

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

MESANE KANSERLİ OLGULARDAN ALINAN TÜMÖR
ÖRNEKLERİNDE AURORA KİNAZ A VE AURORA KİNAZ B
GEN DEĞİŞİKLİKLERİNİN FLORESAN IN SİTU
HİBRİDİZASYON (FISH) YÖNTEMİYLE BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAŞAK TÜFEKÇİ

DANIŞMAN

PROF. DR. SEVİLHAN ARTAN

2011- AĞUSTOS

ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

MESANE KANSERLİ OLGULARDAN ALINAN TÜMÖR
ÖRNEKLERİNDE AURORA KİNAZ A VE AURORA KİNAZ B
GEN DEĞİŞİKLİKLERİNİN FLORESAN IN SİTU
HİBRİDİZASYON (FISH) YÖNTEMİYLE BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAŞAK TÜFEKÇİ

DANIŞMAN

PROF. DR. SEVİLHAN ARTAN

KABUL VE ONAY SAYFASI

Başak TÜFEKÇİ'nin Yüksek Lisans Tezi olarak hazırladığı “**Mesane Kanseri Olgulardan Alınan Tümör Örneklerinde Aurora Kinaz A ve Aurora Kinaz B Gen Değişikliklerinin Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH) Yöntemiyle Belirlenmesi**” başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirilerek “KABUL” edilmiştir.

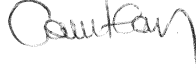
Tarih

26.08.2011

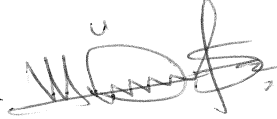
Üye: Prof. Dr. Sevilhan ARTAN



Üye: Doç. Dr. Cavit CAN



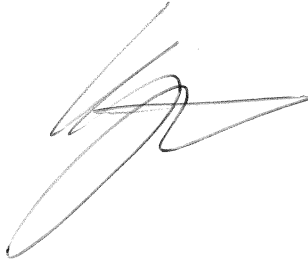
Üye: Yrd. Doç. Dr. Muhsin ÖZDEMİR



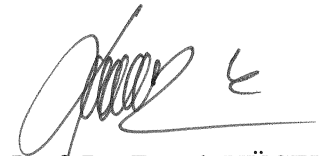
Üye: Yrd. Doç. Dr. Didem COŞAN



Üye: Yrd. Doç. Dr. Oğuz ÇİLİNGİR



Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ^{07/09/2011} tarih ve ^{886/4/107} sayılı kararı ile onaylanmıştır.



Prof. Dr. Ferruh YÜCEL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Giriş: Ürotelyal karsinom sık gözlenen agresif kanser tipidir. Son yıllarda hücre proliferasyonu için gerekli serin/treonin kinazlardan olan Aurora kinazların mesane kanseri progresyonu için belirteç olma potansiyeli gösterebileceği öne sürülmektedir.

Amaç: Aurora kinaz A ve Aurora kinaz B gen kopya sayısı değişiklikleri ile hücrelerin ploidi düzeylerinin mesane kanserli olgulardan alınan tümör örneklerinde, tümör derecesi ve evresi ile ilişkilerinin ortaya konması amaçlanmıştır.

Gereç-Yöntem: Mesane kanseri tanısı almış 28 olgudan alınan tümör örnekleri ile 10 normal doku örneğinde; AURKA ve AURKB genlerinin genomik kopya aberasyonları ile hücrelerin ploidi düzeyleri FISH yöntemi ile değerlendirilmiştir.

Bulgular: Olgularımızın %65,5'in de AURKA geni düşük amplifikasyonu, %48,2'sinde AURKA geni yüksek amplifikasyonu, %51,7'sin de AURKB geni delesyonu, %55,1'inde triploidi, %37,9'unda tetraploidi, %31'inde ise >4n grubu anomaliler saptanmıştır. Düşük grade tümörlerde hafif AURKA amplifikasyonu yoğun olarak gözlenirken ileri grade tümörlerde yüksek AURKA amplifikasyonu ve AURKB delesyonu ortak bulguydu. Nüks olan olgunun ilk tümör örneğinde (Ta) düşük AURKA amplifikasyonu ve AURKB delesyonu gözlenirken, ikinci örnekte (invaziv, yüksek grade, T2) varolan anomalilere yüksek AURKA amplifikasyonu ve poliploid klonlar eşlik etmekteydi. Diğer yüksek dereceli tümörlerin tümünde AURKA amplifikasyonu, AURKB delesyonu, tetraploidi ve >4n grubu anomaliler birlikte saptanmıştır.

Sonuç ve Tartışma: AURKA amplifikasyonunun mesane kanseri progresyonunda erken dönemde ortaya çıktığı, tümör derecesi arttıkça bölünme hatalarından kaynaklanan anomali oranının belirgin bir şekilde arttığı, bu nedenle bu genlerin tanı ve takipte bir belirteç olabileceği düşünülmektedir. Ancak özellikle nüks potansiyeli olan tümörleri belirlemede marker olarak kullanılma potansiyelini belirlemek için daha geniş olgu serilerinde karşılaştırmalı çalışmalara gerek duyulmaktadır. Çalışma Türk populasyonunda bu konuda yapılmış ilk ve tek çalışma olma özelliği taşımaktadır.

Anahtar kelimeler: Mesane kanseri, FISH, AURKA, AURKB, poliploidi

SUMMARY

Introduction: Urothelial carcinoma is a frequent and aggressive cancer. It has recently been postulated that gene amplification and expression profiles of serine-threonine kinase Aurora A and Aurora B may have prognostic potentials in bladder cancer progression.

Aim: to assess the correlation of both markers with clinical and pathological parameters in patients with bladder cancer of different grade and stage.

Materials and Methods: Aurora A and Aurora B genes copy number aberrations and polyploidic clones were analysed by FISH in 28 consecutive cases of bladder neoplasms obtained by transurethral resection and 10 normal tissues.

Results: Low level and high level AURKA gene amplifications were determined in 65,5% and 48,2% of the patients, respectively. Of the samples, 51,7% had AURKB gene deletions whereas 55,1%, 37,9% and 31% of the tumors showed clones with triploidy, tetraploidy and $>4n$. While low level AURKA amplifications were predominantly seen in low grade tumors, the high AURKA amplification and AURKA B gene deletion were the common aberrations in higher grade tumors. The first tumor (Ta, low grade) of the patient with recurrence invasive bladder cancer showed low level AURKA amplification and AURK B gene deletion together, but the recurrent invasive tumor sample (T2, high grade) had not only previously seen abnormalities, but also high level AURKA amplifications and highly frequent polyploid clones were determined.

Conclusion: The results postulated that AURKA gene amplification may be involved in early stages of bladder carcinogenesis, and both of the genes might be used as biomarkers for diagnosis and assignment of tumor progression. However, further detailed studies in larger populations are necessary to use these genes as biomarkers in especially determination of tumors with recurrent potentials.

Keywords: Bladder cancer, FISH, AURKA, AURKB, polyploidy

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	v
SUMMARY	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kanser.....	3
2.2. Kanserın Gelişimi ve Kanser Hücresinin Özellikleri.....	3
2.3. Kanserın Moleküler Temeli.....	5
2.4. Kanser Patogeneğinde Rol Oynayan Genler.....	6
2.4.1. Onkogenler.....	6
2.4.2. Tümör Baskılayıcı Genler.....	10
2.4.3. DNA Tamir Genleri.....	12
2.4.4. Apoptozis Komponentleri.....	12
2.4.5. Mitotik Siklus Düzenleyicileri.....	14
2.4.5.1. Aurora Kinazlar.....	19
2.4.5.1.1. Aurora Kinaz A/ STK15/ STK6 Geni.....	21
2.4.5.1.2. Aurora Kinaz B/ STK12 Geni.....	23
2.5. Aurora Kinazlar ve Tümörogenesis.....	25
2.6. Mesane Kanseri.....	26
2.6.1. Mesane Tanımı.....	26
2.6.2. Mesane Histolojisi.....	27
2.6.3. Mesane Tümörlerinin Patolojisi.....	27

2.6.4. Mesane Kanseri Evreleme.....	27
2.6.5. Mesane Kanseri Derecelendirme.....	28
2.6.6. Mesane Kanserinin Biyolojik Belirteçleri.....	28
2.6.7. FISH (Floresan İn Situ Hibridizasyon) ve Mesane Kanseri.....	32
3.GEREÇ ve YÖNTEMLER.....	34
3.1. Gereç.....	34
3.1.1. Kullanılan Gereçler.....	34
3.1.2. Cam Malzeme.....	35
3.1.3. Kimyasal Maddeler.....	35
3.1.4. Kullanılan Problar.....	35
3.2 Yöntem.....	36
3.2.1 Materyal Alımı	36
3.2.2. Moleküler Sitogenetik Analiz	37
3.2.2.1. Direkt Doku Preparasyonu	37
3.2.2.2. FISH Tekniğinin Uygulanması	38
3.2.2.2.1. Preparatların Ön Yıkaması ve Denatürasyonu.....	40
3.2.2.2.2. Prob Denatürasyonu.....	41
3.2.2.2.3. Hibridizasyon.....	41
3.2.2.2.4 Hibridizasyon Sonrası Yıkamalar	41
3.2.2.2.5. Hibridize Olan Bölgelerin Görüntülenmesi.....	42
3.2.2.2.6. Preparatların Mikroskopta İncelenmesi.....	42
3.2.2.2.7. Değerlendirme.....	43
3.2.3. İstatistiksel Analiz	45
4. BULGULAR.....	47
4.1.Yöntem ve Değerlendirmeye İlişkin Bulgular.....	50
4.1.1. Tümör Örneklerinin FISH Analiz Bulguları.....	50
4.1.2. AURKA Geni Kopya Sayısı Bulguları.....	52
4.1.3. AURKB Geni Kopya Sayısı Bulguları.....	56

4.1.4. Sayısal Kromozom Anomalilerine İlişkin Bulgular.....	58
4.1.5. FISH Analiz Verileri ile Histopatolojik Özelliklerin İlişkisi.....	61
4.2.Çalışmaya İlişkin İstatistik Verileri.....	63
4.2.1. Tümör Dereceleri ile Amplifikasyonlar, Delesyonlar ve Sayısal Kromozomal Artışlar Arasındaki İstatistiksel Veriler.....	63
4.2.2. Tümör Evreleri ile Amplifikasyonlar, Delesyonlar ve Sayısal Kromozomal Artışlar Arasındaki İstatistiksel Veriler.....	67
4.2.3. Saptanan Amplifikasyonlar ve Delesyonlar ile Sayısal Kromozomal Artışlar Arasındaki İstatistiksel Veriler.....	68
5. TARTIŞMA.....	70
5.1.FISH Yöntemi İle Saptanan Anomalilerle Literatür Bilgilerinin Karşılaştırılması.....	70
5.1.1. Aurora Kinaz A Geni Amplifikasyonunun Mesane Tümörü Örneklerindeki Durumu.....	72
5.1.2. AURKA ve AURKB Gen Değişikliklerinin FISH Yöntemi Sonuçları ile Literatür Bilgilerinin Karşılaştırılması.....	83
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	87
7.KAYNAKLAR.....	89
ÖZGEÇMİŞ	

TABLolar DİZİNİ

Sayfa

Tablo 2.1 : Onkogenler ve İşlevleri.....	9
Tablo 3.1. Carnoy's Fiksatif Solüsyonu ve Preparatların Ön Yıkama Solüsyonları.....	38
Tablo 3.2 : Preparatların Denatürasyon Solüsyonu.....	39
Tablo 3.3 : Hibridizasyon Sonrası Solüsyonlar.....	39
Tablo 3.4 : Görüntüleme Sistemleri Solüsyonu.....	40
Tablo 4.1. Mesane Kanseri Olgularının Yaş, Ön tanı, Tümör tipi, Tümör Evre ve Derece Bilgileri.....	48
Tablo 4.2 : Mesane Kanseri Olgularının FISH Analizi Sonuçları.....	55
Tablo 4.3 : Tümör Örneklerinde Saptanan AURKA/AURKB Kopya Sayısı Anomalileri ile > 4n Grubu Klonların Tümör Derecelerine Göre Görülme Sıklıkları.....	62
Tablo 4.4 : Tümör Dereceleri ile Tüm Genetik Anomaliler Arasındaki İstatistiksel Veriler.....	63
Tablo 4.5. Tümör Evreleri ile Tüm Genetik Anomaliler Arasındaki İstatistiksel Veriler.....	67
Tablo 4.6. Amplifikasyonlar ve Delesyonlar ile Sayısal Kromozomal Artışlar Arasındaki İstatistiksel Veriler.....	69
Tablo 5.1. Çalışmamızdaki AURKA Geni ile Literatür Bilgilerinin Karşılaştırılması.....	82

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Hücre İleti Sistemi	8
Şekil 2.2. BCL-2 İle Mitokondriden Sitokrom c Salınımı.....	13
Şekil 2.3. Hücre Siklusu G1/S, G2/M ve M Kontrol Noktaları, Siklin-CDK Kompleksleri.....	14
Şekil 2.4. Hücre Siklusu Progresyonunda Retinoblastoma Proteinin (PRB) Rolü....	16
Şekil 2.5. Hücre Siklusu Kontrolünde Siklin ve CDK'lar.....	18
Şekil 2.6. Aurora Kinazların Yapısı.....	20
Şekil 2.7. Aurora Kinaz A'nın Rolü.....	22
Şekil 2.8. Aurora Kinaz B Aktivitesi.....	24
Şekil 3.1. Çalışmamıza ait Anomalilerin Kesim Noktalarının Belirlendiği ROC Eğrisi.....	46
Şekil 4.1. Olgu 01'e ait AURKA Geni için Normal Hücrenin FISH Görüntüsü.....	53
Şekil 4.2. AURKA Gen Amplifikasyonu Görülen 20 Numaralı Olgunun FISH Görüntüsü.....	53

Şekil 4.3. AURKA Gen Amplifikasyonu Görülen 18 Numaralı Olgunun FISH Görüntüsü.....	54
Şekil 4.4. Olgu 10'e ait AURKB Geni ve Sentromer 17 için Normal Hücelere Sahip FISH Görüntüsü	56
Şekil 4.5. Olgu 27'e ait AURKB Geni ve Sentromer 17 için Delesyonlu Hücelere Sahip FISH Görüntüsü.....	57
Şekil 4.6. Olgu 07'e ait Triploidik Hücrenin FISH Görüntüsü.....	59
Şekil 4.7. Olgu 13'e ait >4n Grubu Hücrenin FISH Görüntüsü.....	59
Şekil 4.8. Olgu 14'e ait >4n Grubu Hücrenin FISH Görüntüsü.....	60
Şekil 4.9. Tümör Örneklerinde Saptanan Anomalilerin Düşük ve Yüksek Dereceli Tümör Örneklerindeki Dağılımları.....	65
Şekil 4.10. Düşük ve Yüksek Dereceli Tümör Örneklerinin Saptanan Anomaliler ile Karşılaştırılması.....	66

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
APC	Anafaz Başlatıcı kompleks
AURKA	Aurora Kinaz A
AURKB	Aurora Kinaz B
BCL-2	B Hücreli Lenfoma-2
CKI	Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü
CDK	Siklin Bağımlı Kinaz
CGH	Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon
CIS	Karsinoma In Situ
DAPI	4',6'-diamino-2-fenilindol
DEHK	Değişici Epitel Hücreli Karsinom
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
FGFR	Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü
FISH	Floresan In Situ Hibridizasyon
g	Gram
GDP	Guanozin Difosfat
GTP	Guanozin Trifosfat
HER2	İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
İHK	İmmunohistokimyasal
INCENP	İç Sentromerik Protein
kDA	Kilo Dalton
LOH	Heterozigosite Kaybı
ml	Mililitre
MPF	Mitoz İlerleten Faktör

Simgeler	Açıklama
mRNA	Messenger Ribonükleik Asit
NaCl	Sodyum Klorür
NaOH	Sodyum Hidroksit
NIHGC	Non-invaziv Yüksek Grade Papiller Ürotelyal Karsinom
NILGC	Non-invaziv Düşük grade Papiller Papiller Ürotelyal karsinom
NIR	Novel INHAT Represör
NMIBC	Kasa İnvaze Olmayan Mesane Kanseri
NMP-22	Nükleer Matriks Protein 22
MAPK	Mitoz Aktive Edici Protein Kinaz
MiRNA	Mikro Ribonükleik Asit
PCNA	Çoğalan Hücre Nükleer Antijeni
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDGF	Platelet Kökenli Büyüme Faktörü
PI3K	Fosfoinositol 3 Kinaz
PUNLMP	Papiller Ürotelyal Düşük Malign Potansiyelli Neoplazi
RB	Retinoblastoma
RNA	Ribonükleik Asit
ROC	Receiver Operating Characteric
RT PCR	Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Src	Rous Sarkoma Virüs
SSC	NaCl ₇ Trisodyum Sitrata
STK	Serin-Treonin Kinaz
TGF-β	Transforme Büyüme Faktörü Beta
TNM	Tümör Nodül Metastaz
TSC	Tüberöz Skleroz Protein
TSG	Tümör Supresör Gen
UICC	Uluslar arası Kanser Karşıtı Birliği
VEGFR	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptörü
μl	Mikrolitre
μg	Mikrogram

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Kanser; hücrelerin aşırı ve zamansız çoğalmalarına, immün sistemin denetiminden kaçmalarına, uzaktaki dokuları da istila ederek metastazlar oluşturmalarına yol açan çok basamaklı bir süreçtir (41,56).

Yapılan çalışmalarda, kanser tüm ölümlerin yüzde yirmisinden fazlasını oluşturmaktadır. Gelişmiş ülkelerin sağlık harcamalarının ciddi bir kısmı kanser tedavilerine harcanmaktadır. Kanser araştırmalarında erken tanı ve tedavi önemli olmakla birlikte, kansere yakalanma riski olan bireylerin kanser gelişmeden önce saptanabilmesi ayrıca önem taşımaktadır (56,57).

Mesaneyi oluşturan hücrelerin kontrolsüz olarak çoğalması ile ortaya çıkan mesane kanseri en sık görülen kanser türlerinden biridir (57). Tüm kanserler içerisinde beşinci, genitouriner sistem kanserleri arasında ise ikinci sıklıkta gözlenir. Mesane kanserinin ortalama görülme yaşı 65'tir. Erkeklerde görülme sıklığı, kadınlara oranla 2-3 kat fazladır. Amerika Birleşik Devletleri, Kanada ve Fransa gibi endüstrileşmiş Batı Avrupa ve Kuzey Amerika ülkelerinde en yüksek insidansa sahipken Asya ve Güney Amerika ülkelerindeki görülme sıklığı en düşük düzeylerde dir. Amerika'da yaklaşık yılda elli bin yeni vaka saptanmakta ve tahminen on iki bini ölümlle sonuçlanmaktadır (6,33). Ülkemizde ise erkeklerde görülen en sık kanserler arasında, akciğer kanseri ve mide kanserinden sonra üçüncü sırayı almaktadır (57).

Mesane kanserlerinin büyük çoğunluğundan çevresel faktörler sorumludur. Özellikle sigara kullanımı mesane kanseri riskini 2-3 kat arttırmaktadır. Sigara kullanımının yanında mesleki ve kimyasal karsinojenlere maruziyet mesane kanseri riskini önemli ölçüde arttırmaktadır (57).

Mesane kanseri, üriner sistemde en çok karşımıza değişici epitel hücreli karsinomu olarak gelir. Transüretral olarak rezeke edilen tümörlerin önemli bir bölümü zamanla nüks eğilimi göstermektedir. Genel olarak tümör tekrarlama oranı %70-80 gibi yüksek bir orandır. Tekrarlayan mesane tümörleri yzeyssel ise bu oran %10-15 oranında görülmektedir. Yzeyssel mesane tümörleri, yüksek derece veya evreye doğru progresyon göstermektedirler. Tanı aşamasında % 85'i mesaneye lokalize, % 15'i de uzak metastaz yapan tümörlerdir (57).

Tanı ve takipte, sistoskopi ve üriner sitoloji yerleşik yöntemdir. Tümör derecesi ve evresi, hastalığın seyri ve tedavi edici sonuçlar hakkında bilgi vericidir. Üriner sitolojik tetkikin genel duyarlılığı %60 dolaylarındadır. Ancak sitolojinin tek başına yanlış negatif sonuçlar verebilme olasılığından dolayı sistoskopi ile beraber kullanılmaktadır. Son yıllarda belirli biyolojik markerlerin FISH (floresan in situ hibridizasyon) ile analizlerinin yüksek derece ürotelyal karsinomu saptamada sitolojiden daha duyarlı olduğunu vurgulayan çalışmalar literatürde yer almaktadırlar (18).

Mesane kanserinin moleküler temeli hakkındaki bilgilerimizin artması ve ileri analiz yöntemlerinin gelişmesi; diğer kanser tiplerinde olduğu gibi bu kanser tipinde de erken tanı, prognoz, tedaviye yönelik biyomarkerlerin belirlenmesi çalışmalarının hız kazanmasına neden olmaktadır. Günümüzde ne sürülen yeni belirteçler genetik yeniden dzenlenmelerden, moleküler değişikliklerden ve hücre döngüsü ile ilişkili proteinlerden temel almaktadır. Son yıllarda hücre proliferasyonu için gerekli serin/treonin kinazlardan olan Aurora kinazların mesane kanseri progresyonu için belirteç olma potansiyeli gösterebileceği ne sürülmektedir (56,60). Bu bilgi doğrultusunda alışmamızda;

Mesane kanserli olgulardan alınan tümör rneklelerinde FISH yöntemiyle saptanan Aurora kinaz A ve Aurora kinaz B gen kopya sayısı değişikliklerinin, tümör derecesi ve evresi ile ilişkilerinin ortaya konması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Çok hücreli organizmalarda her hücrenin çoğalması, farklılaşması ve sağ kalımı organizmanın genel gereksinimleri doğrultusunda düzenlenir. Yaşlanan ve ölen hücre oranı ile yeni oluşan hücre oranı arasında bir denge söz konusudur. Bu denge hücre ileti sistem yolları, hücre proliferasyonu, anjiyogenez, apoptozis ile ilgili yolların aktif veya inaktif hale gelmesi ile sağlanır. Ancak bu yollardaki düzensizlikler, hatalar, yollara dahil olan proteinlerdeki eksiklik veya yanlış davranışlar hücrenin kontrolsüz çoğalması ve/veya normale göre daha az oranda ölümü ya da ölmemesi ile sonuçlanır (21,41,47).

Kanser, bu dengenin bozulması sonucu oluşan kompleks bir hastalık grubudur. Organizmanın en küçük birimi olan hücre de moleküler düzeydeki bozukluklardan orijin aldığı için, kanser moleküler ve hücresel düzeyde incelenmesi gereken bir hastalık grubudur (21).

2.2. Kanserin Gelişimi ve Kanser Hücresinin Özellikleri

Kanser, hücrelerin sürekli çoğalarak birikmesi ile karakterize bir düzen bozukluğudur. Kanserin gelişimi birbirini izleyen değişiklikler sonucu giderek malign şekle dönüşen çok aşamalı bir süreçtir. Kanserin çok aşamalı olduğunu gösteren özelliklerden biri de, kanserin geç yaşlarda ortaya çıkmasıdır (21,56).

Kanser hücrelerini normal hücrelerden ayıran temel özelliklerden biri; kontrolsüz bölünme ve büyümedir. Hızlı ve kontrolsüz bölünme, kanserleşme sürecinin ilk basamağını oluşturmaktadır (47). Benign tümörlerin çoğu yavaş büyürken, malign tümörlerin proliferasyonu hızlı ve kontrolsüzdür. Hücre içi yolların bozulmasına bağlı

olarak proliferasyon hızı da değişir. Bunun devamında ise hücre diferansiyasyonu azalır. Hızlı büyüyen tümörler kötü farklılaşmaya giden bir yol izlerler.

Hasara uğrayan ilk hücre kanserleşme sürecine girerek, klonal orijini oluşturur. Yani ilk oluşan tümör hücresinden meydana gelen yavru hücrelerde de aynı moleküler hatalar bulunmaktadır. Dolayısıyla monoklonal bir orijin gösterirler. Ancak bu hücreler, oluşan başkalaşımın hücrelere çoğalabilme yeteneği vermesine bağlı olarak, normal hücrelere göre daha hızlı proliferasyon olurlar. Bu hızlı proliferasyon sırasında moleküler düzeyde yeni başkalaşımın olması muhtemeldir. Bu da monoklonal orijinin ilerleyen süreçlerde poliklonal hale gelmesine neden olur (21).

Kanser hücrelerinde çoğalmayı düzenleyen yolaklardaki düzensizlik nedeniyle oluşan kontrolsüz çoğalmaya bağlı olarak, aşırı hücre birikiminin uygun miktarda hücre ölümüyle dengelenmemesi kanser gelişimi ile sonuçlanır. Bu hücreler kan ve lenf dolaşım sistemleri ile yayılım yaparak organizmanın diğer organlarını da hasara uğratabilirler (41).

Bir hücrenin çoğalabilmesi, ekstraselüler ortamdan gelen sinyaller aracılığıyla olur. Diğer hücreler tarafından üretilen büyüme faktörleri, hormonlar vb. ligandlar hücre membranından geçerek intraselüler ortama geçer ve nükleusta DNA transkripsiyonunu başlatma veya durdurma görevini yerine getirirler. Yani bir normal hücre, diğer hücrelerin ürünlerine gereksinim duyar. Ancak kanser hücrelerinde bu özellik yitirilmiş, hücreler arası iletişim gereksinimi kaybolmuştur. Ekstraselüler ortamdaki her türlü ligand, kanser hücresinin çoğalması için bir sinyal olabilir. Hatta kanser hücresi kendi ürettiği proteini sinyal olarak kabul edebilir ve otokrin çoğalma yoluyla kontrolsüz proliferasyon sürecini devam ettirebilirler (21,47).

Normal hücrelerin belirli bir çoğalabilme kapasitesi vardır. “Hayflick limiti“ olarak tanımlanan bu özellik kanser hücresinde kaybolmuştur. Yapılan in vitro çalışmalarda; normal hücrelerin düzenli bir şekilde kültür ortamında çoğaldıkları, optimum koşullar sağlanmasına rağmen belirli bir sıklusa ulaştıktan sonra daha fazla çoğalmadıkları gösterilmiştir. Kanser hücrelerinde ise düzensiz şekildeki çoğalmanın

sürekli olduğu, hücrelerin sınırlı sıklusa ulaştıktan sonra dahi kısıtlı besi ortamına rağmen proliferasyonlarına devam ettikleri saptanmıştır (21).

Normal hücrelerde olmayan, kanser hücrelerine özel olan bir başka fark da, kanser hücrelerinin metastaz yapma yeteneğine sahip olmalarıdır. Kanser hücreleri organizmada diğer doku ve organlara yayılım yaparak maligniteye neden olurlar (56). DNA tamiri ile DNA yanlış eşleşmeleri tanıma yeteneklerindeki hatalardan dolayı hücreler heterojendirler. Ayrıca kanser hücreleri proliferasyon kontrol merkezlerine daha az yanıt veren klonlar oluştururlar. Hücre yaşlanması ve ölümü yollarındaki hatalardan dolayı yetersiz hücre ölümü kanser hücrelerinin normal hücrelere kıyasla daha uzun yaşama eğilimi göstermelerine neden olur. Kanser hücrelerinin programlı hücre ölümünü elimine etmesi, tümör gelişimi ve metastaza giden yolu açar (21).

