

**T.C.
HALIÇ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK PROGRAMI**

**MESANE KANSERİNDE TP53 MUTASYON VE
POLİMORFİZMLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Hazırlayan
Sevilay ŞAHOĞLU**

**Danışman
Yrd. Doç. Dr. Nagehan ERSOY TUNALI**

İstanbul – 2012

ÖNSÖZ

Bu çalışma 2010-2012 yılları arasında T.C. Haliç Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nün bilimsel araştırma ve uygulama çalışmalarına verdiği destek ile hazırlanmıştır.

Hem lisans, hem de yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam boyunca bana gösterdiği sonsuz sabır ve verdiği destek ile tez çalışmamın tamamlanmasını mümkün kılan danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Nagehan Ersoy Tunalı'ya çok teşekkür ederim. Ayrıca eğitim süresince bana çok büyük katkıları olan Yrd. Doç. Dr. M. Baki Yokeş'e sabrı ve destekleri için teşekkür ederim.

Tez çalışmamda kullanılmak üzere gerekli hasta örneklerine erişimimi sağlayan Uzm. Dr. Ünsal Özkuvancı, As. Dr. Akif Erbin ve As. Dr. Faruk Özgör'e ayrıca teşekkür ederim.

Ayrıca sevgili Oktay Göktaş'a, anne ve babama her zaman yanımda oldukları ve desteklerini hiçbir zaman esirgemedikleri için çok teşekkür ederim. Son olarak yüksek lisans eğitimim boyunca bana çok yardımcı olan Arş. Gör. Özlem Kurnaz ve Arş. Gör. Ozan Tiryakioğlu'na teşekkürlerimi sunarım.

İstanbul, 2012

Sevilay ŞAHOĞLU

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖNSÖZ	II
KISALTMALAR	i
ŞEKİLLER	iii
TABLolar	v
ÖZET	vi
SUMMARY	vii
1. GİRİŞ	1
1.1. Mesane Kanserinin Semptomları ve Tanısı.....	3
1.2. Tedavi Yöntemleri.....	5
1.3. Çevresel Faktörlerin Mesane Kanserine Etkisi	6
1.3.1. Sigara ve Diğer Tütün Ürünleri	6
1.3.2. Meslek.....	7
1.3.3. Alkol	7
1.3.4. Kahve	8
1.3.5. Schistosoma Haematobium Enfeksiyonu	8
1.3.6. İlaçlar	9
1.3.7. Sıvılar.....	9
1.3.8. Cinsiyet Ve Yaş	10
1.4. Tümör Derecelendirmesi	11
1.5. Mesane Kanserinin Moleküler Mekanizması	13
1.5.1. Kromozomal Değişiklikler	14
1.5.2. Onkogenler	16
1.5.2.1. FGFR3.....	16
1.5.2.2. RAS Onkogeni	16
1.5.3. Tümör Baskılayıcı Genler.....	17
1.5.3.1 C-erB1 ve C-erB2	17
1.5.3.2. CCND1.....	17
1.5.3.3. MYC.....	18
1.5.3.4. E2F3	18
1.5.3.5. PTEN.....	18
1.6. p53	19
1.6.1. p53 ve kanser	23
1.6.2. Mesane Kanserinde p53 Mutasyonları	25
1.6.2.1. p53 kodon 280 - 285	25
1.6.3. Mesane Kanserinde p53 Polimorfizmleri	27
1.6.3.1. p53 Kodon72.....	27
1.6.3.2. Kodon 36.....	29
1.6.3.3. Intron 7	29
2. AMAÇ	31

3. MATERYAL	32
3.1. Çalışmada Kullanılan Örnekler	32
3.1.1 Örneklerin Özellikleri	32
3.2. Yanak İçi Epitel Dokudan DNA İzolasyonu İçin Kullanılan Tamponlar ve Kimyasallar	33
3.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve Saflaştırma İçin Gerekli Kimyasallar	34
3.4. Elektroforezde Kullanılan Kimyasallar ve Tamponlar.....	35
3.5. DNA Uzunluk Markörleri	35
3.6. Cihazlar	36
4. METOD	37
4.1. Trizol ile Dokudan DNA İzolasyonu	37
4.2. GeneJET Genomik DNA İzolasyon Kiti ile Mesane Dokusundan DNA izolasyonu.....	38
4.3. DNA'nın Nitel Ve Nicel Analizi.....	39
4.4. p53 Mutasyon Analizi	40
4.5. Mesane Kanserinin Moleküler Analizi.....	41
5. SONUÇLAR	42
5.1. DNA izolasyonu	42
5.2. p53 geninin PZR-dizileme yöntemi ile moleküler analizi.....	42
5.2.1. p53 genindeki mutasyonlar	43
5.2.2. P53 genindeki polimorfizmler	47
5.3. p53 Arg72Pro polimorfizminin mesane kanserine yatkınlıktaki rolü	51
6. TARTIŞMA	55
6.1. p53 mutasyonları	55
6.2. p53 polimorfizmleri.....	57
6.2.1. p53 kodon72 polimorfizmi	57
6.3. Çevresel Faktörlerin Etkisi	59
6.4. Son Söz.....	59
7. KAYNAKLAR	60
8. ÖZGEÇMİŞ	71

KISALTMALAR

Arg	: Arjinin
(NH₄)₂SO₄	: Amonyum sülfat
BCG	: Bacillus Calmette-Guerin
bç, bp	: Baz çifti
BPB	: Bromofenol mavisi
CDK	: Siklin bağımlı kinaz
CIS	: Karsinoma in situ
df	: Serbestlik derecesi
dNTP	: Deoksiribonükleotid
EDTA	: Etilen diamin tetraasetik asit
EGF	: Epidermal Büyüme Faktörü
EGFR	: Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
EtBr	: Etidyum bromür
FDA	: Food and Drug Administration
FGFR3	: Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü 3
GDP	: Guanozin difosfat
GST	: Glutasyon S-transferaz
GTP	: Guanozin-5'-trifosfat
HW	: Hardy-Weinberg
IARC	: Uluslararası kanser araştırmaları ajansı
ISUP	: Uluslararası Ürolojik Patoloji Topluluğu
L	: Litre
LOH	: Heterozigotluğuun kaybı
M	: Molar
MgCl₂	: Magnezyum klorür
µg	: Mikrogram
ml	: Mililitre
µl	: Mikrolitre
mM	: Milimolar
MRI	: Manyetik rezonans görüntüleme
NaCl	: Sodyum klorür
NaI	: Sodyum iyodür
NAT	: N-asetiltransferaz
nm	: Nanometre
NMP	: Nükleer Matriks Proteini
OR	: Görelilik oranı
PAH	: Polisiklik Aromatik Hidrokarbon
PM	: Zayıf metabolizör
Pro	: Prolin
PTCH	: Gorlin Sendromu Geni
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Rb	: Retinoblastoma

RFLP	: Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmi
RGDE	: Rapid Genomic DNA Extraction
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
RNS	: Reaktif Nitrojen Türleri
SCC	: Skuamöz Hücre Karsinomu
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SNP	: Tek nükleotid polimorfizmi
SULT	: Sulfotransferaz
TBE	: Tris-Borik asit-EDTA
TCC	: Tranzisyonel Hücre Karsinomu
TE	: Tris-EDTA
TSC1	: Tuberos Sclerosis Syndrome Gene 1
TUR	: Transüretal Rezeksiyon
U	: Ünite
UBC	: Üriner Mesane Kanseri
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
WT1	: Wilms-tümör baskılayıcı geni
χ^2	: Ki-kare

ŞEKİLLER

	Sayfa No.
Şekil 1.1. Mesane kanserinde sigara kaynaklı ölüm oranının kadın-erkek ve ülkelere göre dağılımı	7
Şekil 1.2. Beyaz erkek ve kadınlarda yaşa göre üretelyal mesane kanseri gelişimi ..	10
Şekil 1.3. UCC'nin derecelendirilmesi	12
Şekil 1.4. Üretelyal tümörgenezde potansiyel yolaklar	15
Şekil 1.5. Tümör derecelerine göre aktifleşen yolaklar	17
Şekil 1.6. p53 geni ve proteini	21
Şekil 1.7. p53 proteininin uyarıcıları ve sonuçları	22
Şekil 1.8. Tümör dokularında somatik TP53 mutasyonları	23
Şekil 1.9. Kodon 72'nin protein üzerinde gösterimi	29
Şekil 3.1. Tümör patolojilerinin dağılımı	33
Şekil 3.2. Tümör derecelerinin dağılımı	33
Şekil 5.1. İzole edilen DNA'ların %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü	42
Şekil 5.2. p53 Ex 4-9 PZR ürünlerinin %2'lik agaroz jelde görünümü	42
Şekil 5.3. Ex5 kontrol dizisi	43
Şekil 5.4. Ex5 kodon 181 (<u>C</u> GC/ <u>T</u> GC)	43
Şekil 5.5. Ex6 kontrol dizisi	44
Şekil 5.6. Ex6 kodon190 (<u>C</u> CT/ <u>T</u> CT)	44
Şekil 5.7. Ex7 kontrol dizisi (1)	44
Şekil 5.8. Ex7 kodon 234 (<u>T</u> AC/ <u>T</u> GC)	44
Şekil 5.9. Ex7 kontrol dizisi (2)	45
Şekil 5.10. Ex7 kodon 238 (<u>T</u> GT/ <u>T</u> AT)	45
Şekil 5.11. Ex7 kontrol dizisi (3)	45
Şekil 5.12. Ex7 kodon 245 (<u>G</u> GC/ <u>A</u> GC)	45
Şekil 5.13. Ex7 kontrol dizisi (4)	46
Şekil 5.14. Ex7 kodon 249 (<u>A</u> GG/ <u>A</u> TG)	46

Şekil 5.15. Ex8 kontrol dizisi	46
Şekil 5.16. Ex8 kodon 280 (AGA/ACA)	46
Şekil 5.17. Ex4 kontrol dizisi (1)	47
Şekil 5.18. Ex4 kodon 72 (CGC/CCC)	48
Şekil 5.19. Ex4 kontrol dizisi (2).....	48
Şekil 5.20. Ex4 kodon 36 (CCC/CCG)	48
Şekil 5.21. Ex6 kontrol dizisi (2)	48
Şekil 5.22. Ex6 kodon 213 (CGA/CGG)	49
Şekil 5.23. Ex7 kontrol dizisi (5)	49
Şekil 5.24. Ex7 14181. bp (C/T) ve 14168. bp (G/T) (promotöre göre).....	49
Şekil 5.25. Ex9 kontrol dizisi	50
Şekil 5.26. Ex9 14766. bp (promotöre göre) (T/C)	50

TABLolar

	Sayfa No
Tablo 1.1. Mesane kanserinin semptomları	3
Tablo 1.2. Mesane tümörlerinin histopatolojik sınıflandırması	11
Tablo 1.3. Hücre geçişli kansinomlarda bilinen genlerdeki genetik ve epigenetik değişimler	19
Tablo 1.4. Mesane kanseri ile ilişkilendirilmiş p53 mutasyonları	26
Tablo 1.5. Sağlıklı popülasyonlarda kodon 72’de G>C polimorfizminin etnik kökene göre değişimi (p53 Knowledgebase).....	27
Tablo 3.1. Primer dizileri	35
Tablo 4.1. p53 PZR şartları	40
Tablo 4.2. p53 ekzon 4-9 için PZR döngüsü	40
Tablo 5.1. p53 geninde belirlenen mutasyonlar	47
Tablo 5.2. p53 genindeki polimorfizmler	50
Tablo 5.3. Mutasyon bulunan hastaların kodon 72 polimorfizm profili	51
Tablo 5.4. Hardy-Weinberg testi sonuçları	52
Tablo 5.5. Genotiplerin hasta ve sağlıklı bireylerde dağılımı	52
Tablo 5.6. Hasta ve kontrol gruplarının alel frekanslarının karşılaştırılması	53
Tablo 5.7. Model asosiyasyon testi ile hasta ve kontrollerin genotiplerinin karşılaştırılması	53
Tablo 5.8. C alleli taşıyanlar ve risk tahmini	53
Tablo 5.9. Sigara içimi için Ki-kare testi	54
Tablo 5.10. Sigara içimi için risk tahmini	54

GENEL BİLGİLER

Adı ve Soyadı : Sevilay ŞAHOĞLU
Anabilim Dalı : Moleküler Biyoloji ve Genetik
Programı : Moleküler Biyoloji ve Genetik
Tez Danışmanı : Yrd.Doç.Dr.Nagehan ERSOY TUNALI
Tez Türü ve Tarihi : Yüksek Lisans – Eylül 2012

ÖZET

Anormal metabolik yollar ve moleküler kararsızlık mesane kanserinin gelişmesi ve ilerlemesinde rol almaktadır. Bunlar karsinojenlerin değiştirilmiş metabolizma ve detoksifikasyonu ile kalıtsal veya sonradan kazanılmış olan genetik anormalliklerdir. Özellikle p53 genindeki mutasyonlar mesane kanserli hastaların %30-60'ında gösterilmiştir.

Bu tezde amaç mesane kanseri hastalarında p53 geni ekzon 4-9 arasındaki mutasyonların belirlenmesi ve popülasyonlarda oldukça polimorfik olduğu bilinen ve çok çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmiş olan p53 Arg72Pro polimorfizminin sağlıklı bireylerde ve mesane kanseri hastalarında incelenmesi ve bu polimorfizmin mesane kanserine yatkınlıktaki rolünün araştırılmasıdır. Bu çerçevede, 79 hastada polimeraz zincir reaksiyonu ve dizi analizi yöntemiyle p53 mutasyon ve polimorfizmi belirlenmiştir. p53 kodon 181, 190, 238, 249, 234, 245 ve 280 mutasyonları, intron 7 ve intron 9'da polimorfizmler tespit edilmiştir. 79 hasta ve 102 kontrol grubu ile yapılan kodon72 Arg/Pro polimorfizmi analizi sonucunda ise, mesane kanseri ile polimorfizm arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.

Anahtar Kelimeler: Mesane kanseri, polimorfizm, p53, kodon 72, mutasyon

GENERAL INFORMATION

Name and Surname : Sevilay ŞAHOĞLU
Field : Molecular Biology and Genetics
Program : Molecular Biology and Genetics
Supervisor : Assist. Prof. Dr. Nagehan ERSOY TUNALI
Degree Awarded and Date : Master of Science – September 2012

SUMMARY

Abnormal metabolic pathways and molecular instability plays a role in bladder cancer development and progression. These are altered metabolism and detoxification of carcinogens and inherited or acquired genetic abnormalities. Especially, p53 gene mutations are shown in 30% to 60 percent patients with bladder cancer.

In this thesis, the aim is to identify the mutations in p53 between exons 4-9 and investigation of Arg72Pro polymorphism, which is known to be very polymorphic and found to be associated with various diseases, in patients and healthy subjects in an attempt to identify its role in susceptibility to bladder cancer. In this context p53 mutations and polymorphisms were determined with the method of polymerase chain reaction and sequence analysis in 79 patients. Mutations in p53 codons 181, 190, 238, 249, 234, 245 and 280; and polymorphisms in intron 7 and intron 9 have been identified. No association between Arg72Pro polymorphism and the disease was found in the study population of 79 patients and 102 control group.

Keywords: Bladder cancer, polymorphism, p53, codon 72, mutation

1. GİRİŞ

Sanayileşmiş toplumlarda mesane kanseri en yaygın beşinci maligniteye sahiptir. 2007 yılında ABD’de mesane kanseri kaynaklı yaklaşık 13750 ölüm gerçekleşmiştir. Amerika Birleşik Devletleri’nde 2010 yılında 70,530 vakanın (52,760 erkek, 17,770 kadın) 14,680’i ölümlü sonuçlanmıştır (American Cancer Society, 2010). Son 30 yılda mesane kanseri vakalarında yaklaşık %40’lık bir artış görülmektedir. Amerika’da 2012 tarihinde yapılan bir araştırmaya göre, ortalama 70 yaşındaki yaklaşık olarak 56,000 erkek ve 18,000 kadına mesane kanseri teşhisi konulduğu ortaya çıkmıştır (<http://www.cancer.org>).

Mesane kanseri erkeklerde kadınlara oranla 3 kat daha fazla görülmekte ve ABD’deki erkeklerde görülen 4. (ürolojik kanser türleri arasında 2. sırada), kadınlarda ise 8. sıradadır. Beyaz Amerikalıların, Afrikalı Amerikalılarla karşılaştırıldığında 2 kat fazla risk taşıdıkları görülmüştür. Latin Amerikalılar ise Afrikalı Amerikalılardan da daha düşük risk taşımaktadırlar. Cinsiyet ve kökene dayalı nedenler henüz tam olarak anlaşılamamış durumdadır. Mesane kanseri hastalarının %90’ına 55 yaşından sonra bu teşhis konulmaktadır, ancak seyrek de olsa bu hastalığın genç erişkin ve hatta çocuklarda görüldüğü de olmaktadır (American Urological Association Education and Research, Inc, 2007). Az rastalanan çocuk ve daha genç erişkin hastalarda ise genel olarak yavaş ilerleyen düşük seviye tümör görülmüştür (Sexton ve diğ., 2010).

Türk Kanser Araştırma ve Savaş Kurumu’nun hazırladığı Kanser Yüğü 2006 Raporu’na göre mesane kanseri, görülen kanser türleri arasında yaklaşık % 7,8 ile üçüncü sırada yer almaktadır (Akça ve Tokgün, 2012). İzmir’ de görülme sıklığı Kanser İzlem ve Denetim Merkezi (KİDEM) çalışmalarına göre akciğer kanserinden sonra 2. sırada, ürogenital kanserler arasında ise erkeklerde ilk sıradadır (Cüreklibatır ve Demiryöğuran, 2005).

Mesane kanseri teşhislerinin büyük çoğunluğu (%75) kasa yayılma göstermezken (mesane mukozası ve lamina propria ile sınırlı); geri kalan %25’i ise

muscularis propria'ya yayılma göstermiştir. Hastaların yaklaşık %90'ında geçişli hücre karsinoması (TCC) bulunurken, %5'inde pullu hücre karsinoması ve %1-2 arasında adenokarsinoma görülmektedir. Daha küçük oranlarda ise hastalarda birincil küçük hücre karsinoması, mikropapiler tümörler gibi TCC'nin diğer histolojik varyantları görülmektedir. Urakral adenokarsinomalı hastalar için kısmi sistektomi veya pelvik lenfadenektomi düşünülebilir. Küçük hücre karsinomaları saldırgan, genellikle kötü bir ilerleme tahmini ile bağlantılıdır ve neoadjuvan etoposid, sisplatin sistemik kemoterapi ve bunları takip eden sistektomi ve lokalize radyasyon ile kontrol altına alınabilir. TCC'nin mikropapiler varyantları ise mikropapiler karsinomlara benzerler, genellikle yüksek dereceli ve limfovasküler yayılma ile bağlantılıdır ve kasa yayılma olmayan safhada erken radikal sistektomi ile tedavi edilebilir (Sexton ve diğ., 2010).

Tanımlı transizyonel hücre karsinoma varyantları prognostik ve töröpatik açıdan anlamlı olabilir. Mesanenin üretik kanserler sınıfına girmeyen tipleri küçük hücre karsinomları, nöroendokrin, mezankimal tümörler, lenfomalar, lenfoepitelyal varyantlar ve ikincil malignitelerdir.

Mesane kanseri, tümörün sitolojik ve büyüme paterni karakteristiklerine göre sınıflandırılmış ve tümörün dokuda ilerleyişine göre evrelendirilmiştir. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) 1998'de yayınladığı sınıflandırma aşağıda gösterilmiştir (Reuter, 2006).

- Normal
- Hiperplazi
 - Yassı hiperplazi
 - Papiler hiperplazi
- Atipik yassı lezyonlar
 - Reaktif (inflamatuvar) atipi
 - Displazi
 - Karsinoma in situ
- Papiler neoplazmlar
 - Papiloma
 - Papiler karsinoma, yüksek dereceli
 - Papiler karsinoma, alçak dereceli

1.1. Mesane Kanserinin Semptomları ve Tanısı

Mesane kanseri hastalarının büyük bir bölümünde görülen hematüri (idrarda eritrosit görülmesi durumu) sürekli veya aralıklı, gözle görülebilir veya mikroskopik olabilir. Mikroskopik hematüri ile yapılan çalışmalarda, hastaların ortalama %1,3'ünde (%0,4–%6,5) mesane kanseri tanısı konulması beklenirken, gözle görülebilir hematürisi olan hastalarda bu olasılık daha fazladır. Amerikan Ürologlar Derneği hematüri görülen bütün hastaların, özellikle herhangi bir enfeksiyon, taş veya diğer neden olan faktörlerin görülmediği durumlarda, sistoskopi ve üst idrar yolu filmi çekirtmesini tavsiye eder (American Urological Association Education and Research, Inc, 2007). En sık görülen semptomlar Tablo 1.1.'de gösterilmiştir (WebMD internet sitesi, 2011; Bailey ve Sarosdy, 2001).

Tablo 1.1. Mesane kanserinin semptomları

Semptom	Tanımı
Ağrısız hematüri	Ağrı, sık idrara çıkma veya dizüri olmaksızın idrarda kan görülmesi. Hastaların %30 kadarında idrar yolu malignitesi bulunur.
Mikroskopik hematüri	İdrarda çıplak gözle görülmeyecek miktarda kırmızı kan hücrelerinin bulunması. Bunların yaklaşık %10'unda malin hastalık bulunur.
İrritatif semptomlar	Disüri (İdrar sırasında yanma), sık idrara çıkma, böbrek bölgesinde görülen ağrı ile birlikte tam dolu mesane. Mesane tümörü olan hastaların %25'inde bu semptomlardan biri veya daha çoğu bulunur.
Yineleyici idrar yolu enfeksiyonu	Yineleyici bakteriyel sistiti olan yaşlı (50 yaş ve üzeri) hastalarda alta yatan bir tümör olasılığı bulunur.
Sistemik semptomlar	Bel ağrısı, kilo kaybı, bitkinlik, anoreksi, kemik ağrısı, patolojik kırık, öksürük, rektal, anal veya pelvik bölgede ağrı, alt bacaklarda şişme ve anemi

Mesane kanseri, özellikle kasa yayılma olmayan durumlarda, fiziksel muayene esnasında genelde farkedilmez. Kasa yayılma bulunan durumlarda transüretal rezeksiyon sırasında yapılan iki elle muayene klinik aşamalarda yardımcı olabilir. Sitoloji ise ürotelyal karsinomlu hastaların tanı ve takibinde önemli bir yardımcıdır. İdrar yolu ve epitel dokusu sitolojik örnekleme için çok uygundur. İdrar sitolojisi yüksek riski bulunan hastalardaki ürotelyal tümörlerin görüntülenmesi ve derecelendirilmesinde (hematüri olan veya idrar sırasında yanma olan durumlarda),

ayrıca TCC olduğu bilinen hastaların tekrarlama, ilerleme ve tedaviye yanıtlarının izlenmesinde kullanılır. Yüksek dereceli ürotelyal tümörlerde hassaslık ve idrar sitolojisinde pozitif prediktif değerin son derece yüksek olmasının yanı sıra karsinomalı durumlarda hassaslık %90'a ulaşabilir. Sitoloji düşük dereceli tümörlerde daha az başarılıdır. Genel görüntüleme teknikleri damar içi ürogram, retrograd pyelografi ve manyetik rezonans görüntülemeyi (MRI) içermektedir (American Urological Association Education and Research, Inc, 2007).

Her ne kadar kasa yayılma olmayan ürotelyal kanser hastalarının teşhis ve takibinde güvenilen yollar sistoskopi, sitoloji ve gerekli durumlarda biopsi olsa da son yıllarda yayılma olmayan hastalarda idrar-tabanlı markörler sistoskopi ve sitolojinin yerini almıştır. Bu yöntem kasa yayılma olmayan ürotelyal kanser hastalarının hem teşhis, hem de takibinde yardımcı olacaktır. Günümüzde FDA (Food and Drug Administration) onaylı testlerden bazıları şunlardır: Mesane tümörü antijeni testi (STAT), BTA TRAK testi, nükleer matriks proteini (NMP) , ve NMP22 mesane deneyleri, ImmunoCyt testi ve FISH analizleri. Ayrıca yeni bulunan bazı testler ve belirlenen markörler ise şunlardır: Quanticyt, BLCA-4, hyaluronik asit, telomeraz, Lewis kan grubu antijenleri, mikrosatellit polimorfizm analizleri, sitokeratinler ve survivin (American Urological Association Education and Research, Inc, 2007).

Son yıllarda, floresan sistoskopi, konvansiyonel beyaz ışık sistoskopinin tersine, gizli kabarcıklı lezyonların ve karsinomların taranmasını arttıracak bir araç olarak geliştirilmiştir. 5-ALA artırılmış sistoskopi, karsinoma gibi kasa yayılma olmayan mesane tümörlerinin tarama hassasiyetini arttırmıştır. Arttırılmış tarama, tümörün tanımlamasını artırabilir ve ortadan kalkmasını ve tekrarlama oranlarının düşmesini kolaylaştırabilir (American Urological Association Education and Research, Inc, 2007).

Transüretral Rezeksiyon (TUR) 1910 yılında tanımlanmıştır ve kas invaziv olmayan mesane tümörünün tanısı ve tedavisinde öncelikli standart tedavi yöntemi olarak kabul edilmektedir.

Tanı ve tedavi amaçlı yapılan TUR sonrası tümör yüzeysel veya kas invaziv olarak sınıflandırılır. Tanı esnasında bu tümörlerin yaklaşık üçte ikisi yüzeysel mesane kanseri olarak gözlemlenir.

1.2. Tedavi Yöntemleri

Yüzeysel mesane kanserinin standart tedavisi TUR'dur . TUR da amaç komple tümör rezeksiyonu yaparak hastayı tümörsüz bırakmaktır (Konety ve Williams, 2004). TUR sonrası ilk 24 saat içinde uygulanan tek doz epirubicin ve mitomisin, rekürrens oranını %50 oranında düşürdüğünden mesane perforasyon şüphesi olan vakalar dışında tüm yüzeysel mesane tümörlü hastalarda önerilmektedir (Koca ve diğ., 2011).

