

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İNVAZİV DUKTAL MEME KANSERLERİNDE β -CATENİN'İN
KARSİNOGENİK SÜREÇTE ÖNEMLİ GÖRÜLEN N-UCU
MUTASYONLARININ ARAŞTIRILMASI**

ARAŞ. GÖR. SEFA KIZILDAĞ

**TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ
PROF. DR. MERAL SAKIZLI**

**İZMİR
2004**

“İnvaziv duktal Meme karsinomlarında β -Catenin’in karsinogenik süreçte önemli görülen N-ucu mutasyonlarının araştırılması” isimli bu tez 22.01.2004 tarihinde tarafımızdan değerlendirilerek ~~Başarılı~~ \ ~~Başarısız~~ bulunmuştur.

Jüri başkanı

Prof. Dr. Meral Sakızlı
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.B.D.


Jüri Üyesi

Prof. Dr. Neşe Atabey
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.B.D.


Jüri Üyesi

Prof. Dr. Mehmet Alakavuklar
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
Hematoloji onkoloji A.B.D.


Jüri Üyesi

Prof. Dr. Nejat Topçuoğlu
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji A.B.D.


Jüri Üyesi

Yrd. Doç. Dr. Çiğdem Eresen
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.B.D.

TABLO LİSTESİ	1
ŞEKİL LİSTESİ	2
1 KISALTMALAR	3
2 ÖZET	5
3 SUMMARY	6
4 GİRİŞ VE AMAÇ	7
5 GENEL BİLGİLER	10
5.1 MEME KANSERLERİ:	10
5.1.1 Meme kanseri risk faktörleri:	11
5.1.2 Meme kanserlerinde prognostik belirleyiciler:.....	13
5.2 KARSİNOGENEZDE MAJOR GENETİK DEĞİŞİKLİKLER:.....	14
5.2.1 Onkogenlerin mutasyonel aktivasyonu.	16
5.2.2 Tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu.	16
5.2.3 Proto-onkogen ve Tümör baskılayıcı gen örneği.....	17
5.2.4 DNA tamirinde görev alan genlerde ortaya çıkan değişiklikler.	19
5.3 WNT SİNYAL YOLU:	20
5.3.1 Wnt yolağının ekstrasellüler inhibitörleri:	24
5.3.2 Wnt yolağındaki Ligand ve reseptörler:	24
5.3.3 Wnt yolağının akış yönünde bulunan reseptör kompleksi:	25
5.3.4 Wnt sinyali yolağında multiprotein kompleks proteinleri:	26
5.3.5 Wnt yolağının nükleer bileşenleri:	27
5.3.6 Wnt yolağı Hedef genleri:	28
5.4 İNSAN SOLİD TÜMÖRLERİNDE WNT YOLAĞINDAKİ DEĞİŞİKLİKLER:	28
5.5 CTNNB1 (β-CATENİN):.....	29
5.6 İNSAN SOLİD TÜMÖRLERİNDE β-CATENİN MUTASYONLARI:	31
5.7 SSCP (TEK İPLİK KONFORMASYON POLİMORFİZMİ) ANALİZİ	34
6 GEREÇ VE YÖNTEMLER	36
6.1 HASTA SEÇİM YÖNTEMİ:.....	36
6.2 TÜMÖR ÖRNEKLERİNDEN DNA İZOLASYONU:	36
6.2.1 DNA Elektroforezi:	37
6.3 β-CATENİN EKSON 3 POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU:	39
6.4 β-CATENİN EKSON 4 POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU:	40
6.5 β-CATENİN EKSON 5 POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU.	41
6.6 β-CATENİN EKSON 6 POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU:	42
6.7 β-CATENİN EKSON 2, EKSON 3, EKSON 4 POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU:.....	43
6.8 β-CATENİN EKSON 3, EKSON 4, EKSON 5, EKSON 6 SSCP ANALİZİ:	44
6.9 β-CATENİN EKSON 3 VE EKSON 5 DNA DİZİ ANALİZİ:	46
6.10 β-CATENİN İMMUNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEM:.....	46
6.11 KULLANILAN GEREÇLER, SOLÜSYONLAR VE KİMYASAL MADDELER	48
6.11.1 Kullanılan Gereçler:	48
6.11.2 Kullanılan solüsyonlar:	49
6.11.3 Kullanılan kimyasal maddeler.....	50
7 BULGULAR	52
7.1 KLİNİK VE PATOLOJİK VERİLER:	52
7.2 DNA İZOLASYONU:.....	53
7.3 PCR AMPLİFİKASYONLARI:	53
7.3.1 Ekson 3 PCR Amplifikasyonları:	53
7.3.2 Ekson 4 PCR Amplifikasyonları:	54
7.3.3 Ekson 5 PCR Amplifikasyonları:	54
7.3.4 Ekson 6 PCR Amplifikasyonları:	55
7.3.5 Ekson 2, Ekson 3, Ekson 4 PCR Amplifikasyonları:.....	55

7.4	SSCP SONUÇLARI:	56
7.4.1	<i>β-Catenin</i> , Ekson 3 SSCP:.....	56
7.4.2	<i>β-Catenin</i> Ekson 4 SSCP:.....	57
7.4.3	<i>β-Catenin</i> Ekson 5 SSCP:.....	57
7.4.4	<i>β-Catenin</i> Ekson 6 SSCP:.....	58
7.5	DNA DİZİ ANALİZİ SONUÇLARI.....	58
7.6	İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BOYAMA:	59
8	SONUÇ VE ÖNERİLER	60
9	TARTIŞMA	62
10	EKLER	68
10.1	EK-1	68
11	KAYNAKLAR	69



TABLO LİSTESİ

Tablo 1: 2000 Mart ayına kadar β -catenin mutasyonu açısından çalışılan kanser tipleri ve mutasyon frekansları ⁴⁴	32
Tablo 2: DNA izolasyon basamakları	38
Tablo 3: PCR' da kullanılan maddeler ve son konsantrasyonları.....	39
Tablo 4: Ekson3 Polimeraz zincir reaksiyonu için sıcaklık profili:	39
Tablo 5: Ekson4 Polimeraz zincir reaksiyonu için sıcaklık profili:	41
Tablo 6: Ekson5 Polimeraz zincir reaksiyonu için sıcaklık profili:	42
Tablo 7: Ekson6 Polimeraz zincir reaksiyonu için sıcaklık profili:	43
Tablo 8: β -Catenin Ekson 2, Ekson 3, Ekson 4 Polimeraz zincir reaksiyonu için sıcaklık profili:.....	44
Tablo 9: Çalışmaya dahil edilen hastaların klinik ve patolojik bulguları.....	52
Tablo 10: 14 İnvaziv duktal karsinom olgusuna ait β -catenin immüno histokimya ve N-ucu mutasyon sonuçları.....	60

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: Wnt yolağı (Jornal of Cell Science 2002 115, pp.3977-3978).....	23
Şekil 2:Wnt yolağı molekülü Dsh/Dvl ve bağlanan domeynleri	25
Şekil 3:Multiprotein kompleks proteinleri	26
Şekil 4:Wnt yolağında nükleer proteinler	28
Şekil 5:β-catenin Ekson intron bağlantıları	29
Şekil 6:β-catenin'e bağlanan proteinler ve fosforile olan amino asitler.....	30
Şekil 7:SSCP Jel prensibi. ¹¹⁵	34
Şekil 8: Ekson 3 PCR primerleri.....	39
Şekil 9: Ekson 4 PCR primerleri.....	40
Şekil 10: Ekson 5 PCR primerleri.....	41
Şekil 11: Ekson 6 PCR primerleri.....	42
Şekil 12: Ekson 2, Ekson 3 Ekson 4 PCR primerleri.	43
Şekil 13: Hoefer SE 600 vertikal slab jel elektroforez ünitesi parçaları	45
Şekil 14: %1'lik agaroz jelde DNA örnekleri	53
Şekil 15: %3'lük NuSieve® GTG® (FMC) Agaroz jelde Ekson 3 PCR sonuçları (227bp).....	53
Şekil 16: %3'lük NuSieve® GTG® (FMC) Agaroz jelde Ekson 4 PCR sonuçları (253bp).....	54
Şekil 17: %3'lük NuSieve® GTG® (FMC) Agaroz jelde Ekson 5 PCR sonuçları (254bp).....	54
Şekil 18: %3'lük NuSieve® GTG® (FMC) Agaroz jelde Ekson 6 PCR sonuçları (217bp).....	55
Şekil 19: %2'lik NuSieve® GTG® (FMC) Agaroz jelde Ekson 2, Ekson 3, Ekson 4 PCR sonuçları (1377bp).....	55
Şekil 20: %6'lık non-denatüran %10 gliserollü poliakrilamid jelde, Ekson 3 SSCP sonuçları.56	
Şekil 21: %4,5'lik non-denatüran poliakrilamid jelde , Ekson 3 SSCP sonuçları.	56
Şekil 22: %10'luk non-denatüran %10 gliserollü poliakrilamid jelde Ekson 4 SSCP sonuçları.	57
Şekil 23: %8'lik non-denatüran %5 gliserollü poliakrilamid jelde Ekson 5 SSCP sonuçları. .	57
Şekil 24: %8'lik non-denatüran gliserolsüz poliakrilamid jelde Ekson 6 SSCP sonuçları.	58
Şekil 25: 1 numaralı örneğe ait DNA dizi analizi kromatogram görüntüsü.	58
Şekil 26: İnvaziv duktal karsinoma da β-catenin İmmünohistokimyasal Boyama görünümü. 59	

1 KISALTMALAR

BRCA 1: (Breast Cancer Gene 1), (Meme kanseri Geni 1)

BRCA 2: (Breast Cancer Gene 2), (Meme Kanseri Geni 2)

Wnt: Wingless-type MMTV (Mouse mammary tumor virus) integration site family

CTNNB1: β -catenin geni

APC: Adenomatöz polipozis koli

GSK 3 β : Glikojen sentaz Kinaz 3 β

WISP: (Wnt inducible pathway protein) (Wnt uyarımlı yolak proteini)

FAP: (Familial adenomatous polyposis) (ailesel adenomatöz polipozis)

SSCP: (Single Strand Conformation Polymorphism) (Tek iplikli konformasyon polimorfizmi)

KIDEM: İzmir Kanser İzlem ve Denetim Merkezi

ER: Östrojen Reseptörü

PR: Progesteron reseptörü

AJCC: Amerikan Birleşik Kanser Komitesi

RT-PCR: Revers Transkriptaz-Polimeraz Chain Reaction

DCIS: Duktal karsinoma in situ

LCIS: Lobüler karsinoma in situ

Fzd: frizzled

PCP: (Planar cell polarity) (Düzlemsel hücre polarite)

Dv1: Dishevelled

JNK: c-Jun amino-terminal kinase

Fmi: flamingo

ROCK: (Rho-associated kinase) (Rho-ilişik Kinaz)

Nkd: Naked

LEF: Lymphocyte enhancer factor (lenfosit etkinleştiren faktör)

sFRP: (secreted frizzled-related protein) (Fizzled-ilişkili salgı proteini)
SARP: (secreted apoptosis related protein) (Apoptoz ilişkili salgı protein)
WIF: (Wnt-inhibitory factor) (Wnt inhibitör faktör)
Dkk: Dickkopf
Dlg: disclarge tümör supresör
ZO: zonula okludens
PSD: post sinaptik dansite proteini
Arm: Armadillo
CBP: (CREB binding protein) (CREB'e bağlanan protein)
MMP: Matriks metalloproteinaz
CtBP: (c-terminal binding protein) (c-ucuna bağlanan protein)
Lgs: Legless
Pygo: Pygopus
PHD: (plant homology domain) (Bitki homoloji domeyni)
CK 1: Kazein kinaz 1
Dpr: Dapper
HDAC: Histon deasetilaz

2 ÖZET

Beta-catenin, sinyal iletiminde ve hücre adezyonunda önemli rolü olan multifonksiyonel bir proteindir. İstirahat halindeki normal hücrede, Wnt aktivasyonu yokluğunda, β -catenin hücre membranında adherens bağlantılarda yerleşiktir ve hücre içi serbest sitoplazmik β -catenin düzeyi β -catenin'in ubiquitin proteozom yıkılımından dolayı çok düşük düzeydedir. Wnt sinyal yokluğunda GSK3 β , β -catenin'i N-ucunda yer alan serin ve threonin amino asitlerinden (kodon 33, 37, 41, 45) fosfatlamaktadır. N-ucu serin ve threonin amino asitlerinin fosforilasyonu β -catenin stabilizasyonunu sağlamak ve stabilize β -catenin nükleusa geçerek hedef genlerin transkripsiyonel aktivasyonunu gerçekleştirmektedir.

Bu çalışmada, 14 invaziv duktal meme kanseri örneğinde, β -catenin geninin 3, 4, 5 ve 6. eksonlarında (N-ucu) olası somatik mutasyonlar polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), tek iplik konformasyon polimorfizmi (SSCP) ve DNA dizi analizi ile araştırılmıştır. İncelenen örneklerde, bu bölge için β -catenin mutasyonu saptanmamıştır. β -catenin proteininin hücre kompartımanlarında birikimi bağlantılı diğer bir araştırmada immünohistokimya yöntemi ile belirlenmiştir.

Bu sonuçlar, İnvaziv duktal meme kanserinde β -catenin'in genetik defektinin nadir olduğunu ve Wnt sinyal yolağını oluşturan diğer elemanların mutasyonlarının incelenmesinin önemli olabileceğini göstermiştir.

3 SUMMARY

Beta-catenin is a multifunctional protein playing an important role in cellular adhesion and signal transduction. In normal resting cells in the absence of Wnt activation, β -catenin is localized to the adherence junctions on the cell membrane and free cytoplasmic β -catenin is rapidly destroyed by ubiquitin proteasome degradation pathway. In the absence of Wnt signalling, GSK-3 β phosphorylates β -catenin at critical serine and threonine amino acids (codons 33, 37, 41, 45) located at the N-terminus. Phosphorylation of serine-threonine residues in N-terminus of β -catenin results in stabilization, cytoplasmic and nuclear accumulation of β -catenin, and subsequent transcriptional activation of putative target genes.

In this study we investigated 14 human invasive ductal breast cancer samples for somatic mutations in the exons 3, 4, 5 and 6 of β -catenin gene (N-terminal region) by the combined use of polymerase chain reaction (PCR), single strand conformation polymorphism (SSCP) and sequencing. No β -catenin mutation was detected in any of these tumors. Accumulation of aberrant β -catenin protein in cellular compartments in the same breast cancer samples was confirmed with a related experiment by immunohistochemical methods.

Our results suggest that genetic defects in β -catenin is not common in invasive ductal breast cancers, whereas mutations in other components of the Wnt signaling pathway should be considered.

4 GİRİŞ ve AMAÇ

Kadınlarda meme kanserine bağlı ölümler, akciğer kanserinden sonra ikinci sırayı almaktadır. Avrupa ülkelerinde yılda 200,000, ABD' de yılda 211,300 yeni olgu saptanmaktadır.¹ Amerika Birleşik Devletleri'nde meme kanseri kadınlarda en sık saptanan kanserdir ve kanser ölümü nedenleri arasında ikinci sırada yer alır.² Amerikan Kanser Birliğine göre 2003 yılında tahmin edilen 1,334,100 kanser vakasının 556,500'ünün ölmesi öngörülmektedir ve bu 556,500 kişinin 40,200'ünü meme kanseri vakaları oluşturmaktadır.^{1,2,3} Yaşla birlikte meme kanseri görülme insidansının artması 1940' lı yıllardan 1980' li yıllara kadar hafif bir artış göstermiştir. Ancak 1980-1987 yılları arasında bu artış üç kat olmuş ve 1992 yılına kadar aynı seviyede devam etmiştir.^{2,3} Geç evrede meme kanseri tespit etme oranındaki düşme, erken evrede meme kanserlerini yakalama oranındaki bu artış tarama mamografilerinin yaygınlaşması ile açıklanmıştır.³ Hastalığın gelişme riski yaş ile doğrudan ilişkili olup, yaş arttıkça hastalığın görülme sıklığı giderek artar. Meme kanseri 30 yaşından önce nadir olup, bu yaşı takip eden yıllarda hızlı bir tırmanış gösterir.⁴ Menopoz dönemindeki hafif bir azalmayı takiben menopoz sonrası yıllarda yavaş eğimle sürekli devam eden bir artış ortaya çıkar. Bu nedenle 85 yaşındaki her dokuz kadından birinde meme kanseri gelişebileceği beklenmektedir. Görülme sıklığında olduğu gibi mortalite de yaşa bağlı olarak artmakta ve 80 yaşındaki her 100,000 kadından 155 'i meme kanserinden ölmektedir.^{1,4} Dünyada meme kanserine bağlı mortalite ülkeden ülkeye değişmekte olup, İngiltere ve Galler'de en yüksek, Japonya ve Tayland' da en düşük seviyededir.¹

Meme kanseri tedavisindeki gelişmeler hastalığın morbiditesinde azalmaya neden olmakla birlikte mortalitede belirgin bir azalma sağlayamamıştır. Kitle taramaları ile meme kanserinin erken dönemde saptanması mortaliteyi önemli oranlarda düşürmeyi mümkün kılmaktadır.²

Meme kanserli bir hastanın kadın akrabalarında hastalığa yakalanma riski artmış olabilir. Anne, kız kardeş, kız çocuğunda olduğu kadar teyze, hala, kuzen ve büyükannelerde görülen meme kanseri kadındaki riski yükseltir. Ayrıca Li-Fraumeni sendromu, Cowden's sendromu, Muir sendromu ve ataxia telenjektasia gibi bazı ailesel sendromların parçası olarak meme kanseri gözlemlenmiştir.¹² Yaşa dayalı risk

öngörülerini, bu kişileri tanımlama ve tarama programları oluşturma açısından önemlidir. Meme kanserli hastaların %5'inde, tanımlanan, 17q21 kromozomunda yerleşik BRCA 1 (Breast Cancer Gene 1, Meme kanseri Geni 1) gen mutasyonu(-ları) olduğu öngörülmektedir.⁵ Bunların akrabalarında, eğer BRCA 1 geninde germ hattı mutasyon(-ları) taşıyıcısı iseler, yaşam boyunca meme kanseri gelişim riski %50 oranında, 50 yaşın altında ise % 85 düzeyinde olabilir. BRCA 1 gen mutasyonu olan hastalarda over kanseri gelişim riski de yükselmiştir.⁵ 13q12-13 kromozomunda yerleşik bir diğer gen BRCA 2 (Breast Cancer Gene 2, Meme Kanseri Geni 2) de meme kanseri için yüksek, over kanseri için göreceli daha az yüksek risk göstergesidir.⁶

Meme kanseri gelişimi ve ilerlemesi birçok genetik değişikliklerle ilişkilidir, bunlar proto-onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerdeki değişiklikleri ve aynı zamanda henüz tanımlanmamış diğer genleri kapsar. Bu değişiklikler uygun olmayan hücre içi sinyal iletimini başlatabilir, bu da hücrenin kanserleşmesine yol açar, bu değişikliklerin bilinmesi tedaviye yönelik yeni yaklaşımların bulunması için gereklidir.⁷

“Wingless-type MMTV (Mouse mammary tumor virus) integration site family” (Wnt) yolağı evrimsel olarak korunmuştur ve embriyogenez sırasında bir çok olayı kontrol eder.²⁶ Bu yolağın hücresel kontrolü, hücrenin morfolojisini, proliferasyonunu, motilitesini düzenler. Bu yolağın uygunsuz aktivasyonları insanda çeşitli kanserler ile ilişkilendirilmiştir.²⁸ Wnt yolağında rol alan CTNNB1 (β -Catenin), “Adenomatous polyposis coli” (APC), AXIN gibi düzenleyici genlerdeki mutasyonlar kolorektal, hepatoselüler kanserler, melanomlar ve over kanserlerinde gösterilmiştir.^{74,78,96}

β -catenin, Wnt sinyal iletim yolunun merkezi elemanlarından biridir ve sitoplazmada Wnt'nin indüklediği β -catenin birikimi embriyogenez ve normal gelişim için gereklidir. Wnt sinyal aktivasyonu ile glikojen sentaz kinaz 3 β (GSK 3 β) inaktive olur, bu da β -catenin'in post-transkripsiyonel stabilizasyonuna ve bu proteinin sitoplazmik seviyelerinde artışa neden olur. β -catenin düzeyindeki bu artış, Wnt hedef genlerdeki (c-myc, Cyclin D1 ve WISP-1 (wnt inducible pathway protein) gibi) transkripsiyon artışına neden olmaktadır.^{31,36} Bununla birlikte, Wnt sinyal yolağındaki multi-protein kompleksinin öncesinde yaralan proteinleri kodlayan genlerin değişimi ile tümör gelişimi tam olarak ilişkilendirilememiştir.⁴⁴

Buna karşılık, Wnt sinyal yolağındaki multi-protein kompleksinde β -catenin ile bağlanan veya multiprotein kompleksi oluşturan bazı proteinler ile kanser çeşitleri ilişkilendirilebilmektedir.⁸ APC genindeki mutasyonlar ile Familial adenomatöz polipozis (FAP) koli sendromu direkt ilişkilidir ve sporadik kolon karsinomlarının çoğunda bu gende veya proteinde bozukluklar saptanmıştır.^{74,78} Yine β -catenin GSK 3 β bağlanma bölgesindeki mutasyonlar da hepatosellüler, endometrial kanserlerde, melenomda, tiroid kanserlerinde, liposarkomda, pankreasın kistik ve solid tümörleriyle gastrik ve kolon kanserleriyle ilişkilendirilmiştir.^{75,78,82,87,90,92,93,94,99,100,101}

β -catenin NH2 ucu (ekson 3), β -catenin turnover düzenlenme mekanizması için önemli bir bölgedir. Bu bölgedeki 33, 37 ve 45. pozisyondaki serin ve 41. pozisyondaki threonin amino asitlerinin DNA da mutasyon ile değişmesi sonucunda sitoplazmik β -catenin birikimi olmakta, sitoplazmik β -catenin nükleusa geçerek bir transkripsiyon faktörü olan Tcf/Lef ile bağlanarak hedef genleri uyarmaktadır.^{52,55,60} Buna karşın kolon kanserlerinde 183, 245 ve 287 inci kodonlardaki (ekson 4, ekson 5, ekson 6) mutasyonların kanser gelişiminde önemli rol oynadığı gösterilmiştir.⁷⁴

Çalışmamızda, daha önce çalışılmamış bir kanser grubu olarak meme "invaziv duktal karsinom" grubu seçilmiştir. Örneklem grubu meme karsinomu dokuları, Bozyaka Sosyal Sigorta Hastanesi Genel Cerrahi bölümünde 2002-2003 yılları arasında opere edilen ve yine Bozyaka Sosyal Sigorta hastanesi Patoloji servisinde invaziv duktal karsinom tanısı konmuş hastalardan sağlandı. Bu tip kanser olgularının β -catenin ekson 3, ekson 4, ekson 5 ve ekson 6 bölgesindeki mutasyonlar SSCP (Single strand conformation polymorphism) ve DNA dizi analizi ile değerlendirildi. Bununla birlikte β -catenin proteininin sitoplazmik yığılımını veya nükleus lokalizasyonunu göstermek için β -catenin düzeyi immünohistokimyasal olarak, bağlı diğer bir araştırmada değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda elde edilen tüm verilerin, klinik ve patolojik verilerle karşılaştırılarak değerlendirilmesi amaçlanmaktadır.