2.3. Kanserın Moleküler Temeli

Kanser esasında, genetik hasarın birikmesi ile anormal hücre populasyonunun organizmayı sarması ve insanda patolojik etkiler yaratmasıdır. Genetik hasar; çevresel ajanlar, tümör virüsleri, oksidatif stres, kimyasal mutajenlerle ortaya çıkabildiği gibi, kalıtsal olarak da organizmada bulunabilir (47). İşlevini kaybeden bir gen, bir proteinin anormal düzeylerde üretimine, anormal bir protein üretimine (işlev kazanmış ya da kaybetmiş) ya da bir proteinin hiç üretilmemesine sebep olabilir. Bir normal hücrenin mitoz bölünmeye girebilmesi pek çok hücreyel yolağın kontrolü altındadır. Hücre siklusunun her aşamasında bir kontrol söz konusudur. Diğer taraftan hücre sinyal iletimi yolları aracılığı ile hücre proliferasyonu aşamalarında gerekli olan proteinler sentezlenir. Dolayısıyla, bir hücrenin proliferasyonu çok sayıda genin ekspresyonunu veya baskılanmasını gerektirir. Karsinogenez sürecinde ise bu genlerdeki mutasyonlar sebebiyle kontrol mekanizmaları bozulur (56). Hücre siklusunda görevli olan ve hücre proliferasyonunu, diferansiyasyonunu veya hücre ölümünü kontrol eden genlerdeki mutasyonlar kanserleşmeden sorumludurlar. Birçok kanser tipinde, mutasyonlar tek bir somatik hücrede oluşup bölünerek kanser gelişimine neden olurken, kalıtsal kanserlerde kanser gelişimine sebep olan mutasyon, germ hücreleri aracılığıyla sonraki jenerasyona

doğuştan aktarılmakta ve tüm hücrelerin mutant olmasına neden olmaktadır. Kanser oluşumu bir kez başladığında kromozom yapısının bozulması, DNA düzeyindeki hatalar, bu hataların tamirindeki bozukluklar veya epigenetik mekanizmalar kümülatif bir artış göstererek kanseri yaygınlaştırır (56).

2.4. Kanser Patogeneğinde Rol Oynayan Genler

Kanserin gelişiminden pek çok gen sorumludur. Bu genleri fonksiyonları açısından; (21,47,56).

❖ Onkogenler

❖ Tümör baskılayıcı genler

❖ DNA tamir genleri

❖ Apoptozis komponentleri

❖ Mitotik siklus düzenleyicileri

olarak gruplandırabiliriz.

2.4.1. Onkogenler

Onkogenler, hücre proliferasyonu ve hücre farklılaşmasını düzenleyen proteinleri kodlayan protoonkogenlerin mutant veya aşırı eksprese olmuş formlarıdır. Onkogenlerin kansere neden olma potansiyelleri vardır. Aktif olan onkogenler hücrelerin yaşamasına ve sürekli proliferolmalarına neden olur. İlk onkogen 1970 yılında tavuk retrovirüsünde keşfedilen src onkogenidir. O günden bugüne kadar kanser gelişiminde rol oynayan yüzlerce onkogen saptanmıştır (21,56).

Normal hücrelerin büyümesi, farklılaşması ve proliferasyonu sürekli kontrol altındadır. İntraselüler gereksinim ve ekstraselüler ortamdaki gelen sinyallerin hücre

içerisine, nükleusa ulaştırılması çok sayıda proteinin rol oynadığı hücre “sinyal ileti sistemi” yolları sayesinde olur. Bu proteinleri kodlayan genler “protoonkogen“ olarak isimlendirilir. Yani protoonkogenler normal hücrelerde sinyal iletimi ve mitotik sinyallerin düzenlenmesinde görev alan genlerdir. Bu genlerin mutant formları “onkogen“ dir (21).

Protoonkogenler, farklı mekanizmalar aracılığıyla onkogenik potansiyel kazanırlar. Bunlar :

a)Nokta mutasyonu sonucu protoonkogen proteinin yapısında meydana gelen değişiklik

- i) Protein aktivitesinde artışa
- ii) Regülasyon kaybına neden olur.

b)Protein konsantrasyonunda artış

- i) Protein ekspresyonundaki artış (hatalı düzenlenme sonucu)
- ii) mRNA stabilitesinin artması, uzun süre degrade olmadan kalması ve sürekli aktif olması
- iii) Gen duplikasyonu/amplifikasyonu nedeniyle protein miktarında artışın olması

c) Kromozom translokasyonları

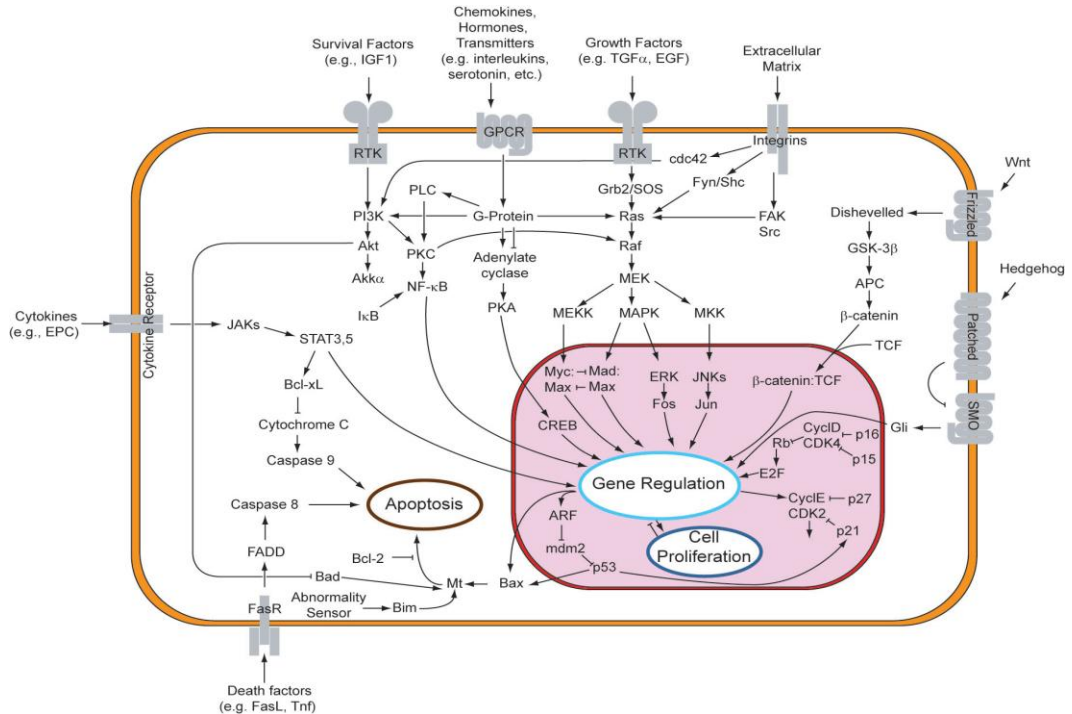
- i)Yanlış hücre tipinde veya yanlış zamanda gen ekspresyonunun artması
- ii)Aktif hibrit proteinin oluşması (39)

Onkogenlerin ekspresyonu mikroRNAlar tarafından da düzenlenebilir. MikroRNAlar küçük, 21-25 nükleotit uzunluğundaki RNA molekülleridir ve gen

ekspresyonunun epigenetik kontrolünden sorumludurlar. Bu mikroRNA'lardaki mutasyonlar (onkomir) onkogen aktivasyonuna yol açarlar (29).

Protoonkogenin onkogenik potansiyel kazanmasında tek allel mutasyonu yeterlidir. Dominant nitelikteki mutasyon nedeniyle gen onkogen haline gelir. Onkogenlerin klasifikasyonunda henüz belirli bir standart bulunmamaktadır. Sıklıkla kullanılan gruplandırma Tablo 2.1'de belirtilmiştir.

Çok hücreli organizmaların hücreleri arasındaki iletişim, hücre sinyal iletimi yolları aracılığıyla olur. Hücre sinyal iletimi ile bir molekülün reseptöre bağlanması ile tüm hücrenin davranışlarını düzenleyen bir dizi hücre içi reaksiyon başlatılır. Şekil 2.1'de hücre ileti sistemi genel olarak verilmiştir.



Şekil 2.1. Hücre İleti Sistemi (32) (www.wikipedia.org ' dan alınmıştır.)

Tablo 2.1. Onkogenler ve işlevleri (21)

<i>Grup</i>	<i>Örnek</i>	<i>Açıklama</i>
Büyüme faktörleri veya mitojenler	c-sis	Genellikle hücre proliferasyonunu aktiflemek için özelleşmiş hücreler tarafından salgılanırlar. Ekstraselüler ortamdan hücre içerisine girerler. Onkogenik özelliği sonucu otokrin loop nedeniyle hücre proliferasyonu sürekli aktif hale gelir.
Reseptör tirozin kinazlar	EGFR, PDGFR, VEGFR, HER2/neu	Reseptör kinazlar hücre yüzeyinde bulunan reseptör proteinlere fosfat grubu eklerler. Hücre dışından gelen sinyalin hücre içine aktarımı sağlar. Tirozin kinazlar hedef proteinin tirozin aminoasidine fosfat grupları eklerler. Onkogenik potansiyel kazanıldığı zaman reseptör devamlı aktif halde kalır, spesifik olmayan sinyallerin hücre içine alınmasına neden olurlar. Hatta ekstraselüler sinyal olmasa dahi aktif olduğu için hücre proliferasyonu sürekli olur.
Sitoplazmik tirozin kinazlar	Src ailesi, ABL geni	Sitoplazmik tirozin kinaz molekülleri hedef proteindeki tirozin rezidüsünü fosforilleyerek, o proteinin aktifleşmesini sağlar. Sürekli aktivasyonları ve onkogenik sinyal iletimi malign hücreli olayları hızlandırır.
Sitoplazmik serin/treonin kinazlar ve düzenleyici alt birimleri	RAF kinaz, CDK	Raf, Ras tarafından aktive edilen ve ERK/MAP kinazın aktivasyonuna yol açan bir protein-serin/treonin kinazdır. CDK'lar hücre döngüsünü denetleyen, mitozun ana regülatörü olan siklin bağımlı protein kinazlardır.
Düzenleyici GTPazlar	RAS	RAS küçük bir GTP'azdır, GTP'yi GDP'ye ve fosfata hidroliz eder. RAS, büyüme faktörü sinyal iletimi ile aktifleşir (EGFR gibi) ve büyüme sinyal yollarında ikili kontrol anahtarı gibi işlev gösterir (aktif/inaktif). RAS aktifliği sonrası hücre proliferasyonunu kontrol eden sitoplazmik proteinler RAF, MEK, ERK, MAPK'dır.
Transkripsiyon faktörleri	MYC geni	Hücre proliferasyonunu uyaran genlerin transkripsiyonlarını düzenlerler.

2.4.2. Tümör baskılayıcı genler

Tümör baskılayıcı gen, hücreyi kanserleşmeden koruyan gendir. Bu genin fonksiyonunu yitirmesi halinde karsinogenez sürecine girilir. Tümör baskılayıcı genlerin kodladığı proteinler hücre siklusunu düzenleyen, apoptozis mekanizmasını aktifleştiren proteinlerdir (47).

Onkogenlerin kodladığı proteinler, genin tek bir allelinin mutasyona uğramasıyla kanser gelişimini başlatırlarken, onkogenlerin aksine tümör baskılayıcı genler; genellikle “iki vuruş“ hipotezine göre hareket ederler. Yani tümör baskılayıcı gen allellerinden biri mutant olsa dahi diğer normal allel genin fonksiyonunu devam ettirir. Ancak her iki allelin mutant olması durumunda baskılayıcı gen işlevini kaybeder. Diğer bir deyişle mutant tümör baskılayıcı alleller genellikle resesifken, mutant onkogen allelleri genellikle dominanttır (56).

Tümör baskılayıcı genlerin fonksiyonları çok çeşitlidir ve aşağıda belirtildiği gibi gruplandırılabilir:

- 1) Hücre siklusunun sürekliliğini sağlayan genlerin baskılanması: Bu genlerin ekspresyonlarının baskılanması sayesinde hücre siklusu durur, mutant hücrenin bölünmesi engellenir.
- 2) Hücre siklusunun DNA tamir sistemine bağlanması: DNA hasarının tamir edilememesi durumunda mutant DNA'ya sahip yavru hücreler oluşacaktır. Bu nedenle hücre siklusu durdurulur ve DNA tamir sistemi aktifleştirilir.
- 3) DNA hasarının tamir edilememesi durumunda apoptozis mekanizmaları aktifleştirilir.

- 4) Hücre adhezyonundan sorumlu bazı proteinler tümör hücrelerinin yayılmasını önler, kontakt inhibisyon kaybını ve metastazı engeller. Bu proteinlere “metastaz baskılayıcıları” adı verilir.
- 5) DNA tamir proteinleri genellikle tümör baskılayıcı olarak gruplandırılırlar (64).

İlk tanımlanan tümör baskılayıcı protein, insan retinoblastom gelişiminde rol oynayan Retinoblastoma proteinidir (PRB). Knudson tarafından tanımlanan retinoblastom olgularında familyal ve sporadik olmak üzere iki farklı grup belirtilmiştir. Hastalığın ortaya çıkış yaşı ve hastalık şiddeti açısından olguların farklılık göstermesi “Knudson hipotezi” nin ortaya atılmasını sağlamıştır. Retinoblastoma geni için iki vuruş olması durumunda hastalık ortaya çıkmaktadır. Knudson‘ın bu keşfi, takip eden yıllarda tümör baskılayıcı genlerin her iki allelinin de mutant olması halinde fonksiyonlarını yitirdiklerini göstermiştir (56,64).

Hücre bölünme siklusu çok önemli bir süreçtir. Tek hücreli fertilize yumurtadan hücre bölünmesi ile organizma oluşmakta veya saç, deri, kan hücreleri, internal organlar hücre bölünmeleri sayesinde yenilenmektedirler. Hücre bölünmesinin hatasız gerçekleşmesi gerekir. O nedenle ileri düzeyde kontrol gerekmektedir. Hücre siklusunda iki önemli aşama vardır:

- i) İnterfaz: Hücrenin büyümesi, mitoz için gerekli proteinlerin sentezlenmesi ve DNA replikasyonunun gerçekleşmesi bu aşamada gerçekleşir.
- ii) Mitoz: Hücrenin iki yavru hücreye bölünmesi

İnterfaz; Gap1 (G1), sentez (S) ve Gap2 (G2) olmak üzere üç fazdan oluşur. Bu aşamalar birbirlerini takip ederler ve bir fazdan diğer faza geçiş sırasında her şeyin kontrol edildiği kontrol noktaları bulunur (21,47,56).

Bu kontrollerde bazı tümör baskılayıcı genler büyük rol oynarlar. Ayrıca DNA harabiyeti durumunda hücrenin arreste sokularak DNA tamir sistemlerinin aktive edilmesinde, tamir edilemeyen DNA'ya sahip hücrenin apoptozise sokularak ortamdan uzaklaştırılmasında da yine tümör baskılayıcı genler, özellikle de P53 proteini büyük rol oynar (47,56,64).

Hücre siklusu ve kontrol noktaları "mitotik siklus düzenleyicileri" bölümünde detaylandırılacaktır.

2.4.3. DNA tamir genleri

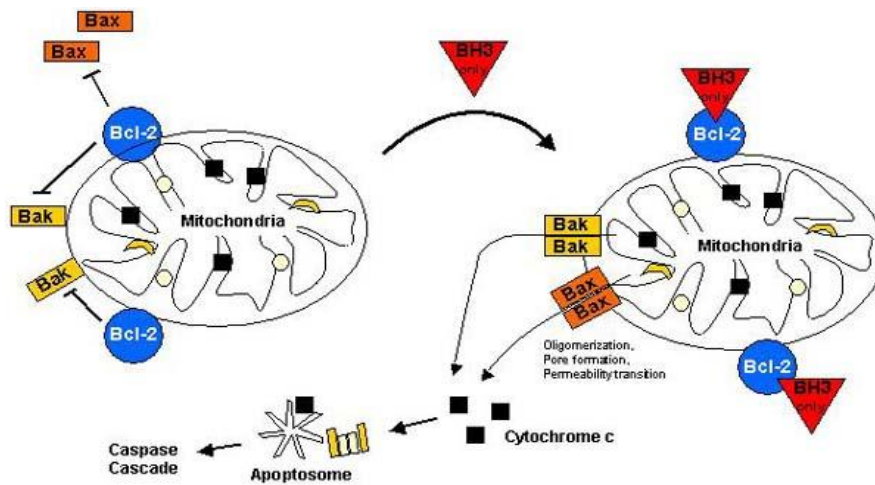
DNA molekülünün replikasyonunda viral, fiziksel ve kimyasal ajanlara maruz kalınması durumunda DNA'da hasar oluşabilir. Oluşan bu hasarlar DNA dizisinin değişmesine, DNA'nın stabil yapısının kaybına neden olabilir. Genomik kararsızlığın tamir edilmeyip diğer yavru hücrelere aktarılması ile kanserleşme başlayabilir. DNA tamir genleri, replikasyondaki hataları veya değişik nedenlerle oluşan DNA hasarlarını hasar tipine göre farklı mekanizmalarla tamir edilmeleri için gerekli enzimleri kodlarlar. Ancak bazı kanser tiplerinin moleküler temellerinde tamir gen mutasyonları bulunmaktadır. Bu genlerin işlevlerinin kaybolması genom boyunca mutasyonların oluşmasına ve her hücre bölünmesinde hasarlı DNA'nın replike olarak mutant yavru hücrelerin oluşmasına dolayısıyla da, genomik instabiliteye neden olacaktır (64).

2.4.4. Apoptozis komponentleri

Apoptozis, erişkinlerde ve embriyolojik gelişimde önemli rolü olan hücre ölümünün normal fizyolojisini oluşturan biyolojik bir olaydır. Apoptozis, hücre çoğalması ile dokudaki hücre sayısının dengesinden sorumludur. Canlı organizması için tehlike potansiyeline sahip hücrelerin ortadan kalkmasını sağlayarak, organizmada bir savunma mekanizması oluşturur. DNA'da bir hasar oluştuğunda hasar tamir edilir. Tamir edilemediği durumlarda hasarın meydana geldiği hücre ortadan kaldırılır ve böylece kanserleşmeye giden yol da engellenir (47).

Apoptozis komponentlerine genel olarak “kaspazlar“ denilmektedir. Kaspazlar bir protein ailesi olup, aktif bölgelerinde sistein aminoasitleri bulunur. Hedef bir hücrede kaspazlar hücre ölümünü gerçekleştirirken, ilk sentezlendiklerinde inaktif halde bulunurlar. Hücre ölümü indükledikten sonra inaktif halde bulunan pro-kaspaz, aktif kaspaz haline gelir. Apoptozisi başlatan yolların ortak noktası mitokondridir. Sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya salınması ile birlikte mitokondri aktive olur. Mitokondrinin aktivasyonuna neden olan faktör BCL-2'dir. Bu faktör hücre ölümünü ya inhibe ederek ya da hücre ölümünü başlatarak mitokondri üzerinde etkisini gösterir (21,47).

Hücre ölümü sürecinde rol alan ve önemli bir protein olan BCL-2 proteini, ilk olarak insan B hücreli foliküler lenfomada tanımlanmıştır. Bu proteinin pro-apoptotik ve anti-apoptotik olmak üzere iki alt grubu bulunmaktadır. Hücre ölümünü tetikleyen pro-apoptotik üyeler; BAX, BAD, BID, BAK iken, anti-apoptotik üyeleri ise BCL-2 ve BCL-XL'den oluşan hücre ölümünü inhibe eden üyelerdir (21,47). DNA'da bir hasar meydana geldiği zaman, P53 aktifleşerek, BAX'ın etkileşimine yol açar ve apoptozisi başlatır (21). Mitokondriden sitokrom c salınımı ile apoptozise giden yol ve kaspaz kaskadının oluşumu Şekil 2.2'de verilmiştir. Pro-apoptotik ve anti-apoptotik üyelerin organizmanın normal fizyolojisi açısından dengede bulunmaları gerekmektedir.

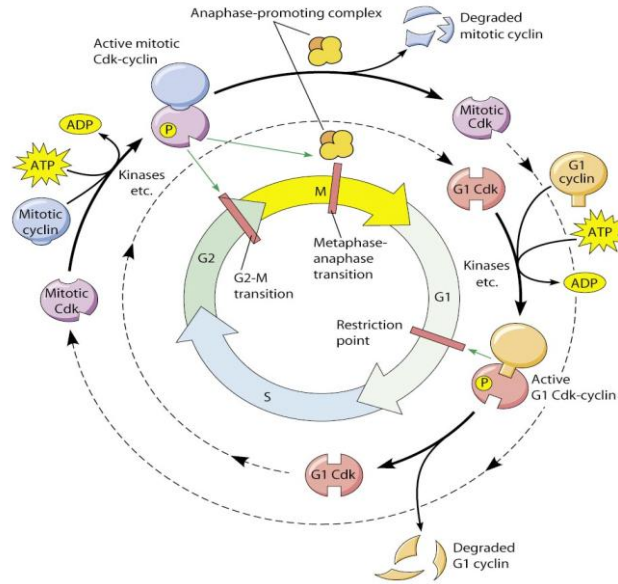


Şekil 2.2. BCL-2 ile Mitokondriden Sitokrom c Salınımı (29)

(http://www.humphath.com/IMG/jpg_bax_bcl2_cytochromec_04_1.jpg&imgrefur 'den alınmıştır.)

2.4.5. Mitotik siklus düzenleyicileri

Hücre döngüsünün düzenlenmesi, hücrenin canlılığı için gerekli süreçlerin gerçekleşmesini sağlar ki bunlar genetik harabiyetin farkedilmesi, tamiri ve kontrolsüz çoğalmanın önlenmesidir. Hücre döngüsünü kontrol eden moleküler olaylar sıralıdır ve belirli bir yönde ilerler, reversibl döngü gerçekleşemez (21). Hücre döngüsünü düzenleyici moleküller siklinler ve siklin bağımlı kinazlardır (CDK). Siklin ve siklin bağımlı kinazları kodlayan genler, ökaryotlarda evrimsel olarak korunmuş genlerdir. Siklinler düzenleyici alt birimleri, CDK'lar da aktif heterodimerin katalitik alt birimini oluştururlar. Siklinlerin katalitik aktivitesi yoktur ve CDK'lar da siklin eksikliğinde inaktiftirler. Siklinlerin bağlanmasıyla aktif oldukları zaman, CDK'lar fosforilasyon reaksiyonunu gerçekleştirirler. Böylece, hücre döngüsünü kontrol eden hedef proteinler aktif veya inaktif olurlar. Farklı siklin-CDK kombinasyonları etkileyecekleri hedef proteinleri belirlerler. Siklin bağımlı kinazlar hücrede sürekli ekspresse olurlarken siklinler, farklı moleküler sinyallere yanıt verirler ve hücre döngüsünün belirli aşamalarında sentezlenirler (15,21).



Şekil 2.3. Hücre Siklusu G1/S, G2/M ve M Kontrol Noktaları, Siklin-CDK Kompleksleri Aracılığıyla Düzenlenirler (30).

(<http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/BIOL2060-19/CB19.html>'den alınmıştır)

Mitotik ekstraselüler sinyal alımında, G1 siklin-CDK kompleksi aktif hale gelerek hücrenin S fazına hazırlanmasını sağlar. Transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunu uyararak S fazı inhibitör moleküllerinin degrade olmalarını uyarır. Aktif S siklin-CDK kompleksi, G1 fazında DNA replikasyon orijinlerine bağlı pre-replikasyon komplekslerini oluşturacak proteinleri fosforile eder. Fosforilasyon ile iki işlev birlikte gerçekleşir: (15)

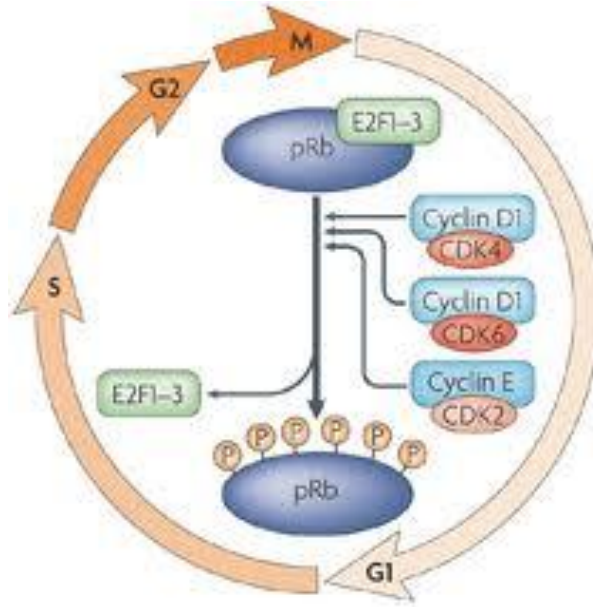
- i) Daha önce bağlı olan pre-replikasyon kompleksi aktifleştirilir.
- ii) Yeni komplekslerin oluşumu önlenir.

Her genom bir kez replike olmalıdır, ayrıca tüm genom replike olmalıdır. Çünkü tüm veya parsiyel gen kaybı olan yavru hücrelerin çoğunlukla yaşama şansları yoktur, tüm veya parsiyel ekstra gen kopyası bulunduran hücrelerde de anomaliler görülür. Mitotik siklin-CDK kompleksleri sentezlenir ancak S ve G2 fazlarında inaktif durumdadırlar. Bu kompleksler, kromozom kondensasyonu ve mitotik iğ iplikçığıne bağlanmada rol oynayan proteinlerin ekspresyonunu uyararak mitozu başlatırlar (15,21).

Siklin D, hücre döngüsünde ekstraselüler sinyallere yanıtta üretilen ilk siklindir. Siklin D CDK4'e bağlanarak siklin D-CDK4 kompleksi oluşur ve bu kompleks Retinoblastoma (RB) proteinini fosforile eder. Aşırı fosforile olan RB, E2F/DP1/RB kompleksinden ayrılır, E2F aktif hale gelir ve siklin E, siklin A, DNA polimeraz, timidin kinaz gibi genlerin transkripsiyonu gerçekleşir. Üretilen siklin E proteini CDK2'ye bağlanarak siklin E/CDK2 kompleksini oluşturur ki bu kompleks hücrenin G1'den S fazına geçişi sağlar (15,21,29,64) (Şekil 2.4).

İki gen ailesi; CIP/KIP ailesi (CDK interacting/Kinase inhibitory protein) ve INK4a/ARF, hücre siklusunun ilerlemesini engellerler. Bu genler tümör baskılayıcı genlerdir. CIP/KIP ailesi üyeleri olan P21, P27 ve P57 gen ürünleri hücre döngüsünü G1 fazında siklin-CDK kompleksine bağlanarak durdururlar. DNA harabiyeti durumunda P21, P53 geni tarafından, P27 ise TGF β (Transforming büyüme faktörü β) tarafından aktifleştirilirler. Tümör supressör gen olan P16/INK4a, CDK4'e bağlanarak

hücreyi G1'de arreste sokarken P14/ARF'de P53 proteinin degradasyonunu engeller (64).



Şekil 2.4. Hücre Siklusu Progresyonunda Retinoblastoma Proteinin (PRB) Rolü. Siklusun S fazına girebilmesi için siklin D1-CDK4, siklin D1-CDK6 ve siklin E-CDK2 kompleksleri tarafından fosforile edilmesi gerekir. Retinoblastoma fosforilasyonu sonucu E2F1-3 transkripsiyon faktörleri RB'dan ayrılırlar. Hücre siklusu progresyonu için gerekli genler aktifleşir ve S fazına geçilir (31).