Mesane tümörlerinde tanısal çalışmaların öncelikli amacı, tedavi yaklaşımları birbirinden tamamiyle farklı olduğundan tümörün yüzeysel (Ta, T1) veya invaziv olup (>T1) olmadığının ve karsinoma in situ (CiS) bulunup bulunmadığının anlaşılmasına yöneliktir.

Kasa yayılma olmayan Ta, T1 ve karsinoma in situ (CIS) ve kasa yayılım gösteren mesane kanserleri farklı şekilde tedavi edilmeliler. Her iki durumda da tedavi cerrahi ve medikal yaklaşımların birleşimini gerektirir.

Ploeg ve arkadaşları başlangıçta cerrahi ve radyoterapi ile tedavi edilmiş hastaların tedavi süreçlerinin kötüye gitmesinden dolayı tekrarlayan kasa yayılan mesane kanseri vakalarına yönelik daha başarılı tedavi yöntemleri bulunması gerektiğini düşünmüşlerdir (Ploeg ve diğ., 2011). Tekrarlanan hastalıktan sonra hayatta kalma süresini belirleyen etkenler şunlardır: uygulanan tedavi tekrarın lokasyonu, hastanın tanı sırasındaki yaşı.

Düşük derece ve evredeki hastalarda kanserin yeniden tekrarlanmaması ve ilerlemesini engellemek için intravesical kemoterapi uygulanması önerilmektedir (NCCN, 2011).

Bacillus Calmette-Guérin (BCG) immünoterapi yöntemi ve diğer intravasikal kemoterapi yöntemleri orta riskli ve tekrar eden vakalarda uygulanabilirken, yüksek riskli hastalarda gerekli değildir. İlerleme ve tekrarlama riski olan T1 yüksek gradeli ve CIS hastalarında intravesikal BCG immünoterapisi tavsiye edilir (Herr ve diğ., 2011).

İlerleme ve tekrar riski orta derecede olan TaT1 tümörlerinde CIS hastaları gibi 1 yıl boyunca BCG tedavisi, daha fazla kemoterapi yerine tercih edilmelidir (Babjuk ve diğ., 2011).

Skuamöz hücre karsinoma hastaları ve skuamöz değişimi için Ehdaie ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada her iki grubun ne kansere özel ve genel sağkalımlarında ne de radikal sistektomi veya pelvik lenf nodunun çıkarımları arasında herhangi bir farklılık bulamamışlardır (Ehdaie ve diğ., 2012).

1.3. Çevresel Faktörlerin Mesane Kanseri Etkisi

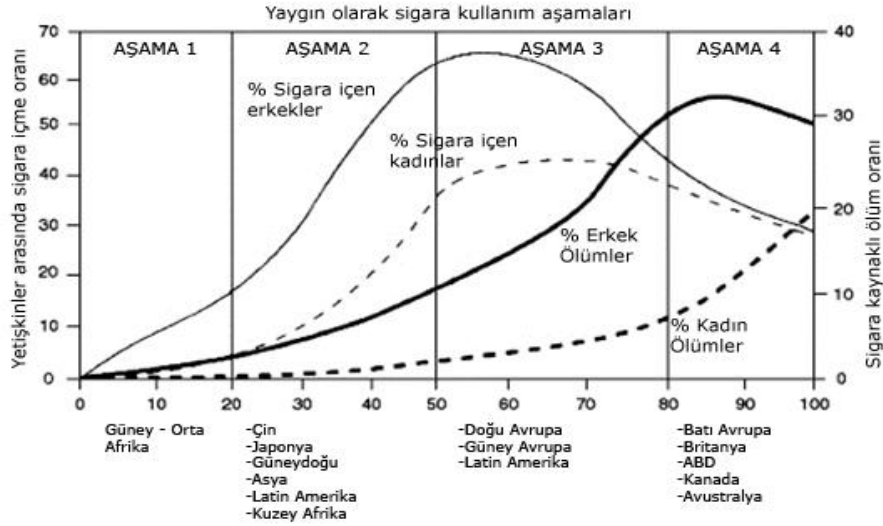
Şimdiye kadar en çok çalışılan konu sigaranın mesane kanseriyle olan ilişkisidir. Ancak sigaranın yanında yiyecek ve içecek tüketimi (özellikle kahve ve alkol tüketimi), mesleki kimyasallara maruz kalma, aromatik aminler (anilin, benzopirin, sıvılaştırılmış doğal gazlar ve diğ), saç boyaları, schistosomiasis enfeksiyonu, kemoterapi ilaçları, farklı coğrafik bölgelerdeki içme sularının içerikleri, ilaç etkileşimleri, ilaçların yan etkileri ve fakir sosyal koşullar da mesane kanseri riski ile ilişkilendirilmektedir. Bunların yanında hava, su ve toprak kirliliği, radyasyona maruz kalma, viral ve bakteriyel enfeksiyonlar, cinsel ilişki ile bulaşan hastalıklar, selenyum alımındaki düşüş, ete eklenen katkı maddeleri de mesane kanseriyle ilişkili bulunmuştur (Joshi ve Preslan, 2011).

1.3.1. Sigara ve Diğer Tütün Ürünleri

Sigara içimi erkeklerde görülen mesane kanserinin %65'i ve kadınların %20-30'u için risk faktörü oluşturmaktadır. Yapılan çalışmalarla en az 6 ay boyunca günde bir adet sigara içen insanların mesane kanserine yakalanma risklerinin hiç sigara içmeyenlere göre 2-3 kat daha fazla olduğu gösterilmiştir. 2-naftilamin ve 4-aminobifenilin sigaradaki karsinojenler olduğu deneylerle kanıtlanmıştır (Dalsu ve diğ., 2009). Sigara içen kadınlarda mesane kanserine yakalanma riskinin sigara içen erkeklere göre daha fazla olduğu düşünülmektedir. (Castalao ve diğ., 2001).

Mesane kanser riskinin sigara içiminin sürekliliği ve sıklığıyla ilişkili olduğu, sigara içiminin yoğunluğunun artmasıyla riskin de arttığı görülmüştür (Silverman ve diğ., 2006). Sigara içmeyi bırakanlarda riskin de düştüğü görülmüştür (Sorahan ve diğ., 1994). Riskin sosyal içicilik ile de ilişkili olabileceği ile ilgili şüpheli sonuçlar ortaya çıkmıştır.

WHO' ülkeler ve kadın-erkek arasındaki üreteryal mesane kanseri farklılıklarını Şekil 1.1. ile göstermiştir.



Şekil 1.1. Mesane kanserinde sigara kaynaklı ölüm oranının kadın-erkek ve ülkelere göre dağılımı (Ploeg ve diğ., 2009).

1.3.2. Meslek

Rehn tarafından ilk kez 1895 yılında anilin boyaları ile mesane kanserleri arasında ilişki kurulmuştur (Cancer Research UK). Daha sonraki çalışmalarda benzidin, 2-naftilamin, 1-naftilamin gibi mesleki kimyasalların da mesane kanserini arttırdığı gösterilmiştir. Kömür ve kömür katranının distilasyonu ile elde edilen bir aromatik amin olan β -naftilaminin mesane kanseri riskini 200 kat arttırdığı Case ve arkadaşları tarafından 1954 yılında gösterilmiştir (Case ve Pearson, 1954). Aromatik aminler gibi boya, metal, endüstriyel yağlar ve polisiklik aromatik hidrokarbonların (PAH) da mesane kanseri riskini arttırdığı gösterilmiştir. Sonuç olarak maden işçileri, baca temizleyiciler, ocakçılar, demirciler, zift ve asfalt yapanlar gibi pek çok endüstriyel meslek sahibi PAH'lara maruz kalmaktadır. Aromatik amin üretiminde, boyayla alakalı üretimde, kauçuk ve kablo üretiminde, tekstil ve deri işlerinde, kömür, alüminyum ve petrol endüstrilerinde bahsi geçen kimyasal ajanlara maruz kalmaktadır.

1.3.3. Alkol

Ağırlıklı olarak hasta-kontrol gruplarında yapılan meta analizlerde alkol tüketiminin erkeklerde mesane kanser riskini arttırdığını göstermişlerdir (Zeegers ve diğ., 2001). Karaciğeri ve hepatik enzimlerin sistemlerini etkileyen yüksek dereceli alkol alımları karsinogen moleküllerinin detoksifikasyonunu düşürür. Ayrıca bunun

yanında etanolün protein sentezini yavaşlatıcı etkisi de görülmüştür. Bunun olası sonuçlarından bir tanesi, malignite değişikliklerine sebep olan hücre tamir mekanizmasının inhibe edilmesidir. Ayrıca etanol karsinojenlerin hücre zarından geçirgenliğini artırabilir ve böylece karsinojenik aktiviteyi de artırabilir. Başka bir açıklama da etanol metaboliti olan asetaldehitin hücre proliferasyonunu etkilediği şeklindedir (Zeegers ve diğ., 2001).

1.3.4. Kahve

Kafein içeren kahve ve çay (özellikle yeşil çay) tüketiminin çok olduğu Japonya’da yapılan bir çalışmada kafein tüketiminin sadece sigara tüketmeyenler veya eski içicilerde mesane kanseri için risk teşkil ettiği gösterilmiştir. Sigara içenlerde kahve tüketimi ile mesane kanseri arasında anlamlı bir ilişki gösterilememiş (Kurahashi ve diğ., 2009).

Yapılan hayvan deneylerinde kahve ve kafeinin ne karsinojenik etkisinin ne de kanseri engelleyici etkisinin olmadığı görülmüştür, ancak Lopez-Abante ve arkadaşları kafeinin sarmalda DNA bileşenlerinin formasyonunu yöneten bileşenlerin ve aromatik aminlerin metabolik aktivasyonu yoluyla mesane kanseri risk faktörü olarak görülebilecek CYP1A2 enzimini tetikleyici etkisi olduğunu önerdiler ve yüksek kahve içiminin (günde 4 fincandan fazla) CYP1A2’ye bağlı olarak enoksidasyon aktivitesini tetiklediği gözlemlenmiştir (Zeegers ve diğ., 2004).

1.3.5. Schistosoma Haematobium Enfeksiyonu

Kronik üriner enfeksiyona sebep olan *Schistosoma haematobium* skomöz hücre karsinomu gelişimiyle ilişkilendirilmiştir. Enfeksiyonun endemik olduğu bölgelere göre bakıldığında, Mısır gibi, skomöz hücre karsinomu (SCC) yıllardır üriner mesane kanserinin (UBC) histopatolojik tipinin baskın olduğu görülür. Bu endemik enfeksiyondan dolayı Mısır batı ülkelerinden neredeyse iki kat yüksek olan 100,000 erkekte 37.1 insidansıyla dünyada UBC insidansının en yüksek olduğu coğrafyadır (Ploeg ve diğ., 2009). *Schistosoma haematobium* yumurtalarının mesanede birikmesi sonucu irritasyon, olası fibrozis, kronik sistit ve karsinojeniz gelişebilir. Enflamasyon sonucunda oluşan Reaktif oksijen türleri (ROS) ve Reaktif nitrojen türleri (RNS) inflamasyona bağlı karsinogeneze sebep olur.

S. haematobium ile indüklenen üriner karsinogenez, inflamasyon prosesi ile oluşan DNA hasarı ve kök hücre aktivasyonu ile ilişkili olabilir. Bunun sonucunda kanser kök hücrelerinin gelişmesine neden olabilir (Ploeg ve diğ., 2009).

1.3.6. İlaçlar

Çok sayıda epidemiyolojik çalışmada aşırı fenasetin içeren analjezik kullananlarda üretelyal kanserlerin (renal pelvis, üreter, mesane) geliştiği gösterilmiştir (Hultengren ve diğ., 1965; Angervall ve diğ., 1969).

Lösemi ve lenfomaların gelişimi ile ilişkisi gösterilen sitotoksik ilaçlardan olan siklofosfamidin metaboliti akroleinin mesane kanserlerine neden olduğu gösterilmiştir. Kemoterapi ajanları gibi diğer çeşitlerinin de mesane kanserinde risk oluşturduğu kanıtlanmıştır. Asetik asitlerin (indometasin, sulindak gibi) 7.5 ppm veya daha yüksek dozlarda kullanımında karsinojenle indüklenen mesane kanserlerinin insidansının azaldığı görülmüştür. Benzer şekilde, propionik asitler (ketoprofen) ve oksikamların (piroksikam) da kanser insidansını azalttığı görülmüştür (Castelao ve diğ., 2000).

Kemirgenlerde yürütülen deneysel araştırmalarda sakkarin ve siklamatlar gibi yapay tatlandırıcıların yüksek dozlarda kullanılması halinde mesane kanseri oldukları gösterilmiştir. Buna karşın insanlarda yürütülmüş vaka-kontrol çalışmaları yapay tatlandırıcılarla mesane kanseri riskinde artış arasında anlamlı ilişki gösterememiştir (Morrison, 1984).

1.3.7. Sıvılar

Birçok çalışmada klorlu içme sularında bir yan ürün olarak veya direk kontaminasyon yoluyla arsenik bulunduğu ve bunun da mesane kanseri riskini arttırabileceği gösterilmiştir. IARC (International Agency for Research on Cancer – Uluslararası kanser araştırmaları ajansı) çalışma grubunun 2004 yılındaki monografında içme sularında bulunan arsenik, insan kanserojeni olarak gösterilmiş ve mesane kanserine neden olduğu bildirilmiştir (IARC).

Blackfoot hastalığı Güney Tayvan'da endemiktir; vasküler ve kardiyak hastalıklarla ve transizyonel karsinomların da aralarında yer aldığı çok sayıda malignensi ile ilişkilidir. Bu hastalığın artezyen kuyularından çok miktarda arsenik alımıyla ilişkili olduğu düşünülmektedir. Benzer endemik mesane kanseri olguları

içme suyunda yüksek oranda arsenik içeren diğer bölgelerde de izlenmiştir (Moore ve diğ., 1997).

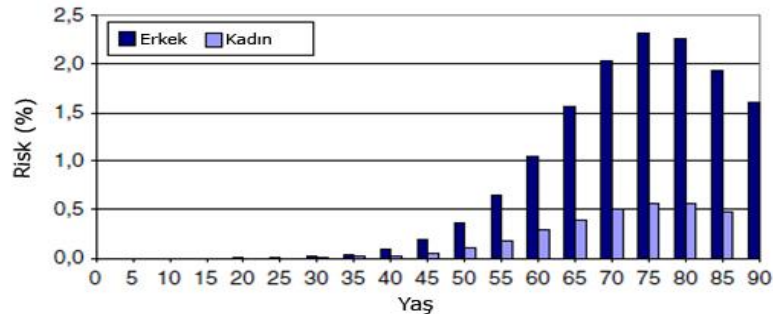
Sebze ve meyve suları çeşitli karsinojenleri modüle eden biyoaktif bileşikler içerirler. Bununla birlikte saflaştırma aşamasında klorlanarak temizlenen içme suları potansiyel karsinojendirler (Michaud ve diğ., 1999).

1.3.8. Cinsiyet Ve Yaş

Mesane kanseri erkeklerde kadınlardan 2-3 kat daha fazla görülmektedir. Bu özellikle endüstrileşmiş ülkeler için doğrudur ve mesleki faktörü düşündürmektedir. Fakat yapılan bazı çalışmalar meslek ve sigara için düzeltme yapıldıktan sonra bile erkeklerde mesane kanseri oranını daha fazla bulmuştur. Beş yıllık sağkalım oranları erkeklerde kadınlardan daha yüksektir.

Mesane kanseri çocukluk çağları dahil her yaşta görülebilir. Bununla birlikte, genellikle orta ve ileri yaşın hastalığıdır. Transizyonel hücreli kanserin ortalama teşhis yaşı erkeklerde 69, kadınlarda ise 71'dir (Dalsu ve diğ., 2009). Ayrıca mesane kanseri insidansı yaşla artar. 70 yaş üstündeki bireylerde mesane kanseri için üç kat daha fazla risk görülmüştür.

Şekil 1.2'de de görüldüğü gibi mesane kanseri hastalarının %90'ına 55 yaşından sonra bu teşhis konulmaktadır, ancak seyrek de olsa bu hastalığın genç erişkin ve hatta çocuklarda görüldüğü de olmaktadır (American Urological Association Education and Research, Inc, 2007). Az rastlanan çocuk ve daha genç erişkin hastalarda ise genel olarak yavaş ilerleyen düşük seviye tümör görülmüştür (Sexton ve diğ., 2010).



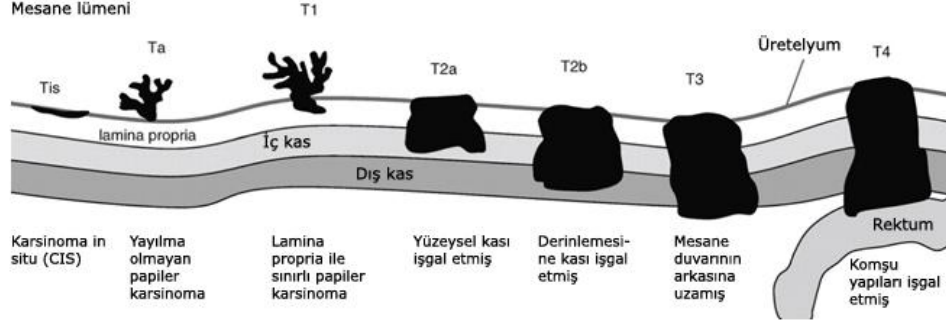
Şekil 1.2. Beyaz erkek ve kadınlarda yaşa göre ürotelyal mesane kanseri gelişimi (Ploeg ve diğ., 2009).

1.4. Tümör Derecelendirmesi

Tablo 1.2.'de yer alan WHO tarafından yapılan histopatolojik sınıflandırma dünyanın hemen her tarafında kullanılmaktadır. Ayrıca Şekil 1.3.'te UCC'nin derecelendirilmesi gösterilmektedir (Macvicar, 2002).

Tablo 1.2. Mesane tümörlerinin histopatolojik sınıflandırması (Macvicar, 2002)

<i>Sembol</i>	<i>Açıklama</i>
PTNM Patoloji Sınıflandırması	
G	Histopatolojik evre belirlemesi
Gx	Farklılaşma evresi değerlendirilemiyor
G1	İyi farklılaşmış
G2	Orta derecede farklılaşmış
G3-4	İyi farklılaşmamış / farklılaşmamış
Primer Tümör	
Tx	Bilinmeyen primer tümör
To	Saptanamayan primer tümör
Ta	İnvaziv olmayan papiller karsinom
Tis	Karsinoma in situ
T1	Subepitelial bağ dokusuna invaze tümör
T1A	Tümör, mukoza ile muskularis mukoza arasında kalan bağ dokusundadır.
T1B	Tümör, muskularis mukoza düzeyindedir.
T1C	Tümör, muskularis mukoza ile propria arasında kalan bağ dokusundadır.
T2	Kasa invaze tümör
T2a	Tümör yüzeysel kas dokusuna invaze (iç yarı)
T2b	Tümör derin kas dokusuna invaze (dış yarı)
T3	Tümör perivezikal dokuya invaze
T3a	Mikroskobik
T3b	Makroskobik (ekstravezikal kitle)
T4	Tümör komşu organlara invaze
T4a	Tümör prostat, uterus veya vajinaya invaze
T4b	Tümör pelvis ve / veya karın duvarına invaze
Bölgesel Lenf Nodları (N)	
Nx	Bilinmeyen lenf nodu metastazı
No	Bölgesel lenf nodu metastazı yok
N1	Tek bir lenf nodunda 2 cm' den küçük metastaz
N2	Tek bir lenf nodunda 2-5 cm arasında ya da birden fazla lenf nodunda <5 cm olmayan metastaz
N3	5 cm< lenf nodu metastazı
Uzak Metastaz	
Mx	Bilinmeyen uzak metastaz
Mo	Uzak metastaz yok
M1	Uzak metastaz var



Şekil 1.3. UCC'nin derecelendirilmesi (Knowles, 2006).

Tümör derecesi ve evresi arasında belirgin bir ilişki bulunmaktadır. İyi ve orta diferansiye tümörlerin çoğu yüzeysel iken kötü diferansiye tümörler invaziv olma eğilimindedir. Sitogenetik ve moleküler verilere göre düşük dereceli (iyi ve orta diferansiye) tümörlerle, yüksek dereceli (kötü diferansiye) tümörlerin orijini farklıdır. Mesane kanserlerinin %35-50'sinde görülen RB ve p53 genlerindeki değişimler yüksek evre ve yüksek derece TCC ler ile ilişkilendirilmiştir. 9. Kromozomun 9p21 bölgesinin silinmesi ise erken evre TCC ile ilişkilendirilmiştir (Doherty ve diğ., 2003).

WHO ve Uluslararası Ürolojik Patoloji Topluluğu (ISUP) 1988 yılında yapılan konferansta genel kabul görececek bir sınıflandırma sistemi geliştirilmesini amaçlamış ve bu konferans sonrasında bu tümörlerin papiller üroteloyal neoplazmlar olarak sınıflanmasına karar verilmiştir (Epstein ve diğ., 1998).

Papilloma (derece 0); normal mesane mukozası ile çevrili fibrovasküler çekirdekli papiller lezyondur (Cheng ve diğ., 1999). Üroteloyal tümörlerden farklı olarak histolojik anormallik yoktur ve endoskopik rezeksiyondan sonra tekrarlamaz. Tek lezyon olarak saptandığında iyi huylu tümör olarak kabul edilir ancak sıklıkla yüksek dereceli üroteloyal tümörlerle birlikte görüldüğü unutulmamalıdır (Cheng ve diğ., 1999). İyi diferansiye (derece 1) tümörler; mukozaya sınırlı olduklarında WHO ve ISUP tarafından düşük malignite potansiyeli papiller üroteloyal tümörler olarak tanımlanmışlardır (Epstein ve diğ., 1998).

Bununla birlikte, sıklıkla tekrarlamakta hatta nüksler daha yüksek histolojik derece ve evrede olabilmektedir (Cheng ve diğ., 1999). Yüksek dereceli tümörlerle birlikte bulunabilmesi ve derece 2 tümörlerle benzer prognostik özellikler göstermesi

nedeniyle dikkatle izlenmelidir. Orta derece diferansiye tümörler (derece 2); WHO ve ISUP tarafından düşük dereceli ürotelyal karsinom olarak tanımlanmıştır.

Kötü diferansiye tümörler (derece 3); WHO ve ISUP tarafından yüksek dereceli ürotelyal karsinom olarak tanımlanmıştır. Düşük dereceli lezyonlara göre çok fazla progresyon riski vardır, ayrıca eş zamanlı invaziv hastalık görülme riski de fazladır.

1.5. Mesane Kanserinin Moleküler Mekanizması

Kasa yayılan ve yayılmayan karsinomlarda biyolojik ve klinik bulguların doğrultusunda elde edilen moleküler genetik bulgular sonucunda mesane kanseri oluşumu için iki yolak bulunmuştur. Halbuki yayılan ürotelyal karsinomaların çoğu displazyanın yassı CIS'e doğru ilerlemesinden ve yüksek derece yayılımcı olmayan lezyonlardan kaynaklanırken, yüzeysel ürotelyal lezyonların iyi huylu tümör ürotelyumdan ürotelyal hiperplezi prosesi sayesinde geliştiği düşünülür. Yayılımcı olmayan lezyonların yaklaşık %10-15'i kasa yayılım gösteren hastalıklara doğru gelişirler. Bu değişimde genetik düzensizlik çok önemli bir etkidir (Netto, 2011).

Anormal metabolik yollar ve moleküler kararsızlık mesane kanserinin gelişmesi ve ilerlemesinde rol almaktadır. Bunlar kısaca: 1. karsinojenlerin değiştirilmiş metabolizma ve detoksifikasyonu ve 2. kalıtsal veya sonradan kazanılmış olan genetik anormalliklerdir (DNA tamir mekanizmasının bozulması, tümör hücre proliferasyonunun engellenmesi, tümör gelişiminin baskılanmasıdır). Egzojen karsinojenlerin değiştirilmiş kimyasal metabolizmalarını içeren yollar anormal sitokrom P450 metabolizması (genetik defektlerle ilişkili), glutatyon-s-transferaz anormallikleri ve N-asetiltransferazın genetik ve metabolik bozukluklarını kapsamaktadır. Genetik dengesizlik anormal onkogen aktivitesi (*ras* ve *myc* aileleri) yüzünden anormal protein ekspresyonları (GDP/GTP bağlama proteinleri), hücresel proliferasyon ve apoptozun baskılanması gibi sonuçlara sebep olabilir (American Urological Association Education and Research, Inc, 2007).

Ras–MAPK ve PI3K–AKT–mTOR yollarındaki değişimler ürotelyal neoplaziyada hücre büyümesinden sorumludurlar. Ras alt ailesinin kodlanan bölgesindeki mutasyonların aktive edilmesi MAPK ve PI3K yolağının aktivasyonuna öncülük eder. Mo ve arkadaşları invaziv olmayan papiller ürotelyal neoplazmalarda

erken oncogenezin altında yatan biyomoleküler yolağı açıklayan bir model önerdiler. Bu modelde Ras, PI3K–AKT–mTOR ve JAK–STAT aktive ederek sağkalımı ve anjiyogenezi yükseltmektedir (promote). mTOR yolağının inhibitörü olan tümör süppresör genin inaktivasyonu JAK-STAT yolağının ve AKT proteinin aktivasyonunu yönetebilmektedir. FGFR3 mutasyonları Ras aktivasyonunu tetikleyebilir. PIK3CA ve FGFR3 mutasyonları genellikle birlikte gerçekleşirler, bu mutasyonların onkogenik etkiye katkısı olduğu kanıtlanmıştır (Netto, 2011).