5 GENEL BİLGİLER

5.1 Meme Kanserleri:

Meme kanserleri kadınlarda en sık görülen kanser olarak %30 ile birinci sırayı alırken kadınlarda ölüm nedeni olarak da %16 ile yine birinci sırayı almaktadır.^{1,2} Amerika Birleşik Devletlerinde 2003 yılına ait istatistik verilerine göre, bu yıl 211,300 yeni vaka görülebileceği ve 39,800 vakanın da bu hastalıktan kaybedilebileceği öngörülmektedir.² Meme kanserine bağlı mortalite hızı yıllara göre sabit kalmakta, ancak meme kanseri görülme oranı hastalığın tanısındaki gelişmelere paralel olarak gittikçe artmaktadır. Bu konuda rakamsal bir gösterge olarak, örneğin Amerika Birleşik devletlerinde 1960 yılında her yirmi kadından biri hayatının bir döneminde meme kanserine yakalanma riskine sahipken bu oran 2003 yılında sekizde birdir.⁴ Görülme sıklığındaki bu artışa, uygulanan mamografik tarama yöntemlerinin gün geçtikçe yaygınlaşmasının neden olduğu bildirilmektedir. Görülme sıklığındaki bu artışa rağmen mortalite hızının sabit kalması ise hastaların çok daha iyi tıbbi bakım koşulları ve adjuvan terapi yöntemlerinin uygulanmasına bağlanmaktadır.^{1,2,4}

Ülkemizde, kanser olgularının bildirimini 1982 yılında zorunlu hale gelmiştir. Bu tarihten itibaren bildirimler Kansere Savaş Daire Başkanlığı'na yapılmaktadır. Ancak bugünkü bilgiler Türkiye genelini temsil etmeyen, sınırlı, kanser insidanslarına ait bilgilerdir. Ölümler yalnızca il ve ilçe merkezlerinden bildirilmektedir. Bu nedenle ölüm bildirimleri eksiktir. 1996'da sağlık bakanlığına 3755 olgu bildirilmiştir. Buna göre insidans yüz binde 21.07 olarak hesaplanabilir. Ancak bu, nüfusa göre beklenen rakamın çok altındadır.⁹

Ülkemizde İzmir ilinde İzmir Kansere İzlem ve Denetim Merkezi (KIDEM) tarafından yapılan çalışma ile, İzmir ili hastanelerinde kanser teşhisi konmuş 1 Mayıs 1992 ile 30 Kasım 1999 tarihleri arasında bildirilen 25,790 kanser olgusunda 9,677 kadın olgunun %27.6 sı (2,763) meme kanseri teşhisi almıştır.¹⁰

Meme kanseri en çok menopoz dönemi ve menopozdan sonra görülmekte olup 50 yaşından önce seyrek, 60 yaş üzerinde siktir. Meme kanserinde ırksal faktörler önem taşımaktadır. Bu bağlamda meme kanseri zenci kadınlarda beyazlara göre daha seyrek görülmektedir.^{1,2} Meme kanserli Afrika kökenli Amerikan bireylerde

daha kısa yaşam süresi, düşük sosyoekonomik durum ve tedaviye ulaşım şanslarının düşük olmasından kaynaklanmıştır. Bununla birlikte İspanyol kökenli Amerikalıların eşit sosyoekonomik durumda ve eşit tedavi koşullarındaki beyazlar ile kıyaslandığında daha yüksek yaşam süresine sahip oldukları belirlenmiştir.² Bir başka epidemiolojik parametre de farklı coğrafi bölgelerde gözlenen meme kanserine bağlı ölüm oranlarındaki değişmedir. Örneğin Avrupa ülkelerinde meme kanserlerine bağlı ölüm oranları daha fazla iken, Asya ülkelerinde bu oran daha düşüktür.¹

5.1.1 Meme kanseri risk faktörleri:

Bazı özellikleri taşıyan kadınlarda, meme kanserinin daha sık görüldüğü bilinmektedir. Bu özelliklere risk faktörleri denmektedir. Bu risk faktörlerini taşıyan kişilerin mutlaka meme kanserine yakalanacakları söylenemez.¹² Sadece, bu faktörleri taşımayanlara göre, daha fazla meme kanserine yakalanma olasılıkları olduğu bilinmektedir. Bu faktörleri taşımayan kişiler de meme kanserine yakalanabilirler. Meme kanserine yakalanan kadınların yarısı, bu risk faktörlerini hiç taşımamaktadır. Bu nedenle, risk faktörlerinin taşımayan kişiler de olağan kontrollerini yaptırmalıdır. Meme kanserine yakalanma riskini artıran faktörleri kısaca şu şekilde sayılabilmektedir;

Yaş: İleri yaş önemli bir risk faktörüdür. Yeni meme kanseri tanısı konan kadınların % 70'i, 50 yaş üzerindedir. Diğer bir deyimle, yaşı 50 yaş üzerinde olan kadınlarda meme kanseri görülme sıklığı, yaşı 50 yaşın altında olan kadınlardan 4 kat daha fazladır.¹¹ Bu nedenle, 50 yaş üzerindeki her kadın, mutlaka yılda bir defa hekime baş vurarak muayene olmalı ve mamografi filmini çektirmelidir.

Kişisel meme kanseri hikayesi: Daha önce meme kanseri geçirmiş ve tedavi olmuş kadınlarda, diğer memede kanser gelişme olasılığı normal kadınlara göre 3-4 kat daha fazladır.¹²

Ailede meme kanseri hikayesi: Ailesinde birinci derece yakınları arasında meme kanseri görülmüş kadınların, meme kanserine yakalanma olasılığı, diğer kadınlara göre daha fazladır.¹³ Örneğin, kız kardeşi veya annesi meme kanserine yakalanan bir kadının, meme kanserine yakalanma riski, diğer kadınlardan 2- 5 kat daha fazladır.¹⁴

Daha önce meme biyopsisi yapılmış olması: Memede bir kitle nedeni ile biyopsi yapılmış ve iyi huylu bir tümör saptanmış olabilir. Bazı iyi huylu tümörlerin bulunması, kanser gelişme riskini değişik oranlarda artırabilmektedir. Bu, tümörün hücresel yapısına göre değişir. Örneğin, yapılan bir biyopside, çıkartılan kitlenin patolojik incelemesi sonucu atipik hiperplazi tanısı konmuş kadınlarda, meme kanseri gelişme oranı normal kadınlara göre daha fazladır.^{12,13}

Fertil çağ süresi: Adet görmeye erken başlanması, menopoza geç girilmesi, fertil çağı uzatmaktadır. Bu sırada kadın daha uzun süre östrojen hormonu etkisi altında kalmakta, meme kanseri gelişme riski artmaktadır.^{15,16}

Doğurganlık hikayesi: İlk çocuğu doğurma yaşı önemlidir. İlk çocuğunu 30 yaşından sonra doğuran kadınlarda meme kanseri görülme oranı 20 yaşından önce doğuranlara göre iki kat fazladır. Hiç çocuk doğurmayan kadınlarda risk hafif yükselmektedir.¹⁶

Sosyoekonomik seviyenin yüksekliği: Varlıklı, sosyoekonomik düzeyi yüksek olan kadınlarda, meme kanseri görülme oranı daha fazladır. Bu ailelerin kızları daha iyi beslendikleri için daha erken gelişmekte ve erken yaşta adet görmeye başlamaktadır.¹⁷ Ayrıca bu çocuklar büyüdükleri zaman eğitim ve iş nedeni ile daha geç evlenmekte ve daha geç çocuk sahibi olmaktadırlar. Bu nedenlere bağlı olarak fertil çağın erken başlaması, geç doğurma gibi nedenler sebep olarak sayılabilir. Ayrıca bunların dışında başka faktörler de rol almaktadır.

Östrojen hormonu tedavisi görenler: Menopoz nedeni ile uzun süre östrojen tedavisi (10 yıldan fazla) gören kadınlarda, meme kanseri riski artmaktadır.^{18,19}

Doğum kontrol hapi kullanılması: Bu konuda farklı görüşler olmakla birlikte hafif bir risk artışı olduğu ileri sürülmektedir. On yıl önce doğum kontrol hapını bırakmış olan kadınlarda ise, bu risk tamamen ortadan kalkmaktadır.¹⁹

Alkol kullanılması: Fazla alkol alan kadınlarda, almayan kadınlara göre risk nispeten artmaktadır. Günde üç bardak yüksek dereceli alkol içen bir kadının meme kanserine yakalanma riski, hiç içmeyen kadına göre iki kat daha fazladır.²⁰

Yaşam biçimi: Şişmanlık ve yağlı beslenme: Bazı çalışmalarda şişmanlığın, özellikle 50 yaş üzerindeki kadınlarda meme kanserine yakalanma riskini artırdığı gözlenmiştir. Özellikle, doymuş yağların fazla bulunduğu yağlı et gibi yemekler ve

yağlı süt ürünlerinin fazla alınmasının bu riski artırdığı ileri sürülmüştür. Sigaranın kesin bir etkisi gösterilememiştir.²¹

5.1.2 Meme kanserlerinde prognostik belirleyiciler:

Meme kanserinde prognostik faktörler üç klinik drumda kullanılmaktadır. Birincisi, sistemik adjuvan terapisi gerekmeyen ve lokal cerrahi gerektiren iyi prognozlu hastaları saptamak; ikincisi, konvensiyonel terapi gerektiren kötü prognozlu hastaları belirtmek; üçüncüsü, tüm bu hastaların özgül terapilerden yararlanıp yararlanmayacaklarını göstermektir.²² Meme kanserlerinde prognostik belirleyiciler olarak birçok klinikopatolojik veri çalışılmakta ve bu konuda literatürde çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Bunlar arasında önemli olan prognostik belirleyiciler; Tümör boyutu histolojik evresi, lenf nodu metastazı, uzak organ metastazı ve steroid hormon reseptörü aktiviteleridir.

Tümör boyutu: Meme kanserinin evrelendirilmesi, tümörlerin klinik değerlendirilmesinde ve tedavi seçeneğine karar verilmesinde önem taşımaktadır. Primer tümör büyüklüğü sağ kalım açısından en önemli ölçütlerden biridir. 2cm altındaki tümörlerin iyi prognoza sahip oldukları bilinmektedir. 2cm ile 5 cm arası tümörler orta, 5cm den büyük tümörler kötü prognoza sahiptirler.²³

Histolojik tür: İnvaziv duktal ve İnvaziv lobüler karsinomlara göre, tübüler, medüller, müsinöz, adenoid kistik, papiller, jüvenil (sekretuar) karsinom daha iyi prognoza sahiptir. İnflamatuar karsinom (klinik), taşlı yüzük hücreli karsinom , karsinokarsinom, ise oldukça kötü prognozludur. Skuamöz hücreli, metaplastik karsinom, nöroendokrin diferansiyasyon gösteren karsinomlar, İnvaziv duktal karsinoma göre daha agresiftirler.²⁴

Tümör TNM evresi: Evrelendirme klinik ve patolojik kriterlere göre yapılmaktadır. Evrelendirme her hasta için tedavi şeklinin seçiminde, prognoz tahmininde, farklı tedavi programlarının sonuçlarının karşılaştırmada önemlidir. Kanser evrelendirilmesi, "American Joint Committee on Cancer" (AJCC) tarafından belirlenmiştir.²⁵ Klinik evrelendirme, fiziksel muayene, görüntüleme bulguları, cerrahi bulgular ve memenin ya da diğer dokuların patolojik değerlendirmesi sonucu elde edilen bulgulara göre yapılır. Klinik evrelendirme terapinin seçilmesi ve değerlendirilmesinde yararlı olur. Patolojik evrelendirme ve klinik evrelendirme

cerrahi rezeksiyon için büyük önem taşır. Patolojik evre ise, sonuçları değerlendirmede ve prognozu tahmin etmede önemli bir yer tutar. İnvaziv karsinomların aksiller lenf nodu pozitifliği insidansının noninvaziv karsinomlardan daha yüksek olduğu ve zayıf klinik iyileşme gösterdiği belirtilmiştir.²²

Steroid hormon reseptör aktivitesi: Meme kanserli kişilerin tümör dokularında immünohistokimyasal olarak, östrojen reseptörü (ER) ve Progesteron reseptörü (PR) aktivitesinin gösterilmesi , tedavi öncesi hastanın klinik değerlendirilmesinde standart bir aşama olarak uygulanmaktadır. ER ve PR aktivitesi olan hastaların %55-60'ı hormon tedavisine yanıt verirken, bu oran reseptör aktivitesi olmayanlarda %10 dur.²²

Hücre proliferasyonu: Mitoz sayımı, Ki-67 yada akış sitometrisi yöntemi ile S-faz fraksiyonunun ölçülmesi ile belirlenen hücre proliferasyonu prognoz açısından önem taşımaktadır. Ki-67 büyüme fraksiyonu ne kadar çok ise tümör agresifliği de o kadar çoktur. Tartışmalı olmakla birlikte anaploid tümörlerin daha kötü prognozlu olduğu bilinmektedir.²²

Yaş: Meme kanserlerinde erken yaş (35 yaş altı) kötü prognostik etki göstermektedir. Fakat bazı yayınlarda ise bu yaş grubundaki meme kanserli olgularda tedavi sonrası prognoz, ileri yaştaki olgulardan farklılıklar göstermemektedir.¹¹

5.2 Karsinogenezde Major genetik değişiklikler:

Hücre döngüsü, çoğalmak üzere uyarılmış bir hücrede gerçekleşen ve bir dizi geçici biyokimyasal aktivitelerin ve morfolojik değişikliklerin görüldüğü bir süreçtir. Bir döngüye giren hücre, morfolojik ve genetik olarak birbirine tıpa tıp benzeyen iki hücre oluşumuyla döngüyü tamamlar. Hücre proliferasyonu hücre döngüsü içinde yer alan bazı kontrol noktaları ("check-points") ında düzenli olarak kontrol edilir. Hücre döngüsü proliferasyon, farklılaşma (diferansiyasyon) ve apoptozis gibi temel hücre fonksiyonları düzenlediğinden büyüme ve doku "turnover"ıyla yakın ilişki içinde bulunur. Bu düzenleme özelliğinin olması organizmadaki hemen hemen her tür fizyolojik ve patolojik durumlarda hücre döngüsünün ne kadar kritik bir öneme sahip olduğunu göstermektedir. Bir çok kanser türünde hücre döngüsünün regülatör proteinleri olan siklinler veya siklin-bağımlı kinaz inhibitörleri (CDI)'nin düzeylerinde

anormallikler saptanmıştır.¹² Örneğin, siklin D meme ve skuamoz hücre tümörlerinde aşırı eksprese olmaktadır. Bir tür CDI geni olan p16 geninin ailesel melanom ve pankreatik kanser olgularında rearanje olduğu bulunmuştur.¹² Apoptoz, nekrozdan farklı olarak, fizyolojik şartlar altında da meydana gelen ve genel olarak doku homeostazını sağlayan bir hücre ölüm şeklidir. Ayrıca, fizyolojik hücre ölümü veya hücre intiharı olarak da bilinmektedir. Apoptoz ve hücre döngüsü birbirleriyle kompleks ve yakın bir ilişki içinde çalışırlar. Örneğin apoptozda rol alan bir protein olan p53 aynı zamanda hücre döngüsünü durduran ve hücreye DNA'sındaki hasarları onarması için zaman kazandıran bir işlev görür. Apoptoz organizmada proliferasyonla denge halinde, birçok dokuda doğal olarak oluşmaktadır. Primatlarda embriyogenez döneminde var olan parmaklar arası perdelerin ve "tadpole" kuyruklarının kaybolması buna örnek olarak verilebilir. Bunun sonucunda apoptoz ve proliferasyon ile dokunun hücresel içeriği sayısal olarak hep aynı kalır. Böylece doku homeostazı yani yeniden yapım ve yıkımın bir harmoni içinde oluşu apoptoz/proliferasyon dengesinin sağlıklı bir şekilde sürdürülmesine bağlıdır. Araştırmalarda bu dengenin bozulmasının birçok önemli hastalık patogenezinde rol aldığı gözlenmiştir. Örneğin, bu dengenin apoptozun hızlanmasına yol açacak biçimde bozulmasının Alzheimer hastalığı gibi bazı nörodejeneratif hastalıkların veya AIDS'in patogenezinde, apoptozun baskılanmasına yol açacak şekilde bozulmasının ise karsinogenezde rol aldığı gösterilmiştir.¹²

Karsinogenez çok basamaklı bir süreçte değişik karsinojenlerin (kimyasal, fiziksel veya viral) etkisiyle oluşan genetik ve epigenetik hasarlanmalarla gerçekleşir. Kanserlerde oluşan genetik değişiklikler kromozomal düzeyde, nükleotid düzeyinde (tek veya çoklu baz değişiklikleri) ya da DNA promotor bölge metilasyonu gibi epigenetik düzeyde oluşabilmektedir. Kanser hücrelerinin büyüme ve çoğalma sürecinde meydana gelen genetik değişiklikler (onkogenler ve tümör baskılayıcı genler), konakçı faktörleriyle (enzim polimorfizimleri) tümör konakçı etkileşimleri (ajiyogenez, invazyon, metastaz) sonucunda organizmada tümör oluşmaktadır.

Karsinogenezdeki Majör genetik olaylar şöyle sıralanabilir.

- Onkogenlerin mutasyonel aktivasyonu.
- Tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu.
- Mutatör gen inaktivasyonu (mutatör fenotip)

5.2.1 Onkogenlerin mutasyonel aktivasyonu.

1969'da Huebner ve Tadora ilk olarak kanser gelişiminde onkogenlerin rolünün olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Onkogenler, proto-onkogen denen normal hücre genlerinden gelişir. Proto-onkogenlerin kodlanmış protein ürünleri genel olarak hücre sinyalizasyonu ve hücre büyümesinin düzenlenmesinde önemli rol oynar. Bu genler mutasyon, kromozomal translokasyon, 'amplifikasyon' (çoğalma) veya transkripsiyonel disregülasyon ile aktive olarak anormal protein sentezine veya aşırı protein yapımına neden olur. Aktive olan proto-onkogenlere onkogen, protein ürünlerine ise onkoprotein denir. Proto-onkogenler, hücre içi sinyal ileticileri, nükleer transkripsiyon faktörleri, hücre döngüsünü kontrol eden proteinler, büyüme faktörleri, hormonlar ve reseptörleri olmak üzere sınıflanabilmektedirler.

Proto-onkogenler değişik yollarla aktive olarak onkogen haline gelirler. Genin yapısal bir bölgesinde değişiklik sonucu farklı fonksiyon gören bir protein sentezlenebilir. Bu tip değişiklikler nokta mutasyonları veya kromozomal translokasyon sonucunda oluşur.³ Bir başka mekanizma da, genin ekspresyonunu düzenleyen bölgede oluşan bir değişiklik veya transkripsiyon faktörlerindeki değişiklik sonucu, yapısal olarak normal olmasına karşın gen ürününün aşırı miktarda üretilmesidir. Diğer bir mekanizma ise gen amplifikasyonu sonucu ürün miktarındaki artıştır.⁸

5.2.2 Tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu.

Tümör baskılayıcı genler hücrenin büyüme ve çoğalmasını baskılayan bir grup genlerdir. Tümör baskılayıcı genlerin sentezlettikleri proteinlerin hücrelerin büyüme ve çoğalmasını baskılaması nedeniyle bu genlerin dolayısı ile baskılayıcı proteinlerin olmaması sonucunda hücre kontrolsüz bir şekilde çoğalmaktadır. Tümör baskılayıcı genleri bir otomobilin fren pedalına benzetmek mümkündür. Freni bozulmuş bir otomobilin kontrolden çıkması gibi tümör baskılayıcı genini kaybetmiş hücre de

büyüme ve çoğalma kontrolünü kaybetmiştir. Normal bir hücrede bir çift halinde bulunan bir tümör baskılayıcı genin her iki allelinin kaybolması veya görev göremez derecede değişikliğe uğraması kansere neden olmaktadır.⁵⁸ Bu genlerin allelerinden birinin doğuştan aktivite kaybettiği bireyler yüksek kanser riskine sahip kişilerdir. Genin tek allelinin varlığı kanseri önlemek için yeterlidir. Bu nedenle bir ebeveynden gelen allelindeki bozukluk kanserle sonuçlanmamaktadır. Fakat, ikinci allelde de bir değişiklik olursa kanserleşme süreci başlamaktadır.⁴⁴

TP53 geni insan kanserlerinde mutasyonu en sık görülen tümör baskılayıcı gendir. Bu genin ürünü olan p53 proteini birçok kompleks aktivitesi olan ve gerektiğinde hücre döngüsünü baskılayan bir proteindir.⁶⁸ Bu protein yanlış eşleşmiş nükleotidleri DNA sarmalı kırıkları gibi DNA lezyonlarını ve ayrıca radyasyon veya kemoterapi ile oluşan DNA hasarlarını algılayan proteinlerle etkileşir. DNA'daki mutasyon saptandığında, p53 hücre döngüsünü durdurur, böylece hücrenin G1 den S fazına geçişini veya S'nin tamamlanmasını engeller. Ardından, ya tamir mekanizması proteinlerini ya da apoptoza yol açan proteinleri indükler.

Retinoblastoma (RB) geni ilk bulunan tümör baskılayıcı gendir. Bu gen hücrel diferansiyasyonda çok önemli bir role sahiptir. Normalde RB geni hücre döngüsünü G1 fazında inhibe eder. P16-siklin D1/CDK 4-6-RB yolu hücre döngüsünün G1'den S fazına geçişte önemli görevlere sahiptirler. Bu yoldaki proteinlerin fonksiyon bozukluğu mitojenik aktivite ile sonlanır.

5.2.3 Proto-onkogen ve Tümör baskılayıcı gen örneği

Bir hücrenin canlılığının en belirgin göstergelerinden biri onun birbirine tıpa tıp benzeyen iki hücreye bölünmesidir. Genel olarak, hücreler bir bölünme sinyali almadıkları sürece hücre döngüsünün aktif (G1, G2, S ve M) fazlarına girmezler ve istirahat fazı 'G0' 'da beklerler. Hücrelerin ikiye bölünmesi mitoz (veya gonadlarda mayoz)'le gerçekleşir. Hücreyi bölünmeye sevk eden sinyaller (örneğin, büyüme faktörleri, sitokinler veya mitojenler) çok çeşitlidir. Hücre bölünme sinyalini aldığı anda sinyal ileti kaskatı (signal transduction cascade) adı verilen bir ileti mekanizması devreye girer. Bu ileti mekanizması ya transkripsiyonu, hücre döngüsünü veya hücre iskeletini kontrol eden bir substratı fosforiller yada nükleusa ulaşıp doğrudan transkripsiyonu modüle eder. Böylece, hücre döngüye sokularak bölünmeye sevk

edilmiş olur. Hücreler mitoz girmeden önce bir hazırlık safhası geçirirler ve bu safhada hücreler hacimce büyürler. Bu hazırlık safhasında bölünme için gerekli olan çeşitli düzenleyici proteinler sentezlenir. Bu safhaya da interfaz denir. Interfaz kendi içinde G1, S, ve G2 alt birimlerinden oluşur. Mitoz ve interfaz beraberce hücre döngüsü olarak bilinen bir süreci oluştururlar. Dolayısıyla, bir hücre döngüsü, fazların işleyiş sırasına göre söylemek gerekirse; G1, S, G2 ve M fazlarından oluşur. Hücre döngüsü bu döngüye özgü bir takım proteinler olan siklinler, siklin-bağımlı serin/treonin protein kinazlar (CDK) ve siklin-bağımlı kinaz inhibitörleri (CDI) tarafından özgün olarak kontrol edilir. Siklinler, CDK ve CDI'lerinin düzeyleri hücre döngüsünün çeşitli aşamalarında farklılık gösterir ve oldukça komplike bir düzen içinde döngünün ilerlemesini düzenlerler. CDK'lar kendi başlarına bulduklarında inaktiftirler. Ancak, siklin'e bağlandıklarında aktifleşirler ve böylece aktif siklin-CDK kompleksleri meydana gelir. Siklinler bu komplekslerin regülatör alt birimleri, CDK'lar ise katalitik alt birimleridir. Siklinler (A, B1, D ve E) döngünün çeşitli fazlarında periyodik olarak bir taraftan sentez edilirlerken diğer taraftan da yıkılırlar. Hücre döngüsü aktivasyonu yoluyla etkili olan ve bu nedenle proto-onkogen grubunda yer alan bu genlerin ürün miktarı ve ekspresyon kontrolü hücre için yaşamsal önemlidir. Siklinlerin periyodik yapım ve yıkımları, dolayısıyla ilişkide buldukları CDK (CDK2, CDK4, CDK5, CDK6, CDK7 ve CDK25)'ların aktivitelerinin düzenlenmesini sağlar. CDK'ların aktiviteleri sadece siklinlerle düzenlenmez ayrıca özgün fosforilasyon/defosforilasyona yol açan başka yollarla da düzenlenir.¹¹

Tümör baskılayıcı genlerden olan CDI'leri (p15, p18, p19, p21 ve p27) ise ya siklinlere, ya CDK'lara yada siklin-CDK komplekslerine bağlanarak CDK'ların aktivitelerini inhibe ederler.¹² Hücredeki siklin düzeyi transkripsiyon aşamasında regüle edilir. Yıkımları ise "ubiquitin" metabolik yoluyla sağlanır. D tip (D1, 2, 3) siklinler başlama siklinleri olarak adlandırılırlar ve büyüme faktörleri veya mitojenlere yanıt olarak eksprese edilirler. Mitojenler ortamdaki uzaklaştırıldığında ise hızla yıkılırlar. Siklin E, G1/S fazlarının sınırında geçici olarak sentez edilir ve hücre S fazına girdiği anda hızla yıkılır. Siklin E, CDK2'yi regüle eder. Siklin A ve B1 mitotik siklinlerdir. Siklin A, S fazı boyunca sentez edilir ve anafaz geçişi için hızla yıkılır. Siklin A, CDK2 ile kompleks yapar ve bu kompleksin DNA replikasyonunda direkt rolünün olduğu düşünülmektedir. Siklin B1 ise S fazının geç döneminde sentez edilir

ve G2 fazından M fazına geçerken sentezi maksimal düzeye erişir, ardından anafazda yıkılır. Siklin B, CDK2 ile etkileşime girer ve bu kompleks MPF ("M-phase/maturation promoting factor") olarak da bilinir. Siklin B'nin anafazda yıkılmasıyla birlikte hücre mitozdan çıkar ve G1'e ilerler.¹²

Hücre döngüsü düzenlenmesinde görev ve proto-onkogen/ tümör baskılayıcı gen grubundan olan bu genlerde ortaya çıkan değişiklikler bu kontrol noktalarının düzenlenmesini bozarak kontrolsüz hücre proliferasyonuna neden olmaktadır.