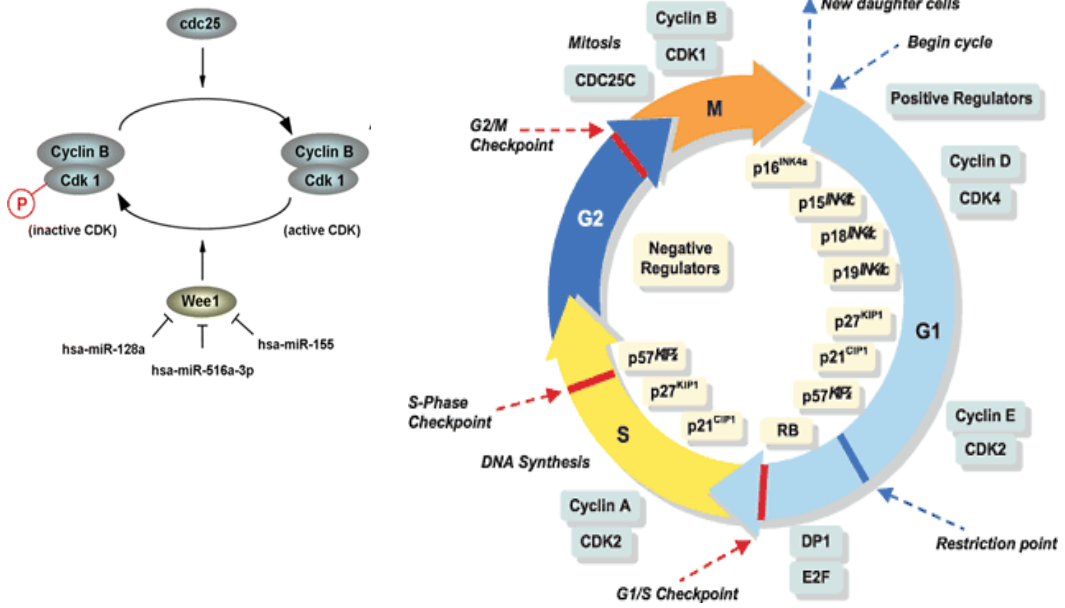
(http://www.nature.com/nrm/journal/v8/n8/fig_tab/nrm2223_F2.html'den alınmıştır)

Hücre döngüsünün en önemli kontrol noktalarından biri olan G1/S, G1 fazının sonunda S fazına girmeden hemen öncedir. Hücre bölünmeli mi, bölünme ertelenmeli mi ya da hücre arreste mi sokulmalı kararının verildiği noktadır. Bu kontrol noktası "restriksiyon noktası" olarak tanımlanır ve CKI-P16 (CDK inhibitör P16) tarafından kontrol edilir. Bu protein CDK4'e bağlanarak siklin D1 ile iletişimi engellenir. Hücre siklusu durur ve DNA tamir mekanizmalarının devreye girmesi için P53 düzeyi artar, P21 aktivasyonu sağlanır. G1 kontrol noktasında RB proteininin hiperfosforilasyonu önlenerek hücre döngüsünün ilerlemesi engellenir. Retinoblastoma fosforillenme/desforilize dengesizliği olduğunda G1-S fazları arasındaki geçişlerde hatalar

olduğundan hücre proliferasyonu bozulur. Pek çok kanser tipinde RB gen mutasyonları bildirilmiştir. Ayrıca siklin D1'in fazla eksprese olduğu durumlarda E2F aktifleşmesi sonrası RB inhibisyonunu sağlayan defosforillenme olmadığından hatalı S fazı geçişleri olmaktadır (15,21,47,64).

Hücre döngüsündeki diğer kontrol noktası G2/M geçişidir. Bu kontrol noktasından geçebilmek için, hücrenin mitozu hazır olduğunu gösteren tüm faktörler kontrol edilir. Hatalı G2/M kontrol noktası olan hücreler DNA tamiri yapılmadan mitozu girer dolayısıyla yavru hücrelerin ölümüne ya da mutant olmasına neden olur. G2/M geçişinde siklin B-CDK1 kompleksinin aktivitesi artar. Bu komplekse "mitozu ilerleten faktör" (MPF) de denir. Geç S fazında siklin B sentezlenmeye başlar ve sentez mitoz boyunca devam eder, bölünme tamamlanınca düzey hızla düşer. Bu düşüş aktif MPF oluşumu ve ikinci hücre bölünmesinin gerçekleşmesi için çok önemlidir. İnterfaz aşamasında siklin B sitoplazmadadır (15,47).

Mitoz başlangıcında siklin B, CDK1'e bağlanarak MPF kompleksini oluşturur. Siklin B-CDK1 kompleksi Wee1 proteini aracılığıyla gerçekleştirilen inhibe edici fosforillenme ile düzenlenir. Bu kompleksin CDK25C tarafından defosforillenmesi CDK aktivitesinin artmasına neden olur. DNA harabiyeti CHK'yı aktifleştirir ki bu da CDK25C'nin fosforile edilerek inaktif hale gelmesine neden olur. Bunun sonucunda siklin B-CDK1 kompleksinin inaktif hale gelmesine ve G2/M evresinde hücrenin arreste girmesini sağlar (26,49) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Hücre Siklusu Kontrolünde Siklin ve CDK'lar (26,27)

(<http://journals.prous.com> ve <http://jcem.endojournals.org/content/95/10/E181.full>' dan alınmıştır.)

Yukarıda ifade edildiği gibi siklin B-CDK1 kompleksi mitoze geçiş için temeldir. Mitoz bölünme sırasında kromozom segregasyonunun doğru olup olmadığını, metafazdan anafaza geçişi “spindle“ kontrol noktasında irdelenmektedir. Mitotik kontrol noktası olarak da ifade edilen bu aşamada iğ iplikciklerine tüm kromozomların uygun şekilde bağlanmaları kontrol edilmektedir. Kontrolden geçilmesi halinde anafaz aşaması gerçekleşmektedir. Metafazın başlaması, kromozomların hücrenin orta kısmında dizilmesi ve mikrotübüllerin kromozomların kinetokorlarına bağlanması ile karakterizedir. Her kromatidin kendi kinetokoru vardır ve kardeş kromatidlerin kinetokorlarını sarmalayan tüm mikrotübüller hücrenin zıt kutuplarına yayılır. Bu mikrotübüller kromozomları zıt kutuplara çekerlerken, kardeş kromatidler arasındaki kohezyon zayıflar ve ayrılmış kromatidler iğ iplikciği mikrotübülleri tarafından zıt kutuplara çekilirler. Kromatidlerin prematür gevşemesi, kromozom ayrılamamasına ve anöploidiye neden olur. Bu nedenle kontrol noktasının görevi, kardeş kromatidler ayrılmadan tüm kromozomların mikrotübüllere bağlı olup olmadığını belirlemektir (47,49).

İğ ipliği bağlanma noktası olan SAC (spindle assembly checkpoint), uygun bağlanmayan kinetokorlar tarafından üretilen bir sinyaldir. Prometafaz sırasında CDK20 ve SAC proteinleri kinetokorlarda yoğunlaşırlar. Bu proteinler doğru kinetokor-mikrotübül bağlantısı oluncaya kadar SAC'ı aktif halde tutarlar. SAC sinyalinden sorumlu proteinler arasında MAD2/MAD3 (mitotic arrest deficient), BUB3, CDK20, MAD1 ve Aurora kinaz B bulunmaktadır (49).

Bu kontrol noktalarında rol alan proteinlerin dışında, yapılan çalışmalarda hücre siklusunu kontrol eden başka proteinlerin de varlığı ortaya çıkmıştır.

2.4.5.1. Aurora kinazlar

Aurora kinazlar, hücre proliferasyonu için gerekli serin/treonin kinazlardır. Aurora kinazlar kromatid segregasyonunu kontrol ederek hücre bölünmesinde önemli rol oynarlar. Bugüne kadar memeli hücrelerinde üç tip aurora kinaz belirlenmiştir. Her üç tip kinazın mitotik regülatörler olarak belirlenmesiyle birlikte; pek çok kanserde ekspresyon düzeylerinin artması nedeniyle kanser araştırmalarında yoğun incelemeler yapılmaktadır (1).

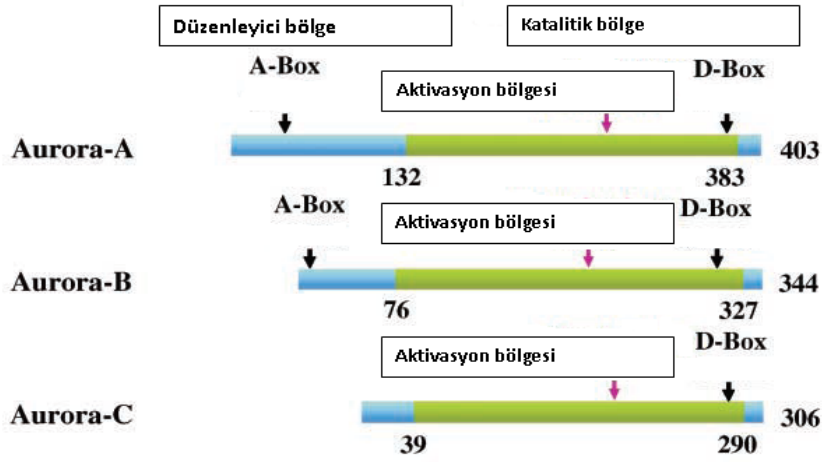
Yukarıda ifade edilen üç Aurora kinaz tipi şunlardır:

- 1)Aurora kinaz A (STK15/STK6/Aurora 2) : Mitoz bölünmenin profaz evresinde rol oynamaktadır ve sentrozomların doğru işlev göstermeleri ve mikrotübül oluşumu için gereklidir.
- 2)Aurora kinaz B (STK12/Aurora1) : Mitotik iğ iplikciğinin sentromere bağlanmasında görev almaktadır.
- 3)Aurora kinaz C (AURKC) : Germ hücre dizilerinde işlev göstermektedir ancak fonksiyonu hakkında henüz detaylı bilgi bulunmamaktadır (1, 2).

Aurora kinazlar iki ana domain içerirler :

- Amino terminalinde düzenleyici domain (A-box)
- Karboksil terminalinde katalitik domain (D-box)

Karboksil terminalinin, katalitik kısmında “aktivasyon bölgesi” bulunur. Amino terminalinde ise “düzenleyici bölge” bulunmaktadır. Düzenleyici bölge ve aktivasyon bölgesinden oluşan Aurora kinazların etkinliğinden “aktivasyon bölgesi“ sorumludur. Kinaz aktivitesi için, aktivasyon bölgesindeki treonin rezidüsünün fosforillenmesi gereklidir. Şekil 2.6’da görüldüğü gibi Aurora kinazların üçünde de katalitik aktivitede homoloji görülmektedir. Aurora kinaz A 403 aa (aminoasit), Aurora kinaz B 344 aa, Aurora kinaz C ise 306 aa içerir. Mutasyonlar veya bu kinazların aşırı ekspresyonları bu aktivasyon bölgesinde görülür (16,20,54).



Şekil 2.6. Aurora Kinazların Yapısı (20)

2.4.5.1.1. Aurora Kinaz A/ STK15/ STK6 geni

Aurora kinaz A (AURKA/STK6/STK15), 9 ekzonlu, 46 kilodaltonluk protein kodlayan, 403 aminoasitten oluşan ve DNA 'nın 22.8 kb'lık kısmını oluşturan mitotik sentrozomal proteini kodlayan bir gendir. Bu gen 20q13.31 bölgesine lokalizedir. Fonksiyonel genin kromozom 20'de ve psödogenin kromozom 1'de olduğu gösterilmiştir (2,25).

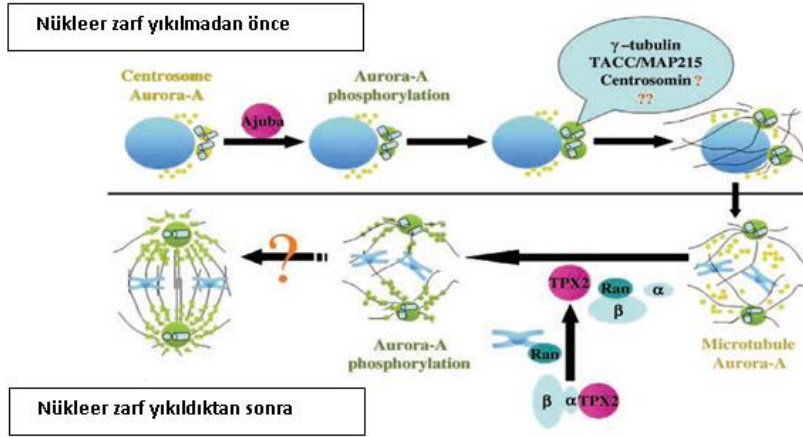
Aurora kinaz A normal hücrelerde, G1'den S fazına geçişte perisentriolar materyalde lokalizedir ve ekspresyonu minimaldir. Aurora kinaz A; sentrozom fonksiyonu ile ayrıca mikrotübül oluşumunda rol alır (1,2,34). G2 fazında, Aurora kinaz A önce perisentriolar materyalde bulunur ve Ajuba proteini denilen, JUB geni tarafından kodlanan, hücre çoğalma ve büyümesini kontrol eden bir protein tarafından aktive edilir ve ekspresyonu maksimum seviyeye ulaşır (24). Ajuba sentrozom fonksiyonunda gerekli bir proteindir. Sentrozom olgunlaşır ve geç G2 fazında AURKA, mikrotübül oluşumu yeteneğini artırır (50).

Nükleer zarf yıkılmadan önce aktif olan Aurora kinaz A; gama-tubulin, kinesin, sentrozomin gibi proteinlerle kompleks kurarak sentrozomun matürasyonunu sağlar (2,20). Mikrotübül oluşumundaki görevinde ise Aurora kinaz A, mikrotübüllerin proksimal sonlarındaki boşlukta bulunur ve Ran-iplikcik düzenleme yolağı ile ilişki kurarak aktifleşir. Ran, küçük bir GTP az'dır ve çoklu mitotik olaylara dahildir (20).

Aurora A ve TPX2 arasındaki ilişki Ran iplikcik yolağı ile keşfedilmiştir. Amino terminalde bulunan ve iğ iplikcik düzenleme faktörü olan TPX2 direkt olarak, karboksil terminalde bulunan Aurora A ile karşılıklı etkileşim halindedir (40) (Şekil 2.7).

Aynı zamanda, HURP bir Ran-importin-beta düzenleyicidir ve yine iğ iplikcik düzenlenmesinde görev alır. Bir düzenleyici olan HURP, mitotik iplikcikteki kromozomun proksimal sonunda konsantredir. Aynı zamanda kinetokor liflerini stabilize etmektedir ve normal inter kinetokor geriliminde umut vaat edici, kinetokoru etkin tutan bir proteindir (67). İğ iplikcik düzenlenmesi boyunca, RCC1 denilen iğ

iplikcik faktörü de yüksek konsantrasyonda bulunur (20). Şekil 2.7’de AURKA’nın sentrozomda ve mikrotübül düzenlenmesindeki rolü şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.7. Aurora Kinaz A'nın Rolü (20)

Mitotik siklus düzenleyicisi olan AURKA, tümör hücrelerinde sentrozom duplikasyonunun uyarılması, genomik düzensizliklerin oluşumu ve anöploidi ile ilişkilendirilmektedir. Sentrozomlar, replike olan kromozomların kardeş hücrelere eşit dağılımı, hücre bölünmesi boyunca bipolar iğ ipliklerinin kurulumu yoluyla genomik kararlılığı korumak için gereklidir. Kontrolsüz duplikasyonlar ile sentrozomların dağılımı, kromozom ayrılma düzensizliklerine neden olur. Aurora kinaz A'da olabilecek ekspresyon artışı sentrozom amplifikasyonlarına ve instabiliteye sebep olurken, Aurora kinaz A'nın inhibisyonu hücreyi G2/M fazında arreste sokarak, apoptozise neden olur (2, 20).

Tümör hücrelerinde, AURKA'nın normalin dışında fazla salınımı P53 fonksiyon kaybı mutasyonuna neden olur. Aurora kinaz A'nın aşırı ekspresyonu, P53'ün fosforilasyonunu önleyerek, MDM2 ile bağlı kalmasına, degrade olmasına yol açar ve P53 transkripsiyonu baskılanır, AURKA inhibe olduğunda ise apoptozis mekanizması çalışmaya başlar (2,36).

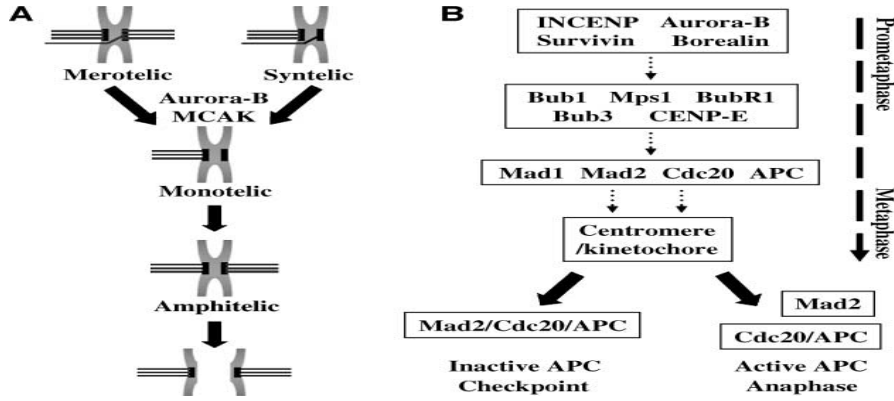
2.4.5.1.2. Aurora Kinaz B/ STK12 geni

Aurora kinaz B; 9 ekzonlu, 1287 baz çifti uzunluğunda, 344 aa'den oluşan, 39 kilodaltonluk protein kodlayan ve kromozom 17p13.1'de lokalize bir gendir. Bu gen normal hücrelerde, mikrotübül organizasyonundan sorumludur (2,28).

Profazdan metafaza, metafazdan anafaza ve sitokineze kadar kromozomu zenginleştiren, güçlendiren bir proteindir. Aurora B, nükleus içinde kalır ve metafazdan anafaza geçişte sentromerlerde lokalizedir. Aynı zamanda AURKB kromozom kondensasyonunda da görev alır ki bunu da histon H3'ü fosforile ederek yapar (2,20). Ayrıca Aurora B sentromerik MCAK (mitotic centromere-associated kinesin)'ı fosforile eder ve mitotik iğ iplikcik düzenlenmesi boyunca mikrotübül depolimerizasyonunu engeller (42).

Mitozda, eğer mikrotübül-kinetokor bağlanması bipolar biçimde ise Aurora B stabilizasyon için MCAK'ı fosforile eder. Diğer taraftan Aurora B tarafından MCAK fosforilasyonu iptal edilirse, mikrotübüller kinetokore bağlanmaktan kaçacaklardır (Şekil 2.8A). Aurora B, INCENP (inner centromeric protein), survivin, borealin proteinleri tarafından fosforillenerek aktive olur (2,20,42).

Kontrol noktası proteini olan MAD2 prometafazdan anafaza kadar kinetokorda bulunur ve iğ iplikcik kontrolünü aktive etmekte görevlidir (1). Aurora kinaz B ve MAD2, diğer kontrol noktası proteinleri (BUB1, BUB3, MAD1, BUBR1, MPS1, CENP-E) ile beraber kompleks halinde bulunarak iğ iplikcikleri ile sentromer-kinetokor bağlantısı doğru oluncaya kadar anafaza geçişi engellerler. MAD2 proteini, CDC20/APC kompleksi ile direkt etkileşim halinde olduğundan uygun bağlanma sağlanamadığı zaman bu komplekse bağlanarak APC'nin inaktif olmasına neden olur ve anafaza geçiş engellenir (Şekil 2.8B). Eğer doğru iğ iplikcik-sentromer/kinetokor bağlanması sağlandıysa MAD2 proteini, CDC20/APC kompleksine bağlanmayacağı için APC aktifleşir, anafaza geçiş sağlanır (20).



Şekil 2.8. Aurora Kinaz B Aktivitesi (20)

Aurora B kompleksinin temel yapısını oluşturan ve apoptozis inhibitörü olarak anahtar rol oynayan bir başka protein ise “survivin” dir. Survivin düzeyleri kanser ilerlemesi için prognostik bir belirteç olarak kullanılmaktadır. Survivin yokluğunda, kromozom segregasyonunda hata olmakta ve sitokinez başarıyla tamamlanamamaktadır (11). Aurora B sitokinezde de temel bir rol üstlenir. Aurora kinaz B, anafaz başladıktan sonra sitokinezde genetik materyalin yavru hücelere eşit şekilde dağılımını sağlar, Aurora'nin sitokinez ve mikrotübül organizasyonunda görevli substratları: düz kas hücresinde bulunan ve ara filament proteinleri olan desmin, histon H3, mezenkim hücrelerinde bulunan ve ara filament proteini olan vimentin, topoizomeraz 2, sentromerik protein A'dır (2,20,22,37).

Son yapılan çalışmalar ile; Aurora kinaz B ve P53 arasında indirekt olarak bir ilişki keşfedilmiştir. Histon asetil transferaz inhibitörü olan NIR (novel INHAT repressor) transkripsiyonel bir co-repressör olarak görev yapmaktadır. Aurora kinaz B'nin NIR bağlanma partneri olduğu ve bu sayede P53'ün aktivitesini çeşitli yollarla dolaylı olarak etkilediği görülmüştür. Bu mekanizma iki şekilde açıklanmaktadır:

Aurora kinaz B'nin overekspresyonu halinde NIR üzerinden P53'ün transkripsiyonel aktivitesi baskılanır. Aurora kinaz B'nin eksikliğinde ise yine NIR üzerinden P53-bağımlı apoptozise, P21 ve BAX'ın upregülasyonuna ve hücre büyümesinin bloklanmasına neden olur (68).

2.5. Aurora Kinazlar ve Tümörögenезis

Aurora kinazların çeşitli kanser türleri ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir:

Aurora Kinaz A ve kanser türleri: Meme kanserinde %94 overekspresyon %12 amplifikasyon, kolorektal kanserde %50 overekspresyon ve amplifikasyon, endometriyum kanserinde %56 amplifikasyon, özefagus kanserinde %68 oranında overekspresyon, gastrik kanserde; %29 amplifikasyon ve %44 overekspresyon, gliomalarda; %26-31 amplifikasyon ve %60 overekspresyon, karaciğer kanserinde; %3 amplifikasyon ve %61 overekspresyon, servikal kanserde overekspresyon ve amplifikasyon, over kanserinde %10-15 amplifikasyon ve %67 overekspresyon, pankreatik kanserde %56-93 oranında overekspresyon ve prostat kanserinde ise %98 overekspresyonu rapor edilmiştir (53).

Aurora Kinaz B ve kanser türleri: Meme, kolorektal, böbrek, akciğer, prostat, tiroid kanseri, lösemi ve beyin tümörlerinde overekspresyonları rapor edilmiştir (53). Aurora kinazların pre-klinik ve klinik olarak yapılan çalışmalarında kanser terapi de bazı Aurora kinaz inhibitörlerinin önemli olduğu vurgulanmıştır.

Pre-klinik ve klinik çalışmalarda Aurora kinaz inhibitörleri

- *Hesperadin: pre-klinik-* Aurora kinaz B aktivitesine spesifik bir inhibitördür. Histon H3 fosforilasyonunu düşürür. *MLN8054: Faz I-II-* Aurora kinaz A aktivitesine spesifik bir inhibitördür. İnhibisyon profili üzerinde yapılan çalışmalar halen devam etmektedir. *ZM447439: Faz I-* Hem Aurora kinaz A hem de Aurora kinaz B inhibitörüdür. Fosfo-histon H3 düzeyini düşürür ve iğ iplikciği kontrolünde hedeftir. Lösemi hücrelerini de apoptozise sürükler. *VX-680(MK-0457): Faz II -*Aurora kinazların her ikisinde, ATP bağlanma bölgesine uygun dizayn edilmiştir. Histon H3 fosforilasyonunu inhibe eder.

PHA-680632: *pre-klinik*-Aurora kinazların ortak inhibitörlerindedir. Henüz yapılan çalışmalarda Aurora kinaz B inhibisyonunu histon H3 fosforilasyonunu düşürerek yapan inhibitördür. *AZD1152*: *Faz I*-Aurora kinaz B için spesifik inhibitördür. Tubulin depolimerizasyon ajanı ve topoizomerez II inhibitörlüğü yapar. *SU6668*: Aurora kinazların her ikisinde ortak inhibitördür. Reseptör tirozin kinazlar olan VEGFR2, PDGFR-beta ve FGFR-1'ü inhibe eder. Yakın zamanda bu inhibitörün etkinliği üzerinde çalışmalar devam etmektedir. *AT9283*: *Faz I* klinik denemeler devam etmektedir (53).

2.6. Mesane Kanseri

Mesane kanseri genitoüriner yolun en sık görülen ikinci kanseridir. Yeni tanı konan kanser olgularının oranı erkeklerde %7 ve kadınlarda %3'tür. Mesane kanseri insidansı, endüstrileşmiş ülkelerde, Asya ve Afrika ülkeleri gibi az gelişmiş ülkelere göre daha yüksektir. Erkek/kadın oranı için uluslararası literatürde verilen oran 3/1, Türkiye'de 6-7/1'dir. Mesane kanserlerinde major prognostik faktörler, yayılım derinliği ve tümörün farklılaşma derecesidir. Genel olarak tümör rekürrens oranı %70 civarındadır. Rekürrent mesane tümörleri yüzeysel ise ancak %15 oranında yüksek evre ve dereceye göre ilerleme göstermektedir. Ortalama görülme yaşı erkeklerde 69, kadınlarda ise 71 olan üroepitelyal tümörlerin 60 yaşından sonra sıklığı giderek artar, 40 yaşından önce görülme oranı azdır ve genellikle iyi diferensiyedir. Tanı ve takipte; sistoskopi ve üriner sitoloji yerleşik yöntem olmasına rağmen, yanlış negatif sonuçlar doğurabileceğinden sistoskopi ve sitoloji ile beraber kullanılması önerilmektedir. Son yapılan çalışmalarda, sitoloji ve FISH kombinasyonunun özgüllüğü ve duyarlılığının daha yüksek olduğu vurgulanmıştır (2,18,57).

2.6.1. Mesane tanımı

Böbreğin süzdüğü idrarı içinde bir süre için biriktiren ve dışarıya atılmasını sağlayan, kas ve zarlardan yapılmış bir kesedir (3).

2.6.2. Mesane histolojisi

Mesane mukozası çok katlı değişken epitel ve bağ dokusunun yaptığı lamina propriadan oluşur. Çok katlı değişken epitelin yüzeyindeki hücrelerin kalın plaklardan oluşan özel bir membranı bulunur. Mesane kasıldığında membran ince bölümlerden katlanır ve kalın plaklar iğ şeklinde sitoplazmik veziküller oluşturacak şekilde içeri çöker. Bu veziküller boş mesanenin yüzeyinde bulunan hücrelerin sitoplazması içinde bu kalın plakların yerleştii depolar olarak iş görürken, dolu mesanede artan hücre yüzeyine yayılırlar (35).