Mesane kanseri ile ilişkilendirilen tümör baskılayıcı genlerden en çok ve kapsamlı çalışılanlarından p53, p21, p16 ve Rb (retinoblastoma) genlerinin mutasyonlu veya inaktif olması sonucu olarak tümör hücresi gelişim ve ilerlemesinde ve hücre döngüsü düzensizliklerine doğru eğilim olabilir (Malats ve diğ., 2005). Aynı şekilde DNA tamir mekanizmasındaki polimorfizmler de üretelyal mesane kanseri oluşumuna sebep olabilir (Matullo ve diğ., 2005). Bunların yanında apoptozis ve hücrel inflamasyon gibi potansiyel yolaklar da tanımlanmıştır (Wu ve diğ., 2003).

1.5.1. Kromozomal Değişiklikler

Kromozom 9'un büyük bir kısmının özellikle de 9q bölgesinin kaybı sıklıkla görülmektedir. İki yolak önerilmiştir: 9q'nun silinmesiyle sonuçlanan displazi ve hiperplazi ve fibroblast büyüme faktörü reseptörü 3 (FGFR3)'ün mutasyonlarının aktivasyonu genetik olarak stabil düşük dereceli papiller tümöre sebep olur. İkinci yolak ise erken p53 mutasyonları nedeniyle oluşan yassı, yüksek dereceli lezyonlar içerir, yüksek dereceli displazi oluşumudur (Sexton ve diğ., 2010).

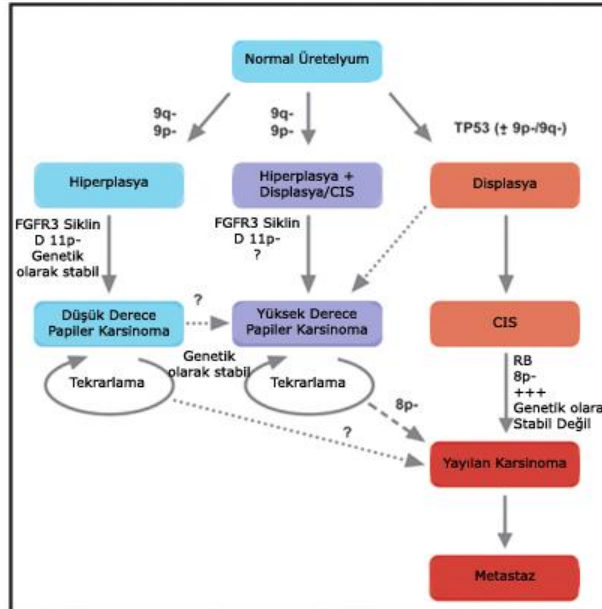
Kromozom 9 kaybı evre ve dereceleri ne olursa olsun bütün mesane kanserlerinin en az %50'sinde bulunmuştur. Kromozomun iki kolunda da tümör baskılayıcı genler bulunmaktadır. Bu genlerin belirlenmesi hastalığın patogenezi anlamada ve klinikte markör olarak kullanılabilceği düşünülmüştür. LOH (Heterozigotluk Kaybı)'un gerçekleştiği kritik bölgeler 9p ve 9q olarak haritalanmıştır. Küçük primer tümörlerde küçük delesyonların frekanslarının daha yüksek olduğu görülmüştür.

Şimdilik 9p'de bir bölge (9p21), 9q'da ise (9q22, 9q32–q33 ve 9q34) üç bölgenin kaybı haritalanmıştır. Bu bölgelerde CDKN2A/ARF (p16/p14ARF) ve CDKN2B (p15) genleri 9p21'de, PTCH (Gorlin Sendromu Geni) 9q22'de, DBC1

geninin 9q32–q33’de ve TSC1 (Tuberous Sclerosis Syndrome gene 1) geninin 9q34’de olduğu düşünölen genlerdir (Berggen ve diğ., 2003).

Geçtiğimiz beş yıl boyunca genom ilişkili çalışmalar (genome-wide association studies-GWAS) kompleks insan hastalıklarının spesifik kromozom bölgeleriyle ilişkili olduğunu göstermiştir. Son üç GWAS beyaz ırkta mesane kanseri riskinin kromozom 8q24’te rs9642880 ve rs2294008 3q28 ta rs710521 ve 4p16.3 bölgesinde rs798766 değişimlerinin ilişkili olduğu tanımlanmıştır (Wang ve diğ., 2011).

Mesane kanserlerinin %40’ında 11p delesyonu ortaya çıkmıştır (Stein ve diğ., 1996) . Olumi ve arkadaşları 43 hastayla yaptıkları çalışmada 11p delesyonunun tamamen farklılaşmış ve kasa yayılım gösteren kanserlerde olduğunu göstermişlerdir. Kromozomun 11p13 bölgesinde Wilms-tümör baskılayıcı geni (WT1) yer almaktadır. Ancak üretelyal karsinomlu hastalarla yapılan çalışmalarda 11p15.2, 11p15.2 ve 11p15.5 bölgesinin önemli olabileceğini görmüşlerdir. Bu da gösteriyor ki WT1 geninden başka tümör baskılayıcı genleri de tümörün progresyonundan sorumlu olabilir (Brauers ve Jakse, 2000). Şekil 1.4’te de görüldüğü gibi üretelyal kanser gelişiminde kromozom 11, 9, 8’ de görölen delesyonlar bazı yollaklarda yer almaktadır.



Şekil 1.4. Üretelyal tümörgenezde potansiyel yollaklar (Brauers ve Jakse, 2000).

1.5.2. Onkogenler

1.5.2.1. FGFR3

FGFR3 genindeki mutasyonlar mesane kanseri ile ilişkilendirilmiştir. Mutasyonlar daha çok düşük dereceli ve evreli tümörlerde ve düşük evreli pTa tümörlerinin %80'i ile ilişkilendirilmiştir. UCC'de bulunan mutasyonlar exon 7,10 ve 15'teki hot-spotlarda görülür ve bunların, reseptörün kinaz aktivitesinin aktifleşmesine neden olduğu tahmin edilir.

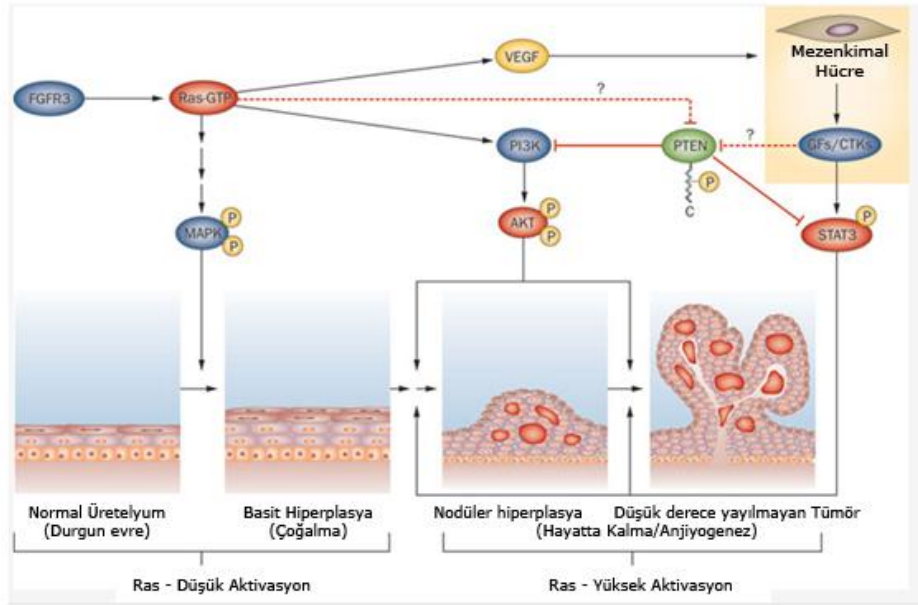
FGFR3'nin üreteryumdaki aktivasyonunun sonuçları tam olarak bilinmemekle birlikte MAPK ve PI3-kinaz yollarının aktivasyonunda rol aldığı söylenebilir. Hem Ras geni hem de FGFR3 mutasyonları low-grade tümörlerin %82'de görülmüştür ve bu gösterir ki ortak bir biyolojik mekanizma neredeyse bütün yüzeysel UCClerde görülebilir (Knowles, 2006).

Mesane kanserinde FGFR3 geninde 5 farklı mutasyon görülmüştür (R248C, S249C, G372C, K652E, Y375C). Çalışmalarda S249C mutasyonunun (TCC→TCG dönüşümü) mesane tümörlerinin %69'unda görülmüştür. FGFR3 mutasyonları sıklıkla düşük gradeli hastalarda görünmesine rağmen (pTa tümörlerinde %74) pT1'de %21, pT2-4 tümörlerinde %16 oranında olduğu görülmüştür (Şekil 1.5) (Billerey ve diğ., 2001, Tomlinson ve diğ., 2007).

1.5.2.2. RAS Onkogeni

H-ras, K-ras ve N-ras genlerini içeren ras gen ailesinin bir üyesi olan C-H-ras geni mesane kanseri ile ilişkilendirilmiştir. Bu onkogenler hücre içinde sinyal iletiminde ve oluşumunda önemli bir rol alan ve GTPaz aktivitesi olan 21kDa protein kodlar. C-H-ras geninde kodon 12-13 ve 61'de mesane kanseriyle ilişkili üç nokta mutasyon belirlenmiştir. C-K-ras geninin kodon 13'te ise bir nokta mutasyonu görülmüştür. Yeni moleküler teknikler kullanılarak ras değişimlerinin mesane kanseri hastalarının %20-50'sinde gözlemlendiği belirlenmiştir (Brauers ve Jakse., 2000).

İnsan tümör hücreleriyle yapılan *in vitro* deneylerde H-ras'ın IGFR ifadesini arttırdığı ve böylelikle yayılımcı fenotipi indüklediği görülmüştür (Theodorescu ve diğ., 1991).



Şekil 1.5. Tümör derecelerine göre aktifleşen yollar (Netto, 2011)

1.5.3. Tümör Baskılayıcı Genler

1.5.3.1 C-erB1 ve C-erB2

Mesane kanseri hastalarının idrarlarında yüksek konsantrasyonda epidermal büyüme faktörünün (EGF) bulunması EGF ve epidermal büyüme faktörü reseptörünün (EGFR) testlerde kullanılabilceğini düşündürmüştür. EGFR; ekstraselüler EGF bağlanma domeyni, bir transmembran kısmı ve hücre içinde ATP bağlanma bölgesi içeren tirozin kinaz aktivitesine sahip bölümlerden oluşmaktadır. Hücre içindeki sinyal transferinin başlayabilmesi EGFR reseptörünün otofosforlanmasını gerektirir. Reseptörün yapısal değişimi liganda bağlanmasını etkiler ve bu durum hücre proliferasyonunun hızlandırılması ve kinaz aktivitesinin artmasını başlatır. C-erB1 geni mesane kanserinde ileri histopatolojik stage ile ilişkilendirilmiştir (Brauers ve Jakse, 2000).

EGFR'nin artması ve tümör derece değişimleri arasında ilişki olduğu öngörülmüştür. Moriama ve arkadaşları kasa yayılım gösteren mesane kanseri örneklerinin %80'inde artan C-erB2 gen artışı olduğunu ve bunun ileri histopatolojik evrelerle ilişkilendirildiğini belirlemiştir (Moriama ve diğ., 1991).

1.5.3.2. CCND1

11q13d bölgesinde bulunan CCND1 protoonkogeni mesane kanserinde aşırı ifade edilmektedir. Bu genin ürünü olan siklin D1 Rb yolağı aracılığı ile hücre

döngüsü prosesinde yer alır. Ayrıca CCND1'in aşırı ifadesi erken tümör tekrarlarında ilişkilendirilirken sağkalımla ilişkilendirilmez (Brauers ve Jakse, 2000).

1.5.3.3. MYC

Kromozom 8'in uzun kolunda yer alan C-MYC geninin floresan in situ hibridizasyon (FISH) ve genomik hibridizasyon yöntemleri kullanılarak yüksek derece ve safhalardaki mesane tümörlerinde kopya sayısının artmış olduğu görülmüştür. MYC onkogeninin aşırı ifadelenmesi yüksek derecedeki mesane kanserlerinde görülürken sağkalımla ve hastalığın ilerleyişiyle ilgili anlamlı bir ilişkisi görülemez (Brauers ve Jakse, 2000). UCC, MYC ve MAPK gibi diğer moleküler yollarla da transkripsiyonel olarak aktif edilmektedir (Knowles, 2006).

1.5.3.4. E2F3

Mesane kanser dokularında ve hücre kültürlerinde 6p bölgesinde E2F3 geninin ifade edildiği görülmüştür. Kasa yayılım gösteren UCC'lerin yaklaşık olarak %14'ünde E2F3 ifade edildiği görülmüştür. 7 gen içeren E2F transkripsiyon faktör ailesinin RB'ye bağlı olarak etki gösterdiği bilinmektedir (Knowles, 2006).

1.5.3.5. PTEN

10q23'te yer alan PTEN (Phosphatase and Tensin Homologue Deleted on Chromosome 10) geninin bir bölümünde heterozigotluk kaybının olması yüksek derece ve evredeki UCC'lerde görülmüştür (Tablo 1.3.). PI3 kinaz yolağında negatif düzenleyici olan PTEN hücre göçü, apoptoz ve proliferasyonu içeren yollarla hücre fenotipini etkilemektedir (Knowles, 2006).

Hastaların %94'ünde PTEN proteininin anlamlı olarak azalmış olduğu gösterilmiştir. Bu azalma hastalığın derecesi ve safhasıyla bağlantılıdır. PTEN eksikliği yüzeysel papiller TCCyi başlatarak veya CIS'in ileri yayılmacı ve metastatik formlara dönüşümünü artırarak mesane kanserine yol açabilir (Tsuruta ve diğ., 2006).

Tablo 1.3. Geçişli hücre karsinomlarında bilinen genlerdeki genetik ve epigenetik değişimler (Knowles, 2006).

Hücre geçişli karsinomalarda bilinen genlerdeki genetik ve epigenetik değişimler		
Gen (Sitogenetik pozisyon)	Değişim	Frekans/Klinik Bağlantı
Onkogenler		
HRAS (11p15)/NRAS (1p13)KRAS2 (12p12)	Mutasyonu aktive eder	%10-15 / Bütün safha ve derecelerde
FGFR2 (4p16)	Mutasyonu aktive eder	%30-80 / Genellikle düşük safha/derece
ERBB2 (17q)	Ampfikasyon/yüksek doz	%10-14 / Yüksek safha/derece
CCND1 (11q13)	Ampfikasyon/yüksek doz	%10-20 / Bütün safha ve derecelerde
MDM2 (12q13)	Ampfikasyon/yüksek doz	Amplifikasyon %4, yüksek derece, %30 yüksek doz, düşük derece
E2F3(6p22)	Ampfikasyon/yüksek doz	Tümör hücre dizilerinde yükselme ve %11 ≥ T1 tümörleri
Tümör baskılayıcı genler		
RASSF1A (3p21)	Metilasyon	Genelde %62, yüksek derece, ilerleme
FHIT(3p14)	Delesyon/Metilasyon	Ürotelyal transformasyon sırasında(in vitro) delesyon, %44 LOH, genelde kasa yayılan, %61 düşük yoğunluk, %16 metilasyon
CDKN2A (9p21)	HD/Metilasyon/Mutasyon	%20-30 yüksek safha/derece; %60 LOH bütün safha ve derecelerde;
PTCH (9q22)	Delesyon/Mutasyon	%60 LOH bütün safha/derecelerde; düşük frekanslı mutasyon
DBC1 (9q32-33)	Delesyon/Metilasyon	%60 LOH bütün safha/derecelerde
TSC1 (9q34)	Delesyon/Mutasyon	%60 LOH bütün safha/derecelerde; %13 mutasyon
PTEN (10q23)	HD/Mutasyon	Kasa yayılan durumlarda %30-35 10q LOH, %17 mutasyon yüksek derecede
RB1 (13q14)	Delesyon/Mutasyon	Toplamda %10-15, Kasa yayılma durumunda %37
TP53 (17p13)	Delesyon/Mutasyon	Kasa yayılan durumlarda %70

1.6. p53

1979 yılında p53 proteini A.Levine, P.May ve L.Old'un yaptığı çalışmalar sonucu keşfedilmiştir (p53.free). Kromozom 17'nin kısa kolunda (17p13.1) yer alan TP53 geni çoğu hayvan türleri arasında yüksek oranda korunmuştur. 20 kb büyüklüğünde olan dizisi, 11 ekzon içermektedir. Fakat 10 Kb civarında olan ilk ekzon kodlanmamaktadır. Evrimsel süreç boyunca yüksek oranda korunan p53 proteini 393 aminoasit içermektedir. Protein 1 N terminal bölgesi(1-42 aa), 1 protein yönünden zengince bölge (63-97 aa), DNA'ya bağlanmak için önemli olan kor domeyn (102-292aa) ve tetramerizasyon domeyni (323-356aa) ve 1 tane de C-terminal bölgesinden (363-393aa) oluşmaktadır. Bu bölgelerden özellikle kor domeyni değişik insan kanseri tiplerinde birçok mutasyon içermektedir. P53'ün C-terminal bölgesi Mdm2' nin (murine double minute 2) N- terminal bölgesine bağlanır (Vama ve diğ., 2011).

P53 proteininde kabul edilen 5 bölge:

1. Amino terminali: 1-42'a kadar olan amino asit rezidülerinden oluşan asidik bir transaktivasyon bölgesi ve MDM2 proteini bağlanma bölgesidir. Bu bölge, gen ekspresyonunu düzenler. Amino terminali içindeki bazı amino asitler, hedef

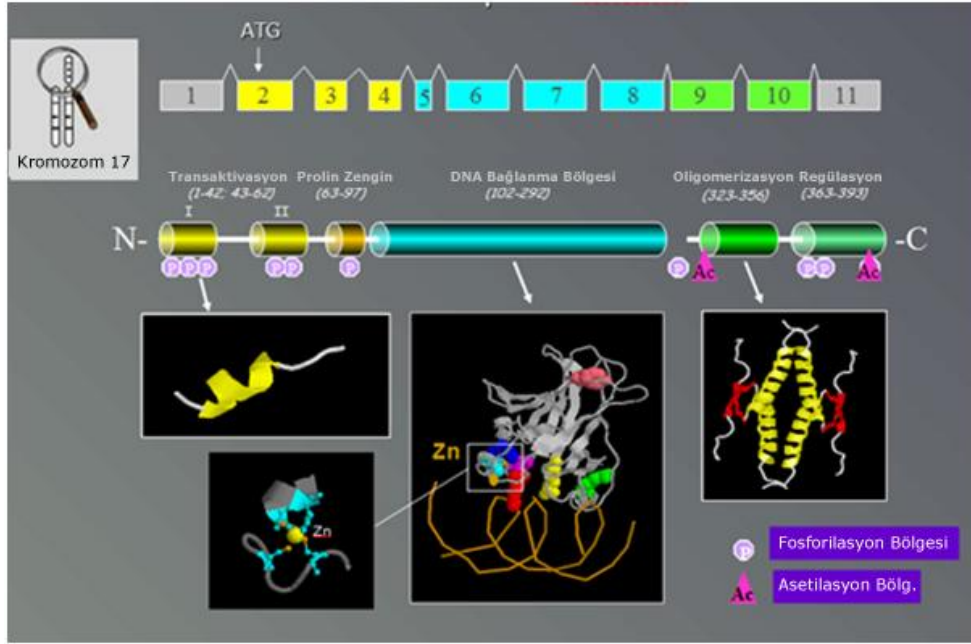
genlerin p53 tarafından pozitif ve negatif regülasyonu açısından kritik görünmektedirler (Smith ve diğ., 2003).

2. Proteince zengin bölge: Şekil 1.6'da görüldüğü gibi 63-97'e kadar olan amino asit rezidülerinden oluşan p53'ün çoğunluğunda korunmuş olan, tekrar eden prolin rezidüleri serilerini içeren bölgedir. Bu bölge transaktivasyon fonksiyonu ve apoptoz için de gereklidir ve p53'ün negatif regülasyonunda görev almaktadır (Cadwell ve Zambetti, 2001).

3. Kor bölge: 102-292'ya kadar olan amino asit rezidülerinden oluşan diziye özgü DNA bağlama bölgesini kapsamaktadır. Diziye özgü DNA bağlama bölgesi, DNA'ya fiziksel olarak bağlanan 2 alfa heliks ilmek için bir yapı iskelesi görevi gören anti paralel beta bir tabakadır. Yanlış anlamlı mutasyonların %90'dan fazlası bu bölgede oluşmakta, bu da proteinin yapısal bütünlüğünün kaybına sebep olmaktadır (Levine, 1997). DNA bağlama bölgesindeki mutasyonlar p53'ün tümör supresör aktivitesini değiştirirler ve kanserde yaygındırlar (Smith ve diğ., 2003).

4. Oligomerizasyon (tetramerizasyon) bölgesi: 323-356'e kadar olan amino asit rezidülerinden oluşan bölgedir. Dimerizasyon için gerekli olan bir alfa-heliks tarafından izlenen beta zinciri içerir. P53, iki dimerden oluşan bir dimerdir. Oligomerizasyon bölgesinde bir nükleer eksport sinyali (nuclear export signal) lokalize olmuştur. Normal p53 fonksiyonu, oligomerizasyon bölgesi tarafından düzenlenen bir işlem olan, proteinin oligomerizasyonu ve özel konformasyonuna da bağlıdır. P53'ün tetramerik formu olan dimerinin, DNA'yla veya çeşitli proteinlerle karşılıklı etkileşmek için artırılmış yeteneği vardır. Yaygın olmasa da, oligomerizasyon bölgesindeki mutasyonlar, tetramerizasyonu, DNA bağlayıcılığını ve tümör hücresi gelişmesinin inhibe edilmesini engeller (Levine, 1997).

5. Karboksi terminali: 363-393'e kadar olan amino asit rezidülerinden oluşan bazik bölgedir. Üç adet nükleer lokalizasyon siyali (NLS) ve hasarlı DNA'ya bağlanan spesifik olmayan bir DNA bağlama bölgesi, ayrıca RNA'ya özel olarak bağlanan amino asitler içerir. Bu bölge, kor bölgenin DNA bağlanma özelliğinin negatif regülasyonunda ve DNA tamir mekanizmasının p53 tarafından regülasyonunda görevlidir (Smith ve diğ., 2003). Bu bölgenin p53'ün apoptotik aktivitesini kontrol ettiği de gösterilmiştir.



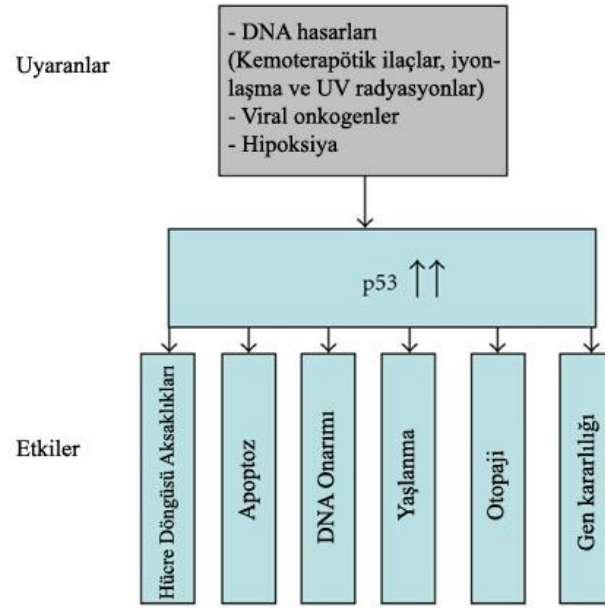
Şekil 1.6. p53 geni ve proteini (<http://www-p53.iarc.fr/>)

Tümör baskılayıcı p53; strese verilen cevapta, genomik stabilitenin korunmasında, DNA hasarı oluşturacak tehditlere verilen cevapta, hipoksi, metabolik stres ve onkogenik aktivasyonda anahtar göreve sahiptir (Şekil 1.7). DNA'daki özel cevap elementlerine bağlanarak tümör büyümesine karşı verilen cevapta (hücre döngüsünün durması, apoptoz, genetik bütünlüğün korunmasında, angiyojenin durdurulmasında vb.) görev alan genlerin transkripsiyonunu düzenler (Vama ve diğ., 2011).

p53 proteini DNA tamiri, hücre döngüsünün kontrolü, genomik kararlılığın sağlanması, kromozom ayrılmasının düzenlenmesi, gen ifadesinin düzenlenmesi, yaşlanma ve programlı hücre ölümü gibi birçok hücrel olayda rol almaktadır. p53, bu işlevlerini ya transkripsiyon faktörü olarak ilgili genlerin transkripsiyonlarını düzenleyerek ya da diğer proteinler ile veya doğrudan DNA ile fiziksel olarak etkileşerek gerçekleştirmektedir (Harris, 1996).

p53, hücre döngüsünün G0/G1 evresinde rol alan birçok siklin bağımlı kinazın işlevini engelleyen p21 proteininin ifadesini, p21WAF2/Cip1 geninin transkripsiyonunu uyararak düzenlemekte ve böylece p21 proteini aracılığı ile hücre döngüsünü G1 aşamasında durdurmaktadır (Harris, 1996). p53 ayrıca, mitoz bölünme için gerekli proteinleri kodlayan c-myc ve c-fos gibi genlerin transkripsiyonlarını düzenleyen E2F transkripsiyon faktörü ile fiziksel olarak

etkileşerek hücre döngüsünün G2 evresinde durdurulmasında da rol almaktadır. p53, DNA tamiri ve DNA sentez mekanizmasında rol alan PCNA (proliferating cell nuclear antigen), GADD45 (growth arrest and DNA damage inducible 45) proteinlerini ve programlı hücre ölümünde rol alan PUMA (p53 up-regulated modulator of apoptosis), Noxa (Latin for “damage”), Bax (Bcl-2-associated X protein) ve Fas gibi proteinlerin transkripsiyonlarını da düzenlenmektedir (Bunz, 1998).



