

**AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

MESANE KANSERİ TANILI OLGULARDA

p53 GENİ MUTASYON ANALİZİ

Bio. Asuman ÖZGÖZ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Danışman
Prof. Dr. Mustafa SOLAK**

2005-015

HAZİRAN 2005

AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MESANE KANSERİ TANILI OLGULARDA p53 GENİ
MUTASYON ANALİZİ**

Bio. Asuman ÖZGÖZ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Mustafa SOLAK

Tez No: 2005-015

2005 - AFYONKARAHİSAR

KABUL VE ONAY

Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Çerçevesinde yürütülmüş bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından

Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunması Tarihi: 20/06/2005



İmza

Prof. Dr. Mustafa SOLAK

ÜYE



İmza

Yrd. Doç. Dr. Hale ŞAMLI

ÜYE



İmza

Yrd. Doç. Dr. Erdinç YÜKSEL

ÜYE

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Asuman ÖZGÖZ'ün "Mesane Kanseri Tanılı Olgularda p53 Geni Mutasyon Analizi" başlıklı tezi 21/06/2005 günü saat 13.00'de Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Yüksel ARIKAN

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Yüksek lisansım boyunca paylaştığı değerli bilgilerinden, tezimin gerçekleşmesinde verdiği destek ve sağladığı olanaklardan dolayı değerli hocam ve danışmanım Sayın Prof. Dr. Mustafa SOLAK'a, tezimin deney aşamalarında çok yardımını gördüğüm, yüksek lisansım boyunca kendimi geliştirmemde sağladığı yardım ve desteklerinden dolayı değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Hale ŞAMLİ'ya, yüksek lisansım boyunca her zaman desteklerini hissettiğim değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Erdinç YÜKSEL ve Sayın Uzm. Tevhide Fıstık'a teşekkürü bir borç bilirim.

Tezim için kullandığım mesane tümör dokusu örneklerini sağlama konusundaki yardımları için Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji ve Patoloji AD. öğretim üyelerine ve Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji AD. öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Kutsal YÖRÜKOĞLU'na teşekkür ederim.

Her zaman sıkıntımı paylaşan, desteğini hissettiren canım arkadaşım Mihrican AYDIN ÖZGÜR'e ve sabırla, sevgi, şefkat ve desteklerini hayatımın her anında esirgemeyen canım anne ve babama çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
KISALTMALAR DİZİNİ.....	VI
TABLO ve GRAFİK DİZİNİ.....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VIII
ÖZET.....	1
SUMMARY.....	2
1.GİRİŞ.....	3
1.1.Mesane Kanseri.....	4
1.2. Epidemiyoloji ve Etiyoloji.....	5
1.3. Mesane Kanserinde Gözlenen Sitogenetik Değişimler	6
1.4. Mesane Kanserinde Gözlenen Moleküler Genetik Değişimler.....	6
1.4.1. Onkogenler.....	6
1.4.2. Tümör Supresör Genler.....	6
1.4.3. Büyüme Faktörleri.....	7
1.5. Mesane Kanserinde Patoloji.....	7
1.5.1. Derecelendirme (Grading).....	8
1.5.2. Evrelendirme (Staging) Sistemi.....	8
1.6. p53 Geni.....	9
1.6.1. p53 Hakkında İyi Bilinen Virolojik Yaklaşım.....	9
1.6.2. p53 Hakkında Çok İyi Bilinmeyen Serolojik Yaklaşım.....	10
1.6.3. p53'ün Bir Onkogen Olduğunu Düşündüren Bulgular.....	10
1.6.4. Bir Tümör Supresör Olarak p53	11
1.6.5. Li-fraumeni Hastalarında p53 Geninin Germline Mutasyonlarının Bulunması	12
1.6.6. Bir Tümör Supresör Gen Olarak Yabanıl p53 ve Bir Dominant Onkogen Olarak Mutant p53.....	13
1.6.7. p53 Geni ve Proteininin Yapı ve Özellikleri.....	13
1.6.8. p53'ünAktivasyonu.....	16
1.6.9. p53 Proteininin Fonksiyonları.....	17

1.6.10. p53 İnteraksiyonları.....	20
1.6.11. p53 Mutasyonları.....	20
1.6.12. Mesane Kanserlerinde Görülen p53 Mutasyonları.....	21
2. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	24
2.1. GEREÇLER.....	24
2.1.1. Parafine Gömülü Doku Örneklerinin Elde Edilmesi.....	24
2.1.2. Kullanılan Kimyasallar.....	24
2.1.3. Kullanılan Cihazlar.....	25
2.2. YÖNTEMLER.....	26
2.2.1. DNA İzolasyonu.....	26
2.2.2. PCR.....	28
2.2.3. Enzim Kesimi.....	31
3. BULGULAR.....	33
3.1. Doku Örneklerinin Toplanması.....	33
3.2. DNA İzolasyonu.....	34
3.3. PCR Sonuçları.....	34
3.4. Enzim Kesimi.....	35
4. TARTIŞMA.....	42
5. SONUÇ.....	46
KAYNAKLAR.....	47

KISALTMALAR DİZİNİ

- APS** : Amonyum persulfat
CIS : Karsinoma in situ
DNA : Deoksiribonükleik asit
EDTA : Etilendiamintetraasetik asit
EtBr : Etidyum bromür
LOH : Heterozigosite kaybı (Loss of Heterozygosity)
PCNA : Prolifere olan hücre nükleer antijeni (Proliferating Cell Nuclear Antigen)
PCR : Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
TBE : Tris buffer EDTA
TCC : Transisyonel hücre karsinomu
TE : Tris EDTA
TEMED: Tetrametil etilendiamin
TET : Tris EDTA tween 20
TSG : Tümör supresör gen

TABLO VE GRAFİK DİZİNİ

Tablo 1.1. Evrelendirme sistemi

Tablo 2.1. 5 ve 6. eksonlar için kullanılan PCR miksi

Tablo 2.2. 5 ve 6. eksonlar için uygulanan PCR koşulları

Tablo 2.3. 7. ekson için kullanılan PCR miksi

Tablo 2.4. 7. ekson için uygulanan PCR koşulları

Tablo 3.1. Olgulara ait laboratuvar çalışma numaraları, olgu yaşı, cinsiyeti, tanısı, tümör evresi ve grade bilgileri

Tablo 3.2. Olgulara ait DNA izolasyon, PCR ve enzim kesim sonuçları

Grafik 1.1. Mesane kanserinde p53 genindeki kodonların mutasyon frekansı

Grafik 1.2. Mesane kanserinde görülen p53 geni mutasyonlarının, mutasyon türüne göre frekansı

Grafik 3.1. Yaş aralıklarına göre mutasyonlu olgu sayısı

Grafik 3.2. Cinsiyete göre mutasyonlu olgu sayısı

Grafik 3.3. Evreye göre mutasyonlu olgu sayısı

Grafik 3.4. Grade değerlerine göre mutasyonlu olgu sayısı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Mesanenin tabakaları ve tümör evreleri

Şekil 1.2. p53 geninin kromozomal lokalizasyonu

Şekil 1.3. p53 geninin yapısı

Şekil 1.4. p53 proteinin yapısı

Şekil 1.5. p53 proteininin fonksiyonları

Şekil 3.1. Agaroz jel 5. ve 6. ekson PCR görüntüleri

Şekil 3.2. Agaroz jel 7. ekson PCR görüntüleri

Şekil 3.3. Agaroz jel 5. ekson enzim kesim görüntüleri

Şekil 3.4. Poliakrilamid jel 7. ekson enzim kesim görüntüleri

ÖZET

Mesane Kanseri Tanılı Olgularda p53 Geni Mutasyon Analizi

p53 geni insan malignansilerinin yaklaşık %50'sinde mutasyona uğrayan bir tümör supresör gendir. Tümör supresyon etkisini, pek çok geni regüle ederek, bu genlerin cevaben hücre siklusu regülasyonu, DNA tamiri ve apoptoza gitmelerini sağlayan bir çok yolla gerçekleştirmektedir. p53, mesane kanserinde en fazla mutasyona uğrayan tümör supresör gen olma özelliğini taşımaktadır. Bu yüzden mesane kanserinin prognozunda önemli bir biomarker olabilir. Bu araştırmada, ürotelyal karsinom teşhisi konmuş 22 olguya ait mesane tümör doku örneklerinden DNA izole edilip, PCR metoduyla 5., 6., ve 7. ekson bölgeleri amplifiye edildikten sonra, enzim kesimi yapılarak 5. ve 7. eksonlarda p53 geni mutasyon analizi gerçekleştirilmiştir. Mutasyon analizi gerçekleştirilen olguların % 45'inde p53 geni mutasyonu saptanmış olup, saptanan mutasyonların %60'ının 5. eksonda bulunan 175. kodon, %40'ının ise 7. eksonda bulunan 249. kodonda olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Sözcükler: p53 geni, mesane kanseri, PCR, enzim kesimi

SUMMARY

p53 Gene Mutation Analysis in Cases with Bladder Cancer

P53 gene is a tumor suppressor gene mutated in approximately 50% of human malignancies. It performs its tumor suppression effect by regulating many genes and canalizing them for cell cycle regulation, DNA repair and apoptosis by many pathways. p53 has the property of being the most mutated tumor suppressor gene in bladder cancer. Due to this, it may be an important biomarker in bladder cancer prognosis. In this study, DNA was isolated from bladder tumor tissue samples of 22 cases diagnosed to be urothelial carcinoma. After then, 5th, 6th and 7th exons of p53 were amplified by PCR method and p53 mutation analysis was performed by enzyme restriction in 5th and 7th exons. In 45% of cases performed mutation analysis, p53 gene mutation was detected. 60% of mutations were in 5th exon, codon 175 and 40% of mutations were in 7th exon, codon 249.

Keywords: p53 gene, bladder cancer, PCR, enzyme restriction

1.GİRİŞ

İnsanlarda oluşan kanserlerde p53 ün rolü göz ardı edilemez. Bütün insan malignansilerinin yaklaşık yarısı p53 geninde mutasyonlara sahiptir (1). En fazla p53 değişim frekansını kolon kanserleri göstermekle birlikte, kanser tiplerinin çoğu p53 mutasyonu gösterir (2). p53 mutasyonları birçok tümör tipinde önemli klinopatolojik korelasyonlar göstermiştir. Genitoüriner kanserler (testis kanseri, pheochromocytoma (böbreküstü bezinin medulla kısmındaki kromafin hücrelerden ileri gelen tümör), Wilms tümör (konjenital ve son derece kötü huylu bir böbrek tümörü) çoğunlukla p53 mutasyonları göstermemesine karşın, mesane ve prostat kanserlerinde p53 mutasyonlarına rastlamak mümkündür. p53 mutasyonlarının mesane kanserinin patogeneğinde erken, diğer kanser tiplerinde geç olduğu görülmüştür (2, 3).

Mesane transizyonel hücre karsinomu (TCC) prostat kanserinden sonra genitoüriner sistemin ikinci en yaygın malignansidir ve her yıl sadece Amerika Birleşik Devletlerinde bile 54.000 civarında yeni tanı ve 12.000' den fazla ölümden sorumludur. Mesane kanserinde gözlenen süperfisyal tümörlerin nüks etmesi yaygındır, ve bu tümörlerin %15' inden fazlası kas invazyonuna gitmektedir. Kas invazyonuna sahip olgularda, sistektomiden sonra hastalıktan iz kalmadığı söylene de bu olgular nüks etme, ilerleme ve metastaz için yüksek risk altındadırlar. İlerlemiş düzeydeki hastalığın tedavisinde kemoterapi ve radyasyon, hayal kırıklığına uğratmaktadır. Hastalığın tedavisini optimize etmek ve yaşama süresini artırmak için, nüks etme, devam etme ve metastaz riski taşıyan hastalar için, hastalığın tanımlanmasının gelişimine belirgin ihtiyaç vardır. Hep aynı şekilde olmamasına rağmen, mesane kanserinde p53'ün potansiyel bir biomarker olduğu konusundaki yoğun çalışmalar, hastalığın devam etmesi ve ölüm oranı p53 mutasyonlarıyla korelasyon göstermiştir (4-6).

