün metilasyon tanıma bölgelerinin bulunduğu ve metilasyona duyarlı oldukları tespit edilmiştir (57, 62). Ancak daha sonra AP-2, c-Myc/Myn, siklik AMP- bağımlı kinaz aktivatör CREB, E2F ve NFkB gibi metilasyon tanıma bölgeleri bulunmayan ve metilasyona duyarsız transkripsiyon faktörleri de keşfedilmiştir. Bu transkripsiyon faktörleri CpG residüleri içeren dizileri tanırlar ve metilasyonla inhibe edilenlere bağlanırlar (57). Bunun sonucunda, daha genele yayılabilir bir görüş ortaya atılmıştır (21, 57).

Günümüzde de kabul gören bu görüşe göre, DNA metilasyonu, son yıllarda keşfedilen bir protein ailesi olan metil-binding domain (MBD) proteinleri olarak bilinen

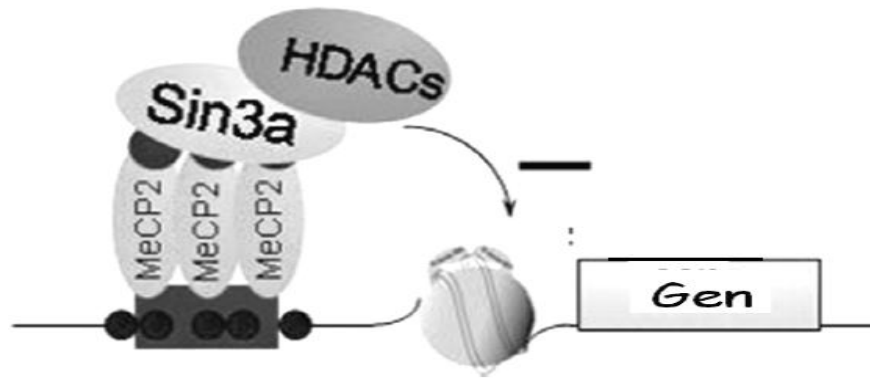
proteinlerin bağlanmasına yol açar. Bu durum represyonun ikinci şeklini ifade etmektedir; Represyonun ikinci şekli ise, metillenmiş DNA'daki spesifik transkripsiyonel represörlerin direkt bağlanmasını içerir. Bu protein ailesinin üyelerinin hepsinde, metillenmiş CpG bölgesi içeren DNA'ya spesifik olarak bağlanmasını sağlayan ortak metil bağlama bölgesi mevcuttur. Bu proteinlerin ilk tanımlananları MeCP1 ve MeCP2'dir (57, 62). Bununla birlikte günümüzde çeşitli yeni proteinler de tanımlanmıştır. Bunlar, MBD1, MBD2, MBD4 ve Kasio proteinlerini içermektedir. MeCP1, MBD1, MBD2 ve MBD4, metil CpG binding domain olarak adlandırılan 5mCpG motifine bağlanır. Bununla birlikte Kasio farklı bir mekanizmaya sahiptir ve çinko parmak motifine bağlanır. MBD4, DNA onarımı ile ilişkilidir, ancak MBD1, MBD2 MeCP2 ve Kasio, histon deasetilaz kompleksi ile etkileşerek hem in vitro hem de hücre kültüründe transkripsiyonu represe etmektedir (57). Bu protein ailesinin bilinen 5 üyesinden en az üç tanesinin (MeCP2, MBD2 ve MBD3), histon deasetilazlar (HDAC1 ve HDCA2) ve kromatin remodelling aktivitelerini (Sin3a ve Mi-2) içeren büyük protein kompleksleri ile ilişkili olduğu Şekil 14'de gösterilmiştir (18, 21, 57). Histon deasetilazlar ve kromatin-remodelling aktivitesinin etkisi ile kromatin yoğunlaşmasının meydana geldiği düşünülmektedir. Bunun yanı sıra MBD proteinlerinin, transkripsiyonel represyonu içeren çeşitli diğer komplekslerle ilişkili olabileceği düşünülmektedir (21, 57, 62).

Encyclopedia of DNA Elements (ENCODE) projesi ile DNA metilasyonu ile ökaryotik gen regülasyonu ve kanser oluşum mekanizmasının anlaşılması için yeni ip uçları sağlayan transkripsiyonel regülasyon arasındaki dinamik etkileşimin araştırılması amaçlanmaktadır (63).

2.5.3.1.1. Metil-CpG Bağlayan Proteinler (MBD) ve Histon Deasetilazlar (HDAC)

İlk MBD 1992 yılında bulunan MECP2'dir. Bu protein metile CpG'lere artmış affinite gösterir ve HDAC gibi korepresör komplekslerin ortamda toplanmasını sağlar. MECP2, metil-CpG bağlayan ve transkripsiyonu baskılayan iki domainden oluşur. MECP2 dışında MBD1-4 olarak adlandırılan 4 tane daha MBD vardır. MECP2, MBD2 ve MBD4 transkripsiyon baskılayıcıları olarak görev alırlar (18). Metile sitozinler; DNMT'lerle, MBD, HDAC'ler ile, transkripsiyon baskılayan proteinlerle ve geç replike olan kromatin yapısı ile ilişkilidir. DNA metilasyonunun gen ifadesini baskılama sürecini, transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını engelleyerek veya metile DNA'ya

bağlanan protein kompleksleri sayesinde kromatin yapısını değiştirerek gerçekleştirdiği düşünülmektedir. Transkripsiyonel sessizleşmede, aktif kromatin önce “de nova” metilasyona uğrar. Ardından metile olmuş DNA’ya, metile DNA dizisini tanıyıp bağlanma özelliği olan MeCP2 proteinleri bağlanır (35). MeCP2 proteinleri transkripsiyonel baskılamayı köprü proteini Sin3 yardımıyla yaparlar (18). MeCP2 proteinleri, transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını engeller ve deasetilaz aktivitesine sahip diğer enzimler için tanıma bölgesi oluştururlar. Ardından bu tanıma bölgesine korepressör Sin3A bağlanır ve histon deasetilaz kompleksleri bu sürece dahil olur (35).

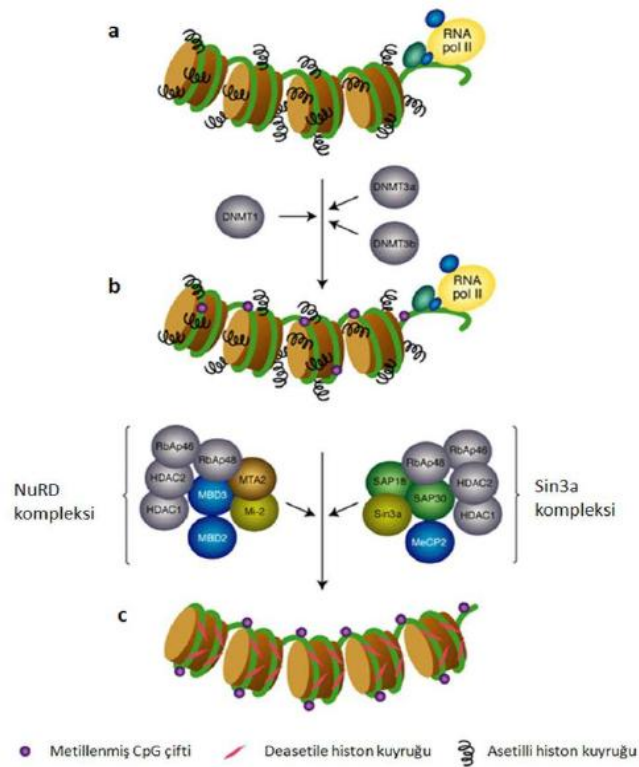


Şekil 2.14. Metilasyonun transkripsiyonu etkileme mekanizması (35) 2008:31

HDAC’lar histon kuyruklarındaki lizin rezidülerini deasetile ederek komşu histonlar arasındaki ilişkiyi kolaylaştırırlar ve daha yoğun olarak paketlenmiş bir kromatin yapısı ortaya çıkmasını sağlarlar. Bu yoğun paketlenmiş yapı transkripsiyon faktörlerinin DNA’ya bağlanmasını engelleyerek, gen ekspresyonunu baskılar. Histon H3 ve H4’ün N terminallerindeki lizin rezidülerinde bulunan asetil gruplarının histon deasetilazlar tarafından uzaklaştırılması sonucu histon (+) yüklenir ve (-) yüklü DNA ile daha kondanse bir yapı oluşturur. Bu da transkripsiyon faktörlerinin DNA’ya bağlanmasını engeller (18). Histon kor yapısı ve DNA arasında sıkı bir paketlenme gerçekleşir, transkripsiyon baskılanır ve gen sessizleşir. Şekil 15’de DNA metilasyonunun transkripsiyonel represyona neden olmasına ilişkin önerilen mekanizma gösterilmektedir. İnaktif kromatinin ise, DNA replikasyonu sonrasında, DNA metil transferazların sürece eklenmesi ile metilasyon deseni korunur ve inaktif kromatin olarak kalır (35). Histon H3’ün lizin9 rezidüsünün HMTASE tarafından metillenmesi

ise metilasyondan sorumlu olan DNA metil transferazların olaya katılımını sağlar. DNMT'ler de promotör bölgedeki CpG dinükleotidlerini metilleyerek genin susmasına neden olur (18). Dolayısıyla DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları birbiri ile örtüşen olaylardır (35).

Bazı CpG bölgesine bağlanma proteinlerinin CpG adacığı yönünden yoksun metile olmayan bölgelere bağlanma olasılığı daha yüksek bulunmuştur ki bu CpG adacığı yönünden yoksun metile olmayan bölgeler yeni Histon H3 lizin 4 üçmetilasyon (H3K4me3) bölgelerini oluşturmak ve açılmış promotör ile ilişkili bulunmamıştır, böylece kromatin yeniden düzenlenmesi boyunca gen aktivitesi düzenlenir. Şaşırtıcı bir şekilde CpG adacığı yönünden yoksun bölgeler keşfedilmemiş promotörleri işaretler ve onlar DNA metilasyon modifikasyonlarına çok duyarlıdır. CpG adacığı yönünden yoksun genlerin kabul gören rolleri bu senaryoda keşfedilmiş olmuştur (63).



Şekil 2. 15. DNA metilasyonunun transkripsiyonel represyona neden olmasına ilişkin önerilen mekanizma (57) 2007:9

DNA metilasyonunun birçok gen üzerinde etkili olması nedeni ile memeli hücrelerinde CpG adalarının metilasyon desenlerinin tanımlanması, normal ve patojenik gen ekspresyonları açısından önemlidir. Bu amaçla sürekli gelişmekte olan moleküler biyoloji teknikleri, bütün genomdaki ve özellikle tek genlerdeki metilasyon desenlerinin analizine olanak sağlamaktadır (35).

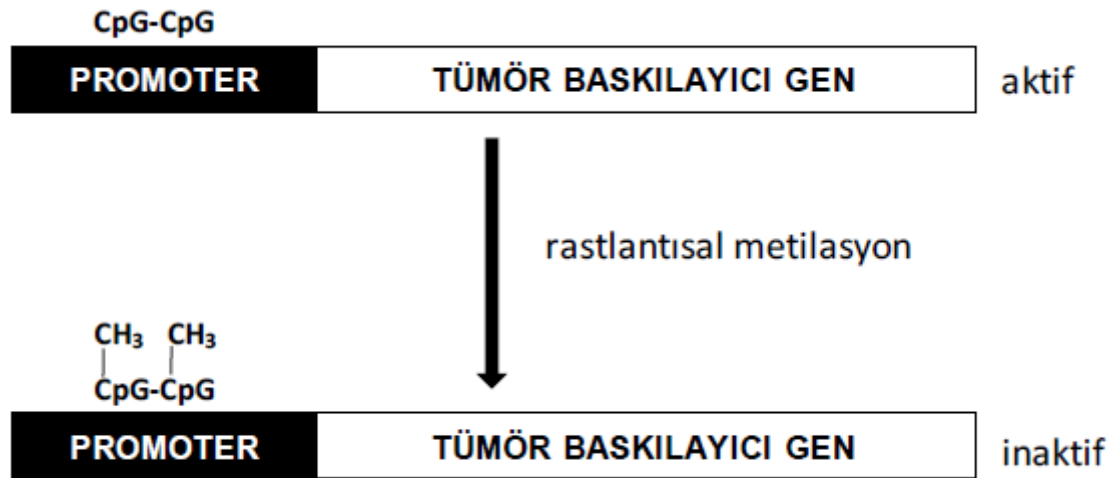
2.5.4. DNA Metilasyonu ve Kanser

Gen ekspresyonunun baskılanmasında önemli bir fonksiyona sahip olan DNA metilasyonu günümüzde ölümcül hastalıkların başında gelen kanserin meydana gelmesinde ve tedavisinde de ön plana çıkmaktadır (57).

Son zamanlarda kanserde DNA metilasyonu, moleküler araştırmaların ana konusunu oluşturmaktadır (57). CpG dinükleotitlerinde DNA metilasyon kaybı olan sayısız kanser keşfedilmiştir (50). Genomda 5mC total düzeyinin ölçümü ile kanser hücrelerinde normal hücrelere göre metilasyonun az olduğu gösterilmiştir (49, 62). Normal hücrelerle karşılaştırıldığında malignant hücreler, DNA metilasyonu açısından major değişimler göstermektedir (57). Normal dokularda CpG dinükleotitlerinin büyük bir kısmı aktif ya da inaktif olmalarına bakılmaksızın metillenmemiş haldedirler. Kanser hücrelerinde ise bu genlerin büyük bir kısmı metile haldedir (21, 62).

DNA hipometilasyonu tümör hücre DNA'sının en önemli işaretlerinden biridir (62, 63). Bu metilasyon kaybı, metilasyonun esas kısmında önemli bir değişiklik olmaksızın adenomdan karsinomaya dönüşen premalign adenomların çok erken evrelerinde keşfedilmiştir (50).

Promotör bölgelerindeki DNA metilasyonu, genin baskılanması ile ilişkilidir. DNA metilasyonu ile gen aktivasyonu kontrol edilmektedir (49, 62). Bununla birlikte birçok tümör baskılayıcı gen tümör oluşumu süresince promotör bölgesindeki CpG adacıklarının anormal metilasyonu ile inaktive olmaktadır. Şekil 16'da metilasyon-tümör baskılayıcı gen ilişkisi gösterilmektedir. Tümör yayılımı ve metastazını baskılayan tümör baskılayıcı ve diğer kanser ilişkili genler kanser hücrelerinde hipermetile olarak bulunmuştur (62). Yani onkogenlerin hipometilasyonu ve tümör baskılayıcı genlerin hipermetilasyonu kapsayan DNA metilasyonundaki değişiklikler tümör oluşumunda önemli bir rol oynar (63).