Şekil 1.7. p53 proteininin uyaranları ve sonuçları (Vama ve diğ., 2011).

P53 yolağındaki bozukluk insan kanserlerinin en önemli işaretidir. p53 yokluğu ve fonksiyon kaybı ile sonuçlanan p53'ün somatik mutasyonları, tümör oluşumundaki en yaygın mekanizmadır. p53'ün doğrudan kaybı bazı kanser türlerinde istenmeyen prognozlarla ilişkilidir.

Hem spontan olarak hem de DNA hasarının bir sonucu olarak, sporadik kanserlerde tümörle ilişkili mutasyonlar oluşabilir. Tümör oluşumunda görev alan mutasyonlar genellikle tek baz değişimleridir, ve bunlar p53'ün DNA-bağlayıcı bölgesinde (DBD) amino asit değişimleri ile sonuçlanır.

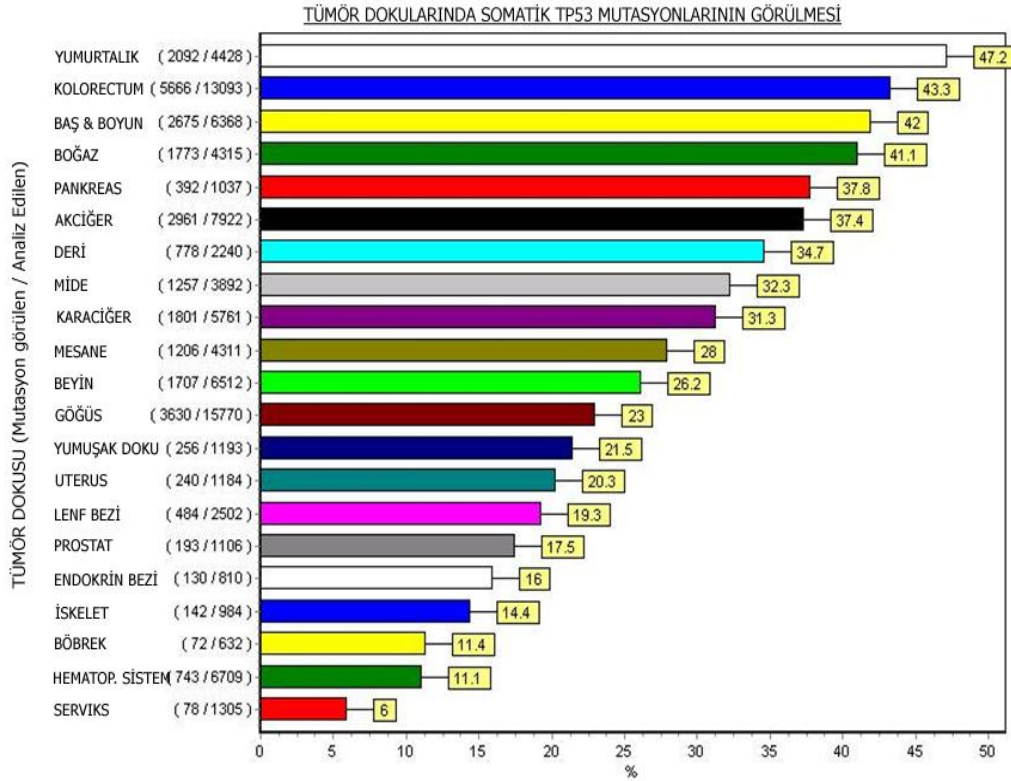
Genellikle, mutant tümör ilişkili p53 proteinleri kısmen ya da tamamen normal p53 fonksiyonlarını kaybetmiştir. Her ne kadar bu tümör oluşumunda sık

görülen bir mekanizma da olsa, bazı kanser türlerinde p53'ün negatif düzenleyicilerinin gen amplifikasyonu da görülebilir.

Li-Fraumeni sendromuna sahip bireylerin eşey hücrelerinde TP53 gen mutasyonu bulunur, bu da birçok kanser türü için artmış riske yol açar. Somatik tümör ilişkili mutasyonlar çoğunlukla kor domeyndeki missense baz değişimleridir ve bunun sonucunda bozuk proteinler kodlanır (Whibley ve diğ., 2009).

1.6.1. p53 ve kanser

p53'ün evrensel mutasyon veri tabanı (<http://www-p53.iarc.fr/>) 30.500 mutasyon içermektedir. Bunlardan %20-30'u malign melanomlarda, %50'si yüzeysel mesane kanserlerinde, %29'u küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinde, %58'i hepatasellüler karsinomlarda, ve %25'i meme kanserlerinde bulunmuştur (Şekil.1.8).



Şekil 1.8. Tümör dokularında somatik TP53 mutasyonları (IARC TP53 database, R15 release, Kasım 2010).

P53'ü diğer tümör baskılayıcı genlerden ayıran yegane özelliği inaktivasyon şeklidir. Birçok tümör baskılayıcı gen, protein sentezini engelleyen çerçeve kayması ve anlamsız mutasyonlarla inaktive edilirken, p53 değişimlerinin büyük bölümü kararlı, normal uzunlukta proteinin sentezlenmesini sağlayan yanlış anlamlı

mutasyonlardır. Böylece p53 spesifik DNA bağlanma özelliğini yitirir ve tümör hücrelerinin nükleuslarında birikir. Tümör hücrelerindeki bu mutant p53'ün korunmasının iki etkiye yol açtığına inanılmaktadır; mutant olmayan allelin ifade ettiği yabancı p53'ü inhibe eden dominant negatif aktivite ve mutant p53'ü dominant onkogene transforme eden fonksiyon kazanımıdır. P53 proteininin önemli özelliği DNA bağlayan bölgenin aşırı esnekliği ve kırılabilirliğidir. p53 mutasyonlarının çoğunun protein DNA bağlanma bölgesinde olması, p53 mutasyon analiz çalışmalarının %80'den fazlasını 5 ile 8. ekzonlar arasında yoğunlaşmasına sebep olmuştur (Soussi ve Lozano, 2005).

p53 proteini kristal yapı incelemeleri p53 proteinin yapısını ve DNA ile nasıl bir düzlemde ilişki kurduğunu ortaya koyduğu gibi p53 geninde gerçekleşen mutasyonların rollerini de ortaya koymuştur. Bu çalışmalar ile p53 proteininde tanımlanmış olan mutasyonların %20'sinin proteinin DNA'ya bağlandığı bölgede bulunan 2 arjinin amino asitinin değişimiyle gerçekleştiği belirlenmiştir. DNA-p53 protein kristal yapısının incelenmesi, bu arjininlerin, p53 proteini ile DNA arasındaki bağın oluşmasında önemli olduğunu göstermiştir (Ho ve diğ., 2006). 248. konumda bulunan arjinin amino asitinin, timin nükleotidindeki oksijen ile ve adenin nükleotidinin halka yapısında bulunan nitrojen ile hidrojen bağı oluşturulmasında rol aldığı gösterilmiştir (Ho ve diğ., 2006). Bu bölge, p53 proteinin, DNA'nın küçük oluşuna bağlanmasında önemlidir ve burada gerçekleşen mutasyonlar proteinin DNA'ya bağlanabilme özelliğini değiştirmektedir. Değişik tümörlerde gerçekleştirilen p53 proteini kristal yapısı incelemeleri ve bu proteinleri kodlayan dizilerin DNA dizi analizi ile ortaya konulması, p53 geni üzerinde kanser türüne özgü mutasyonların oluşmasına imkan veren sıcak bölgelerin varlığını göstermiştir. Bu sıcak bölgelerdeki mutasyonlar p53 proteininin DNA'ya tutunmasında rol alan amino asit kodonlarında değişimlere neden olarak proteinin DNA'ya bağlanabilmesini etkilemektedir (Varley ve diğ., 1997). Bahsedilen kodonlardan 175, 248, 273 ve 282. kodonlarda gerçekleşen mutasyonlar sıklıkla kolon kanserinde, 273. kodon mutasyonları beyin tümörlerinde, 249. kodon mutasyonları karaciğer kanserlerinde, 242 ve 273. kodon mutasyonları akciğer kanserlerinde, 172, 213 ve 248. kodon mutasyonları Burkitt's Lenfoma'da ve 144, 156 ve 248. kodon mutasyonları da pankreas kanserlerinde görülmektedir (Yamaguchi ve diğ., 1999).

1.6.2. Mesane Kanserinde p53 Mutasyonları

P53 geni mesane tümörlerinin %20-60'nda mutasyonludur. Özellikle kodon 280 ve kodon 285 mutasyonların en sık olduğu bölgedir. Bu değişiklikler invazif tümörlerde yüzeysel tümörlerden daha sık görülmektedirler ve daha çok kötü klinik sergileyen vakalarda görülmektedirler. Mesane kanserinde görülen p53 mutasyonları hastaların sigara içme durumu, hastalığının derecesi, mutasyonun görüldüğü kodon gibi detayların da yer aldığı Tablo 1.4.'de gösterilmiştir.

P53 geni oldukça korunmuş bir gendir. Bugüne kadar kodlama bölgesinde beş polimorfizm bulunmuştur. Bunların 4 tanesi ekzon 4'te kodon 34, 36, 47, 72 iken; bir tanesi de ekzon 6 kodon 213'te bulunmuştur. p53'teki polimorfizmlerin çoğu intronik bölgede bulunmuştur. İtron 1'de iki , intron 2'de bir, intron 3'te bir, intron 6'da 2, intron 7'de beş ve intron 9'da 1 tanedir. Bunlardan kodon 72 ve kodon 47'deki polimorfizmler iyi karakterize edilmiştir (Katkoori ve diğ., 2009).

1.6.2.1. p53 kodon 280 - 285

Ekzon 82'de kodon 280 ve 285 mutasyon oluşumu için sıcak bölgelerdir. kodon 280 bütün kanser tiplerinin %1.2'sinde mutaten üriner mesane kanserlerinin %5.1'inde mutanttır. Bu değerler kodon 285 için bütün kanser tiplerinin %0.82'i iken, üriner mesane kanserlerinin %4.3'tür (Berggren ve diğ., 2001).

Tablo 1.4. Mesane kanseri ile ilişkilendirilmiş p53 mutasyonları
(Schroeder ve diğ., 2003)

	p53 mutasyonu				Olay Karakteristiği ^a				
	Ekzon	Kodon	Mutasyon ^b	Sonuç	Derece	Sigara	NAT1	NAT2	GSTM1
G:C > A:T at CpG dinükleotit									
PR363	4	110	C <u>G</u> T-C <u>A</u> T	Arg-His	1	Hayır	+	+	+
ON119	5	158	C <u>G</u> C-C <u>A</u> C	Arg-His	3	Bırakmış	nd	nd	nd
PR124	5	158	C <u>G</u> C-C <u>A</u> C	Arg-His	3	Evet	+	+	+
PR558	5	170	A <u>C</u> G-A <u>I</u> G	Thr-Met	3	Evet	-	+	+
PR278	5	181	C <u>G</u> C-C <u>A</u> C	Arg-His	nd	Evet	+	-	+
PR282	7	245	<u>G</u> G <u>C</u> - <u>A</u> G <u>C</u>	Gly-Ser	2	Evet	-	+	-
PR148	7	248	C <u>G</u> G-C <u>A</u> G	Arg-Gln	3	Evet	+	+	-
PR395	8	273	C <u>G</u> T-C <u>A</u> T	Arg-His	4	Evet	-	+	+
PR109	8	282	<u>C</u> G <u>G</u> - <u>I</u> G <u>G</u>	Arg-Trp	3	Bırakmış	+	+	-
PR283	8	290	C <u>G</u> C-C <u>A</u> C	Arg-His	3	Evet	nd	nd	nd
Diğer Transizyonlar									
PR331	4	88	C <u>C</u> C-C <u>C</u> I	Sessiz mut.	1	Hayır	+	+	-
PR171 ^c	5	137	C <u>T</u> G-C <u>T</u> A	Sessiz mut.	4	Bırakmış	-	+	-
PR171 ^c	5	141	T <u>G</u> C-T <u>G</u> I	Sessiz mut.	c	c	c	c	c
PR171 ^c	5	153	<u>C</u> C <u>C</u> - <u>I</u> C <u>C</u>	Pro-Ser	c	c	c	c	c
PR171 ^c	5	161	<u>G</u> C <u>C</u> - <u>G</u> I <u>C</u>	Ala-Val	c	c	c	c	c
PR553	5	168	<u>C</u> A <u>C</u> - <u>I</u> A <u>C</u>	His-Tyr	4	Bırakmış	-	+	+
PR167	6	192	<u>C</u> A <u>G</u> - <u>I</u> A <u>G</u>	Gln-Stop	3	Evet	-	-	+
PR603	6	192	<u>C</u> A <u>G</u> - <u>I</u> A <u>G</u>	Gln-Stop	3	Bırakmış	+	-	+
PR302	6	205	T <u>A</u> T-T <u>G</u> T	Try-Cys	2	Bırakmış	+	+	-
PR365	6	215	<u>A</u> G <u>T</u> - <u>G</u> G <u>T</u>	Ser-Gly	4	Evet	-	+	+
PR267	6	220	T <u>A</u> T-T <u>G</u> T	Tyr-Cys	4	Bırakmış	+	-	+
PR156	7	230	A <u>C</u> C-A <u>I</u> C	Thr-Met	4	Evet	+	+	+
PR270	7	234	T <u>A</u> C-T <u>G</u> C	Tyr-Cys	4	Evet	-	+	+
PR389	7	239	A <u>A</u> C-A <u>A</u> T	Sessiz mut.	2	Bırakmış	-	-	-
PR579	7	244	<u>G</u> G <u>C</u> - <u>G</u> A <u>C</u>	Gly-Asp	4	Hayır	+	-	+
PR122	7	250	C <u>C</u> C-C <u>C</u> I	Sessiz mut.	4	Hayır	-	-	+
PR231	8	265	C <u>I</u> G-C <u>C</u> G	Leu-Pro	4	Evet	+	+	+
PR228	8	266	<u>G</u> G <u>A</u> - <u>A</u> G <u>A</u>	Gly-Arg	3	Bırakmış	nd	-	+
PR171 ^c	8	285	<u>G</u> A <u>G</u> - <u>A</u> A <u>G</u>	Glu-Lys	c	c	c	c	c
PR362 ^c	8	285	<u>G</u> A <u>G</u> - <u>A</u> A <u>G</u>	Glu-Lys	3	Bırakmış	-	-	+
PR362 ^c	8	287	<u>G</u> A <u>G</u> - <u>A</u> A <u>G</u>	Glu-Lys	c	c	c	c	c
Transversiyonlar									
PR204	4	62	<u>G</u> A <u>A</u> - <u>I</u> A <u>A</u>	Glu-Lys	4	nd	-	-	-
PR227	6	215	A <u>G</u> I-A <u>G</u> A	Ser-Arg	4	Evet	-	-	+
ON201	6	216	G <u>T</u> G-G <u>T</u> I	Sessiz mut.	4	Evet	nd	nd	nd
PR402	6	222	C <u>C</u> G-C <u>C</u> I	Sessiz mut.	2	Evet	-	+	-
PR212	7	248	C <u>G</u> G-C <u>I</u> G	Arg-Leu	4	Bırakmış	-	+	-
PR284	8	280	A <u>G</u> A-A <u>A</u> C	Arg-Thr	4	Bırakmış	-	+	+
PR294	8	284	<u>A</u> C <u>A</u> - <u>C</u> C <u>A</u>	Thr-Pro	2	Bırakmış	-	-	+
PR565 ^c	8	286	G <u>A</u> A-G <u>A</u> T	Glu-Asp	2	Evet	-	+	-
İnsersiyon ve delesyonlar									
PR565 ^c	5	172	-17	Çerçeve kayması	c	c	c	c	c
ON105	8	267	+G	Çerçeve kayması	3	Hayır	-	+	+
PR145	8	285	+G	Çerçeve kayması	3	Bırakmış	+	-	-

^a derece, ilk tanıda klinik derece. Sigara içiciliği, ilk tanıdan iki yıl önceki sigara durumu. NAT1:+, herhangi bir NAT1*10 alleli; -, NAT1*10 allelinin olmaması. NAT2:+, yavaş (NAT2*4 alleli yok); -, hızlı. GSTM1: +, homozigot null; -, herhangi bir yabancı tip alleli. nd, tespit edilemeyen.

^b her mutasyon olan bazın altı çizilidir. İlk üç baz yabancı tip iken, son üç baz mutant dizide yer almaktadır.

^c birden fazla mutasyon görüldüğü durumlar

1.6.3. Mesane Kanserinde p53 Polimorfizmleri

1.6.3.1. p53 Kodon72

Kodon 72 Arjinin/Prolin (Arg-CGC/Pro-CCC) polimorfizminin görülme sıklığı etnik grup ve coğrafyaya göre değişkenlik göstermektedir (Tablo 1.5.). P53Arg ile p53Pro arasında konformasyonel olarak farklılığın olduğu iki proteinin SDS-PAGE’te yürütülüp p53Pro varyantının p53Arg varyantından daha yavaş ilerlediği görülünce anlaşılmıştır (Thomas ve diğ., 1999).

Tablo 1.5. Sağlıklı popülasyonlarda kodon 72’de G>C polimorfizminin etnik kökene göre değişimi (p53 Knowledgebase)

Grup	N	Arg/Arg	Arg/Pro	Pro/Pro	Referanslar
ABD	245	51.8	40.0	8.2	Hildesheim ve diğ. 1998
ABD	510	46.5	41.6	12.0	Fan ve diğ. 2000
Şili	53	47.2	45.3	7.5	Ojeda ve diğ. 2003
Brezilya	82	40.2	54.8	4.9	Drummond ve diğ. 2002
Japonya	105	39.0	54.3	6.7	Suzuki ve diğ. 2005
Tayvan	152	30.9	49.3	19.7	Wang ve diğ. 1999
İspanya	90	46.3	43.5	10.2	Beckman ve diğ. 1994
Çek Cum.	172	53.5	35.5	11.1	Tachezy ve diğ. 1999
Hollanda	158	57.0	37.0	6.0	Hayes ve diğ. 1998
İngiltere	41	36.6	58.5	4.9	Storey at al. 1998
İngiltere	246	62.6	30.5	6.9	Rosenthal ve diğ. 1998
Yunanistan	99	24.2	64.7	11.1	Soulitzis ve diğ. 2002
İsveç	188	47.0	44.0	9.0	Anderson ve diğ. 2001
Finlandiya	171	56.7	38.0	5.3	Beckman ve diğ. 1994
Norveç	225	54.0	40.0	6.0	Helland ve diğ. 1998
Almanya	193	59.0	34.0	7.0	Scheckenbach ve diğ. 2004
Polonya	52	73.1	23.1	3.8	Dybikowska ve diğ. 2000
Türkiye	114	36.84	48.25	14.91	Törüner GA, 2001
Türkiye	102	40.1	48.1	11.8	Bu çalışmanın sonuçları

P53’te 61-94 amino asitleri arasında yer alan beş tekrar pxxp sekansı (prolin) içeren bölgenin SH3 bölgesine bağlanma aktivitesi aracılığıyla bu motifin sinyal transdüksiyonunda yer aldığı düşünülmektedir (Şekil.1.9.). Hücre kültüründe yapılan çalışmalarda p53’ün tümör hücrelerinin büyümesini baskılamasında görülen bozukluklar prolinden zengin bölgenin silinmiş olmasıyla ilişkilendirilmiştir. G bazının C bazına dönüşümü kodon 72’deki arjinin aa’nin prolin aa’e dönüşmesine

sebeptir. p53'ün Arg taşıyan formunun prolin taşıyan formuna göre tümör büyümesinde anlamlı olarak daha fazla ilişkili olduğu bulunmuştur (Chen ve diğ., 2000).

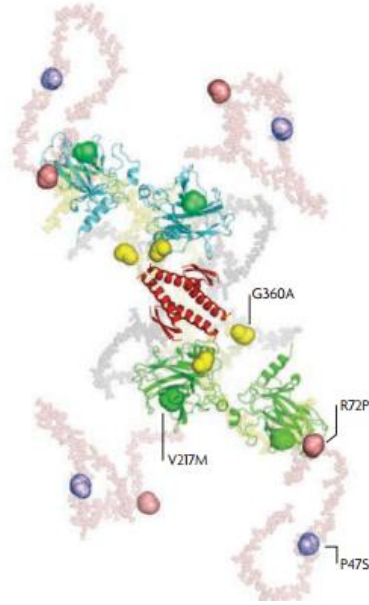
2002'de yapılan bir çalışmada Arg/Arg genotipinin mesane kanseri gelişimindeki riski arttırdığı gösterilmiştir (Soulitzis ve diğ., 2002). Ancak bunun yanında Kuroda ve arkadaşları Pro/Pro genotipini taşıyan ve sigara içen bireylerde üretelyal kanser riskinin arttığını bulmuşlardır (Kuroda ve diğ., 2003).

HPV virüsünün E6 proteinleri ubiquitine bağlı degradasyonda p53Arg'i p53Pro'e göre daha efektif olarak hedef alır. Bu yüzden HPV ile ilişkili kanser türleri p53Arg için analiz edilmeli, çünkü çoğunlukla normal popülasyon heterozigottur (Storey ve diğ., 1998).

Arg/Arg frekansı genel popülasyonlar karşılaştırıldığında serviks kanseri hastalarında anlamlı şekilde yüksek çıkmış, Arg için homozigot olan bireyler heterozigot olan bireylere göre HPV ilişkili tümörlere yedi kat daha yatkın olduğunu göstermektedir (Storey ve diğ., 1998).

Benzer çalışmalar serviks, baş ve boyun kanseri, akciğer, deri, meme, özefagus gibi kanserlerde yapılmıştır. Ancak sonuçlar arasında tutarsızlık bulunmaktadır. Yakın zamanda p53Arg'in, mutant p53'ün konformasyonel yapısının p73 ile stabil bir kompleks oluşturması yeteneğini arttırdığı gösterilmiştir. Bu oluşum; p73'ün apoptozisi başlatmasına ve sekans spesifik transkripsiyonel aktivatör olarak görev almasına neden olmaktadır.

Kodon 72 polimorfizminin p53'ün prolinde zengin bölgesinde yer aldığı bilinmektedir. Bu domain p53'e bağlı apoptozda önemli bir rol oynamakta ve p53'ün baskılayıcı aktivitesini arttırmaktadır (Sakamuro ve diğ., 1997). Bu bölge beş tane PxxP SH3 (SRC-homology-3) bağlanma motifi içermektedir ki, bunlardan biri kodon 72'de arjinin ile yer değiştirdiğinde kaybolmaktadır. Değişim sonucunda poliprolininin biyolojik rolü de değişmektedir. P53 proteininin iki polimorfik varyantının transkripsiyonel mekanizmaya bağlanma kabiliyetleri, transkripsiyonu aktive etmeleri, apoptozu indüklemeleri ve birincil hücrelerin transformasyonlarını baskılamaları birbirinden farklı olsa da DNA'ya bağlanma kabiliyetleri aynıdır (Thomas ve diğ., 1999). PP bölgesi özellikle apoptozu indüklemek için önemli bir bölgedir.



Şekil 1.9. Kodon 72'nin protein üzerinde gösterimi (Whibley ve diğ., 2009)

1.6.3.2. Kodon 36

Kodon 36'daki sessiz mutasyonların (CCG>CCT); MDM2' nin TP53 mRNA afinitesini düşürmesi ile P53'ün apoptozdaki aktivitesini azalttığı görülmüştür. Üç benzer polimorfizm, D21D (GAC>GAT), P34P (CCC>CCA) ve P36P (CCG>CCA), MDM2 bağlayıcı TP53 mRNA'da önemli bölgelerde bulunur. Son bulgulara göre mikroRNA (miRNA)'nın gen kodlama dizilerini hedeflemesi ile translasyonun inhibe edildiği gösterilmiştir. Ancak kodlama bölgesindeki sessiz Tp53 polimorfizminin P53 aktivitesini nasıl etkilediğini açıklayan ve P53'leri hedefleyen miRNA'lar hala bulunamamıştır (Whibley ve diğ., 2009).

1.6.3.3. Intron 7

P53 geninde ekzon72nin 3' ucunun 72 bp altında, 14181 pozisyonunda lokalize C→T polimorfizmi bulunmuştur. 300 örnekle (159 hasta ve 171 sağlıklı) yapılan çalışmada polimorfizm frekansının %15 civarında ve kontrol ve hastalarda bu frekansın birbiriyle neredeyse aynı oldu bulunmuştur. Bu durum polimorfizmin üriner mesane kanserinin patogenezi ve etiyolojisiyle ilgisi olmadığını düşündürmüştür (Berggen ve diğ., 2000).

Üriner mesane kanserli hasta ve sağlıklı kontrol gruplarında yapılan çalışmalarda intron 7'de 14168. pozisyonda yabancıl tipte bulunan G bazının yerine T bazının olduğunu, bütün kontrol ve hastalarda, bulmuşlardır. Aslında 14168.

pozisyonda yabancı tipteki bazın T bazı olduğunu belirtmişlerdir (Berggen ve diğ., 2000).

14168. pozisyonda yabancı tipin G bazı yerine T bazı olduğunu gösterilmiştir. Orjinal sekans dizisinde yanlış olduğu (GenBank no. U94788), o pozisyonda T bazının yabancı tip olduğuna dair güncellemenin GenBank'ta (no. AF209155) yapıldığı da belirtilmiştir (Gale ve diğ., 2003).

p53 KnowledgeBase Team'e göre beyaz ırk, Çin, Japon ve Afrikalı popülasyonunda bütün bireylerde G alleli yerine T allelinin olduğu görülmüştür (p53 KnowledgeBase Team).

2. AMAÇ

Tümör baskılayıcı olan p53 geni tüm kanserlerle ilişkilendirilmiştir. p53 strese verilen cevapta, genomik stabilitenin korunmasında, DNA hasarı oluşturacak tehditlere verilen cevapta, hipoksi, metabolik stres ve onkogenik aktivasyonda anahtar göreve sahiptir. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda kanserle ilişkili olduğu düşünülen birçok eşey hücresi ve somatik p53 mutasyonları ile p53 polimorfizmleri bulunmuştur.