Kanser hücreleri, çeşitli büyüme faktörleri üretirler. Bu büyüme faktörlerinin hücre yüzeyindeki reseptörleriyle etkileşimi sonucunda kendi büyümelerini otokrin yollarla uyarırlar. Neoplastik hücrelerin birçok büyüme faktörünün salınımı ile çoğalma avantajı sağladıkları bilinmektedir.¹²

Pek çok büyüme faktörü ve reseptörleri kanser hücreleri ve normal hücreler tarafından eksprese edilmektedirler. Bu büyüme faktörleri otokrin, parakrin ve endokrin yollarla kanser büyümesinde rol oynarlar. Eğer bir tümör hücresi, hem bir büyüme faktörü hem de reseptörünü taşıyorsa kendisini uyaran büyüme halkasına sahip demektir. Buna 'Otokrin Büyüme Halkası' denir. Otokrin etki normal hücrelerde de görülür, ancak bu yolda yer alan proteinleri kodlayan ve çoğu proto-onkogen veya tümör baskılayıcı gen gurubunda bulunan genlerde değişiklik sonucu farklı bir aktivite gelişebilir.¹¹³ Dengeli büyüme için karşılıklı düzenleyici sistemler bir arada bulunur. Kanser hücrelerinde ise bu dengeler bozulmuştur. Ancak tek bir büyüme faktörü kanser gelişimini düzenlemez. Pek çok büyüme faktörü ve reseptörü "multiotokrin loop" oluşturarak etki gösterirler. Metastaz ve invazyonun da bu büyüme faktörleri ve reseptörlerinin etkileşimi sonucunda ortaya çıktığı bilinmektedir.⁷

5.2.4 DNA tamirinde görev alan genlerde ortaya çıkan değişiklikler.

İnsanlarda gelişen kanserlerin % 80'inde neden çevresel faktörlerdir. Gerek endojen gerekse ekzojen karsinojenler ve genotoksik olaylara maruziyet, DNA'da hasara neden olurlar. Normal koşullarda hücre döngüsü yavaşlar ve bu yavaşlama sürecinde hücreler DNA hasarını tamir etme fırsatı bulurlar. DNA tamiri normal hücre döngüsünün devamı için esastır ve hatalı DNA tamiri karsinogenez gelişiminden sorumlu önemli bir faktördür. Tamir genlerinde, germ hattında taşınan bir mutasyon

olması halinde bireyin mutasyon riski ve hızı artar. Sonuç olarak proto-onkogen/ tümör baskılayıcı genlerinde mutasyon olasılığı ve dolayısı ile kanser riski artar.

Hücrel karsinogenezde, hücre döngüsü ve regülasyonu, hücre sinyal iletimi, apoptoz , protein yıkımı ve hücre diferansiyasyonu gibi mekanizmaları denetleyen genler, dominant ya da resesif etkili oluşlarına göre sırasıyla proto-onkogen veya tümör baskılayıcı gen olarak nitelendirilmektedir. DNA onarım genleri de tümör baskılayıcı genler gibi davranmalarına rağmen, ailesel kanserlerde süreci hızlandırmaları ve riski artırmaları nedeniyle ayrı bir grup olarak (mutatör genler) değerlendirilirler. Kanserin özünü oluşturan kontrolsüz hücre çoğalması yukarıda bahsettiğim gibi hücrenin hatalı Mitoz uyarımı olmasıyla yakın ilişkidir. Hatalı uyarım olma ya da hatalı sinyal iletimi, sinyal iletim yollarında görev yapan çeşitli proteinlerin aktivitelerinin artması yada azalmasıyla doğrudan ilişkilidir.

5.3 WNT Sinyal yolu:

İlk belirlenen Wnt geni, Mouse Wnt-1 (Int-1), fare meme tümörü virüsünün entegrasyonu ile meme tümörünü aktive etmesi nedeniyle 1982 yılında proto-onkogen olarak tanımlanmıştır.²⁶ Bunun sonucunda 1980 lerde Wnt genlerinin potansiyel kanser yapıcı etkileri çalışılmaya başlamıştır.^{27,28} “Drosophila segment polarity gene Wingless (wg)” nin moleküler olarak tanımlanması ve Wnt-1 geninin insan homologunun gösterilmesinden sonra, Wnt geninin, memeli doku ve organ farklılaşmasında önemli düzenlenmelerde rol aldığı tanımlanmış oldu.^{29,30} Günümüzde 100 kadar Wnt geni; insan, nematod (*Caenorabditis elegans*), ve basit bir metazoan olan hydra’dan tanımlanmış ve izole edilmiştir. Tüm bu Wnt proteinleri, hücrelerden sekrete edilirler ve yine kendi hücre yüzey reseptörlerine bağlanarak hücre akıbetini veya diğer farklılaşma parametrelerini kontrol ederler.³¹

Fertilize olan yumurta hücresinden kompleks çok hücreli organizmanın gelişimi, karmaşık ve gelişmiş sinyal yolları tarafından sıkıca kontrol edilmektedir. Bu eksiksiz sinyal yolları, Hedgehog, Tgf- β , Wnt ailesi gibi salgılanan faktörleri içermekte, bir çok basamakta kontrol altında tutulmaktadır.^{31,32} Bununla birlikte, bu kontrolün bozulması veya sürekli olarak uygunsuz bir şekilde aktivasyonu çeşitli kanserlerin ortaya çıkması ile ilişkilendirilmiştir. Yüksek derecede korunmuş olan Wnt proteinleri Wnt sinyal yolağını yönlendirirler ve hücre adezyonu, hücre polaritesi,

hücre hareketi ve gelişim genlerinin ekspresyonlarının düzenlenmesi gibi hücrenin bölünmesinden ölümüne kadarki birçok önemli mekanizmayı düzenlerler.³²

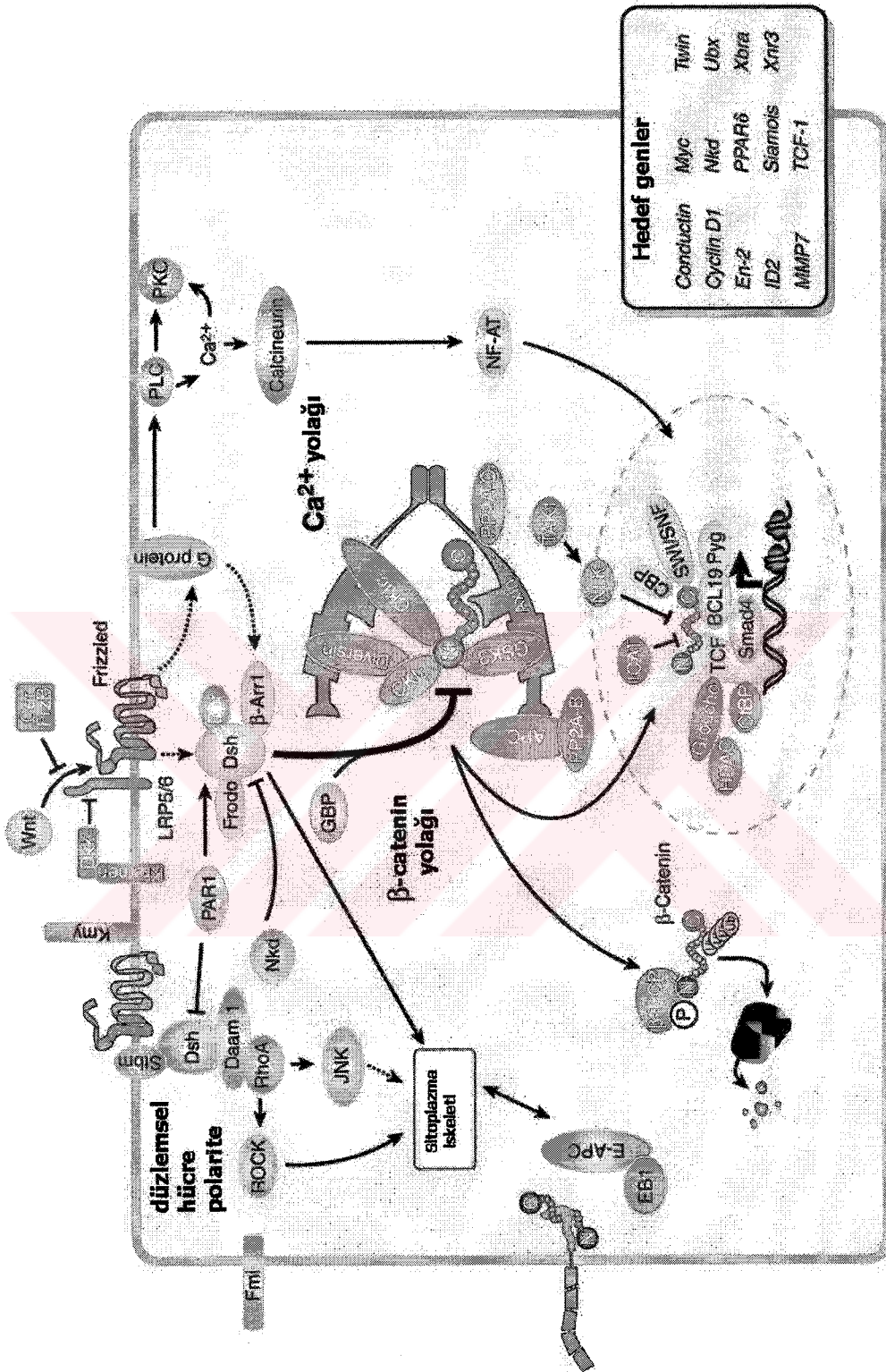
Sekrete Wnt ligandının frizzled (Frz) ailesi üyesi olan reseptörüne bağlanması ile bu çok korunmuş sinyal yolağı aktive olur. Wnt nin Frz reseptörüne bağlanması ile üç farklı hücresel yolak aktive olur. Bunlar Wnt/Ca²⁺ yolağı, düzlemsel hücre polaritesi (PCP) yolağı ve Klasik Wnt yolağıdır.^{31,33,34,35,36}

Wnt/Ca²⁺ yolağı, fosfolipaz C aktivasyonunu ve Ca²⁺ düzeyini yükseltir. Bu da "Protein kinaz C" ve "Ca²⁺-Kalmodulin bağımlı protein kinaz II'yi" aktive eder. Hücre içi Ca²⁺ iyonu yükselmesi "fosfataz Kalsinörin'i" aktive eder ve bir transkripsiyon faktörü olan NF-AT nin fosforilasyonuna neden olur. Bu fosforilasyon ile NF-AT nükleusa geçer ve bu işlem sonunda NF-AT hedef genleri aktive olur.^{32,37,38}

Düzlemsel hücre polarite (PCP) yolağı Rho A, Rac ve c-Jun amino-terminal kinaz (JNK) gibi küçük GTPaz'lar yoluyla etki gösterir. Wnt'nin Frizzled reseptörüne bağlanması JNK'i aktive eder, asimetric Hücre iskeleti organizasyonunu yönlendirir ve hücrelerin epitelyal kılıf planı içinde polarizasyonunu koordine eder.³⁹ Bu yolak, cadherin-ilişkili transmembran molekül olan Fmi'yi (flamingo), proteoglikan Kny'i (knypek), ve PDZ (PDZ aynı tipteki tekrarları içerdiği için; memelilerde "post sinaptik dansite protein" (PSD-95), Drosophilada "discharge tümör supresör" (Dlg), memelilerde "thight junction" "zonula occludens" (ZO-1) proteinlerinin ilk harflerinden ismini almıştır) molekülü, stbm'u (strabismus) kapsar ve klasik yolakdan Dsh (Dishevelled) noktasında dallanır. Dsh kendisinden sonraki efektörlere GTPaz Rho ve ROCK (Rho-ilişkili kinaz) gibi Daam1 yolu ile bağlanır. Wnt hedef geninin ürünü Nkd (naked) Wnt sinyal iletiminin bir antagonisti olarak yakın zamanda tanımlanmıştır. Nkd, Dsh'e bağlanır ve β-catenin'i bloke eder bu aynı zamanda JNK yolağının uyarılmasına yol açar.³³

Klasik Wnt yolağı evrimsel olarak yüksek derecede korunmuş proteinler tarafından kontrol edilmektedir. Bu çok fonksiyonlu protein ailesinin oluşturduğu yolak, en son β-catenin proto-onkogeninin özel hedef genlerin transkripsiyonunu aktive etmesi ile sonuçlanır.^{31,36,40} Wnt sinyal yolunda serbest haldeki sitoplazmik β-catenin yıkılır. Bu yıkım, β-catenin amino terminal ucundaki aminoasitlerin çoklu protein kompleksi tarafından fosforilenmesi yolu ile olur. Bu protein kompleksinde

CK1(Kazein Kinaz 1), bir proto-onkogen olan GSK3 β (Glikojen sentaz Kinaz üç beta), bir tümör baskılayıcı gen olan APC (Adenomatöz polipozis koli) ve 'axin' proteini bulunmaktadır.^{36,37,41} Bu kompleks, β -TRCP (beta-transductin tekrarını içeren protein) tarafından β -catenin'in ubiquitinasyonunu sağlar.^{42,43} Sonuç olarak, proteozom yoluyla β -catenin yıkılmış olur. β -catenin yıkımı sonucu sitoplazmik ve nükleer serbest β -catenin düzeyi azalır. Böylece, Tcf/ β -catenin kompleksi oluşmadığı için hedef genlerin ekspresyonu engellenmiş olur.^{44,45,46} Wnt sinyal iletisi varlığında β -catenin nükleusa geçerek, bir transkripsiyon faktörü olan Tcf (T hücre faktör)/ Lef (lenfosit enhancer faktör) ile bağlanarak transkripsiyon co-represörü olan Tle (Transductin benzeri enhancer) / Groucho ve/veya CtBP (C-terminal bağlayıcı protein) in etkisini ortadan kaldırır ve hedef genlerin ekspresyonunu aktive eder. Tcf'nin NEMO-benzer kinaz, Tak1 (Transforming beta aktive eden Kinaz) ile fosforilenmesi Wnt yolağını negatif yönde düzenler.^{44,45}



Şekil 1: Wnt yolağı (Jornal of Cell Science 2002 115, pp.3977-3978)⁴⁷.

5.3.1 Wnt yolağının ekstrasellüler inhibitörleri:

Xenopus laevis'ta üç sınıf Wnt antoganisti tanımlanmıştır. Bu antogonistlerin insandaki homologları bulunmasına rağmen *Drosophila melanogaster* ve *Caenorabditis elegans* homologları tanımlanamamıştır.

Birinci sınıf antogonistler sFRP (salgılanan frizzled-ilişkili proteinler) olarak isimlendirilirler. Bu proteinlerin diğer adı SARP (salgılanan apoptozis ilişkili protein) dir. Bu proteinler hücre sensitivitesi ve pro-apoptotik uyarılarda görev almaktadırlar. sFRP'lerin, Fz (frizzled) transmembran protein ailesi ligand bağlama domainleri vardır ve bu domain Sisteince zengindir. sFRP ler Fz proteinleri ile bağlanarak Wnt fonksiyonunu antogonistik etki ile inhibe ederler.⁴⁸

İkinci sınıf antogonistler WIF-1 (Wnt-inhibör faktör-1) olarak adlandırılırlar. WIF-1 ler antogonistik etkisini direkt olarak Wnt proteinlerine bağlanarak Wnt'nin reseptöre bağlanmasını engelleme yolu ile yaparlar. Bu proteinin insan homoloğu 12inci kromozom üzerinde yer almaktadır.³¹

Üçüncü sınıf salgılanan antogonistler DKK (Dickkopf) olarak isimlendirilmiştir. İnsan homologları DKK1, DKK2, DKK3 ve DKK4 olmak üzere dört adettir. DKK proteinleri Wnt ligandına bağlanarak etki göstermezler. DKK proteinleri Wnt-Fz-LRP reseptör kompleksinin oluşmasını inhibe ederek etki gösterirler.⁴⁹

5.3.2 Wnt yolağındaki Ligand ve reseptörler:

Wnt ligantları, meyve sineğinden insana kadar geniş bir sınıfta eksprese olan proto-onkogen ailesi üyesidir. Bu geniş ve sekrete olabilen glikoprotein ailesi, sinyal molekülleri ailesinin en büyüğü sayılmaktadır. İlk bulunan Wnt geni "Mouse Int-1" dir. Int-1 1991 yılında *Drosophila melanogaster* da Wg geninin bulunması ile Wnt-1 adını almıştır. Günümüze değin insanda 19 adet Wnt geni tanımlanmıştır. Bu ailenin tüm üyeleri yapısal olarak birbirleri ile benzerdir fakat farklı biyolojik özelliktedir.⁵⁰

Drosophila melanogaster da Fz genleri doku polaritesinin gelişiminde ağırlıklı role sahiptir. Fz geni, transmembran protein ailesi üyesidir ve yedi adet transmebran parçası bulunur.

Drosophila melanogaster, *Xenopus laevis* ve Fare de Arrow(*Drosophila*)/LRP (düşük dansiteli lipoprotein ilişkili protein)(omurgalılarda) Wnt sinyali için gereklidir.

Olasılıkla bu protein Wnt yolağında co-reseptör olarak görev almaktadır. LRP geni uzun tek geçişli transmembran proteini kodlar ve ekstrasellüler domaini direkt olarak Fz ye bağlanma özelliği göstermektedir. Lrp nin intrasellüler bölgesi ise Axin proteini ile bağlanmaktadır.⁵⁰

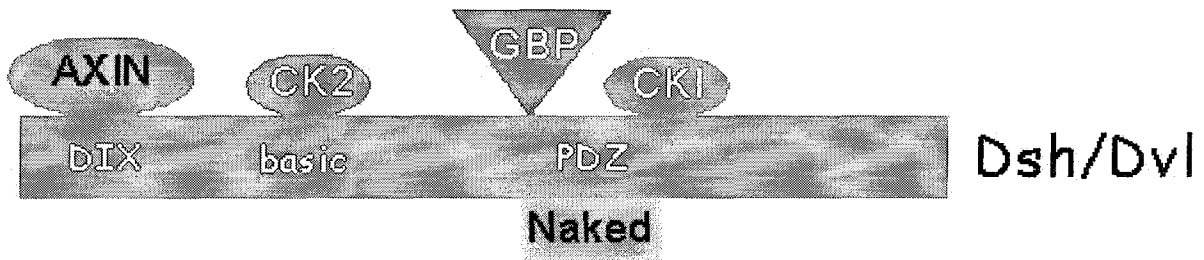
5.3.3 Wnt yolağının akış yönünde bulunan reseptör kompleksi:

Drosophila melanogaster da Dsh omurgalılarda Dvl sitoplazmik fosfoprotein kodlayan genlerdir. Bu proteinler Wnt sinyal mekanizmasının pozitif mediatörleridir. İnsanda Dvl-1, Dvl-2 ve Dvl-3 olmak üzere üç adet homoloğu bulunmaktadır. Fz reseptörünün akış yönünde görev yapan Dsh/Dvl in esas görevi tam olarak açıklanamamıştır.⁴⁹

Dsh/Dvl proteini üzerinde DIX (Dishevelled homoloğu) domaini bulunmaktadır. Axin proteini Dsh/Dvl'in Dix domainine bağlanma özelliğindedir. Bu Bağlanma Axin proteinini inhibe eder. Bu inhibisyon sonucunda β -catenin GSK3 β tarafından fosfatlanır.⁵⁰

Ck2 *Drosophila melanogaster* da Wnt sinyal yolağında pozitif düzenleyici olarak görev alan bir proteindir. Ck2, Dsh/Dvl'in bazik domeynine bağlanır. Bu bağlanma sonucunda Dsh/Dvl fosforilenerek ile aktive olur.⁵¹

Wnt uyarımı olduğunda Ck1, Dsh/Dvl'e bağlanır. Bu bağlanma ile β -catenin 45 inci Serin aminoasitinden defosforile olur. Bu da β -catenin stabilizasyonuna yol açar ve β -catenin yolağının aktivasyonu gerçekleşir.^{51,52}



Şekil 2:Wnt yolağı molekülü Dsh/Dvl ve bağlanan domeynleri

Xenopus laevis' ta Wnt uyarısı sırasında GBP (GSK-3 bağlayıcı protein), Dvl'in PDZ domeynine bağlanmaktadır. PDZ aynı tipteki tekrarları içerdiği için; memelilerde "post sinaptik dansite protein" (PSD-95), *Drosophila melanogaster*da "discharge tümör

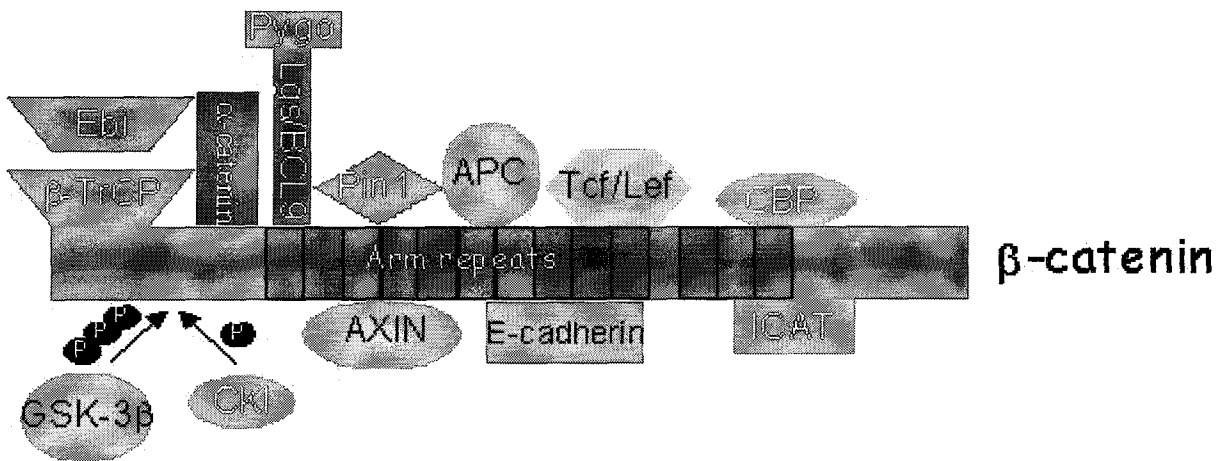
supresör" (Dlg), memelilerde "zonula okludens" (ZO-1) proteinlerinin ilk harflerinden ismini almıştır.⁵³