2.6.3. Mesane tümörlerinin patolojisi

Mesane tümörlerinin %95'i üroepitelyal kaynaklıdır. Bunların da yaklaşık %90'ını oluşturan değişici epitel hücreli karsinom (DEHK) genellikle lümeneye doğru büyüyen papiller tümörlerdir (41,57). Nadir rastlanan epitelial tümörlerden olan adenokarsinom ve skuamöz hücreli karsinom, değişici hücreli karsinom (DEHK) ile bulunabileceği gibi yalnız başlarına da bulunabilirler. Mesanenin nadir rastlanan bu iki tümörünün seyri DEHK'dan daha kötüdür. Bu tümörler genellikle tanı anında ileri evreli, sağkalım oranı düşük tümörlerdir. Karsinoma in situ, yalnız başına veya yüksek derece DEHK ile birlikte bulunabilir. Klinik önemleri %40 oranında yayılım yapma potansiyellerinden kaynaklanmaktadır. Mesane kanserlerinin %80'i süperfisial mesane tümörü (Ta/Tis) olarak ortaya çıkmaktadır. Bu tümörlerin çoğu iyi diferansiyedir. Kötü diferansiye, geniş çoklu veya mesane mukozasının diğer bölgelerinde lokalize in situ kanserle birlikte olan süperfisial tümörler, tekrarlama ve invaziv kanser gelişme riski taşımaktadırlar (57).

2.6.4. Mesane kanseri evreleme

Mesane kanserlerinin evrelemesi tümörün mesane duvarına yayılım derecesi ile belirlenir. UICC'nin mesane kanserleri için düzenlediği TNM evreleme sistemine göre evre tiplendirmesine baktığımızda; (57)

T : Primer tümör

T0 : Tümöre ait delil yok

Ta : Non-invaziv papiller karsinom

Tis : Karsinoma in situ (Flat tümör)

T1 : Tümör subepitelyal konnektif dokuya invaze

T2 : Tümör kasa invaze **T2a** : Tümör süperfisial kasa invaze

T2b : Tümör derin kasa invaze

T3 : Tümör perivezikal dokuya invaze **T3a** : Mikroskopik

T3b : Makroskopik

T4 : Prostat, uterus, vajina, pelvik, abdominal duvar invazyonu

2.6.5. Mesane kanseri derecelendirme (Dünya Sağlık Örgütü-2004)

“Düşük derece” ve “yüksek derece” tümör olarak ikiye ayrılır: İki tümör grubunu birbirinden ayıran en önemli özellik olan progresyon, başlıca tümör evresi, derecesi ve büyüklüğü gibi kriterlerce belirlenir. Lamina propria yayılımı bir mesane tümörünün gösterebileceği ilk yayılım kademesini oluşturmakta ve tümör şiddetini yansıtmaktadır (57).

2.6.6. Mesane kanserinin biyolojik belirteçleri

Mesane kanseri tanısında çok sayıda biyolojik tümör belirteci tanımlanmış ve bunlar mesane kanserinin invaziv ve non-invaziv olarak doğru tanısında kullanılmak üzere geliştirilmişlerdir. Günümüzde birer belirteç olarak araştırmalarda ve bazı diagnostik analizlerde kullanılan genler ve etki alanları aşağıda belirtilmiştir:

Yüksek derece ve evreli mesane tümörleri ile EGFR ekspresyonu arasında bağlantı bulunmakla birlikte, EGFR ekspresyonu ileri evre hastalıkta doğal seyri etkiler.

Transmembran glikoprotein olan HER2/neu'daki ekspresyon artışı, ileri tümör evresi, tümör progresyonu, metastatik hastalık gelişimi ve yaşam süresinde azalma ile ilişkilendirilmiştir. Süperfisial mesane tümör dokularında H-RAS ve FGFR3 onkogenleri gibi fonksiyon kazandıran mutasyonlar, kromozom 9 delesyonu, 9q kaybı bu tip tümörlerde görülebilen anomalilerdendir. Yüzeysel mesane tümörlerinde P27 ekspresyonunun azalması hastalığın doğal seyrini etkilemektedir. Karsinoma *in situ* ve invaziv tümörler ise P53, RB, PTEN genleri gibi fonksiyon kaybettiren mutasyonlar ile karakterizedir. Mesane tümöründe MDM-2 gen amplifikasyonu nadir görülmesine karşın, bu genin mesane tümörlü hastalarda % 20-30 oranında aşırı ekspresyonu belirtilmiştir (57).

Tümör baskılayıcı gen olan TSC1 geni 9q34.1 bölgesinde lokalizedir ve süperfisial mesane tümörlerinde %10 oranında mutasyonu saptanmıştır. Bu genin ürünü olan "hamartin" AKT protoonkogenini fosforile ederek işlev görür. Papiller tümörlerde, tümör baskılayıcı gen olan PTCH geni (9q22) ve INK4A (9p21) genlerinin %40 oranında delesyonu görülmüştür. Mesane tümörlerinde DBCCR1 (9q33) delesyonları da %50 oranında görülmüştür. Mesane karsinomlarında süperfisial tümörlerde bir diğer belirteç ise KISS-1 denilen 1q32'de lokalize olan ve "metastaz baskılayıcı gen" olarak adlandırılan gendir. Bu genin düşük transkripsiyon düzeyleri prognostik açıdan önem taşımaktadır. Metastaz baskılayıcı KISS1'in ekspresyon paternleri; evre, derece ve sağkalım ile birliktelik içindedir. Siklusta görev alan TGF- β geninin ifadesindeki azalma yüksek derece tümörler ile birliktelik gösterir. Aynı zamanda TGF- β reseptörlerindeki ifade azalması da lenf nodlarında yüksek evre ve derece ile ilişkilidir (13).

Mitotik siklusta proliferen olan hücrenin çekirdeğinde bulunan ve G1'den mitozaya gidişi sırasında düzeyi artan Ki-67 (MKI67) antijeni nükleer bir proteindir. Dokudaki bu antijen, Ki-67 (MIB-1) antikoru kullanılarak immunohistokimyasal yöntemlerle saptanmaktadır. Mesane tümöründe Ki-67 ekspresyonunu artması, hastalığın progresyonu hakkında etkin bir belirleyici olarak kullanılmaktadır (57).

İdrar sedimentinde anormal hücrelerin saptanması ile mesane kanserinin tanısı da yaygınlaşmıştır. İdrar örneğinin non-invaziv şekilde toplanabilmesi, neoplastik hücrelerin kohezyon kaybı sonucu dökülmesi, bu incelemenin mesane kanseri tanısında nispeten daha kolay olmasını sağlamıştır. Bugüne kadar idrarda ve/veya mesane yıkama örneklerinde kanser tanısı için değerlendirilen biyolojik belirteçler şunlardır:

Survivinin idrarda ekspresyonu görülmekle birlikte; tümör rekürrensi, evresi ve progresyonu ile birliktelik içindedir (63). Son literatürlere göre survivinin duyarlılığı %64-%94, özgüllüğü %93-%100 görülmüştür (63,66). Nükleer matriks proteini olan BCLA-4'ün idrarda saptanmasında duyarlılığı %80, özgüllüğü % 87'dir (51). Hiyalüronik asit; tümör hücre adhezyonu, proliferasyon, migrasyon ve anjiogenezisi regüle etmesi ile bilinen doku matriksinin bir komponentidir. Mesane tümör hücrelerinde fibroblastlar tarafından hiyalüronik asit üretimi de indüklenir. Lokeshwar ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada mesane kanserinde hiyalüronik asit oranının arttığını saptamışlardır. Nükleer matriks protein 22 (NMP-22) ise, mitoz regülasyonunda önemli bir proteindir ve NMP-22 testinin ise %70-75 duyarlılık/özgüllük oranı vardır (45,57).

Aynı zamanda yapılan bir çalışmada mesane kanserli olgulardan alınan idrar örneklerinde üç epigenetik biyomarker (GDF15, TMEFF2, VIM) tanımlanmıştır. İdrar örneklerinde bu genlerin metilasyon düzeylerinin normal mesane mukozalarından alınan örneklere oranla belirgin derecede yüksek bulunduğu bildirilmiştir (14). Yine yapılan bir çalışmada ürotelyal mesane karsinomlu olgulardan alınan idrar örneklerinde miR-96 ve miR-183'ün farklı upregülasyonları görülmüştür. Sitolojik incelemeleri negatif olan bu olguların %61'in de miR-96 ekspresyonunda artış saptanmıştır. Bu miRNA'ların potansiyel tümör markerleri olabileceği vurgulanmıştır (9,69).

2009 yılında yapılan bir çalışmada: 9p21 lokusunun delesyonu, erken evre ürotelyal karsinomalarda saptanmış, rekürrens ile ilişkilendirilmiştir ve marker olabileceği belirtilmiştir (38). Yine yapılan bir çalışmada mesane kanserli olgulardan alınan yıkama sıvılarında P53 gen mutasyonlarının saptandığı da bildirilmiştir (59). 2006 yılında Schuldtz ve ark. nın yaptığı çalışmada; mesane yıkama sıvısında Ki-67

(MKI-67) ve survivinin mRNA ekspresyonundaki artışların marker olabileceği üzerinde durulmuştur (61).

Mesane kanserinde gerek tümör dokusu gerek yıkama sıvısı ve idrar örneklerinde yapılan çalışmalarda mesane karsinogenezini aydınlatmayı amaçlayan araştırmacılar Aurora kinazlarla yaptıkları çalışmalarda çeşitli verilere ulaşmışlardır:

Ürotelyal mesane karsinomlu olgularda yapılan bir çalışmada Aurora kinaz A overekspresyonu, kötü prognoz ve tümör derecesi ile ilişkilendirilmiştir. Tümör progresyonunu saptamada Aurora kinaz A protein ekspresyon düzeyleri ile tümör derecesinin bağımsız faktörler olabileceği üzerinde durulmuştur. Düşük dereceli olgularda %35, yüksek dereceli olgularda ise %65 oranında AURKA ekspresyonu saptanmıştır (52). Bildirilen başka bir araştırmada tümör örneklerinde İHK analiz ile AURKA aşırı ekspresyonu ile tümör derecesi arasındaki bağlantı ortaya konmaya çalışılmıştır. Evresi Ta olan tümörlerde tümörün rekürrens riskinin %90.2, AURKA'nın rekürren tümörlerin tanısı için duyarlılığının yüksek olduğu bildirilmiştir. Aurora kinaz A ekspresyonunun özellikle rutin kontrollerde önemli bir belirteç olabileceği ortaya atılmıştır (12).

Yapılan bir çalışmada AURKA amplifikasyonu ve overekspresyonunun mesane karsinogenezi ile birlikteliği ortaya konmaya çalışılmış, tümör dokuları, idrar sedimentleri ve yıkama sıvılarında yapılan bu çalışmada AURKA'nın potansiyel biyomarker olabileceği belirtilmiştir (58). Farklı tümör derecesi ve evresine sahip mesane kanserli olgulardan alınan dokularda yapılan ekspresyon çalışmasında, AURKA ve AURKB genlerinin protein ekspresyonları ile tümör derecesi ve evresi arasındaki ilişki saptanmaya çalışılmış, Aurora kinazlardaki overekspresyon ile tümör derece ve evresi arasında bağlantı olduğuna ilişkin bilgilere ulaşılmıştır (8). Süperfisial mesane tümöründe İHK yöntem kullanılarak, AURKA ve AURKB ekspresyon düzeyi ile tümör rekürrensi arasındaki ilişkiyi saptamak amacıyla yapılan başka bir çalışmada, Aurora kinaz B'nin tümörlerde yüksek ekspresyonunun rekürrense sebep olabileceğini bildirmişlerdir (7). İmmunohistokimyasal analiz ile Aurora kinaz B protein ekspresyonu %57,5 oranında bulunurken, Aurora kinaz A protein ekspresyonu %69,9 olarak

saptanmıştır. Aurora kinaz A ve Aurora kinaz B ekspresyon düzeyleri ile tümör rekürrensi arasında anlamlı bir ilişki bulunmuş ve bu genlerin ekspresyon düzeylerinin rekürren tümörlerde belirteç olabileceği belirtilmiştir (7).

2.6.7. FISH (Floresan In Situ Hibridizasyon) ve mesane kanseri

Nükleik asit moleküllerinin komplementer dizileri ile eşleşme eğiliminde olmaları çeşitli hibridizasyon yöntemlerinin gelişmesini sağlamıştır. Hibridizasyon, solüsyon içerisindeki (in vitro) hücre/nükleik asit veya hücre ya da dokuların kendi ortamlarında (in situ) gerçekleştirilir. FISH, nükleik asit problemlerinin sitolojik, hücresel veya kromozom preparatlarındaki denatüre edilmiş RNA veya DNA hibridizasyonuna dayanan moleküler bir tekniktir (5).

Mesane kanserlerinde FISH tekniği genetik değişiklikleri belirlemede etkin bir yöntemdir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda süperfisyal mesane kanserli hastalarda FISH yönteminin faydalı olduğu gösterilmiştir. Interfaz nükleuslarında yapılabilmesi, hücrelerin morfolojik yapılarının stabilliğini sağlayarak kendi ortamlarında analizlerinin gerçekleştirilebilmesi özellikle kanser genetiğinde büyük fayda sağlamaktadır. Klonal farklılıkları belirlemede tek hibridizasyon yöntemidir. Bu nedenle özellikle 1990'lı yıllardan itibaren tanı ve araştırma amaçlı yaygın kullanım alanı bulan bu teknik pek çok kanser tipinde de yoğun olarak kullanılmaktadır. Bu kanser tiplerinden biri olan mesane kanserlerinde de FISH tekniği genetik değişiklikleri belirlemede etkin bir yöntemdir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda süperfisyal mesane kanserli hastalarda FISH yönteminin uygun biyomarkerlerin kullanılması şartıyla tanıda sitoloji ile birlikte faydalı olduğu gösterilmiştir (23). Bu yöntemin avantajlarına bağlı olarak non-invaziv ya da yarı invaziv yaklaşımlarla sağlanan biyolojik materyallerde de analiz olanağı doğmaktadır.

2000 yılında yapılan bir çalışmada; 280 idrar örneğine FISH ve sitoloji yapılmış, FISH'in rutin sitolojiye göre duyarlılığı karşılaştırılmıştır. FISH'in duyarlılığı %81, rutin sitolojinin duyarlılığı %59 olarak belirtilmiştir (6). Bu çalışma göstermiştir ki FISH'in sitolojiye göre duyarlılığı belirgin bir şekilde yüksektir. Sitoloji, düşük derece

papiller lezyonları tanımlamada yeterli olamamakta, tüm ürotelyal karsinomları saptayamamakta, özellikle yüksek derece ürotelyal karsinomlar için %90'lık bir duyarlılık gerekmektedir (45).

Mesane tümörlerinde FISH analizinin tanı, rekürrens, progresyon ile ilişkisinin kurulduğu çalışmalar bulunmaktadır: Degtyar ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada; tümör dokularında FISH yöntemi kullanarak kromozom 7 ve 9 polizomileri saptamışlar, yüksek dereceli tümörlerle birliktelik içinde olduğunu belirtmişlerdir. Aynı çalışmada kromozom 9 monozomisi FISH ile %17,6 oranında gözlenmiş, kromozom 9 kayıplarının ise mesane karsinogenezini aydınlatılabileceğini bildirmişlerdir (18). Başka bir çalışmada, kasa invaziv olmayan mesane kanserlerinde FISH yönteminin rekürrens ve progresyon riskini saptamada etkin bir yöntem olduğu vurgulanmış, kromozom 3, 7, 17 ve lokus 9p21 bölgeleri 126 tümör dokusunda incelenerek, FISH paternleri tanımlanmıştır. Tümör rekürrensi ve progresyon riskinde FISH yönteminin yardımcı olabileceğini belirtmişlerdir (48). Lopez ve arkadaşlarının 2010 yılında yaptıkları çalışmada ise, karsinoma in situ tanısı konan olgulardan alınan tümör örneklerinde FISH yöntemi ile Cyclin D3 geni amplifikasyonu saptanmış, tümör rekürrensi, progresyon ve sağkalım ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (46).

Mesane kanserlerinde invaziv özellik gösteren tümörlerin erken tanılarının biyolojik markerlerle belirlenebilme, tümör derecesi ve evresi ile prognoz verilerine ulaşabilme arayışlarında Aurora kinaz A ve Aurora kinaz B genlerinin kopya sayıları açısından rollerinin olup olmadığını belirlemek amacıyla planlanan araştırmamızın ilk aşamasında mesane kanserli olgulardan alınan tümör örneklerinde Aurora kinaz A ve Aurora kinaz B gen kopya sayıları ile hücrelerin ploidi özellikleri FISH yöntemiyle analiz edilmiştir.

3. GEREÇ ve YÖNTEMLER

Çalışmamızda mesane tümör örneklerinde AURKA ve AURKB gen kopya sayısı değişiklikleri floresan in situ hibridizasyon yöntemiyle (FISH) incelenmiştir. Çalışmamızda kullanılan gereçler aşağıda listelenmiştir:

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan gereçler

Buzdolabı (Arçelik 415)	Deep-Freeze (Heraeus)
Etüv (Friocell MMM Med Center)	Floresan mikroskop (Olympus BX-61)
Image Analyser (Applied Imaging)	Su banyosu (Nüve)
Mikropipet (Eppendorf)	Vortex (Janke and Kunke1, UF-2)
Pipet uçları	Beher (500 ml, 1000 ml)
Penset	Mezür, pH Metre (Jenco)
Kronometre	Ependorf tüpü (1,5 ml lik)
Enjektör (2'lik, 5'lik, 10'luk)	Termometre
Cam kalemi	Steril penset ve makas
Mikrosantrifüj (Eppendorf Centrifuge 5415)	
Elektronik terazi (Seuter, Ainworth-AA-250, Setra-M2000L)	

3.1.2. Cam malzeme

Beher (500 ml, 1000 ml)
Mezür, Cam pipet, Lam, Lamel
Küçük ve büyük petri kabı
Yatay ve dikey Şale

3.1.3. Kimyasal maddeler

Saf Alkol (Merck)	Antifade (Vector)	DAPI (Sigma)
İmmersiyon yağı (Merck),	HCl (Merck),	Distile Su
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ .2H ₂ O(Carlo Erba)	NaCl (Merck),	Asetik asit
NaOH (Merck),	Pepsin (Sigma),	Parafilm
Tween 20 (Sigma),	SSC (sodyum salin sitrat)	RPMI 1640
Rubber Cement (Marabu Fixo gum)	Tripsin EDTA(PAA Lab)	(Bio. Indust.)

3.1.4.Kullanılan problar

Çalışmamızda AURKA ve AURKB lokuslarına spesifik FISH probları kullanılmıştır. Ayrıca tümör örneklerindeki poliploidi tanısına yardımcı olması amacıyla kromozom 8 ve kromozom 12'ye spesifik sentromer probları (Abbott) doku örneklerine uygulanmıştır. Aurora kinaz A ve Aurora kinaz B lokuslarına spesifik olan problarda ayrıca ilgili kromozomlara ilişkin sırasıyla, lokus spesifik ve sentromer kontrol probları da farklı florokromlarla işaretli olarak bulunuyordu:

LSI AURKA 20q13 Spectrum red /20q11 Spectrum green Dual Color Prob
(Kreatech Cat.# KI-10721)

LSI AURKB 17p13 Spectrum red /Cep 17 Spectrum green Dual Color Prob
(Kreatech Cat.# KI-10722)

Cep 8 (D8Z2) Spectrum green probe (Cytocell/ Cat.# LPE008R/G)

Cep 12 (D12Z3) Spectrum red probe (Qbiogene/ Cat.# PSA T0012-R5)

3.2. Yöntem

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı ve Eskişehir Yunus Emre Devlet Hastanesi Üroloji servisinden gelen mesane kanseri tanısı almış 29 olgudan alınan tümör örnekleri AURKA ve AURKB genleri açısından değerlendirilmiştir.

3.2.1. Materyal alımı

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı ve Eskişehir Yunus Emre Devlet Hastanesi Üroloji servisinden gelen mesane kanseri tanısı almış 29 olgudan alınan tümör örnekleri transport besiyeri içerisinde Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na ulaştırılmıştır.

3.2.2.Moleküler sitogenetik analiz

3.2.2.1.Direkt doku preparasyonu

Direkt doku preparasyonunun hazırlanmasında; Levy ve arkadaşlarının uyguladığı protokol modifiye edilerek çalışmamıza uyarlanmıştır (44).

- Transport medium içine konulmuş mesane tümörü doku örnekleri birkaç kez transport medium ile yıkanmıştır.

- Daha sonra doku örnekleri steril küçük boy petri kabına aktarılmış ve mekanik olarak küçük parçalara ayrılmıştır.

- Doku örneklerinin bulunduğu petri kabına 37°C'deki Tripsin EDTA solüsyonundan 2 ml eklenerek 25-30 dk etüvde bekletilmiştir.

- Süre sonunda enzimatik olarak da parçalanan hücre süspansiyonu cam pipetle ekim tüpüne aktarılıp üzerine 3 ml besi yeri eklenmiştir ve santrifüj edilmiştir

- Santrifüj sonrası süpernatant pipet ile ortamdaki uzaklaştırılmış, tüplere 4'er ml taze hazırlanmış Carnoy fiksatif eklenip, pipetaj yapılmış ve santrifüj edilmiştir

- Fiksatif ortamdaki uzaklaştırılmış ve iki kez daha fiksatif işlemi tekrarlanmıştır.

- Son fiksatif ortamdaki uzaklaştırıldıktan sonra hücre süspansiyonuna taze hazırlanmış %70'lik asetik asit solüsyonundan 2 ml eklenip 7 dakika kadar hücreler bu solüsyonla muamele edilmiştir.

- Süre sonunda parçalanmış dokulardan temiz lamaların üzerine birkaç damla damlatılarak dokular bir bent pipet yardımıyla aşağı yukarı hareket ettirilerek yayılmıştır.

- Hazırlanan preparatlar 1 gece oda ısısında bekletilerek hücrelerin yaşlanması sağlanmıştır.

3.2.2.2. FISH tekniğinin uygulanması

Floresan in situ hibridizasyon tekniğinde preparat ön yıkama, denatürasyon, hibridizasyon ve post-hibridizasyon aşamalarında Stedum ve arkadaşları tarafından kullanılan protokol laboratuvar şartlarımıza uygun hale getirilerek uygulanmıştır (65).

Kullanılan stok ve çalışma solüsyonları aşağıda tablolar halinde verilmiştir (Tablo 3.1 – 3.4)

Tablo 3.1. Carnoy's Fiksatif Solüsyonu ve Preparatların Ön Yıkama Solüsyonları

Metanol	3 birim
Asetik asit	1 birim
20XSSC Solüsyonu	
NaCl (3 M)	175,3 gr
Tri Sodyum Sitrata (0,3 M)	88,24 gr
Distile su	1000 ml
0,1XSSC Solüsyonu	
20XSSC	3 ml
Distile su	597 ml

Tablo 3.2. Preparatların Denatürasyon Solüsyonu

0.07 M NaOH		
1 M NaOH		14 ml
Distile su		200 ml

Tablo 3.3. Hibridizasyon Sonrası Solüsyonlar

1XSSC Solüsyonu		
20XSSC		10 ml
Distile su		190 ml
2XSSC Solüsyonu		
20XSSC		20 ml
Distile su		180 ml
2XSSC/Tween-20 Solüsyonu		
20XSSC		20 ml
Tween 20		100 µl
Distile su		180 ml
Tüm solüsyonlar HCl ile pH 7.0 a ayarlanır.		

Tablo 3.4. Görüntüleme Sistemleri Solüsyonu

DAPI/Antifade solüsyonu	
2XSSC	20 ml
DAPI	100 µl
Distile su	80 ml

3.2.2.2.1. Preparatların ön yıkaması ve denatürasyonu

Spesifik nükleik asit sekanslarını belirlemek ve problemlerin hedeflerine en optimal şartlarda ulaşabilmeleri için prob DNA'sının yoğun biyolojik yapıların içerisine girmeleri gereklidir. Bu nedenle mateyal ön yıkamadan geçirilmelidir.

Preparatlar birer dakika olmak üzere sırasıyla %100-%70-%50-%30 luk alkol serilerinden ve sonra da 0.1XSSC solüsyonundan geçirilerek dehidre edilmiştir.

Preparatlar 70°C deki 2XSSC solüsyonunda 30 dakika inkübasyona bırakılmışlardır.

İçerisinde preparatların bulunduğu 2XSSC solüsyonu içeren şale soğuk su içerisine konulmuş ve solüsyon ısısının 37 °C'ye gelmesi sağlanmıştır.

Sıcaklığı 37 °C'ye düşen 2XSSC içerisindeki preparatlar oda sıcaklığında bulunan 0.07 M lık NaOH solüsyonuna alınmış ve denatürasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

Denatürasyonu takiben preparatlar oda sıcaklığında bulunan 0,1XSSC ve ardından +4 °C’de olan 0,1XSSC ve 2XSSC solüsyonlarında birer dakika bekletildikten sonra, sırasıyla %30-%50-%70-%100’lük alkollerde birer dakika tutularak rehidre edilmişlerdir.

3.2.2.2.2. Prob denatürasyonu

Kullandığımız problemlerin uygulanmasında üretici firmanın önerdiği yöntem kullanılmıştır. Problemler 10 dakika 78 °C de bekletilerek denatüre edilmişlerdir.

3.2.2.2.3. Hibridizasyon

Problun bulunduğu ependorf tüpü santrifüj edilerek tüm problun dibine çökmesi sağlanmıştır. Denatüre edilen preparatlarda belirlenen alana prob eklenmiş ve üzerlerine 24x24 mm’lik lamel kapatılmıştır. Lamel çevresi su girmemesi için rubber cement ile yalıtılmıştır. Preparatlar 37 °C’de iki gece nemli ortamda hibridizasyona bırakılmıştır.

3.2.2.2.4. Hibridizasyon sonrası yıkamalar

Bu yıkamalarda spesifik olarak bağlanmayan prob DNA’sının ortamdaki uzaklaştırılması ve olgu DNA’sına tam komplementer olan (%80–100) dizilerin hedef bölgede sabit hale getirilmesi amaçlanmaktadır.

-Hibridizasyonu tamamlanan preparatlar etüvden çıkartılarak lamellerin çevresindeki yalıtım maddesi dikkatlice temizlenmiştir.

-Preparatlar, oda ısısındaki 2XSSC solüsyonunda hafifçe karıştırılarak lameller preparatlardan uzaklaştırılmıştır.

-Preparatlar 74 °C ısıya ulaşmış 1XSSC solüsyonunda 7-8 dakika bekletilmiştir.

-Takiben preparatlar 2XSSC/ Tween 20 solüsyonunda 5 dakika yıkanarak spesifik olmayan bölgelere bağlanmış floresan prob artıklarının preparatlardan uzaklaştırılması sağlanmıştır.

3.2.2.2.5. Hibridize olan bölgelerin görüntülenmesi

Bu aşamada prob ve nukleus DNA sının hibridize olduğu bölgelerin görünür hale getirilmesi amaçlanmaktadır.

Hibridizasyon sonrası yıkamaları yapılan preparatlar 4XSSC/DAPI solüsyonunda 2 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda 15 µl antifade eklenmiş ve lamel ile kapatılmıştır. Mikroskopik analize kadar preparatlar -20°C de ve karanlıkta bekletilmişlerdir.