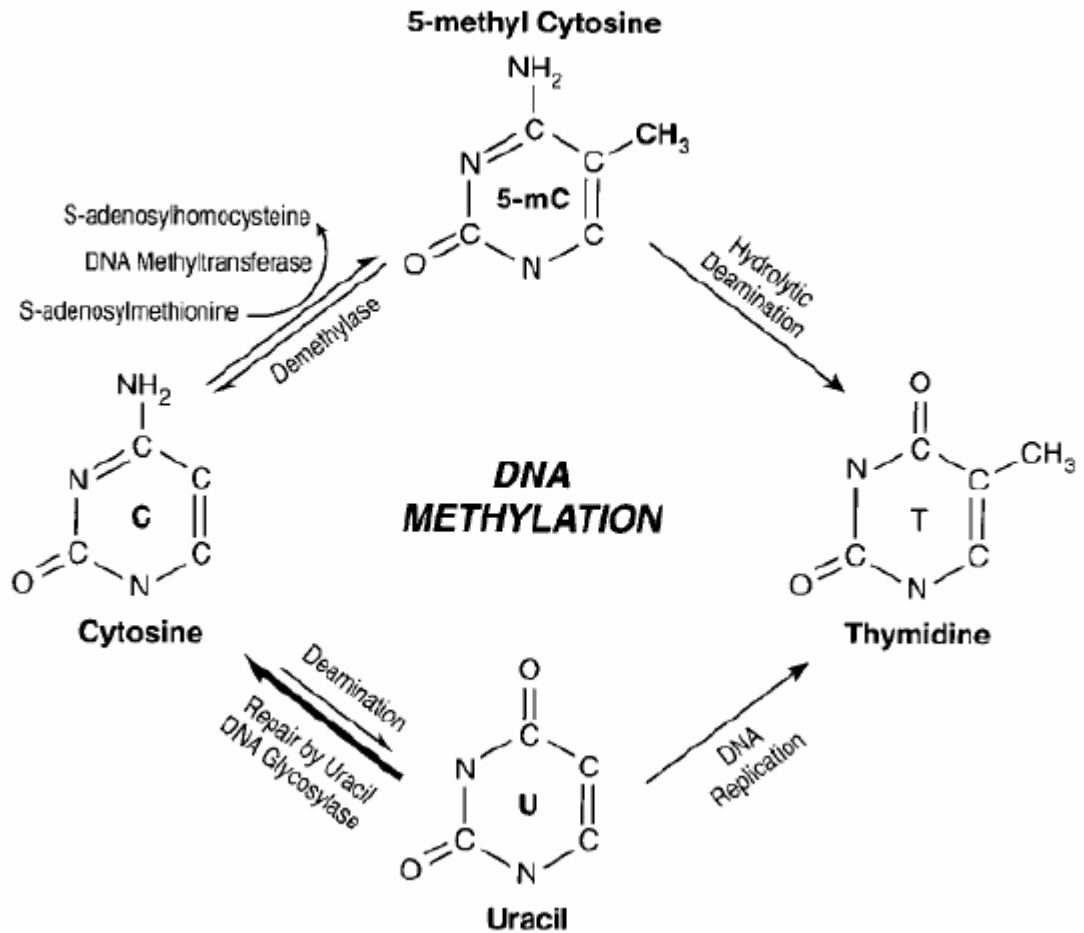
Şekil 2.16. Metilasyon-Tümör Baskılayıcı Gen İlişkisi (57) 2007:2

Metil-CpG, mutasyonel bir hotspottur ve germ-line ve kanserde bulunan bütün nokta mutasyonların 1/3'ü bu bölgededir (18, 50). Bir hücrede mutasyonun meydana gelmesinde birçok değişik faktörlerin etkisi vardır. Vücut tarafından üretilen reaktif oksijen türlerinin fazlalığı ve mevcut çevresel kirleticiler DNA'ya zarar vermektedir. Ancak şimdi kanser sürecinde metilasyonun da majör bir rol oynadığına dair önemli deliller vardır (57). Metile sitozinin kendisi de mutajeniktir. Spontan hidrofilik deaminasyon sonucu C-T transisyonu ortaya çıkar. Genin kodlayıcı bölgesindeki CpG dinükleotidlerinin metile halde olması, ultraviyoleye bağlı mutasyon sıklığını artırır; çünkü metil grubu sitozinin UV absorpsiyon spektrumunu değiştirir (18). DNA metilasyonu olası mutasyonların artmasına, protoonkogenlerin aktivasyonuna, tümör supressör genlerin sessizleşmesine ve ayrıca kromozomal instabiliteye neden olmaktadır (57, 63).

Normal bir şekilde metillenmemiş bölgelerde metilasyondaki artış, ilgili genlerin sessizleşmesine neden olmaktadır. CpG adacıklarındaki hipermetilasyondan dolayı belli kanserlerde birçok tümör supressör geni eksprese edilememektedir. Retinoblastoma (*Rb*) tümör supressör geninde CpG adacıklarında hipermetilasyon saptanmıştır. *Rb* geninin promotör bölgesindeki *in vitro* metilasyonun, promotör aktivasyonunu bloke ettiği gösterilmiştir (57).

CpG dinükleotid yapısında yer alan 5-metilsitozin timine, sitozin ise urasile yaygın olarak deamine olmaktadır. Sitozinin→urasile transisyonu Urasil-DNA glikosilaz enzimi ile etkili bir şekilde tamir edilebilmektedir. Ancak DNMT, sitozin→urasil→timin transisyonunda bu tamiri bloke etmektedir (57). Şekil 17’de DNA metilasyonundaki biyokimyasal yollar gösterilmektedir. Kanserde bazlarda meydana gelen bu transisyonel deaminasyon oranının çok yüksek olduğu bildirilmiştir (18, 57).

Metile CpG dinükleotid yapısındaki mutasyon oranının metil grubu taşımayan sitozine oranla 40 kez daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Diğer yandan metil ya da non metil sitozinin *in vitro* kültürasyonda *in vivo*’ya oranla üç kez daha fazla deamine olduğu saptanmıştır. Bu durum, hücrede deaminasyonun geriye dönüşümlü tamir edildiğini göstermektedir (57).



Şekil 2.17. DNA Metilasyonundaki biyokimyasal yollar (57) 2007:1

DNA metilasyonu, histon modifikasyonları, kromatin düzenleyici proteinler ve kodlanmayan RNA'lar kanser oluşumunun temelini oluşturur. Dolayısıyla bunların mekanizmasını çözmek kişiye özel kanser tedavisinin hazırlanmasında etkili olacaktır (63).

DNA metilasyonu karsinogeneziste önemli yer tutmaktadır. Esteller ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada 15 farklı tümör tipinde hipermetilasyon olduğu belirlenmiş çok sayıda gen bildirilmiştir. Bu genler arasında *p16INK4a*, *p15INK4b*, *p14ARF*, *p72*, *APC* ve *BRCA1* gibi tümör baskılayıcı genler, *MLH1*, *GSTP1* ve *MGMT* gibi DNA onarım genleri, *CDH1*, *TIMP3* ve *DAPK* gibi metastaz ve invazyon genleri bulunmaktadır (21).

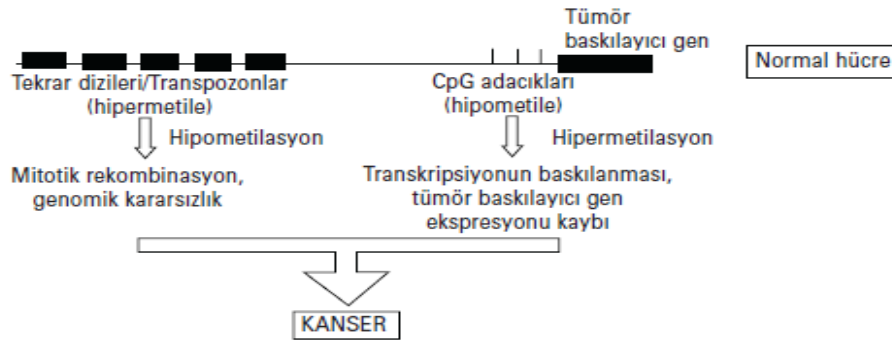
Erken tanı olanağı sağlayabilmesi, kanserin sınıflandırılması, prognozu ve tedavisi ile ilgili olarak yol gösterici olabilmesi nedeniyle metilasyon, kanser araştırmalarında önemli bir yere sahiptir (18).

DNA'nın epigenetik olarak tekrar düzenlenmesi, çok farklı kanser türünde etiyolojinin aydınlatılması, kanser türüne özgü markır olabilecek genlerin belirlenmesi, tedaviye yönelik yeni yöntemlerin geliştirilmesi amacı ile son yıllarda artan oranlarda araştırılmaktadır (57).

Son dönemlerde yapılan çalışmalar DNA metilasyonunu, serum, plazma ya da idrar gibi biyolojik örneklerde, kanserin erken dönemde tespitinde kullanılabilecek bir markır olarak öne çıkarmaktadır. Örneğin prostat kanserinde *GSTP1* geninde % 31 ve özofagiyal adenokarsinomada *APC* tümör baskılayıcı geninde % 25 oranında belirlenen hipermetilasyon, her iki tümörde de DNA metilasyon markırı olarak plazmada tespit edilebilmektedir (21).

2.5.5. Hipometilasyon/Hipermetilasyon

DNA hipermetilasyon/hipometilasyon, kromozom instabilitesine, retrotranspozon elementlerin ve onkogenlerin aktivasyonuna yol açarak karsinogenezisin gelişiminde önemli bir rol oynayan epigenetik mekanizmadır (21). Şekil 18'de DNA hipo/hipermetilasyonu ile kanser ilişkisi gösterilmektedir.



Şekil 2.18. DNA Metilasyonu ve Kanseri (17) 2007:51

2.5.5.1. DNA'nın Hipometilasyonu

Kanserin erken aşamasında sitozin metilasyonunda global bir azalma gösterilmiştir (hipometilasyon). Hipometilasyon, kromozomal instabiliteye ve bazı protoonkogenlerin ekspresyonunda artışa neden olmaktadır. Spesifik onkogenlerin insan tümörlerinde hipometillendiği gözlenmiştir (57).

69'li yılların sonunda tümör hücrelerinin genomunda metil sitozin sayılarında azalma olduğu gözlenmiştir. Bu durum DNA'nın az metillenmesi olarak isimlendirilmiş, benign ve malign tümörlerin genomlarında gösterilmiştir (20). Kanseri hücreleri normale göre %20-60 daha az metillenmiş sitozin içerir. Dokuya özgü aktif genler fonksiyonel oldukları dokuda hipometil, diğer dokularda hipermetil durumdadırlar. Dolayısıyla dokuya özgü house-keeping genler organizmanın yaşamı boyunca sürekli hipometil durumdadır (57, 62).

DNA metilasyonunun, kanser sürecine önemli katkı sağladığı gözlenmiştir. Tümör hücrelerinde hipometilasyon, genomun tekrarlayan bölgelerinden metilasyonun kaybına ve genlerin yeniden aktivasyonuna neden olur (35, 63). Genomik metilasyonun kaybı, kanserde sık ve erken gözlenen bir olaydır. Bu kayıp pek çok tümör çeşidinde metastatik potansiyel ve hastalığın şiddeti ile ilişkilidir. Promotör bölgelerinde hatalı sitozin birimlerinin hipermetilasyonu ise, tümör supressör genlerin transkripsiyonel sessizleşmesine, gen ekspresyonunda değişikliğe ve DNA tamir genlerinin inaktivasyonuna neden olmaktadır. Bu iki özellikte tümör hücresinin gelişimi için büyük bir avantaj kazandırmaktadır (35).

Hiperplazik polipler gibi adenom poliplerin de karsinoma donusumunde global az metillenmenin etkili olduğu bilinmektedir. hipometilasyonun daha önce sessizleşmiş retrotranspozonların yeniden etkinleşmesine neden olarak normal gen yapısı ve işlevinde bozulmalara neden olabileceği ileri sürülmüştür (20).

DNA'nın az metillenmesi onkogenleri etkinleştirebilir ve imprinting kaybına (LOI) yol açabilir, böylece hücre çoğalmaya teşvik edilmiş olur (20). Tümör oluşumu boyunca, kanser hücreleri CpG adacığı olmayan promotör bölgelerde CpG metilasyonu kaybı ile CpG hipermetilasyonu gerçekleşir (63).

Hipometilasyon kromozomal insitabilite, transpozabl elemanların reaktivasyonu, imprinting kaybı durumlarında kansere neden olur (18). Kromozomal bölgelerdeki yeniden düzenlenmeler, kromozom fragmentlerindeki kazanç ve kayıptan dolayı anormal gen dozajlarının etkisi sebebiyle hipometilasyon, malignensilere neden olmaktadır. Göğüs adenokarsinomaları, ovaryum, epitelyal tümörler ve sporadik Wilms tümörlerinde bu bölgeler hipometillenmektedir (57).

Kanserle metilasyon arasındaki ilişkide önemli noktalardan bir tanesi de genomda, yaşla birlikte promotör metilasyon yükünün artmasıdır. Yaşa bağılı olarak gerçekleşen bu artış, ileri yaşlarda kanser insidansındaki artışı, yani yaşlılık-kanser ilişkisini açıklayabilir. Ayrıca kanser hücreleri hızlı replikasyon döngüleri nedeniyle yaşlı hücreler olarak kabul edilmektedir (18).

2.5.5.2.DNA Hipermetilasyonu

Kanserde hipermetilasyon hipometilasyona göre daha çok çalışılmıştır ve karsinogeneztteki rolü daha iyi bilinmektedir. İnsan tümörlerinde CpG adacıklarının artmış metilasyonu ilk defa 1986'da rapor edilmiştir (57). CpG adalarında görülen aşırı metillenme kanser vakalarında önemli rol oynamaktadır (20, 57). Hipometilasyon genellikle uzun araya girmiş diziler gibi tekrarlayan DNA elemanlarında olmasına karşın, hipermetilasyon CpG adacıklarında olmaktadır (57). Global metilasyon kanser hücrelerinde normal hücrelerden daha az iken hipermetilasyon tümörün ilerleyişinde gerekli olduğu düşünülmektedir (62).