Drosophila melanogaster da, 'naked' proteinin Dsh ile bağlandığı gösterilmiştir. Bu bağlanma ile Dsh aktivitesi downregüle olmaktadır. Naked proteini ekspresyonu Wg (Wingless) tarafından negatif feedback mekanizma ile kontrol edilmektedir.⁵⁴

5.3.4 Wnt sinyal yolağında multiprotein kompleks proteinleri:

Wnt yolağında, β -catenin stabilizasyonu multi protein kompleksi tarafından düzenlenmektedir. Bu kompleks β -catenin, Axin/Conductin, APC ve GSK3 β proteinleri tarafından oluşturulmuştur.⁵⁵

β -catenin E-cadherin'in sitoplazmik domeyni ve α -catenin ile birlikte aktin iskeletine bağlanan bir proteindir. β -catenin *Drosophila melanogaster*'daki Arm (Armadillo) protein tekrarları ile homoloji gösterir.^{56,57} Yapısal olarak amino terminal domaininde ilk 130 aminoasit ve karboksi terminal domaininde de 110 aminoasit içinde 42 aminoasitlik tekrarlar halinde 12 adet Arm dizisi bulunmaktadır. Bu diziler *Drosophila melanogaster*'daki Arm tekrarları ile homoloji göstermektedir. β -catenin'in amino terminal domeyni stabilitesinin düzenlenmesinde önemlidir. Karboksi terminal domeyni ise transkripsiyonel aktivasyon domeynidir. β -catenin aminoasitlerinin %70'i γ -catenin (Plakoglobin) ile homoloji gösterir. Bu homolojinin %80'i Arm tekrarları içindedir. Plakoglobin; E-cadherin, α -catenin, APC, Axin ve Tcf/Lef transkripsiyonel faktörlere bağlanır ve hücre adezyonu ve Wnt sinyal yolunda görev alır.⁵⁸



Şekil 3: Multiprotein kompleks proteinleri

β -catenin katabolizmasında ubiquitinasyona bağlı iki degradasyon mekanizması rol alır. β -TrCP ve Ebi, Fbox proteinleridir ve her iki tip protein de β -catenin'in N-terminal bölgesine bağlanırlar. Her iki degradasyon sistemi de APC proteini ile etkileşim gösterir^{59,60}. β , β -catenini Thr (41), Ser(35) ve Ser (33) ten fosfatlar. Bu fosfatlanma sonucunda CK1 β -catenini Ser (45) ten fosfatlamaktadır.^{52,55,60} Tüm bu fosforilasyonlar sonucu β -catenin proteozom sisteminde yıkılır. α -catenin β -catenin'in N-terminal ucuna bağlanmaktadır. E-cadherin β -catenin'in Arm tekrar bölgesine bağlanmaktadır. Her iki proteinde hücre adezyonunu kontrol etmektedir.⁶¹

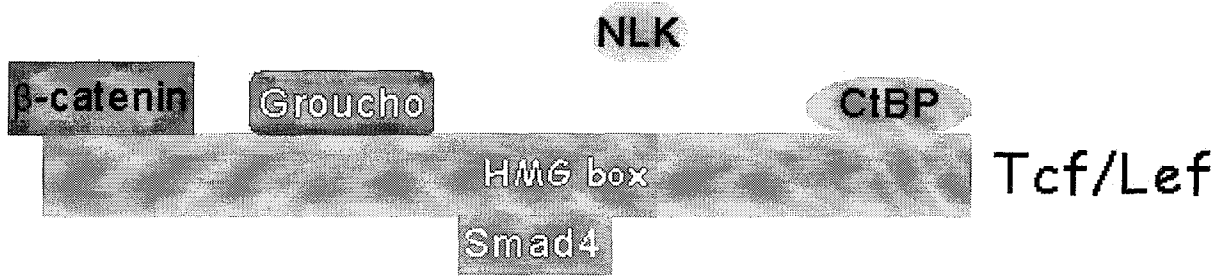
Drosophila melanogaster da Lgs (Legless) ve Pygo (Pygopus) proteinlerinin Arm tekrar bölgesine bağlanarak wg sinyal yolunda transkripsiyonel co-aktivatör molekül olarak fonksiyon gösterdikleri belirtilmiştir. Lgs' nin insandaki homoloğu BCL-9 dur. Pygo geni ise PHD' yi (plant homology domain) kodlar ve insanda hPYGO1 ve hPYGO2 olmak üzere iki adet homoloğu bulunmaktadır.⁶² Pygo'nun esas mekanizması tam olarak tanımlanamamıştır. Pin1 (Pepthydyl-propyl cis-trans isomeraz) APC bağlanma bölgesindeki Ser-Pro motifini fosforiller ve APC ve β -catenin etkileşimini inhibe eder. Bu da Wnt sinyal yolağını negatif olarak regüle eder.⁶³

Xenopus laevis'ta CBP' in (Creb bağlayıcı protein) β -catenin transaktivasyon domeynine bağlanarak Wnt hedef genlerini uyardığı gösterilmiştir.⁶⁴

Fare çalışmalarında TCF4' in (ICAT) β -catenin C terminal domeynine bağlanarak Wnt hedef genlerinin ekspresyonunu baskıladığı gösterilmiştir.⁶⁵

5.3.5 Wnt yolağının nükleer komponentleri:

Stabilize olan β -catenin' in nükleusa geçtiği gösterilmiştir. Fakat β -catenin'in nükleusa transportun daki mekanizma tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. Nükleer β -catenin Tcf/Lef transkripsiyon faktörü ailesi ile bağlanmaktadır. Bu bağlanma Wnt sinyal yolundaki genlerin ekspresyonunun anahtar faktörüdür.



Şekil 4:Wnt yolağında nükleer proteinler

Tcf/Lef proteinleri “high mobility grup” (HMG)-box transkripsiyon faktörleridir.⁶⁶ İnsanda dört adet homoloğu bulunmaktadır. Bunlar Lef1, Tcf1, Tcf3 ve Tcf4 olarak adlandırılmaktadırlar. Bu dört homolog protein de DNA da aynı motife bağlanmakta ancak dokuya özgül ekspresyon paterni göstermektedirler⁶⁷. Tcf/Lef; β -catenin, BCL-9, Pygo ve CBP ile kompleks oluşturur ve c-myc, Cyclin D1, WISP-3 (WNT inducible signaling pathway) ve MMP-7 (matriks metalloproteinaz proteini) gibi hedef genlerin ekspresyonlarını açar.⁶⁸ Eğer ortamda Wnt uyarımı yoksa Tcf/Lef “Groucho” ve CtBP (c-terminal binding protein) gibi co-represörlere bağlı kalarak transkripsiyonu baskırlar.⁶⁹

5.3.6 Wnt yolağı Hedef genleri:

Günümüzde *Drosophila melanogaster* ve omurgalılarda tanımlanmış 50 den fazla Wnt hedef geni tanımlanmıştır. Bu genler gelişim , hücre proliferasyonu, hücre-hücre adezyonu ve hücre matriks etkileşiminde görev almaktadırlar. Bu genlerin büyük bir kısmı promotör bölgelerinde Tcf/Lef bağlanma motifleri içermektedirler.³¹

5.4 İnsan solid tümörlerinde Wnt yolağındaki değişiklikler:

Wnt sinyal yolağının kronik aktivasyonu bir çok kanser tipi ile ilişkilendirilmiştir⁷⁰. Kolorektal,^{71,72,73,74,75,76,77} hepatoselüler kanserlerde,^{78,79,80} Kötü diferansiyasyon gösteren çocukluk çağı hepatoblastomlarda,⁸¹ endometrial kanserde,^{82,83,84,85,86,87,88} over kanserlerinde,^{87,88,89} gastrik kanserlerde,^{90,91} Böbrek Wilms tümörlerinde,^{92,93} sporadik medülloblastomlarda,^{94,95} meme kanserlerinde,^{96,97,98} pankreatik tümörlerde,⁹⁹ tiroid kansinomlarında,^{100,101,102,103} renal ve transisyonel hücre kansinomunda,¹⁰⁴ pilomatrixoma olgularında,¹⁰⁵ ve nöroektodermal tümörlerde¹⁰⁶ Wnt yolağındaki düzenleyici genlerin mutasyonları ile yolağın kronik aktivasyonu tanımlanmıştır. Wnt yolağındaki CTNNB1, AXIN ve APC

genlerinde mutasyonlar ve “Hot spot” mutasyonlar belirlenmiştir. Bu yolda görev alan GSK3 β 'nin mutant olduğu kanser türü tanımlanmamıştır. Bu GSK3 β 'nin diğer proteinlere nazaran daha önemli bir işleve sahip olduğunu ve mutasyonlarının yaşama bağdaşmadığı anlamına gelebilir.⁵⁰ İnsan solid tümörlerinde Wnt yolağında en çok çalışılan genlerden biri CTNNB1 dir.

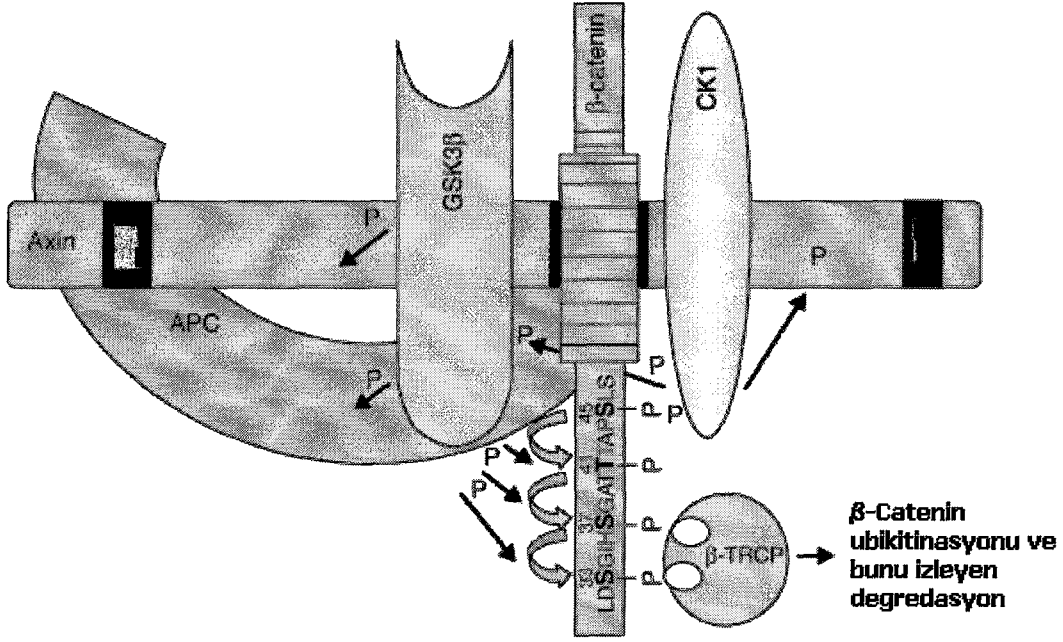
5.5 CTNNB1 (β -Catenin):

CTNNB1 geni β -catenin proteinini kodlamaktadır.¹⁰⁷ Yapılan haritalama çalışmaları ile genin insanda 3p22-p21.3 ta lokalize olduğu gösterilmiştir.¹⁰⁸ Genin toplam uzunluğu 40.940 bp dir, 16 adet eksonu vardır. Eksonların büyüklükleri 61-790bp arasında değişmektedir. 16' ıncı ekson içinde alternatif 'splice' varyantı bulunmaktadır.¹⁰⁹



Şekil 5: β -catenin Ekson intron bağlantıları.

β -catenin cDNA sı 2346bp uzunluktadır ve 781 aminoasit kodlamaktadır. Genin translasyon başlangıç kodonu 2. ekson içindedir. β -catenin geni içerisinde 12 adet 42 aminoasitten oluşmuş ve evrimsel olarak korunmuş olan Arm tekrar bölgeleri bulunmaktadır. Arm tekrarları sırası ile (152-191), (193-234), (235-276), (277-381), (319-360), (361-389), (400-441), (442-484), (489-530), (531-571), (594-636), (637-666) aminoasitleri arasındadır.¹¹⁰



Şekil 6:β-catenin'e bağlanan proteinler ve fosforile olan aminoasitler

β-catenin üzerinde, β-catenin'in degradasyonu için GSK3β tarafından fosforile edilen aminoasit dizileri bulunmaktadır. Bu aminoasitler sırası ile 33 üncü, 37 inci ve 45 inci aminoasit olarak serin ve 41 inci aminoasit olan treonin dir.^{52,55,60} Bununla birlikte 86 inci aminoasit ve 654 üncü aminoasit Ck1 fosforilasyonunda önemlidir.¹¹¹

Intrasellüler Wnt sinyal iletimi, sitozolik β-catenin stabilizasyonuna yol açar. Wnt'lerin yokluğunda β-catenin CK1α (kasein kinaz Iα) ve/veya CK1ε ile Ser45'ten fosforillenir, bu GSK 3β 'yı serin/treonin rezidüleri 41, 37 ve 33.'ten fosforillemek üzere etkin kılar.^{51,52} Bu rezidülerden en az ikisinin fosforilasyonu β-catenin'in ubiquitinlenmesini βTrCP ve proteazom sisteminde yıkımını tetikler. β-catenin'in fosforilasyonu bir multiprotein kompleks içinde meydana gelir. Bu kompleks β-catenin, Axin/Conductin, APC ve GSK3β proteinleri tarafından oluşturulmuştur.^{42,112} β-catenin yıkımı multisubunit PP2A (serine/treonin phosphataz) ile modüle edilir.⁴² Dsh aktivitesi kinaz PAR1 ile modüle edilir, bu β-catenin yolağının Wnt aktivasyonunu tetikler ama JNK yolağını bloke eder.⁴⁷ Diğer Dsh ile ilişkiye giren moleküller 'frodo' ve β-Arr1 (β-arrestin 1) dir, bu proteinler Dsh ile ve genel Dsh antagonisti Dpr (Dapper) ile sinerjik etki gösterir.³³

Stabilize β-catenin hücre nükleusuna girer ve Lef/Tcf transkripsiyon faktörleri ile bağlanır, böylece Wnt hedef genlerinin transkripsiyonuna yol açar.

Transkripsiyonel aktivasyon β -catenin'in histon asetil transferaz CBP ile etkileşmesiyle yönlendirilir, 'kromatin-remodeling' SWI/SNF kompleksi ve Bcl-9 (Pyg) bağlanır. β -catenin'in yokluğunda Tcf transkripsiyonu co-represör CtBP ile etkileşerek baskılamaktadır. Bununla birlikte β -catenin ile ICAT'ın etkileşimi Wnt sinyal iletimini negatif olarak düzenlemektedir.⁶⁹

5.6 İnsan solid Tümörlerinde β -catenin mutasyonları:

β -catenin, Wnt sinyal yolağında, hücre-hücre adezyonunda ve sinyal iletiminde rol alan çok fonksiyonlu bir proteindir. Hücre aderens bağlantılarında, hücre içi cadherin ve α -catenin'in de rol aldığı hücre iskelet sisteminde bu proteinlerin sitoplazmik domeynleri ile bağlı halde bulunmaktadır.^{7,113}

β -catenin'in sitoplazma veya nükleusta anormal birikimi ile çeşitli tipteki kanserler ilişkilendirilmiştir.⁴⁴ Wnt/wg sinyal yokluğunda sitoplazmik β -catenin APC ile bağlı haldeyken GSK3 β tarafından fosforile edilir ve Ubikitin-proteozom yolağı ile yıkılır. APC veya β -catenin genindeki değişikliklerde degradasyon sisteminin çalışmamasından dolayı, hücrede β -catenin birikimi olmaktadır. Biriken β -catenin nükleusa geçerek Tcf/Lef ile etkileşime girmekte ve hedef genlerin transkripsiyonunu artırmaktadır.⁴⁵

β -catenin proteininin N-terminali Serin ve Treonin aminoasitlerinin fosforilasyonu bakımından kritiktir. Bu aminoasitler 33, 37, 41ve 45 inci kodonlara (Ekson 3) denk gelmektedir. Bununla birlikte bazı kanserlerde 183, 245 ve 287 inci kodonlardaki (ekson 4, 5, 6) mutasyonların kanser gelişiminde önemli rol oynadığı gösterilmiştir.^{44,45,107}

2003 yılına kadar yapılan β -catenin çalışmaları ve bulunan mutasyonlar Tablo 1 de özetlenmiştir.

Tablo 1: 2000 Mart ayına kadar β -catenin mutasyonu açısından çalışılan kanser tipleri ve mutasyon frekansları⁴⁴

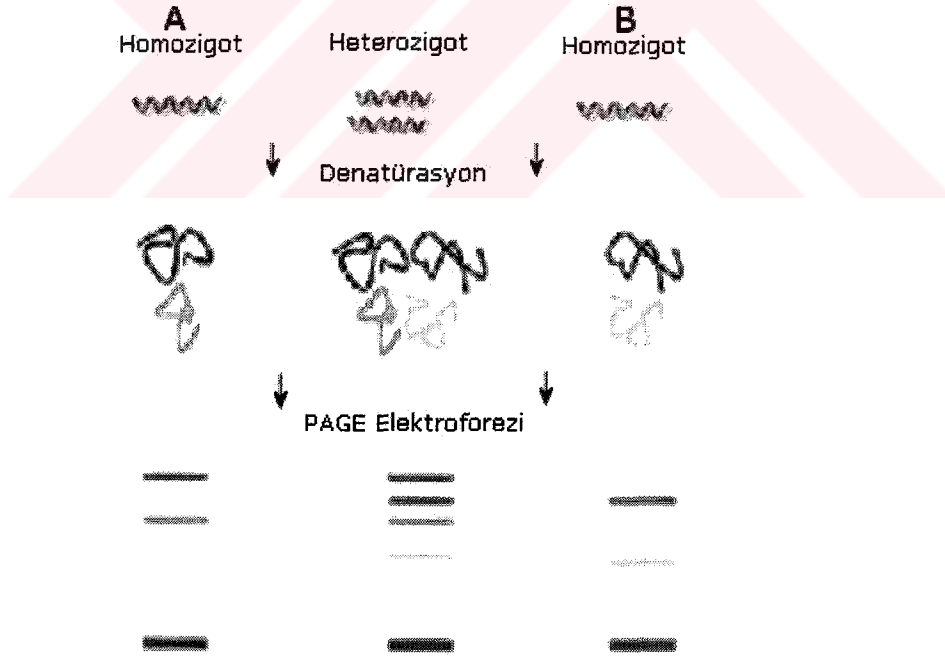
Doku	Frek.	S29	Y30	L31	D32	S33	G34	I35	H36	S37	G38	A39	T40	T41	T42	A43	P44	S45	L46	S47	G48	K49	Kaynak
Kolorektal	9/202						1							3				5					Samowitz
Kolorektal	2/92												1					1					Kitaeva
Kolorektal APC mutasyonsuz	7/58																						Lwao
Kolorektal APC mutasyonsuz	13/27					2	1							3				5					Sparks
kolorektal HNPCC	12/28				2		2			1			2					5					Miyaki
kolorektal MSI (+)	13/53																	6					Mirabelli-primdahl
kolorektal MSI (-)	0/27																						Mirabelli-primdahl
desmoid, sporadik	1/1													1									Shitoh
desmoid, sporadik	22/42												10					12					Tejpar
endometrial MSI (+)	3/9				2	1																	Mirabelli-Primdahl
endometrial MSI (-)	10/20				3	1	2			3				1									Mirabelli-Primdahl
Gastirik, Intestinal-tip	7/26	2			5																		Park
Gastirik, difüz-tip	0/17																						Park
hepatoselüler HCV (+)	9/22				3	1				3				1				2					Huang
hepatoselüler	12/35				1	1	2	1	1				1	2				2		1			Van Nhieu
hepatoselüler	6/26				2		1			1								1					De La Coste
hepatoselüler	14/75				5	1	1							1				4					Miyoshi
hepatoselüler	21/119				3	3	1	1		2			4					8					Legoix
hepatoblastom, sporadik	8/9						2			1								1					Jeng

Doku	Frek.	S29	Y30	L31	D32	S33	G34	I35	H36	S37	G38	A39	T40	T41	T42	A43	P44	S45	L46	S47	G48	K49	Kaynak
hepatoblastom, sporadik	27/52				2		3			1				5									Koch
hepatoblastom	12/18				2		1						1					1					Wei
Böbrek, Wilms' tümör	6/40													1				2					Koesters Maiti, 2000
medullöblastom, sporadik	3/67					2				1													Zurawel
melanom	1/65																	1					
ovarian, endometrium	7/13				3	1				2				1									Garnallo
ovarian, endometrium	3/11									2				1									Palacios
ovarian, endometrium	10/63									6													Wright
pankreatik tümörler	0/111																						Ramaswamy
pilomatrikom	12/16				2	4	3			2				1									Chan
prostat kanseri	5/104				1	2								1				1					Voeller
tiroid, anaplastik	19/31								1	3	1		8	2	1	1	4	2	1	2		9	Garcia-Rostan
uterin endometrium	10/76					1				2				4				3					Fukuchi

5.7 SSCP (Tek iplik konformasyon polimorfizmi) Analizi

SSCP mutasyon tarama için en çok kullanılan yöntemlerden biridir. Mutasyon araştırılan PCR fragmanlarının boyu 175-250 bp arasında olmalıdır. Teknikte önemli olan, PCR reaksiyonunun başarılı yapılmış olması, istenmeyen (non-spesifik) bantların olmamasıdır. Bu yüzden teknik uygulanmadan önce PCR ürünlerinin temizliği ve doğruluğu agaroz jelde kontrol edilmelidir.¹¹⁴

SSCP yöntemi, nükleik asitlerin non-denatüran jelde boyutuna ve şekline göre farklı hareket kabiliyetlerini esas alır. Baz dizilimi farklı çift veya tek iplikli DNA moleküllerinin kendi üzerine katlanmaları ve molekül içi etkileşimleri farklıdır. Eğer bir DNA molekülünde üzerinde bir baz değişimi olursa bu DNA'nın kendi üzerine katlanmaları ve molekül içi etkileşimi değişir. Bu konformasyonel değişim de bu molekülün non-denatüran jelde farklı elektroforetik hareket göstermesine neden olur. Bu yolla, tümör örneğine ait DNA ile normal dokudan alınan DNA'yı veya incelenen gen polimorfik değilse, tümör DNA'sını wildtype DNA ile karşılaştırarak mutasyon olup olmadığını saptayabiliriz.¹¹⁵ (Şekil 7.)



Şekil 7:SSCP Jel prensibi.¹¹⁵

SSCP görüntüleme yöntemi olarak birçok yöntem uygulanmaktadır. Bunlar Gümüş boyama, Radyoaktif [³³P]-dATP kullanımı ve SYBR® GREEN II dir. Gümüş boyama, çalışma şartlarının ayarlanması ve kullanılan kimyasallar ve aynı zamanda boyama prosedürünün uzunluğu açısından kullanışı zor bir yöntemdir. PCR sırasında Radyoaktif [³³P]-dATP kullanımı ise radyoaktif laboratuvarı olmayan merkezler için sakıncalı olabilir. SYBR® GREEN II ise hem kullanımı kolay hem de duyarlılığının yüksekliği göz önüne alındığında kullanışlı bir yöntem olmaktadır.¹¹⁶

SYBR® GREEN II 100pg tek iplikli DNA moleküllerini poliakrilamid veya agaroz jelde gösterebilen bir boyadır. 300nm dalga boyunda translimünasyon veya 254 nm epi-illüminasyonda uyarılarak daha sonra kamera ile görüntülenebilir.