3.2.2.2.6. Preparatların mikroskopta incelenmesi

Preparatlar Olympus BX-61 Floresan mikroskobunda uygun filtrelerle incelenmişlerdir. Floresan mikroskoba bağlı yüksek rezolüsyonlu kamera ve görüntü analiz sistemi (Applied Imaging Cytovision 3.93) aracılığıyla her olguya ilişkin FISH analiz verileri detaylı olarak incelenmiş, fotoğraflanmış ve arşivlenmiştir.

3.2.2.2.7. Değerlendirme

Tümör örneklerinin AURKA ve AURKB genlerine spesifik problemler ile hibridizasyonu sonrasında ilgili gen ve sentromerlere özgü sinyal fenotipleri her hücrede ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Her olguda her prob için kriterlere uygun olan 100-150 hücre değerlendirilmiştir. Rastgele seçilen objektif alanlarında normal ve atipik sinyal fenotipine sahip hücreler analiz edilmiştir. Problemlere spesifik floresan ışıklı sinyaller değerlendirilirken birbirine çok yakın olup tek/çift sinyal ayırımı yapılamayan sinyallere sahip hücreler ile sinyal çap büyüklüğü birbirlerinden farklı olan (iki katı ya da daha fazla) sinyallere sahip hücreler değerlendirilmeye alınmamışlardır.

Yaptığımız bu çalışmada, AURKA ve AURKB gen kopya sayısı değişikliklerinin yanı sıra CEP 8 ve CEP 12 problemleri de uygulanmış ve bu problemlere özgü sinyal fenotipleri değerlendirilmiştir. Hücrelerde triploidi, tetraploidi ve >4 hücrelerin tanılarının konmasında kromozom 20, 17, 8 ve 12'ye ait sinyal sayıları kullanılmıştır. Bu poliploidik olan hücreler sinyal sayılarına göre triploidi, tetraploidi ve >4n grubu olarak değerlendirilmeye alınmışlardır.

Çalışmamızda, AURKA ve AURKB genlerinin kopya sayısı değişimleri aşağıda belirtilen altı grupta değerlendirilmiştir.

Örnekler AURKA geni için:

- i) Normal (2 sinyal),
- ii) Düşük amplifikasyon (3-4 sinyal),
- iii) Yüksek amplifikasyon (>4 sinyal),

AURKB için delesyon (< 1),

Kopya sayısı değişiklikleri:

- i) Triploidi (20, 17, 8 ve 12 spesifik sinyaller için üçer sinyal),
- ii) Tetraploidi (20, 17, 8 ve 12 spesifik sinyaller için dörder sinyal) ve
- iii) $> 4n$ grubu (20, 17, 8 ve 12 spesifik sinyaller için ≥ 5 sinyal)

Örneklere tanı koymak için eşik değer hesaplaması yapılmıştır: Bu hesaplama kullanılan tüm hedef gen ve sentromer bölge problemlerinin kesim noktası değerlerine göre yapılmıştır. Kesim noktaları ROC eğrisi yöntemi kullanılarak belirlenmiştir.

Hücrelerin;

- % 3,54 ünde 3-4 AURKA gen kopyası bulunması durumunda düşük amplifikasyon (+),

- % 3,13 ünde >4 AURKA gen kopyası bulunması durumunda yüksek amplifikasyon (+),

- % 1,59 unda < 1 kopya bulunması durumunda delesyon (+),

- Hücrelerin % 2,27' ün de kopya sayısı artışı 3 ise triploid (+)

- Hücrelerin % 3,79' ün de kopya sayısı artışı 4 ise tetraploid (+)

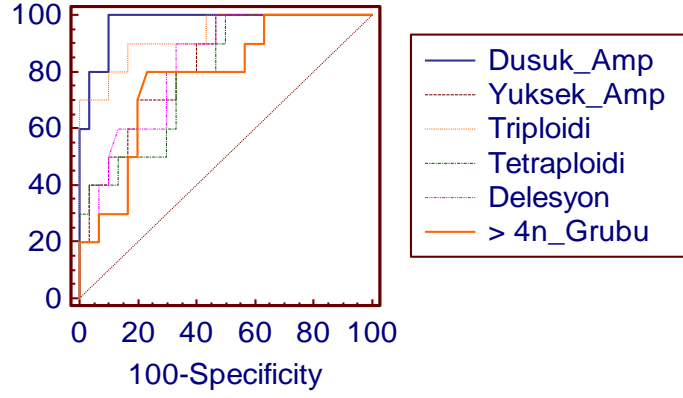
- Hücrelerin % 1,75' ün de kopya sayısı artışı ≥ 5 olması durumunda ise

“ $>4n$ grubu” anomalileri olarak adlandırılmış ve FISH pozitif olarak değerlendirilmiştir.

3.2.3. İstatistiksel analiz

Çalışmamızda SPSS 15.0, MedCalc versiyon 10.2 ve Sigma Stat programları kullanılmıştır. Hastaların yaş, tümör dokularının evre ve derece durumu ile çalışmada saptanan gen amplifikasyonları, sayısal kromozom anomalileri ve delesyonlar arasındaki ilişki araştırılmıştır. Olguların amplifikasyon, sayısal kromozom anomalileri ve delesyon bulguları tümör derecesi ve evresi ile ilişkilendirmesi Fischer Exact Ki-Kare testi ile yapılmıştır. Olgulardaki amplifikasyon, sayısal kromozom anomalileri ve delesyon bulgularının yaş ile ilişkilendirilmesi ise Spearman Ki-Kare testi kullanılarak yapılmıştır. Sürekli verilerin değerlendirilmesinde ort \pm standart sapma değerleri verilmiştir. İstatistik olarak anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edilmiştir.

Kesim noktalarının (cut-off) amplifikasyon, sayısal kromozomal anomaliler ve delesyonlar için belirlenmesi ise MedCalc programında ROC (receiver operating characteristic) eğrisi yöntemi ile belirlenmiştir. Şekil 3.1’de çalışmamıza ait anomalilerin kesim noktalarının belirlendiği ROC eğrisi verilmiştir. Her iki prob ile kontrol problemlerinin normal olduğu bilinen örneklerdeki sinyal fenotipleri temel alınarak eşik değer hesaplamaları yapılmıştır.



Şekil 3.1. Çalışmamıza ait Anomalilerin Kesim Noktalarının Belirlendiği ROC Eğrisi

ROC eğrisi, bir tanı testine ilişkin duyarlılık ve özgüllük değerleri arasındaki ilişkiyi grafiksel olarak gösteren bir eğridir. ROC eğrisi, doğru pozitif orana (duyarlılık) karşın yanlış pozitif oranların (1- özgüllük) noktalanarak çizilmesiyle elde edilen bir grafik olup bu eğriyi oluşturmak için her bir kesim noktası için duyarlılık ve özgüllük değerlerinin belirlenmesi gerekmektedir (17).

4. BULGULAR

Çalışmamızda Ocak-Kasım 2010 tarihleri arasında Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı ile Yunus Emre Devlet Hastanesi Üroloji kliniğinde mesane kanseri tanısı alan ve opere edilen 28 olguya ilişkin 29 tümör örneği ve kontrol grubunu oluşturan on normal mesane dokusu örneği AURKA ve AURKB geni kopya sayıları ile poliploidik ve anöplodik hücre dağılımları açısından değerlendirilmiştir. Olgularımızdan bir tanesinde kısa süre içerisinde nüks gözlenmesi nedeniyle bu olgudan iki doku örneği de çalışmaya dahil edilmiştir.

Çalışmaya dahil olan mesane kanseri tanısı almış olguların yaş, tümör tipi, tümör evre ve tümör derecelerine ilişkin verileri hasta dosyalarından temin edilmiştir. Araştırma grubunu oluşturan 28 olgunun yaş ortalaması 65 ± 1.2 , kontrol grubuna dahil edilen on bireyin yaş ortalaması ise 49 ± 1.4 idi.

Tablo 4.1'de görüldüğü üzere, olguların başvurularında belirlenen ön tanıları değerlendirildiğinde 9 olgunun hematüri, geri kalan 19 olgunun ise malign mesane neoplazisi olduğu saptanmıştır.

Cerrahi rezeksiyon sonrası yapılan histopatolojik değerlendirmede ise tümörlerin 28 tanesi ürotelyal karsinom (değişici epitel karsinom), bir tanesi ise invaziv ürotelyal karsinom olduğu belirlenmiştir. Tüm tümör örneklerinin 20 tanesi düşük, 9 tanesi ise yüksek dereceli tümördü. Tümör evreleri ise 18 tane Ta, 10 tane T1, bir tane ise T2 olarak raporlandırılmıştır. Nüks eden olguya ait gelen iki tümör örneğinde; ilk gelen örnek Ta evrede iken, aynı olguya ait ikinci tümör örneğinde evre T2 olarak belirtilmiş ve araştırma grubumuza bu örnekte dahil edilmiştir.

Tablo 4.1. Mesane Kanserli Olguların Yaş, Ön Tanı, Tümör Tipi, Tümör Evre ve Derece Bilgileri

Hasta No	Yaş	Ön tanı	Tanı	Tümör Derecesi	Tümör Evresi
1/ Örn 1*	79	Hematüri	Ürotel.kars.	düşük	Ta
1/ Örn 2*	79	Malign neopl.	İnvaziv Ürotel.kars.	yüksek	T2
2	52	Hematüri	Ürotel.kars.	düşük	T1
3	71	Malign neopl.	Ürotel.kars.	düşük	Ta
4	68	Malign neopl.	Ürotel.kars.	düşük	T1
5	69	Malign neopl.	Ürotel.kars.	düşük	T1
6	61	Malign neopl.	Ürotel.kars.	düşük	Ta
7	61	Malign neopl.	Ürotel.kars.	yüksek	Ta
8	75	Malign neopl.	Ürotel.kars.	yüksek	Ta
09	52	Hematüri	Ürotel.kars.	düşük	T1
10	39	Hematüri	Ürotel.kars.	düşük	T1
11	78	Malign neopl.	Ürotel.kars.	düşük	Ta
12	68	Malign neopl.	Ürotel.kars.	yüksek	T1
13	63	Malign neopl.	Ürotel.kars.	yüksek	T1
14	77	Hematüri	Ürotel.kars.	yüksek	T1

Tablo 4.1. Mesane Kanserli Olguların Yaş, Ön Tanı, Tümör Tipi, Tümör Evre ve Derece Bilgileri (devam ediyor)

Hasta No	Yaş	Ön tanı	Tanı	Tümör Derecesi	Tümör Evresi
15	74	Hematüri	Ürotel.kars	düşük	Ta
16	65	Hematüri	Ürotel.kars	düşük	Ta
17	69	Hematüri	Ürotel.kars	yüksek	T1
18	66	Malign neopl.	Ürotel.kars	yüksek	Ta
19	73	Malign neopl.	Ürotel.kars	düşük	Ta
20	72	Malign neopl.	Ürotel.kars	düşük	Ta
21	52	Hematüri	Ürotel.kars	düşük	Ta
22	66	Malign neopl.	Ürotel.kars	düşük	Ta
23	77	Malign neopl.	Ürotel.kars	düşük	Ta
24	71	Malign neopl.	Ürotel.kars	düşük	T1
25	63	Malign neopl.	Ürotel.kars	düşük	Ta
26	53	Malign neopl.	Ürotel.kars	düşük	Ta
27	58	Malign neopl.	Ürotel.kars	düşük	Ta
28	72	Malign neopl.	Ürotel.kars	yüksek	Ta

* Nüks Eden Olguya Ait Doku Örnekleri

4.1. Yöntem ve Değerlendirmeye İlişkin Bulgular

Çalışmamızda doku örneklerinden direkt preparasyon ile hazırlanan preparatlar AURKA ve AURKB genleri ile kromozom 8, 12, 17 ve 20'ye spesifik DNA probları ile hibridize edilmişlerdir. Hibridizasyon sonrası floresan spotlara yönelik FISH analizinde hem kontrol grubunun hem de araştırma grubunun tüm örneklerinde hibridizasyonun başarılı olduğu gözlenmiştir. Tüm problemler için çalışmamızın başarı oranı %100 olarak saptanmıştır.

Kontrol grubu örneklerinde her bir prob için en az 100 hücre analiz edilmiş olup, herhangi bir anormal sinyal paternine rastlanılmamıştır. Dolayısıyla her kontrol grubu örneğinde AURKA ve AURKB genlerinin kopya sayılarının normal oldukları ve tüm örneklerin incelenen kromozomlar açısından diploidik oldukları saptanmıştır.

4.1.1. Tümör örneklerinin FISH analiz bulguları

Çalışmamızda analizlerin gerçekleştirildiği 29 tümör örneğinden üç tanesinde (%10) incelenen genler ve kromozomlar açısından herhangi bir anomaliye rastlanılmamıştır. Bu tümörlerden iki tanesi düşük dereceli T1 evreli tümörler, bir tanesi de düşük dereceli Ta evreli tümördü. Geri kalan 26 tümör örneğinde ise en az bir aberan sinyal paterni gözlenmiştir.

Tümörün nüks etmesi nedeniyle farklı zamanlara ait iki farklı tümör örneğinin incelendiği olgumuzda ilk tümöre ilişkin hücrelerde AURKA genine ilişkin düşük amplifikasyon ve AURKB geni delesyonu gözlenmiş, ancak anöplodik ve poliplodik hücreler saptanmamıştır. Buna karşılık Tablo 4.2'de de görüldüğü üzere ikinci tümör

örneğinde AURKB geni delesyonuna ek olarak, AURKA geni yüksek amplifikasyonu ile tetraploid klonlar ve $>4n$ özellikli klonlar gözlenmiştir. Bu olgumuzun ilk tanı aldığı zaman düşük dereceli Ta tümörü özellikleri gösterdiği, nüks örneğinde ise yüksek dereceli T2 evresi tümör olduğu rapor edilmiştir. Tablo 4.2'de olguların FISH analizi bulguları verilmiştir. Tümör örneklerinin FISH analizleri değerlendirilirken 6 parametre incelemeye alınmıştır:

Kesim Noktası (Cut-off):

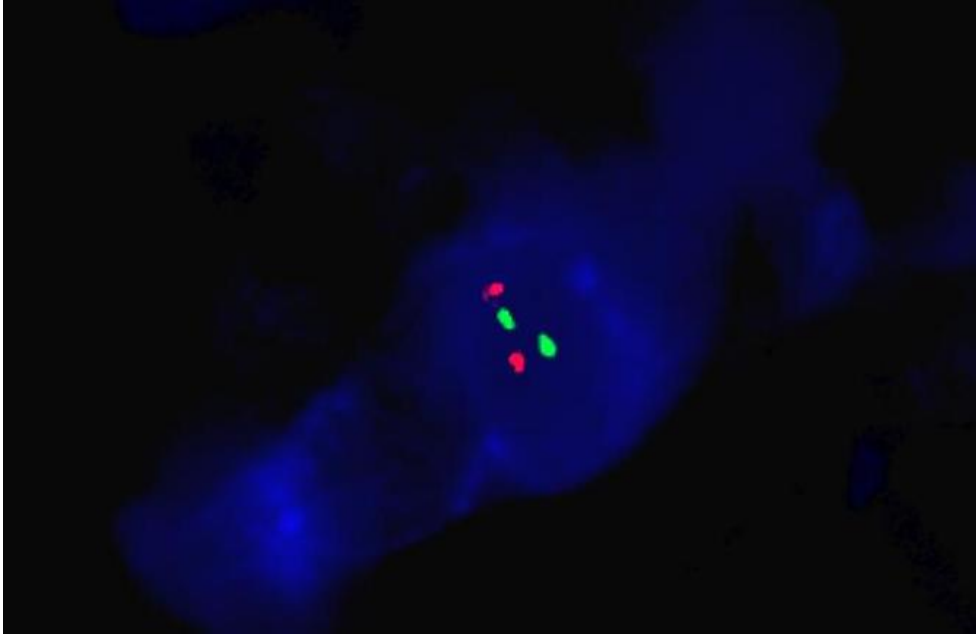
- % 3,54	AURKA düşük amplifikasyon (+),
- % 3,13	AURKA yüksek amplifikasyon (+),
- % 1,59	AURKB delesyon (+),
- % 2,27	Triploid (+)
- % 3,79	Tetraploid (+)
- % 1,75	$>4n$ grubu (+)

4.1.2. AURKA geni kopya sayısı bulguları

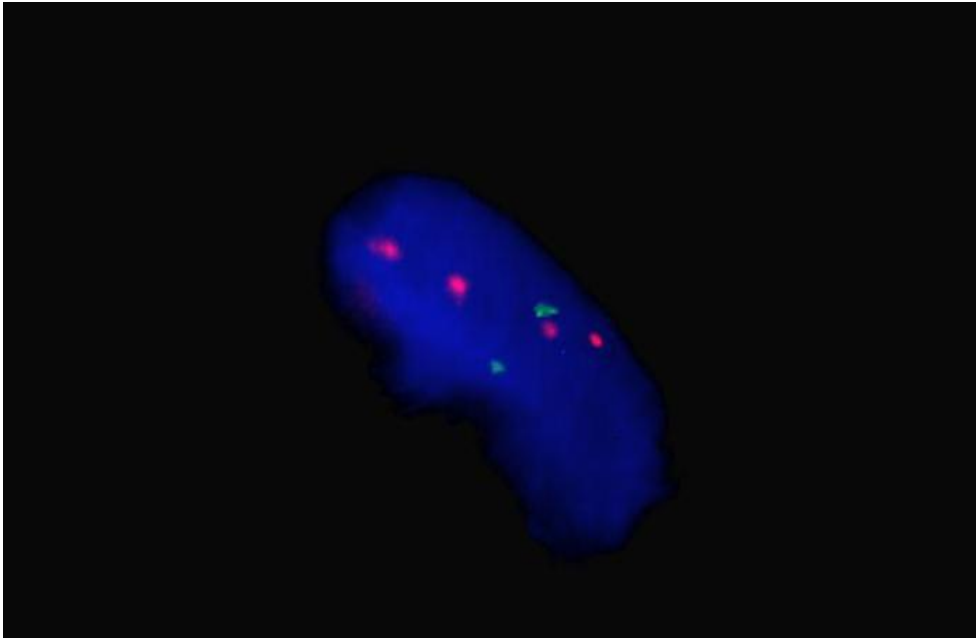
İncelenen tüm örneklerin 19 tanesinde AURKA geni düşük amplifikasyonu gözlenmiştir. Düşük dereceli, Ta evresinde olan iki tümör örneğinde (olgu 15 ve 20) sadece düşük AURKA amplifikasyonu gözlenmiştir. Diğer 17 örnekte düşük AURKA geni amplifikasyonuna ek anomaliler saptanmıştır.

Aurora kinaz A geni yüksek amplifikasyonu toplam 14 örnekte saptanmıştır. Yüksek AURKA gen amplifikasyonunun izole olduğu bir örneğe rastlanılmamıştır. Sadece bir tümörde (düşük dereceli Ta tümör) AURKA geni yüksek amplifikasyonu ile birlikte AURKB gen delesyonu gözlenmiş, poliploidik klonlar saptanmamıştır. Olgu 01'e ait AURKA geni için normal hücrenin FISH görüntüsü Şekil 4.1'de, Aurora Kinaz A amplifikasyonu görülen olgulara ait (olgu 18 ve 20) FISH görüntüleri Şekil 4.2 ve Şekil 4.3'de örnek olarak verilmiştir.

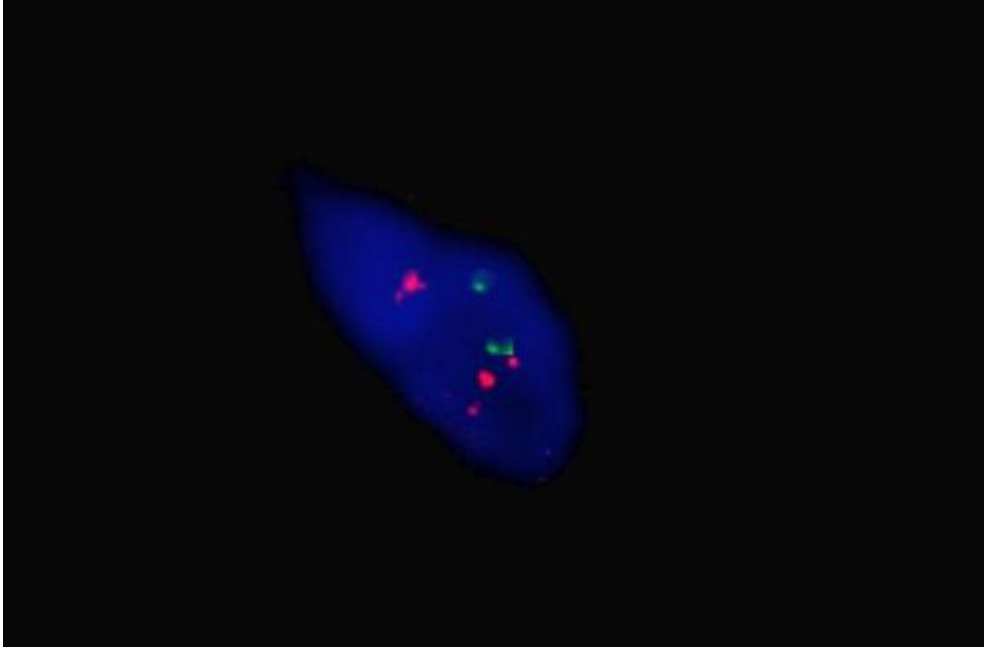
Yüksek AURKA gen amplifikasyonu, yüksek dereceli tümörlerin tümünde gözlenirken düşük dereceli tümörlerin beş tanesinde saptanmıştır. Yüksek dereceli T1 evresindeki tüm tümörlerde (dört olgu) yüksek AURKA gen amplifikasyonu, ilave anomalilerle birlikte gözlenmiştir. Düşük dereceli Ta evresindeki üç tümör ile yine düşük dereceli T1 evresindeki iki tümörde de bu anomali saptanmıştır. Tablo 4.2.'de olguların FISH analizi bulguları verilmiştir.



Şekil 4.1. Olgu 01'e ait AURKA geni için normal hücrenin FISH görüntüsü (AURKA/ 20q13 kırmızı sinyal, kontrol 20q11 yeşil sinyal)



Şekil 4.2. AURKA gen amplifikasyonu görülen 20 numaralı olgunun FISH görüntüsü (AURKA/20q13 kırmızı sinyal, kontrol 20q11 yeşil sinyal)



Şekil 4.3. AURKA gen amplifikasyonu görülen 18 numaralı olgunun FISH görüntüsü (AURKA/20q13 kırmızı sinyal, kontrol 20q11 yeşil sinyal)

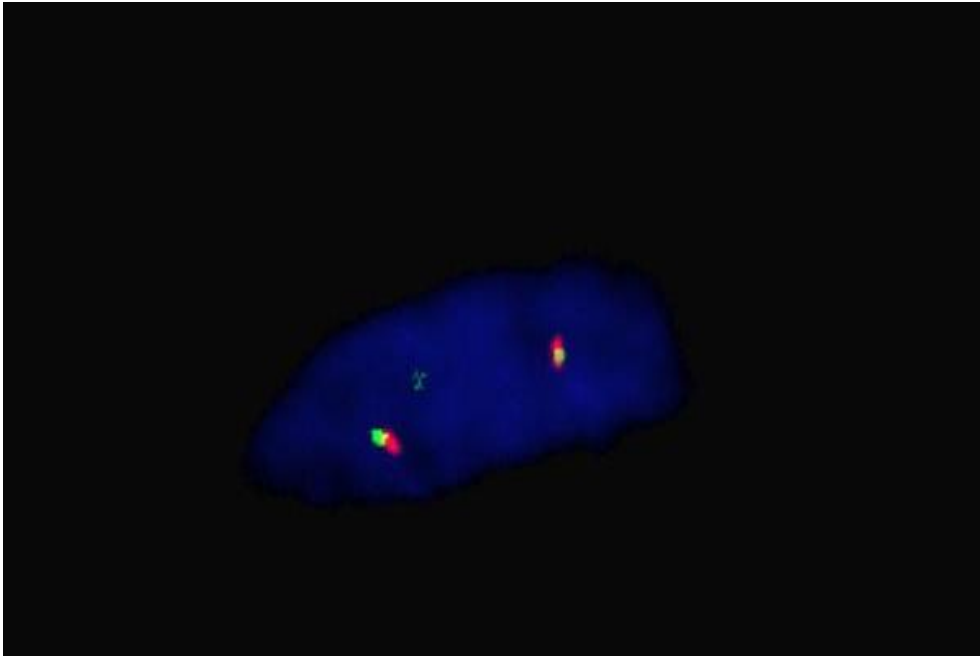
Tablo 4.2. Mesane Kanserli Olguların FISH Analizi Sonuçları

<i>H</i>	<i>AURKA</i>	<i>AURKA</i>			<i>>4n</i>		
<i>NO</i>	<i>Düşük</i>	<i>Yüksek</i>	<i>Triploid</i>	<i>Tetraploid</i>	<i>Grubu</i>	<i>AURKB</i>	<i>Derece ve</i>
	<i>Amplifikasyon</i>	<i>Amplifikasyon</i>	<i>Hücre</i>	<i>Hücre</i>	<i>Hücre</i>	<i>Delesyonu</i>	<i>Evre</i>
01/1	Poz	neg	neg	neg	neg	poz	düşük/Ta
01/2	poz	poz	neg	poz	poz	poz	yüksek/T2
2	neg	poz	poz	neg	neg	poz	düşük/T1
3	neg	neg	poz	neg	neg	neg	düşük/Ta
4	poz	poz	poz	neg	neg	neg	düşük/ T1
5	poz	neg	poz	neg	neg	neg	düşük/T1
6	poz	poz	poz	neg	neg	neg	düşük/Ta
7	poz	poz	poz	poz	poz	poz	yüksek/Ta
8	neg	poz	neg	poz	poz	Poz	yüksek/Ta
09	neg	neg	neg	neg	neg	neg	düşük/T1
10	neg	neg	neg	neg	neg	neg	düşük/T1
11	poz	neg	neg	neg	neg	poz	düşük/Ta
12	poz	poz	neg	poz	poz	poz	yüksek/T1
13	poz	poz	poz	poz	poz	poz	yüksek/T1
14	neg	poz	neg	poz	poz	poz	yüksek/T1
15	poz	neg	neg	neg	neg	neg	düşük/Ta
16	neg	neg	poz	neg	neg	neg	düşük/Ta
17	poz	poz	poz	poz	poz	poz	yüksek/T1
18	poz	poz	poz	poz	poz	poz	yüksek/Ta
19	neg	neg	neg	neg	neg	neg	düşük/ Ta
20	poz	neg	neg	neg	neg	neg	düşük/Ta
21	neg	poz	neg	neg	neg	poz	düşük/Ta
22	neg	neg	poz	neg	neg	neg	düşük/Ta
23	poz	poz	poz	neg	neg	neg	düşük/Ta
24	poz	neg	poz	poz	neg	poz	düşük/T1
25	poz	neg	neg	poz	neg	neg	düşük/Ta
26	poz	neg	poz	neg	neg	neg	düşük/Ta
27	poz	neg	poz	neg	neg	poz	düşük/Ta
28	poz	poz	poz	poz	poz	poz	yüksek/Ta

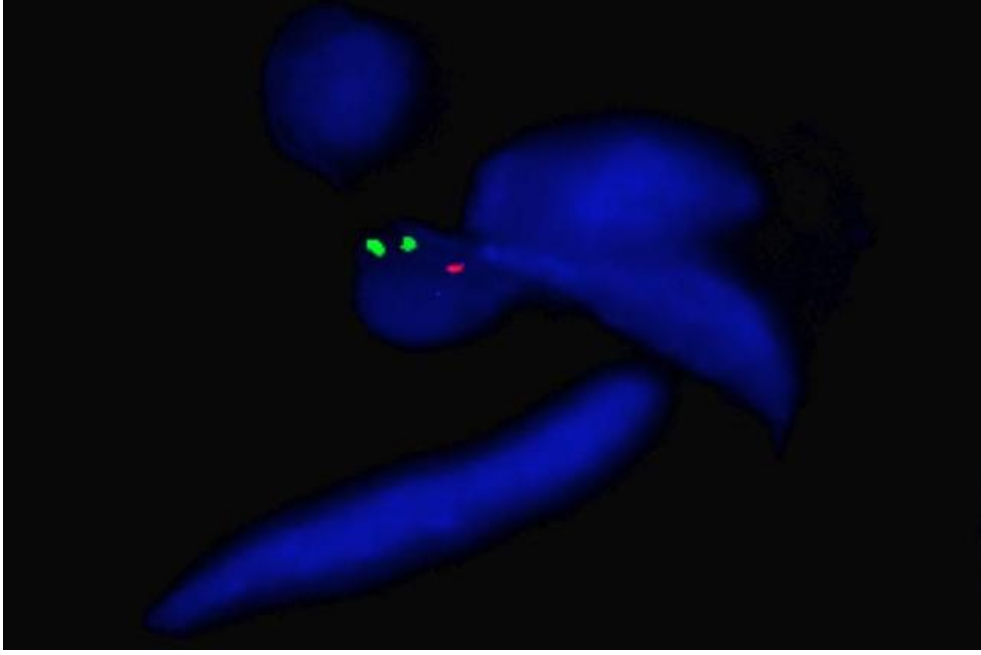
*Tümörü tekrarlayan olguya ait doku örnekleri

4.1.3. AURKB geni kopya sayısı bulguları

Çalışmamızda incelediğimiz diğer Aurora kinaz geni olan AURKB genine ilişkin anomaliler tüm örneklerde allel kaybı olarak kendini göstermiştir. İncelenen 29 tümör örneğinin 15 'inde (%51,7) AURKB gen delesyonu gözlenmiştir ki anomalilerin gözleendiği örneklerin 9 tanesi yüksek dereceli tümör sınıflamasındadır. Delesyonun gözleendiği geri kalan 6 düşük dereceli tümörün dört tanesi Ta, iki tanesinin de T1 evresi tümörler olduğu saptanmıştır. Aurora kinaz B delesyonunun gözleendiği düşük dereceli Ta evresindeki iki örnekte anomalinin düşük AURKA amplifikasyonu, bir örnekte de yüksek AURKA geni amplifikasyonu ile birlikte olduğu, diğerlerinde ise AURKA geni anomalileri ile ek anomalilerin birlikte görüldüğü saptanmıştır. Olgu 10'a ait AURKB geni için normal hücrelere sahip FISH görüntüsü Şekil 4.4'de, AURKB delesyonu saptanan 27 no'lu olgunun FISH görüntüsü Şekil 4.5'de örnek olarak verilmiştir.