Çalışmamızda mesane kanseri tanısı alan olgularda p53 mutasyon analizi gerçekleştirmek üzere, bu olgulara ait parafine gömülü tümör doku

örnekleri kullanıldı. Bu örneklerden DNA izolasyonu gerçekleştirilip izole edilen DNA'dan, PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) metodu kullanılarak hedef eksonlar amplifiye edildikten sonra elde edilen PCR ürünlerine enzim kesimi yapılması yoluyla mutasyon analizi gerçekleştirildi. p53 geninin 5. ve 7. eksonlarında bulunan ve en çok mutasyona uğrayan "hot spot" kodonlardan olan 175. ve 249. kodonlara yönelik mutasyonları saptamak üzere enzim kesimi yapıldı.

p53 mutasyonlarının diğer kanser tiplerinin patogenezinde geç oluşmasına rağmen, mesane kanseri patogenezinde erken oluşması ve yapılan bazı çalışmaların mesane kanseri prognozunu hastalığın ilerlemesi ve ölüm oranının artması ile korelasyonu üzerine yoğunlaşması, p53 mutasyon analizinin kliniğe faydalı olabileceğini düşündürmüştür.

Bu, araştırmada Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı'nda ürotelyal karsinom tanısı alan mesane kanserli olgularda p53 geni 5. ve 7. ekson mutasyonlarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

1.1. Mesane Kanseri

Mesane kanseri, 2000 yılında dünya çapında tahminen 13.432 ölümden sorumlu olmuştur (7). Mesane tümörleri, erkeklerde akciğer, prostat ve kolorektal tümörlerinden sonra 4. sıklıkla görülürken, kadınlarda tümör tipleri arasında 8. sıklıkla görülendir; erkeklerde bütün tümörlerin %7'sini oluştururken, kadınlarda %3'ünü oluştururlar. Ortalama görülme yaşı 65 olan üroepitelyal tümörlerin 60 yaşından sonra insidansı giderek artar, 40 yaşından önce görülme oranı %1'den azdır. Endüstri ülkelerinde daha sık görülen mesane tümörleri, erkeklerde kadınlara oranla 2-3 misli daha fazladır (8).

Bir tümör tek başına kanser değildir; "kansere" olarak nitelendirilebilmesi için, invazyon için potansiyelinin olması gereklidir. Anormal replikasyona uğrayıp tümör oluşturan hücreler, farklı bir tabakaya girip yayılırsa invazyon oluşmuş demektir. Buna ek olarak, bu hücreler kan damarlarına girebilir, yeni tümörler geliştirip, metastaz yapabilecekleri uzak organlara taşınabilirler.

Vücuttaki organlar arasında fiziksel bir sınır olduğu gibi, organın kendisinde de sınırlar vardır. Bununla paralel olarak mesane duvarının birçok doku tabakası vardır (9). Mesane kanserini anlamak için öncelikle mesanenin nasıl bir organ olduğunu bilmek gerekir. Mesane, idrar rezervuarı olarak görev yapan içi boş, muskuler bir organdır. Mesane duvarının iç yüzünde transizyonel epitelden ibaret mukoza bulunur. Mukozanın üzerinde konnektif ve elastik doku içeren submukoza (lamina propria) ve bunun dışında detrusor kas tabakası bulunur. Mesane kubbesi ve posterior yüzü peritonla örtülüdür (10).

1.2. Epidemiyoloji ve Etiyoloji

Mesane kanserinin insidansı Amerikalı beyazlarda, Amerikalı zencilerden; batıdaki endüstrileşmiş ülkelerde Afrikalı ve Asyalı milletlerden ve kentsel alanlarda, kırsal alanlardan daha yüksektir. Bu yönelimler, mesane kanserinin gelişiminde endüstriyel maddelerin rol oynadığını akla getirmektedir (11). 2-naftilamin, benzidine ve 4-aminobiphenil gibi kimyasal karsinojenler mesane kanseriyle ilişkilendirilmiş olup, bu karsinojenler, lastik ve tekstil işinde, boyacılıkta, deri işlemeciliğinde ve kuaförlük gibi birçok meslekte kullanılmaktadır (11, 12).

Sigara içiciliği mesane kanseri için tek başına risk faktörüdür. Erkeklerdeki olguların en az %50'sinden sorumludur. Sigara içmeyenlerle kıyaslandığında, sigara içenlerde hastalık geliştirme riski 2 kat fazladır. Dahası risk doza da bağlıdır; sigarayı bırakanların riski, sigara içen ve içmeyenlerin ortasındadır (11, 13, 14). Phenacetin içeren analjeziklerin, üretelyal neoplazmaların patogeneziyle ilişkili olduğu gösterilmiştir (15, 16). Bilharziasis, mesane taşları ve kronik kateterizasyon gerektiren şartlar gibi kronik mesane enfeksiyonları ve irritasyonları skuamöz hücreli mesane kanserinin gelişmesine neden olurlar (11, 17, 18). Kahve ve suni tatlandırıcılar gibi diyet faktörlerinin karsinojen olduğunu akla getiren bulgular değişkendir (19, 20).

Ailesel mesane kanseri, mesane kanserli hastaların çok küçük bir kısmından sorumludur. Büyük olgu-kontrollü bir çalışma, bu ailelerde mesane

kanserini çevresel ve genetik faktörlerin bir kombinasyonunun oluşturduğunu akla getirmektedir (21).

1.3. Mesane Kanserinde Gözlenen Sitogenetik Değişimler

Mesane kanserinin kromozomal çalışmaları, çoğu solid tümörde olduğu gibi oldukça komplikedir ve sonuçlar değişkendir. Moleküler biyolojik yöntemler kullanarak, araştırmacılar yapısal ve sayısal kromozomal değişiklikleri ve allelik delesyonları saptayabilmişlerdir. Mesane kanserinin bütün evrelerinde 9. kromozomun bir kısmının veya tamamının delesyona uğraması, bu değişimlerin erken mesane karsinogenezinden sorumlu olabileceğini akla getirmiştir (22, 23). 7. kromozomun sayısal artışı, tümör derecesinin artışı ve proliferasyonla korelasyon göstermiştir (24). İleri evre tümörlerde, hakim olarak 3p, 11p ve 17p delesyonları oluşurken, bu bölgelerdeki genlerin kaybı tümör ilerleyişine neden olmuş olabilir (25). Bununla birlikte, genetik çalışmalardaki ilerlemelere rağmen, mesane kanserinde etkilenen genlerin çoğu ve biyolojik fonksiyonları hala bilinmemektedir.

1.4. Mesane Kanserinde Gözlenen Moleküler Genetik Değişimler

1.4.1. Onkogenler

Mesane kanserinde onkogenlerin rolü, diğer katı tümörlerde olduğu kadar anlamlı değildir. %9-34 arası değişen oranlarda, bütün insan malignansileri içinde HER-2/neu onkogeninin mesane kanserinde overekspresyon insidansı en yüksektir (26, 27). Yüksek derece ve ileri evre tümörlerde daha sık bulunmuştur. Mesane tümörlerinin yaklaşık %7-20'sinin *ras* mutasyonuna sahip olduğu bilinmektedir (28, 29).

1.4.2. Tümör Supresör Genler

Mesane kanserinde en sık değişen ve muhtemelen hastalığın ilerlemesinde de en önemli olan tümör supresör gen (TSG) p53'tür. DNA sekanslama veya p53 proteininin ekspresyonuyla belirlenen mesane tümörü

p53 mutasyon insidansı, %50-60 olarak belirlenmiştir (30, 31). Dahası, p53 mutasyonunun varlığı, yüksek düzey ve invazif tümörlerle korelasyon göstermiştir (31, 32). Esrig ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, her düzeyde mesane kanseri gösteren 243 sistektomi örneğinden %42'sinin p53 protein overekspresyonuna sahip olduğu ve bu overekspresyonun bu popülasyonda kayda değer bir hastalık tekrarlama ve ölüm riskini bağımsız olarak önceden tahminine olanak verdiği gösterilmiştir (32).

p53 mutasyonunun varlığının, biyolojik olarak agresif davranış gösteren mesane karsinoma in situ'ya (Carcinoma in situ) (CIS) neden olması muhtemeldir. Aksine, düşük derece (grade), düşük evre (stage)'li papiller mesane kanserinde, p53 mutasyon insidansı çok düşüktür. Bu sebeple, p53 mutasyonunun varlığına bağlı olarak, süperfisyal mesane kanserinde tümör gelişiminde iki yol olduğu hipotezi ileri sürülmüştür (33).

Cairns ve arkadaşları transisyonel hücre karsinomu olan 94 hastadan 28'inde retinoblastoma (Rb) geninin allelik kaybını yüksek derece ve ileri evre tümörlerde daha sık olarak gözlemişlerdir (34).

1.4.3. Büyüme Faktörleri

Bilim adamları bazı büyüme faktörlerinin mesane tümörü olan hastaların idrarlarında veya tümörlerin içinde daha yüksek konsantrasyonda olduğunu fark etmişlerdir. Bu faktörlere örnekler; epidermal büyüme faktörü (epidermal growth factor = EGF), fibroblast büyüme faktörü (fibroblast growth factor = FGF) ve transforme edici büyüme faktörüdür (transforming growth factor = TGF) (35).

1.5. Mesane Kanserinde Patoloji

Mesane kanseri tipleri, karsinoma in situ (CIS), invazif transisyonel hücre karsinomu (TCC), metastatik transisyonel hücre karsinomu (TCC), transisyonel olmayan hücre karsinomları (adenokarsinoma, skuamoz hücreli karsinom, undiferansiyel karsinoma, miks karsinoma) olarak sınıflandırılabilir (36).

1.5.1. Derecelendirme (Grading)

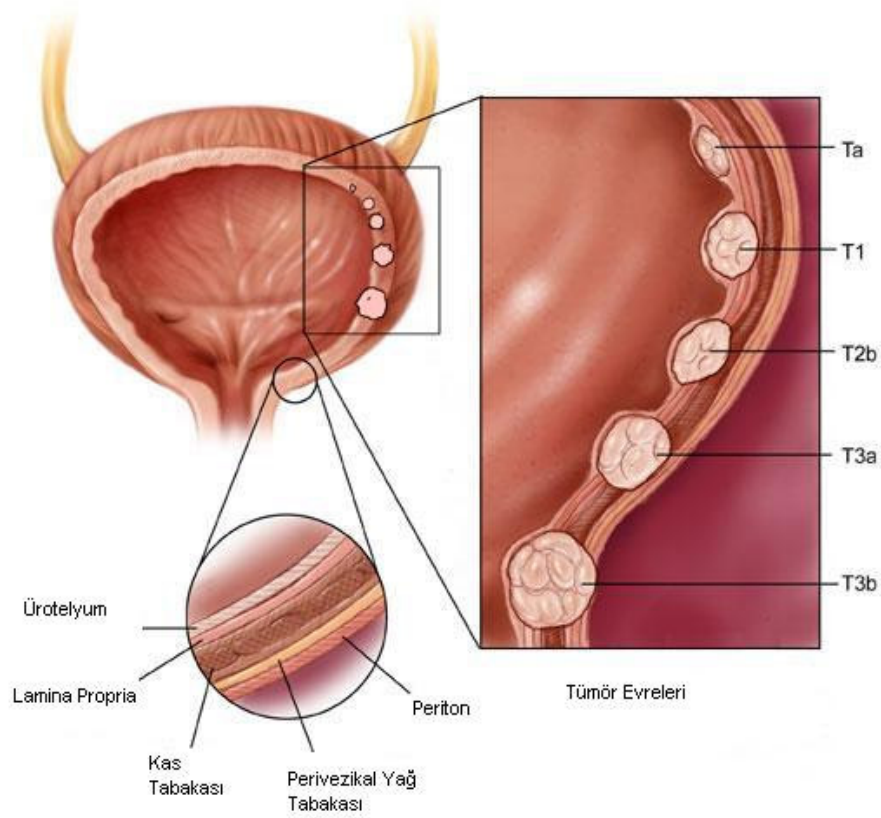
Derecelendirme, hücresel atipi, nükleer anomaliler ve mitoz sayısına dayandırılmıştır. Mesane tümörleri Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organisation = WHO) kriterlerine göre üç kategoriye sınıflandırılmıştır; derece 1, 2 ve 3 (37).