6 GEREÇ ve YÖNTEMLER

6.1 Hasta Seçim Yöntemi:

Meme karsinomu dokuları Bozyaka Sosyal Sigorta hastanesi Genel Cerrahi Bölümün'de 2002-2003 yılları arasında opere edilen ve yine Bozyaka Sosyal Sigorta hastanesi Patoloji servisinde invaziv duktal karsinom tanısı konmuş hastalardan sağlandı. Alınan dokular -80°C de çalışma yapılincaya kadar saklandı. Çalışmaya toplam 14 hasta dahil edildi.

6.2 Tümör Örneklerinden DNA izolasyonu:

Dokular Ameliyathanede alındıktan sonra transport ortamı içinde laboratuara ulaştırıldı. Bu dokular DNA izolasyonu yapılana dek -80°C de bekletildi. DNA izolasyonu Macherey-Nagel Marka "NucleoSpin® Tissue" DNA izolasyon kiti ile yapıldı. DNA izolasyonu aşamasının başlangıcında dokular buz içinde çözüldü.





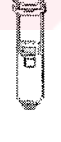

1. Yaklaşık 25 mg doku parçası mikrosantrifuj tüp içine alındı. Bu aşamadan sonra doku parçası 50-75 μl PBS (fosfat tamponlu tuz çözeltisi) içinde homojenize edildi.
2. Homejenize edilen dokular 180 μl T1 (Lizis tamponu) ve 25 μl Proteinaz K içinde 56°C de gece boyu bekletildi.
3. Ertesi gün örnekler vorteks ile iyice karıştırıldıktan sonra, 200 μl B3 tamponu eklendi ve 70°C de 10 dakika bekletildi.
4. Mikrosantrifuj tüp içine 210 μl (%96-100) etanol eklendi ve vorteks ile nazikçe karıştırıldı.
5. Bu aşamadan sonra örneklerin her biri farklı "NucleoSpin® Tissue" kolonlara ekendi ve örnekler Mikrosantrifuj ile 11,000xg de 1 dakika santrifüj edildi. Böylelikle DNA kolon içindeki silika membrana tutturulmuş oldu.
6. Kolon üzerine 500 μl BW tamponu eklenerek kolonlar 11,000xg de 1 dakika santrifüj edilerek birinci yıkama işlemi gerçekleştirildi.
7. Kolon üzerine 600 μl B5 tamponu eklenerek kolonlar 11,000xg de 1 dakika santrifüj edilerek ikinci yıkama işlemi gerçekleştirildi.

8. Kolonlar 11,000xg de 1 dakika santrifüj edilerek kolon üzerindeki silika membran kurutuldu.
9. Kolon üzerine 100µl 70C° de ısıtılmış BE tamponu eklenerek, 11,000xg de 1 dakika santrifüj edilerek DNA yeni tüpe elue edildi.

6.2.1 DNA Elektroforezi:

Doku örneklerinden elde edilen DNA miktarları spektrofotometrik okumayla hesaplandı. Çıkan miktarlara göre tüm DNA örneklerinin konsantrasyonu 100ng/µl olacak şekilde dH₂O ile ayarlandı. İzole edilen DNA örnekleri %1'lik 0.5µg/ml etidyum bromidli agaroz jelde 10 V/cm olacak şekilde 1 saat 0.5xTBE tamponunda yürütüldü. Bunun için 0.3g agaroz, 0.5xTBE ile bir beherde 30ml'ye tamamlandı. Beher mikrodalga fırında 1 dakika bekletildi. Agaroz jel sıcaklığı 45 C° ye geldikten sonra jele 0.5µg/ml etidyum bromid eklendi. Jel zaman geçirmeden dökülerek tarak yerleştirildi. Polimerizasyon için 20-30 dakika beklendi. Jel polimerize olduktan sonra tarak çıkarıldı ve oluşan kuyucuklara örnekler 5µl örnek ve 2µl yükleme tamponu şeklinde yapıldı. İzole DNA ların kaliteleri jelde değerlendirildi.

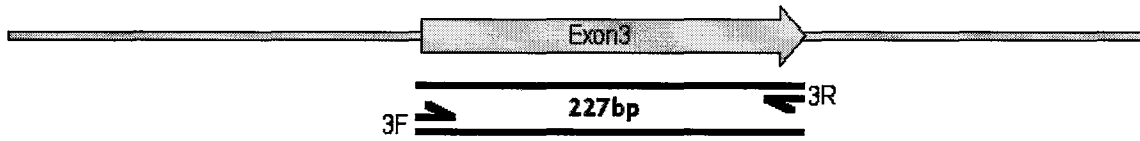
Tablo 2: DNA izolasyon basamakları

1.	Örnek hazırlığı		25mg doku küçük parçalara ayrılır
2.	Hücre patlatma öncesi hazırlık		180µl T1
			25µl Proteinaz K
			56 C° de 1-3 saat
3.	Hücreleri patlatma		200µl B3
			70 C° de 10 dakika
4.	DNA bağlanma kondisyonunu artırma		210 µl etanol
5.	DNA bağlama		Tamamı kolona yüklenir
			11.000g'de 1dakika
6.	Silika membranı yıkama		1. Yıkama 500µl BW
			2. Yıkama 600µl B5
			1. ve 2. Yıkama 11.000g'de 1 Dakika
7.	Silika membranı kurutma		11.000g'de 1 Dakika
8.	DNA elüsyonu		100µl BE (70C°)
			Oda sıcaklığında 1 Dakika
			11.000g'de 1 Dakika

6.3 β -Catenin Ekson 3 Polimeraz zincir reaksiyonu:

β -catenin genomik DNA dizisi gen bankasından bulunduktan sonra (Genbank ACCESSION no: X89579, X89580, X89581, X89582, X89583 ve NT_022517) bu dizi Fast PCR® programında işlenerek β -catenin Ekson 3 için sens ve antisens primerleri dizayn edildi.

Sens (F) 5'-GCTGATTTGATGGAGTTGGA-3'
Antisens (R) 5'-GCTACTTGTTCCTTGAGTGAA-3'



Şekil 8: Ekson 3 PCR primerleri

Bu primerler kullanılarak Ekson 3 polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltıldı. PCR' da kullanılan maddeler ve son konsantrasyonları Tablo 4 deki gibidir. PCR işlemi sonrasında bant büyüklükleri horizontal jel elektroforezi ile değerlendirildi. Agaroz jel elektroforezi 0.5xTBE Tamponu içinde, %3'lük NuSieve® GTG®(FMC), 0.5µg/ml etidyum bromidli jelde 10Volt/cm olacak şekilde 35 dakika yürütüldü. PCR ürünlerinin büyüklüğünün 227bp olduğu, 50bp 'step ladder'® (Sigma) ve Marker VIII® (Roche) moleküler ağırlık markeri kullanılarak doğrulandı.

Tablo 3: PCR' da kullanılan maddeler ve son konsantrasyonları

Kullanılan maddeler	25 µl	Son konsantrasyon
dH2O	16.5 µl	Tamamlayacak kadar
10XTampon	2.5 µl	1 x
dNTP karışımı	0.5 µl	200 µM
MgCl2	2 µl	2 mM
Primer 5' sens	0.5 µl	50 pmol
Primer 3' antisens	0.5 µl	50 pmol
Kalıp DNA	2 µl	50-100 ng
Taq polimeraz	0.5 µl	2.5 Ünite

Tablo 4: Ekson3 Polimeraz zincir reaksiyonu için sıcaklık profili:

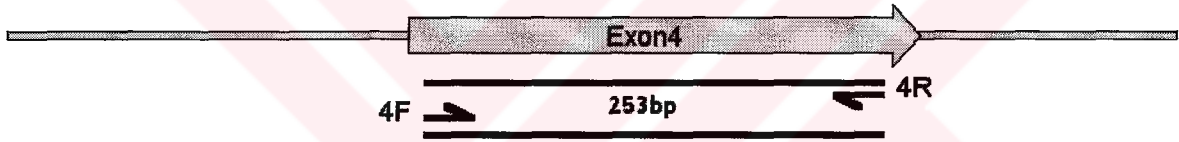
5 dakika 94 C°	İlk denatürasyon
45 saniye 94 C°	
30 saniye 56 C°	33 döngü
45 saniye 72 C°	
5 dakika 72 C°	Son uzama

6.4 β -Catenin Ekson 4 Polimeraz zincir reaksiyonu:

β -catenin genomik DNA dizisi gen bankasından bulunduktan sonra (Genbank ACCESSION no: X89579, X89580, X89581, X89582, X89583 ve NT_022517) bu dizi Fast PCR® programında işlenilerek β -catenin Ekson 4 için sens ve antisens primerleri dizayn edildi.

Sens (F) 5'- GACAGTATGCAATGACTCGAGC -3'

Antisens (R) 5'- TTGCTTACCTGGTCCTCGTC -3'



Şekil 9: Ekson 4 PCR primerleri

Bu primerler kullanılarak ekson 4 polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltıldı. PCR' da kullanılan maddeler ve son konsantrasyonları tablo 4 deki gibidir. PCR işlemi sonrasında bant büyüklükleri horizontal jel elektroforezi ile değerlendirildi. Agaroz jel elektroforezi 0.5xTBE Tamponu içinde, %3'lük NuSieve® GTG®(FMC), 0.5µg/ml etidyum bromidli jelde 10Volt/cm olacak şekilde 35 dakika yürütüldü. PCR ürünlerinin büyüklüğünün 253bp olduğu, '50bp step ladder'® (Sigma) ve Marker VIII® (Roche) moleküler ağırlık markeri kullanılarak doğrulandı.

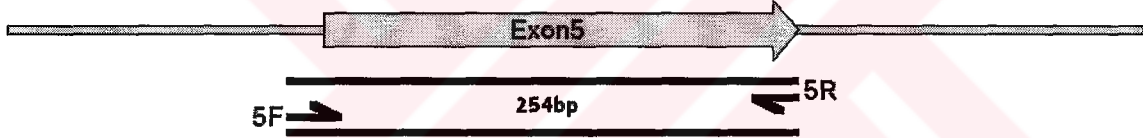
Tablo 5: Ekson4 Polimeraz zincir reaksiyonu için sıcaklık profili:

5 dakika 94 C°	İlk denatürasyon
30 saniye 94 C°	
30 saniye 55 C°	33 döngü
20 saniye 72 C°	
5 dakika 72 C°	Son uzama

6.5 β -Catenin Ekson 5 Polimeraz zincir reaksiyonu.

β -catenin genomik DNA dizisi gen bankasından bulunduktan sonra (Genbank ACCESSION no: X89579, X89580, X89581, X89582, X89583 ve NT_022517) bu dizi Fast PCR® programında işlenilerek β -catenin Ekson 5 için sens ve antisens primerleri dizayn edildi.

Sens (F) 5'- GAATTCCTGTATTACAGGTGGTGG -3'
Antisens (R) 5'- AAGCATTTTCACCAGGGCAG -3'



Şekil 10: Ekson 5 PCR primerleri

Bu primerler ile Ekson 5 polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltıldı. PCR' da kullanılan maddeler ve son konsantrasyonları Tablo 4 deki gibidir. PCR işlemi sonrasında bant büyüklükleri horizontal jel elektroforezi ile değerlendirildi. Agaroz jel elektroforezi 0.5xTBE Tamponu içinde, %3'lük NuSieve® GTG®(FMC), 0.5µg/ml etidyum bromidli jelde 10Volt/cm olacak şekilde 35 dakika yürütüldü. PCR ürünlerinin büyüklüğünün 254bp olduğu, 50bp 'step ladder'® (Sigma) ve Marker VIII® (Roche) moleküler ağırlık markeri kullanılarak doğrulandı.

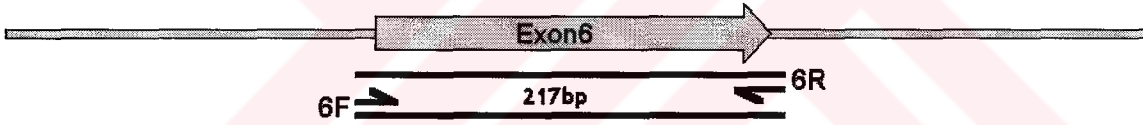
Tablo 6: Ekson5 Polimeraz zincir reaksiyonu için sıcaklık profili:

5 dakika 94 C°	İlk denatürasyon
20 saniye 94 C°	
30 saniye 56 C°	33 döngü
30 saniye 72 C°	
5 dakika 72 C°	Son uzama

6.6 β -Catenin Ekson 6 Polimeraz zincir reaksiyonu:

β -catenin genomik DNA dizisi gen bankasından bulunduktan sonra (Genbank ACCESSION no: X89579, X89580, X89581, X89582, X89583 ve NT_022517) bu dizi Fast PCR® programında işlenilerek β -catenin Ekson 6 için sens ve antisens primerleri dizayn edildi.

Sens (F) 5'- TCTTCCCAGTTCACCAGTGG -3'
Antisens (R) 5'- TCTTACCTTGCTTTCTTGGTTGC -3'



Şekil 11: Ekson 6 PCR primerleri

Bu primerler kullanılarak ekson 6 polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltıldı. PCR' da kullanılan maddeler ve son konsantrasyonları Tablo 4 deki gibidir. PCR işlemi sonrasında bant büyüklükleri horizontal jel elektroforezi ile değerlendirildi. Agaroz jel elektroforezi 0.5xTBE Tamponu içinde, %3'lük NuSieve® GTG®(FMC), 0.5µg/ml etidyum bromidli jelde 10Volt/cm olacak şekilde 35 dakika yürütüldü. PCR ürünlerinin büyüklüğünün 217bp olduğu, 50bp 'step ladder'® (Sigma) ve Marker VIII® (Roche) moleküler ağırlık markeri kullanılarak doğrulandı.

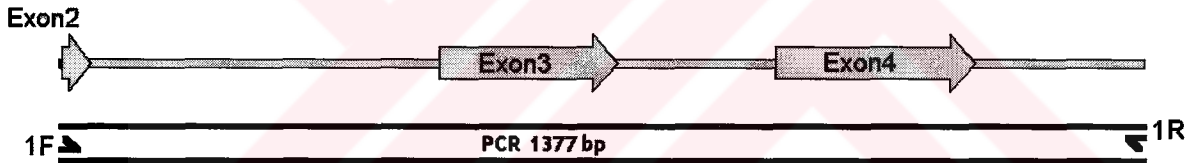
Tablo 7: Ekson6 Polimeraz zincir reaksiyonu için sıcaklık profili:

5 dakika 94 C°	İlk denatürasyon
20 saniye 94 C°	
20saniye 55 C°	33 döngü
30 saniye 72 C°	
5 dakika 72 C°	Son uzama

6.7 β -Catenin Ekson 2, Ekson 3, Ekson 4 Polimeraz zincir reaksiyonu:

β -catenin genomik DNA dizisi gen bankasından bulunduktan sonra (Genbank Accession no: X89579, X89580, X89581, X89582, X89583 ve NT_022517) bu dizi Fast PCR® programında işlemlenerek β -catenin Ekson 2-4 bölgesini kapsayacak sens ve antisens primerleri dizayn edildi.

Sens (F) 5'- CTGTTTTGAAAATCCAGCGTGG -3'
Antisens (R) 5'- CATCTGAGGAGAACGCATGA -3'



Şekil 12: Ekson 2, Ekson 3 Ekson 4 PCR primerleri.

Bu primerler kullanılarak Polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltıldı. PCR' da kullanılan maddeler ve son konsantrasyonları Tablo 4 deki gibidir. PCR işlemi sonrasında bant büyüklükleri horizontal jel elektroforezi ile değerlendirildi. Agaroz jel elektroforezi 0.5xTBE Tamponu içinde, %3'lük NuSieve® GTG® (FMC), 0.5 μ g/ml etidyum bromidli jelde 10Volt/cm olacak şekilde 35 dakika yürütüldü. PCR ürünlerinin büyüklüğünün 1377bp olduğu, 'GeneRuler'TM 1kb DNA Ladder (MBI Fermantas) moleküler ağırlık markeri kullanılarak doğrulandı.

Tablo 8: β -Catenin Ekson 2, Ekson 3, Ekson 4 Polimeraz zincir reaksiyonu için sıcaklık profili:

5 dakika 94 C°	İlk denatürasyon
45 saniye 94 C°	
30 saniye 56 C°	33 döngü
1 dakika 72 C°	
5 dakika 72 C°	Son uzama

6.8 β -Catenin Ekson 3, Ekson 4, Ekson 5, Ekson 6 SSCP

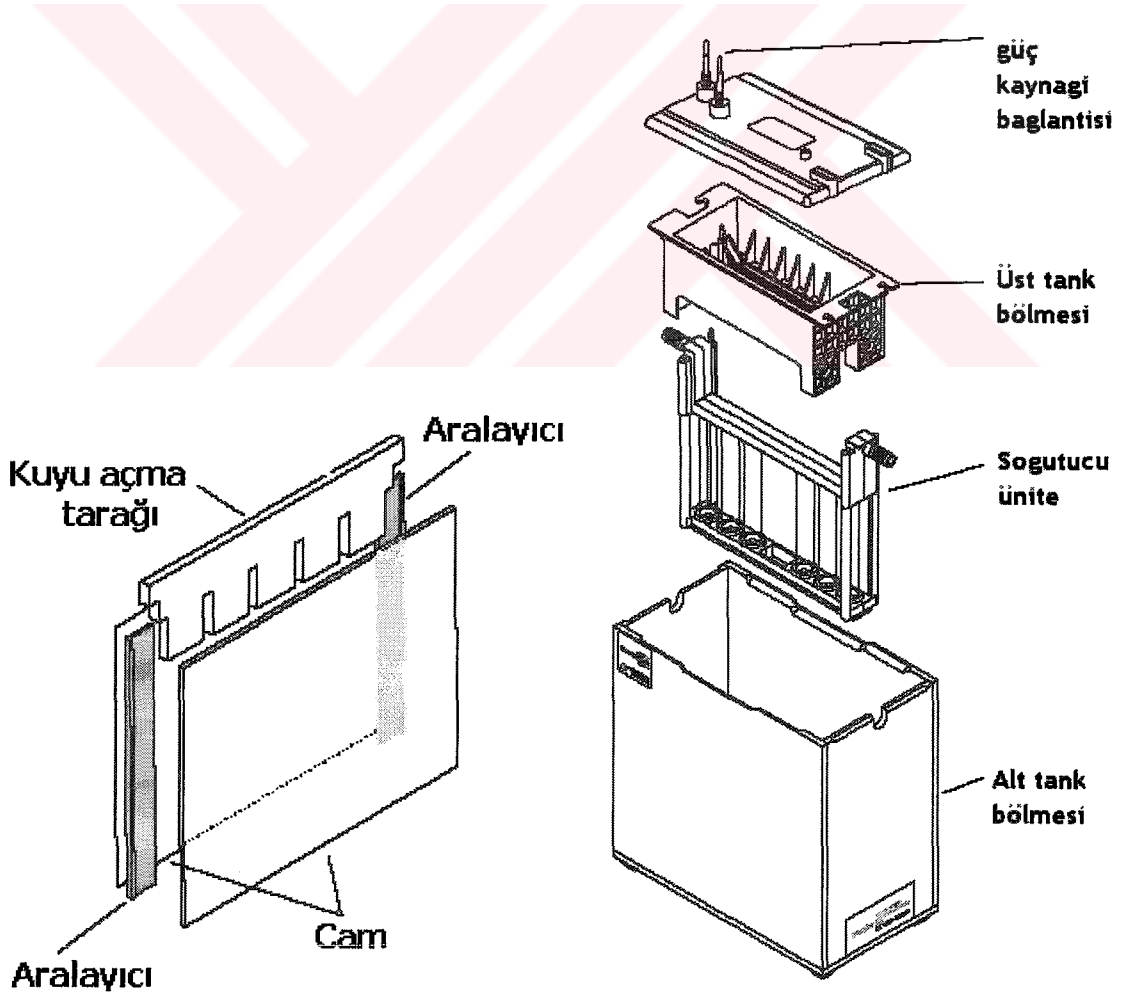
Analizi:

PCR ürünlerinin büyüklüğü agaroz jelde kontrol edildikten sonra 150-200ng çoğaltılmış DNA (Toplam PCR ürününün %10'u) başka bir PCR tüpüne aktarıldı. Aktarılan miktara göre eşit hacimdeki SSCP jel yükleme tamponu ile karıştırıldı. Örnekler 98 C° de 5 dakika denatüre edildikten sonra, yükleme öncesi 2 dakika buz üzerinde bekletildi.

SSCP jel elektroforezi "Hoefler SE 600 vertikal slab jel elektroforez ünitesi" kullanılarak yapıldı. 18x16 cm' lik cam levha pudrasız eldiven giyilerek dH₂O ile iyice yıkandıktan sonra kurumaya bırakıldı. Kuruyan cam levhalar absolü etanol ile silindi ve kağıt havlu ile kurulandı. Çıkarırken jelin cama yapışmasını önlemek için isopropanol ile yıkandı ve kağıt havlu ile silindi. Aynı şekilde iki levha arasına yerleştirilecek 0.75mm kalınlıkta "spacer" (aralayıcı) ve dişli tarak da isopropanol ile yıkandı ve kağıt havlu ile silindi. Daha sonra camlar arasına 0.75mm aralayıcı yerleştirilerek levhalar birbiri üzerine kapatılarak sıkıştırıldı. Örnekler %6-8 'lik nondenatüran poliakrilamid jelde gliserollü veya gliserolsüz olarak 15 C° de sirkülasyonlu su banyosu kullanılarak yürütüldü. Poliakrilamid jel, 37.5:1 oranındaki %40'lık stok poliakrilamid jelden 3ml, 10xTBE tamponundan 1.5ml, ve gliserolden 3ml bir beher içine alınarak 30ml ye dH₂O ile tamamlanarak hazırlandı. Karıştırılan solüsyonlar 50ml lik enjektöre çekildikten sonra, 0.45 μ m por çaplı filtreden damla damla süzüldü. Daha sonra solüsyon üzerine 30 μ l TEMED ve taze hazırlanmış %10'luk 300 μ l Amonyum persülfat eklendi. Jel zaman kaybetmeden 50ml lik enjektöre çekildi ve camlar arasına döküldü. Jel donmadan önce levhaların uç kısmına tarak yerleştirildi. Jelin polimerizasyonu için en az 2 saat beklendi. Jel

polimerize olduktan sonra 15 kuyulu tarak dikkatli bir biçimde jelden ayrıldı. Kuyular bir insülin enjektör yardımı ile polimerize olmayan akrilamid parçalarını uzaklaştırmak için 0.5xTBE tamponu ile yıkandı. Cam levhalar elektroforez tankına yerleştirildi. Tankın alt bölümü 4 L 0.5x TBE tamponu ile üst bölümü 700ml 0.5 TBE tamponu ile dolduruldu. Sirkülasyonlu su banyosu 15C° a ayarlandı ve elektroforez ekipmanı ile bağlantısı yapıldı böylece elektroforez işlemi 15 C° de gerçekleştirilmiş oldu. Güç kaynağı 4 Watt'a ayarlandıktan sonra örnekler denatüre edilip yüklendi. Örnekler 4Watt güçte 4 saat yürütüldü.

Yürüme işlemi tamamlandıktan sonra jel dikkatlice cam levhalardan ayrıldı, 100ml 0.5xTBE tamponu içinde 1:10 000 dilisyonunda SYBR® Gren II eklenerek 30 dakika karanlıkta bekletildi. Bekleme sonrasında jel translüminatör üzerine yerleştirildi ve 300nm ultraviyole altında uyarıldı. Çıkan bantlar eagle eye II® Stratagene görüntüleme sisteminde fotoğraflandı.



Şekil 13: Hoefer SE 600 vertikal slab jel elektroforez ünitesi parçaları

6.9 β -Catenin Ekson 3 ve Ekson 5 DNA Dizi analizi:

β -catenin genomik DNA dizisi Ekson 3 için sens ve antisens, Ekson 5 için sens ve antisens, primerleri ile çoğaltıldıktan sonra DNA dizi analizi işlemi için "MacroGen's Genome Center" firmasına (Güney Kore, Seul) gönderildi. DNA dizi analizi "ABI PRISM 3700 DNA analyzer" kullanılarak yaptırıldı. Firmadan gelen "chromatogram" dosyaları Chromas2.23 bilgisayar programı ile açılarak çıktıları alındı. Her bir örnek için DNA dizileri tek tek gözle değerlendirilerek mutasyon olup olmadığı tarandı.