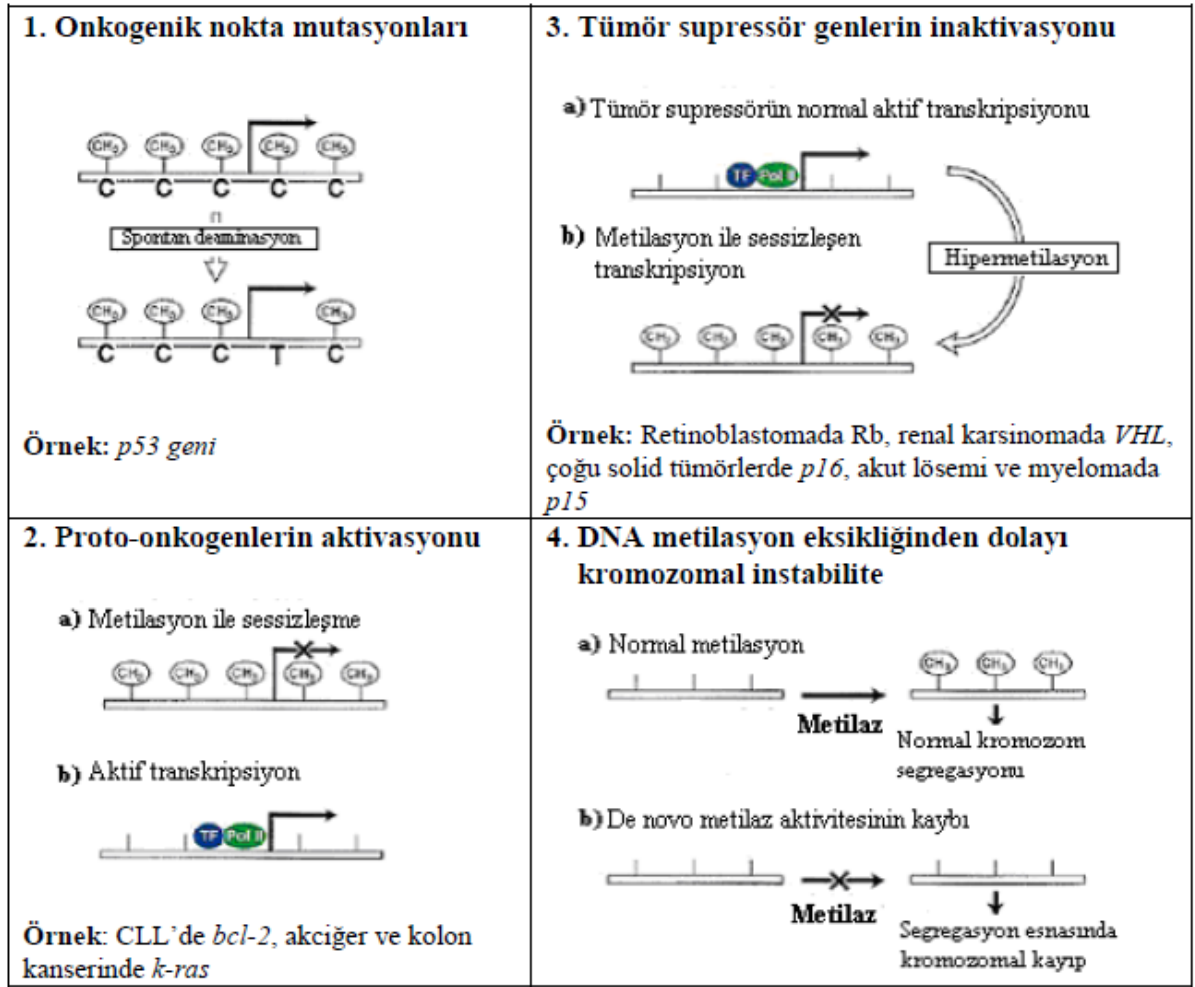
Kanser vakalarında retinoblastoma geninin metillenerek sessizleştiği bulunduktan sonra P16INK4A, VHL, APC, CDH1, MLH1 gibi diğer tümör baskılayıcı genlerle ilgili

çalışmalar da yapılmaya başlanmıştır (20). Metilasyondan sorumlu olduğu düşünülen bu genler;

- Hücre siklusunun regülasyonu (*p16INK4A* , *p15INK4B*, *Rb*, *p14ARF*)
- DNA tamir sistemi (*BRCA1*, *MGMT* (*O(6)*-metilguanin-DNA metiltransferaz))
- Apoptozis (*DAPK* (*ölümle-ilişkili protein kinaz*),
- İlaç direnci
- Detoksifikasyon
- Anjiogenez
- Metastaz gibi olaylardan sorumludur (35, 57).

Tümör gelişimi sırasında CpG adacıklarının hipermetilasyonunun önemi epigenetik olarak vurgulanmıştır ve inaktivasyon, tümör oluşumu sırasında gen ekspresyonu kaybı için primer mekanizmadır (57).

Epigenetik modifikasyonlardan, global hipometilasyon kromozom instabilitesi, mobil DNA ve onkogen aktivasyonuna neden olurken, hipermetilasyon, tümör suppressör genlerin promotör bölgelerinin transkripsiyonunu repress eder (57). Şekil 19’da DNA metilasyonunun kansere neden olabilen dört farklı mekanizması gösterilmektedir.



Şekil 2.19. Kansere neden olabilen DNA metilasyonunun dört farklı mekanizması (57) 2007:13

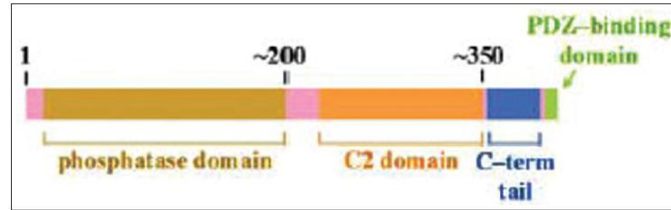
2.6. FOSFATAZ VE TENSİN HOMOLOG

PTEN geni ilk kez 1997 yılında tanımlanan bir tümör baskılayıcı gendir (4, 13, 64). Sıklıkla somatik kanserlerde inaktive olur (65) ve en çok mutasyona uğrayan tümör baskılayıcı gen olan *P53*'den sonra ikinci sırada yer alır (64, 66).

2.6.1. Yapısı

PTEN, 10q25.3 lokalizedir (65, 67), 403 aminoasit ve 47 kD olan bir proteini kodlayan (4, 13, 64, 66) 9 ekzonlu bir gendir. Ekzon 1-6, proteinin önemli domainini içeren ilk 185 aminoasitlik N-terminal domainini kodlar. Bu domain katalitik merkezi içeren genişletilmiş aktif bölgeye sahiptir (13, 64, 66). C-terminal domaini ise kalan aminoasitlerden oluşur ve C2, PEST ve PDZ olmak üzere 3 subdomaini içerir. C2; fosfolipitlere bağlanır, PEST; proteinin stabilitesinden sorumlu sekanstır ve PDZ; çeşitli

fosforilasyon bölgeleri ve fosfataz domaini ile etkileşime giren bağlanma motifidir (64, 66). *PTEN*'in yapı ve domainleri Şekil 20'de gösterilmektedir.



Şekil 2.20. *PTEN* yapı ve domainleri (13) 2013:2

2.6.2. Fonksiyonu

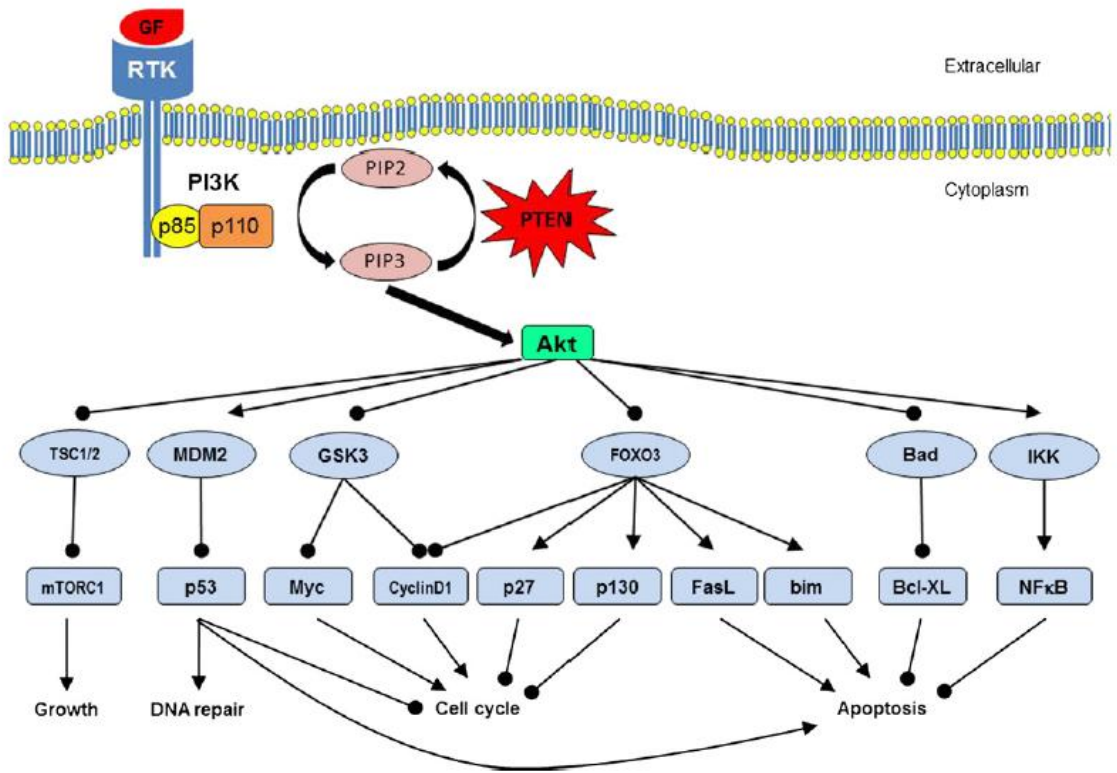
PTEN, yaşlanma, angiogenez, apoptozis, hücre döngü ilerlemesi, hücre kasılması, DNA hasarına yanıtı içeren sayısız süreçte görev alır (13).

PTEN geni hem lipid hem de proteinleri defosforile etme yeteneğine sahip bir çift spesifik fosfataz kodlar (64, 68, 69) ve bir enzimatik fonksiyonu olduğu bilinen ilk tümör baskılayıcı moleküldür (68-70).

PTEN geni (RefSeq NM_000314) 10. Kromozomun q (64) kolunda lokalize olan ve çeşitli kanserlerde önemli bir mediatördür. Tam anlamıyla tanımlanacak olursak; tümör baskılayıcı genlerin kaybı gelişmekte olan tümörlerin artışından bahseder. Bu genler, allellerden birisinin kalıtsal olarak inaktif olması sebebiyle ailesel kanser sendromları ile ilişkili genlerdir ve artan kanser riski otozomal dominant biçimdeki her bir nesil boyunca taşınabilir (71).

PTEN, tirozin fosfatazlar üzerinde araştırma yapılırken tesadüfen saptanmıştır (69). Tirozin fosfataz ailesinin bir üyesidir ve asıl işlevi defosforilasyondur (4). Yabanıl tip *PTEN* fosfoinositol 3-kinaz (PI3K)/Akt sinyal yolağının ana negatif düzenleyicisidir (30) ve bunu fosfotidil inositol trifosfatı (PIP3) defosforilleyerek yapar böylece PI3K aktivitesine ters olarak Akt yolağı baskılanmış olur (7, 66, 68). *PTEN*/PI3K/Akt yolağı Şekil 21'de şematik olarak gösterilmektedir. Fosfoinositilleri üç yerden defosforilleyerek hücre büyümesini ve hücrenin hayatta kalmasını sağlar (44, 30). Yani hücre içi proliferatif sinyallerin iletimi ve hücre siklusunun ilerlemesi inhibe edilmiş olur (68). *PTEN* kaybı ise endometrium kanser gelişiminde potansiyel bir inhibitördür (30).

PTEN; p27, p130, siklin D1 ve myc gibi kontrol noktalarının anahtar proteinlerini regüle eder, böylece hücre döngüsünün ilerleyişini ve DNA hasar kontrol noktalarını denetler (64). *PTEN* geninin mutasyonları, sentromer instabilitesi, çift zincirli kırıklar, tamir kusurları, hücre döngüsü kontrol noktası kusurları, apoptozise direnç, sürekli devam eden hücre döngüsü gibi çeşitli etkenlere sebep olur. PTEN hem de mitojen etkili kinaz yolağını inhibe ederek farklılaşma ve proliferasyonu regüle eder (64).



Şekil 2.21. PTEN/PI3K/Akt yolağı: hücresel etkileşimleri, GF büyüme faktörü, RTK reseptör Tirozin kinaz (64) 2012:3

Birden çok kanıt *PTEN* tümör baskılayıcı geninin endometrial karsinomada moleküler bir belirteç olduğunu desteklemektedir (36). Yani endometrial adenokarsinom patogenezinin katılan önemli bir gen olan (72) *PTEN*'in endometriumda 'gatekeeper' olduğu düşünülmüştür (37).

Adını fosfataz fonksiyonu ve tensin homolojisi özelliklerinden alan *PTEN*, ilk çalışmalar sırasında farklı araştırmacılar tarafından *MMAC1* (mutated in multiple advanced cancer) ve *TEP-1* (TGF β - regulated and epithelial cell-enriched phosphatase) olarak adlandırılmıştır (37, 45, 64, 68, 73).

PTEN, hücre büyümesi ve apoptoz için gerekli sinyal yollarını düzenlemede (PI3K/Akt sinyal yolu antagonisti) önemli rol oynar (8, 10, 28, 73). Bu düzenlemeyi embriyonik gelişimde ve kanser biyolojisinde rol oynayan integrin fonksiyonlarını negatif olarak düzenleyerek yapar (69). Bu yolakta PTEN'in görevi bir tümör baskılayıcı olarak PI'yı P3'e fosforile edip Protein Kinaz B (PKB)/Akt kinazın baskılayıcı aktivitesini azaltmaktır böylece hücre döngüsünün tutuklanması ve/veya apoptozis indüklenir (8, 73).

PTEN ekspresyon kaybı ile tümör dokusunda Akt anlamlı bir şekilde fosforile olur yani fosfo-Akt ekspresyonu ile *PTEN* ekspresyonu negatif bir şekilde korelasyon gösterir (7). Kanser hücresinde Akt onkogeninin amplifikasyonu ya da baskılayıcı regülatörlerin aktivasyonu sayesinde Akt aktivasyonu sağlanır. Akt, hücreyi stres tarafından teşvik edilen apoptozisten koruyan bir hayatta kalma sinyali verir. Etkili Akt inhibitörlerinin gelişimi endometrium kanserinin tedavi stratejisinde de umut vaat edicidir (26).

Ayrıca *PTEN* sinyal transdüksiyon lipidlerinin defosforilasyonunda da anahtar rol oynar. PTEN yokluğunda lipid sinyal transdüksiyonu yoluyla tümör hücreleri apoptozdan korunabilir. *PTEN*, lipid fosfataz ve protein tirozin fosfataz aktiviteli önemli bir tümör baskılayıcı gen olup ekstrasellüler matriks ve hücre etkileşimlerinin negatif düzenleyicisidir (69).