Bu çalışmada amaç, Türk mesane kanseri hastalarında p53 geni mutasyon ve polimorfizm profilini araştırmaktır. Bu hedef, Türk mesane kanseri hastalarında onkogen ve tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyon ve polimorfizmlerin belirlenmesi ve bir veri tabanı oluşturulması yolundaki ilk adımı oluşturmaktadır. Bu bağlamda, bu tez çalışması çerçevesinde ilk olarak p53 geni ekson 4-9 arasındaki mutasyonların belirlenmesi ve tümör evre ve dereceleriyle ilişkilendirilmesi amaçlanmıştır. Buna ek olarak tüm popülasyonlarda oldukça polimorfik olduğu bilinen ve çok çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmiş olan p53 Arg72Pro polimorfizminin sağlıklı bireylerde ve mesane kanseri hastalarında incelenmesi ve bu polimorfizmin mesane kanserine yatkınlıktaki rolünün araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca tüm verilerin mesane kanseri için önemli risk faktörleri olan cinsiyet ve sigara içimi ile birlikte incelenmesi planlanmıştır.

3. MATERYAL

3.1. Çalışmada Kullanılan Örnekler

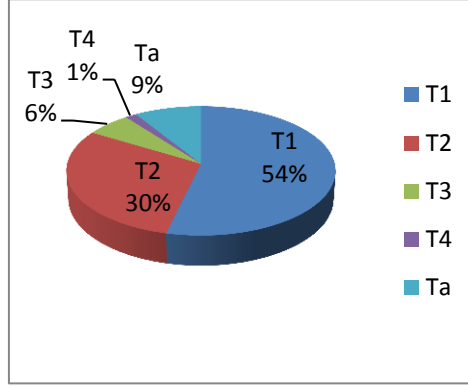
Bu çalışmada kullanılan kan ve tümör dokusu örnekleri 2008-2012 yılları arasında T.C. Sağlık Bakanlığı Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Bağcılar Eğitim ve Araştırma Hastanesi ve Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde mesane kanseri teşhisi koyulmuş olan hastalardan alınmıştır. Tümör dokusu örnekleri (79 adet) rutin operasyon esnasında alınarak -80°C'de saklanmıştır. Ailesinde ve kendisinde kanser geçmişi bulunmayan gönüllü kişilerin yanak içi epitel doku örnekleri 102 kişilik kontrol grubu Aysun Açar'ın tezinde kullanmış olduğu örneklerdir (Açar, 2009). Hastalara ve gönüllülere uygulanan anket ile cinsiyet, yaş, doğum yeri, meslek, alkol ve sigara kullanımı, kullanım miktarı ve süresi ile ilgili bilgiler elde edilmiştir. Bu çalışmada İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylanmış ve biyolojik örnekler bireylerin gönüllü olur formunu okumaları ve yazılı izin vermeleri ile alınmıştır.

3.1.1 Örneklerin Özellikleri

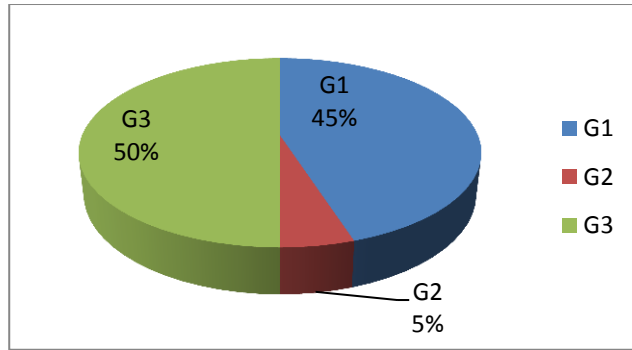
Bu çalışmada tümör dokusu alınan 79 hasta ve yanak içi epitel hücreleri alınan 102 sağlıklı birey olmak üzere toplam 181 birey yer almıştır. Tüm bireylerin cinsiyeti, yaşı, mesleği, sigara içim süresi, miktarı ve kanser açısından aile geçmişi sorgulanmıştır. Hasta bireylerde ise bu bilgilere ek olarak hastalık evresi, tümör derecesi ve nüks bilgileri değerlendirmeye dahil edilmiştir.

Mesane dokusu bulunan hasta grubunda yaş aralığı 54-81 yaş ve yaş ortalaması 68,1 yaş olan 79 birey yer almaktadır. 50 yaş altı yalnızca %2'lik bir oranken 50-70 yaş arası %55 ve 70 yaşından büyükler %43'tür. Hasta grubunun yalnızca %3'ü kadınlardan oluşmaktadır. Kontrol grubunu oluşturan bireylerin %48'i kadın %52'si erkeklerden oluşmaktadır.

Hasta bireylerin %86'sının patolojisi bilinmektedir ve tümör patolojileri incelendiğinde %9'unun Ta, %54'nün T1, %30'unun T2, %6'sının T3, %1'inin T4 olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.1.). Ayrıca tümör sınıflandırmasına bakıldığında toplam hastaların %79'unun tümör derecesi bilinmekte olup bunların %45 G1, %5 G2 ve %50 G3 olduğu görülmüştür (Şekil 3.2.).



Şekil 3.1. Tümör patolojilerinin dağılımı



Şekil 3.2. Tümör derecelerinin dağılımı

3.2. Yanak İçi Epitel Dokudan DNA İzolasyonu İçin Kullanılan Tamponlar ve Kimyasallar

Lizis Tamponu	: 50 mM Tris (pH= 8,0)
	50 mM EDTA
	50 mM Sükroz
	100 mM NaCl
	%1 (w/v) SDS
Sodyum Asetat (NaOAc)	: 3 M

Proteinaz K	: 10 mg/ml
Saf İzopropanol	
Etanol	: %70
Fenol (pH= 8,0)	: Tris ile doyurulmuş
Saf Kloroform	
Kloroform-İzoamil Alkol (24:1)	: Saf Kloroform ve İzoamil alkol 24' e 1 oranında karıştırılır.
Low-TE Tamponu (pH= 8,0)	: 10 mM Tris (pH= 8,0) 0,1 mM EDTA (pH= 8,0)

3.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve Saflaştırma İçin Gerekli Kimyasallar

10X MgCl ₂ 'süz Tampon	: 200 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 750 mM Tris-HCl, (pH 8.8) %0.1 Tween 20, (Fermentas, LİTVANYA)
MgCl ₂	: dH ₂ O'da 25 mM (Fermentas, LİTVANYA)
Deoksiribonükleotidler (dNTP)	: 100 mM dATP, dCTP, dGTP ve dTTP (Fermentas, LİTVANYA)
Taq DNA Polimeraz	: Rekombinant Taq DNA Polimeraz (Fermentas, LİTVANYA) Fast Start DNA polimeraz (Roche, ALMANYA)
PZR ürünlerinin saflaştırılması	: High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, ALMANYA)
Primerler	: Tablo 3.1'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Primer dizileri

Çoğaltılan Bölge	Primer İsmi	Primer Dizisi
Ekzon 4	P53Ex4F	5'-GAC CTG GTC CTC TGA CTG CT 3'
	P53Ex4R	5'-ACG GCC AGG CAT TGA AGT CT 3'
Ekzon 5	P53Ex5F	5'-GCC GTC TTC CAG TTC TTT ATC TG 3'
	P53Ex5R	5'-TGG GCA ACC AGC CCT GTC GTC 3'
Ekzon 6	P53Ex6F	5'-CCT CAC TGA TTG CTC TTA G 3'
	P53Ex6R	5'-CAC TGA CAA CCA CCC TTA AC
Ekzon 7	P53Ex7F	5'-CAT CTT GGG CCT GTG TTA TC
	P53Ex7R	5'-GAG TGG GAG CAG TAA GGA GAT TC
Ekzon 8	P53Ex8F	5'-GGA GCC TGG TTT TTT AAA TGG G
	P53Ex8R	5'-CTA GGA AAG AGG CAA GGA AAG G
Ekzon 9	P53Ex9F	5'-GCC TCA GAT TCA CTT TTA TCA CC
	P53Ex9R	5'-CAT TTT GAG TGT TAG ACT GGA AAC

3.4. Elektroforezde Kullanılan Kimyasallar ve Tamponlar

10X TBE (Tris-Borik asit-EDTA)	: 890 mM Tris 890 mM Borik Asit, 20 mM Na ₂ EDTA.2H ₂ O, (pH= 8.3)
Agaroz Jel	: 0,5 X TBE Tamponunda %1 ve %2'lik (w/v) agaroz
10X Bromofenol Mavisi (BPB)	: 2,5 mg/ml BPB
Etidyum Bromür (EtBr)	: 10 mg/ml

3.5. DNA Uzunluk Markörleri

50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 baz çiftlik fragmentler içeren GeneRuler 50 baz çiftlik DNA markörü. (Fermentas, LİTVANYA)

100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 baz çiftlik fragmentler içeren GeneRuler 100 baz çiftlik DNA markörü. (Fermentas, LİTVANYA)

3.6. Cihazlar

Tartı	: Hassas Terazi, Sartorius BL 120S (ALMANYA)
Derin Dondurucular	: -20°C, 2021 D (Arçelik, TÜRKİYE) -20°C, GSD26410NE (Bosch,ALMANYA) -80°C
Yatay Elektroforez Sistemleri	: MultiSub Midi (Cleaver Scientific, İNGİLTERE) miniRapide Cleaver Scientific, İNGİLTERE)
Isı Bloğu	: DB 2D (Techne, İNGİLTERE)
Görüntüleme Sistemleri	: Bio-RAD UniversalHoodII (BIO-RAD İTALYA)
Otoklav	: Dik Tip Otoklav (BES, TÜRKİYE)
Buzdolapları	: Beko 8742 , Arçelik 3061 Plus (TÜRKİYE)
Manyetik Karıştırıcılar	: MR 3001 (Heidolph, ALMANYA)
Vorteks	: Heidolph REAX (ALMANYA)
Su Banyosu	: Memmert (ALMANYA)
PZR Cihazları	: Techne TC-512 (İNGİLTERE) Techne TechGene (İNGİLTERE)
Santrifüjler	: Mini Spin Plus (Eppendorf, ALMANYA) : Centrifuge 5415 R (Eppendorf, ALMANYA)
Mikrodalga Fırın	: MD 592 SUPER (Arçelik, İSVEÇ)
Güç Kaynakları	: EC250-90 Thermo Elektron Corporation EPS301 (Amersham Pharmacia Biotech, İSVEÇ)

4. METOD

4.1. Trizol ile Dokudan DNA İzolasyonu

Ortalama olarak 50-100 mg olan mesane tümör ve kontrol dokusu örnekleri seramik havanlara alınır. Homojenizasyon işlemi soğuk odada (+4°C) gerçekleştirilir. Doku parçalarının üzerine sıvı azot eklenir ve azotun uçması beklenir. Taş gibi sertleşen doku parçası tokmak yardımıyla homojenize edilir. Havandan toplanan ezilmiş dokular 1,5 ml'lik Eppendorf tüpe alınır. Üzerine 1 ml trizol eklenir. Homojenize edilen örnekler 5 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilir. Bu süre nükleoproteinlerin tamamen ayrışması için gereklidir. Daha sonra 0.2 ml kloroform eklenir ve kapağı sıkıca kapatılan tüp 15 saniye boyunca elde çalkalanır. 2-3 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilir. İnkübasyondan sonra 12,000 x g' de +4°C'de 15 dakika boyunca santrifüj edilir. Tüpün üstünde oluşan sıvı faz dikkatlice yeni bir tüpe aktarılır. Bu fazdan RNA izolasyonu için RNA izolasyon prosedürüne devam edilir. DNA ve protein izolasyonu için ise interfaz ve fenol-kloroform fazı kullanılır.

İzole edilecek DNA'nın kalitesi açısından aköz fazın tamamen alınması önemli bir noktadır. Eğer bu işlem yeterli titizlikle yapılmaz ise izole edilecek olan DNA'da RNA kontaminasyonu görülür. Sulu fazı tamamen alınan interfaz ve fenol-kloroform faz kısmının kaldığı tüpe 0.3 ml %100 etanol eklenir. Birkaç defa çalkalanarak karıştırılır ve 2-3 dakika oda sıcaklığında inkübe edilir. İnkübasyon sonrasında 2000 x g'de +4°C'de 5 dakika boyunca santrifüj edilerek DNA'nın pellet olarak çökmesi sağlanır. Fenol- etanol karışımı içeren süpernatant daha sonra protein izolasyonunda kullanılmak üzere yeni bir tüpe aktarılır ve -80°C'de saklanır.

DNA pelleti 1ml sodyum sitrat / etanol solüsyonuyla yıkanır. Arada dikkatlice alt üst edilerek 30 dk boyunca oda sıcaklığında inkübe edilir. Bu aşamada gerekirse DNA en az 2 saat boyunca sodyum sitrat / etanol solüsyonu içerisinde saklanabilir. Sonrasında 2000 x g'de 4°C'de 5dk boyunca santrifüj edildikten sonra

süpernatant atılır. Bu yıkama işlemi bir kez daha tekrarlanır. Eğer pellet 200µg'dan büyük ise yıkama işlemi 2 defa tekrar edilir. Daha sonra pelletin üzerine 1,5-2 ml %75'lik etanol eklenir. Bir sonraki aşamada tüpler 10-20 dk boyunca oda sıcaklığında inkübe edilir. Arada birkaç kez nazikçe altüst edilir. Sonrasında 2000 x g 'de 4°C'de 5 dk boyunca santrifüj edildikten sonra süpernatant atılır. DNA pelletinin kuruması için (etanolün uçması için) 5-10 dk boyunca oda sıcaklığında veya vakumlu kurutucuda bekletilir. DNA'nın parçalanmasını engellemek için bu aşamada pellet vakum santrifüjü ile kurutulmamalıdır.

50-70 mg doku veya 1×10^7 hücre için 0,3 – 0,6 ml 8mM NaOH eklenir (Bu aşamada DNA su veya Tris tamponu içerisinde iyi şekilde süspansiyon edilemez). Çözünmeyen materyalleri uzaklaştırmak için 12000 x g'de 4°C'de 10 dk boyunca santrifüj edilir. Santrifüj sonrasında DNA'yı içeren süpernatant yeni bir tüpe aktarılır. Bu aşamada DNA'nın uzun süre saklanabilmesi için pH'ın HEPES ile ayarlanması gerekmektedir. pH 7-8 arasında olabilmesi için HEPES ve 1mM EDTA eklenir. pH'ı ayarlanan DNA +4°C'de veya -20°C'de saklanabilir.

4.2. GeneJET Genomik DNA İzolasyon Kiti ile Mesane Dokusundan DNA izolasyonu

10-20 mg mesane dokusu havanda likit nitrojen kullanılarak homojenize edilir. Homojenize edilen materyal 1,5 ml lik mikrosantrifüj tüpüne alınır ve 180µl parçalama solüsyonu eklenerek süspansiyon haline getirilir. 200µl proteinaz K eklenir ve vorteks veya pipetleme yardımıyla iyice karıştırılır. Örnekler 56 °C'de 1-2 saat boyunca inkübe edilir. Bu aşama doku tamamen dağılıp partikül kalmayana kadar inkübasyon uzatılabilir. İnkübasyon sonrasında 200µl RNase A eklenir. Vorteksle karıştırma işlemi yapıldıktan sonra 10dk boyunca oda sıcaklığında inkübe edilir. Daha sonra 200µl liziz solüsyonu eklenir, homojen bir karışım elde edene kadar 15sn boyunca vorteksle iyice çalkalanır. 400µl %50'lik etanol eklenir ve pipetleme yapılarak ya da vortekslenerek karıştırılır. Hazırlanan karışım, GeneJET Genomik DNA İzolasyon Kiti'nin içinden çıkan kolon tüp içeren toplama tüplere aktarılır. Kolon 6000 x g'de 1dk boyunca santrifüj edilir. Toplama tüp, içindeki solüsyonla birlikte atılır ve kolon, kitin içerisinde olan 2ml'lik toplama tüplerine aktarılır. Daha sonra 500µl yıkama solüsyonu 1 (Wash Buffer 1) eklenir, 8000 x g'de 1dk boyunca santrifüj edilir. Toplama tüpünün içerisindeki kalıntı atılır ve kolon aynı

toplama tüpüne yeniden yerleştirilir. Kolona 500 l yıkama solüsyonu 2 (Wash Buffer 2) eklenir ve maksimum hızda ($\geq 12000 \times g$) 3 dk boyunca santrifüj edilir. Santrifüjden sonra eğer saflaştırma kolonunda kalan artık solüsyon var ise kolon 1dk boyunca maksimum hızda yeniden santrifüj edilir. Toplama t p içerisindeki kalıntı ile birlikte atılır ve kolon steril bir 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilir. 200 l elüsyon solüsyonu kolon içerisindeki membranın ortasına bırakılır. Bu işlem sırasında pipetin ucunun tüpün çeperlerine değmemesine  zen gösterilmelidir. 2dk boyunca oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra $8000 \times g$ 'de 1dk boyunca santrifüj edilir. Daha sonra pürifikasyon kolonu atılır, izole edilen DNA -20°C 'de saklanır.

4.3. DNA'nın Nitel Ve Nicel Analizi

İzole edilen DNA  rneklerinin kalitatif analizi örneklerin %1'lik agaroz jelde yürütülmesi ile yapılır. Agaroz jelde yürütülen DNA'nın görüntüleme sisteminde görüntülendiğinde jelde birden fazla, beklenmeyen bir bant g r ld ğinde veya sürüntü şeklinde bantlar oluşturması DNA izolasyonu sırasında DNA'nın parçalandığını gösterir ve bu DNA'nın PZR işlemi için kullanmaya uygun olmadığını gösterir. Agaroz jel elektroforezi sonrası PZR işleminde kullanmak üzere uygun olduğu belirlenen örnekler spektrofotometrik analizden geçirilerek miktarının ve saflığının belirlenmesi gerekmektedir. Bu amaçla TE tamponu içerisinde  z nm ş DNA  rnekleri seyreltilerek spektrofotometre ile 260nm'de absorbansları ölçülür ve aşağıdaki formül ile DNA miktarı belirlenir;

$$\text{Konsantrasyon } (\mu\text{g/ml}) = \text{dilüsyon faktörü} \times A_{260} \times 50 \mu\text{g/ml}$$

Bunun yanında PZR işleminde önce DNA'nın saflığının da belirlenmesi gerekmektedir. Bu amaçla spektrofotometrede nükleik asitlerin maksimum absorbans gösterdiği 260nm'de ve proteinlerin maksimum absorbans gösterdiği 280nm'de absorbans ölçümü yapılarak A_{260}/A_{280} oranı belirlenir. PZR gibi işlemlerde kullanılacak olan DNA  rneklerinin 1,7-1,8 oranlarında saf olması gerekmektedir. Bu oranın düşük olması protein kontaminasyonu, büyük olması ise RNA veya fenol kontaminasyonu olduğu gösterir.

4.4. p53 Mutasyon Analizi

p53 genindeki mutasyon ve polimorfizmlerin belirlenebilmesi için ekson 4-9 arasındaki altı ekzon bölgesi PZR ile çoğaltılmıştır. Tipik bir PZR reaksiyonu çoğaltılacak DNA'yı, istenilen bölgeyi hedefleyen ileri ve geri primerleri, reaksiyon tamponunu, MgCl₂, dNTP'leri ve Taq polimeraz enzimini içerir (Tablo 4.1.). Denatürasyon, primer bağlanması ve yeni dizinin uzaması aşamalarıyla, hedeflenen DNA bölgesinin çoğaltılması sağlanmış olur (Tablo 4.2.).

Tablo 4.1. p53 PZR şartları

	EX4	EX5	EX6	EX7	EX8	EX9
(NH ₄) ₂ SO ₄ Tampon	1X	1X	1X	1X	1X	1X
MgCl ₂ (mM)	1,5	2	2	2	2	2
dNTP (mM)	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
Primerler (pmol)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Taq Pol. (u)	1	1	1	1	1	1
DNA (ng)	100	100	100	100	100	100

Tablo 4.2. p53 ekzon 4-9 için PZR döngüsü

PZR Isı Döngüsü Şartları						
	Ex4	Ex5	Ex6	Ex7	Ex8	Ex9
Başlangıç Denatürasyonu	95°C, 4dk.	95°C, 4dk.	94°C, 5dk.	94°C, 5dk.	94°C, 5dk.	94°C, 5dk.
Denatürasyon	95°C, 30sn	95°C, 30sn	94°C, 30sn	94°C, 30sn	94°C, 30sn	94°C, 30sn
Bağlanma	60,1 °C, 45sn	64,2 °C, 45sn	55,2, 45sn	61,5 °C, 45sn	58,0 °C, 45sn	57 °C, 45sn
Uzama	72°C, 1dk.	72°C, 1dk.	72°C, 1dk.	72°C, 1dk.	72°C, 1dk.	72°C, 1dk.
Son Uzama	72°C, 5dk.	72°C, 5dk.	72°C, 5dk.	72°C, 5dk.	72°C, 5dk.	72°C, 5dk.
Döngü Sayısı	30	30	30	30	30	30

PZR örnekleri reaksiyon sonrasında %2'lik agaroz jel elektroforezine tabi tutulmuş ve EtBr boyaması ile UV ışığı altında görüntülenmiştir.

PZR ürünü içeren her tüpe 50 µl PZR ürünü için 250 µl bağlanma tamponu eklenir. Filtreli tüpler toplama tüplerinin içerisine yerleştirildikten sonra PZR ürünleri mikropipet ile filtreli tüpe aktarılır ve maksimum hızda (14000 rpm) 1 dk boyunca santrifüjlenir. Santrifüj sonrası filtreli tüp çıkartılır ve toplama tüpündeki solüsyon atılır. Daha sonra filtre tüpü yine aynı toplama tüpüne yerleştirilir ve filtreli tüpe 250 µl yıkama solüsyonu eklenerek maksimum hızda 1 dk boyunca santrifüjlenir. Santrifüjün ardından yine filtreli tüp çıkartılır ve toplama tüpündeki solüsyon atılır. Optimum saflığı ve yıkama tamponunun cam fiberlerden tamamen ayrılmasını sağlamak için aynı işlem 100 µl yıkama tamponu ile tekrarlanır ve filtreli tüpler temiz 1,5ml'lik tüplere aktarılır. Filtreli tüpe 50 µl elüsyon tamponu eklendikten sonra yaklaşık 1dk beklenir ve tüpler yine 1dk boyunca maksimum hızda santrifüjlenir ve 1,5 ml yeni tüpte saflaştırılmış PZR ürünleri elde edilir.

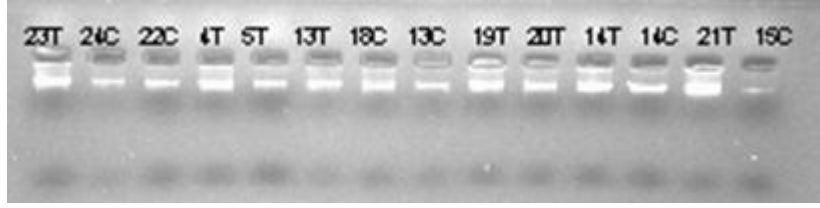
4.5. Mesane Kanserinin Moleküler Analizi

Bu tezde mesane kanseri hastalığı ile p53 genindeki polimorfizm arasındaki ilişkinin araştırılması için PCR-dizileme yöntemleri kullanılmıştır. p53 geninde 6 ekzon uygun primerler ile PCR yapılarak çoğaltılıp ve PCR ürünleri saflaştırıldıktan sonra dizileme için MacroGen'e (Kore) gönderilmişlerdir. Hasta ve kontrol grubunda saptanan polimorfizmlerin verileri SPSS 15.0 ve PLINK programları ile istatistiksel olarak incelenmiştir.

5. SONUÇLAR

5.1. DNA izolasyonu

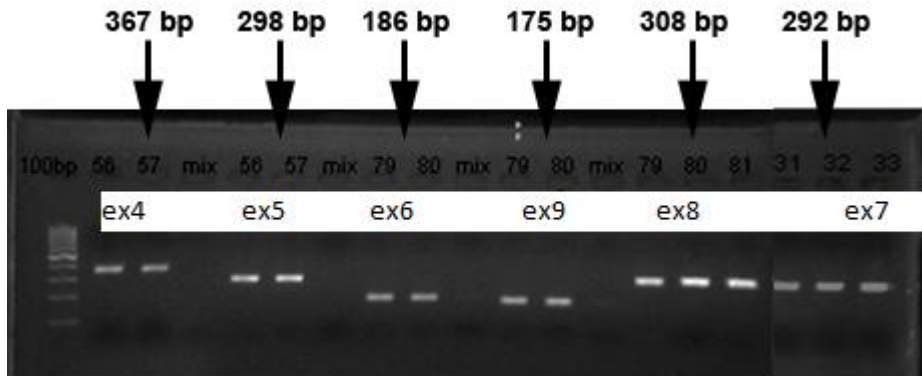
İzole edilen DNA örnekleri %1'lik agaroz jele 1 µl yüklenerek kalitatif ve kantitatif olarak değerlendirilmiştir (Şekil 5.1).



Şekil 5.1. İzole edilen DNA'ların %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü

5.2. p53 geninin PZR-dizileme yöntemi ile moleküler analizi

p53 geninin ekzon 4-9 arasındaki toplam 6 ekzon bölgesi PZR ile çoğaltılmış ve %2'lik agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmiştir. Ürün boyları 100bç ve 50bç DNA markörleri kullanılarak değerlendirilmiştir (Şekil 5.2.).