Şekil 4.4. Olgu 10'e ait AURKB geni ve sentromer 17 için normal hücrelere sahip FISH görüntüsü (Cep17 yeşil sinyal, AURKB/17p13 kırmızı sinyal)

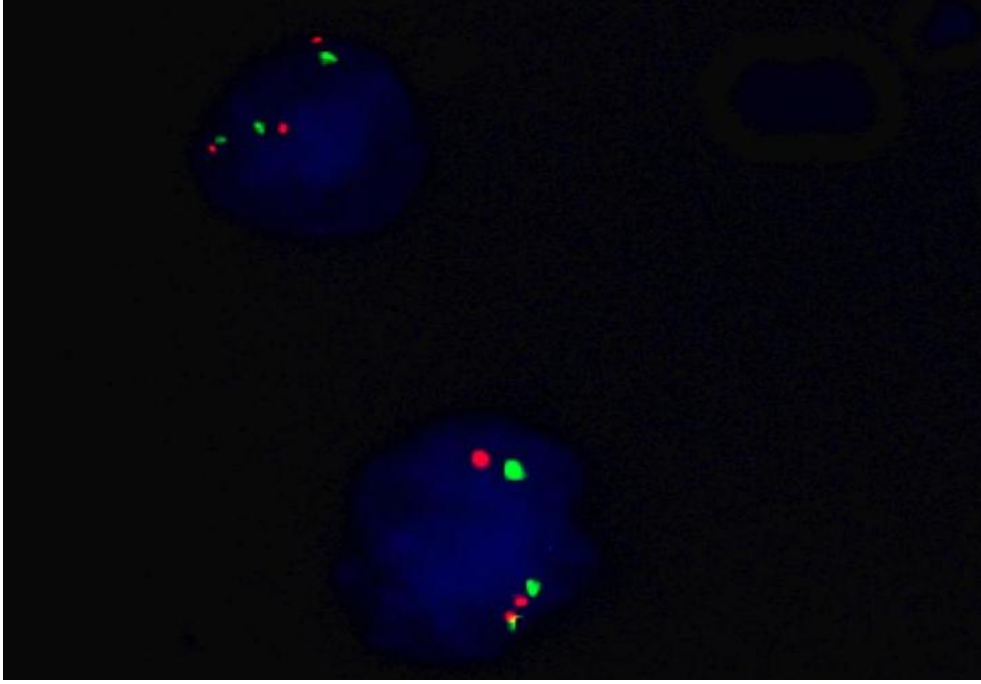


Şekil 4.5. Olgu 27'e ait AURKB geni ve sentromer 17 için delesyonlu hücelere sahip FISH görüntüsü (Cep17 yeşil sinyal, AURKB/17p13 kırmızı sinyal)

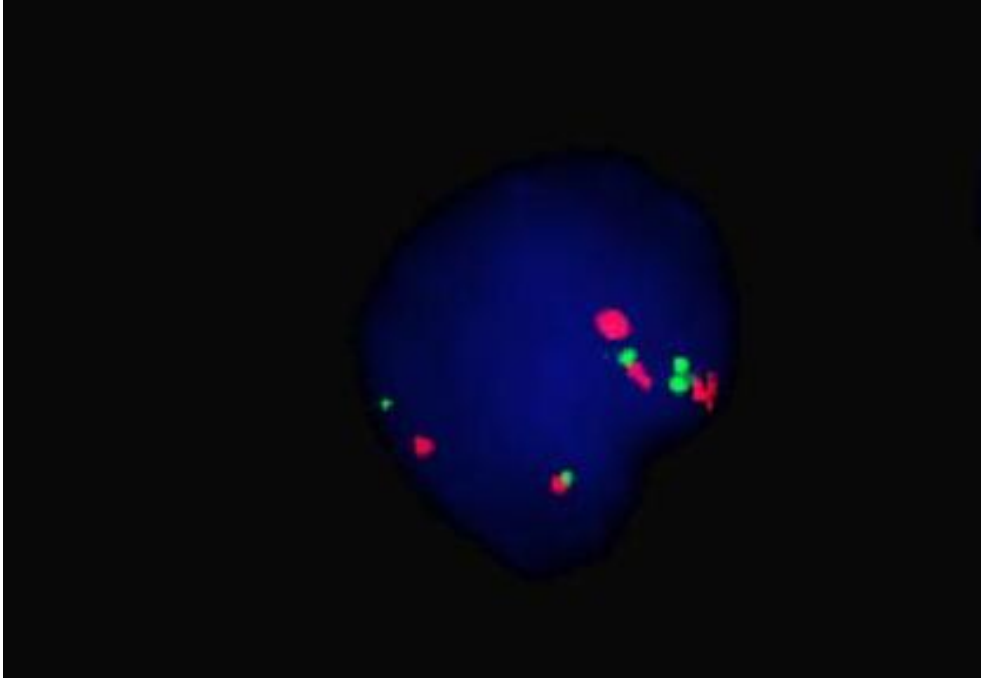
4.1.4. Sayısal kromozom anomalilerine ilişkin bulgular

Çalışmamızda AURKA ve AURKB genlerine spesifik problardaki (kromozom 17 ve 20) kontrol problemleri aracılığıyla hücrelerin ilgili kromozomlara ilişkin aneuploidileri ile poliploidileri durumlarını da değerlendirme olanağı olmuştur. Poliploidi tanısında kesin veriye ulaşabilmek için hücreler kromozom 8 ve 12'ye ait sentromer problemleri ile de ayrıca hibridizasyona sokulmuşlardır.

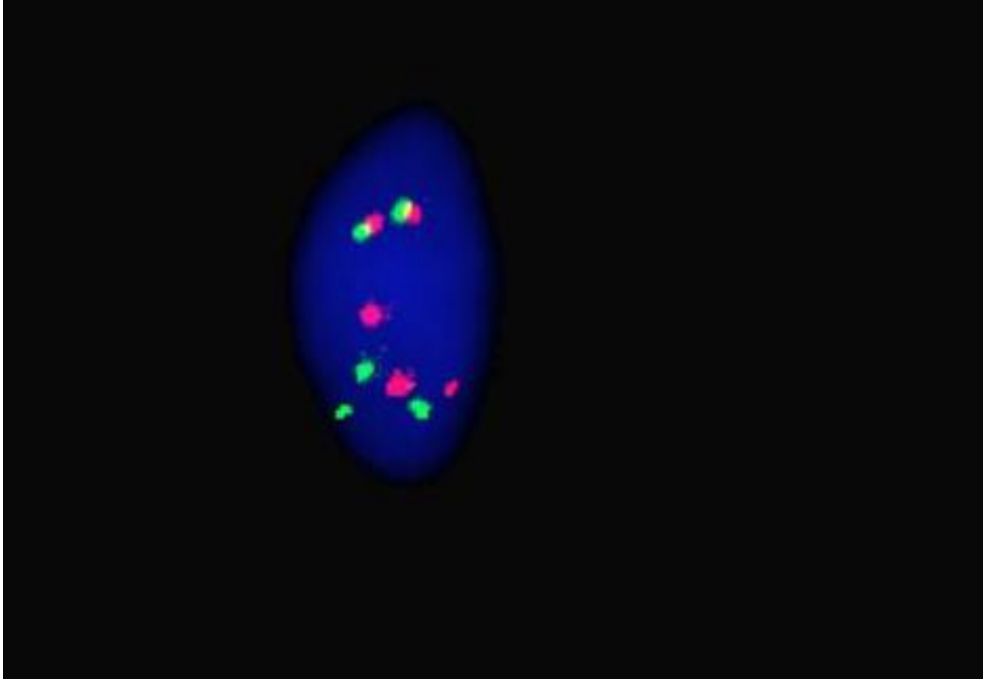
İncelediğimiz tüm tümör örneklerinde incelenen kromozomlar açısından aneuploidik (trizomik-monozomik) hücre gözlenmemiştir. Buna karşılık özellikle yüksek dereceli tümörlerde poliploidik klonlarla yüksek sıklıkta karşılaşmıştır. Poliploidiler; triploid, tetraploid ve $>4n$ grubu olarak gruplandırılmıştır. İncelenen tümör örneklerinin %55,1 'inde (16/29) triploidik, % 37,9 'unda (11/29) tetraploidik ve %31 'nde de (09/29) $>4n$ grubu anomalilerinin olduğu klonlar saptanmıştır. Olgu 07'e ait triploidik hücrenin FISH görüntüsü Şekil 4.6'da verilmiştir. Yüksek dereceli T1 evresi dört tümörün iki tanesinde tetraploid ve $>4n$ grubu klonlar, ikisinde de tüm poliploidi çeşitleri birlikte gözlenmiştir. $>4n$ grubu anomali saptanan olgu 14'e ait FISH görüntüsü Şekil 4.8'de belirtilmiştir. Ta evresi tümörlerde de biri dışında diğer üç tanesinde triploid/tetraploid ve $>4n$ grubu hücre klonları birlikte saptanmıştır. Olgu 13'e ait $>4n$ grubu hücrenin FISH görüntüsü Şekil 4.7'de belirtilmiştir. Düşük dereceli 20 tümör örneğinin 11 tanesinde sadece triploidik hücreler gözlenirken, Ta ve T1 evresindeki iki tümörde tetraploid hücre dizisi saptanmıştır. Bu örneklerden bir tanesinin hücre dağılımında triploid ve tetraploid hücre dizileri birlikte gözlenmiştir. $>4n$ grubu anomalileri düşük dereceli tümörlerde hiç bulunmamıştır.



Şekil 4.6. Olgu 07'e ait triploidik hücrenin FISH görüntüsü



Şekil 4.7. Olgu 13'e ait >4n grubu hücrenin FISH görüntüsü



Şekil 4.8. Olgu 14'e ait >4n grubu hücrenin FISH görüntüsü

4.1.5. FISH analiz verileri ile histopatolojik özelliklerin ilişkisi

Yukarıda da ifade edildiği gibi kontrol grubu örneklerinde gerek lokus spesifik problemler açısından gerekse sentromer problemleri açısından herhangi bir anomaliye rastlanılmamıştır. Buna karşılık tümör dokularında düşük ve yüksek dereceli tümör örneklerinde anlamlı düzeyde artan anomaliler gözlenmiştir. Yüksek dereceli tümörlerde tümör başına düşen ortalama anomali oranı 5.3 iken, düşük dereceli tümörlerde 1.8'dir ve aralarında anlamlı düzeyde farklılık saptanmıştır.

Tablo 4.3' de değerlendirilen parametrelerin görülme oranları verilmiştir.

Tablo 4.3. Tümör Örneklerinde Saptanan AURKA/AURKB Kopya Sayısı Anomalileri ile > 4n Grubu Klonların Tümör Derecelerine Göre Görülme Sıklıkları

Genetik Anomaliler	Düşük Derece Oran	Yüksek Derece Oran	Toplam Oran %
AURKA Düşük Amp.	12/20	07/09	%65,5 (19/29)
AURKA Yüksek Amp.	05/20	09/09	%48,2 (14/29)
AURKB Delesyon	06/20	09/09	%51,7 (15/29)
Triploid	11/20	05/09	%55,1 (16/29)
Tetraploid	02/20	09/09	%37,9 (11/29)
>4n grubu	0/20	09/09	%31 (09/29)
Toplam	36/20	48/09	
*ANCA	1.8	5.3	

***ANCA (Abnormal number of chromosome abnormalities) :** Çalışmamızda her grupta saptanan toplam anomalili örnek sayısının incelenen toplam örnek sayısına oranını ifade etmektedir (4).

4.2. Çalışmaya İlişkin İstatistik Verileri

4.2.1. Tümör dereceleri ile amplifikasyonlar, delesyonlar ve sayısal kromozomal artışlar arasındaki istatistiksel veriler

Olgularda saptanan tüm genetik anomaliler ile tümör dereceleri arasında yapılan istatistiksel çalışmada Fischer Exact Ki-Kare testi kullanılmıştır. Aurora kinaz A yüksek amplifikasyon, AURKB delesyonu, tetraploidi ve >4n grubu anomalileri ile tümör dereceleri arasında önemli düzeyde anlamlı verilere ulaşılmıştır ($p<0.001$). Tablo 4.4’de istatistiksel bilgiler ayrıntılarıyla verilmiştir.

Tablo 4.4. Tümör Dereceleri ile Tüm Genetik Anomaliler Arasındaki İstatistiksel Veriler

	<i>AURKA Düşük Amp.</i>		<i>AURKA Yüksek Amp.</i>		<i>AURKB Delesyonu</i>		<i>Triploidi</i>		<i>Tetraploidi</i>		<i>>4n Grubu</i>	
	(+)*	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
TÜMÖR DERECE Sİ												
Yüksek	7	2	09	0	09	0	5	4	09	0	09	0
Düşük	12	8	5	15	6	14	11	9	2	18	0	20
Toplam	19	10	14	15	15	14	16	13	11	18	09	20
Fisher Exact Ki Kare	p>0.05		p<0.001		P<0.001		p>0.05		P<0.001		P<0.001	

*(+): İncelenen genetik anomalinin kaç tane tümör dokusunda gözleendiğini belirtmektedir.

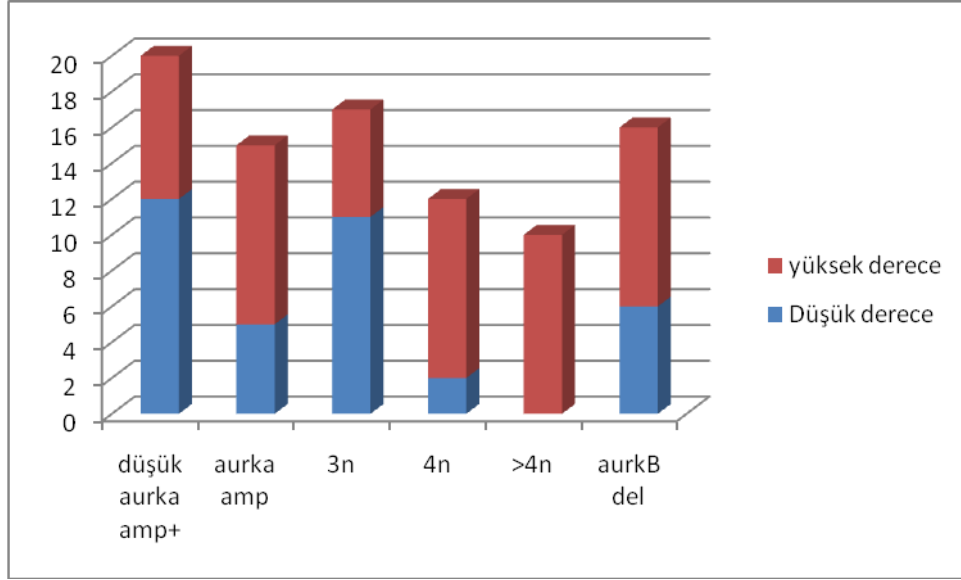
*(-): İncelenen genetik anomalinin kaç tane tümör dokusunda gözlenmediğini belirtmektedir.

Düşük amplifikasyonu olan olgular ile tümör dereceleri arasında farklılık gözlenmezken ($p>0.05$), Yüksek AURKA amplifikasyonunun yüksek dereceli tümörlerde gözlenmesinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p<0.001$) belirlenmiştir. İleri tümör dereceli olgularda AURKA amplifikasyonunda yüksek düzeyde gözlenmiştir.

Aurora kinaz B delesyonu ile tümör dereceleri arasında anlamlı düzeyde ilişki olduğu ($p<0.001$), yüksek dereceli tümörlerde AURKB gen delesyonunun daha yüksek sıklıkta gözleendiği görülmüştür.

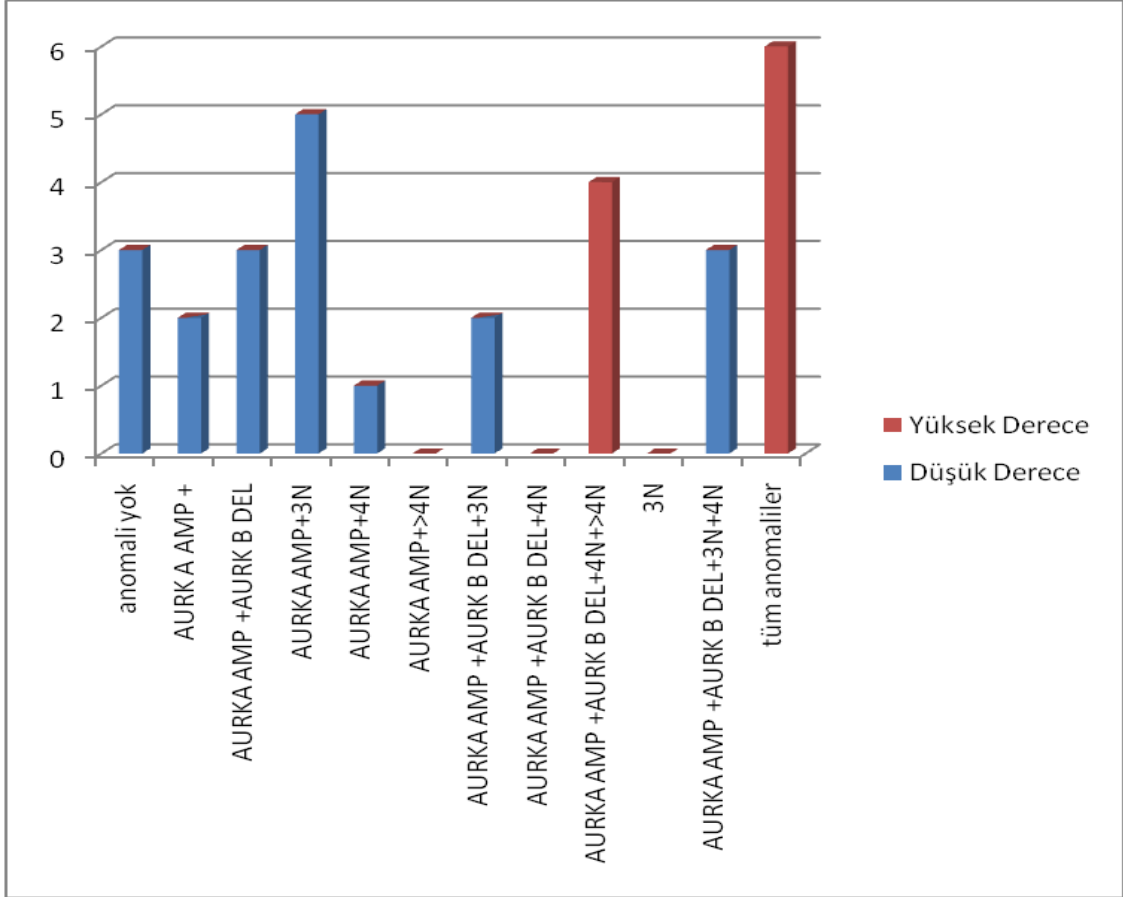
İncelenen tümör hücrelerinin triploidik, tetraploidik ve $>4n$ grubu ile tümör dereceleri arasında ilişki karşılaştırıldığında ise özellikle tümör derecesi ile tetraploidi ve $>4n$ grubu anomalileri arasındaki ilişkinin anlamlı düzeyde olduğu ($p<0.001$), tetraploidik ve $>4n$ hücre klon sıklığının tümör derecesi arttıkça arttığı belirlenmiştir.

Çalışmamızda incelediğimiz anomalileri tek başına ve/veya diğer anomalilerle birlikteliğine bakmaksızın her anomalinin gözleendiği tümörlerin derecelerine göre karşılaştırma yaptığımızda yüksek AURKA amplifikasyonunun yüksek dereceli tümörlerde, tetraploidik ve $>4n$ grubu anomaliler ile AURKB delesyonlarının da yine yüksek dereceli tümörlerde daha yüksek oranlarda gözleendiği saptanmıştır (Şekil 4.9)



Şekil 4.9. Tümör Örneklerinde Saptanan Anomalilerin Düşük ve Yüksek Dereceli Tümör Örneklerindeki Dağılımları

Çalışmamızda birden fazla anomalinin birlikte gözleendiği örneklerin düşük ya da yüksek dereceli tümörlerde görülme oranları da karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırmalar ile ilgili olarak örnekler, Tablo 4.2 temel alınarak değerlendirilmiş ve kombine anomalilerin özellikle yüksek dereceli tümörlerde daha yüksek oranlarda gözleendiği saptanmıştır (Şekil 4.10). Gruplar arası farklılıklar istatistiksel olarak çok anlamlıydı (Ki-Kare Testine göre $p < 0.001$ ***)



Şekil 4.10. Düşük ve Yüksek Dereceli Tümör Örneklerinin Saptanan Anomaliler ile Karşılaştırılması

4.2.2. Tümör evreleri ile amplifikasyonlar, delesyonlar ve sayısal kromozomal artışlar arasındaki istatistiksel veriler

Olguların amplifikasyon, delesyon, triploidi, tetraploidi ve >4n anomali grubu bulgularının tümör evrelerine göre ilişkilendirilmesi Fischer Exact Ki-Kare testi ile yapılmıştır. Olgularımızda saptanan amplifikasyon, delesyon, triploidi, tetraploidi ve >4n grubu ile tümör evreleri arasında istatistiksel olarak bir ilişki kurulamamıştır ($p < 0.05$). Tablo 4.5’de tümör evreleri ile saptanan anomaliler arasındaki istatistiksel analiz ayrıntılı olarak verilmiştir.

Tablo 4.5. Tümör Evreleri ile Tüm Genetik Anomaliler Arasındaki İstatistiksel Veriler

TÜMÖR EVRESİ	AURKA Düşük Amp.		AURKA Yüksek Amp.		AURKB Delesyonu		Triploidi		Tetraploidi		>4n Grubu	
	(+)*	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
Ta	12	6	7	11	8	10	10	8	5	13	4	14
T1	6	4	6	4	6	4	6	4	5	5	4	6
T2	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0
Toplam	19	10	14	15	15	14	16	13	11	18	09	20
Fisher Exact Ki Kare	p>0.05		p>0.05		p>0.05		p>0.05		p>0.05		p>0.05	

*(+): İncelenen genetik anomalinin kaç tane tümör dokusunda gözleendiğini belirtmektedir.

*(-): İncelenen genetik anomalinin kaç tane tümör dokusunda gözlenmediğini belirtmektedir.

Olgularımızda saptanan anomaliler ve olgu yaşları arasındaki ilişki istatistik olarak Spearman kıkare testi kullanılarak yapılmıştır. Olgularımızda saptanan amplifikasyon, triploidi, tetraploidi, $>4n$ anomali grubu anomaliler ve delesyonlar ile olgu yaşları arasında istatistiksel olarak bir ilişki kurulamamıştır ($p>0.05$).

4.2.3. Saptanan amplifikasyonlar ve delesyonlar ile sayısal kromozomal artışlar arasındaki istatistiksel veriler

Saptanan amplifikasyonlar ve delesyonlar ile sayısal kromozomal artışlar arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada; Aurora kinaz A amplifikasyon oranı yükseldikçe ploidik klonların arttığı ve bu iki anomali grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı verilere ulaşıldığı Tablo 4.6'da görülmektedir.

Aurora kinaz B gen delesyonu ile sayısal kromozomal artışlar arasında da önemli düzeyde anlamlı verilere ulaşılmış olmakla beraber, delesyonların poliploidik durumları ortaya çıkarabileceği istatistiksel olarak belirlenmiştir ($p<0.001$)

Tablo 4.6. Amplifikasyonlar ve Delesyonlar ile Sayısal Kromozomal Artışlar Arasındaki İstatistiksel Veriler

GENETİK ANOMALİLER		Triploidi		Tetraploidi		>4n Grubu	
		(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
AURKA Düşük Amp.	(+)*	12	7	09	10	7	12
	(-)	4	6	2	8	2	8
Fisher Exact Ki Kare		p>0.05		p>0.05		p>0.05	
AURKA Yüksek Amp.	(+)	09	5	09	5	09	5
	(-)	7	8	2	13	0	15
Fisher Exact Ki Kare		p>0.05		p<0.001		p<0.001	
AURKB Delesyonu	(+)	8	7	10	5	09	6
	(-)	8	6	1	13	0	14
Fisher Exact Ki Kare		p>0.05		p<0.001		p<0.001	

*(+): İncelenen genetik anomalinin kaç tane tümör dokusunda gözlendiğini belirtmektedir.

*(-): İncelenen genetik anomalinin kaç tane tümör dokusunda gözlenmediğini belirtmektedir.