Hücre uyarıcı sinyalleri ile aktive olan PI3K, fosfotidil inozitol bifosfatı (PIP2) fosforilleyerek membranla ilişkili bir lipid medyatör olan PIP3'e çevirir (7, 68). Bir ikincil mesaj molekülü olan PIP3 ise bir onkoprotein olan serin/treonin protein kinaz Akt molekülünü aktive eder (26, 28, 7). PKB olarak bilinen Akt, (10) aktive olduktan sonra intrasitoplazmik pek çok kinazın, transkripsiyon faktörünün ve regülatör molekülün fosforilasyonunu gerçekleştirerek hücre, gelen uyarıcı sinyallerin nükleusa iletilmesini sağlamış olur (68).

PTEN, reseptör tirozin kinazlar tarafından hücre içine aktarılan ve daha sonra PI3K aracılığı ile çekirdeğe ulaştırılan sinyal iletim yolağında görev almaktadır. Lipit fosfataz aktivitesi ile bu yolaktaki PI3K ürünleri olan PIP3'ları defosforile ederek hücre çoğalmasını uyacak sitomulusların çekirdeğe iletilmesini engellemektedir (68). PIP3, büyüme faktörlerinin hücre membran reseptörlerine bağlanması ile PI3K enzimi tarafından üretilir. PIP3 üretimi sonucunda hücre proliferasyonuna katılan diğer proteinlerin fosforilasyonunda rol alan protein kinaz Akt aktive olur. PTEN, PIP3

seviyesini baskılayarak hücre proliferasyonunda ‘down regulator’ olarak fonksiyon görür. Bu nedenle PTEN aktivitesinin kaybı, PI3K/AKT sinyal yolağında disregulasyona sebep olarak kontrolsüz hücre proliferasyonuna neden olur (74).

PTEN mutasyonlarının ilerleyici birikimi hastalığı premalignden maligne dönüştürebilir. Farklı metilasyonlar tarafından *PTEN*’in epigenetik regülasyonunu içeren diğer mekanizmalar *PTEN*’in ekspresyon kaybına katkıda bulunabilir (37).

Farklı metilasyonlar, birçok kanserin gelişimine sebep olan önemli bir epigenetik kontrol mekanizmasıdır. Araştırmalar gösterdi ki; normalde unmetile olan genlerin promotör bölgelerinin metilasyonu transkripsiyonel inaktivasyona yol açarak tümör oluşumuna sebep olur (37).

Promotör bölgenin, histon deasetilasyonu gibi diğer DNA modifikasyonlarının ya da her ikisinin hipermetilasyonu yoluyla genlerin epigenetik inaktivasyonu tümör baskılayıcı genleri susturabilir. Gerçektende sporadik kanserlerde epigenetik düzenleme yoluyla tümör baskılayıcı genlerin sessizleşmesi iyice belgelenmiş bir olaydır ve spesifik tümör baskılayıcı genlerin varlığında gen mutasyonundan ziyade inaktivasyon mekanizması daha yaygın görülür. Bu durum bazen germline olarak oluşabilir ve bu yüzden epigenetik değişiklikler, epimutasyonlar sonraki nesillere taşınabilir ve bu bireyler belli kanserlerde artmış risk yatkınlığına sahip olabilirler (71).

Değişmiş *PTEN* fonksiyonu premalignant fazdaki endometrial kanserlerin çoğunun etiyolojisinden kısmen sorumludur ve kansere ilerlemeye katkı sağlar. Bu yüzden *PTEN* ekspresyon ya da fonksiyon kaybı erken endometrial prekanserlerin bir belirteçidir (72). *PTEN knockout* farede endometrial hiperplazi ve endometrial kanser geliştiği gözlenmiştir (12, 36, 72).

2.6.3. PTEN’in İnaktivasyonu

PTEN, ubiquitin-proteosom yolağı tarafından sitoplazma içinde degrade olur. Şaşırtıcı bir şekilde, ubiquitin kesildiği yerde mono-ubiquitine PTEN çekirdeğe transloke olduğu sırada, sitoplazmada degrade olan poliubiquitine PTEN olduğu gözlenmiştir (64).

PTEN mutasyonları ve diğer genetik değişiklikler *PTEN*’in fonksiyonunu bozabilir. Normal hücreler genellikle neoplazi boyunca kaybolan güçlü nükleer *PTEN* ekspresyonu gösterirler. PTEN protein degradasyonu ya da relokalizasyonu sinyal ağlarını ve tümorogeneze doğru dengeyi bozabilir. En doğal oluşan *PTEN*

mutasyonları, *PTEN* missense mutasyonlarının %90'ı azaldığında ya da lipit fosfataz aktivitesi çıktığı zaman hem lipit hem protein fosfataz inaktive olur. Aksine tüm *PTEN* mutasyonlarının %40'ı C2 domainini içerir. Kanıtlar gösteriyor ki *PTEN* allellerinden birisi mutanttır (64).

2.6.4. Tümörlerde Pten Anormallikleri

- 1- Monoallelik *PTEN* (64).
- 2- **Biallelik *PTEN*:** endometrium kanserinde yaklaşık %50 (64).
- 3- ***PTEN* Germline Mutasyonları:** Cowden sendromunda gözlenir (37, 45) ve bu sendrom endometrium kanseri açısından büyük risk taşır (64, 67).
- 4- ***PTEN* Somatik Mutasyonları:** Sporadik primer kanserler arasında sıklığı büyük farklanma gösterir, en çok endometrium kanseri ve glioblastomada görülür (64). Somatik mutasyonlar tip I endometrial kanserli hastaların yaklaşık yarısında rapor edilmiştir (36, 72).

PTEN değişiklikleri sporadik endometrial kanserlerin çoğunun karsinogenezinde önemli bir rol oynar. *PTEN* değişiklikleri ve mutasyonlarının endometrium kanserinde yanlış eşleşme tamiri eksikliğinin gelişiminde erken ya da prekanser evrede oluşur (64).

Endometrial adenokarsinomların tüm histolojik alt tipleri arasında endometrioid alt tip somatik *PTEN* mutasyonlarının en yüksek oranına sahip görülür. Rutin histoloji endometrioid endometrial adenokarsinomları non-endometrioid tümörlerden kolayca ayırt eder. Endometrioid endometrial adenokarsinomlarının riski, progestinler tarafından karşılanmamış yüksek östrojen seviyeli hastalarda ve fiziksel olarak ayırt edici prekanseröz lezyonlu hastalarda artar (72).

2.6.5. Pten Tümör Baskılayıcı Geninin Hipermetilasyonu

Genlerin promotör bölgelerinin hipermetilasyonu tümörlerde en fazla gözlenen epigenetik değişikliktir. Kanserlerde hipermetile olan genler tümör oluşumunu, invazyonunu, metastazını baskılayan veya oluşan DNA hasarlarını tamir eden tümör baskılayıcı genlerdir. Ailesel kanser formlarına neden olan genlerin %50'sinin sporadik kanser olgularında hipermetilasyona uğradığı gösterilmiştir (18).

Knudson'ın çift vuruş hipotezine göre tümör baskılayıcı gen kaybı sonucu kanser gibi fenotipik bozuklukların ortaya çıkabilmesi için genin her iki allelinin de inaktive olması gerekmektedir. Yapılan birçok çalışmada germline olarak kalıtılan ilk mutasyondan sonra ikinci mutasyonun/vuruşun gerçekleşmesinde en önemli mekanizmalardan birisinin metilasyon olduğunu göstermiştir. Burada mutasyonlu allelin promotör bölgesinde herhangi bir değişiklik olmazken, sağlam allelde metilasyon sonucu inaktivasyon meydana gelmektedir (18).

2.7. KANSERİN ERKEN TANISINDA DNA METİLYASYONU

CpG adacıklarının artmış metilasyonu, kanserin erken tanısı için geliştirilen teknikler arasında en cazip markırdır. DNA metilasyonunun 3 anahtar özelliği, bu amaç için kullanılacak en iyi tümör markırı olduğunu göstermektedir. İlk olarak kanserde birçok CpG adacığında metilasyon oranı artmaktadır. Ancak normal dokularda bu oran çok nadirdir ya da hiç metillenme olmaz. İkinci olarak, gen içerisinde bir çok noktada meydana gelebilecek olan genetik mutasyonun aksine DNA metilasyonundaki değişimler, genin bir çok spesifik noktasında meydana gelen transkripsiyonun kaybı ile ilişkilidir (57).

Üçüncü olarak, polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) temelli tekniklerin gelişimi ile (özellikle metilasyona spesifik PZR), tümör kaynaklı DNA örneklerinde, metilasyon bozuklukları çok kısa sürede saptanabilmektedir (57).

Yapılan çalışmalarda, birçok genin promotör metilasyonunun, normal dokularda saptandığı ancak bu metilasyonun yaşla birlikte arttığı gösterilmiştir. Bununla birlikte tüm genler, yaşla ilişkili metilasyon şüphesi göstermemektedir (57).

2.8. METİLYASYONU BELİRLEMEDE KULLANILAN YÖNTEMLER

Günümüzde DNA metilasyon analizi için kullanılan çok sayıda yöntem bulunmaktadır (35, 49, 62). Bu yöntemler; hibridizasyon (Southern blot ve mikroarray), restriksiyon enzim PZR, metilasyon- duyarlı restriksiyon enzimlerle kesme, metilasyona-hassas tek nükleotid primer uzaması ve bisülfıt genomik DNA dizi analizi teknikleri temeline dayanmaktadır (49, 62).

2.8.1. Southern Blot

DNA metilasyon analizlerinde çok sık kullanılan bir tekniktir. Bu metotta, genomik DNA aynı dizi için spesifik metilasyon-spesifik ve metilasyona-spesifik olmayan

endonükleazlarla kesilir (*HpaI* ve *MspII*, *Sma I-XmaI* gibi) (48, 57). Bu enzimler unmetile kromozomları küçük parçalara ayırırken metile DNA bu traşlamadan kaçır. Daha sonra bu parçalar PZR ya da Southern blot yolu ile test edilir (48). Southern blot yapılırken agaroz jel üzerinde ayrılan restriksiyon fragmentleri bir membrana transfer edilir ve hedef dizi için spesifik bir proba hibridize edilir. Otoradyografi ile boyutları tahmin edilen bandların varlığı gösterilir. Southern hibridizasyon metodu için yüksek moleküler ağırlıklı büyük miktarlarda DNA gerekmektedir (57).

2.8.2. Mikroarray

İlk olarak, Huang ve ark. metilasyona spesifik restriksiyon enzimi ile kombine ederek mikroarray temelli bir teknik geliştirmişlerdir ve bu teknik ile simultan olarak binlerce CpG adacığının görüntülenmesini sağlamışlardır. Bu yöntem bilinmeyen metilasyon hotspotlarını belirlemek için veya genomdaki metile CpG adalarını saptamak için kullanılır. DNA'nın bisülfitle modifikasyonunun ardından çoklu-PZR yapılır. Kullanılan primerler bisülfitle modifiye edilen ipliğe spesifiktir. Böylece tamamlanamamış bisülfid modifikasyonundan doğan hatalı sonuçlar engellenmiş olur (49).

2.8.3. Restriksiyon Enzim PZR

Restriksiyon enzim PZR yönteminde ise, genomik DNA metilasyona spesifik ve metilasyona spesifik olmayan restriksiyon enzimlerle bağlanır ve sindirilen DNA, hedef bölge primerler kullanılarak amplifiye edilir. Hedef dizi metillenmiş CpG alanlarını içeriyorsa amplifiye DNA'nın boyutu tahmin edilebilir. PZR'den önce metilasyona spesifik olmayan endonükleazların kullanımı ile hedef DNA dizisinin metilasyon bölgesi önemsizse olası amplifikasyon gerçekleşmeyecektir. Bu yöntemde enzim sindirimi tam olarak gerçekleştirilmelidir. Metillenmiş ve metillenmemiş hedef bölgede CpG alanları varsa, yetersiz sonuçlar elde edilecektir. Ama yine de bu teknik hedef dizide DNA metilasyonunun izlenmesinde çok önemlidir (57, 62).

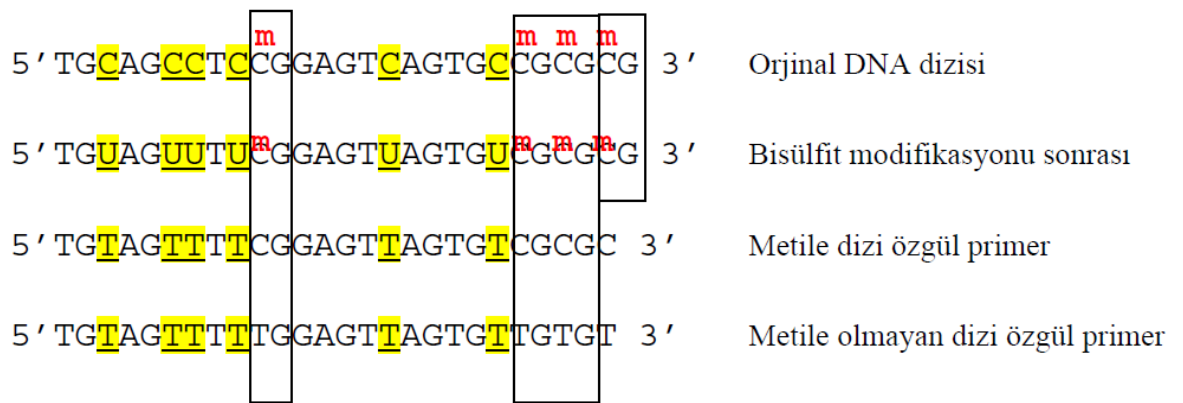
2.8.4. Metilasyon Özgül PZR (MS-PZR)

Metilasyona Spesifik PZR (MSP), ilk olarak 1996'da Herman et al. tarafından tanımlanmış bir tekniktir (35, 57). MSP, DNA metilasyon analizinde yaygın olarak kullanılan metotlardan biridir (57). Metilasyon için özgül ve duyarlı bir yöntemdir (35). Bisülfid uygulamasından sonra, metillenmiş ve metillenmemiş DNA arasındaki mevcut