6.10 β -Catenin İmmünohistokimyasal yöntem:

Çalışmaya dahil edilen 14 olgunun β -catenin, progesteron, estrogen ve c-erb için immünohistokimyasal boyamaları ve değerlendirmeleri Bozyaka Sosyal Sigorta hastanesi Patoloji servisinde çalışmamıza bağlı diğer bir araştırma kapsamında yapıldı. İmmünohistokimyasal çalışma için Histopatolojik tanı amacıyla hazırlanmış olan preparatlar gözden geçirildi. Uygun prepatalara ait parafin bloklar belirlendi. Uygun preparat kriterleri:

- materyalin çok büyük olmaması,
- tümör çevresinde normal asiner yapıların bulunması,
- nekroza gitmemiş tümör alanları içermesi,
- özellikle primer tümörü içeren preparat olmasıdır (LAP veya metastaz olmamalı).

Arşivden uygun olduğu anlaşılan preparatların parafin blokları eşleştirildi. Her bloktan her bir marker için birer tane olmak üzere ve negatif ve pozitif kontroller için de 2 tane olmak üzere toplam 6 adet lizinli lama dokular alındı.

Lizinli lama alınan doku önce deparafinize edildi. Bu işlem etüvde 60-61°C'de yapıldı. Geri kalan parafin xylol ile uzaklaştırıldı. Xylol uygulandıktan sonra preparatların üzerindeki xylol alkol ile yıkanarak uzaklaştırıldı. Formalin ile fiske edilen dokularda antijen maskelenmesini önlemek için preparatlar sitratlı solüsyonda 10dk. kaynatıldı. Bu kaynatma esnasında dokunun lamdan düşmesini lizinli lam önlemektedir. Bu aşamadan sonra Primer antikolar belirli dilisyonunda preparat üzerine damlatıldı. β -catenin için Santa Cruze marka (Katalog Numarası:sc-7963) fare monoklonal antikor kullanıldı. Primer antikor da preparatlar belli süre inkübe edildi ve PBS (fosfatlı tamponlu solüsyon ile) yıkama yapıldı. Daha sonra preparatlar üzerine

biyotinlen bağlı sekonder antikor damlatıldı. Belli bir inkübasyon süresi sonunda preparatlar PBS ile yıkandı. Bu aşamadan sonra preparatlar üzerine streptavidin biotin enzim kompleksi damlatıldı ve ardından son olarak kromojen damlatılıp preparatlar ışık mikroskobunda incelemeye alındı.

İmmünohistokimya boyamalar “UltraVision Large Volume Detection System Anti-Polyvalent, HRP” kiti kullanılarak yapılmıştır.

Bu kitteki reagent'lar işaretli bir streptavidin-biyotin immunoenzimatik antijen tarama sistemini oluşturmaktadır. Bu teknik, örneğin, hedef antijene spesifik unkonjuge primer bir antikor ile sıralı enkübasyonunu, primer antikorla reaksiyona giren biyotinlenmiş sekonder antikor, enzim işaretli streptavidin, ve substrat kromojeni kapsar.

BOYAMA PROTOKOLU

- Parafinden arındırılmış rehidrate doku kesitleri, Non-spesifik “background” boyanmayı azaltmak amacıyla endojen peroksidaz sindirimi yapılır, Lam hidrojen peroksit içinde 10-15 dakika bekletilir.
- Tamponla 2 kez yıkanır.
- Gerekirse, doku digestive enzim içinde edilir (veya uygun pretreatment yapılır).
- Non-spesifik “background” boyamayı önlemek için oda sıcaklığında 5 dakika bekletilir.
- Lamlar bu bekleme sırasında çalkalayıcı ile çalkalanır.
- Primer antikor uygulanır ve firmanın protokolüne uygun olarak bekletilir.
- Tamponla 4 kez yıkanır.
- Sekonder antikor olarak Biyotinlenmiş keçi Anti-Polyvalent antikor uygulaması yapılır ve oda ısısında 10 dakika bekletilir.
- Tamponla 4 kez yıkanır.
- Streptavidine Peroksidase uygulanır ve oda ısısında 10 dakika bekletilir.
- Tamponla 4 kez yıkanır.

- Firmanın önerilerine uygun seçilen peroxidase-uyumlu kromojen ile bekletilir.
- Negatif boyama yapılır ve lamelle örtülür.

6.11 Kullanılan Gereçler, Solüsyonlar ve Kimyasal Maddeler

6.11.1 Kullanılan Gereçler:

- Major Science Dry Bath inkübatör
- Velp Zx3 Vorteks
- Sorval® MC12V masa üstü santrifüj
- Arçelik mikrodalga fırın
- Grant LT D66 sirkülasyonlu su banyosu.
- ATTA Cross Power 500 Güç kaynağı
- Hoeffler HE33 Mini submarine agaroz jel sistemi
- Hoeffler PS500XT Güç kaynağı
- Hoeffler HE600 Vertikal elektroforez ekipmanı.
- IKA Labortechnik Manyetik karıştırıcı
- MJ Research PTC-100 Thermal denetleyici
- Stratagene Eagle Eye® II jel fotoğraflama sistemi.
- Presica 2200 SCS terazi
- Presica 205A SCS hassas terazi
- Jenway 3320 pH metre
- Aura SD4 vertikal Laminer-air flow
- Philco -20 C° derin dondurucu
- Sanyo -80 C° derin dondurucu
- Arçelik +4 Buzdolabı
- Astell Scientific pastör fırını
- Nanopure saf su cihazı
- Easypure ultra saf su cihazı
- Gelenkamp Etüv

- Gilson Pipetman p10 (0,2µl-10µl)
- Finnpiquette (0.5µl-10µl)
- Finnpiquette (40µl-200µl)
- Finnpiquette (200µl-1000µl)

6.11.2 Kullanılan solüsyonlar:

- 10XTBE
108gr Tris baz (0.04 M)
55gr Borik asit
40 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0)
1 litreye distile su ile tamamlanır.
- 5M EDTA
186,1gr disodyum EDTA (2 sulu) 1 litreye distile su ile tamamlandı. pH'ı 10 M NaOH ile 8.0'a ayarlandı. Not: EDTA pH 8.0'da çözülür.
- 3M Sodyum Asetat
408,1 g Sodyum asetat 1 lt distile suda çözüldü, pH glasiyel asetik asit ile ayarlandı.
- Denatüran jel yükleme tamponu
-% 95 Formamid
-20mM EDTA
-% 0.05 Brom fenol mavisi
-% 0.05 Ksilen Siyanol
- Agaroz jel için denatüran olmayan yükleme tamponu (6X)
-% 0.25 Brom fenol mavisi
-% 40 (W/V) sükroz
- 10 X Taq Polimeraz için çalışma tamponu
-10 mM Tris HCl
-%0.1 Triton X 100
-50 mM KCl
-1.5 mM MgCl₂

-0.2 mg/ml BSA (Sığır Serum Albümini)

Tampon pH'i 9.0

- Primerler

Primerler 0.2µmol konsantrasyonda ve HPLC (High pressure liquid chromatography) ile saflaştırmış olarak sentezletirildi. Liyofilize halde gelen primerler 100 pmol/µl konsantrasyonda olacak şekilde dH₂O ile çözüldü.

- Etidyum Bromid (10 mg/ml konsantrasyonda)

100mg etidyum bromid çeker ocak içerisinde tartılarak 10 ml dH₂O içerisinde çözüldü.

- Amonyum persulfat (%10)

1 gr. Amonyum persulfat 1 ml' ye tridistile dH₂O ile tamamlanır.

6.11.3 Kullanılan kimyasal maddeler

- Agaroz (Sigma Kat.No: A 9539)
- NuSieve GTG agaroz (FMC Kat.No:50084)
- Agaroz LE (Promega Kat.No:123325)
- Akrilamid (Sigma Kat. No: A-9099)
- Amonyum persülfat (Sigma Kat.No: A 9164)
- Borik Asit (Sigma Kat.No: B 0394)
- Brom fenol mavisi (Merck Kat.No:61159)
- EDTA pH8.0 0.5M (Applichem Kat.No: 3145)
- Etanol (Carlo ERBA Kat.No: 414608)
- Etidyum Bromid (Sigma Kat.No: E 7637)
- İsoprapanol (Applichem Kat.No:A3928-00)
- N,N'-Metilen -bis-Akrilamid (Sigma Kat. No: M-2022)
- Taq polimeraz(Recombinant)(MBI Kat. No:EPO402)
- Taq polimeraz(Roche Kat No:1146173)
- High Fidelity PCR Enzyme Mix (MBI Fermantas Kat No: EPO510)
- Pfu DNA Polymeraz (Recombinant) (MBI Fermantas Kat No:EPO509)
- DNA Moleküler ağırlık belirleyicisi VIII (Roche Kat No:1336045)

- GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (MBI Fermentas Kat No:SM0318)
- GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus (MBI Fermentas Kat No:SM0321)
- 50bp Step Ladder (Sigma Kat No:S7025)
- 2mM dNTP (MBI Fermentas Kat No:R2049)
- TEMED (Sigma Kat. No: T 7024)
- Trisma-Base (Sigma Kat. No: T 8524)
- Xylene Cyanole FF (Sigma Kat.No: X 4126)
- “Nucleospin Tissue” DNA izolasyon kiti (Macherey-Nagel Kat.No:740.952.50)
- Gliserol (Carlo Erba Kat.No:516852)
- SYBR® GREEN II (Amresco Kat No:K143)
- β -catenin fare monoklonal antikor (Santa Cruze Kata No:sc-7963)
- Universal immünohistokimya kiti “UltraVision Large Volume Detection System Anti-Polyvalent”, HRP (Lab vision)
- pH indikatör pH(0-14) (Merck Kat.No:109535)
- 0.45 μ m Enjektör Filtre (Schleicher&Schwell Kat.No:462200)
- 100-1000 μ l Filtreli pipet ucu (Corning Kat.No:4809)
- 0.5-20 μ l Filtreli pipet ucu (Greiner Bio-one Kat.No:771288)
- 10-200 μ l Filtreli pipet ucu (Greiner Bio-one Kat.No:739288)
- 0.5-20 μ l Filtreli jel yükleme pipet ucu (Greiner Bio-one Kat.No:775288)
- 0.2ml PCR tüpü (Greiner Bio-one Kat.No:683201)
- 0.5ml PCR tüpü (Greiner Bio-one Kat.No:682201)
- 2ml cryo tüp (Greiner Bio-one Kat.No:122278)
- 1.5ml Tüp (Greiner Bio-one Kat.No:616201)

7 BULGULAR

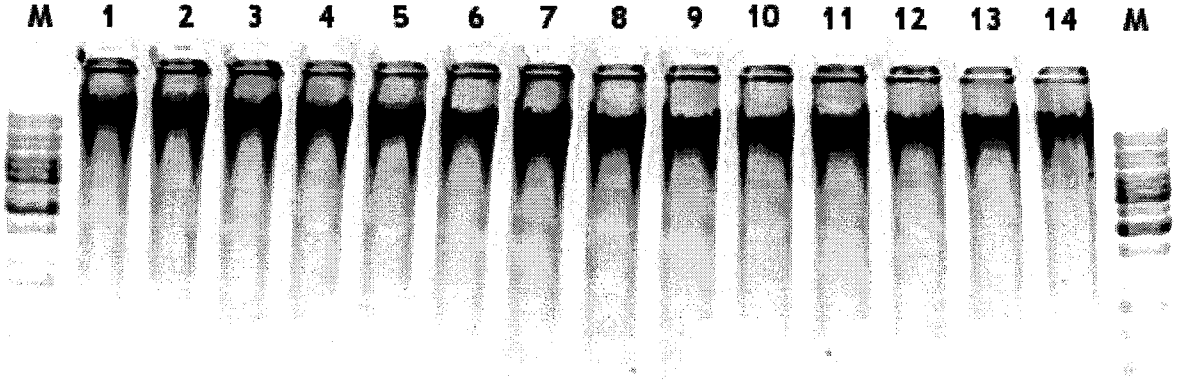
7.1 Klinik ve patolojik veriler:

Çalışmaya dahil edilen hastaların klinik ve patolojik verileri Tablo.9 da verilmektedir. Grubu oluşturan hastaların %7.14'ü (1/14) 40 yaş altı, %7.14'ü (1/14) 41-50 yaş arası, %21.42'si (3/14) 51-60 yaş arası, %50'si (7/14) 61-70 yaş arası, %14.28'i (2/14) 71-80 yaş arasında bulunmaktadır. Aile öyküsüne bakıldığında grubun %21.42'sinin (3/14) aile öyküsü vardır. İki hastanın aile öyküsü bulgusuna ulaşılammıştır. Patolojik açıdan bakıldığında grubun %21.4sinin (3/14) miks tip IDC+IDL histopatolojik tanısı aldığı görülmektedir. Lenf nodu metastazı açısından hastaların % 78.57'si (11/14) pozitif olarak saptanmıştır. Yine grubu oluşturan hastaların %7.14'ü (1/14) derece 1, %21.42'si (3/14) derece2, %57,14'ü (8/14) derece 3 ve %14.28'si (2/14) de derecelendirilemeyen ve derecesi bilinmeyen hastalardan oluşmaktadır. Östrojen reseptörü (Er) pozitif hasta sayısı %64.28 (9/14), negatif hasta sayısı %21.42 (3/14) tür. Progesteron reseptörü (Pr) pozitif hasta sayısı %35.71 (5/14), negatif hasta sayısı %50 (7/14)tür. Epidermal büyüme faktörü reseptörü (c-erb) immünhistokimyası pozitif olan hastalar %50 (7/14), negatif olan hastalar %21.42 (3/14) tür. gruptaki hastalardan birinde kemik iliği ve akciğer metastazı, bir tanesinde sol aksiler metastaz ve bir tanesinde de akciğer ve kemik metastazı bulunmaktadır.

Tablo 9: Çalışmaya dahil edilen hastaların klinik ve patolojik bulguları.

No	yaş	AÖ	Patoloji	LNM	Gr	Evre	ER	Pr	c-erb	Met	sağ
1	64	+	IDC	+	III	T2N2M0	+	+	-	-	+
2	44	-	IDC+IDL	+	I	T2N1M0				-	+
3	37	-	IDC	+	III	T2N2M0	-	++	+++	Kemik Akc	
4	65	-	IDC	+	III	T3N1M0	+	-	+++		
5	70	-	IDC	-		T2N0M0	+	-		-	+
6	67	+	IDC	+	II	T3N2M0	++	-	-	Sol axilla	+
7	61	-	IDC	+	III	T2N2M0	+++	-	+++		
8	71	-	IDC	+	III	T2N2M0	+++	++	+++	Akc Kemik	
9	53		IDC	+	III	T2N2M0					
10	54	+	IDC+ILC	+	II	T2N1M0	-	-	-	-	+
11	66	-	IDC	-		T2N2M0	+	++		-	
12	79		IDC+ILC	-	II	T4NxM0	+++	-	+	-	+
13	57	-	IDC	+	III	T2N2M0	-	+	+	Lokal nüks	+
14	63	-	ILC	+	III	T1N2M0	+	-	+	-	+

7.2 DNA İzolasyonu:

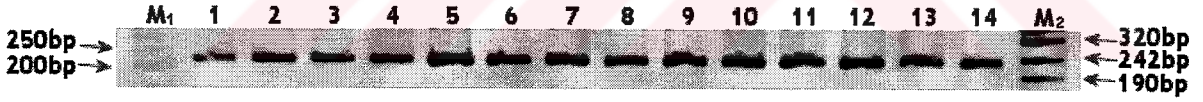


Şekil 14: %1'lik agaroz jelde DNA örnekleri

1-14 hasta DNA'ları, M; DNA ağırlık Belirleyicisi 1kb Ladder® (MBI Fermantas)

7.3 PCR Amplifikasyonları:

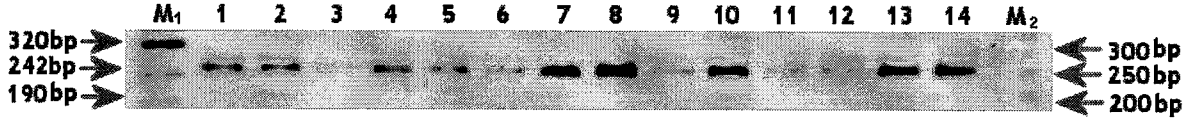
7.3.1 Ekson 3 PCR Amplifikasyonları:



Şekil 15: %3'lük NuSieve® GTG® (FMC) Agaroz jelde Ekson 3 PCR sonuçları (227bp).

Sırası ile M₁; 50bp step ladder® (Sigma), 1-14 Hasta PCR'ları, M₂; VIII® (Roche) moleküler ağırlık belirleyicisi.

7.3.2 Ekson 4 PCR Amplifikasyonları:



Şekil 16: %3'lük NuSieve® GTG® (FMC) Agaroz jelde Ekson 4 PCR sonuçları (253bp).

Sırası ile M₁; Marker VIII® (Roche), 1-14 Hasta PCR'ları, M₂; 50bp step ladder® (Sigma) moleküler ağırlık belirleyicisi.

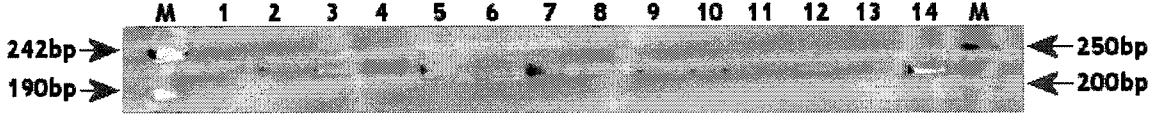
7.3.3 Ekson 5 PCR Amplifikasyonları:



Şekil 17: %3'lük NuSieve® GTG® (FMC) Agaroz jelde Ekson 5 PCR sonuçları (254bp).

Sırası ile M₁; Marker VIII® (Roche), 1-14 Hasta PCR'ları, M₂; 50bp step ladder® (Sigma) moleküler ağırlık belirleyicisi.

7.3.4 Ekson 6 PCR Amplifikasyonları:



Şekil 18: %3'lük NuSieve® GTG® (FMC) Agaroz jelde Ekson 6 PCR sonuçları (217bp).

Sırası ile M₁; Marker VIII® (Roche), 1-14 Hasta PCR'ları, M₂; 50bp step ladder® (Sigma) moleküler ağırlık belirleyicisi.

7.3.5 Ekson 2, Ekson 3, Ekson 4 PCR Amplifikasyonları:

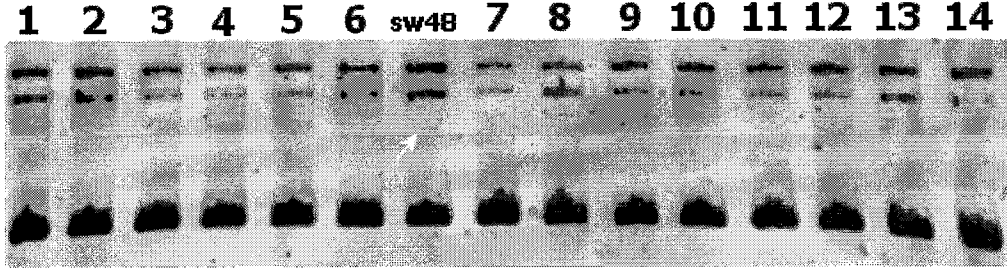


Şekil 19: %2'lik NuSieve® GTG® (FMC) Agaroz jelde Ekson 2, Ekson 3, Ekson 4 PCR sonuçları (1377bp).

Sırası ile M₁; Marker GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus (MBI Fermantas), 1-14 Hasta PCR'ları, 15 HepG2 (heterozigot 115 aminoasit delesyon) hücre hattı pozitif kontrol, M₂; Marker VIII® (Roche) moleküler ağırlık belirleyicisi.

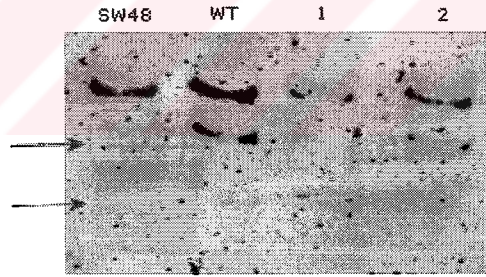
7.4 SSCP sonuçları:

7.4.1 β -Catenin , Ekson 3 SSCP:



Şekil 20: %6'lık non-denatüran %10 gliserollü poliakrilamid jelde, Ekson 3 SSCP sonuçları.

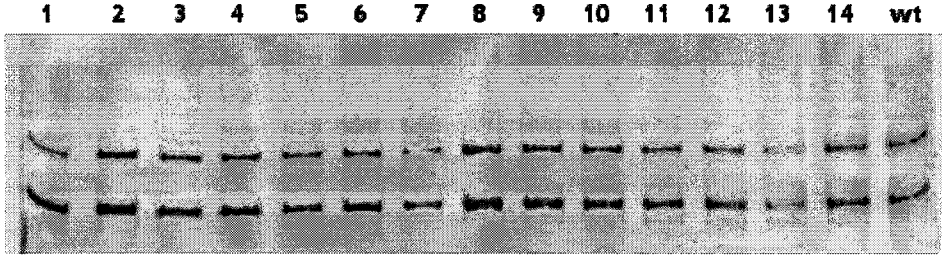
Sırası ile; 1-6 Hasta; sw48 pozitif kontrol hücre hattı, 7-14 hasta örnekleri.



Şekil 21: %4,5'lik non-denatüran poliakrilamid jelde , Ekson 3 SSCP sonuçları.

Sırası ile; sw48 pozitif kontrol hücre hattı, wt wild type hücre hattı, örnek 1, ve örnek 2.

7.4.2 β -Catenin Ekson 4 SSCP:



Şekil 22: %10'luk non-denatüran %10 gliserollü poliakrilamid jelde Ekson 4 SSCP sonuçları.

Sırası ile; 1-14 hasta wt; wildtype hücre hattı.

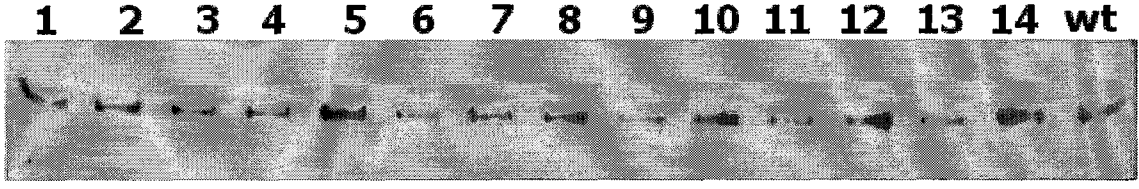
7.4.3 β -Catenin Ekson 5 SSCP:



Şekil 23: %8'lik non-denatüran %5 gliserollü poliakrilamid jelde Ekson 5 SSCP sonuçları.

Sırası ile; 1-14 hasta wt; wildtype hücre hattı.

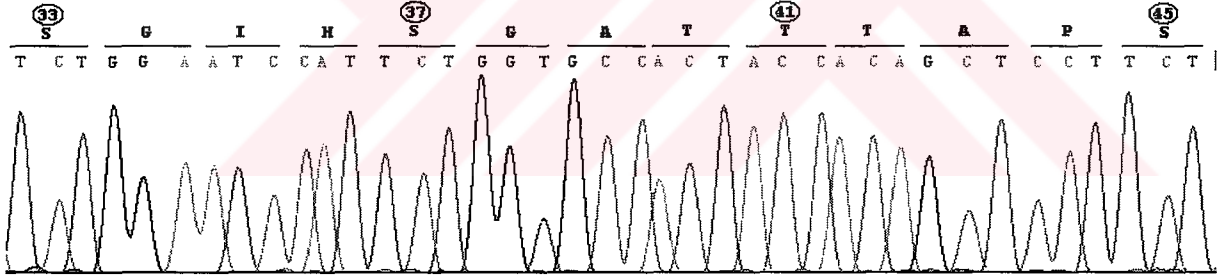
7.4.4 β -Catenin Ekson 6 SSCP:



Şekil 24: %8'lik non-denatüran gliserolsüz poliakrilamid jelde Ekson 6 SSCP sonuçları.