1.5.2. Evrelendirme (Staging) Sistemi

Mesane kanseri için Jewett-Marshall evrelendirme sistemi ve Tümör-Nod-Metastaz (Tumor-Node-Metastasis) (TNM) sistemi olmak üzere iki evrelendirme sistemi mevcuttur. Genellikle, TNM sistemi evrensel olarak kabul görmüş ve tercih edilmiştir (38).

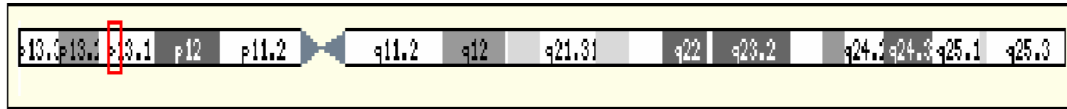
Tablo 1.1. Evrelendirme sistemi (39).

Mesane Tümörlerinin Evrelendirmesi (TNM)	
pTX	Primer tümör değerlendirilmedi
pT 0	Primer tümör
pTa	Papiller non invaziv karsinom
pTis	Karsinoma in situ
pT1	Epitel altı bağ dokuda tümör var (Muscularis mukozaya göre pT1a, b, c)
pT2	Kas invazyonu var
pT2a	Süperfisyal kas invazyonu
pT2b	Derin kas invazyonu
pT3	Perivezikal yağ doku tutulumu
pT3a	Mikroskobik
pT3b	Makroskobik (ekstra vezikal kitle)
pT4	Prostat, vajen, uterus, pelvik ve abdominal duvar invazyonu
pT4a	Prostat, vajen, uterus invazyonu
pT4b	Pelvik ve abdominal duvar invazyonu
pNX-0-1-2-3	Bölgesel lenf nodu metastazları
pMX-0-1	Uzak metastaz



Şekil 1.1. Mesanenin tabakaları ve tümör evreleri (40).

1.6. p53 Geni



Şekil 1.2. p53 geninin kromozomal lokalizasyonu (41).

p53 proteininin 1979'da keşfedilmesi, virolojik yaklaşım ve serolojik yaklaşım olmak üzere iki tip çalışmanın neticeye ulaşmasıyla olmuştur (42).

1.6.1. p53 Hakkında İyi Bilinen Virolojik Yaklaşım

SV-40 transforme hücrelerinin çalışmaları, büyük T antijeniyle birlikte, 55 kDa'luk bir proteinin de çökeldiğini göstermiştir (43-47). Bu asosiyasyonun, bu iki protein arasındaki bir in vivo ilişki sonucu olduğu

gösterilmiştir (45). Daha sonra, bu proteinin hücrel genom tarafından kodlanmış olabileceği düşünülmüştür. Linzer ve Levine fare (mürin) transforme SV40 hücrelerinin büyük bölümünde ve enfekte olmayan embriyonik karsinom hücrelerinde 54 kDa proteinin overekspresyona uğradığını göstermişler ve SV40 enfeksiyonunun veya fare hücreleri transformasyonunun, selüler bir 54 kDa proteinin stabilitesini ve sentezini uyardığı sonucuna varmışlardır (46).

1.6.2. p53 Hakkında Çok İyi Bilinmeyen Serolojik Yaklaşım

1979' da Deleo ve arkadaşları, farelerin Meth A gibi bazı methylcholanthrene'le indüklenmiş tümör hücre hatlarına humoral cevaplarının, p53 tarafından yönetildiğini göstermişlerdir (48). Daha sonra, birçok tümör tipine eğilimli olan hayvanların p53'e spesifik immun cevap oluşturdukları bulunmuştur (44). Crawford ve arkadaşları ilk kez 1982' de meme kanserli hastaların serumlarının %9'unda insan p53 proteinine karşı antikolar tanımlamışlardır (49). Anlamlı bir klinik korelasyon bildirilmemiştir. Caron de Fromentel ve arkadaşları daha sonra bu tip antikoların çeşitli kanser tipleri olan çocukların serumlarında mevcut olduğunu bulmuşlardır (50).

1.6.3. p53'ün Bir Onkogen Olduğunu Düşündüren Bulgular

p53 için yapılan ilk çalışmalar, hücre proliferasyonunu teşvikle ilişkili olabileceğini akla getirmiştir. Reich ve Levine tarafından yapılan deneylerde, farelere ait hücrelerin gelişimi, serumdan yoksun bırakmak suretiyle durdurulduğunda, çok düşük p53 mRNA ve protein seviyeleri ortaya koydukları görülmüştür. Hücre, serum sitümlasyonu ile gelişmeye indüklendiğinde ise, p53 mRNA ve p53 protein sentez oranı oldukça yükselmiş, DNA replikasyonunun başlamasından hemen önce, G₁/S sınırına yakın ise pik yapmıştır (51). Dinlenme halindeki normal T lenfositleri ve normal diploid fibroblastlarla yapılan benzer deneylerde ise p53 ekspresyonunun daima hücre gelişiminin indüksiyonuyla birbirine bağlı olduğu gösterilmiştir (52, 53). Bu gözlem, p53 proteininin diğer

karakteristiklerine (kısa yarı ömür, nükleer lokalizasyon) eklenmiştir, bu da p53'ün hücre proliferasyonunda pozitif rol oynayabileceğini akla getirmiştir. Bu fikir, Mercer ve arkadaşlarının çalışmasıyla kuvvetlenmiştir (53).

p53 antikorunun, dinlenme halindeki Swiss 3T3 fare hücresi nükleusuna mikroenjeksiyonu, hücrelerin serumla stimülasyonundan sonra S fazına girmesini engellemiştir. Bu inhibisyonun sadece mikroenjeksiyon, stimülasyon zamanında yapıldığında etkili olması, p53'ün G_0 / G_1 transisyonu için kritik olduğunu akla getirmiştir (53, 54). Daha sonra benzer sonuçlar mutant p53'ü ekspresse eden methylcholanthrene'le transforme olmuş fare hücreleri kullanıldığında da elde edilmiştir (55, 56). Bütün bu gözlemler, yabancıl p53'ün hücre proliferasyonunda pozitif bir regülatör olduğunu düşündürmüştür.

1984' te iki araştırma grubu mürin p53'lerinin, aktif c-Ha-ras onkogenini kodlayan plazmidlerle transfeksiyonunun, REF hücrelerini, myc veya E1A onkogenlerindeki gibi etkilediğini bildirmişlerdir (57-59). Bu gözlemler p53'ün "nükleer dominant onkogen" olarak sınıflandırılmasına sebep olmuştur. Üçüncü bir grup araştırmacı mürin p53'lerinin normal rat kondrositlerini ölümsüzleştirip ras transformasyonuna duyarlı hale gelmelerine yol açtığını göstermiştir (58, 60).

1.6.4. Bir Tümör Supresör Olarak p53

Friend virüsü tarafından indüklenen tümörlerde, tümör hücrelerinde bulunan p53 sıklıkla yeniden düzenlenmiş, bu da ekspresyonun engellenmesine veya truncated (eksik-budanmış) veya mutant proteinin kodlanmasına yol açmıştır (61). Çalışılan bütün durumlarda, kromozomun kaybıyla ikinci allel kaybolmuş veya delesyonla etkisiz hale gelmiştir. Bu tümör modelinde, p53 geninin fonksiyonel inaktivasyonu, in vivo'da friend lösemisinin gelişimi boyunca, eritroid hücrelerin seçici bir gelişme avantajı kazandığı görülmektedir.

F9 hücrelerinden izole edilen mürin p53 cDNA klonlardan birinin aktif Ha-ras geniyle işbirliği yapması, p53 cDNA klonlarının davranış olarak birbirinden farklılık gösterdiği konusunda diğer bir ipucu olmuştur (62).

Mevcut bütün p53 cDNA klonlarının incelenmesi, daha önce polimorfizmden kaynaklandığı tahmin edilen birçok kodon değişimlerini göstermiştir. Bununla birlikte, bu p53 sekans farklılıklarının, farklı türlerde karşılaştırılmasıyla, bazılarının yüksek düzeyde korunmuş bölgelerde olmasının polimorfizme bağlı olmayan bir özellik olduğu ortaya konulmuştur (63, 64).

Bu sekanslar tekrar dikkatle araştırıldığında F9 cDNA klonunun yabancı olduğu, fakat transfeksiyon deneylerinde kullanılanların, transforme edici özelliklerini aktive eden nokta mutasyonları içerdikleri gösterilmiştir. Daha sonra yapılan deney setlerinde, yabancı p53 kodlayan bir plazmidin, p53 ve aktif Ha-ras geni içeren plazmidin transformasyon potansiyelini azalttığı gösterilmiştir (65, 66). Bununla birlikte yabancı p53'ün E1A veya myc ve aktif Ha-ras geni karışımının yaptığı transformasyonu baskıladığı gösterilmiştir. Bu transformasyon deneyleri, yabancı p53'ün in vitro'da hücre transformasyon supresörü olduğunu göstermiştir.

Farklı insan kanserlerinde veya hücre hatlarında p53 ekspresyonu, birçok araştırmacı tarafından uzun süre çalışılmıştır. Bu ekspresyon sıklıkla yüksek düzeyde bulunmuş fakat bu fenomen için kesin bir açıklama yapılamamıştır, çünkü osteosarkomlardan başka bir yeniden düzenlenme, Southern blot yöntemiyle saptanamamıştır. Kolorektal kanser olgularının genetik incelemelerinde, p53 genini taşıyan 17. kromozomun kısa kolunda heterozigosite kaybı yüksek oranda gözlenmiştir (67).

1.6.5. Li-Fraumeni Hastalarında p53 Geninin Germline Mutasyonlarının Bulunması.

Mutant p53 geni taşıyan transgenik farelerde, sarkomlar başta olmak üzere, pek çok kanser tipinin geliştiği görülmüştür (68). Bu gözlem birçok araştırmacıyı, Li-Fraumeni sendromlu hastaları çalışmaya yönlendirmiştir. Bu sendrom, osteosarkomlar, meme kanseri, yumuşak doku sarkomları ve lösemiler de olmak üzere geniş bir kanser spektrumunun, çok erken yaşta, ailesel bir ilişki göstermesiyle karakterizedir. İstatistiksel analizler, bu bireylerin %50'sinin, 30 yaşlarından önce tümör geliştireceklerini, %90'ının da 70 yaşından önce tümör geliştireceklerini göstermiştir. Bu sendroma sahip

ailelerin büyük çoğunluğunda p53 germline mutasyonlar bulunmuştur (69, 70). Bütün olgularda kanserin gelişmesi ve mutant allelin transmisyonu arasında kesin bir korelasyon olduğu tespit edilmiştir.

1.6.6. Bir Tümör Supressör Gen Olarak Yabanıl p53 ve Bir Dominant Onkogen Olarak Mutant p53

Bütün bu bilgiler bir araya getirildiğinde p53 genini bir tümör supresör olarak tanımlamak mümkün olmuştur. Tümör supresör genlerin başlıcası olan Rb geninden farklı olarak, p53 geninin bazı orijinal özellikleri vardır. Özellikle, transaktivasyonel aktivitesini kaybetmiş bir mutant proteinin üretimine yol açan ve p53 genindeki değişimlerin %95'inden sorumlu olan mutasyonlar nokta mutasyonlarıdır. Bununla birlikte bu mutant proteinin sentezi, hücre için zararsız değildir. Özellikle bazı mutant p53'ler (mutasyonun yerine bağlı olmak üzere) transdominant bir fenotip sergilerler ve inaktif bir heteroligomerin oluşumunu indüklemek için geriye kalan yabanıl allelin ekspresyonuyla oluşan yabanıl p53'e eşlik etme yeteneğindedirler (71).