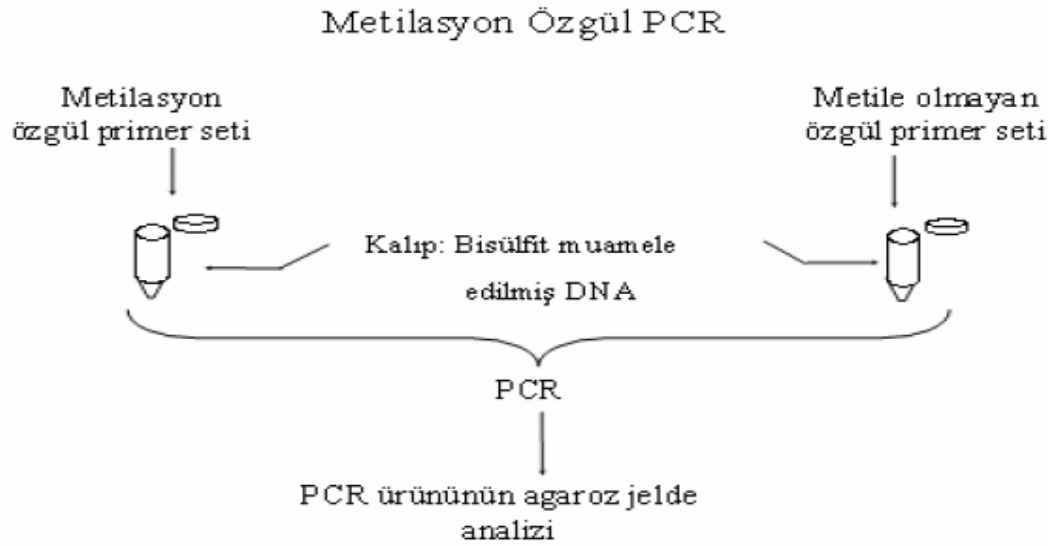
dizi farklılıklarından yararlanılarak yapılmaktadır (62). MSP’de, kalıp olarak kullanılacak DNA, bisülfıt muamelesi ile modifiye edilir (35, 49). Sitozinler, urasile deamine olur (35, 49) ve sitozinler PZR sırasında timin gibi replike olur (35, 49, 57). Her DNA örneği için iki PZR reaksiyonu yapılır (35, 49). Primerlerin yerleşimi, özellikle ya metillenmiş (C) ya da modifiye (T) alanları içeren dizilerde olur. Metilasyona özgöl bir primer dizaynı Şekil 22’de gösterilmektedir. PZR sonrası, amplifiye edilmiş olan DNA, metilenmiş ya da metillenmemiş diziler için spesifik primer çiftiyle elde edilir. MSP, DNA’nın bir bölgesindeki metilasyonun varlığının saptanmasında kullanılan hızlı ve kaliteli bir metoddur (57, 62). MSP’ye ait genel taslak Şekil 23’de gösterilmektedir. Bu yöntemle az sayıda metile olmuş allelin saptanması mümkündür (49).

Hassas olan ve kolayca kullanılan bu yöntem sınırlı sayıdaki CpG dinökleotitlerini analiz edebilir. Ayrıca bu yöntem tek bir CpG bölgesinin metilasyon durumu hakkında tam bilgi sağlayamaz (75).

Bu yöntem için primerlerin dikkatli seçilmesi çok önemlidir. Çünkü metil ve unmetil primer çiftlerinin her ikisi ile yanlış pozitif sonuç elde edilebilir. Genomik DNA’nın tamamlanmamış bisülfıt modifikasyonu, metilenmiş sitozin için yanlış pozitif sonuç vermesine neden olabilir (57, 62).



Şekil 2.22. Metilasyon Özgül primer dizaynı (35) 2008:34



Şekil 2.23. Metilasyon Özgül PZR (35) 2008:34

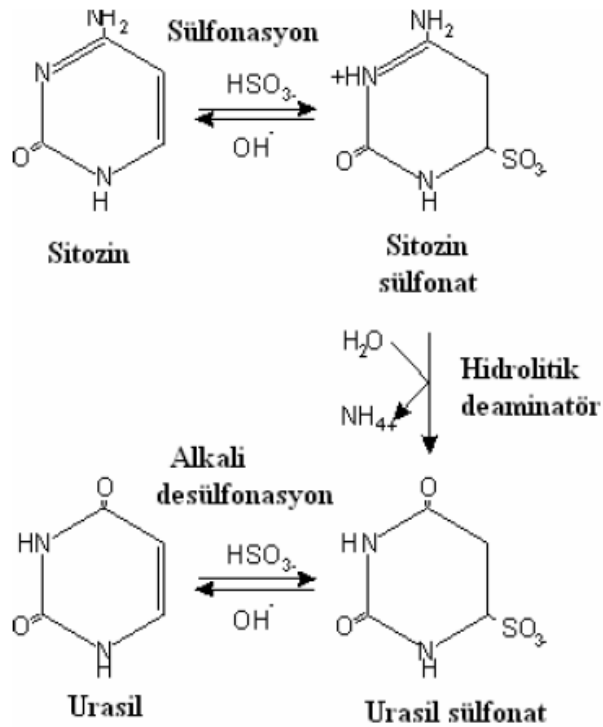
2.8.5. Metilasyona-Hassas Tek Nükleotid Primer Uzaması

Metilasyona-hassas tek nükleotid primer uzaması, ilk olarak Kuppuswamy ve ark. tarafından tanımlanmıştır ve anormal allellerde mutasyonun belirlenmesinde kullanılmaktadır (57, 62). Bisülfite uygulaması ve modifiye DNA için spesifik primerler ile hedef dizinin amplifikasyonundan sonra, amplifiye DNA metilasyona hassas tek nükleotid primer uzama reaksiyonu için bir kalıp olarak kullanılır. Tek nükleotid uzaması reaksiyonunda kullanılan primerler, metilasyon bölgesini tanıyan bağlama bölgesinden sadece bir nükleotid öncesine göre dizayn edilmektedir. Saflaştırılmış amplifiye DNA radyoaktif dCTP ya da dTTP ve DNA polimeraz ile inkübe edilir. Eğer hedef bölge metillenirse, bir sitozin (C) nükleotid uzaması sırasında birleştirilmektedir. Eğer bölgede metillenme yoksa, sitozin yerine timin (T) birleştirilir. Primer dizaynı ve DNA'nın tam modifikasyonu, yapılan analizlerde iyi sonuçlar elde edilmesi için önemlidir (57).

2.8.6. Bisülfite DNA Dizi Analizi

DNA metilasyonunu çalışmak için altın standart, bisülfite muamelesi tarafından sitozinin urasile dönüşüm modifikasyonu ve bunu takiben dizideki değişikliklerin PZR ve DNA dizi analizi ile saptanmasıdır (35, 59).

Bisülfıt modifikasyonu, genomda bulunan tüm metile ve metile olmayan CpG adalarını saptamak için kullanılır (35). Bisülfıt DNA dizi analizi, 5-metilsitozin içeren DNA dizileri için genlerin metilasyon durumlarının analiz edilmesinde yeni tekniklerin gelişmesine neden olmuştur. Bu yöntem, ilk olarak Frommer ve ark. tarafından tanımlanmıştır. Bisülfıt DNA dizi analizindeki amaç genomik DNA'daki 5-metilsitozinin belirlenmesi esasına dayanır (57, 62). Sodyum bisülfıt, tek iplik DNA'da lokalize olan sitozini deamine eder. Bu reaksiyonda DNA, önce denatürasyon ile tek zincirli forma geçer. Ardından sırasıyla; sitozinin bisülfıt reaksiyonu ile sitozin sülfonata, hidrolitik deaminasyon ile urasil sülfonata ve alkali desülfonasyon ile urasile dönüşümü gerçekleşir. Böylece tüm sitozinler urasile dönüşür, ancak 'metile sitozin', sitozin olarak kalır (35, 57, 59, 62). Bisülfıt modifikasyonu şematize olarak Şekil 24'de gösterilmektedir.



Şekil 2.24. Bisülfıt modifikasyonu (35) 2008:33

Bisülfıt modifikasyon işleminde dikkat edilmesi gereken önemli noktalar bulunmaktadır. Örneğin, reaksiyonun alkalın ortama dönmesi, sodyum bisülfıtın degradasyonuna neden olmaktadır. Ayrıca bisülfıt ile inkübasyon süresi uzun tutulursa,

pürin bazlarının %60'ında ve DNA molekülündeki fosfodiester bağlarda hasarlar oluşur, primidin bazları yıkılır (35).

Son zamanlarda bisülfüt muamelesi esasına dayanan metodlar yaygın olarak kullanılmaktadır (49). Bisülfüt kimyasal modifikasyondan sonra metile olan ve olmayan DNA'nın analizi için farklı yöntemler kullanılmaktadır. Bunlar kalitatif (MSP vs.) ve kantitatif (Bisülfüt genomik sekanslama, COBRA (Combined Bisulfite Restriction Analysis) vs.) metilasyon analiz yöntemleridir (35, 49).

Bisülfüt modifiye DNA'da, metile olmayan DNA'dan metile DNA'yı ayırmak için iki farklı metilasyon özgül primer seti kullanılır. Metile primer, metilasyondan dolayı CG içerirken, metile olmayan primer aynı DNA bölgesine yerleşmekle beraber TG içerir (35).

Bisülfüt PZR sonrasında elde edilen ürün, iki farklı şekilde analiz edilebilir. Bunlardan ilki, restriksiyon enzimler kullanılarak elde edilen PZR ürünündeki kesim sonrası analizidir. Bu yöntemde CGCG dizisini tanıyan *BstUI* gibi bir enzim kullanılarak bu dizilerdeki değişime (metilasyon var ise dizi korunur, metilasyon yok ise TGTG' ye dönüşür ve kesim bölgesi kaybolur) bağlı desen elektroforez sonrası incelenir. Bu teknik COBRA olarak adlandırılır (35, 62). Daha duyarlı sonuç veren diğer yöntem ise elde edilen bisülfüt PZR ürününün çift yönlü DNA dizi analizidir. Elde edilen analiz sonucu, referans DNA dizisi ile kıyaslanarak metilasyon analizi kantitatif olarak gerçekleştirir (35).

İnsan tümörögenezinde tümör baskılayıcı genlerinin hipermetilasyon ilişkili sessizleşmesinde en önemli ve en yaygın epigenetik mekanizma analizi edilmiştir. Bu anormalliğin analizi için metilasyon durumunda quantifikasyonunun yokluğu ve analiz edilebilir CpG bölgelerinin sayısının sınırlı oluşu gibi kısıtlamalar ile bu tekniklerde aksaklıklar olur. Pyrosekanslama bu kısıtlamaların üstesinden gelen, heterojen metilasyon modeline sahip genlerin analizi için faydalı olan yeni bir tekniktir. İlk raporlar tek bir CpG bölgesindeki metilasyon seviyesinin tam quantifikasyonunu gösteren bu tekniğin güvenilirliğini göstermiştir (75).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma için gerekli olan parafine gömülü bloklar Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı ve Kayseri Kadın Doğum Ve Çocuk Hastalıkları Hastanesi'nden sağlanmıştır. Moleküler çalışmalarda Erciyes Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiş olup aşağıdaki gereçler kullanılmıştır.

3.1. GEREÇLER

3.1.1. Demirbaş Malzemeler

1. Pyromark Q 26 Cihazı (QIAGEN)
2. Santrifüj Cihazı Mikro 22 (Hettich Zentrifugen)
3. Termal Cyclers PZR Cihazı (SensoQuest)
4. Soğutmalı Santrifüj Cihazı (Sigma)
5. Vorteks Cihazı (Heidolph)
6. Isıtıcı Blok TH2 (HLC Biotech)
7. Mikropipet (Gilson Eppendorf)
8. T-Shaker (Euroclone)
9. Distile Su Cihazı (Diret-Q.UV Millipore)
10. Mikrotom (Leica RM 2155)

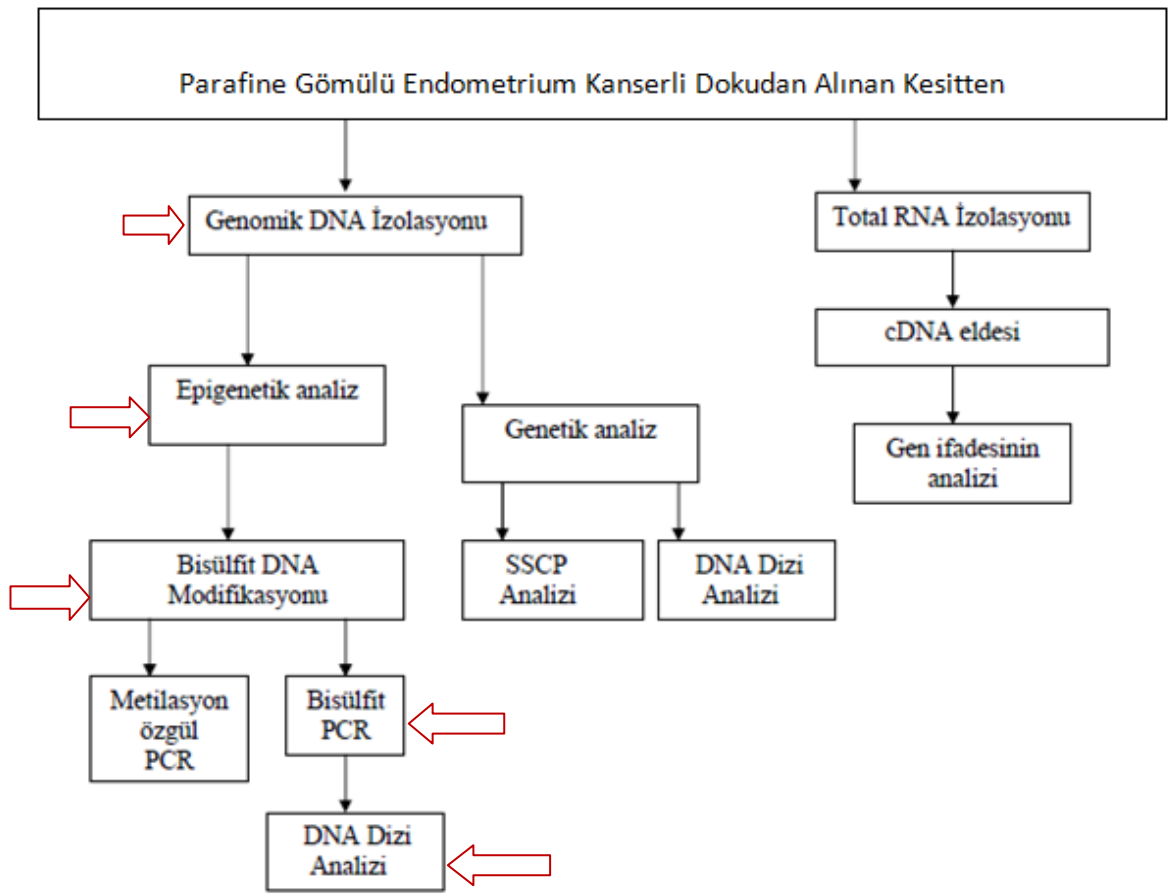
3.1.2.Sarf Malzemeleri

1. DNA FFPE Tissue Kit (QIAamp)
2. PZR Control DNA Set (EpiTect)
3. Bisulfite Kit (EpiTect)
4. Gold Q26 Reagents (PyroMark)
5. Binding Buffer (PyroMark)
6. Denaturation Solusyonu (PyroMark)
7. Wash Buffer (PyroMark)
8. Annealing Buffer (PyroMark)
9. Q26 Plate (PyroMark)
10. PZR Kit (PyroMark)
11. Q26 CpG PTEN Kit (PyroMark)

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Doku Kesiti Alınması (Mikrotom Cihazı)

Mikrotom cihazı blok tutucu yuvasına parafin blok kesitleri yerleştirildi. Dokunun ön yüzü bir miktar traşlanarak ana dokuya ulaşıldı. 5 mikron kalınlığında 5 kesit alınıp 2 ml'lik ependorf tüplerine yerleştirildi. Bu işlem Erciyes Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında gerçekleştirilip geri kalan işlemler Erciyes Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalında yapıldı. Şekil 1'de çalışmamıza ait taslak plan şematize olarak gösterilmektedir.