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda tümör tipi tespit edilen 29 olguya ilişkin 30 mesane tümörü örneğinde FISH analizi ile AURKA, AURKB genlerinin kopya sayıları ile kromozom 8, 12, 17 ve 20'ye ilişkin problr aracılığıyla hücrelerin poliploidik özellikleri değerlendirilmiş ve tümör özellikleri ile ilişkileri irdelenmiştir. Çalışmada saptanan veriler ile literatür verileri karşılaştırılmıştır.

5.1. FISH Yöntemi İle Saptanan Anomalilerle Literatür Bilgilerinin Karşılaştırılması

Mesane kanseri ön tanısı alan tümör, idrar ve mesane yıkama örneklerinde farklı biyomarkerler kullanılarak FISH analizlerinin yapılması uzun zamandan beri araştırılan bir konudur. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda FISH yönteminin, tümöre spesifik markerler kullanılması halinde yüksek duyarlılıkta uygulanabileceği sonucuna ulaşılmış ve hatta bazı merkezlerde tanı amaçlı uygulamalar başlamıştır. Son yıllarda bu yöndeki çalışmalar daha da önem kazanmıştır.

Maffezzini ve arkadaşları 2010 yılında yaptıkları bir çalışmada, FISH yönteminin kasa-invaze olmayan mesane kanserine (NMIBC) giden hastalarda progresyon veya tümör tekrarlama riskinin belirlenmesinde bir gösterge olabildiğini saptamak amacıyla bir çalışma yapmışlardır. Çalışmada, 126 olgunun üriner sitoloji ve sistoskopi ile takip edilen örneklerinde kromozom 3, 7, 17 ve 9p21 lokusuna ait problr kullanılmıştır. Olgulardan 73 tanesinde (%57,9) üriner FISH testi pozitif olarak bulunmuştur. Sonrasında 14 ayı takip eden sürede bu olguların 46 tanesinde (%63) tümör tekrarı ve 15 olguda ise hastalık progresyonu görülmüştür. Kasa invaze olmayan mesane kanserinde (NMIBC) üriner FISH testinin tümör tekrarlama riskinin saptanmasında önemli bir takip aracı olabileceğini bildirmişlerdir (48).

Caraway ve arkadaşları 2010 yılında yaptıkları çalışmada, ürotelyal karsinomların tümör tekrar riski ve hastalığın progresyonu ile yüksek bir birliktelik içinde olduğunu bildirmişler ve FISH yönteminin ürotelyal karsinomları saptamadaki duyarlılığını saptamayı amaçlamışlardır. Bu çalışmada 2004- 2006 yılları arasındaki 600 olgudan alınan 1006 idrar örneğinde mesane kiti kullanılarak yapılan çalışmada, tekrarlayan ürotelyal karsinomu olan olgular ile üriner semptomları olan olgular tanımlanmıştır. İdrar örneklerinde, en az 2 kromozomda (kromozom 3, 7 veya 17) görülen ≥ 4 kopya sayısı artışı ve/veya 9p21 delesyonu olan olgular FISH- pozitif olarak değerlendirilmeye alınmışlardır. Olgulardan alınan idrar örneklerinden %27'si FISH pozitif saptanmış, FISH yönteminin duyarlılığı ve özgüllüğü %58 ve %66 olarak bildirilmiştir. FISH yönteminin ürotelyal karsinomları saptamada sitolojiden daha etkili olabileceği belirtilmiştir. Ürotelyal karsinomlarda kromozom 3, 7, 17 ve 9p21 lokusuna ait problemlerle yapılan bu geniş çaplı FISH çalışmasında bu bölgelerin tekrarlayan ürotelyal karsinomları saptamada önemli belirteçler olabileceği bildirilmiştir (10).

Çalışmamızın amacı Aurora kinazların mesane kanseri tanısında kullanılabilirliğini araştırmak olduğu için araştırmacıların belirlediği markerler açısından örneklerimiz değerlendirilmemiştir. Ancak çalışmamızda kullanılan kromozom 8, 12, 17 ve 20'ye spesifik sentromer/lokus spesifik problemlerle yapılan FISH analizlerinde de triploidik, tetraploidik ve daha yüksek ploidili hücreler yüksek oranlarda saptanmıştır ve bu anomaliler hücrelerde çok kesin şekilde saptanabilmişlerdir. İncelenen tüm örneklerde başarılı sonuç alınmış ve sadece üç örnekte herhangi bir anomaliye rastlanmamıştır. Dolayısıyla çalışma verilerimiz de uygun markerler ile mesane örneklerinde FISH analizinin kullanılabilirliğini destekler niteliktedir.

5.1.1. Aurora Kinaz A geni amplifikasyonunun mesane tümörü örneklerindeki durumu

Genetik instabilite malign transformasyon ve tümör progresyonundan sorumlu tutulmaktadır. Kanserin moleküler patolojisine ilişkin çalışmalarda pek çok genetik instabilitenin farklı mekanizmalarla ilişkili olduğu ortaya konmuştur. Son dönemlerde özellikle DNA yanlış eşleşme tamir genlerinin inaktivasyonuna bağlı olarak ortaya çıkan instabilite üzerinde durulmaktadır. Özellikle mikrosatellit dizilerinin genişlemesi veya kısalmasından sorumlu olan bu mekanizma, sadece diploid veya diploide yakın olan tümörlerin oluşum mekanizmalarını açıklamada önemli hale gelmektedir. Mitotik içcik kontrol noktası genlerinden olan BUB ve MAD2 mutasyonları nadiren anöplodik tümör hücrelerinde bildirilmiştir. Buna karşılık *Sen ve arkadaşlarının (2002)* AURKA geni amplifikasyonunun ve aşırı ekspresyonunun anöploidi ve poliploidi ile ilişkili olduğunu mesane kanseri örneklerinde yaptıkları çalışma ile ortaya koymuşlardır (62).

Çalışmalarında mesane karsinogenezinde AURKA geni amplifikasyonunun ve STK15 proteininin aşırı ekspresyonunun önemli rol oynayabileceğini, agresif fenotipe sahip poliploid hücre popülasyonlarının birikimine neden olabileceklerini vurgulamışlardır. Aurora kinaz A geni 20q13'de lokalizedir. Kromozom 20q çeşitli kanser türlerinde amplifiye olan bir kromozomdur. Ayrıca 20q amplifikasyonu pek çok agresif varyant epitelyal ve mezenşimal kanserde de rapor edilmiştir ki mesane kanseri de bu kanserler arasındadır (62).

Kromozom 20q yüksek dereceli invaziv ürotelyal mesane karsinomlarında hemen tüm poliploid hücrelerde yüksek oranda amplifiye olmaktadır. Ayrıca *in vitro* çalışmalarda transforme edilmiş ürotelyal hücrelerde de kromozom 20 kopya sayısının

artması bu kromozoma ilişkin genetik materyalin artmasının ürotelyal neoplazinin erken dönemlerinde rol oynayabileceğini göstermektedir (62).

Sen ve arkadaşları (2002), toplam 205 parafinize mesane tümöründe STK15 proteinini immünohistokimyasal olarak, 61 örnekte Southern Blot tekniği ve 21 örnekte de FISH analizi ile AURKA gen kopya sayısını değerlendirmişlerdir. Araştırmacılar aynı zamanda kromozom 3, 17, 20 ve 21 kopya sayısını da FISH analizi ile incelemişlerdir. Yüksek düzeyde STK15 protein ekspresyonu mesane tümörlerinde yüksek sıklıkta gözlenmesine rağmen poliploidik özellik gösteren %30 tümörde STK15 proteini aşırı ekspresyonunun gözlenmediği, farklı genlerin ploidik klonların oluşmasını tetikleyebileceği bildirilmiştir. Mesane tümörlerinde en azından 3-4 kopya halinde olan AURKA gen amplifikasyonunun yaygın bir bulgu olduğu ifade edilmiştir (62).

Ancak diploid veya diploide yakın tümör örneklerinde hücrelerin %40-50 kadarında 3-4 kopya artışının gözlendiği ve bu hücrelerinin sadece %2-20 kadarında >4 AURKA amplifikasyonun olduğu rapor edilmiştir. Poliploidi derecesinin AURKA amplifikasyonu ile ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır. Aynı çalışmada gen amplifikasyonu ile poliploid derecesinin klinik fenotiple ilişkisi değerlendirilmiştir. STK15 aşırı ekspresyonunun incelenen %50 tümör örneğinde gözlendiği ve bu tümörlerin ileri grade, nonpapiller, invaziv ve poliploid özellikte oldukları yani çok agresif tümör özelliklerini taşıdıkları gözlenmiştir. Serin-Treonin Kinaz 15 (STK15) aşırı ekspresyonu %76.9 invaziv, ileri grade, poliploid mesane kanserlerinde gözlenirken, sadece %7.5 süperfisyal mesane tümöründe gözlendiği belirtilmiştir. Süperfisyal non-invaziv olan ancak STK15 proteininin aşırı ekspresyonu olduğu ve yüksek oranda poliploid olan tümörlerin invaziv, klinik olarak agresif tümöre dönüşme olasılığının yüksek olduğu ifade edilmiştir.

Serin-Treonin Kinaz 15 (STK15) aşırı ekspresyonu olan tümörlerin uzak metastaz ve azalmış survi ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir. Serin-Treonin Kinaz 15 (STK15) amplifikasyon ve overekspresyon düzeylerinin poliploidi derecesi ile güçlü bir birliktelik olduğunu belirtmişlerdir (62).

Çalışmamızda poliploidik hücreler; triploid, tetraploid ve $>4n$ grubu olarak ayrılmıştır. Aurora kinaz A gen amplifikasyonunun özellikle yüksek orandaki gen amplifikasyonunun yüksek dereceli tümörlerde yüksek oranda gözlenmesi *Sen ve arkadaşlarının* çalışmaları ile uygunluk göstermektedir. Tüm poliploid gruplarını birlikte değerlendirdiğimiz zaman; yüksek dereceli on tümör dokusunun tümünde tetraploidi ve $>4n$ grubu anomalileri görülürken, düşük dereceli tümörlerin sadece ikisinde tetraploidik hücreler saptanmış, $>4n$ grubu anomalileri ise görülmemiştir. Yüksek dereceli tümörlerde poliploid grupların yüksek oranda gözlenmesi *Sen ve arkadaşlarının* çalışmasını destekler niteliktedir (62).

Aynı zamanda *Sen ve arkadaşları* AURKA gen amplifikasyonu ve ploidik özellikli klonlar ile tümör derecesi, evresi ve histopatolojik paternler (Papiller-non-papiller) arasında istatistiksel olarak yüksek birliktelik saptamışlardır ($p < 0.001$). Bizim çalışmamızda da amplifikasyonlar ve kopya sayısı artışlarının tümör dereceleri ile arasında önemli düzeyde ($p < 0.001$) birliktelik gözlenmişken, tümör evreleri ile AURKA kopya sayısı artışı arasında istatistiksel bir anlamlılık saptanmamıştır ve bu bulgumuz ilgili çalışma ile uygunluk göstermemektedir. Çalışmamızda tüm dokular papiller özellikte olduğundan, saptadığımız anomalilerle histopatolojik özellikler anlamlandırılmamıştır.

Park ve Arkadaşları (2008), Aurora kinaz A gen amplifikasyonunun mesane kanseri tanısında biyomarker olma potansiyelini belirlemeyi amaçlamışlar ve bu amaç doğrultusunda immunohistokimya, gerçek zamanlı PCR ve FISH analizlerini 23 mesane tümörü ve yedi kontrol dokusu ile 100 mesane kanserli olgunun idrar örneği ve kanser tanısı olmayan 148 kontrol olgusu idrar örneğinde gerçekleştirmişlerdir (58).

Aurora kinaz A ekspresyon düzeyinin ileri derece tümörlerde anlamlı düzeyde arttığını, tümör derecesi, evresi ve poliploidik özelliği ile AURKA ekspresyonunun bağlantılı olduğunu gözlemlemişlerdir. Süperfisial düşük derecede, ürotelyal karsinom (değişici epitel karsinom) örneklerinde AURKA mRNA düzeyinin normal ürotelyuma göre hafif oranda arttığını, buna karşılık ileri derecedeki, invaziv, yüksek poliploidik orandaki ürotelyal karsinomlarda (değişici epitel karsinom) mRNA ekspresyonunun yaklaşık 19 kat arttığı belirtilmiştir. Aynı çalışmada kromozom 3, 7, 17'ye ilişkin sentromerik FISH problemleri ile yapılan analizlerde bu kromozomlara ilişkin kopya sayılarının ≥ 4 olduğu örneklerde AURKA mRNA düzeyinin arttığı dolayısıyla poliploidi derecesinin AURKA mRNA ekspresyonu ile ilişkili olduğunu öne sürmüşlerdir. Bununla birlikte mesane kanseri gelişiminde AURKA amplifikasyonunun da poliploid hücrel fenotipin gelişmesine neden olabileceği ve yüksek tümör derecesi ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir (58).

Aurora Kinaz A geni kopya sayısının mesane kanseri tanısı için marker olma potansiyelini idrar örnekleri ile yaptıkları analizlerle de değerlendirmişler ve AURKA FISH testinin mesane kanserini saptamadaki duyarlılığını %87, özgüllüğünü % 96.6 olarak bildirmişlerdir. Ayrıca düşük derece tümörlere oranla yüksek dereceli tümörlerde AURKA anöploidi oranının yükseldiği, fakat evreler arasında fark olmadığı belirtilmiştir. Araştırmacıların farklı yöntemleri kullanarak elde ettikleri verilere göre AURKA-FISH yönteminin mesane kanserini saptamada sitolojiden daha etkili olduğu

ve bu belirteçlerin gelecek için umut vaat ettiği belirtilmiştir. Mitotik siklus regülatörü olan AURKA geninin mesane kanseri tanısında bir marker olabileceği diğer çalışmalarla da desteklenmiştir (12,60,62,70).

Çalışmamızda elde edilen verilerle *Park ve arkadaşlarının* bildirdiği bulgular uygunluk göstermektedir. Bizim çalışmamızda da tümör derecesi ile AURKA gen amplifikasyonunun ve poliploidik hücre oranının anlamlı düzeyde ilişkili olduğu saptanmıştır. Çalışmamızda saptanan anomaliler ile tümör evreleri arasında bir ilişkinin gözlenmemesi de *Park ve arkadaşlarının (2008)* çalışması ile uygunluk göstermektedir (58).

Park ve arkadaşları, AURKA gen amplifikasyon düzeyleri ile tümör dereceleri arasında yaptıkları istatistiksel çalışmada anlamlı veriler ($p<0.001$) gözlemişlerken, tümör evresi ve histopatolojik paternler ile AURKA amplifikasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir birliktelik saptamamışlardır. Çalışmamızda Park ve arkadaşlarına benzer şekilde istatistiksel verilere ulaşılmıştır. Aurora kinaz A amplifikasyon düzeyleri, bunlara ilaveten eklenen diğer sayısal anomaliler ile tümör dereceleri arasında önemli düzeyde ($p<0.001$) birliktelik saptanmışken, tümör evreleri ile istatistiksel bir ilginin kurulamaması yine *Park ve arkadaşlarının* istatistiksel çalışması ile uyumludur.

Yamamoto ve arkadaşlarının (2006); tamir genleri olan MLH1, MSH2 ile AURKA ve P53 genlerini; kromozomal instabilite, tümör derecesi, tümör evresi ve protein ifade düzeyleri ile ilişkilerini belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada %65 tümörde AURKA geni aşırı ekspresyonu ile %49 oranında kromozom 7, 9, 17 ve %42 oranında ise 20q13 kopya sayısı artışlarının gözlemlendiği bildirilmiştir (70).

Araştırmacılar mesane kanseri gibi kromozomal kararsızlığın ileri düzeyde olduğu, artmış protein ekspresyonunun hastalığın kötü seyri ile ilişkili olduğunu ve sentrozom amplifikasyonlarının AURKA geninin hastalık progresyonu için güçlü bir belirteç olabileceğini belirtmişlerdir (70).

Yamamoto ve arkadaşları (2006); istatistiksel çalışmalarında sadece 20q13 kazanımı olanları, 20q13'e ilave kromozom 7, 9, 17 polizomileri olanları ve sadece kromozom 7, 9, 17 polizomileri belirlenen örnekleri tümör derecesi, evresi, tümör rekürrensi ve tümör şekli ile ilişkilerini araştırmış ve istatistiksel olarak yaptıkları çalışmada; tüm bu parametreler ile saptanan sayısal alterasyonlar arasında anlamlı bir birliktelik bulmuşlardır. Biz çalışmamızda AURKA lokusu olan 20q13 kazanımları ve ploidik özellikli tümör dokuları ile tümör derecesi arasında önemli düzeyde anlamlı verilere ulaştık. Bu sayısal artışlar ve tümör dereceleri yüksek bir korelasyon göstermekteydi ($p < 0.001$).

Yamamoto ve arkadaşlarının (2006), AURKA geni lokusu olan 20q13 bölgesine ait saptanan kopya sayısı artışlarındaki oran ile çalışmamızda belirlenen oranlar uyumluluk göstermektedir. Bu literatürde çok çeşitli gen bölgeleri ve farklı yöntemlerle anomaliler belirlenmeye çalışılmıştır. Çalışmamıza gelecekte eklenebilecek olan İHK yöntem, AURKA geninin hem FISH yöntemiyle gen düzeyinde analizine hem de İHK yöntemi ile protein olarak ifadesine yönelik yeni bakış açılarının oluşmasında ve tanısal analiz olarak kullanılabilirliği konusunda bir yol olabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızın bulgular bölümünde belirtildiği gibi bir olgumuzda mesane tümörü nüks etmiş olup her iki tümör örneği de değerlendirilmiştir. İlk değişici epitel karsinom tanısı alan örneğin düşük tümör dereceli Ta evresinde olduğu hasta dosyasından

öğrenilmiştir. İlk gelen örnekte AURKA geni düşük amplifikasyonu ile AURKB delesyonu bulunurken, nüks eden tümör örneğinde yüksek AURKA geni amplifikasyonu, AURKB delesyonu ile tetraploidik ve >4n özellikli hücre klonlarının olduğu görülmüştür.

Aurora kinaz A aşırı ekspresyonunun rekürrens riski ile ilişkisi *Comperat ve arkadaşlarının* 2007 yılında bildirdikleri araştırmada ortaya konmuştur. Toplam 128 olgudan transüretal rezeksiyon ile alınan tümör örneklerinde İHK analiz ile AURKA ve MIB-1 (Ki-67) aşırı ekspresyonu ile tümör rekürrensi arasındaki bağlantı ortaya konmuştur. Siklusta proliferen olan hücrelerde G1, S, G2 ve M fazlarında ekspresyon olan, nükleer protein kompleksi MIB-1'in hücrel proliferasyonundaki işlevinden dolayı, mesane kanserinde rekürrensi olan ve olmayan olgulardaki yapılan ekspresyon çalışmasında; süperfisyal mesane neoplazileri (pTa) tümör derecelerine göre üç gruba ayrılmış ve her grupta AURKA ve MIB-1 ekspresyonlarına bakılmıştır (12).

Papiller ürotelyal düşük malign potansiyelli neoplazilerde (PUNLMP), rekürrensi olgularda %92 AURKA ve %54 MIB-1 overekspresyonu, rekürrens olmayan olgularda ise %23 AURKA ve %5 MIB-1 overekspresyonu saptanmıştır. Non-invaziv papiller düşük derece ürotelyal karsinomda (NILGC) rekürrensi olgularda %97 AURKA ve %42 MIB-1 overekspresyonu, rekürrensi olmayan olgularda ise %23 AURKA ve %14 MIB-1 overekspresyonu saptanmıştır. Son grup olan non-invaziv yüksek derece papiller ürotelyal karsinomda (NIHGC) rekürrensi olguların tamamında AURKA ve %65 MIB-1 overekspresyonu, rekürrensi olmayan olgularda ise %67 AURKA ve %50 MIB-1 overekspresyonu gözlenmiştir (12).

Tüm bu verilerle beraber *Comperat ve arkadaşları*, AURKA'nın artmış ekspresyonun MIB-1'e oranla yüksek relaps riski taşıdığını ve AURKA'nın tekrarlayan tümörleri saptamada daha duyarlı ve etkili bir marker olabileceğini bildirmişlerdir (12).

Mitotik siklus düzenleyicisi AURKA'nın tekrarlayan tümörler için duyarlılığının yüksek olduğu (%90.2) bildirilmiştir. Tüm bulguların birlikte değerlendirilmesi sonucu AURKA ekspresyonunun hastaların takibinde özellikle rutin kontrollerde önemli bir belirteç olabileceği ortaya atılmıştır (12). Bizim çalışmamızda da AURKA geni kopya sayısının ürotelyal karsinomda arttığına dayanarak rekürrens değerlendirmesinde bu gene ilişkin kopya sayısı/ekspresyon analizinin bilgi verici olabileceği düşüncesindeyiz. Ancak nüks eden daha fazla tümör örneğine ilişkin verilerin değerlendirilmesi gerekmektedir.

Comperat ve arkadaşları, çalıştıkları tümör dokularının relaps durumlarına göre AURKA overekspresyonları arasındaki ilişkiyi yaptıkları istatistiksel çalışmayla da vurgulamışlardır (12). Çalışmamızda nüks eden bir tane olgumuzun olması sebebiyle AURKA geni değişiklikleri ve rekürrens değerlendirmesi istatistiksel olarak değerlendirilememiştir. Çalışma kapsamına alınabilecek rekürrensi olgu sayılarındaki artış, çeşitlilik ve diğer genlerin dahil olması ile yapılabilecek çok yönlü çalışmalar, mesane karsinogenezine ışık tutabilecek, bu süreçte yeni klon oluşumlarının varlığı çok daha açık gözlenebilecektir.

Kanser progresyonu ve ölüm riski en sık gözlenen Ta için düşük olmakla birlikte rekürrens riskinin yüksek olması hastanın yaşam kalitesini düşürmekte ve sağlık masraflarının çok artmasına neden olmaktadır. Rekürrensin genetik profilini belirlemeyi hedefleyen *Nord ve arkadaşları (2010)* yüksek rezolüsyonlu array analizi ile nüks eden ve etmeyen Ta tümörlerini incelemişlerdir. Veriler değerlendirildiğinde Ta tümörlerinde DNA kopya alterasyonlarının çok yüksek sıklıkta olduğunu, FGFR3, CCND1, MYC ve MDM2 genlerine ek olarak MYBL2, YWHAB (14-3-3 protein beta/alfa) ve SDC4 gen amplifikasyonlarının yüksek dereceli rekürren tümörlerde yüksek sıklıkta gözlendiğini belirtmişlerdir. Aday genlerden SDC4'de 20q12'de lokalizedir. Aurora kinaz A geni ile

aynı amprikondadır. Yüksek dereceli ve rekürren örneklerde aşırı amplifiye olan bu amprikonların incelenmesi daha agresif terapinin faydalı olacağı hastaların belirlenmesinde faydalı olacaktır (55).

Onkogenik serin/treonin kinaz olan, tümöröenez, gelişim ve kemorezistansta önemli roller üstlenen AURKA ekspresyonunun mesane kanseri olgularının prognoza etkisi *Lei ve arkadaşları (2011)* tarafından da değerlendirilmiştir. Yirmi örnekte gerçek zamanlı PCR ile mRNA ekspresyon düzeyi incelenmiş ve ayrıca 96 olguya ilişkin tümörlerde İHK analiz ile protein lokalizasyonları değerlendirilmiştir. Aurora kinaz A proteininin mesane kanseri hücrelerinin sitoplazmalarında lokalize olduğu, olguların %51'inde yüksek düzeyde AURKA protein ekspresyonu belirlenmiştir. Aurora kinaz A protein ekspresyonu sağkalım ile ilişkilendirilmiş, düşük ekspresyonun gözleendiği olgulara göre yüksek AURKA ekspresyonu olan olgularda hastalısız geçen sürenin ve genel survi oranının düşük olduğu belirtilmiştir. Gerçek zamanlı PCR çalışmasında ise, mRNA ekspresyonunun tümör dokularında belirgin bir şekilde arttığı ifade edilmiştir. Daha önce belirtilen çalışmalar ve bizim çalışmamızda da gözlenen aşırı AURKA artışı ile ileri tümör derecesi arasındaki anlamlı ilişkinin rekürrens bağlantısı *Lei ve arkadaşlarının* bu çalışmasında gözlenmemiştir. Bizim ve literatürdeki diğer çalışmaların aksine tümör evresi ile AURKA ekspresyon düzeyi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu vurgulanmıştır. Farklı bulgulara ulaşılmış olmakla birlikte bu çalışmada da AURKA geninin mesane kanseri progresyonunda rol oynadığı ve prognostik faktör olarak değerlendirilebileceği belirtilmiştir (43).

Lei ve arkadaşları AURKA protein ekspresyon düzeyleri ile tümör evresi, derecesi, yaş, cinsiyet ve rekürrens oranlarını istatistiksel olarak da karşılaştırmışlar, tümör evresi, invazyon ve lenf nodu metastazı ile AURKA ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptamışlardır (43) ($p < 0.05$). Ancak tümör derecesi, rekürrens, yaş ve cinsiyet ile AURKA ekspresyonu arasında anlamlı bir ilişki saptanamamıştır ($p > 0.05$).

Lei ve arkadaşlarının yaptığı bu istatistiksel çalışma tümör derecesi ve evresi bakımından bizim çalışmamız ile korelasyon göstermemektedir. Çalışmamızda tümör derecesi ile amplifikasyonlar ve poliploidiler arasında önemli düzeyde anlamlı verilere ($p<0.001$) ulaşılmış olmakla birlikte, tümör evreleri ve yaş ile anomaliler arasında bir ilişki kurulamamıştır. Rekürrensli bir olgumuzun olması ve cinsiyet dağılımı ise dengeli olmadığından istatistiksel çalışmaya dahil edilmemiştir. Tablo 5.1'de literatür bilgileri ile çalışmamız karşılaştırılmıştır.

Tablo 5.1. Çalışmamızdaki AURKA Geni ile Literatür Bilgilerinin Karşılaştırılması

<i>Araştırmacı</i>	<i>Olgu sayısı</i>	<i>Yöntem</i>	<i>Gen/genler</i>	<i>Sonuç</i>
Sen ve ark. (2002)	205	İHK	AURKA	% 76,9 yüksek derece %7,5 düşük derece olgular
	21	FISH		Düşük derece olgular/ düşük amp. % 40,83
				Düşük derece olgular/yüksek amp. % 7,6
				Yüksek derece olgular / düşük amp. % 37,6
				Yüksek derece olgular/ yüksek amp. % 50,1
Yamamoto ve ark. (2006)	100	İHK	AURKA	% 65
FISH	7, 9, 17, 20q13 kopya sayısı artışları	⇒ %49		
		⇒ % 42		
Comperat ve ark. (2007)	128	İHK	AURKA MIB-1	<u>Relaps(+)</u> %95 <u>Relaps(-)</u> %40 %50 %20
Lei ve ark.	96	İHK	AURKA	%51
<i>Bizim Çalışmamız (2011)</i>	29	FISH	AURKA düşük amp. yüksek amp Triploid Tetraploid >4n grubu	% 65,5 % 48,2 % 55,1 % 37,9 % 31

Samir ve arkadaşları 2009 yılında, mesane kanserinde son günlerde genetik bazı belirteçlerin varlığına dikkat çekmişler ve bu amaçla bir derleme yayınlamışlardır. Genetik yeniden düzenlenmelere, moleküler değişikliklere neden olan ve hücre siklusunda ilişkili proteinler üzerinde yeni belirteçlerin taşındığını ileri sürmektedirler. Buna göre; FGFR3, P53 ve RB gen mutasyonları ile aynı zamanda Aurora Kinaz A geninin mitozda anahtar regülatör rolünün olduğunu ve Aurora kinaz A'nın amplifikasyonunun yeni bir belirteç olabileceğini belirtmişlerdir (60)

Aurora kinaz A geninin kopya sayısı artışları ve sayısal kromozomal değişikliklerinin mesane kanseri prognoz tayininde marker olarak kullanılabileceğine ilişkin verilerimiz bu konuda yapılan diğer çalışmalarla da uygunluk göstermektedir (19,43,52,70).