Mutant p53'le aktif Ha-ras geninin bir araya getirilmesiyle, bazı p53 mutantlarının yüksek, dominant onkogenik aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (72).

Bu gözlemler, mutant p53'ün mutasyon tipi ve fenotipine göre birçok sınıfının olduğu fikrine yol açmıştır (73). Bu sınıflara göz atacak olursak ;

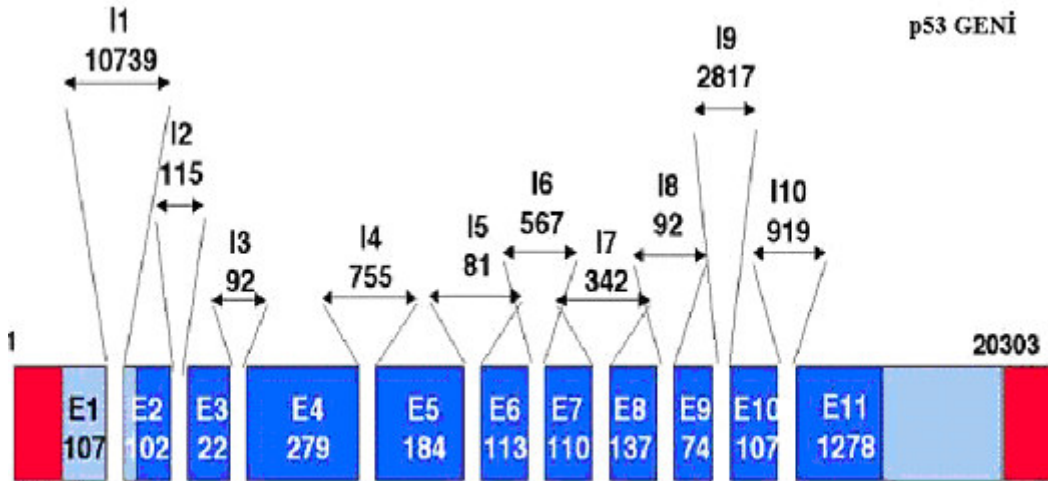
1. Tamamen inaktif olduğu halde transformasyona karışmayan geçersiz, değersiz (null) p53 mutasyonları
2. Tam olarak inaktif olan ve yabanıl allelden ekspresse olan yabanıl p53'ü engelleme yeteneğinde olan dominant negatif mutasyonlar
3. p53'ün normal fonksiyonun değişip, onkogenik aktivite kazandığı ve direkt olarak transformasyona karıştığı, dominant pozitif mutasyonlar.

1.6.7. p53 Geni ve Proteininin Yapı ve Özellikleri

p53 geni 17p13.1 lokusunda 20 kb'lık (20303 bç) DNA kesimi üzerinde bulunur (74). 2,6 kb (2629 bç) mRNA üretmek üzere kombine olmuş

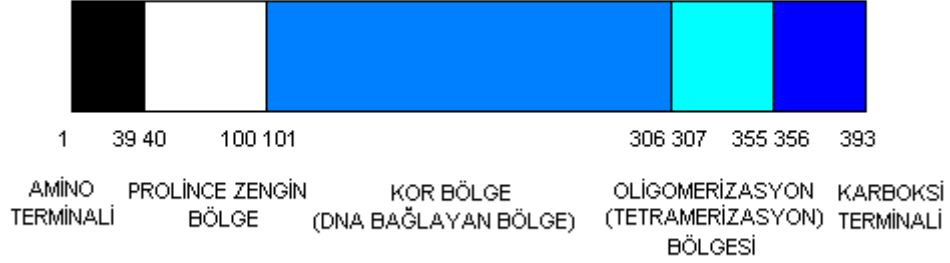
11 ekson içerir (75). p53'ün 1. eksonu kodlamayan (non-coding) bir eksondur. Bu bölgenin kararlı bir ilmek oluşturarak yabancı p53'e sıkı bir şekilde bağlanıp, mutant p53'e bağlanmadığı gösterilmiştir. Bu bağlanma, p53 mRNA'sının translasyonunu spesifik olarak engelleyerek, hücrede p53 proteini seviyesini bu yolla kontrol edebilmektedir (76).

p53 proteini (53,000 kDa), "upstream" regülatör bölgelerinde veya intronlarında p53 bağlama bölgeleri olan genlerin ekspresyonunu aktive eden diziye özgü DNA bağlama proteinidir. p53 proteini, hücre tipi, hasar düzeyi, benzerlik ve henüz tanımlanmamış birçok parametreye bağlı olarak farklı yollarla aktive edilen, yüzlerce gende bulunan DNA tanıma sekanslarını bağlayan bir transkripsiyon faktörü olarak görev yapmaktadır (77-79). p53, p53 bağlayıcı bölgeleri olmayan birçok genin de transkripsiyonunu baskılar ki; bu da transkripsiyonu değiştirmesi için p53'ün DNA'ya fiziksel olarak bağlanmasının gerekmediğini gösterir (1,80).



Şekil 1.3. p53 geninin yapısı (76).

p53 proteini her biri spesifik fonksiyonlara sahip 5 bölgeye ayrılabilir:



Şekil 1.4. p53 proteininin yapısı (81)'den değiştirilerek.

p53 proteininde kabul edilen beş bölge:

1. Amino terminali: 1-39'a kadar olan amino asit rezidülerinden oluşan asidik bir transaktivasyon bölgesi ve Mdm 2 proteini bağlanma bölgesidir (81). Bu bölge, gen ekspresyonunu düzenler. Amino terminali içindeki bazı amino asitler, hedef genlerin p53 tarafından pozitif ve negatif regülasyonu açısından kritik görünmektedirler (74).
2. Prolince zengin bölge: 40-100'e kadar olan amino asit rezidülerinden oluşan p53'ün çoğunluğunda korunmuş olan, tekrar eden prolin rezidüleri serilerini içeren bölgedir (81). Bu bölge transaktivasyon fonksiyonu ve apoptozis için de gereklidir ve p53' ün negatif regülasyonunda görev almaktadır (82).
3. Merkezi (central) veya kor bölge: 101-306'ya kadar olan amino asit rezidülerinden oluşan diziye özgü DNA bağlama bölgesini kapsamaktadır (81). 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 (missense) mutasyonların %90'dan fazlası bu bölgede oluşmakta, bu da proteinin yapısal bütünlüğünün kaybına sebep olmaktadır (1). DNA bağlama

bölgesindeki mutasyonlar p53'ün tümör supresör aktivitesini değiştirirler ve kanserde yaygındırlar (74).

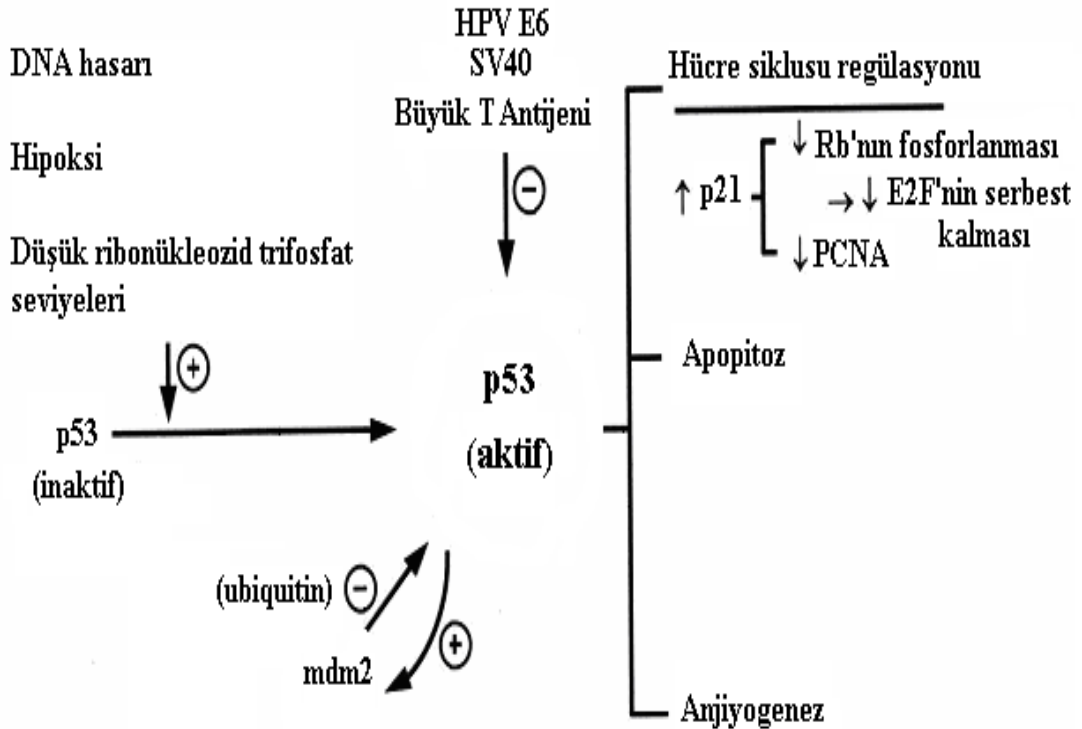
4. Oligomerizasyon (tetramerizasyon) bölgesi: 307-355'e kadar olan amino asit rezidülerinden oluşan bölgedir. Dimerizasyon için gerekli olan bir alfa-heliks tarafından izlenen beta zinciri içerir. p53, iki dimerden oluşan bir dimerdir. Oligomerizasyon bölgesinde bir nükleer eksport sinyali (nuclear export signal) lokalize olmuştur (81). Normal p53 fonksiyonu, oligomerizasyon bölgesi tarafından düzenlenen bir işlem olan, proteinin oligomerizasyonu ve özel konformasyonuna da bağlıdır. p53'ün tetramerik formu olan dimerlerin 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 (1).
5. Karboksi terminali: 356-393'e kadar olan amino asit rezidülerinden oluşan bazik bölgedir. Üç adet nükleer lokalizasyon sinyali (NLS=nuclear localization signal) ve hasarlı DNA'ya bağlanan bir non-spesifik DNA bağlama bölgesi, ayrıca RNA'ya özel olarak bağlanan amino asitler içerir. Bu bölge, kor bölgenin DNA bağlama özelliğinin negatif regülasyonunda (81), ve DNA tamir prosesinin p53 tarafından regülasyonunda görevlidir (74). Bu bölgenin p53'ün apoptotik aktivitesini kontrol ettiği de gösterilmiştir (83).

1.6.8. p53'ün Aktivasyonu

Normalde, sadece 20 dakikalık bir yarı ömre sahip olduğu için, p53'ün hücrel konsantrasyonu düşüktür. Üstelik, p53 protein fonksiyonu için aktivasyona ihtiyaç duyan latent bir formda bulunur (1). Düşük ribonükleozid trifosfat seviyeleri p53'ü stimüle etse de, p53'ü aktive eden başlıca upstream olaylar DNA hasarı ve hipoksidir. DNA hasarı, yükselmiş p53 seviyesi, daha uzun bir yarı ömür ve transkripsiyon faktörü olarak aktivasyonla sonuçlanır. p53'ün DNA hasarını tam saptama mekanizması ve sonraki dahil olduğu sinyal transdüksiyon yolları iyi tanımlanmamıştır.

Bununla birlikte, DNA ipliği kırıkları ve DNA tamir araçlarının p53' ü aktive ettiği düşünülmektedir (84). Hipoksi p53 proteininin konsantrasyonunu yükseltir ve aktive eder, ve bu belki de hipoksik hücrelerin p53 aracılığıyla apoptozine yol açar (1). Sonuçta, düşük ribonükleozid trifosfat seviyeleri p53 ekspresyonunun yükselmesini teşvik ediyor olabilir, çünkü normal konsantrasyonlar S fazının ve hücre siklusunun devamı için gereklidir. Düşük ribonükleozid trifosfat seviyelerinin G0/G1 hücre siklus arrestiyle sonuçlanan bilinmeyen sinyal mekanizmaları yoluyla p53'ü aktive ettiği düşünülmektedir (85).