Şekil 3.1. Çalışma yöntemimize ait genel bakış

3.2.2. Genomik DNA İzolasyonu

Parafinli doku kesitlerinden Genomik DNA izole etmek için QIAamp DNA FFPE Tissue kiti ve bu kite ait prosedür kullanılmıştır. DNA izolasyonu kritik bir prosedür olup aşağıda kısaca özetlenmiştir.

3.2.2.1. Prosedür:

1. Kesitlerin alındığı ependorf tüpe 1 ml xylene eklenip ve 10 sn vortekslenir.
2. Oda sıcaklığında 5 dk 14000 rpm’de ependorf tüp santrifüj edilir.
3. Santrifüj sonrası pelet (çökeltinin) üstünde yüzen kısım (süpernatant) pipetle uzaklaştırılır. Ancak pelete dokunulmaz.
4. Pelet üzerine 1 ml saf (%96-100) ethanol eklenip yeniden vortekslenir

5. Karışım oda ısısında 14000 rpm’de 1 dk santrifüj edilir ve tekrar süpernatant atılır.
6. Pelet oda ısısında (15°-25° C) 10 dk inkübasyona bırakılır.
7. Pelet üzerine 180 µl ATL buffer, 20 µl proteinaz-K eklenip vortekslenir.
8. 56° C de 1 saat inkübasyona bırakılır.
9. Ardından 90° C de 1 saat daha inkübasyona bırakılıp süpernatantdan kurtulmak için yeniden 14000 rpm’de 1 dk santrifüj edilir.
10. Pelet üzerine 200 µl buffer AL eklenip vortekslenir.
11. Tüm lizat dikkatlice QIAamp MinElute kolona transfer edilip kapağı kapatılır ve 6000 x g (8000 rpm) de 1 dk santrifüj edilir. Ardından kolon temiz bir 2 ml’lik toplama tüpüne alınır. Bu aşamada Genomik DNA kolona tutunduğundan diğer hücre lizatları kolondan süzülerek toplama tüpünde biriktirilir ve süzüntüyü içeren toplama tüpü değiştirilir.
12. QIAamp MinElute kolonu dikkatle açıp 500 µl Buffer AW1 eklendi. 8000 rpm de 1 dk santrifüj edilir. Her işlemde membrandan lizatın tamamen süzülmesine dikkat edilir. Her santrifüj sonrası toplama tüpü değiştirilir.
13. Kolona 500 µl buffer AW2 eklenir. 14000 rpm’de 3 dk santrifüj edilerek mebranın tamamen kuruması sağlanır.
14. Bu işlemin ardından kolonda tutulu DNA üzerine 20-100 µl buffer ATL eklenir.
15. QIAamp MinElute kolonunun tüpünün kapağı kapatılıp oda sıcaklığında 1 dk inkübasyona bırakılır ve son kez 14000 rpm’de 1 dk santrifüj edilir. Kolonu bırakan DNA artık epandorf tüptedir.

3.2.3. Genomik DNA’ya Bisulfit Uygulanması

3.2.3.1. Prosedür:

1 µl’de 10 ng DNA olacak şekilde hasta grubu ve kontrol grubu DNA’sı seyreltildi. Genomik DNA’nın bisulfit ile muamele edilmesi için EpiTect Plus Bisulfite Conversion Kit (Qiagen) kullanılarak bisulfit işlemi gerçekleştirildi.

800 µl RNase free water ile Bisulfit kit Mix 5 dk vortekslenerek çözüldü. Daha iyi çözmek için 60 C° ‘de inkübe edilebilir.

EpiTect PZR Kontrol DNA kiti; Bisülfite Converted Metile DNA, Bisülfite Converted Unmetile DNA ve Unmetile DNA olmak üzere 3 farklı kontrol DNA'yı içermektedir. Bunlardan Unmetile DNA'ya bisülfite ile muamale edildi. Böylece Bisülfite Converted Unmetile Kontrol DNA ile bizim bisülfite işlemi yaptığımız Unmetile DNA kıyaslanarak bisülfite işleminin başarılı olduğu ispatlanır.

Bisülfite Mix	85 µl
DNA Protect Buffer	35 µl
RNase free water	15 µl
DNA	5 µl (total 100 ng DNA)

135 µl mix dağıtılır ve üzerine 5 µl DNA eklenir ve inkübasyona alınır.

İnkübasyon şartları;

95 °C 5dk

60 °C 25dk

95 °C 5dk

60 °C 85dk

95 °C 5dk

60 °C 174dk

20 °C ∞

3.2.4. Bisülfite lenmiş DNA'nın Temizlenmesi

Bisülfite ile muamele edilen tüm örneklere Clean up işlemi uygulanır.

3.2.4.1. Prosedür:

1. Bisülfiteleme işlemi tamamlandıktan sonra PZR tüpleri kısa bir süre santrifüj edilir ve temiz 1,5 ml'lik mikro santrifüj tüplerine alınır.
2. 10 µg/ml taşıyıcı RNA içeren 310 µl yeni hazırlanmış Buffer BL, örneğe eklendi ve vorteklendi. Maksimum hızda çok kısa santrifüj edildi.

3. 250 µl ethanol (%96-100) eklenir ve 15 sn vortekslenir ve kısa süre santrifüj edilir.
4. EpiTect kolonlara alınan örneklerde aynı işlemler 2.kez yapılır ve 1 dk daha maximum hızda santrifüj edilir.
5. 500 µl Buffer BW her kolona ilave edilir ve maximum hızda 1 dk santrifüj edilip toplama tüpü değiştirilir.
6. 500 µl Buffer BD eklenip 15 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakılır (15°-25° C)
7. 1 dk boyunca maximum hızda yeniden santrifüj edilen örneklere, 2 kez daha Buffer BW eklenir ve toplama tüpü değiştirilir.
8. Kolonlardan 2 ml'lik toplama tüpüne alınan örnekler 1 dk boyunca kalıntı sıvıdan arındırılmak için maximum hızda santrifüj edilir.
9. 250 µl ethanol (%96-100) her bir kolona eklenir ve maksimum devirde 1dk santrifüj edilir.
10. Kolonlar kapakları açık olacak şekilde 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne alındı ve ısıtıcı blokta 60° C'de 5 dk inkübasyona bırakıldı.
11. Kolonlar 1,5 ml'lik yeni mikrosantrifüj tüplerine alınır. 20 µl Buffer EB kolon membranının merkezine bırakılır. Kolonlar oda ısısında 1dk santrifüj edilir.
12. 12,000 rpm' de 1 dk santrifüj sonucu purifiye DNA elde edilir.
13. Clean up sonrası DNA'lar tekrar ölçülür. Peaklerin temizliği ve DNA konsantrasyonu takip edilir.

3.2.5. PZR

PTEN Pyro kit ve PTEN PyroMark CpG Assay kullanılarak bisülfittenmiş DNA'nın PZR amplifikasyonudur.

- 1- Reaksiyon karışımı hazırlanıp, 20 µl her PZR tüpüne eklendi. DNA'dan 5 µl PZR tüpüne eklendi.

95 °C 15dk
 94 °C 30sn
 56 °C 30sn
 71 °C 30sn
 71 °C 10dk
 +4 °C ∞

} 45 döngü

2- Termal cykler çalıştırıldı.

PTEN geni, 9p21 bölgesinde lokalize olup kendisi ile yüksek sekans homolojisine sahip bir pseudogene sahiptir. Bu durum ise diğer yöntemler ile *PTEN*'in 5' UTR bölgesinde metilasyon analiz araştırmasını zorlaştırır. Bu yüzden yalnızca *PTEN*'in promotör metilasyonunu araştırmak için bisülfite ile pyrosekans yöntemini seçtik.

3.2.6. PZR Ürünlerinin Streptavidin Sepharose Yüksek Performans Boncuklarıyla Immobilizasyonu

1. Streptavidin sepharose boncukları içeren şişe homojen bir solusyon haline gelene kadar çalkalanır.
2. DNA immobilizasyonu için master karışım hazırlanır.

Streptavidin	3 µl
Binding Buffer	37 µl
Pyro distile su	30 µl

1. 26 kuyucuk içeren PZR platedeki her kuyucuğa 69 µl master mix eklenir.
2. Her kuyucuğa 10 µl biotin ile işaretlenmiş PZR ürünü eklenir.
3. PZR plate seal ile sıkıca kapatılır.
4. Oda sıcaklığında 5-10 dk 1400 rpm'de çalkalanır.
5. Platedeki karışım vakuma çekilir.
6. Tablodaki sıra ve süre ile solüsyonlar vakumlanır.

5 sn	Ethanol
7 sn	Denaturasyon solüsyonu
10 sn	Washing Buffer

7. Vakum kapatılır. Vakum sayesinde tüm kirlilik, primerler ve forward iplik vakumla atılırken reverse ipliğe takılı olan biyotinin streptavidin ile büyük bir baş oluşturması sebebiyle reverse iplik vakumun uçunda kalır. Böylece biyotin ile işaretli reverse ipliğin kaldığı yapı başka plate hazırlanan sekans primeri üzerine eklenir.

3.2.7. PyroMark Q96'daki Örneklerin Pyrosekans Analizine Hazır Hale Getirilmesi

8. Sekans primeri 880 µl Annealing Buffer ile sulandırılır.
9. Başka bir plate üzerine 30 µl Sekans Primeri dağıtılıp 1dk primer- DNA eşleşmesi sağlanır.
10. 2dk 80 C° 'de bekletilir. Daha sonra 5-10 dk oda sıcaklığında bekletilir.
11. Bu sırada kartuş hazırlanır. Enzim ve substrat 620 µl pyro distile su ile çözülür.
12. Kartuşa istenen miktarda ve şekildeki sıra ile enzim (E), substrat (S,) Adenin (A), Timin (T), Guanin (G) ve Sitozin (C) yüklenir.

E	A	S
C		T
	G	

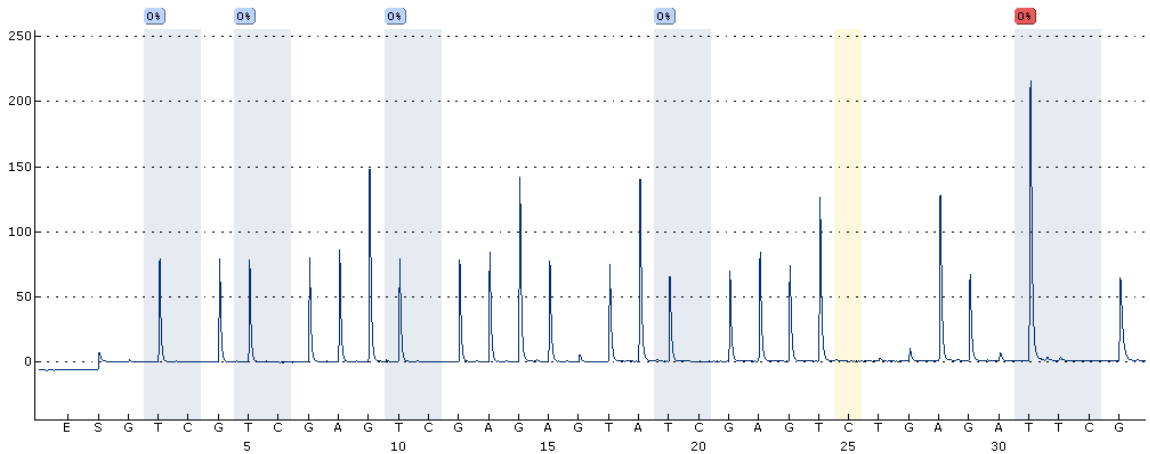
13. Cihaza kartuş ve plate koyulur run'a basılır.

4.BULGULAR

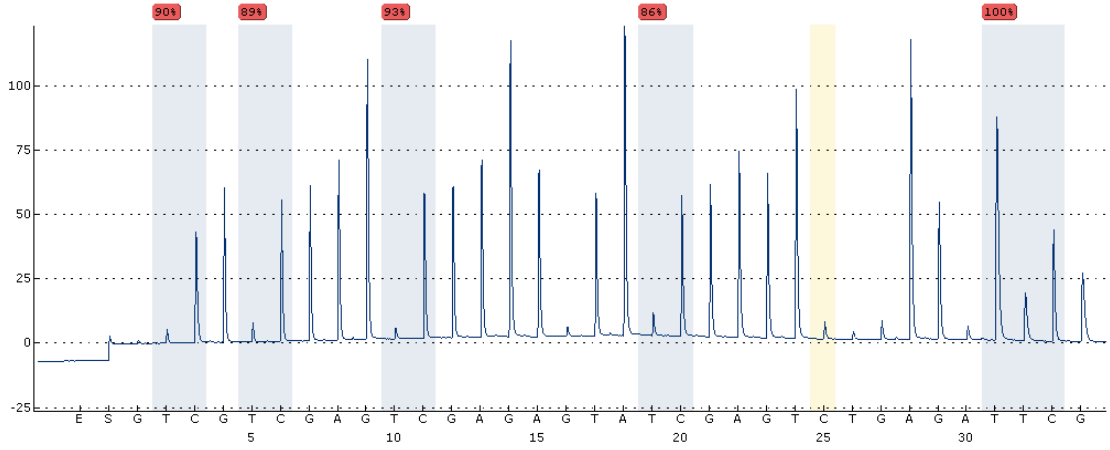
Bu çalışmada 31 endometrium kanserli hasta ve 19 sağlıklı endometriuma sahip kontrol kullanıldı. Hasta grubu ve kontrollerin parafine-gömülü dokularından DNA izole edildi. Bu DNA örneklerine bisülfıt işlemleri ardından pyrosekans yapılarak metilasyon araştırması yapıldı.