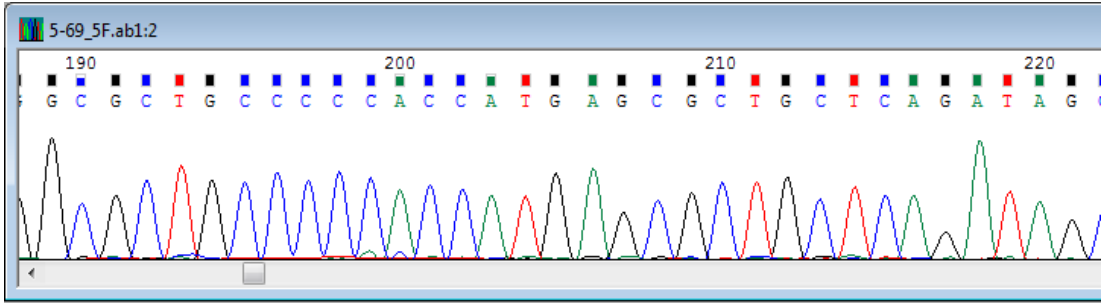


Şekil 5.2. p53 Ex 4-9 PZR ürünlerinin %2'lik agaroz jelde görünümü

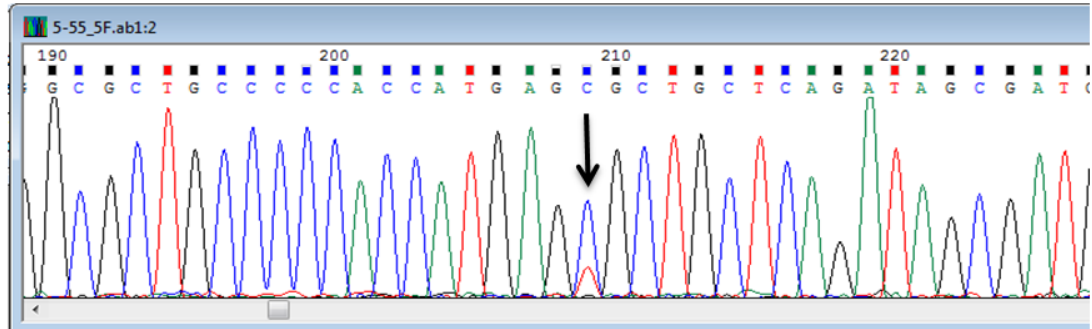
79 hastadan alınan tümörlü mesane dokusundan izole edilen DNA'lar PZR işleminden sonra saflaştırılarak dizi analizi için hazırlanmıştır. Dizi analizi işlemi Macrogen (Kore) tarafından gerçekleştirilmiş, sonuçlar ChromasPro 1.5 programı ile değerlendirilmiştir. Kodon 72 polimorfizminin mesane kanserine yatkınlıktaki rolünün değerlendirilmesi amacıyla, sağlıklı bireylerin genotip dağılımları daha önce laboratuvarımızda PZR-RFLP metoduyla yapılan başka bir araştırmadan alınmıştır (Aysun Açar, 2009).

5.2.1. p53 genindeki mutasyonlar

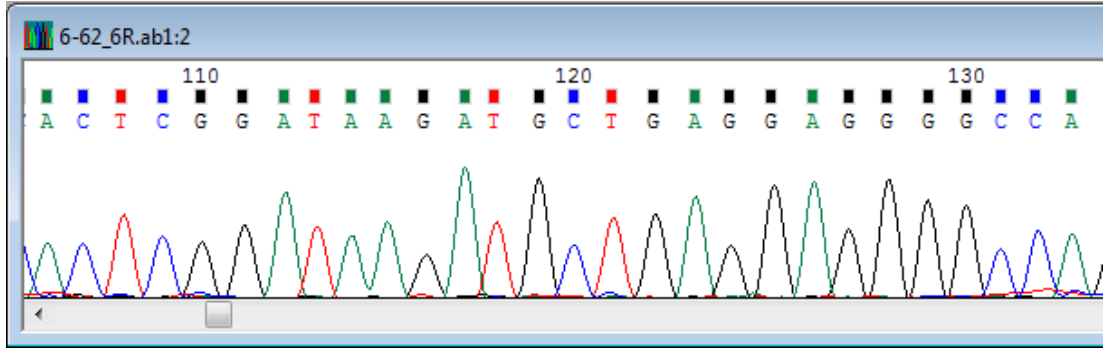
Mesane kanseri hastalarının p53 genlerinde bulunan mutasyonlar Şekil 5.3.-5.16'da gösterilmiş ve Tablo 5.1.'de özetlenmiştir. Buna göre G>A (2 adet) , C>T (2 adet) , A>G (1 adet), G>C (1 adet) değişimleri görülmüştür.



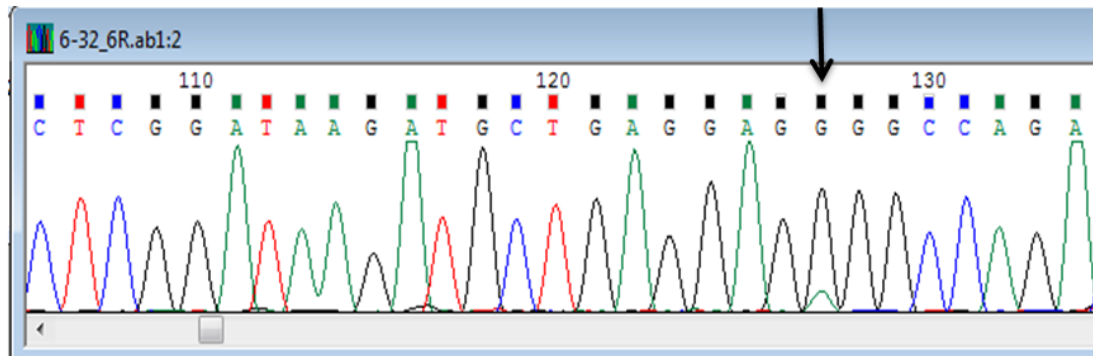
Şekil 5.3. Ex5 kontrol dizisi



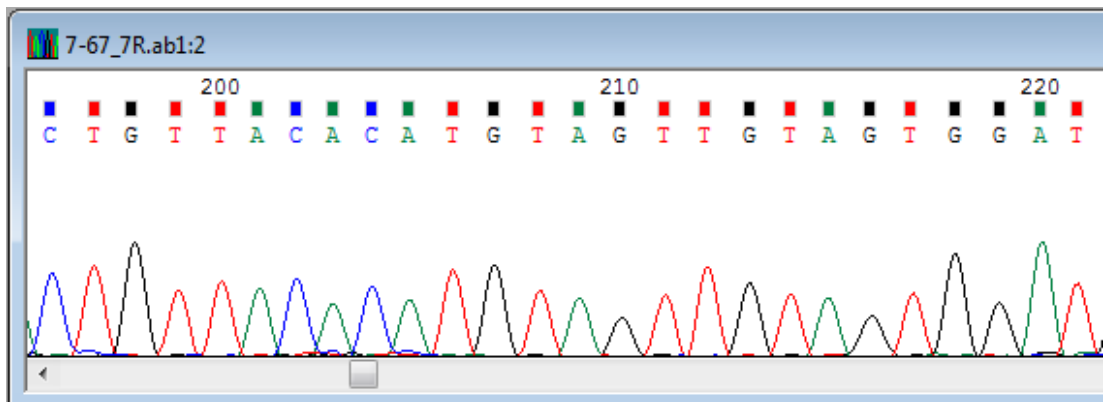
Şekil 5.4. Ex5 kodon 181 (CGC/TGC)



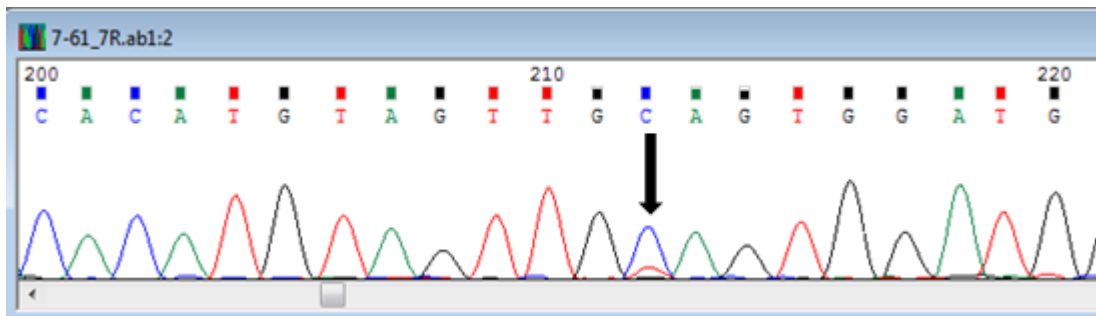
Şekil 5.5. Ex6 kontrol dizisi (1)



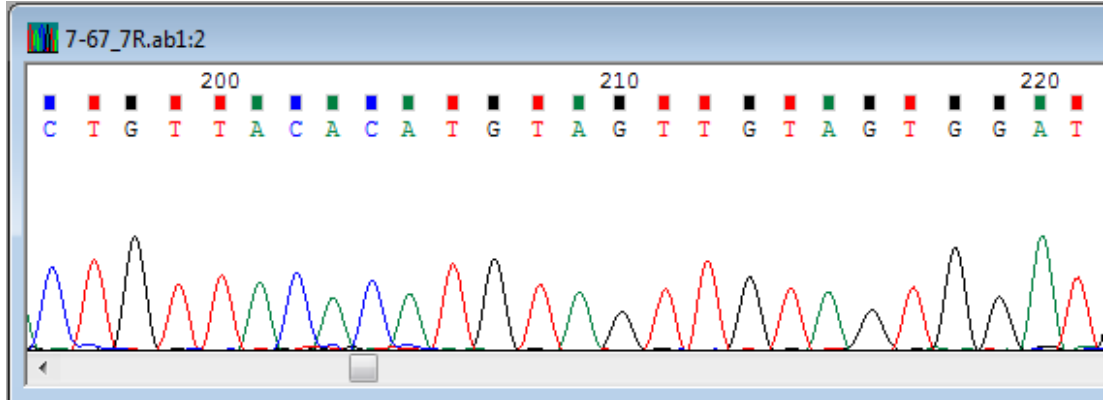
Şekil 5.6. Ex6 kodon190 (CTT/TCT)



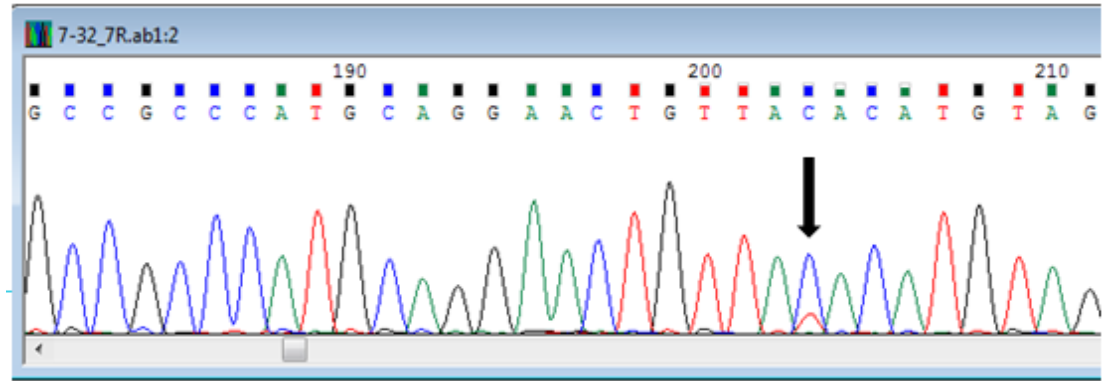
Şekil 5.7. Ex7 kontrol dizisi (1)



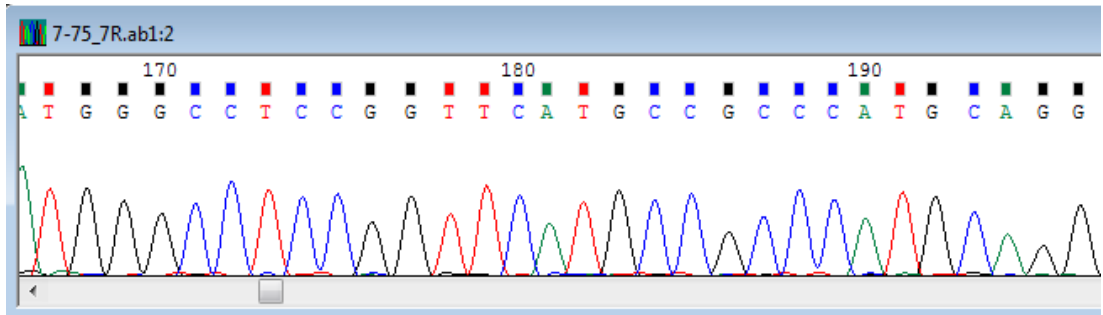
Şekil 5.8. Ex7 kodon 234 (TAC/TGC)



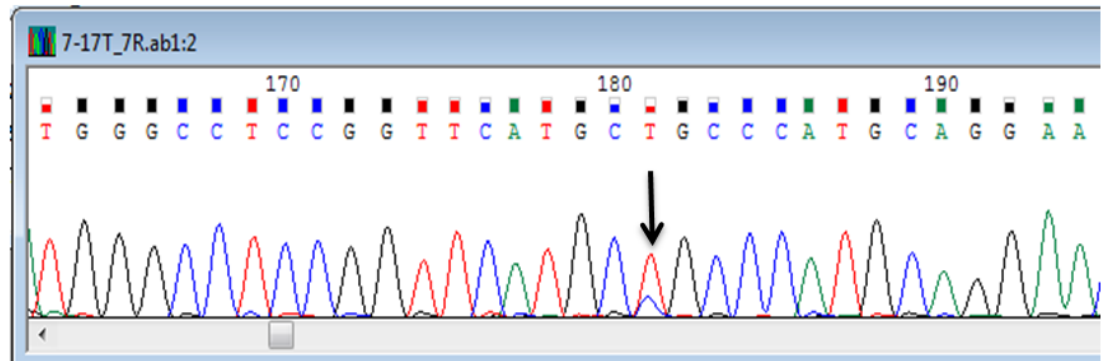
Şekil 5.9. Ex7 kontrol dizisi (2)



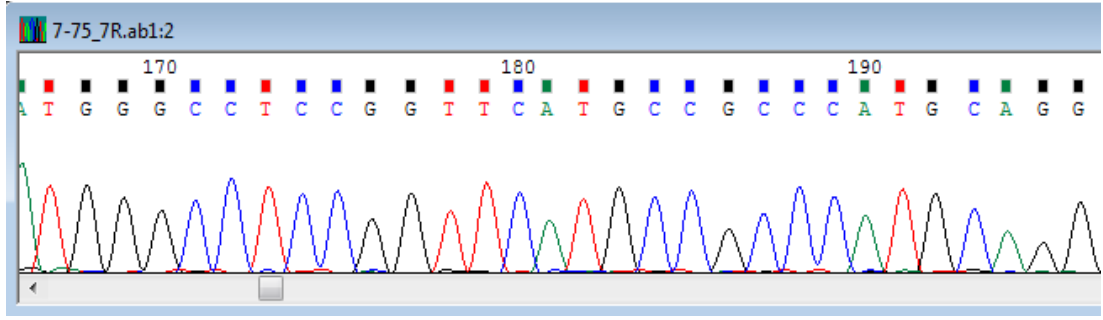
Şekil 5.10. Ex7 kodon 238 (TGT/TAT)



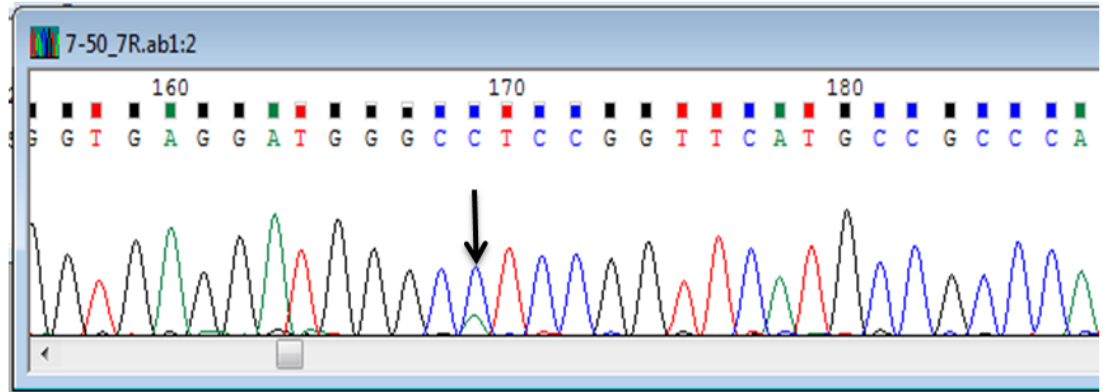
Şekil 5.11. Ex7 kontrol dizisi (3)



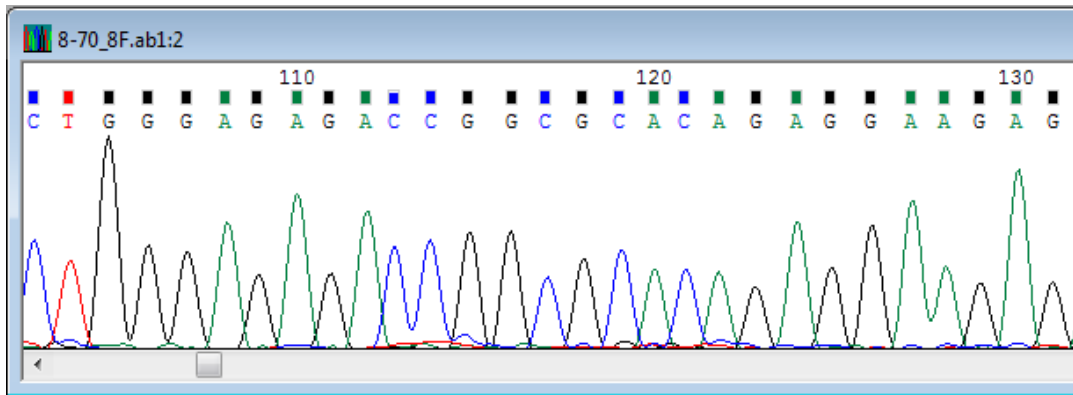
Şekil 5.12. Ex7 kodon 245 (GGC/AGC)



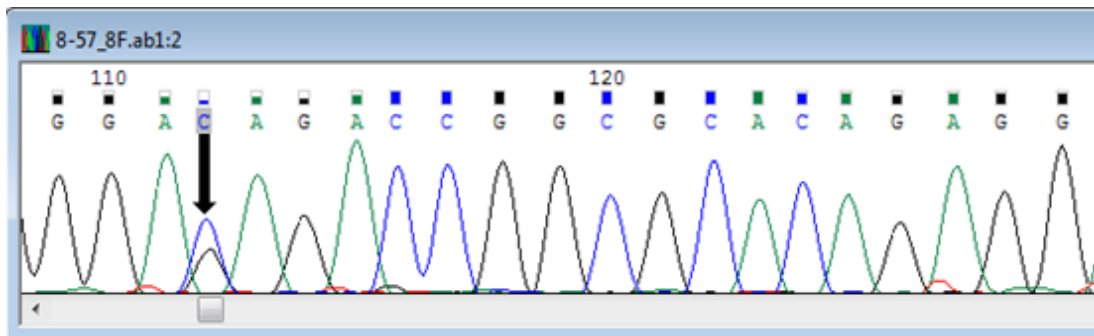
Şekil 5.13. Ex7 kontrol dizisi (4)



Şekil 5.14. Ex7 kodon 249 (AGG/ATG)



Şekil 5.15. Ex8 kontrol dizisi



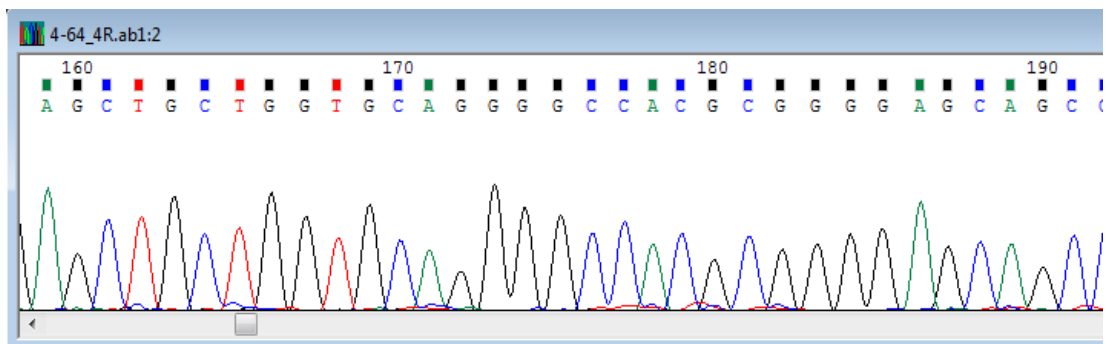
Şekil 5.16. Ex8 kodon 280 (AGA/ACA)

Tablo 5.1. p53 geninde belirlenen mutasyonlar

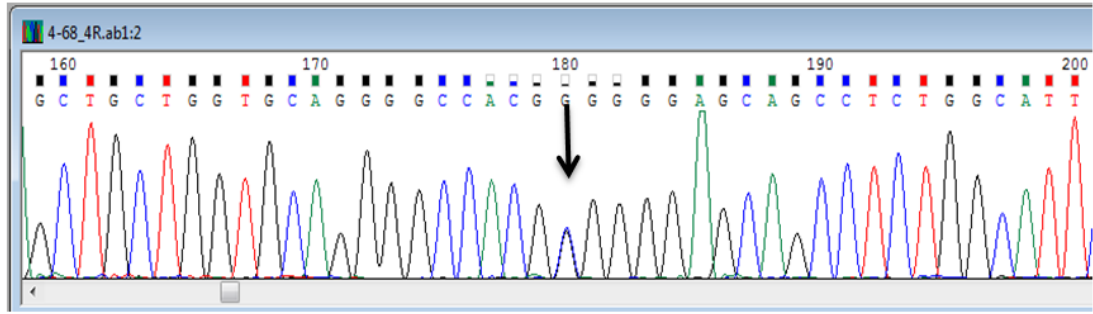
ID	Ekzon	Kodon	Mutasyon	Aminoasit	Tümör derecesi	Sigara
55	5	181	<u>C</u> GC/ <u>T</u> GC	Arg/Cys	T2G3	30yıl 1p/gün
32	6	190	<u>C</u> CT/ <u>T</u> CT	Pro/Ser		
32	7	238	<u>T</u> GT/ <u>T</u> AT	Cys/Tyr		
50	7	249	<u>A</u> GG/ <u>A</u> TG	Arg/Met		
61	7	234	<u>T</u> AC/ <u>T</u> GC	Tyr/Cys	T1G3	20 yıl 1pk/g
76	7	245	<u>G</u> GC/ <u>A</u> GC	Gly/Ser	T1 G3	40 yıl 1pk/gün 30 yıl önce bırakmış
57	8	280	<u>A</u> GA/ <u>A</u> CA	Arg/Thr	T2G3	50 yıl 1pk/gün
59	8	280	<u>A</u> GA/ <u>A</u> CA	Arg/Thr	T2G3	40 yıl 1,5pk/gün

5.2.2. P53 genindeki polimorfizmler

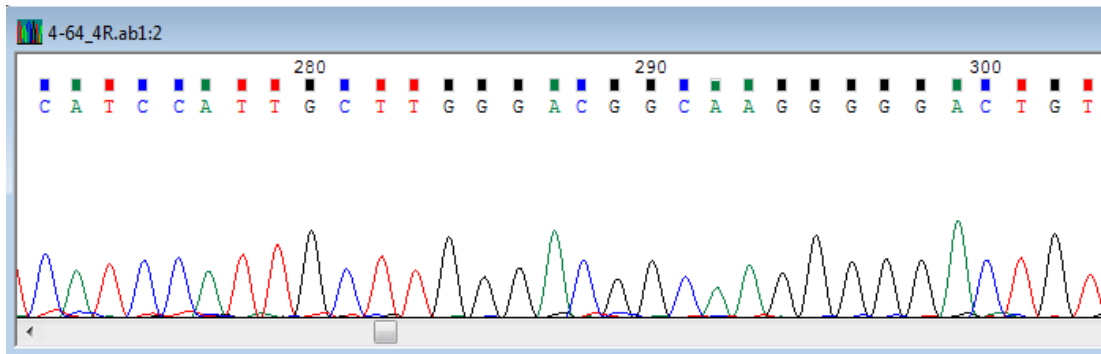
Ekzon 4,6 ve intron 7 ve 9'da bulunan polimorfizmler Şekil 5.17 - 5.26'te gösterilmiş ve Tablo 5.2'de özetlenmiştir.