1.6.9. p53 Proteininin Fonksiyonları



Şekil 1.5. p53 proteininin fonksiyonları (74).

p53'ün fonksiyonları çeşitli ve komplekstir (Şekil 1.5). p53 aktivasyonunu izleyen hücresel cevaplar; hücre siklusu regülasyonu, DNA

tamiri ve apoptozdur. Bu konudaki genel düşünce, DNA hasara uğradığında, p53 aracılı yolların, hasarı, hücre siklusunu durdurarak veya DNA tamiriyle düzeltmeye giriştiğidir. Eğer hasar tamir edilemeyecek kadar büyükse, p53, apoptoza teşvik eder (74).

Yabani p53'ün hücre siklusu üzerinde, p16 siklin D1 siklin bağımlı kinaz-4 (Cdk4) Retinoblastoma (Rb) yolu, p21^{waf1-cip1} yolunu da kapsayan birçok regülatör yolu içeren sayısız etkisi vardır (74).

p16 siklin D1 Cdk4 Rb yolu, hücre siklusunun G₁' den S fazına geçişini düzenler; ve neredeyse kanserlerin tümünde bu dört komponentten biri değişir veya mutasyona uğrar. p16 bu yolun negatif regülatörüdür ve mutasyon veya hipermetilasyonla, görev dışı kalır. Siklin D1, birçok kanserde aşırı eksprese olmuştur. Cdk4 değişimleri, bu yolun p16'nın sebep olduğu negatif regülasyona hedef olmasını engeller. Rb proteini, hücre siklus regülasyonu için kritiktir. Rb, fosforilasyonunun başlıca hedefidir ve normalde, G₁ fazından S fazına geçişte gerekli olan E2F-DP transkripsiyon faktör komplekslerini regüle eder. Rb'nin fosforilasyonu, E2F-DP'nin Rb klompleksinden serbest hale geçmesini sağlar. Serbest E2F-DP, S fazına geçişe izin verir (86).

p21^{waf1-cip1} yolundaki WAF1-CIP1, p53' e cevap vermeye istekli (responziv) bir downstream hedef genidir. p21 birçok cyclin-Cdk kompleksini bağlayan, WAF1-CIP1 geninin protein ürünüdür. p21'in bağlanması, Cdk aktivitesini önleyip, Rb'nin fosforilasyonunu inhibe eder, böylece eninde sonunda G₁'i durdurarak hücre siklusunun devamlılığını bloke eder. p21 ayrıca, DNA tamirinde PCNA' nın (prolifere olan hücre nükleer antijeni = proliferating cell nuclear antigen) rolünü etkilemeden, PCNA'ya bağlanarak DNA replikasyonunda PCNA' yı inhibe eder (74).

Transgenik farelerde yapılan çalışmalardan elde edilen bilgilerle birlikte, literatürlerin büyük bir çoğunluğu p53'ün apoptoz regülasyonundaki rolünü desteklemektedir. Normal mürin timositleri, DNA hasarına neden olan radyasyona maruz kaldıklarında apoptoza uğrarlar. Bununla birlikte, p53'ü görev dışı bırakılan farelerin timositleri aynı uyarıya cevap olarak apoptoza gitmezler (87). Keza, normal farelerin intestinal kök hücreleri radyasyon

yaralanmasını takiben apoptoza uğramışlardır (1). p53 aracılı apoptozun mekanizması, p53'ün düzenlediği transkripsiyonu ve p53'e bağımlı nontranskripsiyonal fonksiyonları kapsar (1, 88)._Birçok faktör p53 aracılı apoptozu artırabilir veya engelleyebilir. Örneğin myeloid lösemik hücreler, yabancı p53'ün aktivasyonu ile apoptoza uğrayabilirken, interlekin-6'nın varlığında apoptoza uğramazlar ki, bu da interlekin-6'nın p53 aracılı apoptozisi ortadan kaldırdığını akla getirmektedir (89). Benzer biçimde mürin eritrolösemik hücrelere eritropoietinle muamele edilmesi, p53'ün düzenlediği programlı hücre ölümünü bloke eder (90). Wilms tümör geni (WT1) ürünü, p53'ü stabilize eder fakat p53 aracılı apoptozu da inhibe eder (91).

Aksine, Adenovirüs E1A onkoproteini, insan papilloma virüsü (HPV) E7 onkoproteini, E2F-1' in overekspresyonu ve myc onkogeninin ürünü de dahil olmak üzere birçok protein, p53 aracılı apoptozu artırır (74).

Son zamanlardaki veriler, p53'ün hücre senesensinde bir rolü olduğunu akla getirmektedir. Yapılan çalışmalarda hücre kültürlerinin ileri pasajlarında, yüksek p53 ve p21 konsantrasyonlarının hücresel bölünmeyi yavaşlatması veya durdurmasıyla, p53'ün, kültürü devam eden pasajlara duyarlı olduğu görülmüştür. Hücre kültüründeki mutant p53, senesensi erteleyerek hücrenin yaşamını uzatmaktadır. p53'ü görev dışı bırakılan farelerin hücreleri, belkide p53 aracılı sentrozom duplikasyonunun düzenlenememesiyle veya G2/M hücre siklus kontrol noktalarının kaybı sebebiyle senesensten kaçmaktadır (92, 93).

Anjiyogenez, katı tümörlerin gelişimi ve metastatik fenotipin devamı açısından önemlidir. Bazı deneysel incelemelerde, p53'ün, anjiyogenezin regülasyonunda görevli olduğu görülmüştür (94). Yapılan bir çalışmada, p53 mutasyonu bulunan ve belirgin anjiyogenik olan bir insan meme kanseri hattında, yabancı p53, anjiyogenezin inhibitörü olan trombospondin salgısını artırmak suretiyle anti-anjiyogenik bir yolu tetiklemiştir (95). Ek olarak, Li-Fraumeni Sendromu olan hastaların fibroblastlarındaki tek yabancı p53 allelinin kaybıyla trombospondin sekresyonunun düşmesi ve aynı anda etkili bir anjiyogenez sebebi olan vasküler endotelial büyüme faktörü

sekresyonunun artışı, belirgin bir pro-anjiyogenik etkiye neden olmaktadır (96).

1.6.10. p53 İnteraksiyonları

p53, birçok viral proteinle (HPV Onkoprotein E6, Adenovirüs Onkoproteini (E1B), SV 40 Büyük T Antijeni), onkogen ürünleriyle (Mdm2, C-Abl) ve transkripsiyon faktörleriyle (TFIIH, WT1, TATA Bağlayan Protein) önemli fizyolojik yollarla karşılıklı olarak etkileşir. p53 protein interaksiyonları listesi hızla genişlemektedir (74).

1.6.11. p53 Mutasyonları

İnsan p53 mutasyonlarının ilk kez 1990 yılında kolorektal kanserlerde dokümente edilmesinden sonra, pek çok laboratuvar tarafından yapılan çalışmalarda, doku orijini ve etiyojiden bağımsız olmak üzere, insan kanserlerinin büyük çoğunluğunda, bu genin mutant veya inaktif olduğu görülmüştür (97). p53 mutasyonları insan kanserlerinin yaklaşık %50'sinde bulunmuştur (79).

p53 mutasyonları; delesyon, insersiyon, trunkasyon (truncation-budanma) veya nokta mutasyonları şeklindedir. Tümörlerde genellikle yabancı allelin delesyona uğramasıyla oluşan, heterozigotluğun kaybı (LOH = loss of heterozygosity) söz konusudur. Bütün mutasyonların %85'ten fazlası bir yanlış anlamlı (missense) proteinin üretimiyle sonuçlanan tek amino asit substitisyonlarıdır (1, 82).

Mutasyonların doğasının karsinomların, sarkomalardan daha yüksek nokta mutasyonu frekansına sahip olmasında olduğu gibi, dokuya spesifik olduğu görülmektedir (82). p53 mutasyonlarının büyük çoğunluğu (%90'dan fazlası) sekans-spesifik DNA bağlayan kor bölgede oluşmakta ve yaklaşık %50'si bu bölgedeki 175, 248, 249, 273 veya 282 olmak üzere beş "hot spot" kodonu değiştirmektedir (1, 97). Neredeyse bütün belli başlı kanser tipleri (deri, akciğer, karaciğer, meme, mesane kanseri, gastrointestinal sistem ve hematolojik kanserler) DNA bağlayan bölgeye dağılmış olan mutasyonlar gösterirler. Genellikle, kor bölgedeki mutasyonlar, direkt olarak DNA'ya

bağlanan amino asitlerde (örneğin 248. ve 273.) veya p53'ün konformasyonunu değiştirerek spesifik DNA bağlayıcılığını engelleyen (örneğin 143. ve 175.) amino asitlerde oluşan mutasyonlar olarak sınıflandırılabilir (98, 99).

Farklı mutasyon tiplerinin gösterdiği mutasyon frekansları içinde G:C→A:T transisyonları frekansı %42,6 ile en yüksek değerdedir. G:C→T:A transversiyonları %16,8 ile ikinci sıklıktaki mutasyon tipidir. Diğer mutasyonlar A:T→ G:C transisyonları %10,7, delesyonlar %8,9, G:C→C:G transversiyonları %8, A:T →T:A transversiyonları %5,6, A:T→C:G transversiyonları %3,7, insersiyonlar %2,6, CC:GG→TT:AA double transisyonları %0,7 olarak dağılım göstermektedir (97).

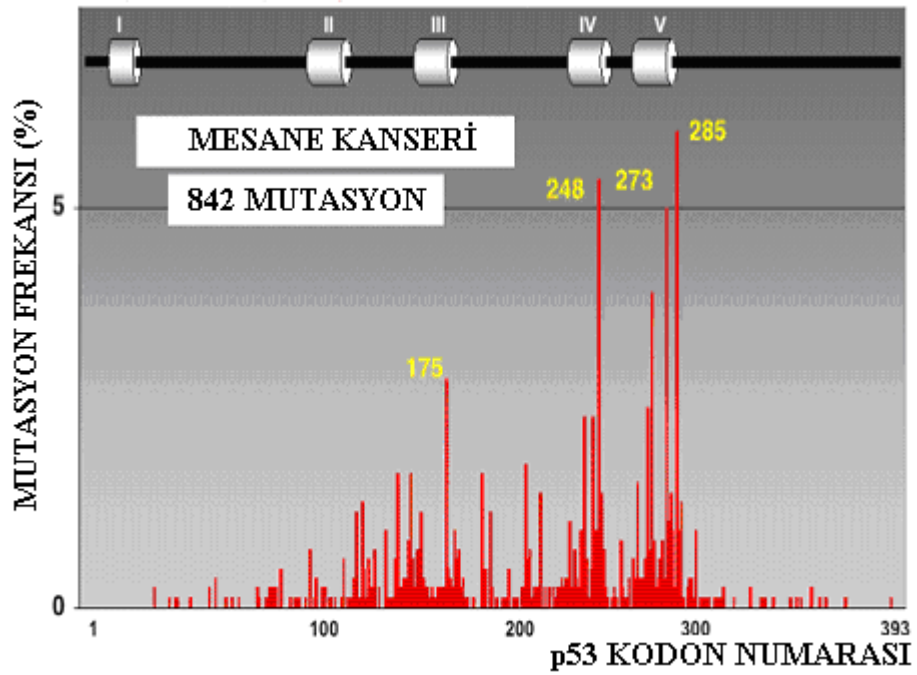
1.6.12. Mesane Kanselerinde Görülen p53 Mutasyonları

Mesane kanserleri, yaygın olarak G:C→A:T transisyonları ve G:C→C:G transversiyonları gösterirler. Bu mutasyonlar mesane kanserine yol açan farklı etiyolojik ajanlara maruz kalmanın sonucu indüklenmiş olabilir. Bu kanserlerde G:C→T:A mutasyonunun azlığı tütündeki benzo-a-pyrene'nin mesane kanseri ve sigara içimiyle ilgili temel faktör olmadığını akla getirmektedir. Diğer yandan G:C→C:G transversiyonlarının seçici olarak 4-aminobifenil (4-aminobiphenyl) tarafından indüklendiği bilinmektedir. Hem sigara içenler, hem de kimyasal boya işçileri bu arilamine maruz kalırlar. Bu yüzden G:C→C:G transversiyonlarının fazla miktarda görülmesi, bu mutasyonların hem tütün içiciliğinden hem de kimyasal boyalardan kaynaklandığını akla getirmektedir. G:C→A:T transisyonlarının fazlalığı da aynı tip karsinojenler veya enflamatuvar reaksiyonlara bağlanabilir (97).