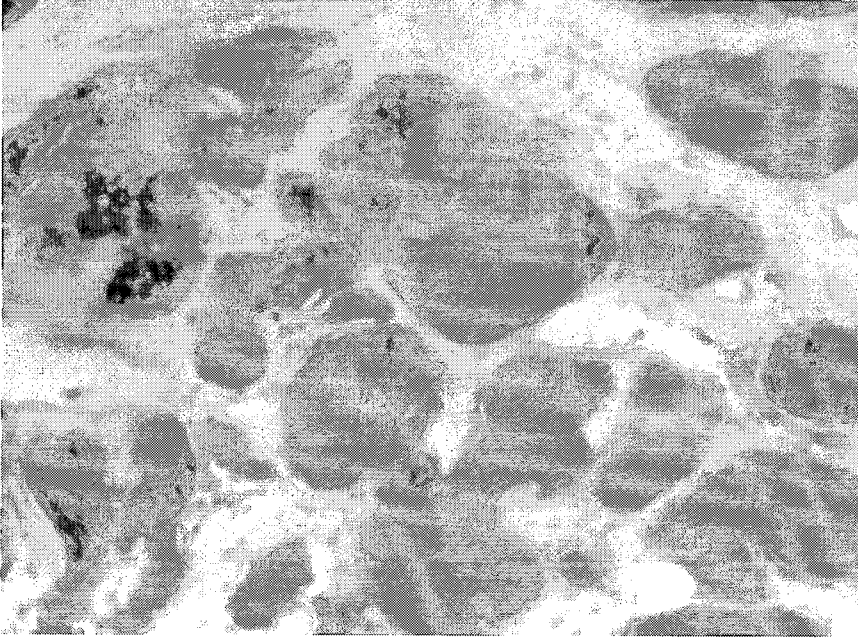
Sırası ile; 1-14 hasta wt; wildtype hücre hattı.

7.5 DNA Dizi analizi sonuçları



Şekil 25: 1 numaralı örneğe ait DNA dizi analizi kromatogram görüntüsü.

7.6 İmmünohistokimyasal Boyama:



Şekil 26: İnvaziv duktal karsinoma da β -catenin İmmünohistokimyasal Boyama görünümü.

8 SONUÇ VE ÖNERİLER

Tablo 10: 14 İnvaziv duktal karsinom olgusuna ait β -catenin immünohistokimya ve N-ucu mutasyon sonuçları.

No	Yaş	AÖ	Patoloji	Gr	Evre	ER	PR	c-erb	β -cat Imm	β -cat mut
1	64	+	IDC	III	T2N2M0	+	+	-	+++	-
2	44	-	IDC+ILC	I	T2N1M0	*	*	*	+++	-
3	37	-	IDC	III	T2N2M0	-	++	+++	+	-
4	65	-	IDC	III	T3N1M0	+	-	+++	-	-
5	70	-	IDC	*	T2N0M0	+	-	*	++	-
6	67	+	IDC	II	T3N2M0	++	-	-	+	-
7	61	-	IDC	III	T2N2M0	+++	-	+++	++	-
8	71	-	IDC	III	T2N2M0	+++	++	+++	+	-
9	53	*	IDC	III	T2N2M0	*	*	*	+	-
10	54	+	IDC+ILC	II	T2N1M0	-	-	-	+++	-
11	66	-	IDC	*	T2N2M0	+	++	*	++	-
12	79	*	IDC+ILC	II	T4NxM0	+++	-	+	+++	-
13	57	-	IDC	III	T2N2M0	-	+	+	+++	-
14	63	-	IDC	III	T1N2M0	+	-	+	+	-

Kısaltmalar: AÖ: Aile öyküsü, IDC: İnvaziv duktal karsinom, ILC:İnvaziv lobüler karsinom, ER: Östrojen reseptörü, PR: Progesteron reseptörü, β -cat imm: β -catenin immünohistokimya boyaması, β -cat mut: β -catenin mutasyonu, *:ulaşılamayan veri.

Sonuç olarak, başta İnvaziv duktal karsinomlar olmak üzere sporadik meme kanserlerinde β -catenin N-ucu mutasyonlarının kanserleşme sürecinde bir önem taşımadığı düşünülmektedir. Literatürde sporadik kanserlerle yapılan çalışmalarda β -catenin N-ucu mutasyonlarının frekansı çok düşüktür. Bizim çalışmamızda bunu destekler niteliktedir. Çalışma bize İnvaziv duktal karsinom progresyonunun farklı

kanser yolağı üzerinden olduğu düşünülmektedir. Meme ve İnvaziv duktal karsinomu β -catenin mutasyonu araştırılması açısından ilk çalışmalardan biri olan bu çalışmanın devamında, hasta sayısı arttırılarak, Wnt yolağında rol alan diğer genler ile meme karsinomu arasındaki ilişkinin bakılmasının yararlı olacağı dşnncesindeyiz



9 TARTIŞMA

Onkogenik mutasyonlar, hücrelerin sinyal iletim yollarında görev alan proteinlerin değişimine neden olarak etki gösterirler. Bu etki, sinyal iletimi basamaklarında doğal olmayan sinyallerin ortaya çıkmasına ve/veya sinyal iletiminin aktarılmamasına neden olabilir. Bu değişimler hücre tarafından tolere edilmediği durumlarda spontan hücresel yanıt gözlenir. Büyüme faktörlerinin farklı komponentlerini kodlayan genlerin mutasyonları hücre bölünmesinin kontrolünün kaybına ve sonuç olarak bu hücrenin kanserleşme sürecine yol açabilir. Önemli işlevleri nedeniyle hücresel onkogenler evrimsel olarak korunmuşlardır, yapı ve işlevleri uzak akraba çok hücreli canlılarda benzer yada aynıdır.

Wnt sinyal yolağının, *Drosophila melanogaster*, *Xenopus laevis*, *Caenorabditis elegans* ve Fare'de evrimsel olarak korunduğu gösterilmiştir. Bu yolda görev alan proteinler, gelişimsel süreçte, vücut şekil ve eksen oluşumunda görev alırlar. Doku ve organ gelişimini belirleyen böyle önemli bir yolağın yapıtaşlarını oluşturan proteinlerinin herhangi birinin işlevini yerini getirememesi sonucunda hücre bölünmesinin kontrolünün kaybına ve sonuç olarak bu hücrenin kanserleşme sürecine yol açabilir. Bu konudaki en iyi çalışmalardan biri, Wnt-1 in fare tümör virüs kaynaşma bölgesinin 'integration site' proto-onkogen olarak tanımlanmasıdır.⁷⁶ Bu entegrasyon ile Wnt-1'in yanlış ekspresyonu sonucunda meme tümörü veya nöral tüp hiperplazisi olduğu tanımlanmıştır.

Wnt geninin proto-onkogenik etkisi 1982 yılında Nusse ve Verma tarafından tanımlanmıştır.²⁶ Bu çalışmadan sonra *Drosophila melanogaster*' da 'Wingless' yolağı tanımlanmış ve bu yoldaki gen defektleri ile çeşitli kanserlerin ilişkisi araştırılmıştır.⁴⁴ İnsan kanserlerinde Wnt yolağındaki genlerde proteinin fazla üretimi veya az üretimi çalışmaları yapılmış fakat bu çalışmalar mRNA ekspresyon düzeyinin bu kanser tipleri ile korelasyonundan öteye gitmemiştir. Wnt ligand veya reseptörlerini kodlayan genlerde mutasyon, yeniden düzenlenme veya amplifikasyonlar herhangi bir kanser tipi ile tam olarak ilişkilendirilememiştir.⁴⁴

Yakın zamanda, kolorektal kanserlerle ilişkisi tanımlanmış bir tümör baskılayıcı gen olan APC geninin, Wnt sinyal yolağında negatif düzenleyici olduğu bulunmuştur. APC bu yolda esansiyel olarak görev alan β -catenin'in degradasyonuna neden olmaktadır. Bu verilerin ortaya çıkması ile, mutant APC bulunan kolon kanserinde β -

catenin düzeyi yüksekliği ve bu yolağın yapısal olarak aktivasyonunun nedeni tanımlanmış oldu. APC gen mutasyonu bulunmayan kanserlere bakıldığında, kanser oluşumunda β -catenin'in N-terminal bölgesinde bulunan ve fosforilasyonu ile β -catenin'in degradasyonundan sorumlu olan aminoasitleri kodlayan bölgelerdeki mutasyonların artmış olduğu saptanmıştır. Özellikle replikasyon hatası yüksek bulunan (Replication Error-positive) kolon kanserlerinde mikrosatelit instabilite ile birlikte değerlendirildiğinde β -catenin geni mutasyon frekansı yüksektir. İlginç olarak endometrial kanserlere bakıldığında, mikrosatelit instabilitesi ve β -catenin mutasyonu arasındaki böyle bir korelasyon yoktur.⁸⁴

Agresif fibromatozis, diğer bir adı ile desmoid tümörler, lokal olarak invaziv bir büyüme gösterirler ve bu tip kanserler FAP fenotipi ile direkt ilişkilidirler. FAP bireyleri APC mutasyonu taşımaktadır ve erken yaşta intestinal adenom görülme olasılığı çok sıktır. Desmoid tümörler kolorektal kanserlerde APC geninin her iki allelinin kaybı ile sporadik olarak görülmektedir. Bu iki genotipte β -catenin'in N-terminal bölgesinde mutasyonlar saptanmıştır. Shitoh ve Tejpar kırk iki desmoid tümürlü hasta ile yaptığı çalışmada, 21 örnekte β -catenin geni mutasyonu saptamıştır. Bu çalışmada dokuz örnekte APC geni mutasyonu saptanmış fakat bu mutasyonlar β -catenin gen mutasyonu içeren örneklerle örtüşmemiştir.

FAP bireylerinde kolon bölgesinde artmış kanser insidansına rağmen, bir çok kanser tipi için APC geninin her iki allelinin inaktive olma olasılığı çok zayıftır. Bu birçok doku tipinde β -catenin stabilizasyonunun kanser başlatıcı neden olduğunu gösterebilir fakat; APC geninin her iki allelinin mutasyon sonucu inaktive olmayacağı anlamına gelmemektedir.⁴⁴ Wnt yolağındaki APC'den farklı diğer genler onkogenik mutasyonlara daha açıktır ve aktivasyonunun kaybı için APC genindeki gibi her iki allelinin inaktive olması gerekmemektedir.³³ Literatüre bakıldığında çeşitli tümörlerle Wnt yolağındaki onkogenik mutasyonlara açık olan bu genler arasındaki ilişki tanımlanmaya çalışılmıştır.

GSK3 β Wnt yolağında negatif düzenleyici olarak rol almaktadır ve potansiyel bir tümör baskılayıcı genidir. GSK3 β 'nin mutant olduğu herhangi bir kanser tipi tanımlanamamıştır. Bu GSK3 β 'nin hücrenin yaşamsal aktiviteleri için gerekli olduğu anlamına gelmektedir.⁴⁴

Wnt yolağında pozitif düzenleyici olarak görev alan diğer bir protein Dsh proteindir. Wnt yolağının akış yönünde görev alan bu proteinin iki ana görevi vardır

bunlardan biri β -catenin'in stabilizasyonu diğeri ise jun kinaz aktivasyonudur. Neoplastik transformasyonda Dsh'in fazla ekspresyonu veya konstitisyonel aktivasyonu beklenebilir fakat şimdiye kadar bu proteinin ilişkili olduğu herhangi bir kanser türü tanımlanamamıştır.⁴⁴

Wnt yolağında en çok çalışılan bileşenlerden biri kuşkusuz β -catenin dir. β -catenin bu yolağın temel proteinlerinden biridir ve bu yolağın işleyiş mekanizması üzerinde kilit görevi görmektedir. β -catenin, Wnt yolağındaki kilit rolünün yanında, membrana bağlı E-cadherin ve epidermal büyüme faktörüne bağlanarak hücre adezyonu ve hücre-hücre bağlantılarında önemli rol almaktadır.⁵⁷ Literatürde, Wnt yolağında esansiyel görev alan bu gen ürünü ile kanser ilişkisi arasında bir çok çalışma yapılmıştır.

FAP bireylerinde Hepatoblastom insidansı artmıştır. Bu tümörlerde, APC'nin her iki allelinin kaybı ile görülen sporadik form nadir olarak görülmektedir.⁷⁶ Hepatoblastom olgularında β -catenin mutasyonu çalışılan üç farklı çalışmada β -catenin gen mutasyonu frekansı yüksek bulunmasına rağmen APC geninde herhangi bir mutasyon saptanamamıştır.^{78,79,80}

Beckwith-Wiedemann sendromu hepatoblastoma ile direkt alakalıdır. Beckwith-Wiedemann sendromundaki genetik bozuklukların nedeni Wnt sinyal yolağındaki mutasyonlar olarak gösterilmiştir. Nitekim bu tür vakalarda β -catenin gen mutasyonları yüksek frekansta saptanmıştır. Bu yüksek medullablastom riski görülen ve germ hattında APC mutasyonları bulunan Turcot sendromunda aynıdır. Bunun yanında sporadik medullablastom vakalarında, APC ve β -catenin geninde çok nadir mutasyon saptanmıştır.⁴⁴

Hepatosellüler karsinomlar Wnt sinyal yolağında yerleşik birçok mutasyon ile karakterize bir kanser türüdür. Hepatit C virüsü ile ilişkili Hepatosellüler kanserlerde β -catenin gen mutasyonu ~%20 olarak bulunmuştur. İnvaziv ve intrasellüler bölgede tümörün histolojik olarak görüldüğü daha kötü prognozlu hepatosellüler kanserlerde immünohistokimyasal olarak β -catenin'in nükleer boyaması gösterilmiş ve bu vakalarda β -catenin gen mutasyonu daha yüksek frekansta saptanmıştır.⁸¹ Başka bir hepatosellüler kanser çalışmasında ise genomdaki heterozigosite kaybı ile β -catenin gen mutasyonu arasında ters bir korelasyon saptanmıştır. Bu çalışma kromozomal instabilite ve β -catenin mutasyonunun hepatosellüler kanser gelişiminde alternatif yollar olduğunu göstermektedir.⁴⁴

Hepatosellüler karsinom da dikkat çekici başka bir nokta c-myc ve Cyclin D1 genlerinde görülen amplifikasyonlar dır. Bu genler Wnt sinyal iletim yolağının β -catenin'den sonraki akış yönünde bulunmaktadır. Literatüre bakıldığında, bu gen ürünleri amplifikasyonu görülen hepatoselüler kanserlerde β -catenin mutasyonlarının yüksek sıklıkta olduğu görülmektedir.⁸¹

Farede SV 40 T antijeni transgenik ekspresyonu ile yapılan Hepatosellüler kanser modelinde, β -catenin mutasyonu bulunamamıştır. SV40 T-antijeni Retinoblastoma proteinine bağlanmakta ve bu proteini bloke ederek Cyclin D1 aktivasyonu sağlamaktadır. Böyle bir kanser gelişiminde zaten β -catenin gen mutasyonu beklenmemektedir. Bu çalışmaya karşılık, fare karaciğerinde transgenik c-myc ekspresyonunda β -catenin geninde mutasyonlar saptanmıştır. Bu veriler ışığında c-myc başlangıçlı Hepatosellüler karsinom progresyonunun farklı kanser yolağı üzerinden olduğu bildirilmiştir.¹¹⁷

Hepatosellüler karsinom da birbirinden farklı β -catenin mutasyonları tanımlanmıştır. Bu kanser başlangıcının multifokal olduğu anlamına gelmektedir. Huang ve arkadaşlarının aynı hastanın farklı tümör alanları ile yaptığı çalışmada farklı tümör alanlarından alınan örneklerde farklı bölgelerde β -catenin gen mutasyonları saptanmıştır.⁴⁴

Wilm's tümör geni mutasyonu bulunan pediatrik böbrek kanserli hastalar ile yapılan başka bir çalışmada β -catenin geninde %15 oranında mutasyon saptanmıştır. Bu çalışma β -catenin gen mutasyonunun diğer bir onkogenik defektten sonra ortaya çıkan bir mutasyon olabileceğini göstermektedir.^{92,93}

Melanoma ve prostat kanserleri gibi ailesel olmayan diğer kanser türlerinde β -catenin mutasyonu düşük frekansta görülmektedir.⁴⁴ Rimm ve arkadaşlarının 65 melanom örneği ile yaptığı çalışmada sadece bir örnekte β -catenin mutasyonu saptanmıştır. Bu melanom örneklerinde β -catenin'in immünohistokimyasal olarak nükleer lokalizasyonu bir ile üç pozitiflik arasında değişmektedir.¹¹⁸ Bu çalışma bize ailesel olmayan bu tip tümörlerin kanserleşme sürecinde Wnt yolağında β -catenin stabilizasyonundan farklı bir mekanizma kullandığını göstermektedir.

Çalışmamızda bu konuda daha önce çalışılmamış olması nedeni ile meme karsinom gurubu kullanılmıştır. Çalışma planlanırken meme kanseri tiplerinde en agresif seyreden İnvaziv duktal karsinom örnekleri değerlendirmeye alınmıştır.

Çalışmanın değerlendirilmesinde β -catenin proteinin fosforilasyon ile stabilizasyonundan sorumlu olan N-ucunda yerleşik 33, 37, 41, 45. kodonları ve Kazein Kinaz-2 nin fosforilasyonunda görev alan kodon 183, 245, ve adezyondon sorumlu olan 287 inci kodonunu kapsayan DNA bölgesi (Ekson 3, Ekson 4, Ekson 5, Ekson 6) mutasyon açısından değerlendirilmiştir.

Hasta örneklerinden DNA izolasyonu sonrasında β -catenin geni sekansı Gen bankasından kaydedilerek ekson intron yerleşimleri çıkarıldı. Bu işlemde sonra bu sekanslar Fast PCR programında açılarak uygun sıcaklıklarda PCR primerleri yaratıldı. Primerler sentez ettirildikten sonra her primer çifti için PCR amplifikasyon reaksiyonu optimizasyon işlemi yapıldı. SSCP yöntemi temeli konformasyona dayandığı için reaksiyonda konformasyonu etkileyecek her türlü parametre ekarte edildi bunun için, amplifikasyonlar sonrasında nonspesifik bantlara neden olabilecek etkenleri ortadan kaldırmak amacı ile her reaksiyon tekrarlanan denemeler sonucunda elde edilen uygun sıcaklık profili ve reaksiyon konsantrasyonunda amplifikasyonlar gerçekleştirildi.

Çalışmada ekson 3 için pozitif kontrol olarak daha önceden β -catenin mutasyonu tanımlanmış olan SW48 kolon karsinom hücre hattı DNA'sı kullanılmıştır. Bu hücre hattı elimizde olmadığı için "GSF-National Research" merkezinde Natali Pellegata'dan tedarik edilmiştir.

Çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılan diğer bir hücre hattı HepG-2 Hepatosellüler karsinom hücre hattıdır. Çalışma sırasında bu hücre hattı DNA'sı ekson 3 için primerler ile PCR ile çoğaltılarak asıl iplik için dizayn edilen primer ile DNA dizi analizi yapıldığında elde edilen DNA dizilerinde herhangi bir delesyon saptanamadı. Literatüre bakıldığında bu hücre hattının 125 aminoasitlik heterozigot delesyonunun olduğu saptandı. DNA dizisi primerler ile karşılaştırıldığına antisens iplikteki primerin bağlanma bölgesinin delesyonun içinde kaldığı ve dolayısı ile PCR sırasında bu hücre hattı DNA sının sadece bir allelinin çoğaltıldığı ve DNA dizi analizinin de tek allele ait olduğu saptandı. Bunun üzerine kendi örneklerimizde böyle bir durum ile karşılaşmamak için, büyük heterozigot delesyonları tanımlamada (ekson2-4) primerleri dizayn edildi. Şekil 19'da HepG-2 DNA'sının ekson 2-4 primerleri ile PCR ile çoğaltılmış her iki allelide görülmektedir.

Çalışmamızda 2 nolu örnekte ekson 5 primerleri ile yapılan SSCP ile farklı iki bandın jelde varlığı saptandı. (Şekil 23 örnek no.2) Literatürde SSCP tekniği için PCR

yapılırken enzim olarak hata oranı düşük enzim kullanılması gerektiği veya farklı bant paterni görünümünün hata oranı düşük olan enzim ile (High fidelity taq) tekrarlanması gerektiği belirtilmiştir. Çalışmamızda 2 nolu örnek için hata oranı düşük enzim ile tekrar reaksiyon kurulmuş ve SSCP jelinde farklı bir bant saptanmamıştır. Aynı reaksiyon DNA dizi analizi yapılmış ve herhangi bir mutasyon saptanmamıştır. Bunun sonucunda ilk SSCP deki farklı bant paterninin Taq polimerazın hata oranının yüksekliğinden dolayı reaksiyon sırasında yanlış baz eşleştirmelerinden kaynaklandığı şeklinde yorumlanmıştır.

SSCP jelinde, örnekler jele yüklenmeden önce denatüre edildiği için ayrı yürüyen, birbirinin komplementeri iki ipliğin, iki bant paterni vermesi gerekmekte veya alleller farklı ise dört bant vermesi gerekmektedir. Bizim çalışmamızda da ekson 3 ve ekson 5 amplifikasyonlarında dört adet, ekson 4 ve ekson 6 amplifikasyonlarında iki adet bant görülmektedir.

SSCP de jel görüntüleme yöntemi olarak üç farklı yöntem kullanılmaktadır. Bunlar; radyoaktif yöntem, gümüş boyama yöntemi ve Syber Green II ile boyama yöntemidir. Çalışmamızda radyoaktif malzeme ile çalışmaya uygun ortamımızın olmaması nedeni ile bu yöntem kullanılmamıştır. Gümüş boyama yöntemi görüntüleme yöntemi olarak en sık kullanılan tekniktir. Bu yöntemin dezavantajı boyama sürelerinin uzunluğu ve optimizasyonunun zaman almasıdır. Çalışmamızda görüntüleme tekniği olarak daha standart bir yöntem olması nedeniyle tek iplikli DNA örneğine bağlanma özelliği gösteren Syber Green II boyası seçilmiştir.

Meme kanserlerinin bir alt tipi olan invaziv duktal karsinomundaki β -catenin N-ucu mutasyonlarının ve β -catenin'in hücrel lokalizasyonunu belirlediği bu çalışma literatürdeki β -catenin mutasyonu çalışmalarının arasında memede invaziv tipteki çalışmalar arasında ilktir.

Çalışmada sitoplazmik olarak β -catenin immünohistokimyasal boyama ile üç pozitif boyanan ve ekson 3 mutasyonu bulunmayan örnekler bulunmaktadır. Sitoplazmadaki yoğun boyanan bu β -catenin fazlalığı, β -catenin'in degradasyonunun yapılamadığı anlamına gelmektedir.

Kanser gelişiminde c-myc, insülin benzeri büyüme faktörü, Transforming büyüme faktörü gibi hücrel onkogenlerin aktivasyonun yanı sıra, Tp53, Retinoblastoma gibi tümör baskılayıcı gen inaktivasyonları rol oynamaktadır. Çalışmamızda literatürde kanser gelişimine neden olan etmenler dalında önemli bir yer alacağını ummaktayız.

10 EKLER

10.1 EK-1

HASTA BİLGİLENDİRME VE ONAY FORMU

Bu çalışmada meme kanserine neden olan etmenlerin araştırılması amaçlanmıştır. Bunun için operasyonunuz için alınacak olan meme dokunuzdan ve yine operasyonda alınacak olan parçanın cerrahi sınırları içindeki normal dokunuzdan mercimek büyüklüğünde bir parça alınacak ve bu parçalarda beta catenin geni mutasyon açısından incelenecektir. Sizden alınan bu örnekte başka bir amaçla kullanılmayacaktır. Size bu araştırmanın sonuçları yazılı olarak iletilecektir.