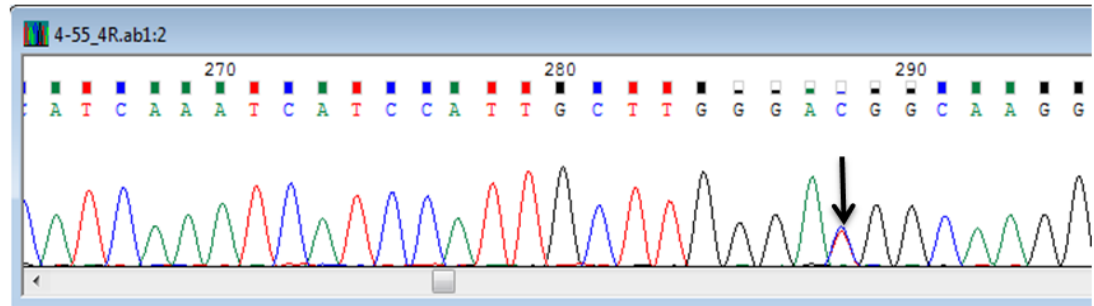
Şekil 5.17. Ex4 kontrol dizisi (1)



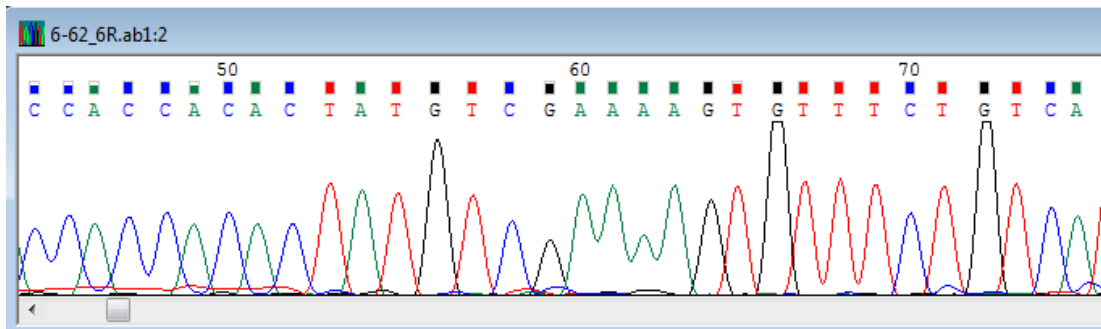
Şekil 5.18. Ex4 kodon 72 (CGC/CCC)



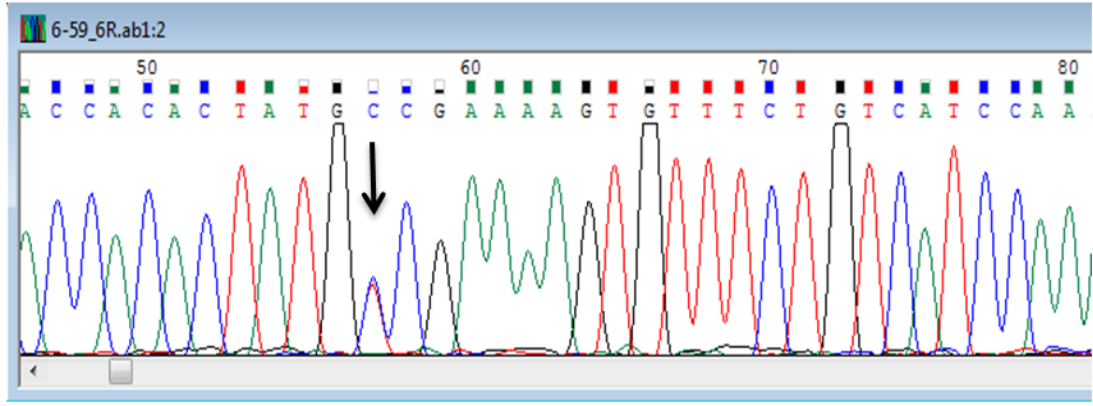
Şekil 5.19. Ex4 kontrol dizisi (2)



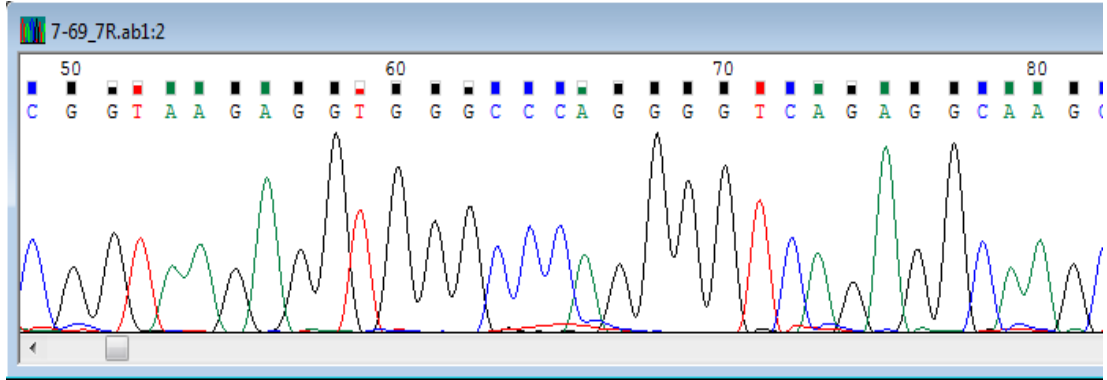
Şekil 5.20. Ex4 kodon 36 (CCC/CCG)



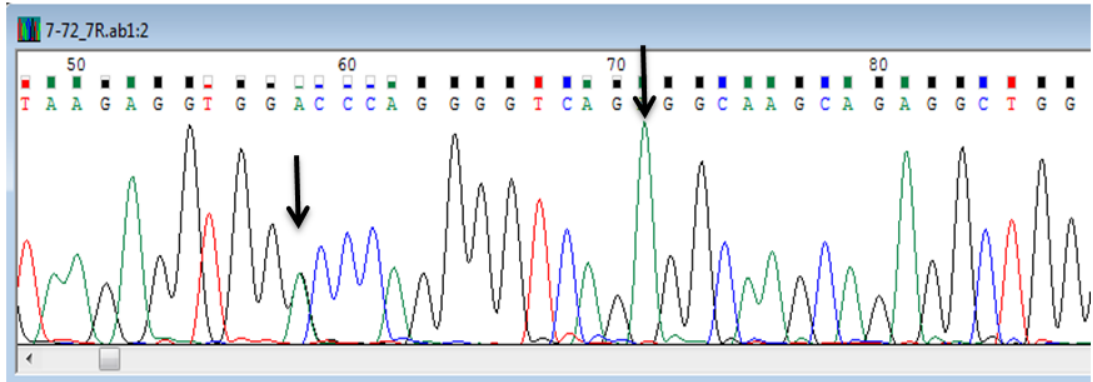
Şekil 5.21. Ex6 kontrol dizisi (2)



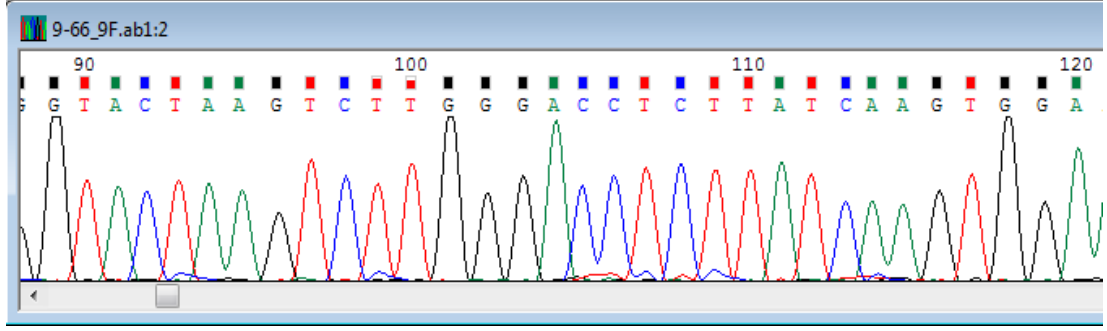
Şekil 5.22. Ex6 kodon 213 (CGA/CGG)



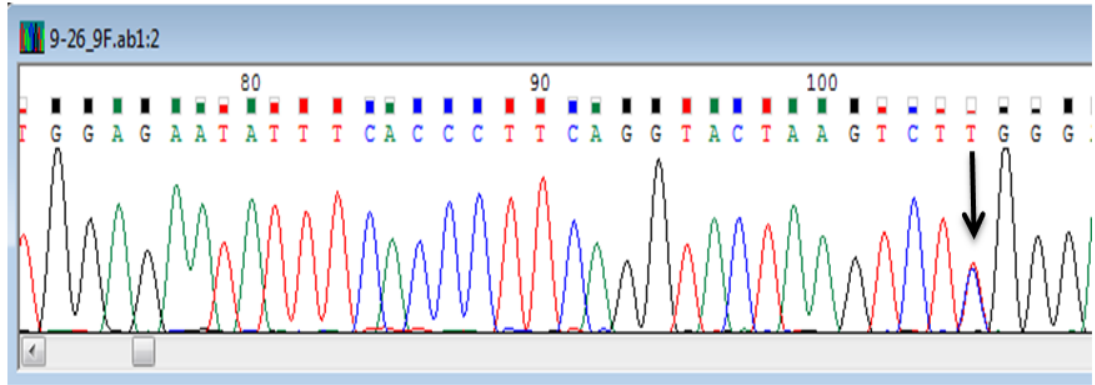
Şekil 5.23. Ex7 kontrol dizisi (5)



Şekil 5.24. Ex7 14181. bp (C/T) ve 14168. bp (G/T) (promotöre göre)



Şekil 5.25. Ex9 kontrol dizisi



Şekil 5.26. Ex9 14766. bp (promotöre göre) (T/C)

Tablo 5.2. p53 genindeki polimorfizmler

Ekzon/İntron	Bölge	Polimorfizm	Genotip	Birey Sayısı
Ekzon4	Kodon 72	Arg/Pro CGC/CCC	CC	6
			GC	27
			GG	27
	Kodon 36	CCC/CCG	GT	3
Ekzon 6	Kodon 213	Arg/Arg CGA/CGG	AG	3
İnt 7	14181bp (promotöre göre)	C/T	CT	8
			TT	2
İnt9	14766 bp (promotöre göre)	T/C	TC	2

Tümör dokusunda mutasyon bulunan hastaların kodon72'de taşıdıkları alleller Tablo 5.3'te gösterilmiştir.

Tablo 5.3. Mutasyon bulunan hastaların kodon 72 polimorfizm profili

ID	Ekzon	Kodon	Mutasyon	KODON 72 Polimorfizmi
55	5	181	<u>C</u> GC/ <u>T</u> GC	GC
32	6	190	<u>C</u> CT/ <u>T</u> TCT	GC
32	7	238	T <u>G</u> T/ <u>T</u> AT	GC
50	7	249	A <u>G</u> G/ <u>A</u> TG	GG
61	7	234	T <u>A</u> C/ <u>T</u> GC	GG
76	7	245	<u>G</u> GC/ <u>A</u> GC	CC
57	8	280	A <u>G</u> A/ <u>A</u> CA	GG
59	8	280	A <u>G</u> A/ <u>A</u> CA	GC

5.3. p53 Arg72Pro polimorfizminin mesane kanserine yatkınlıktaki rolü

Hasta ve kontrol grubunun kodon72 genotip dağılımlarının Hardy-Weinberg Dengesine uygunluğu ki-kare testi ile değerlendirilmiştir (Tablo 5.4.). Test sonuçlarına göre kontrol popülasyonu Hardy-Weinberg dengesindedir ($p > 0,05$) ve genotip frekansları hasta popülasyonu ile karşılaştırarak kontrol grubu olarak kullanılmaya uygundur. Arg amino asidi CGC, pro amino asidi ise CCC kodunu ile temsil edilir.

Tablo 5.4. Hardy-Weinberg testi sonuçları

Kodon 72	Gözlemlenen allel frekansı			Beklenen allel frekansı			p
	GG	GC	CC	GG	GC	CC	
Hasta	27	27	6	27,3	26,3	6,3	0,842
Kontrol	38	51	13	15	48	40	0,518

Kodon 72 polimorfizmine ait hasta ve kontrol genotiplerinin dağılımları Tablo 5.5.'de gösterilmiştir. SPSS 13.0 programı kullanılarak bu polimorfizmin hastalık için oluşturduğu risk hesaplanmıştır (Tablo 5.5.). Tüm ilişkilendirme analizlerinde $p < 0,05$ değerleri istatistiksel anlamlılık olarak kabul edilmiştir.

PLINK'te yapılan allel frekansları karşılaştırılması testinde p değeri 0,05'ten büyük çıktığından dolayı kontrol ve hastalar arasında allel açısından anlamlı bir farklılık bulunamamıştır (Tablo 5.6.).

Model asosiyasyon testi ile hasta ve kontrol grubunun genotipleri karşılaştırıldığında aynı şekilde p değeri 0,05'ten yüksek bulunmuştur ($p=0.7442$). Genotipler açısından hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı farklılık bulunamamıştır (Tablo 5.7.). C alleli için risk tahmini PLINK'te lojistik regresyon analizi ile yapılmıştır (Tablo 5.8.).

Tablo 5.5. Genotiplerin hasta ve sağlıklı bireylerde dağılımı

Grup	Genotip			Toplam
	CC	GC	GG	
Kontrol	13 %12,7	51 %50,0	38 %37,3	102 %100
Hasta	6 %11	27 %49,3	27 %39,7	60 %100
Toplam	19 %11,8	78 %48,1	65 %40,1	162 %100

Tablo 5.6. Hasta ve kontrol gruplarının allel frekanslarının karşılaştırılması

CHR	SNP	BP	A1	F_A	F_U	A2	CHISQ	P	OR
17	Kodon 72	1	C	0.3362	0.3775	G	0.5443	0.4606	0.8354

A1: Az görülen allel, A2: Çok görülen allel, F_A: Az görülen allelin hastalardaki frekansı, F_U: Az görülen allelin kontrollerdeki frekansı, CHISQ: Ki kare, OR: Odds ratio

Tablo 5.7. Model asosiyasyon testi ile hasta ve kontrollerin genotiplerinin karşılaştırılması

CHR	SNP	A1	A2	TEST	AFF	UNAFF	CHISQ	DF	P
17	Kodon 72	C	G	GENO	6/27/27	13/51/38	0.5908	2	0.7442

AFF: Hastalarda genotipik/allel dağılımı, UNAFF: Kontrollerde genotipik/allel dağılımı, DF: Serbestlik derecesi.

Tablo 5.8. C allelini taşıyanlar ve risk tahmini

		C allel +		Total	OR	%95 CI	p
		GG (C- ALLEL)	C allel + (CC+ CG)				
GRUP	KONTROL	39	63	102	0.9451	0.5179- 1.347	0,000
	HASTA	29	44	73			
Total		68	107	175			

Cinsiyet, yaş ve sigara kullanımının da mesane kanseri oluşumuna etkileri SPSS 13.0 yazılımı ile incelenmiştir.

Sigara içimi ve mesane kanseri arasındaki ilişkinin incelenebilmesi için hasta ve kontrol grubu sigara kullanımına göre gruplanmıştır. Hasta ve sağlıklı bireylerin toplamda 116'sının sigara bilgisi varken 46'sının sigara bilgisi yoktur. Analizde sadece sigara bilgisi olanlar dahil edilmiştir, bu nedenle birey sayısı azdır. Yapılan analiz sonucunda sigara içenlerin mesane kanserine yakalanma riskinin içmeyenlere göre istatistiksel olarak önemli derecede arttığı belirlenmiştir (Tablo 5.9. ve 5.10.).

Tablo 5.9. Sigara içimi için Ki-kare testi

Grup	Sigara içen	Sigara içmeyen	Pearson χ^2	df	p
Kontrol	23	49	27,181	1	0,000
Hasta	36	8			

Tablo 5.10. Sigara içimi için risk tahmini

Sigara içmeyen / sigara içen OR	(%95 CI)
9,587	3,850-23,872

6. TARTIŞMA

Mesane kanseri erkeklerde görülen kanserlerin %6-8'ini, kadınlarda ise %2-3'ünü kapsamaktadır. Erken yaşlarda görülen olgular olmakla birlikte, daha çok 60-70 yaş aralığında, yani geç yaşta ortaya çıkmaktadır. Mesane kanserinin epidemiyolojisi incelendiğinde birçok çevresel faktörle ilişkili olduğu görülmüştür. Uzun bir süredir anilin içeren boyaların mesane kanseri riskini arttırdığı gösterilmiştir. Özellikle kauçuk, boya, organik kimyasallar içeren işlerde çalışan işçiler aromatik aminlere maruz kaldıklarından mesane kanseri gelişme riski bu grup için yüksektir. Motorin dumanlarına maruz kalma ve uzun süre fenasetin içeren analjezik kullanımı da mesane kanserinin gelişimiyle ilişkilendirilmiştir. Ama bunların dışında sigara kullanımı en önemli faktördür. Öyle ki, sigara kullananlarda mesane kanseri gelişme riski kullanmayanlara göre 2 ile 6 kat daha fazladır (Macvicar, 2002).

Mesane kanseri gelişimi ve progresyonu multifaktöriyeldir. p53'teki mutasyonlarla birlikte diğer genetik defektler de bu süreçte yer alır. p53 mutasyonu dışında kromozom 9 delesyonu ve bu kromozomdaki değişiklikler, retinoblastoma genindeki mutasyonların da mesane tümörleriyle alakalı olduğu düşünülmüştür (Cairns ve diğ., 1993). Özellikle p53 mutasyonlarının yüksek evreli ve dereceli tümörlerde ve tümör progresyonunda önemli rol oynadığı bir çok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Tsuji ve diğ., 1997, Fujimoto ve diğ., 1992).

6.1. p53 mutasyonları

P53 kodon 249'da G>T transversiyonunun varlığı bir hastanın tümör dokusunda gösterilmiştir. Bu bulgu değerlendirildiğinde özellikle akciğer kanserlerinde G>T transversiyonu yerine G>A tranzisyonunun varlığı gösterilmiştir (Hussain ve diğ., 1997).

Kodon 280 üriner mesane kanserlerinin %5.1'inde mutanttır (Berggren ve diğ., 2001). Bu bölge p53'ün DNA'a bağlanma bölgesinde bulunmaktadır. 2 bireyde

bu kodonda G>C mutasyonu gözlenmiştir. Her iki birey de T2G3 tümör tipine sahipken bir diğer ortak yanları birinin 40 yıl, diğerinin 50 yıldır sigara içiyor olmasıdır. Ancak, uzun süre sigara kullanmanın bu mutasyonla ilişkili olup olmadığını gösterebilmek için örnek sayısının fazla olması gerekmektedir.

Tablo 5.1.'de görüldüğü üzere bulunan bütün mutasyonlar ileri evredeki hastalarda görülmüştür. p53 genindeki mutasyonların çoğunun ileri evre tümörlerde görülmesi beklenen bir durumdur (Esrig ve diğ., 1993). 181 (C>T), 190 (C>T), 234 (A>G), 238 (G>A), 245 (G>A) kodonlarında transizyon; 249 (G>T), 280 (G>C) kodonlarında ise transversiyonlar bulunmuştur. Berggren ve arkadaşlarının 189 hastayla yaptıkları bir çalışmada bulunan mutasyonların 22 tanesi transizyon iken 8 tanesi transversiyondur (Berggren ve diğ., 2001). G>A transizyonları sigara içerisindeki nitrozaminlerin sebep olduğu baş ve boyun ve ösofagus kanserlerinde görülmektedir (Greenblatt ve diğ., 1994).

Ayrıca aynı grubun çalışmasında kodon 280'de dört mutasyon bulunmuştur (Berggren ve diğ., 2001). Kodon 280'de bulduğumuz Arg/Thr değişimine sebep olan G>C transversiyonu Berggren tarafından da gösterilmiştir.

Kodon 245'te G>C mutasyonu Berggren tarafından gösterilmişken bizim bulgularımızda kodon 245'te G>A mutasyonu olduğu bulunmuştur (Berggren ve diğ., 2001). Kodon 245'teki mutasyonun kasa invazif olmayan tümörlerde görüldüğü bulunmuştur (Spruck CH III ve diğ., 1994). Kodon 238 ve 249'da bulunan mutasyonlar CpG adalarında yer almamaktadır (Feng ve diğ., 2002).

Kodon 190'daki mutasyon kolorektal kanserlerde gösterilmiştir (Costa ve diğ., 2005). Bu mutasyon daha önce mesane kanserli hastalarda gösterilmemiştir.

Li-Fraumeni hastalığına sahip bir ailede yapılan çalışmalarda kodon 181'deki mutasyonun sadece ikinci bir kanser türü daha taşıyan bireylerde olduğu görülmüştür. Eşey hücre geçişli mutasyon olan kodon 181 mutasyonunun erken evre kanserlerinin oluşma riskini arttırmakla ilişkilendirilmemiştir (Frebourg ve diğ., 1992). Çalışmamızda mutasyon bulunan hastanın ikinci bir kanser türüne sahip olup olmadığı bilgisi bulunmamaktadır. Ancak hastanın T2G3 dereceli tümöre sahip olduğu bilinmektedir.

6.2. p53 polimorfizmleri

Kodon 36'daki (CCG>CCT) sessiz mutasyonların; MDM2' nin TP53 mRNA afinitesini düşürmesi ile P53'ün apoptoz aktivitesini azalttığı görülmüştür. Bu çalışmada iki örnekte G>A değişimi heterozigot olarak görülmüştür. Aynı örneklerin birinde (T1G3) intron 9'da (14766 T/C) bir polimorfizm, diğerinde (T2G3) kodon 181'de mutasyon görülmüştür.

Çalışılan bütün örneklerde intron 7'de 14168 pozisyonunda G/T değişimi görülmüştür. Bütün örneklerde bu durumun görülmesi referans dizinin doğruluğu hakkında şüpheye sebep olmuştur. Nitekim yapılan araştırmalarda 14168. pozisyonda yabancı tipin G bazı yerine T bazı olduğu görülmüştür (Gale ve diğ., 2003).

P53 geninde ekzon 7'nin 3' ucunun 72 bp altında, 14181 pozisyonunda lokalize C→T polimorfizminin frekansının %15 civarında ve kontrol ve hastalarda bu frekansın birbiriyle neredeyse aynı olduğu bulunmuştur. Bu durum polimorfizmin üriner mesane kanserinin patogenezi ve etiyolojisiyle ilgisi olmadığını düşündürmüştür (Berggen ve diğ., 2000). Hastaların 10 tanesinde bu polimorfizm belirlenmiştir. Kontrol grubunda bu polimorfizm taranmadığından mesane kanseri ile ilişkili olup olmadığına dair bir veri elimizde bulunmamaktadır.

Ekzon 6 kodon 213'te aminoasit değişimine sebep olmayan A/G değişimi Berggren ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada eşey hücresi polimorfizmi olarak tanımlanmıştır. (Berggren ve diğ., 2001).

6.2.1. p53 kodon72 polimorfizmi

Patrick ve arkadaşlarının çeşitli hücre kültürleriyle yaptığı deneylerde Arg/Arg alleli taşıyan hücrelerin Pro/Pro allelini taşıyanlara göre daha çabuk apoptoza gittiğini bulmuşlardır. Özellikle ısıya duyarlı protein içeren insan Saos2 hücreleriyle yapılan çalışmada Arg/Arg allelini taşıyan hücrelerin 3-5 kat daha fazla apoptoza gittiklerini göstermişlerdir. Bu bulgularının apoptoz ile kodon 72 polimorfizmi arasındaki ilişkiyi anlayabilmek için hücrelerin ölüm kinetiğini zamana bağlı analizle ölçmeyi hedeflemiş, hem Pro72 hem Arg72 içeren hücre kültürlerinde p21, MDM2, kaspaz 9, kaspaz3 ve PARP proteinlerin sıcaklık değiştikten 15 saat sonra miktarlarının arttığını gözlemlemişlerdir. Bu parçalanma proteinlerinin Arg72 klonlarında 10-15 kat daha fazla olduğu görülmüştür. Aynı grubun yaptığı çalışmada

her iki genotipin transaktivasyon ve transrepresyon yeteneğinin aynı olduğu bulunmuştur. Arg varyantını taşıyan p53 proteinin mitokondrideki lokalizasyonunun da daha iyi olduğu ve mitokondrinin kilit proteinleri olan GRP75 ve Hsp60 ile etkileşiminin daha yüksek olduğu bulunmuştur. Bütün bu bulgulara rağmen bu polimorfik bölgenin kanser ile ilişkisi tamamen aydınlatılmış değil. Çünkü bu bölgedeki polimorfizm etnik kökene göre farklılıklar göstermektedir (Dumont ve diğ., 2003).

Marin ve arkadaşlarının çalışmalarında skomöz hücre tümörlerinde Arg/Arg genotipinin hücre büyümesinin inhibisyonunu azalttığını raporlamışlardır. p53Arg'nin konformasyonundan ötürü p73'e bağlanarak p73 ile indüklenen apoptozu nötralize etmektedir (Marin ve diğ., 2000).

p53 kodon 72 polimorfizminin frekansı etnik kökene göre çeşitlilik göstermektedir. Tablo 1.5.' te çeşitli etnik gruplarda Arg/Arg, Pro/Pro, Arg/Pro allellerinin frekanslarının farklı olduğu ve ortak olarak bütün popülasyonlarda Pro/Pro allelini taşıyan bireylerin frekansının düşük olduğu gösterilmiştir. Kodon 72 varyant allelleri çeşitli kanserlerle ilişkilendirilmiştir. Örneğin Pro/Pro genotipi Tayvanlı ve Japonlarda görülen akciğer kanseriyle ilişkilendirilmişken beyaz ırk ve Afro-Amerikalılarda ilişkilendirilmemiştir (Kuroda ve diğ., 2003). Kodon 72'de G>C değişimi (Arg/Pro) verileri değerlendirildiğinde heterozigot GC genotipinin hasta bireylerde %49,3 iken sağlıklı bireylerde %50'dir. CC (prolin) genotipinin görülme sıklığı sağlıklı bireylerde %12,7 iken hastalarda %11'dir. Arg'nin (GG) görülme sıklığı hastalarda %39,7, kontrol grubunda %37,3'tür. Hastalar ve kontroller arasında PLINK'te yapılan allelik asosiyasyonun anlamlı olmadığı bulunmuştur. Törüner ve grubunun Türk popülasyonunda mesane kanseri hastalarıyla yaptığı çalışmada kodon 72 polimorfizminin mesane kanseri için anlamlı olmadığı gösterilmiştir (Törüner ve diğ., 2001).

Çalışmalarımızda Pro/Pro allelini taşıyan 5 hastanın olduğu görülmüştür. Bu hastaların tümör dereceleri ile bir ilişki olup olmadığına baktığımızda invazif olmayan, ileri evre, farklılaşmamış gibi çeşitli evrelerde oldukları görülmektedir (Ta, T3, T1G3, T2G3). Ancak Lin ve arkadaşlarının çalışmaları Pro/Pro genotipinin yüksek dereceli tümörlerle ilişkili olmadığını (P=0.078) fakat kasa invazif tümörlerle oldukça ilişkili olduğunu göstermiştir (P=0.002) (Lin ve diğ., 2012). Tayvan'da yapılan çalışmada mesane kanserinin ilerleyişinde Pro/Pro genotipinin yüksek negatif prediktif değere sahip olduğu görülmüştür (Lin ve diğ., 2012). Türk

popülasyonunda yapılan bir çalışmada p53Arg allelini taşıyan bireylerin meme kanseri ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir (Buyru ve diğ., 2003).