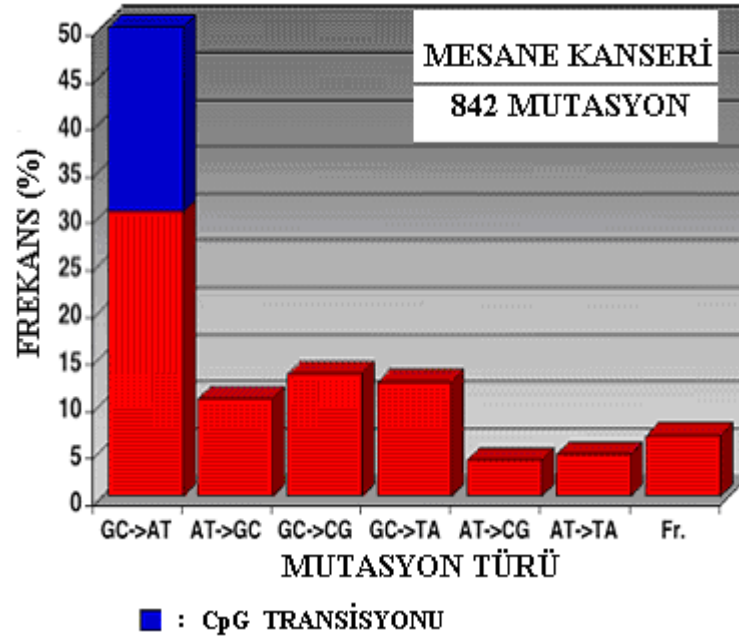
p53'ü diğer tümör supresörlerden ayıran yegane özelliği, inaktivasyon şeklidir. Birçok tümör supresör gen, protein sentezini engelleyen (veya budanmış ürün üreten) çerçeve kayması (frameshift) ve anlamsız (nonsense) mutasyonlarla inaktive edilirken, p53 değişimlerinin büyük bölümü, kararlı normal uzunlukta proteinin sentezlenmesini sağlayan yanlış anlamlı (missense) mutasyonlardır. Böylece p53, spesifik DNA bağlama özelliğini yitirir ve tümör hücrelerinin nükleuslarında birikir. Tümör hücrelerindeki bu

mutant p53'ün korunmasının iki etkiye yol açtığına inanılmaktadır; mutant olmayan allelin ekspresse ettiği yabancı p53'ü inhibe eden dominant negatif aktivite ve mutant p53'ü dominant onkogene transforme eden fonksiyon kazanımı (79, 100, 101). p53 proteininin önemli bir özelliği, DNA bağlayan bölgenin aşırı esnekliği ve frajilitesidir (79, 102). p53 mutasyonlarının çoğunun proteinin DNA bağlayan bölgesinde olması, p53 mutasyon analiz çalışmalarının %80'den fazlasının 5. ila 8. eksonlar arasında yoğunlaşmasına sebep olmuştur (79).

Mesane kanserinde gözlenen mutasyonlar Soussi p53 veritabanı 2005 bilgilerine göre aşağıda verilen grafiklerle özetlenebilir.



Grafik 1.1. Mesane kanserinde p53 genindeki kodonların mutasyon frekansı (103).



Grafik 1.2. Mesane kanserinde görülen p53 geni mutasyonlarının, mutasyon türüne göre frekansı (103).

2. GEREÇ VE YÖNTEMLER

2.1. GEREÇLER

2.1.1. Parafine Gömülü Doku Örneklerinin Elde Edilmesi

Bu araştırmada, Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakóltesi Patoloji Anabilim Dalı ve Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakóltesi Patoloji Anabilim Dalı arşivlerinde bulunan, sırasıyla 9 ve 13 adet parafin bloğa gömülü mesane tümör doku örnekleri kullanılmıştır.

2.1.2. Kullanılan Kimyasallar

Ksilol (Merck)

%96'lık Etanol (Tekel)

Aseton (Merck)

Proteinaz K (Bio basic inc.)

TET (Dr. Zeydanlı)

NaCl (4M)

%70'lik Etanol (Tekel)

1X TE (Dr. Zeydanlı)

Agorose- I (Amresco)

5X TBE (Applichem-Bio Chemica)

EtBr (Sigma)

Akrilamid (Sigma)

Bisakrilamid (Bio basic inc.)

TEMED (Sigma)

Amonyun persulfat (Sigma)

Gliserin (Riedel-de Haën)

Brom fenol blue (Sigma)

dNTP miks (100 mM) (Amresco)

Taq DNA Polimeraz (Fisher)

MgCl₂ (25mM) (Fisher)

10X reaksiyon tamponu (Fisher)

Exon 5-6 Sens Primer (Bio basic inc.):

P₅S (Sens) :5' TTC CTC TTC CTG CAG TAC TC 3'

Exon 5-6 Antisens Primer (Bio basic inc.):

P₅A (Antisens) : 5' AGA CCT CAG GCG GCT CAT AG 3'

Exon 7 Sens Primer (Bio basic inc.):

P₇S (Sens): 5' GTT GGC TCT CAC TGT ACC ACC 3'

Exon 7 Antisens Primer (Bio basic inc.)

P₇A (Antisens): 5' CCT GGA GTC TTC CAG TGT GAT 3'

Hae II Enzim seti içeriği (Takara):

Hae II enzimi

10X M tamponu

10X yükleme tamponu

Hae III Enzim seti içeriği (Takara):

Hae III enzimi

10X M tamponu

10X yükleme tamponu

Φx174 DNA/BsuRI (HaeIII) Marker, 9 içeriği (MBI Fermentas):

DNA marker

6X yükleme boya solüsyonu

2.1.3. Kullanılan Cihazlar

Mikrotom (Leica – RM 2145)

Etüv (Nüve – EN 055)

Mikrosantrifüj (Heraeus – Biofuge pico)

Buzdolabı (Profilo)

Derin dondurucu (Bosch)

Thermal cycler (Eppendorf - Mastercycler personal)

Mikrodalga fırın (Arçelik)

Yatay elektroforez tankı (Biolab)

Dikey elektroforez tankı (Thermo)

Güç Kaynağı (Thermo)

Güç Kaynağı (Apelex)

UV Transilluminatör (UVP)
Su banyosu (Nüve BM 402)
Hassas terazi (Sartorius)
Spektrofotometre (NanoDrop ND-1000)

2.2. YÖNTEMLER

Çalışmamızda, mutasyon analizi açısından değerlendirilen 22 olgununun parafine gömülü mesane tümör doku kesitlerinden genomik DNA elde edildi. Elde edilen genomik DNA'ların p53 genine ait 5., 6. ve 7. eksonları PCR metoduyla amplifiye edildi. Amplifikasyon %2'lik agaroz jelde kontrol edildi. Amplifikasyonun doğrulanmasının ardından, 5. ekson için Hae II enzim kesimi, 7. ekson için Hae III enzim kesimi uygulandı. Enzim kesimi sonuçları sırasıyla, %2'lik agaroz jel ve %10'luk (%5 gliserinli) poliakrilamid jel elektroforezi sonucunda değerlendirilerek, olgulara ait örneklerin incelenen mutasyonlar açısından mutant olup olmadıkları belirlendi.

2.2.1. DNA İzolasyonu

Parafine gömülü tümör doku örneklerinden DNA izolasyonu gerçekleştirmek için, çeşitli metodlar denendi. Denenen metodlar arasında en iyi sonuç, "ksilen-tuzla uzaklaştırma" metodundan elde edildiği için, bu yöntemin uygulanmasına karar verildi. Olgulara ait tümör doku örneklerinin gömülü olduğu parafin bloklardan, her seferinde kullanılan mikrotom bıçağı değiştirilip, cihaz yüzeyi dezenfekte edilmek suretiyle, steril 1,5 ml'lik ependorf tüplere 2 µm kalınlığında 10 kesit alındı. "Ksilen-tuzla uzaklaştırma" metodu gereği, parafinin uzaklaştırılması, yıkama, parçalama, saflaştırma, çöktürme, yıkama ve süspanse etme basamakları uygulanarak DNA izole edildi (104). İzolasyonu takiben DNA'ların varlığı spektrofotometrik ölçüm ve %2'lik agaroz jel elektroforeziyle doğrulandı.

- 1) İzolasyonda kullanılacak olan solüsyonlar aşağıdaki gibi hazırlandı:
 - %96'lık Etanol: 96 ml etanol üzerine 4 ml dH₂O eklendi.
 - Proteinaz K: 6mg liyofilize proteinaz K üzerine 300 µl steril dH₂O eklendi.

- 4 M NaCl: 23,3 gr NaCl distile su ile 100 ml' ye tamamlandı.
- %70'lik Etanol: 70 ml etanol üzerine 30 ml dH₂O eklendi.
- 2) Parafini uzaklaştırmak için 1,5 ml'lik ependorf tüplerdeki kesitlerin üzerine 1000 µl ksilol eklendi. Tüp alt üst edilmek suretiyle elde 2 dakika karıştırıldı.
- 3) Mikrosantrifüjle 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
- 4) Dokulara dikkat edilerek, süpernatant uzaklaştırıldı.
- 5) Bu basamaklar 2 kez daha tekrar edilerek, parafinin tamamen uzaklaştırılması sağlandı.
- 6) Mikrosantrifüjle 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
- 7) Dokulara dikkat edilerek, süpernatant uzaklaştırıldı.
- 8) Yıkama için tüpe 1000 µl %96'lık etanol eklendi. Tüp alt üst edilmek suretiyle elde 2 dakika karıştırıldı.
- 9) Mikrosantrifüjle 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
- 10) Dokulara dikkat edilerek, süpernatant uzaklaştırıldı.
- 11) Yıkama işlemi, 2 kez daha tekrar edildi.
- 12) Mikrosantrifüjle 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
- 13) Dokulara dikkat edilerek, süpernatant uzaklaştırıldı.
- 14) Doku peleti üzerine 500 µl aseton eklendi.
- 15) Mikrosantrifüjle 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
- 16) Dokulara dikkat edilerek, süpernatant uzaklaştırıldı.
- 17) Doku peleti kuruması için 37 °C etüvde inkübe edildi.
- 18) Kuruyan pelet üzerine, 6 µl proteinaz K içeren 400 µl TET solüsyonu eklenerek, tüp 55 °C etüvde 3 gece inkübasyona bırakıldı.
- 19) İnkübasyon sonrasında, proteinaz K'nın inaktivasyonu için tüp, hot plate'de hazırlanan 95 °C'lik su banyosunda 10 dakika inkübe edildi.
- 20) Tuzla uzaklaştırma basamağı için, su banyosundan alınan tüp üzerine 200 µl 4M NaCl solüsyonu eklendi.
- 21) Mikrosantrifüjle 2500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.
- 22) DNA'nın çöktürülmesi için süpernatant, yeni steril bir ependorf tüpe alınıp, üzerine 1000 µl %96'lık soğuk etanol eklendi.
- 23) DNA pelleti görülünceye kadar, tüp yavaşça alt üst edildi.