4.1. PYROSEKANS BULGULARI

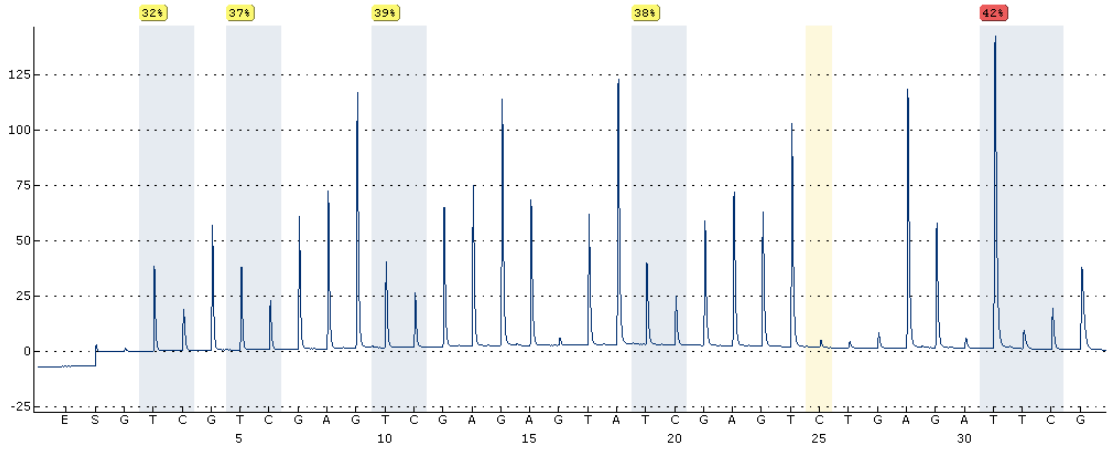
Bisülfıt ile muameleden sonra PTEN Pyro kit kullanılarak PZR işlemi yapılmıştır. PyroMark Q96 cihazı kullanılarak pyrosekans yapılmıştır. EpiTect PCR Control DNA kullanılarak bisülfıt dönüşümü ispatlanmıştır. *PTEN* promotör bölgesine ait 5'CGCGAGGCGAGGATAACGAGTTAAGTTTCGGT 3' sekansı üzerindeki 5 CpG adasının metilasyon analizi yapılmıştır. Hasta ve kontrol gruplarının 5CpG adasında metilasyon tespit edilememiştir. Hasta ve kontrol grubu arasında metilasyon açısından fark bulunamamıştır. PyroMark Q96 cihazından elde edilen veriler peak şekilindeki gibidir;



Şekil 4.1. Hasta ve kontrol grubunun *PTEN* metilasyon görüntüsü



Şekil 4.2. Metile kontrol DNA görüntüsü



Şekil 4.3. Yarı-Metile kontrol DNA görüntüsü

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Rahim içi dokudan köken alan Endometrium kanseri, Amerika Birleşik Devletleri'nde kadınlar arasında görülen dördüncü en yaygın kanserdir ve 2013 verilerine göre 49500 yeni vaka olduğu ve 8200 kişinin bu sebepten öldüğü tahmin edilmektedir (2). Bu kadar sık görülmesine rağmen endometrium kanserinin moleküler mekanizması henüz tam olarak anlaşılamamıştır (8-12). Hastaların çoğunda erken evre ve düşük grade endometrium kanseri görülmektedir. Rahim kanseri genel olarak iki grupta sınıflandırılır. Tip I östrojen fazlalığı, obezite, hormon reseptör pozitifliği ile ilişkili iken, Tip II ise sıklıkla yaşlılarda ve obez olmayan kadınlarda görülen seröz tümörlerdir (2).

Bir tümör baskılayıcı gen olan *PTEN*, 10q23.3'de lokalizedir. Sıklıkla somatik kanserlerde inaktive olur (13, 65). Asıl görevi defosforilasyondur (4). Yabanıl tip *PTEN* PI3K/Akt sinyal yolağında PIP3'ü defosforilleyerek Akt yolağını baskılar (7, 8, 66, 68). Fosfoinositilleri defosforilleyerek hücre içi proliferatif sinyallerin iletimi ve hücre siklusunun ilerlemesi inhibe ederek (68) hücre büyümesini ve hücrenin hayatta kalmasını sağlamış olur (30, 44). *PTEN* kaybı ise kanser gelişimine yol açar ve endometrium karsinogenezinde potansiyel bir inhibitördür (30). Yani *PTEN* endometrial adenokarsinom patogenezinde katılan önemli bir gendir (72). Son çalışmalar insan kanserlerinin çoğunda prognostik indikatör olarak *PTEN* proteinin rolünü desteklemektedir.

Mutter et al.'a göre değişmiş *PTEN* fonksiyonu premalignant fazdaki endometrial kanserlerin çoğunun etiyolojisinden kısmen sorumludur ve kansere ilerlemeye katkı sağlar. Bu yüzden *PTEN* ekspresyon ya da fonksiyon kaybı erken endometrial prekanserlerin bir belirticidir (72).

Huang et al.'a göre tümör oluşumu birikerek ilerleyen genetik bozuklukları kapsayan ve çoklu adımdan oluşan bir süreçtir. Mutasyon, heterozigosite kaybı (LOH) ve gen amplifikasyonunu kapsayan DNA değişiklikleri tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonuna ve onkogenlerin aktivasyonuna yol açabilir. Bu durum ise kontrolsüz hücre büyümesine katkı sağlar. Çok yakın geçmişte epigenetik bozukluklar da kanser gelişiminde büyük öneme sahip bulundu. Bu moleküler değişiklikler DNA sekansında değişiklik gerektirmez ancak endometrium kanserini kapsayan tümörlerde bu moleküler değişiklikler sık gözlenir. Tümör baskılayıcı genler kanser hücrelerinde mutasyon ya da delesyon ile inaktive olabilmesine rağmen promotör bölgeleri içindeki CpG adacıklarının anormal metilasyonunu kapsayan epigenetik mekanizmalar genin sessizleşmesine katkı sağlar (14).

Dvorakova et al.'a göre normalde unmetile olan CpG adacığının anormal metilasyonu, insan kanserlerinde birçok genin transkripsiyonel olarak inaktivasyonu ile ilişkili genlerin 5'promotör bölgesinde lokalizedir (76).

Tümör baskılayıcı genlerin promotör hipermetilasyonunu kapsayan gen sessizleşmesinin epigenetik mekanizmalarının tümör oluşumuna katkı sağladığı görülmüştür (65, 28).

Frisk et al.'a göre *PTEN* promotör hipermetilasyonu *PTEN* sessizleşmesine sebep olabilir. Önceki çalışmalar prostat kanserinde *PTEN* promotör bölgesinin hipermetilasyonu bir transkript sessizleşme mekanizması olarak önermiştir (73). Henüz moleküler mekanizması tam olarak anlaşılamayan endometrium kanserinde *PTEN*'in transkripsiyonel olarak sessizleşmesinin promotör bölgesine ait hipermetilasyon ile olduğu kuvvetle muhtemeldir.

Endometrial kanserde östrojen ERK (Extracellular signal-Regulated Kinase) yolağını aktive edebilir; *PTEN*, ERK aktivasyonunda baskılayıcı bir role sahiptir (30). Zhang et al. (30) Endometrial kanserde *PTEN*'in inaktivasyonunun ERK yolağının sürekli inaktivasyonuna sebep olduğunu ve hücre proliferasyonu takibinde malignant transformasyon ve endometrial kanserli hücrelere ilerleyişin söz konusu olduğu sonucunu çıkarmıştır.

Yapılan çalışmalar ışığında şu açıktır ki; karşılanmamış östrojene maruz kalma durumunda, *PTEN* fonksiyon kaybı endometrial kanserlerin erken evrelerinde başlar (72). Uterin endometrial kanserlerinin %45'inde *PTEN* geni mutasyona ya da delesyona

uğramıştır (13). *PTEN* promotör metilasyonunun ise endometrial kanserde ilerlemiş evre ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (8, 65).

Abdulkareem and Blair'a göre *PTEN*'nin mRNA ya da protein düzeyinde ekspresyon kaybına en sık endometrium kanserinde rastlanmaktadır. Vakaların yaklaşık %50'si *PTEN* mutasyonuna, %61'i *PTEN* ekspresyon kaybına, %97'si ise azalmış ekspresyon kaybına sahiptir. Laboratuarlarda rutin olarak *PTEN* gen ve protein lokalizasyonunun test edilmesi yakın gelecekte gerçeklik kazanacaktır. Bu durum birçok insan kanserlerinde tarama, tanı, tedavi ve prognoz daha çok kolay olacaktır. Böylece mortalite ve morbitite azalacaktır (13).

Zysman et al., *PTEN* mutasyonlarının ilerleyici birikiminin hastalığı premalignden maligne dönüştürebileceğini ifade ederek farklı metilasyonlar tarafından *PTEN*'in epigenetik regülasyonunu içeren diğer mekanizmaların *PTEN*'in ekspresyon kaybına katkıda bulunabileceğini ifade etmişlerdir (37).

Endometrial adenokarsinom ve diğer tümör tiplerinde *PTEN*'in inaktivasyonu sadece gözlenen mutasyonlar dahilinde açıklanamaz. Bu gözlem *PTEN* ekspresyonunun transkripsiyonel ya da translasyonel seviyede diğer mekanizmalar tarafından baskılandığını gösteriyor (72).

Biz çalışmamızda *PTEN* geni promotör bölgesinde metilasyona rastlamadık. Benzer şekilde; Bennet ve ark. Cowden sendromlu ve Cowden benzeri sendromlu hastalarda *PTEN* promotör metilasyonunu araştırmışlardır (77). Bu hastaların önemli bir kısmında beklenmedik bir şekilde *PTEN* promotör hipermetilasyonuna rastlanmamıştır. Ancak, oldukça beklenmedik şekilde görüldü ki; bu hastalarda *PTEN*'de gen sessizleşmesi yoktu. Belki de önerdiği gibi *PTEN* promotör hipermetilasyonu bu tümör baskılayıcı genin ekspresyonunu değiştirmiyor ya da regüle etmiyordu (71, 77).

Dvorakova et al. 79 endometrium dokusunda (59 endometrium kanseri ve 20 normal endometrium) yaptığı metilasyon çalışmasında *PTEN* geninde içinde bulunduğu 27 genin metilasyonunu incelemiştir. *PTEN* %15'lik eşik değerini geçememiştir. Ancak diğer birkaç gende hasta ve kontrol grubu arasında alakalı olarak metilasyon farklılığı gözlenmiştir (76). Bizim çalışmamızda da benzer veri elde edilmiştir; *PTEN* geni promotör bölgesine ait metilasyon %10'luk eşik değeri geçememiştir.

Salvesen et al. yaptığı çalışmada endometrium kanserli 138 hastanın 26'sında (%19) *PTEN* promotör metilasyonu varlığını göstermiştir. Ayrıca *PTEN* promotör metilasyonunun endometrium kanserinde nispeten daha sık olduğunu gözlemlemiştir. Bu yüzden endometrium kanserinde *PTEN* geninin hipermetilasyon ile sıklıkla hedefe yönelik olarak inaktive olduğu bulunmuştur (65).

Brakensiek et al.'a göre insan tümörögenezinde tümör baskılayıcı genlerinin hipermetilasyon ilişkili sessizleşmesinde en önemli ve en yaygın epigenetik mekanizmanın analizleri yapılırken, bu anormalliğin analizi için metilasyon durumunda quantifikasyonunun yokluğu ve analiz edilebilir CpG bölgelerinin sayısının sınırlı oluşu gibi kısıtlamalar ile bu tekniklerde aksaklıklar olabilir. Pyrosekanslama bu kısıtlamaların üstesinden gelen, heterojen metilasyon modeline sahip genlerin analizi için faydalı olan yeni bir tekniktir. İlk raporlar tek bir CpG bölgesindeki metilasyon seviyesinin tam quantifikasyonunu gösteren bu tekniğin güvenilirliğini göstermiştir (75). *PTEN*, 9p21 bölgesinde lokalize olup kendisi ile yüksek sekans homolojisine sahip bir pseudogene sahiptir. Bu durum ise diğer yöntemler ile *PTEN*'in 5' UTR bölgesinde metilasyon analiz araştırmasını zorlaştırır (78). Bu yüzden yalnızca *PTEN*'in promotör metilasyonunu araştırmak için bisülfite ile muamele sonrası pyrosekans yöntemini seçtik.

6.KAYNAKLAR

1. Pırpanlar S., Endometrium, Serviks, Over Kanserlerinde Lenf Nodu Diseksiyonunun ve Çıkarılan Lenf Nodu Sayısının Sağ Kalım Üzerine Etkisi, Uzmanlık Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları Ve Doğum Ana Bilim Dalı, İzmir 2006:105.
2. Kandoth C, Schultz N, Cherniack AD, et al. Integrated Genomic Characterization of Endometrial Carcinoma. Nature. 2013; 2;497(7447):67-73.
3. Kotil G., Endometrial Patolojilerde Power Doppler Ultrasonografi İle Mikrodamar Yoğunluğunun Korelasyonu, Uzmanlık Tezi, Sağlık Bakanlığı Dr. Lutfi Kırdar Kartal Eğitim Ve Araştırma Hastanesi Kadın Hastalıkları Ve Doğum Kliniği, İstanbul 2005:77.
4. Turan Ç, Soylu F, Erkan L ve ark. Endometrial Adenokarsinomlarda PTEN Gen Mutasyon Ekspresyonunun Araştırılması Ve Klinik Önemi. İzmir Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi 2009: 47 (1) 17-27.
5. Büyükkınacı M. Endometriyum Kanserinde Preoperatif Yüksek Serum Ca-125 Değerlerinin Prognostik Önemi, Uzmanlık Tezi, İstanbul Bakırköy Kadın Doğum Ve Çocuk Hastalıkları Eğitim Ve Araştırma Hastanesi Kadın Hastalıkları Ve Doğum Kliniği, İstanbul 2008:90.
6. Erdem B. Uterin Kaynaklı Postmenapozal Kanama Nedenlerinin Analizi, Uzmanlık Tezi, Taksim Eğitim Ve Araştırma Hastanesi Kadın Hastalıkları Ve Doğum Kliniği, İstanbul 2009:84
7. Kanamori Y, Kigawa J, Itamochi H, et al. Correlation Between Loss of Pten Expression And Akt Phosphorylation in Endometrial Carcinoma. Clin Cancer Res. 2001; 7(4):892-5.