6.3. Çevresel Faktörlerin Etkisi

Bu çalışmadaki veriler değerlendirildiğinde sigara içenlerin mesane kanserine yakalanma sıklığı, içmeyenlere göre 9 kat daha fazladır (OR=9,587). Sigara içenlerin sigara içme yoğunluğu ve mesane kanseri riski için risk tahminleri oldukça yüksek çıkmıştır (OR = 8.8, 11.5 ve 23.8) (Alguacil ve diğ., 2011). Ayrıca, mesane kanserinde sigaranın risk faktörü olduğu Dalsu ve arkadaşları tarafından da gösterilmiştir (OR=5,2) (Dalsu ve diğ.,2009). Aynı çalışmada toplamda 1170 hasta ve 1413 sağlıklı bireyin verileri kullanılarak sigara içenler, içip bırakanlar (bırakma zamanları ile), toplamda kaç sene içtiği gibi parametreler de dikkate alınarak tümör derecesi ve risk faktörü değerlendirilmiştir. Bu çalışmada yer alan bireyler arasında uzun süreler sigara kullanıp bırakan 5 hasta bulunmaktadır (20 ile 60 yıl arasında değişen sürelerde içip bırakmış olanlar). Bu hastaların tümör dereceleri de birbirinden farklılık göstermektedir (T1G1, T1G3, T2G3).

6.4. Son Söz

Bu tez çalışmasında p53 genindeki mutasyonlar mesane kanserli hastalarda taranmıştır. Kodon 72 polimorfizminin etnik kökene göre farklılık göstermesi değişik popülasyonlarda ve değişik kanserlerde farklı sonuçlara sebep olmuştur. Yapılan istatistiki hesaplar sonucu hasta ve kontrol grubu arasında C alleli için anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. Bunun yanında hasta grubunda 181, 190, 234, 238, 245, 249 ve 280. kodonlarda mutasyonlar bulunmuştur. Kodon 190'daki mutasyon daha önce mesane kanseri ile ilişkilendirilmemiştir. Bulunan mutasyonlar mesane kanserinin mekanizması ve önlenmesi açısından ileride yapılacak çalışmalar için aydınlatıcı nitelikte olabilir.

7. KAYNAKLAR

Akça H ve Tokgün O (2012). Genetik alteration in bladder carcinoma. *Üroonkoloji Bülteni*. 1(1):10-13.

Alguacil J, Kogevinas M, Silverman TD, Malats N, Real XF, ve diğ. (2011). Urinary pH, cigarette smoking and bladder cancer risk. *Carcinogenesis*. 32 (6): 843-847.

Andersson S, Rylander E, Strand A ve diğ. (2001). The significance of p53 codon 72 polymorphism for the development of cervical adenocarcinomas. *Br J Cancer*. 85 (8): 1153-1156.

Angervall L, Bengtsson U, Zetterlung CG, Zsigmond M (1969). Renal pelvic carcinoma in a Swedish district with abuse of a phenacetin-containing drug. *Br J Urol*. 41: 401–405.

Aysun Açar (2009). *GRIN1, GRIN2A, GRIN2B ve TP53 lokuslarındaki polimorfizmlerin Huntington Hastalığı Başlangıç Yaşına Etkileri*. Yüksek Lisans Tezi. Haliç Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

Babjuk M, Oosterlinck W, Sylvester R, Kaasinen E, Böhle A, Palou-Redorta J (2011). EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder. *The 2011 update. Eur Urol*. 59(6):997-1008.

Bailey M ve Sarosdy M (2001). *Fast Facts – Mesane Kanseri*. Murat Kahramanoğlu (Çev), AND Danışmanlık ve Yayıncılık.

Beckman G, Birgander R, Sjalander A ve diğ. (1994). Is p53 polymorphism maintained by natural selection? *Hum Hered*. 44: 266-270.

Berggen P, Hemminki K, Steineck G (2000). Stockholm Bladder Cancer Group, p53 intron 7 polymorphisms in urinary bladder cancer patients and controls. *Mutagenesis*. 15(1):57-60.

Berggen P, Kumar R, Sakano S (2003). Detecting Homozygous Deletions in the CDKN2A(p16INK4a)/ARF(p14ARF) Gene in Urinary Bladder Cancer Using Real-

Time Quantitative PZR. *Clin Cancer Res.* 9:235-242.

Berggren P, Steineck G, Adolfsson J, Hansson J, Jansson O, Larsson P, Sandstedt B, Wijkström H, Hemminki K (2001). p53 mutations in urinary bladder cancer. *British Journal of Cancer.* 84(11), 1505–1511

Billerey C, Chopin D, Lorton M, Ricol D, Medina S (2001). Knockdown by shRNA identifies S249C mutant FGFR3 as a potential therapeutic target in bladder cancer, Frequent FGFR3 Mutations in Papillary Non-Invasive Bladder (pTa) Tumors. *American Journal of Pathology.* 158 (6).

Brauers A, Jakse G (2000). Epidemiology and biology of human urinary bladder cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology.* 126:575-583.

Bunz F (1998). Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science.* 282:1497-501.

Buyru N, Tigli H, Dalay N (2003). P53 codon 72 polymorphism in breast cancer. *Oncol Rep.* 10(3):711-4.

Cadwell C, Zambetti GP (2001). The effects of wild-type p53 tumor suppressor activity and mutant p53 gain-of-function on cell growth. *Gene.* 277:15-30.

Cairns P, Shaw MC, Knowles MA (1993). Preliminary mapping of the deleted region of chromosome 9 in bladder cancer. *Cancer Res.* 53: 1230-1232.

Case RAM ve Pearson JT (1954). Tumours of the Urinary Bladder in Workmen Engaged in the Manufacture and Use of Certain Dyestuff Intermediates in the British Chemical Industry: Part II. Further Consideration of the Role of Aniline and of the Manufacture of Auramine and Magenta (Fuchsine) as Possible Causative Agents. *British Journal of Industrial Medicine.* 11(3): 213-216.

Castelao JE, Yuan JM, Gago-Dominguez M, Yu MC, ve Ross RK (2000). Non-steroidal anti-inflammatory drugs and bladder cancer prevention. *Br J Cancer.* 82(7): 1364–1369.

Castalao E, Yuan J, Skipper P, Tannenbaum S, Dominguez M, Crowder S, Ross R, Yu M (2001). Gender- and Smoking-Related Bladder Cancer Risk. *Journal of the National Cancer Institute.* 93:538–45.

Chen W, Tsai F, Wu J, Wu H, Lu H, Li C (2000). Distributions of p53 codon 72

polymorphism in bladder cancer – proline form is prominent in invasive tumor. *Urological Research*. 28(5): 293-296.

Cheng L, Neumann RM, Bostwick DG (1999). Papillary urothelial neoplasms of low malignant potential. Clinical and biologic implications. *Cancer*. 86:2102-8.

Costa A, Marasca R, Valentinis B, Savarino M, ve diğ. (2005). p53 gene point mutations in relation to p53 nuclear protein accumulation in colorectal cancers. *The Journal of Pathology*. 176(1): 45–53.

Cüreklibatır İ ve Demirydoğan S (2005). Yüzeysel mesane tümörlerinde kemo-immunoterapi sonrası nüks. *Üroonkoloji Bülteni*. 3:9-14.

Dalsu B, Karagas M, Verrill C, Johnson A, Andrew A, Marsit C, Schwenn M, Colt J, Cherala S, Samanic C, Waddell R, Cantor K, Schned A, Rothman N, Lubin J, Fraumeni Jr J, Hoover R, Kelsey K, Silverman D (2009). A Case – Control Study of Smoking and Bladder Cancer Risk: Emergent Patterns Over Time. *J Natl Cancer Inst*. 101:1553–1561.

Ding-wei Y, Jia-fu Z, Song-xi Q ve diğ. (1993). Expression of 53 product in Chinese human bladder carcinoma. *Urol Res*. 21:223-6.

Doherty S, McKeown S, McKelvey-Martin V, Downes S, Atala A, Yoo J, Simpson D, Kaufmann W (2003). Cell Cycle Checkpoint Function in Bladder Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 95(24):1859-1868.

Drummond SN, De Marco L, Prodeus Ide A ve diğ. (2002). TP53 codon 72 polymorphism in oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res*. 22: 3379-3381.

Dumont P, Leu J, Pietra III ACD, Donna LG & Murphy M (2003). The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nature Genetics*. 33:357 – 365.

Dybikowska A, Dettlaff A, Konopa K, Podhajaska A (2000). p53 codon 72 polymorphism in cervical cancer patients and healthy women from Poland. *Acta Biochim Pol*. 47: 1179-1182.

Ehdaie B, Maschino A, Shariat SF, Rioja J, Hamilton RJ, Lowrens WT (2012). Comparative outcomes of pure squamous cell carcinoma and urothelial carcinoma with squamous differentiation in patients treated with radical cystectomy. *J Urol*. 187(1):74-9.

- Epstein JI, Amin MB, Reuter VR, Mostofi FK (1998). The World Health Organization/International Society of Urological Pathology consensus classification of urothelial (transitional cell) neoplasms of the urinary bladder. Bladder Consensus Conference Committee. *Am J Surg Pathol*. 22:1435-48.
- Esrig D, Spruck III CH, Nichols PW, Chaiwun B, Steven K, Groshen S ve diğ. (1993). p53 Nuclear Protein Accumulation Correlates with Mutations in the p53 Gene, Tumor Grade, and Stage in Bladder Cancer. *American Journal of Pathology*. 143(5): 1389–1397.
- Feng Z, Hu W, Rom NW, Beland FA ve Tang MS (2002). 4-Aminobiphenyl is a major etiological agent of human bladder cancer: evidence from its DNA binding spectrum in human p53 gene. *Carcinogenesis*. 23(10): 1721–1727.
- Frebourg T, Kassel J, Lam TK, Gryka AM, Barbier N ve diğ. (1992). Germ-line mutations of the p53 tumor suppressor gene in patients with high risk for cancer inactivate the p53 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 89:6413-6417.
- Fujimoto K, Yamada Y, Okajima E ve diğ. (1992). Frequent association of p53 gene mutation in invasive bladder cancer. *Cancer Res*. 52:1393-8.
- Gale JM, Romero CP, Tafoya GB, Conia J (2003). Application of Optical Trapping for Cells Grown on Plates: Optimization of PZR and Fidelity of DNA Sequencing of p53 Gene from a Single Cell. *Clinical Chemistry*. 49:3 415–424.
- Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M and Harris CC (1994) Mutations in the p53 tumor suppressor gene: Clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res*. 54: 4855–4878.
- Harris CC (1996). Structure and Function of the p53 Tumor Suppressor Gene: Clues for Rational Cancer Therapeutic Strategies. *Journal of the National Cancer Institute*. 88:1442-1455.
- Hayes VM, Hofstra RMW, Buys CHCM ve diğ. (1998). Homozygous arginine - 72 in wild type p53 and risk of cervical cancer. *Lancet*. 352: 1756.
- Helland A, Langerod A, Johnsen H ve diğ. (1998). p53 polymorphism and risk of cervical cancer. *Nature*. 396: 530-531.

- Herr HW, Dalbagni G, Donat SM (2011). Bacillus calmette-guérin without maintenance therapy for high-risk non-muscle-invasive bladder cancer. *Eur Urol.* 60(1):32-6.
- Hildesheim A, Schiffman M, Brinton LA ve diğ. (1998). p53 polymorphism and risk of cervical cancer. *Nature.* 396: 531-532.
- Ho CW, Fitzgerald MX, Marmorstein R (2006). Structure of the p53 core domain dimer bound to DNA. *J Biological Chem.* 281(42): 20494-502.
- Hultengren N, Lagergren C, Ljunqvist A (1965). A Carcinoma of the renal pelvis in renal papillary necrosis. *Acta Chir Scand.* 130: 314–320.
- Hussain S, Kennedy C, Amstad P, Lui H, Lechner J, Harris C (1997). Radon and lung carcinogenesis: mutability of p53 codons 249 and 250 to 238Pu a-particles in human bronchial epithelial cells. *Carcinogenesis.* 18(1):121–125.
- Joshi A, Preslan E (2011). Risk Factors for Bladder Cancer, Challenges of Conducting a Literature Search Using PubMed. *Perspect Health Inf Manag.* Spring 2011.
- Katkooori V, Jia X, Shanmugam C. (2009) Prognostic Significance of p53 Codon 72 Polymorphism Differs with Race in Colorectal Adenocarcinoma. *Clin Cancer Res.* 15:2406-2416.
- Knowles M (2006). Molecular subtypes of bladder cancer: Jekyll and Hyde or chalk and cheese?. *Carcinogenesis.* 27(3):361–373.
- Koca O, Öztürk M, Gökçe M, Keleş M, Güneş M, Kahraman M (2011). Effect of physician's experience on the recurrence of the bladder cancer after transurethral resection, Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi 2. Üroloji Kliniği. *Yeni Üroloji Dergisi - The New Journal of Urology.* 6(3):25-28.
- Konety BR, Williams RD (2004). Superficial transitional (Ta/T1/CIS) cell carcinoma of the bladder, Departments of Urology and Epidemiology, University of Iowa, Iowa, USA. *BJU International.* 94(1):18–21.
- Kurahashi N, Inoue M, Iwasaki M, Sasazuki S, Tsugane S (2009). Coffee, green tea, and caffeine consumption and subsequent risk of bladder cancer in relation to smoking status: a prospective study in Japan for the Japan Public Health Center (JPHC) Study Group. *Cancer Science.* 100(2):284–291.

- Kuroda Y, Tsukino H, Nakao H, Imai H, Katoh T (2003). p53 codon 72 polymorphism and urothelial cancer risk. *Cancer Letters*. 189:77–83
- Levine AJ (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*. 88(3):323-331.
- Lin HY, Huang CH, Yu TJ, Wu WJ, Yang MC, Lung FW (2012). p53 codon 72 polymorphism as a progression index for bladder cancer. *Oncol Rep*. 27(4):1193-9.
- Macvicar AD (2002). Bladder Cancer Staging. *BJU International*. 86 Suppl. 1:111-122.
- Malats N, Bustos A, Nascimento CM, Fernandez F, Rivas M, Puente D (2005). P53 as a prognostic marker for bladder cancer, a meta-analysis and review. *Lancet Oncol*. 6:678.
- Marin MC, Jost CA, Brooks LA, ve diğ. (2000). A common polymorphism acts as an intragenic modifier of mutant p53 behavior. *Nat Genet*. 25:47–54.
- Matullo G, Guarrera S, Sacerdote C, Polidoro S, Davico L, Gamberini S (2005) Polymorphisms/haplotypes in DNA repair genes and smoking: a bladder cancer case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 14:2569.
- Michaud D, Spiegelman D, Clinton S, Rimm E, Curhan G, Willett W, Giovannucci E (1999) Fluid Intake and the Risk of Bladder Cancer in Men, *Engl J Med*. 340:1390-1397.
- Moore LE, Smith AH, Hopenhayn-Rich C (1997). Disease in bladder cell micronucleus prevalence after intervention to lower the concentration of arsenic in drinking water. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 6:1051.
- Moriyama M, Akiyama T, Yamamoto T, Kawamoto T, Kato T, Sato T, Watanuki T, Hikage T, Kassute N, Mori S (1991). Expression of C-erbB-2 gene product in urinary bladder cancer. *J Urol*. 145:423-427.
- Morrison AS (1984) Advances in the etiology of urothelial cancer. *Urol Clin North Am*. 11:557.
- Netto G (2011). Molecular biomarkers in urothelial carcinoma of the bladder: are we there yet? *Nature Reviews Urology*. 9:41-51.

- Ojeda J, Ampuero S, Rojas P ve diğ. (2003). p53 Codon 72 Polymorphism and Risk of Cervical Cancer. *Biol Res.* 36 (2): 279-283.
- Öztürk T (2006). Türk Toplumunda Transizyonel Hücreli Mesane Kanserlerinde CYP 1A1 ve GST M1 Gen Polimorfizmlerinin İncelenmesi. Uzmanlık Tezi. İÜ. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, İstanbul.
- Ploeg M, Aben K, Kiemeny L (2009). The present and future burden of urinary bladder cancer in the World. *World J Urol.* 27:289–293.
- Ploeg M, Kums AC, Aben KK. (2011). Prognostic factors for survival in patients with recurrence of muscle invasive bladder cancer after treatment with curative intent. *Clin Genitourin Cancer.* 9(1):14–21.
- Reuter VR (2006). The pathology of bladder cancer. *Urology.* 67 (Suppl 3A): 11–18.
- Rosenthal AN, Ryan A, Al-Jehani RM ve diğ. (1998). p53 codon 72 polymorphism and risk of cervical cancer in UK. *Lancet.* 352 (9131): 871-872
- Sakamuro D, Sabbatini P, White E, Prendergast GC (1997). The polyproline region of p53 is required to activate apoptosis but not growth arrest. *Oncogene.* 15:887–898.
- Scheckenbach K, Lieven O, Gotte K ve diğ. (2004). p53 codon 72 polymorphic variants, loss of allele-specific transcription, and human papilloma virus 16 and/or 18 E6 messenger RNA expression in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 13 (11 Pt1):1805-1809.
- Schroeder J, Conway K, Li Y (2003). p53 Mutations in Bladder Cancer : Evidence for Exogenous versus Endogenous Risk Factors. *Cancer Res.* 63:7530-7538.
- Sexton WJ., Wiegand LR, Correa JJ, Politis C ve diğ. (2010). Bladder Cancer: A Review of Non–Muscle Invasive Disease. *Cancer Control.* 17(4): 256-68.
- Silverman DT, Devesa SS, Moore LL, Rothman N, Schottenfeld D, Fraumeni JF Jr (2006). Cancer Epidemiology and Prevention, New York, NY. *Oxford University Press.* 1101–1127.
- Smith ND, Rubenstein JN, Eggener SE (2003). The p53 Tumor Suppressor Gene and Nuclear Protein: Basic Science Review and Relevance in the Management of Bladder Cancer, Clinical Urology: Review Article. *J Urol.* 169(4):1219-1228.

- Sorahan T , Lancashire RJ , Sole G (1994). Urothelial cancer and cigarette smoking, findings from a regional case-controlled study. *Br J Urol.* 74(6):753–756.
- Soulitzis N, Sourvinos G, Dokianakis D, Spandidos D (2002). p53 codon 72 polymorphism and its association with bladder cancer. *Cancer Letters.* 179:175–183.
- Soussi T, Lozano G. (2005). p53 mutation heterogeneity in cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 331(3):834-42.
- Spruck CH III, Ohneseit PF, Gonzalez-Zulueta M, ve diğ. (1994). Two molecular pathways to transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer Res.* 54:784-788.
- Stein JP, Ginsberg DA, Grossfeldt GD (1996). The effect of p21 expression on tumor progression in p53 altered bladder cancer. *J urol.* 155:628.
- Storey A, Thomas M, Kalita A, Harwood C, Gardiol D, Mantovani F, Breuer J, Leigh IM, Matlashewski G, Banks L (1998). Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature.* 393(6682):229-34.
- Suzuki K, Matsui H, Ohtake N ve diğ. (2003). A p53 Codon 72 Polymorphism Associated with Prostate Cancer Development and Progression in Japanese. *J Biomed Science.* 10:430-435.
- Tachezy R, Mikyskova I, Salakova M, Van Rast M (1999). Correlation between human papillomavirus-associated cervical cancer and p53 codon 72 arginine/ proline polymorphism. *Hum Genet.* 105:564-566.
- Theodorescu D, Cornil I, Sheehan C, Man MS, Kerbel RS (1991). Ha-ras induction of the invasive phenotype results in up-regulation of epidermal growth factor receptors and altered responsiveness to epidermal growth factor in human papillary transitional cell carcinoma cells. *Cancer Res.* 51:4486–4491.
- Thomas M, Kalita A, Labrecque S, Pim D, Banks L, Matlashewski G (1999). Two polymorphic variants of wild-type p53 differ biochemically and biologically. *Molecular and Cellular Biology.* P. 1092–1100.
- Tomlinson C, Baldo O, Harnden P, Knowles MA (2007). FGFR3 protein expression and its relationship to mutation status and prognostic variables in bladder cancer. *Journal of Pathology J Pathol.* 213: 91–98.

- Tsuji M, Kojima K, Murakami Y (1997). Prog-nostic value of KI-67 antigen and p53 protein in urinary bladder cancer: Immunohistochemical analysis of radical cystectomy specimens. *Br J Uro.* 79: 367.
- Tsuruta H, Kishimoto H, Sasaki T, Horie Y, Natsui M, Shibata Y, Hamada K (2006). Hyperplasia and Carcinomas in Pten-Deficient Mice and Reduced PTEN Protein in Human Bladder Cancer Patients. *Cancer Res.* 66:8389.
- Varley JM, Evans DGR, Birch JM (1997). Li-Fraumeni syndrome-a molecular and clinical review, *Brit J Cancer.* 76(1):1-14.
- Varna M, Bousquet G, Plassa LF, Bartheau P, Janin A (2011). TP53 Status and Response to Treatment in Breast Cancers. *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* 2011:284584.
- Wang Y, Chen C, Chen S ve diğ. (1999). p53 Codon 72 Polymorphism in Taiwanese Lung Cancer Patients: Association with Lung Cancer Susceptibility and Prognosis. *Clin Cancer Res.* 5: 129-134.
- Wang M, Chu H, Yan F, Qin C, Li P, Yuan L, Yin C, Xu J, Zhang Z (2011). Chromosome 4p16.3 variant modify bladder cancer risk in a Chinese population. *Carcinogenesis.* 32(6): 872–875.
- Whibley C, Pharoah P, Hollstein M (2009). p53 polymorphisms: cancer implications. *Nature Review, Cancer.* 9: 95-107.
- Wu X, Amos CI, Zhu Y, Zhao H, Grossman BH, Shay JW (2003). Telomere dysfunction: a potential cancer predisposition factor. *J Natl Cancer Inst.* 95: 1211.
- Yamaguchi Y, Watanabe H, Yirdiran S, ve diğ. (1999). Detection of mutations of p53 tumor suppressor gene in pancreatic juice and its application to diagnosis of patients with pancreatic cancer: comparison with K-ras mutation. *Clin Cancer Res.* 5: 1147-53.
- Zeegers M, Kellen E, Buntinx F, Brandt P (2004). The association between smoking, beverage consumption, diet and bladder cancer, a systematic literature review. *World J Urol.* 21: 392–401.

Zeegers M, Volovics A, Dorant E, Goldbohm A, Brandt P (2001). Alcohol Consumption and Bladder Cancer Risk: Results from the Netherlands Cohort Study. *American Journal of Epidemiology*. 153(1):38-41.

WEB KAYNAKLARI

American Urological Association Education and Research, Inc. (2007). Erişim Tarihi: 19 Mayıs 2011, The Management of Bladder Cancer: Diagnosis and Treatment Recommendations <http://www.auanet.org/content/guidelines-and-quality-care/clinical-guidelines/main-reports/bladcan07/chapter1.pdf>.

American Cancer Society. (2010). Erişim Tarihi: 10 Mart 2010, *Cancer Facts and Figures*. Atlanta.

<http://www.cancer.org/acs/groups/content/@nho/documents/document/acspc-024113.pdf>

Erişim Tarihi: 10 Nisan 2012, <http://www.auanet.org/content/guidelines-and-quality-care/clinical-guidelines/main-reports/bladcan07/chapter1.pdf> 10.04.12

IARC. (2011). Erişim Tarihi: 25 Eylül 2011, : <http://www-p53.iarc.fr/> 25.09.11

National Institutes of Health, Smoking and Bladder Cancer. (2011). Erişim Tarihi: 13 Ocak 2011, <http://www.nih.gov/researchmatters/august2011/08292011cancer.htm>

National Comprehensive Cancer Network (NCCN) (2011). NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. Erişim Tarihi: 14 Haziran 2011 http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp

P53 Knowledge Base. (2011). Erişim Tarihi: 30 Kasım 2011, [http://p53.bii.a-](http://p53.bii.a-star.edu.sg/aboutp53/snps/snpdetail.php?geneid=X54156&snppos=14168)

[star.edu.sg/aboutp53/snps/snpdetail.php?geneid=X54156&snppos=14168](http://p53.bii.a-star.edu.sg/aboutp53/snps/snpdetail.php?geneid=X54156&snppos=14168) 30.11.2011

P53 Knowledge Base. (2011). Erişim Tarihi: 23 Eylül 2011, <http://p53.bii.a-star.edu.sg/aboutp53/snps/snpdetail.php?geneid=X54156&snppos=12139>

WebMD. (2012). Erişim Tarihi: 15 Temmuz 2012, <http://www.webmd.com/cancer/bladder-cancer/bladder-cancer-symptoms>

<http://www.cancer.org/Cancer/BladderCancer/DetailedGuide/bladder-cancer-key-statistics>

p53.free. (2010). Erişim Tarihi: 10 Ekim 2010,
http://p53.free.fr/p53_info/p53_disco.html

Cancer Research UK. (2011). Erişim Tarihi: 25 Kasım 2011,
<http://www.cancerresearchuk.org/cancer-nfo/cancerstats/types/bladder/riskfactors/bladder-cancer-risk-factors>

8. ÖZGEÇMİŞ

Hatay'da 1988 yılında doğan Sevilay Şahoğlu ilk öğretim ve lise eğitimini Samandağ' da tamamladı. 2006 yılında Haliç Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde başladığı yüksek öğrenimini 2010 yılında tamamladı. Yüksek lisans eğitimine Haliç Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde devam etti.