- 24) Mikrosantrifüjle 12.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.
- 25) DNA pelletine dikkat edilerek, süpernatant uzaklaştırıldı.
- 26) Yıkama için DNA peleti üzerine 1000 µl %70'lik etanol eklendi.
- 27) Mikrosantrifüjle 12.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.
- 28) 1000 µl %70'lik etanol ile yıkama işlemi tekrarlandı.
- 29) Mikrosantrifüjle 12.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.
- 30) DNA peletine dikkat edilerek, süpernatant uzaklaştırıldı.
- 31) DNA peleti kuruması için 37 °C etüvde inkübe edildi.
- 32) Kuruyan DNA peleti üzerine 50 µl 1X TE eklendi ve pipetajla peletin, tüpün tabanından kalkması sağlandı. DNA'nın süspansiyon olması için, tüp bir gece oda ısısında bekletildi.

2.2.2. PCR

Elde edilen genomik DNA ile p53 geninin 5, 6 ve 7. ekson bölgelerinin PCR metoduyla amplifiye edilmesi için, sırasıyla primerleri birlikte dizayn edilen 5-6. eksonlar ve 7. ekson için uygun PCR miksleri ve PCR koşullarının oluşturulmasına yönelik optimizasyon denemeleri yapıldı. En iyi verimin alındığı koşullar uygulandı. PCR sonucunda, amplifikasyon ürünleri %2'lik agaroz jel elektrofozıyla, ΦX174 DNA/BsuRI (HaeIII) Marker, 9 kullanılarak kontrol edildi.

- 1) - PCR miksinde kullanılacak olan dNTP 2,5 mM olacak şekilde, 10 µl 100mM dNTP'ye 390 µl dH₂O eklenerek hazırlandı.
 - PCR miksinde kullanılacak olan primerler aşağıdaki şekilde hazırlandı.
 - Exon 5-6 Antisens : 100 µl stok solüsyon hazırlamak için liyofilize içeriğe 102 µl dH₂O eklendi.
 - Exon 5-6 Sens: 100 µl stok solüsyon hazırlamak için liyofilize içeriğe 121 µl dH₂O eklendi.
 - Exon 7 Antisens : 100 µl stok solüsyon hazırlamak için liyofilize içeriğe 109 µl dH₂O eklendi.
 - Exon 7 Sens: 100 µl stok solüsyon hazırlamak için liyofilize içeriğe 104 µl dH₂O eklendi.

- Agaroz jel hazırlamada kullanılan EtBr için ise, 0,1 g toz haldeki EtBr üzerine 1 ml steril dH₂O eklenerek hazırlanan stoktan 1ml alınarak, dH₂O ile 10 ml'ye tamamlandı.
 - Agaroz jel hazırlamada kullanılan 0,5X TBE, 1 birim 5X TBE'ye 9 birim dH₂O eklenerek gerekli miktarlarda hazırlandı.
- 2) Amplifiye edilecek örnek sayısına yetecek kadar PCR miksi hazırlandı (Tablo 2.1. ve Tablo 2.3.). Hazırlanan PCR miksi 0,2 ml'lik ependorf tüplere 45µl olacak şekilde dağıtıldı. Daha sonra üzerine 5 µl genomik DNA eklendi. İçinde PCR miksi ve DNA olan 0,2 ml'lik ependorf tüpler, uygun PCR koşullarıyla programlanan thermal cycler'da amplifikasyona bırakıldı (Tablo 2.2. ve Tablo 2.4.).
- 3) 5 ve 6. eksonlar için kullanılan PCR miksi aşağıdaki şekildedir.

Tablo 2.1. 5 ve 6. eksonlar için kullanılan PCR miksi.

dNTP	5 µl
10X PCR tamponu	5 µl
Primer sense	0.5 µl
Primer antisense	0.5 µl
DNA	5 µl
Taq DNA polimeraz	0.3 µl
dH ₂ O	34.1 µl
toplam	50 µl

- 4) 5 ve 6. eksonlar için uygulanan PCR koşulları aşağıdaki şekildedir.

Tablo 2.2. 5 ve 6. eksonlar için uygulanan PCR koşulları.

1.	94 °C'de	7 dakika
2.	94 °C'de	1 dakika
3.	55 °C'de	2 dakika
4.	72 °C'de	2 dakika
5.	2,3,4	35 döngü
6.	72 °C'de	7 dakika

5) 7. ekson için kullanılan PCR miksi aşağıdaki şekildedir.

Tablo 2.3. 7. ekson için kullanılan PCR miksi.

dNTP:	5 µl
10X PCR tamponu	5 µl
Primer sense	0.3 µl
Primer antisense	0.3 µl
DNA	5 µl
Taq DNA polimeraz	0.3 µl
dH ₂ O	34.1 µl
toplam	50 µl

6) 7. ekson için uygulanan PCR koşulları aşağıdaki şekildedir.

Tablo 2.4. 7. ekson için uygulanan PCR koşulları.

1.	94 °C'de	7 dakika
2.	94 °C'de	1 dakika
3.	55 °C'de	1 dakika
4.	72 °C'de	1 dakika
5.	2,3,4	35 döngü
6.	72 °C'de	7 dakika

7) PCR sonunda, amplifikasyon ürünlerinin kontrol edilmesi için %2'lik agaroz jel hazırlandı. 50 ml 0,5X TBE içine 1 g agaroz eklenerek mikrodalga fırında kaynatılıp, içerisine 2,5 µl EtBr ilave edildi ve toplam volüm jel dökme setine dökülerek tarak yerleştirildi. Hazırlanan %2'lik agaroz jel, içinde 0,5X TBE bulunan elektroforez tankına alındı. Jel tarağının oluşturduğu kuyulardan ilkinde 1µl 6X yükleme boya solüsyonu, 1µl marker DNA, 4µl dH₂O karışımı; diğer kuyulara ise 10µl amplifikasyon ürünüyle birlikte, 3 µl brom fenol blue yüklendi. 80 voltta 45 dakika yürütüldü. Sonuçlar UV transillimünatörde değerlendirildi.

2.2.3. Enzim Kesimi

PCR amplifikasyon ürünleri %2'lik agaroz jelde kontrol edildikten sonra, amplifikasyon ürünlerine enzim kesimi uygulandı. p53 geninin 5 ve 6. eksonlarının amplifikasyon ürünü, 5. eksonun 175. kodonunda CGC tanıma sekansı olan Hae II (*Haemophilus aegyptius*) enzimi ile muamele edildi. 5 ve 6. eksonların PCR amplifikasyon ürününün, mutasyon olmaması durumunda, Hae II ile kesildiğinde 163 ve 234 bazlık iki parçaya ayrılması, mutasyon durumunda ise Hae II kesim noktası ortadan kalkacağı için 397 bazlık kesilmemiş bir parçanın görülmesi beklendi. p53 geninin 7. ekson PCR amplifikasyon ürünü ise, 7. eksonun 249. kodonunda GG CC tanıma sekansı olan Hae III (*Haemophilus aegyptius*) enzimi ile muamele edildi. 110 bp olan 7. ekson PCR ürününün, mutasyon olmaması durumunda, Hae III ile kesildiğinde 75 ve 35 bazlık iki parçaya ayrılması, mutasyon durumunda ise Hae III kesim noktası ortadan kalkacağı için 110 bazlık kesilmemiş bir parçanın görülmesi beklendi.

1) 5. ve 6. eksonların amplifikasyon ürünü Hae II enzimi ile muamelesi için, 1µl Hae II enzimi, 1µl 10X M tamponu ve 8,5 µl PCR amplifikasyon ürünü 0,2 ml'lik steril ependorf tüpüne konulduktan sonra, 1 saat 37 °C etüvde inkübe edildi. Inkübasyon sonrası enzim aktivitesi 10X yükleme tamponu ile durduruldu. Önceden hazırlanan %2'lik agaroz jel, içinde 0,5X TBE bulunan elektroforez tankına alındı. Jel tarağının oluşturduğu kuyulardan ilkine 1µl 6X yükleme boya solüsyonu, 1µl marker DNA, 4µl dH₂O karışımı; diğer kuyulara ise 10µl enzim kesim ürünüyle birlikte, 3 µl 10X yükleme tamponu yüklendi. 80 voltta 40 dakika yürütüldü. Sonuçlar UV transillimünatörde değerlendirildi.

2) 7. Ekson enzim kesiminin değerlendirilebilmesi için ilk önce %10'luk (%5 gliserinli) poliakrilamid jel hazırlandı.

Poliakrilamid jeli dökmek için kullanılan 29x22x0,04 cm ölçülerindeki 2 cam yüzey, öncelikle deterjan ile yıkanıp iyice durulandıktan sonra kurulandı. Jelin döküleceği yüzeyler %70'lik etanol ve izopropanol ile silindi. Jelin döküleceği cam yüzeylerin yan kenarları arasına 0,04 cm

kalınlığında 2 aralayıcı yerleştirilip, kısıkaçlar kullanılarak sabitlendi. Düzenek hazırlandıktan sonra aşağıdaki malzemelerle hazırlanan jel karışımı 50 ml' lik enjektöre çekilerek, 45° eğimle tutulan cam yüzeyler arasına karışımın donmaması ve hava kabarcığı oluşmaması için hızlı bir şekilde boşaltıldı. Jel donmadan üst kısma tarak yerleştirildi ve jel donması için 2 saat oda ısısında bekletildi.

Poliakrilamid jel için hazırlanan 50 ml'lik jel karışımı

- 0,1 g amonyum persulfat (APS) + 1000 µl distile su
- 12,5 µl TEMED
- 4,9 g akrilamid
- 0,12 g bisakrilamid
- 2,5 ml gliserol
- Malzemeler bir araya getirildikten sonra üzerine 0,5X TBE eklenerek toplam volüm 50 ml'ye tamamlandı.

- 3) 7. ekson amplifikasyon ürünü Hae III enzimi ile muamelesi için, 1µl Hae III enzimi, 1µl 10X M tamponu ve 8,5 µl PCR amplifikasyon ürünü 0,2 ml'lik steril ependorf tüpüne konulduktan sonra, 1 saat 37 °C etüvde inkübe edildi. İnkübasyon sonrası enzim aktivitesi 10X yükleme tamponu ile durduruldu. Hazırlanan poliakrilamid jel, içinde 0,5X TBE bulunan dikey elektroforez tankına alındı. Jel tarağının oluşturduğu kuyulardan ilkinde 1µl 6X yükleme boya solüsyonu, 1µl marker DNA, 4µl dH₂O karışımı; diğer kuyulara ise 10µl enzim kesim ürünüyle birlikte, 3 µl 10X yükleme tamponu yüklendi. 102 voltta 2 saat yürütüldü.
- 4) Cam yüzeyler açılarak, yüzeylere yapışmış halde olan jel serbest hale getirildi ve boyama için, içinde 1 ml'sinde 1 µl etidyum bromür içeren 0,5xTBE solüsyonunda 2 saat bekletildi. Sonuçlar UV transillimünatörde değerlendirildi.

3. BULGULAR

3.1. Doku Örneklerinin Toplanması

Çalışmamızda, Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'ndan 9 ve Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'ndan 13 adet olmak üzere, ürotelyal karsinom tanısı almış olgulara ait toplam 22 parafine gömülü mesane tümör dokusu örneği kullanıldı. Bu olgulara ait laboratuvar çalışma numaraları, olgu yaşı, cinsiyeti, tanısı, tümör evresi ve grade bilgileri Tablo 3.1'de verildi.

Tablo 3.1. Olgulara ait laboratuvar çalışma numaraları, olgu yaşı, cinsiyeti, tanısı, tümör evresi ve grade bilgileri.