Çalışmaya katılmayı ONAYLIYORUM / ONAYLAMİYORUM.

Onayı veren kişinin

Adı ve Soyadı:

Tarih:

İmza:

Onayı alan kişinin

Adı ve Soyadı:

Tarih:

İmza:

11 KAYNAKLAR

¹ Ahmedin Jemal, PhD, DVM; Taylor Murray; Alicia Samuels, MPH; Asma Ghafoor, MPH; Elizabeth Ward, PhD; Michael J. Thun, MD, MS. Cancer Statistics, 2003. CA Cancer J Clin 2003;53:5-26

² Kathryn O'Brien, MPH; Vilma Cokkinides, PhD, MSPH; Ahmedin Jemal, DVM, PhD; Cheryl J. Cardinez, MSPH; Taylor Murray; Alicia Samuels, MPH; Elizabeth Ward, PhD; Michael J. Thun, MD, MS. Cancer Statistics for Hispanics, 2003. CA Cancer J Clin 2003;53:208-226

³ ICR Section of Cell Biology and Experimental Pathology and The Breakthrough Toby Robins Breast Cancer Research Centre, ICR RMT Breast Unit RMT/ICR Academic Department of Biochemistry. Special Topics: Breast Cancer. The Royal Mardesden nhs trust—the institute of cancer research annual research report. 1998; 66-76

⁴ http://www.nationalbreastcancer.org/signs_and_symptoms/index.html. 2003

⁵ Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, et al.: A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. Science 266(5182): 66-71, 1994.

⁶ Wooster R, Neuhausen SL, Mangion J, et al.: Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. Science 265(5181): 2088-2090, 1994

⁷ Hajra KM, Fearon ER. Cadherin and catenin alterations in human cancer. Genes Chromosomes Cancer. 2002 Jul;34(3):255-68.

⁸ Mc Corming. Signaling Networks that cause cancer. Tcb vol 9 no:12 M53-M56

⁹ Olgular ışığında meme kanseri 2003, 1,2.

¹⁰ İzmir Kanser İzlem ve Denetim Merkezi (KIDEM)
<http://www.ato.org.tr/konuk/kidem/index.html>

¹¹ Mc Pherson K, Steel CM, Dixon JM. Breast cancer epidemiology, risk factors, and genetics. BMJ 2000; 321 624-628

¹² Cotran SR, Kumar V, Robbins LS. Robbins pathologic bases of disease. 6th ed. Philadelphia, Saunders, 1999

¹³ Lippman ME. Epidemiology of breast cancer. In: Dantforth D, Lichter AS, Lippman ME.(eds) Diagnosis and management of Breast cancer. Philadelphia, Saunders, 1988, p.1-9

¹⁴ Anderson DE, Badzioch MD. Survival in breast cancer patients. *Cancer* 1986; 58; 360-365

¹⁵ Howe H, Senie R, Bzsuch H, et al. Early abortion and breast cancer risk in women under age 40. *Int J Epidemiol* 1989;18:300.

¹⁶ Newcomb P, Storer B, Longnecker M, et al. Lactation and a reduced risk of premenopausal breast cancer. *N Engl J Med* 1994;330:81

¹⁷ Cancer Committee of the College of American Pathologists. Is fibrocystic disease of the breast precancerous? *Arch Pathol Lab Med* 1986;110:171

¹⁸ Sillero-Arenas M, Delgado-Rodriguez M, Rodigues-Canteras R, et al. Menopausal hormone replacement therapy and breast cancer: a meta-analysis. *Obstet Gynecol* 1992;79:286.

¹⁹ Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer: Breast cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data on 53,297 women with breast cancer and 100,239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies. *Lancet* 347(9017): 1713-1727, 1996.

²⁰ Longnecker M, Berlin J, Orza M, et al. A meta-analysis of alcohol consumption in relation to breast cancer risk. *JAMA* 1988;260:642

²¹ Bastarrachea J, Hortobagyi GN, Smith TL, et al.: Obesity as an adverse prognostic factor for patients receiving adjuvant chemotherapy for breast cancer. *Annals of Internal Medicine* 120(1): 18-25, 1994.

²² Clark G.M. Prognostic and predictive factors Disease of the breast. Lippincott-Raven Philadelphia 1996; 461-485.

²³ Fisher B., Bauer M., Wickerman L. Relation of number of positive axillary nodes to the prognosis of patients with primary breast cancer. An NSABP update. *Cancer* 52:1555-1557 1983

²⁴ Millis R.R., Hanby A.M., Girling A.C. Diagnostic surgical pathology. Vol.1 Second ed. New York, Raven Pres, 2354-2385.

²⁵ Summary List of Clarifications to AJCC Cancer Staging Manual, 6th Edition. American Joint Committee on Cancer, Chicago, 2003.

²⁶ Nusse R, Varmus H.E. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell* 31: 99-109 1982

²⁷ Nusse R, Varmus HE. Wnt genes. *Cell*. 26;69(7):1073-87 1992.

²⁸ Nusse R, The Wnt gene family in tumorigenesis and in normal development. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 43(1-3):9-12 1992.

²⁹ Cabrera C.V, Alonso M.C, Johnston P, Philips R.G, Lawrence PA Phenocopies induced with antisense RNA identify the wingless gene. *Cell* 50: 659-663 1987

³⁰ Rijsewijk F, Schuermann M, Wagenaar E, Parren P, Weigel D, Nusse R. The *Drosophila* homolog of the mouse mammary oncogene *int-1* is identical to the segment polarity gene *wingless*. *Cell* 50: 649-657 1987

³¹ <http://www.stanford.edu/~rnusse/wntwindow.html> (2003)

³² Johan H, Nick B, Hans c: you Wnt some, you lose some: oncogenes in the Wnt signaling pathway. *Curr. Opin. in genetics & Dev*. 13:28-33 2003.

³³ Peifer M., Polakis P. Wnt signalling in oncogenesis and embryogenesis –a look outside the nucleus. *Science* 287:1606-1609 2000.

³⁴ Kuhi M., Sheldahl L.C., Park M. The Wnt/Ca²⁺ pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape. *Trends Genet*. 16:279-283. 2000

³⁵ Peifer M., McEven D.G. The balet of morphogenesis: unveiling the hidden choreographers. *Cell* 109: 271-274 2000

³⁶ Akiyama T. Wnt/ β -catenin signaling. *Cytokine&Growth factor Reviews* 11: 273-282. 2000

³⁷ Keiko M., Lothar H. β -Catenin: a transforming actor on many stages. *Breast Cancer Res*, 5:63-68 2003

³⁸ Saneyoshi T., Kume S., Amasaki Y. The Wnt/calcium pathway activates NF-AT and promotes ventral cell fate in *Xenopus* embryos. *Nature* 417: 295-299 2002.

-
- ³⁹ Sokol S. A role for Wnts in morphogenesis and tissue polarity. *Nat. Cell Biol.* 2: E124-E125 2000.
- ⁴⁰ Thompson B., townsley F., rosin-Arbesfeld R. A new nuclear component of the Wnt signaling pathway. *Nat. Cell Biol.* 4: 367-373 2002.
- ⁴¹ Bart H, Ernst R. Wnt signaling: A complex issue. *Biol Res* 35: 277-286, 2002
- ⁴² Easwaran V., Song V, polakis P. The Ubiquitin-Proteasome Pathway and Serine Kinase Activity Modulate Adenomatous Polyposis Coli Protein-mediated Regulation of β -Catenin-Lymphocyte Enhancer-binding Factor Signaling *The J. of. Biological chemistry.* Vol. 274, No. 23 4, pp. 16641–16645, 1999
- ⁴³ Hermann A., Andreas B., Jörg S. β -catenin is a target for the ubiquitin–proteasome pathway. *The EMBO Journal* vol.16 no.13 pp.3797–3804, 1997
- ⁴⁴ Polakis P. Wnt signaling and cancer. *Gees&Development* 14: 1837-1851 200.
- ⁴⁵ Polakis P. The oncogenic activation of β -catenin. *Current Opinion in Genetics & Development.* 9: 15-21 1999.
- ⁴⁶ Nhieu J.T.V., Renard C.A., Wei Y. Nuclear accumulation of mutated β -catenin in hepatocellular carcinoma is associated with increased cell proliferation. *American j. of Path.* 155: no.3 703-710 1999.
- ⁴⁷ Joerg H., Juergen B. The Wnt signalling pathway. *Journal of Cell Science* 115, 3977-3978 2002
- ⁴⁸ Steve E. J., Catherine J. Secreted Frizzled-related proteins: searching for relationships and patterns. *BioEssays* 24.9 811-820 2002.
- ⁴⁹ Mao B., Wu W., Davidson G. Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/ β -catenin signaling. *Nature* 417: 664-667 2002.
- ⁵⁰ <http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer/Deep/WNTSignPath.html>
- ⁵¹ Sakanaka C., Leong P., Xu L. Casein kinase 1 ϵ in the Wnt pathway: Regulation of β -catenin function. *PNAS* 96 no:22 12548-12552 1999.
- ⁵² Amit S., Hatzubai A., Birman Y. Axin-mediated CK1 phosphorylation of β -catenin at Ser 45: a molecular switch for the Wnt pathway. *Genes & Development* 16 1066-1076 2002.

-
- ⁵³ Li L, Yuan H, Weaver CD, Axin and Frat1 interact with dvl and GSK, bridging Dvl to GSK in Wnt-mediated regulation of LEF-1. *EMBO J.* 18:4233-4240, 1999.
- ⁵⁴ Zeng W, Wharton KA, Jr., Mack JA, Naked cuticle encodes an inducible antagonist of Wnt signalling. *Nature* 403:789-795, 2000.
- ⁵⁵ Schwarz-Romond T, Asbrand C, Bakkers J, The ankyrin repeat protein Diversin recruits Casein kinase Iε to the beta-catenin degradation complex and acts in both canonical Wnt and Wnt/JNK signaling. *Genes Dev.* 16:2073-2084, 2002.
- ⁵⁶ McCrea PD, Turck CW, Gumbiner B. A homolog of the armadillo protein in *Drosophila* (plakoglobin) associated with E-cadherin. *Science* 254:1359-1361, 1991
- ⁵⁷ Gumbiner BM. Signal transduction of beta-catenin. *Curr.Opin.Cell Biol.* 7:634-640, 1995
- ⁵⁸ Kolligs FT, Kolligs B, Hajra KM, Gamma-catenin is regulated by the APC tumor suppressor and its oncogenic activity is distinct from that of beta-catenin. *Genes Dev.* 14:1319-1331, 2000
- ⁵⁹ Polakis,P. More than one way to skin a catenin. *Cell* 105:563-566, 2001
- ⁶⁰ Liu C, Li Y, Semenov M, Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell* 108:837-847, 2002
- ⁶¹ Huber AH, Weis WI. The structure of the beta-catenin/E-cadherin complex and the molecular basis of diverse ligand recognition by beta-catenin. *Cell* 105:391-402, 2001.
- ⁶² Kramps T, Peter O, Brunner E,. Wnt/wingless signaling requires BCL9/legless-mediated recruitment of pygopus to the nuclear beta-catenin-TCF complex. *Cell* 109:47-60, 2002
- ⁶³ Ryo A, Nakamura M, Wulf G, Liou YC, Lu KP. Pin1 regulates turnover and subcellular localization of beta-catenin by inhibiting its interaction with APC. *Nat.Cell Biol.* 3:793-801, 2001
- ⁶⁴ Takemaru KI, Moon RT. The transcriptional coactivator CBP interacts with beta-catenin to activate gene expression. *J.Cell Biol.* 149:249-254, 2000
- ⁶⁵ Tago K, Nakamura T, Nishita M,. Inhibition of Wnt signaling by ICAT, a novel beta-catenin-interacting protein. *Genes Dev.* 14:1741-1749, 2000

⁶⁶ Van de Wetering M, de Lau W, Clevers H. WNT signaling and lymphocyte development. *Cell*. 2002 109 Suppl:S13-9

⁶⁷ Tesshi Yamada, Asako S. Takaoka, Yasuyoshi Naishiro, Reiko Hayashi, Keiji Maruyama, Chihaya Maesawa, Atsushi Ochiai, and Setsuo Hirohashi. Transactivation of the Multidrug Resistance 1 Gene by T-Cell Factor 4/ β -Catenin Complex in Early Colorectal Carcinogenesis. *Cancer Research* 60, 4761–4766, 2000

⁶⁸ Kwonseop Kim, Ka Ming Pang, Michael Evans, and Elizabeth D. Hay. Overexpression of β -Catenin Induces Apoptosis Independent of Its Transactivation Function with LEF-1 or the Involvement of Major G1 Cell Cycle Regulators. *Molecular Biology of the Cell* Vol. 11, 3509–3523, 2000

⁶⁹ Caca K, Kolligs FT, Ji X, Hayes M, Qian J, Yahanda A, Rimm DL, Costa J, Fearon ER. Beta- and gamma-catenin mutations, but not E-cadherin inactivation, underlie T-cell factor/lymphoid enhancer factor transcriptional deregulation in gastric and pancreatic cancer. *Cell Growth Differ*. 1999 10(6):369-76

⁷⁰ Miyoshi K., Lothar H. β -catenin: a transforming actor on many stages. *Breast cancer Res*. 5:63-68 2003.

⁷¹ Katherina Eklof Spink, Sofia G. Fridman William I. Weis. Molecular mechanisms of β -catenin recognition by adenomatous polyposis coli revealed by the structure of an APC- β -catenin complex. *The EMBO Journal* Vol.20 No.22 pp.6203-6212, 2001

⁷² Wang Z., Vogelstein B., Kinzler K.W. Phosphorylation of β -catenin at S33, S37, or T41 can occur in absence of phosphorylation at T45 in colon cancer cells. *Cancer Research* 63:5234-5235 2003.

⁷³ Koesters R., Hans M. A., Benner A. Predominant mutation of codon 41 of the β -catenin proto-oncogene in rat colon tumors induced by 1,2-dimethylhydrazine using a complete carcinogenic protocol. *Carcinogenesis*, Vol. 22, No. 11, 1885-1890, 2001

⁷⁴ M. Ilyas, I. P. M. Tomlinson, A. Rowan, M. β -Catenin mutations in cell lines established from human colorectal cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997 16; 94 (19): 10330–10334

⁷⁵ Iwao K, Nakamori S, Kameyama M. Activation of the beta-catenin gene by interstitial deletions involving exon 3 in primary colorectal carcinomas without adenomatous polyposis coli mutations. *Cancer Res.* 1998 1;58(5):1021-6.

⁷⁶ Akiyama Y, Nagasaki H, Yagi KO. Beta-catenin and adenomatous polyposis coli (APC) mutations in adenomas from hereditary non-polyposis colorectal cancer patients. *Cancer Lett.* 2000 1;157(2):185-91.

⁷⁷ Kitaeva MN, Grogan L, Williams JP. Mutations in beta-catenin are uncommon in colorectal cancer occurring in occasional replication error-positive tumors. *Cancer Res.* 1997 15;57(20):4478-81.

⁷⁸ A. De La Coste, B. Romagnolo, P. Billuart. Somatic mutations of the β -catenin gene are frequent in Mouse and human hepatocellular carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 95, pp. 8847–8851, 1998

⁷⁹ J. Cui, X. Zhou, Y. Liu. Mutation and overexpression of the β -catenin gene may play an important role in primary hepatocellular carcinoma among Chinese people. *Journal Cancer Res. Clin. Oncol.* (2001) 127: 577-581

⁸⁰ Fujie H, Moriya K, Shintani Y. Frequent β -catenin aberration in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology Res* 2001; 20: 39-51.

⁸¹ H. Takayasu, H. Horie, E. Hiyama, . Frequent Deletions and Mutations of the β -Catenin Gene Are Associated with Overexpression of *Cyclin D1* and *Fibronectin* and Poorly Differentiated Histology in Childhood Hepatoblastoma. *Clinical Cancer Research* Vol. 7, 901-908, 2001.

⁸² Rong Wu, Yali Zhai, Eric R. Fearon. Diverse Mechanisms of β -Catenin Deregulation in Ovarian Endometrioid Adenocarcinomas. *Cancer Research* 61, 8247–8255, 15, 2001

⁸³ P. Machin, L. Catusus, C. Pons, CTNNB1 Mutations and β -Catenin Expression in Endometrial Carcinomas. *Human Pathol.* Vol. 33, No. 2002 206-212.

⁸⁴ L. Mirabelli-Primdahl, R. Gryfe, H. Kim, β -Catenin Mutations Are Specific for Colorectal Carcinomas with Microsatellite Instability but Occur in Endometrial Carcinomas Irrespective of Mutator Pathway *Cancer Research* 59, 3346–3351, 15, 1999

⁸⁵ Fukuchi T, Sakamoto M, Tsuda H. Beta-catenin mutation in carcinoma of the uterine endometrium. *Cancer Res.* 1998 Aug 15;58(16):3526-8.

⁸⁶ Schlosshauer PW, Pirog EC, Levine RL. Mutational analysis of the CTNNB1 and APC genes in uterine endometrioid carcinoma. *Mod Pathol.* 2000 13:1066-71

⁸⁷ R. Wu, Y. Zhai, E. R. Fearon. Diverse Mechanisms of β -Catenin Deregulation in Ovarian Endometrioid Adenocarcinomas. *Cancer Research* 61, 8247–8255, 2001

⁸⁸ Wright K., Wilson P., Morland S. β -catenin mutation and expression analysis in ovarian cancer: exon 3 mutations and nuclear translocation in 16% of endometrioid tumors. *Int. J. Cancer* 82: 625-629 1999.

⁸⁹ Gamallo C, Palacios J, Moreno G. beta-catenin expression pattern in stage I and II ovarian carcinomas : relationship with beta-catenin gene mutations, clinicopathological features, and clinical outcome. *Am J Pathol.* 1999 155(2):527-36.

⁹⁰ Park W.S., Oh R.R., Park J.Y. Frequent somatic mutations of the beta-catenin gene in intestinal-type gastric cancer. *Cancer Res.* 1999 1;59(17):4257-60.

⁹¹ Huiping C., Kristjansdottir S., Jonasson J.G. Alterations of E-cadherin and beta-catenin in gastric cancer. *BMC Cancer.* 2001;1(1):16.

⁹² Maiti S, Alam R, Amos CI, Huff V. Frequent association of beta-catenin and WT1 mutations in Wilms tumors. *Cancer Res.* 2000 Nov 15;60(22):6288-92.

⁹³ Koesters R, Ridder R, Kopp-Schneider A,. Mutational activation of the beta-catenin proto-oncogene is a common event in the development of Wilms' tumors. *Cancer Res.* 1999 Aug 15;59(16):3880-2.

⁹⁴ R. P. Dahmen, A. Koch, D. Denkhaus, J. C. Deletions of AXIN1, a Component of the WNT/wingless Pathway, in Sporadic Medulloblastomas. *Cancer Research* 61, 7039–7043, October 1, 2001

⁹⁵ N. Yokota, S. Nishizawa, S. Ohta. Role of WNT Pathway in Medulloblastoma Oncogenesis. *Int. J. Cancer:* 101, 198–201 (2002)

⁹⁶ M Ueda, RM Gemmill, J West, R Winn. Mutations of the β - and γ -catenin genes are uncommon in human lung, breast, kidney, cervical and ovarian carcinomas *British Journal of Cancer*(2001) 85(1), 64–68 2001

⁹⁷ Shiaw-Yih Lin, Weiya Xia, Jo C. Wang, β -catenin, a novel prognostic marker for breast cancer: Its roles in cyclin D1 expression and cancer progression. 4262–4266 PNAS April 11, 2000 vol. 97 no. 8

⁹⁸ Van de Wetering M., Barker N., Harkes I.C. Mutant E-cadherin breast cancer cells do not display constitutive Wnt signaling. *Cancer Res.* 2001 Jan 1;61(1):278-84.

⁹⁹ Jiangyong M., Takeshi K., Seika K. Mutation of β -catenin and its protein accumulation in solid and cystic tumor of the pancreas associated with metastasis *International Journal of Molecular Medicine* 11: 461-464, 2003

¹⁰⁰ B. Xu, K. Yoshimoto, A. Miyauchi. Cribriform-morular variant of papillary thyroid carcinoma: a pathological and molecular genetic study with evidence of frequent somatic mutations in exon 3 of the β -catenin gene *J Pathol* 2003 199: 58–67

¹⁰¹ Garcia G, Tallini G, Herrero A. Frequent mutation and nuclear localization of beta-catenin in anaplastic thyroid carcinoma. *Cancer Res.* 1999 Apr 15;59(8):1811-5.

¹⁰² Garcia-Rostan G, Camp RL, Herrero A. Beta-catenin dysregulation in thyroid neoplasms: down-regulation, aberrant nuclear expression, and CTNNB1 exon 3 mutations are markers for aggressive tumor phenotypes and poor prognosis. *Am J Pathol.* 2001 Mar;158(3):987-96.

¹⁰³ S. Ikeda, Y. Ishizaki, Y. Shimizu, Immunohistochemistry of cyclin D1 and β -catenin, and mutational analysis of exon 3 of β -catenin gene in parathyroid adenomas. *International Journal of Oncology*, 20: 463-466, 2002

¹⁰⁴ V. Bilim, T. Kawasaki, A. Katagiri. Altered Expression of β -Catenin in Renal Cell Cancer and Transitional Cell Cancer with the Absence of β -catenin Gene Mutations. *Clinical Cancer Research* Vol. 6, 460-466, 2000

¹⁰⁵ Y. Kajino, A. Yamaguchi, N. Hashimoto. β -Catenin gene mutation in human hair follicle-related tumors. *Pathology International* 2001; 51: 543–548

¹⁰⁶ Koch A., Waha A., Tonn J.C., Somatic mutations of WNT/wingless signaling pathway components in primitive neuroectodermal tumors. *Int J Cancer.* 2001 Aug 1;93(3):445-9

¹⁰⁷ OMIM (Online Mendelian Inheritance Men Database)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispmim.cgi?id=116806>

¹⁰⁸ Kraus, C.; Liehr, T.; Hulsken, J.; Behrens, J. Localization of the human beta-catenin gene (CTNNB1) to 3p21: a region implicated in tumor development. *Genomics* 23: 272-274, 1994

¹⁰⁹ Nollet, F.; Berx, G.; Molemans, F. Genomic organization of the human beta-catenin gene (CTNNB1). *Genomics* 32: 413-424, 1996.

¹¹⁰ Homo sapiens catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa Gen bank accsion no:N NM_001904

¹¹¹ Murase, S.; Mosser, E.; Schuman, E. M. Depolarization drives beta-catenin into neuronal spines promoting changes in synaptic structure and function. *Neuron* 35: 91-105, 2002

¹¹² T. Hinoi, H. Yamomato, M. Kishida. Complex formation of adenomatous polyposis coli gene product and axin facilitates glycogen synthase kinase-3 β -dependent phosphorylation of β -catenin and down regulates β -catenin. *The Journal of Biological Chemistry*. 274: no:23 34399-34406 2000.

¹¹³ Potter E, Bergwitz C, Brabant G. The cadherin-catenin system: implications for growth and differentiation of endocrine tissues. *Endocr Rev*. 1999 20(2):207-39.

¹¹⁴ Markoff, A., Savov, A., Vladimirov, V., Bogdanova, N., Kremensky, I., and Ganev, V. Optimization of single-stranded conformation polymorphism analysis in the presence of polyethylene glycol. *Clin Chem* 43: 30-3, 1997

¹¹⁵ PCR product analysis Applications SSCP www.amershambiosciences.com

¹¹⁶ *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition*, J. Sambrook, E.F. Fritsch and T. Maniatis, Cold spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989)

¹¹⁷ Umeda T., Yamamoto T., Kajino K., β -catenin mutations are absent in hepatocellular carcinomas of SV40 T antigen transgenic mice. *In. J. Oncol*. 16: 1133-1136 2000.

¹¹⁸ Rimm D.L., Caca K., Hu G. Frequent nuclear/cytoplasmic localization of β -catenin without exon3 mutations in malignant melanoma. *Am. J. Pathol*. 154:325-329 1999.