8. Terakawa N, Kanamori Y, Yoshida S, et al. Loss of PTEN Expression Followed by Akt Phosphorylation is a Poor Prognostic Factor For Patients With Endometrial Cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2003;10(2):203-8.
9. Özgüven Ö., İstanbul Üniversitesi Jinekolojik Tümörlü Hastalarda HTERT Ekspresyonu Ve Kromozom 10p 15.1 Üzerindeki Heterozigotluğun Araştırılması, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul 2006:84.
10. Mori N, Kyo S, Sakaguchi J, et al. Concomitant Activation of Akt With Extracellularly Regulated Kinase 1/2 Occurs Independently of PTEN or PIK3CA Mutations in Endometrial Cancer and May Be Associated With Favorable Prognosis. *Cancer Sci*. 2007 Dec;98(12):1881-8.
11. Gao Q, Ye F, Xia X, et al. correlation Between PTEN Expression and P13k/Akt Signal Pathway in Endometrial Carcinoma. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. 2009; 29(1):59-63.
12. Zhang Y, Wei L, Wang J, Sun T, et al. Role of Phosphatase PTEN in The Activation of Extracellular Signal-Regulated Kinases Induced by Estradiol in Endometrial Carcinoma Cells. *Chin Med J (Engl)*. 2003 Mar;116(3):383-7.
13. Abdulkareem IH, Blair M. Phosphatase and Tensin Homologue Deleted on Chromosome 10. *Niger Med J*. 2013; 54(2):79-86.
14. Huang YW, Luo J, Weng YI, et al. Promoter Hypermethylation of CIDEA, HAAO and RXFP3 Associated with Microsatellite Instability in Endometrial Carcinomas. *Gynecol Oncol*. 2010; 117(2):239-47.
15. Wiencke JK, Zheng S, Jelluma N et al. Methylation of the PTEN Promoter Defines Low-grade Gliomas and Secondary Glioblastoma. *Neuro Oncol*. 2007; 9(3):271-9.
16. Cock-Rada A, Weitzman JB. The Methylation Landscape of Tumour Metastasis. *Biol Cell*. 2013; 105(2):73-90.
17. http://www.tip.hacettepe.edu.tr/actamedica/2007/sayi_1/baslik9.pdf
(13.04.2013)

18. Onay H., Konvansiyonel Renal Hücreli Kanser Oluşumunda Etkili Olan Genlerin Metilasyon Durumunun Araştırılması, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir 2006:96.
19. http://yunus.hacettepe.edu.tr/~mergen/derleme/d_epigenetik.pdf (25.06.2013)
20. Özdemir F., Kolorektal Kanserli Hastalarda SFRP1 Geninin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul 2009:82.
21. Yakut S., Glial Tümörlerde ARHI Tümör Süpresör Geninde LOH ve Metilasyon Profillerinin Araştırılması, Doktora Tezi, Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Antalya 2007:95.
22. Takanami I, Imamuma T, Hashizume T, et al. Expression of PDGF, IGF-II, bFGF and TGF-beta 1 in Pulmonary Adenocarcinoma. *Pathol Res Pract.* 1996; 192(11):1113-20.
23. Huebner RJ, Todaro GJ. Oncogenes of RNA Tumor Viruses As Determinants of Cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1969;64(3):1087-94.
24. Kopnin BP. Targets of Oncogenes and Tumor Suppressors: Key For Understanding Basic Mechanisms of Carcinogenesis. *Biochemistry (Mosc).* 2000;65(1):2-27.
25. Knudson AG Jr. Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1971; 68(4):820-3.
26. Jin X, Gossett DR, Wang S, et al. Inhibition of AKT Survival Pathway by a Small Molecule Inhibitor in Human Endometrial Cancer Cells. *Br J Cancer.* 2004; 91(10):1808-12.
27. Pavlakakis K, Messini I, Vrekoussis T, et al. PTEN-loss and Nuclear Atypia of EIN in Endometrial Biopsies Can Predict The Existence of a Concurrent Endometrial Carcinoma. *Gynecol Oncol.* 2010; 119(3):516-9.
28. Konopka B, Janiec-Jankowska A, Kwiatkowska E, et al. PIK3CA Mutations and Amplification in Endometrioid Endometrial Carcinomas: Relation to Other Genetic Defects And Clinicopathologic Status of The Tumors. *Hum Pathol.* 2011; 42(11):1710-9.

29. Başığmez F.O., Endometrium Kanseri Hastalarda Endojen Seks Steroidlerinin Önemi, Uzmanlık Tezi, İstanbul Bakırköy Kadın Doğum ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul 2005:61.
30. Zhou C, Bae-Jump VL, Whang YE, et al. The PTEN Tumor Suppressor Inhibits Telomerase Activity in Endometrial Cancer Cells by Decreasing HTERT mRNA Levels. *Gynecol Oncol.* 2006; 101(2):305-10.
31. Hayes MP, Wang H, Espinal-Witter R, Et Al. PIK3CA And PTEN Mutations in Uterine Endometrioid Carcinoma and Complex Atypical Hyperplasia. *Clin Cancer Res.* 2006; 12(20 Pt 1):5932-5.
32. <http://www.rahimkanseri.org/> (13.06.2013)
33. http://www.doktornevra.com/genital_kanserler/endometrium_kanseri_rahim_kanseri.asp (13.06.2013)
34. Baştürk M., Endometrium Karsinomlarında C-KİT Ekspresyonu ve Myometrial İnvazyonda Mast Hücre ve Mikrodamar Yoğunluğunun Önemi,Uzmanlık Tezi, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, Mersin 2006:65
35. Pehlivan M., Kronik Miyeloid Lösemi (KML) Hastalarında SFRP1 Geninin Promotör Bölgesinin Epigenetik ve Genetik Değişikliklerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İzmir 2008:135.
36. Lacey JV Jr, Mutter GL, Ronnett BM, et al. PTEN Expression in Endometrial Biopsies As a Marker of Progression to Endometrial Carcinoma. *Cancer Res.* 2008; 68(14):6014-20.
37. Zysman MA, Chapman WB, Bapat B, et al. Considerations When Analyzing the Methylation Status of PTEN Tumor Suppressor Gene. *Am J Pathol.* 2002; 160(3):795-800.
38. Elwood JM, Cole P, Rothman KJ, Kaplan SD, et al. Epidemiology of Endometrial Cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1977; 59(4):1055-60.
39. Parazzini F, La Vecchia C, Negri E, Fedele L, et al. Reproductive Factors and Risk of Endometrial Cancer. *Am J Obstet Gynecol.* 1991; 164(2):522-7.

40. Hardiman P, Pillay OC, Atiomo W, et al. Polycystic Ovary Syndrome and Endometrial Carcinoma. *Lancet*. 2003; 361(9371):1810-2.
41. Persson I, Adami HO, Bergkvist L, et al. Risk of Endometrial Cancer After Treatment With Oestrogens Alone or in Conjunction With Progestogens: Results of a Prospective Study. *BMJ*. 1989; 298(6667):147-51.
42. Quereux C, Gabriel R. Non Contraceptive Benefits of Oral Contraception. *Gynecol Obstet Fertil*. 2003; 31(12):1047-51.
43. <http://www.figo.org/publications/annual> (18.07.2013)
44. Black D, Bogomolny F, Robson ME, et al. Evaluation of Germline PTEN Mutations in Endometrial Cancer Patients. *Gynecol Oncol*. 2005; 96(1):21-4
45. Ricci R, Komminoth P, Bannwart F, et al. PTEN as a Molecular Marker to Distinguish Metastatic From Primary Synchronous Endometrioid Carcinomas of The Ovary And Uterus. *Diagn Mol Pathol*. 2003; 12(2):71-8.
46. Güneş S, Kulaç T. Epigenetiğin Spermatogenezdeki Rolü. *Turkish Journal of Urology*. 2013; 39(3): 181-7.
47. D'Addario C, Di Francesco A, Pucci M, Et Al. Epigenetic Mechanisms and Endocannabinoid Signalling. *FEBS J*. 2013; 280(9):1905-17.
48. Li XQ, Guo YY, De W, Et Al. DNA Methylation and Micromas in Cancer. *World J Gastroenterol*. 2012; 18(9):882-8.
49. Öztürk Ş., Ailevi Akdeniz Ateşi Patogenezinde ASC Ve MEFV Genlerinin Metilasyonunun Rolü, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul 2008:77.
50. Chiacchiera F, Piunti A, Pasini D. Et Al. Epigenetic Methylations and Their Connections With Metabolism. *Cell Mol Life Sci*. 2013; 70(9):1495-508.
51. Sashida G, Iwama A. Epigenetic Regulation of Hematopoiesis. *Int J Hematol*. 2012; 96(4):405-12.
52. Chen H, Hardy TM, Tollefsbol TO. et al. Epigenomics of Ovarian Cancer and its Chemoprevention. *Front Genet*. 2011;2:67

53. Çakar E.Ş., Genom Metilasyon Profilinin Kolorektal Kanseri Etiyolojisindeki Rolü, Uzmanlık Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Ana Bilim Dalı, Sivas 2007:148.
54. Yenice B., Ty2 Retrotranspozonu Transkripsiyonunun Düzenlenmesine Kromatin Modifiye Edici Faktörlerin Etkilerinin Analizi, Yüksek Lisans Tezi, Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa 2005:56.
55. <http://www.fastbleep.com/biology-notes/40/116/1191> (20.07.2013)
56. Jørgensen S, Schotta G, Sørensen CS. Et Al. Histone H4 Lysine 20 Methylation: Key Player In Epigenetic Regulation of Genomic Integrity. *Nucleic Acids Res.* 2013; 41(5):2797-806.
57. Eroğlu P., Non-Hodgkin Lenfomalı Olgularda P15ink4b Promotör Bölgesindeki DNA Metilasyonunun Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mersin 2007:108.
58. Dalton SR, Bellacosa A. DNA Demethylation By TDG. *Epigenomics.* 2012; 4(4):459-67.
59. Hackett JA, Surani MA. DNA Methylation Dynamics During The Mammalian Life Cycle. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2013; 368(1609):20110328.
60. <http://www.rikenresearch.riken.jp/eng/frontline/5514> (17.06.2013)
61. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1084952102001374> (23.06.213)
62. Momparler RL, Bovenzi V. Et Al. DNA Methylation and Cancer. *J Cell Physiol.* 2000; 183(2):145-54.
63. Jiang Y, Liu S, Chen X, Et Al. Genome-Wide Distribution of DNA Methylation and DNA Demethylation and Related Chromatin Regulators in Cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2013; 1835(2):155-63.
64. Govender D, Chetty R. Gene of The Month: PTEN. *J Clin Pathol.* 2012; 65(7):601-3.

65. Salvesen HB, Macdonald N, Ryan A, Et Al. PTEN Methylation is Associated With Advanced Stage and Microsatellite Instability in Endometrial Carcinoma. *Int J Cancer*. 2001 Jan; 91(1):22-6.
66. Georgescu MM. PTEN Tumor Suppressor Network in PI3K-Akt Pathway Control. *Genes Cancer*. 2010; 1(12):1170-7.
67. Blumenthal GM, Dennis PA. Germline PTEN Mutations as a Cause of Early-Onset Endometrial Cancer. *J Clin Oncol*. 2008; 26(13):2234; Author Reply 2234.
68. Önder S. Ç., Diffüz Büyük B Hücreli Lenfomalarda Morfolojik Özellikler ve PTEN İmmünekspresyonu, Uzmanlık Tezi, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, Ankara 2003:65
69. Kır C., İntraduktal Ve İnvaziv Duktal Meme Karsinomlarında PTEN, SURVİVİN Ekspresyonu ve Apoptosis ile İlişkisi, Uzmanlık Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, Afyonkarahisar 2007:75.
70. Gül D.K., Endometrium Patolojilerinde PTEN Tümör Supresör Gen Mutasyonunun Önemi, Uzmanlık Tezi, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları Ve Doğum Anabilim Dalı, İstanbul 2008:61.
71. Jelovac D, Park BH. PTEN Promoter Silencing and Cowden Syndrome: The Role of Epigenetic Regulation of KILLIN. *JAMA*. 2010; 304(24):2744-5.
72. Mutter GL, Lin MC, Fitzgerald JT, Et Al. Altered PTEN Expression As A Diagnostic Marker for The Earliest Endometrial Precancers. *J Natl Cancer Inst*. 2000; 92(11):924-30.
73. Frisk T, Foukakis T, Dwight T, Lundberg J, Et Al. Silencing of The PTEN Tumor-Suppressor Gene in Anaplastic Thyroid Cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 2002; 35(1):74-80.
74. Berber F., P53, E-CADHERİN Ve PTEN İmmünoreaktivitelerinin Prostat Asiner Adenokarsinoma Paternlerinde Karşılaştırılması, Uzmanlık Tezi, Gülhane Askeri Tıp Akademisi Haydarpaşa Eğitim Hastanesi Komutanlığı Patoloji Servisi, İstanbul 2006:72.

75. Brakensiek K, Wingen LU, Länger F, Et Al. Quantitative High-Resolution Cpg Island Mapping With Pyrosequencing Reveals Disease-Specific Methylation Patterns of The CDKN2B Gene in Myelodysplastic Syndrome And Myeloid Leukemia. Clin Chem. 2007; 53(1):17-23.
76. Dvorakova E, Chmelarova M, Laco J, Palicka V, Et Al. Methylation Analysis of Tumor Suppressor Genes in Endometroid Carcinoma of Endometrium Using MS-MLPA. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2013.
77. Bennett KL, Mester J, Eng C. Et Al. Germline Epigenetic Regulation of KILLIN in Cowden And Cowden-Like Syndrome. JAMA. 2010; 304(24):2724-31.
78. García JM, Silva J, Peña C, et al. Promoter Methylation of the PTEN Gene is a Common Molecular Change in Breast Cancer. Genes Chromosomes Cancer. 2004 Oct;41(2):117-24.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Keziban KORKMAZ

Uyruğu: Türkiye (TC)

Doğum Tarihi ve Yeri: 20 Mayıs 1986, Sorgun

Medeni Durumu: Bekâr

Tel: 0546 596 72 92

Fax: +90 352 437 93 15

email: kzbnkorkmaz@hotmail.com

Yazışma Adresi: Erciyes Üniversitesi Genom ve Kök Hücre Merkezi

Talas/KAYSERİ

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet
Tarihi		
Yüksek Lisans	EÜ Sağlık Bilimler Enstitüsü	2013
Lisans	CÜ. Fen-Edebiyat Fakültesi	2010
Lise	Sorgun Anadolu Lisesi, Yozgat	2005

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2013	- Halen Erciyes Üniversitesi Strateji	Büro
Personeli		
2010-2012	EÜ Tıbbi Genetik Anabilim Dalı	Öğrenci
Statüsü		

YABANCI DİL

İngilizce