5.1.2. AURKA ve AURKB genlerinin FISH bulguları ile literatür bilgilerinin karşılaştırılması

Mesane kanseri örneklerinde AURKB geni kopya sayısına ilişkin bir araştırmaya rastlanılmamıştır. Aurora Kinaz B protein ekspresyon düzeyinin tümör derecesi ile ilişkili olduğunu ortaya koyan çalışmalar bulunmaktadır (7,8).

Bizim çalışmamızda AURKB geni kopya sayısı artışına rastlanılmamış aksine özellikle yüksek dereceli tümörlerde AURKB allel kaybı yüksek sıklıkta saptanmıştır. *Wu ve arkadaşlarının* (2011) yaptıkları proteomiks çalışmasında AURKB'nin P53 ve NIR (novel INHAT represor) ile protein kompleksi halinde bulunduğu, AURKB'nin NIR'a bağlandığı dolayısıyla P53 ile indirekt ilişki içerisinde olduğunu bildirmişlerdir. Aurora kinaz B veya NIR'ın aşırı ekspresyonunun P53 transkripsiyon aktivitesini baskıladığı, AURKB veya NIR ekspresyonundaki azalmanın ise P53'e bağlı

apoptozise, dolayısıyla hücre büyümesinin durmasına neden olduğu ifade edilmektedir. Bu araştırma verileri ile çalışmamızda saptanan bulgular birlikte değerlendirildiğinde AURKB allel kaybının özellikle tetraploidik ve >4n profile sahip klonların olduğu tümörlerde gözlenmiştir. Apoptozis mekanizmasının normal koşullarda aktif hale gelmesi için uygun bir yapı söz konusudur. Anomaliler yüksek orandadır, P53 aktif hale gelir, P21 ve BAX genlerinin aktif hale gelmesi ile apoptozis süreci başlar (68).

Saptanan AURKB delesyonları ile sayısal kromozomal artışlar istatistiksel olarak da karşılaştırılmış, delesyonlar ile tetraploidi ve >4n grubu anomaliler arasında istatistiksel olarak önemli düzeyde anlamlılık ($p < 0.001$) saptanmıştır (Tablo 4.6). Çalışmamızda saptadığımız delesyonlar ve bu delesyonların ploidik klonlarla olan anlamlı ilişkisi, AURKB geninin siklustaki mekanizmasını da açıklamaktadır.

Bruyere ve arkadaşları 2007 yılında yaptıkları çalışmada; mesane patogenezinde Aurora kinazların mitoz regülasyonundaki görevlerini göz önünde bulundurarak Aurora kinaz A ve Aurora kinaz B ekspresyonları ile klinik, patolojik ve tümör tekrarlama riski arasındaki korelasyonu saptamak amacıyla bir çalışma yapmışlardır. Çalışmada 73 süperfisial mesane tümöründe İHK yöntem kullanılarak, ekspresyon düzeyi ile tümör rekürrensi arasındaki ilişkiyi saptamışlardır (7).

Mitoz düzenleyicisi olan Aurora B'nin tümörlerde yüksek ekspresyonunun G1 kontrol noktası hataları ile tümör rekürrensine sebep olabileceğini bildirmişlerdir. Ürotelyal karsinom tanısı konan hastalardan alınan tümör dokularında, sadece süperfisial mesane neoplazileri (evre Ta) kullanılmıştır. Sonuçta; İHK analiz ile Aurora B protein ekspresyonu %57,5 oranında bulunmuşken, Aurora A protein ekspresyonu ise %69,9 olarak saptanmıştır. Aurora A ve Aurora B ekspresyon düzeyleri ile tümör rekürrensi arasında anlamlı bir ilişki olduğu vurgulanmıştır (7).

Aynı zamanda Aurora kinaz protein ekspresyon düzeyleri ile rekürrens ve tümör derecesi özelliklerini istatistiksel çalışma ile belirleyen *Bruyere ve arkadaşları* AURKA ve AURKB protein ekspresyon düzeyleri ile tümör derecesi arasında anlamlı bir bulguya ulaşamamışlar ($p>0.05$), ancak rekürrens ile bu genlerin protein ekspresyon düzeyleri arasında güçlü bir birliktelik saptamışlardır (7) ($p<0.001$). Çalışmamızda nüksen sadece bir tane olgumuzun olması sebebiyle rekürrens-anomali karşılaştırması yapılamamakla beraber, tümör derecesinin bu çalışmanın aksine Aurora kinazlarla birlikteliği açıkça ortaya konabilmiştir.

İHK analiz ile AURKB protein ekspresyonları, çalışmaların yoğun olan kısmını oluşturmaktadır. Biz de çalışmamızda kromozomal olarak artışları ve AURKB delesyonu saptadık. Mitotik siklus düzenleyicisi olan AURKB geni segregasyonda çok önemli rolleri olan bir genidir. Kaybı veya artışı hatalı kromozom ayrılmalarına sebep olabilir. Bizim çalışmamızda bulduğumuz genetik değişimler, AURKB geninin mekanizmasına açıklık getirmektedir. *Bruyere ve arkadaşlarının* çalışmasında AURKB protein ekspresyonu %57,5 olarak saptanmışken, bizim çalışmamızda AURKB delesyonu %51,7 olarak saptanmıştır (7).

Tümörü tekrarlayan bir tane olgumuzun gelen her iki örneğinde de AURKB delesyonu saptanmıştır. Aynı zamanda triploid, tetraploid ve $>4n$ grubu anomalileri de gözlenmiştir. Tümör tekrarı ile saptanan anomaliler arasında ilişki kurulabilmiştir. Çalışmamız bu literatür ile uyumluluk göstermektedir. Daha fazla olgu sayısı ve tekrarlayan tümörlü olgularla yapılacak çalışmalar bu konuda bize daha etkili fikirler verebilir.

Bufo ve arkadaşları 2010 yılında yaptıkları çalışmada; AURKA ve AURKB ekspresyonları ile tümör evre ve derecesi arasındaki ilişkiyi belirlemek amacıyla bir çalışma yapmışlardır. Western blot ve İHK yöntemi ile 85 hasta üzerinde yapılan çalışmada istatistiksel olarak tümördeki protein düzeyleri ile yaş ve cinsiyet arasında bir ilişki bulunamamıştır. Mitotik siklus düzenleyicileri olan AURKA ve AURKB ekspresyon düzeylerindeki artışla tümör derece ve evresi arasında anlamlı bir ilişki saptanmıştır ve bu genlerin mesane kanserinde önemli bir rol üstlendiklerini belirtmişlerdir (8).

Çalışmamızda yüksek tümör dereceli olguların tümünde AURKB delesyonu saptanmıştır. Düşük tümör dereceli olguların sadece 6'sında (6/20) delesyon saptanmıştır. Bu bulgu bize AURKB delesyonu ile tümör derecesi arasında anlamlı bir ilişki olduğunu göstermektedir. Ancak verilerimiz tartışmaya açıktır.

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Mesane kanserli olgulardan alınan 30 tümör örneğinde AURKA ve AURKB kopya sayısı değişiklikleri ile poliploidik hücrelerin düşük ve yüksek dereceli tümörlerdeki aberasyon dağılımları değerlendirilmiştir. Çalışma verilerinde AURKA ve AURKB gen değişiklikleri ile tümör dereceleri arasında önemli düzeyde fark bulunmuştur. Amacımız doğrultusunda, tümör derecesi yükseldikçe anomali oranının belirgin derecede arttığı saptanmıştır. Aynı zamanda olgularımızdan bir tanesinin tümörü tekrarlanmış ve yapılan analizde bu olguda da anomali açısından belirgin farklılıklar saptanmıştır. Yaptığımız çalışmada tümör evreleri ve olgu yaşları ile saptanan genetik değişiklikler arasında bir fark bulunamamıştır.

- 1- Düşük tümör dereceli olgularımızın 3 tanesinde hiçbir genetik anomali saptanmamıştır.
- 2- Yüksek tümör dereceli olguların tamamında AURKA yüksek amplifikasyonu, AURKB delesyonu, tetraploidi ve poliploidi saptanmıştır.
- 3-Olgularımızda AURKA düşük amplifikasyon en sık gözlenen anomali olarak tespit edilmiş ve özellikle düşük dereceli tümörlerde yoğunlaşmıştır.
- 4-Çalışmamızda triploidi ikinci en sık görülen anomali olarak tespit edilmiştir.
- 5-Aurora kinaz B delesyonu, çalışmamızda üçüncü sık rastlanan değişiklik olarak gözlenmiş ve yüksek dereceli tümörlerde görülme sıklığının anlamlı olduğu gözlenmiştir.

Çalışmamız Türk popülasyonunda mesane dokularından AURKA ve AURKB genlerinin birlikte çalışıldığı ve FISH yöntemi ile incelendiği ilk çalışma olma özelliği taşımaktadır.

Sonuç olarak; yapılan bu çalışmada elde edilen verilere dayanarak, tümör derecesi ile birlikte anomali oranının da arttığı saptanırken, tümör evreleri ile anomali artışı arasında bir ilişki kurulamamıştır. Aynı zamanda tümör tekrarı ile AURKA ve AURKB gen değişiklikleri arasında anlamlı bir ilişki olabileceği düşünülmüş, ancak tek olgu olduğu için veri kesinlik kazanmamıştır. Çalışmamızda saptanan ilk veriler, mesane kanserinde bu genlerin ve poliploidik hücre analizlerinin tanı ve takipte bir belirteç olabileceğini göstermektedir. Ancak geniş araştırma popülasyonlarında ekspresyon çalışmaları ile birlikte daha kapsamlı ve kesin verilere ulaşılabileceği düşüncesindeyiz. Özellikle nükslerde, invaze örneklerde bu genlerin detaylı olarak incelenmesinin mesane kanseri tanı ve prognoz değerlendirmesinde çok önemli verilere ulaşılabileceği görüşündeyiz.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ

1. Anand, S., Penrhyn, S., Venkitaraman, A.R., 2003, Aurora kinase amplification overrides the mitotic spindle assembly checkpoint, inducing resistance to Taxol, *Cancer Cell*, 3:51 – 62.
2. Andrews, P.D., 2005, Aurora kinases: shining lights on the therapeutic horizon? Division of gene regulation and expression. Wellcome Trust Biocentre, University of Dundee, 24: 5005–5015.
3. Arıncı, K., Elhan, A., 1997, *Anatomi 1. cilt*, Güneş Kitabevi, 400s.
4. Arslantaş, A., Artan, S., Öner, Ü., Durmaz, R., Müslümanoğlu, H., Atasoy, M.A., Başaran, N., Tel, E., 2002, Comparative genomic hybridization analysis of genomic alterations in benign, atypical and anaplastic meningiomas, *Acta neurol. belg.*, 102, 53-62.,
5. Artan, S., 1996, FISH tekniğinde kullanılan problemler ve özellikleri, *Teorik ve Pratik Floresan İn Situ Hibridizasyon*, Ed. Başaran, N.; Etam, Eskişehir, 14-25s.
6. Brown, F.M., 2000, Urine cytology: it is still the gold standard for screening, *Urol Clin North Am*, 27: 25–3.
7. Bruyere, F., Corcoran, N.M., Berdjis, N., Namdarian, B., Pedersen, J., Ockrim, J., Voelkze, B.B., Costello, A.J., Hovens, C.M., 2008, Aurora kinase B is an independent protective factor in superficial bladder tumours with a dysfunctional G1 checkpoint, *BJU Int*, 102(2):247-52.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

8. Bufo, P., Sanquedolce, F., Tortorella, S., Cormio, L., Carrieri, G., Pannone, G., 2010, Expression of mitotic kinases phospho-aurora A and aurora B correlates with clinical and pathological parameters in bladder neoplasms, *Histol Histopathol*, 25:1371-1377.
9. Canturk, M., Artan, S., Can, C., Oner, S., Ozen, M., Ozdemir, M., Aslan, H., Ciftci, E., Cilingir, O., Celayir, F.M., 2010, Determination of miRNAs expressions in bladder cancer by microarray technology, *cancer genetics*, 78: 57-77.
10. Caraway, N.P., Khanna, A., Fernandez, R.L., Payne, L., Bassett, R.L., Zhang, H.Z., Kamat, A., Katz, R.L., 2010, Fluorescence in situ hybridization for detecting urothelial carcinoms, *Cancer Cytopathol.*, 118: 259-68.
11. Chen, J., Jin, S., Tahir, S.K., Zhang, E., Liu, X., Sarthy, A.V., Mcgonigal, T.P., Liu, Z., Rosenberg, S.H., Nq, S.C., 2003, Survivin enhances Aurora-B kinase activity and localizes Aurora-B in human cells, *J Biol Chem*, 278: 486-90.
12. Comp erat, E., Camparo, P., Haus, R., Chartier, K.E., Radenen ,B., Richard, F., Capron, F., Paradis, V., 2007, Aurora-A/STK-15 is a predictive factor for recurrent behaviour in non-invasive bladder carcinoma: a study of 128 cases of non-invasive neoplasms, *Virchows Arch*, 4504: 419-24.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- 13.** Cordon, C., 2008, Molecular alterations associated with bladder cancer initiation and progression, *Scand J Urol Nefrol*, 42:154-165.
- 14.** Costa, V.L., Henrique,R., Danielsen,S.A., Duerte, P.S., Eknaes, M., Skotheim, R.I., Rodrigez, A., Magalhaes, J.S., Oliveira, J., Lothe, R.A., Teixeira, M.R., Jeronimo, C., Lind,G.E., 2010, Three Epigenetic Biomarkers, GDF15, TMEFF2, and VIM, Accurately Predict Bladder Cancer from DNA-Based Analyses of Urine Samples, *Clin Cancer Res*, 16:5842.
- 15.** Coquere O., 2002, Linking cyclins to transcriptional control, *Gene*, 299:35-55.
- 16.** Crane, R., Kloepfer, A., Ruderman, J.V., 2004, Requirements for the destruction of human Aurora-A, *J Cell Sci*, 117: 5975 – 83.
- 17.** Çamlıca, H., Dişçi, R., 2008, Tanı testlerinde sınır değerlerinin belirlenmesi, *Türk Onkoloji Dergisi*, 026-033 S.
- 18.** Degtyar, P., Neulander, E., Zirkin, E., Yusim, H., Douvdevani, A., Mermershtain, W., Kaneti, J., Manor, E., 2004, Fluorescence in situ hybridization performed on exfoliated urothelial cells in patients with TCC of the bladder cancer, *Urology*, 63: 398-401.
- 19.** Fraizer, G.C., Diaz, M.F., Lee, I.L., Grossman, H.B., Sen S., 2004, Aurora-A/STK15/BTAK enhances chromosomal instability in bladder cancer cells, *Int J Oncol*, 25:1631-9

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

20. Fu, J., Bian M., Jiang Q., Zhang C., 2007, Roles of Aurora kinases in mitosis and tumorigenesis, *Mol Cancer Res.*, 5(1):1-10.
21. Geoffey, M., C., Hausman, E., R., 2006, Hücre: Moleküler Yaklaşım, (Çev.: Sakızlı M., Atabey N.), İzmir Tıp Kitabevi, İzmir, 542-640s.
22. Goto, H., Yasui, Y., Kawajiri, A., Nigg, E.A., Terada, Y., Tatsuka, M., Nagata, K., Inagaki, M., 2003, Aurora-B regulates the cleavage furrow-specific vimentin phosphorylation in the cytokinetic process, *J Biol Chem*, 278: 8526 – 30.
23. Halling, K.C., Kipp, B.R., 2008, Bladder cancer detection using FISH, *Adv.Anat. Pathol*, 15: 279-286.
24. Hirota, T., Kunitoku, N., Sasayama, T., Marumoto, T., Zhang, D., Nitta, M., Hatakeyama, K., Saya H., 2003, Aurora-A and an interacting activator, the LIM protein Ajuba, are required for mitotic commitment in human cells, *Cell*, 114 : 585–598.
25. <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/AURKAID730ch20q13.html>
26. <http://jcem.endojournals.org/content/95/10/E181.full>
27. <http://journals.prous.com>

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

28. http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/ProteinSummary?db=core;g=ENSG00000178999;r=17:8108051-8113936;t=ENST00000316199
29. <http://www.humphath.com>
30. <http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/BIOL2060-19/CB19.html>
31. http://www.nature.com/nrm/journal/v8/n8/fig_tab/nrm2223_F2.html
32. <http://www.wikipedia.org>
33. Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., Murray, T., Thun, M.J., 2008, Cancer statistics, CA Cancer. J Clin, 58: 71-96.
34. Jiang, Y., Zhang, Y., Lees, E., Seghezzi, W., 2003, Aurora A overexpression overrides the mitotic spindle checkpoint triggered by nocodazole, a microtubule destabilizer. Oncogene, 22: 8293 – 301.
35. Junquera, C. L., Carneiro, J., Kelley, O.R., Temel Histoloji, 1998 , Barış Kitabevi, 375-376 s.
36. Katayama, H., Sasai, K., Kawai, H., Yuan, M., Bondaruk, J., Suzuki, F., Fujii, S., Arlinghaus, RB., Czerniak, BA., Sen, S., 2004, Phosphorylation by Aurora kinase A induces Mdm2- mediated destabilization and inhibition of p53, Nature Genet, 36: 55-62.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

37. Kawajiri, A., Yasui, Y., Goto, H., 2003, Functional significance of the specific sites phosphorylated in desmin at cleavage furrow: Aurora-B may phosphorylate and regulate type III intermediate filaments during cytokinesis coordinately with Rho kinase, *Mol Biol Cell*, 14:1489 – 500.
38. Kawauchi, S., Sakai H., Ikemoto, K., Eguchi, S., Nakao, M., Takihara, H., Shimabukuro, T., Furuya, T., Oga, A., Matsuyama, H., Takahashi, M., Sasaki, K., 2009, 9p21 index as estimated by dual-color fluorescence in situ hybridization is useful to predict urothelial carcinoma recurrence in bladder washing cytology, *Hum Pathol*, 40:1783-9.
39. Kufe, D.W., Pollock, R.E., Weichselbaum, R.R., Bast, R.C., Gangsler, T.S., Holland, J.F., Frei, E., 2003, Mechanisms of Oncogene activation, *Holland-Frei Cancer Medicine*, 6th edition.
40. Kufer, T.A., Sillje, H.H., Korner, R., Gruss, O.J., Meraldi, P., Nigg, E.A., 2002, Human TPX2 is required for targeting Aurora-A kinase to the spindle, *J Cell Biol*, 158: 617 – 23.
41. Kumar, V., Cotran, R.S., Robbins, S.L., Robbins Temel Patoloji, 2003, (Çev: Çevikbaş U.), Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 172-195 s.
42. Lan, W., Zhang, X., Kline, S.L., Rosasco, S.E., Barrett, G.A., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Walczak, C.E., Stukenberg, P.T., 2004, Aurora B phosphorylates centromeric MCAK and regulates its localization and microtubule depolymerization activity, *Curr Biol*, 14: 273 – 86.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

43. Lei, Y., Yan, S., De, L.M., Na, L., Fa, H.R., 2011, Prognostic significance of Aurora-A expression in human bladder cancer, *Acta Histochemica*, volume 13, issue 5, 514-518p.
44. Levy, B., Jobanputra, V., Warburton, D., 2009, Preparation and culture of products of conception and other solid tissues for chromosome analysis, *Curr, Protocol, Human, Gen*, chapter 8 unit 8.5 60p.
45. Lokeshwar, V.B., Habuchi, T., Grossman, B., Murphy, W.M., Hautmann, S.H., Bono, A.V., Getzenberg, R.H., Goebell, P., Schmitz, B.J., Schalken, J.A., Fradet, Y., Maarberger, B., Messing, E., Droller, M.J., 2005, Bladder tumor markers beyond cytology: International Consensus Panel on bladder tumor markers, *Urology*, 66: 35–63.
46. Lopez Bç A., Ordóñez J.L., Otero A.P., Blanca A., Sevillano V., Sanchez C. M., Muñoz E., Cheng L., Montironi R., 2010, Cyclin D3 gene amplification in bladder carcinoma in situ, *Virchows Arch.*, 457:555-61.
47. Lüleyap, Ü., 2008, Moleküler Genetiğin Esasları, Nobel Kitabevi, 304-310s.
48. Maffezzini, M., Campodonico, F., Capponi, G., Canepa, G., Casazza, S., Bandelloni, L., Tamaqno, S., Puntoni, M., 2010, Prognostic significance of fluorescent in situ hybridisation in the follow-up of non-muscle-invasive bladder cancer, *Anticancer Res*, 4761-5.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

49. May, K., Hardwick, K.G., 2006, The spindle checkpoint, *Journal of Cell Science* 119: 4139-4142.
50. Meraldi, P., Honda, R., Nigg, E.A., 2002, Aurora-A overexpression reveals tetraploidization as a major route to centrosome amplification in p53^{-/-} cells, *EMBO J*, 21: 483–92
51. Meyers I. J., Van, L. T., Gertzenberg, R., 2005, Mechanistic analysis of the role of BLCA-4 in bladder cancer pathobiology, *Cancer Res*, 65:7145–50.
52. Mhawech, F.P., Fischer, G., Alvarez, V.J., Ahmed, A., Herrmann, F.R., 2008, Predicting outcome in minimally invasive (T1a and T1b) urothelial bladder carcinoma using a panel of biomarkers: a high throughput tissue microarray analysis, *BJU Int*, 100:1182-7.
53. Mountzios, G., Terpos, E., Dimopoulos, M.A., 2008, Aurora kinases as targets for cancer therapy, *Cancer Treatment Reviews*, 34, 175– 182.
54. Nguyen, H.G., Chinnappan, D., Urano, T., Ravid, K., 2005, Mechanism of Aurora-B degradation and its dependency on intact KEN and A-boxes: identification of an aneuploidy-promoting property, *Mol Cell Biol*, 25: 4977 – 92.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

55. Nord, H., Segersten, H., Sandgren, J., Wester, K., Busch, C., Menzel, U., Komorowski, J., Dumanski, J.P., Malmström, P.U., Diaz Te Stahl, T., 2010, Focal amplifications are associated with high grade and recurrences in stage Ta bladder carcinoma, *Int. J Cancer*, 126:1390-402.
56. Nussbaum, R.L., Mcinnes, R.R., Willard, H.F., Thompson&Thompson Tıbbi Genetik, 2005, Güneş Kitabevi, 312-313 s.
57. Özen, H. Ve Türkeri, L., 2007, Üroonkoloji Kitabı, Ankara Üroonkoloji Derneği, 151-230 s.
58. Park, H.S., Park, W.S., Bondaruk, J., Tanaka, N., Katayama, H., Lee, S., Philippe, E., Jorda, R., Wang, Z., Ruth, L., Dinney C., Keren, J., Lotan, Y., Rizwan, C., Baggerly, K., Sen, S., Barton, H.G., 2008, Quantitation of Aurora Kinase A gene copy number in urine sediments and bladder cancer detection, *J Natl Cancer*, 100: 1401 – 1411 p.
59. Philips, H.A., Howard, G.C.W. and Miller, W.R., 2000, P53 mutations as a marker of malignancy in bladder washing samples from patients with bladder cancer, *British Journal of Cancer*, 82:136-141.
60. Samir, P., Shirodkar, N., Lokeshwar, V.B., 2009, Department of Urology, University of Miami Miller School of Medicine, Miami, Florida, potential new markers in the early detection of bladder cancer, *Curr Opin Urol.*, 19: 488.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

61. Schultz, I.,J., Kiemeny, L.,A., Willems, L., J., Swinkels, D., W., Witjes' J., A., Kok, J., B., 2006, Survivin and MKI67 mRNA expression in bladder washings of patients with superfisial urothelial cell carcinoma correlate with tumour stage and grade but do not predict tumour recurrence, British Journal of Cancer, 82:136-141.
62. Sen, S., Zhou, H., Zhang, R.D., Yoon, D.S., Lopez, F.V., Ito, S., Jiang, F., Johnston, D., Grossman, B., Ruifrok, A.C., Katz, R.L., Brinkley, W., 2002, Amplification/Overexpression of a Mitotic Kinase Gene in Human Bladder Cancer. J Natl Cancer Inst, 94: 1320–9.
63. Shariat, S., Casella, R., Khoddami, S., Hernandez, G., Sulser, T., Gasser, T.C., Lerner, S.P., 2004, Urine detection of survivin is a sensitive marker for the noninvasive diagnosis of bladder cancer, J Urol, 171: 626–30.
64. Sherr, C.J., 2004, Principles of tumor suppression, Cell, 116, 235–246.
65. Van Stedum S, King W, 2002, Basic FISH techniques and troubleshooting, Methods in molecular biology, vol 204: molecular cytogenetics: protocols and applications, 204:51-63.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

66. Weikert, S., Christoph, F., Schrader, M., Krause, H., Miller, K., Muller, M., 2005, Quantitative analysis of survivin mRNA expression in urine and tumor tissue of bladder cancer patients and its potential relevance for disease detection and prognosis, *Int J Cancer*, 116: 100–4
67. Wong, J., Fang, G., 2006, HURP controls spindle dynamics to promote proper interkinetochore tension and efficient kinetochore capture. *J Cell Biol*, 173: 879 – 91.
68. Wu, L., Ma, C.A., Zhao, Y., Jain, A., 2011, Aurora B interacts with N1R-p53, leading to p53 phosphorylation in its DNA-binding domain and subsequent functional suppression, *J Biol Chem.*, 286:2236-44.
69. Yamada, Y., Enokida, H., Kojima, Kawakami, K., Chiyomaru, T., Tatarano, S., Yoshino, S., Kawahara, K., Nishiyama, K., Seki, N., Nakagawa, M.,2011, MiR-96 and miR-183 detection in urine serve as potential tumor markers of urothelial carcinoma: correlation with stage and grade, and comparison with urinary cytology, *Cancer Science*, 102:522-9.
70. Yamamoto, Y., Matsuyama, H., Kawauchi, S., Furuya, T., Liu, X.P., Ikemoto K., Oga, A., Naito, K., and Kohsuke, S., 2006, Biological Characteristics in Bladder Cancer Depend on the Type of Genetic Instability, *American Association for Cancer Research*, 1158:1078-0432.

BAŞAK TÜFEKÇİ

KiŐisel Bilgiler :

Doğum Tarihi : 10.01.1986

Doğum Yeri : Trabzon

Uyruğu : T.C.

Medeni Hali : Bekar

Adres : AkarbaŐı Mah. Dr. Sadık Ahmet Cad. Türk Silahlı Kuvvetleri EŐKİŐEHİR

Eğitim Durumu :

Yüksek Lisans 09.2008-08.2011	Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakóltesi, Tıbbi Genetik AD	3,00/4
Lisans 09.2004-06.2008	Kütahya Dumlupınar Üniversitesi Fen Fakóltesi, Biyoloji Bölümü	2,95/4
Lise 09.2001-06.2004	Ankara Batıkent Anadolu Lisesi	4,88/5

Yabancı Diller :

İngilizce (iyi seviyede)