Olgu No	Yaş	Cinsiyet	Tanı	Evre	Grade
1	67	E	Ürotelyal Karsinom	Ta	1
2	77	E	Ürotelyal Karsinom	Ta	2
3	73	E	Ürotelyal Karsinom	Tb1	2
4	69	E	Ürotelyal Karsinom	Ta	1
5	63	E	Ürotelyal Karsinom	T2a	3
6	55	E	Ürotelyal Karsinom	Ta	1
7	71	E	Ürotelyal Karsinom	Ta	1
8	74	K	Ürotelyal Karsinom	T1c	3
9	57	K	Ürotelyal Karsinom	T1c	2
10	59	E	Ürotelyal Karsinom	T3b	2
11	63	E	Ürotelyal Karsinom	T1	3
12	71	E	Ürotelyal Karsinom	Ta	1
13	77	E	Ürotelyal Karsinom	T1	3
14	77	E	Ürotelyal Karsinom	Ta	2
15	55	E	Ürotelyal Karsinom	T1	3
16	74	E	Ürotelyal Karsinom	T1	3
17	72	K	Ürotelyal Karsinom	T1	2
18	60	E	Ürotelyal Karsinom	Ta	2
19	72	E	Ürotelyal Karsinom	T2	2
20	57	E	Ürotelyal Karsinom	T1	3
21	57	E	Ürotelyal Karsinom	Karsinoma in situ	
22	65	E	Ürotelyal Karsinom	T1	2

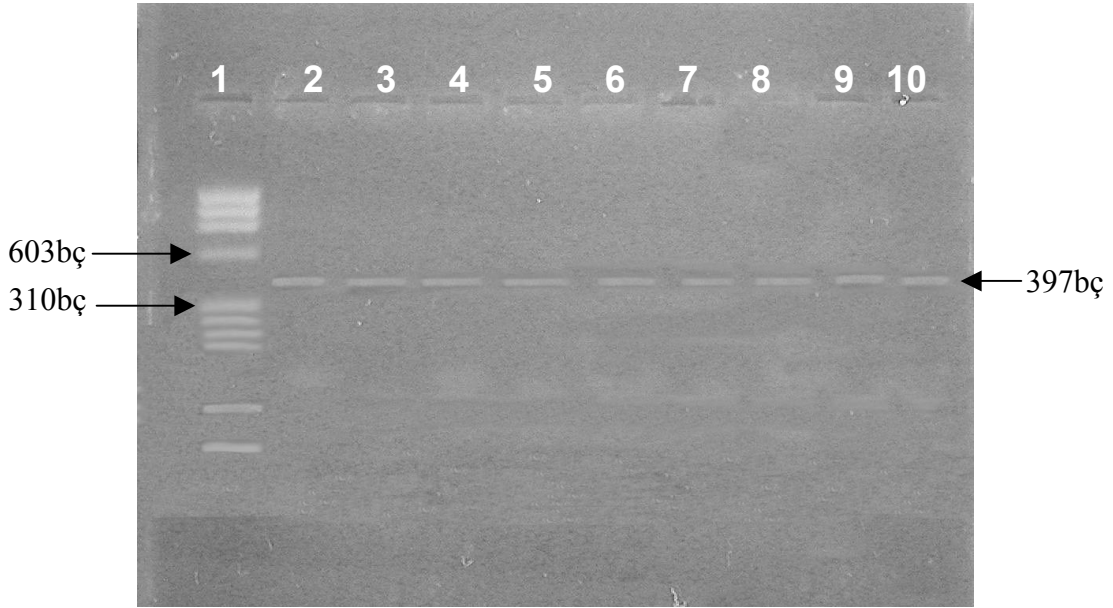
E: Erkek, **K:** Kadın

3.2. DNA İzolasyonu

Parafine gömülü mesane tümör doku örneklerinden “ksilen-tuzla uzaklaştırma” metodu kullanılarak DNA izolasyonu gerçekleştirildi. Dokudan izole edilen DNA'nın spektrofotometrik ölçümü yapıldı. DNA'nın varlığı agaroz jel elektroforeziyle de doğrulandı. DNA izolasyonuna ilişkin sonuçlar Tablo 3.2.'de verildi.

3.3. PCR Sonuçları

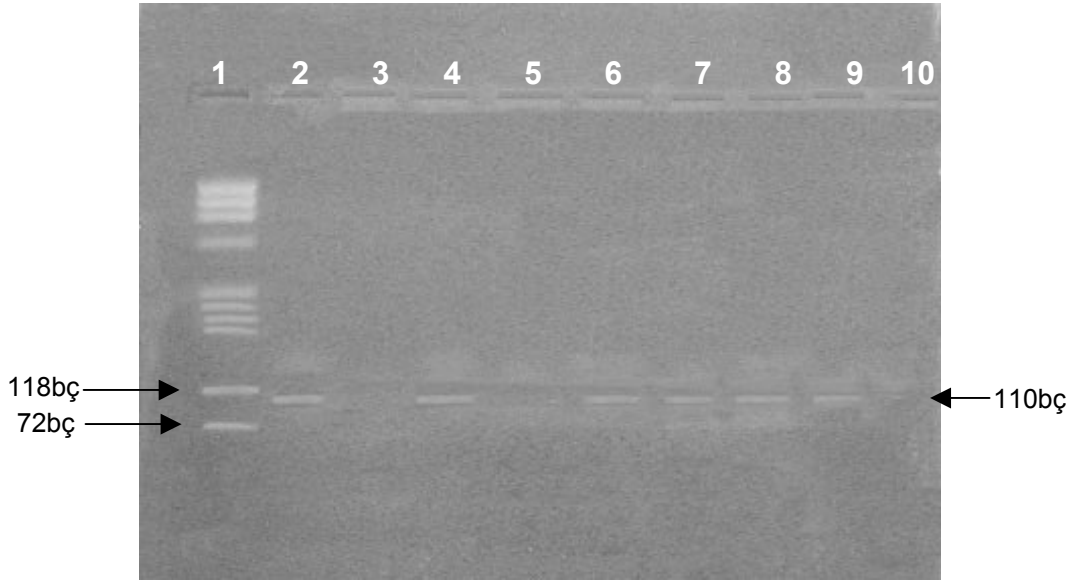
DNA izole edildikten sonra dizayn edilen primerler kullanılarak hazırlanan mikslerle uygun PCR koşulları altında 5. (6. ile birlikte) ve 7. ekson amplifikasyonları gerçekleştirildi. Amplifikasyona ait sonuçlar %2'lik agaroz jelde kontrol edildi. Amplifikasyon sonuçları Tablo 3.2. de verildi. Ekson 5-6'nın agaroz jel görüntüleri Şekil 3.1. de verildi.



Şekil 3.1. Agaroz jel 5. ve 6. ekson PCR görüntüleri.

1.	Kuyu : Marker DNA	5. Kuyu: 4	8. Kuyu: 7
2.	Kuyu: 1	6. Kuyu: 5	9. Kuyu: 8
3.	Kuyu: 2	7. Kuyu: 6	10. Kuyu: 9
4.	Kuyu: 3		

Ekson 7 için kurulan PCR sonucunda 7, 8, 9, 12, 13, 14 ve 16 nolu olgulara ait örneklerde amplifikasyon gerçekleşmedi. Parafin bloktan izole edilen DNA miktarı az olduğundan, elde edilen miktarın da, çalışmanın diğer bölümlerinde kullanılmış olduğundan ekson 7'nin PCR'ı için yeterli DNA kalmadığı için amplifikasyon yapılamadı. 7. ekson agaroz jel görüntüsü Şekil 3.2.'de verildi.



Şekil 3.2. Agaroz jel 7. ekson PCR görüntüleri.

- | | | |
|----------------------|-------------|--------------|
| 1. Kuyu : Marker DNA | 5. Kuyu: 12 | 8. Kuyu: 19 |
| 2. Kuyu: 6 | 6. Kuyu: 17 | 9. Kuyu: 20 |
| 3. Kuyu: 8 | 7. Kuyu: 18 | 10. Kuyu: 16 |
| 4. Kuyu: 10 | | |

3.4. Enzim Kesimi

Mutasyon analizi için PCR sonucunda elde edilen amplifikasyon ürünlerine enzim kesimi uygulandı. 5. ve 6. ekson amplifikasyon ürünlerinin 5. eksonda mutasyonun olması halinde kullanılan HaeII enziminin 5. eksonda tanınan bölgenin ortadan kalkması ile kesim gerçekleşmediğinden

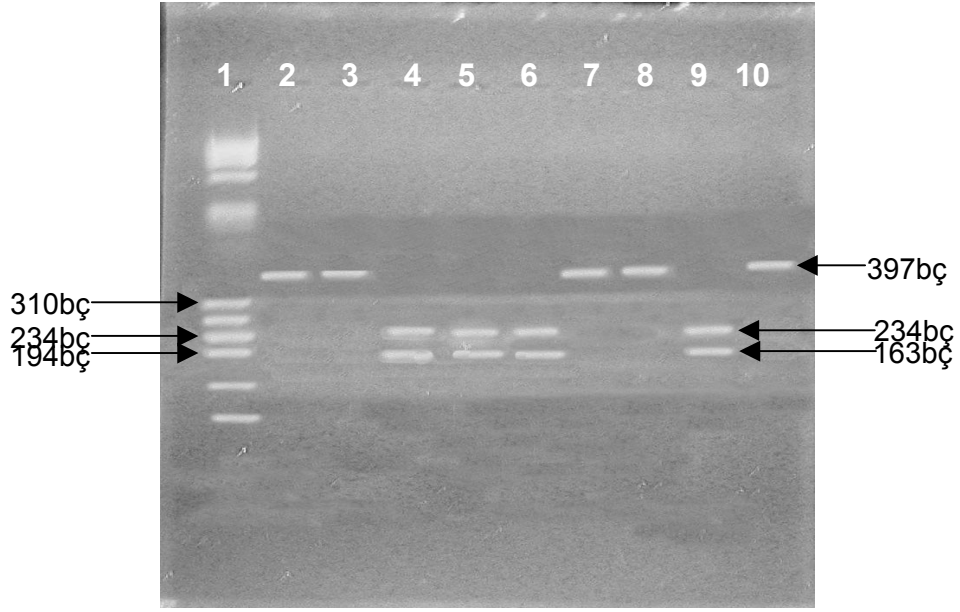
agaroz jelde 397 baz çifti uzunluğunda tek bir bant görülmesi beklendi. Mutasyon olmaması durumunda enzim 5.eksonda 175. kodonda bulunan tanıma bölgesinde kesim gerçekleştireceğinden jelde 163 ve 234 baz çifti uzunluğunda 2 bant görülmesi beklendi. Kesim sonuçları agaroz jel elektroforezi ile değerlendirildi. Bu sonuçlar Tablo 3.2. de verildi.

Tablo 3.2. Olgulara ait DNA izolasyon, PCR ve enzim kesim sonuçları.

Olgu No	DNA İzolasyon Sonucu	Exon 5-6 Amplifikasyonu	Exon 7 Amplifikasyonu	Exon 5 Hae II Enzim Kesimi	Exon-7 HaeIII Enzim Kesimi
1	+	+	+	ÇB	ÇB
2	+	+	+	ÇB	ÇB
3	+	+	+	TB	ÇB
4	+	+	+	ÇB	ÇB
5	+	+	+	TB	ÇB
6	+	+	+	TB	ÇB
7	+	+	-	TB	KY
8	+	+	-	TB	KY
9	+	+	-	TB	KY
10	+	+	+	ÇB	ÇB
11	+	+	+	ÇB	ÇB
12	+	+	-	ÇB	KY
13	+	+	-	ÇB	KY
14	+	+	-	ÇB	KY
15	+	+	+	ÇB	ÇB
16	+	+	-	ÇB	KY
17	+	+	+	ÇB	TB
18	+	+	+	ÇB	TB
19	+	+	+	ÇB	ÇB
20	+	+	+	ÇB	TB
21	+	+	+	ÇB	ÇB
22	+	+	+	ÇB	TB

TB: Tek Bant, **ÇB:**Çift Bant, **KY:** Kesim Yok

Çalışmamızda 5. ekson için uygulanan enzim kesimi sonucunda 3, 5, 6, 7, 8 ve 9 nolu olgulara ait örneklerin agaroz jel elektroforezi sonucunda 397 baz çifti uzunluğunda tek bir bant görüldü. Enzim kesim görüntüleri Şekil 3.3.'de verildi.



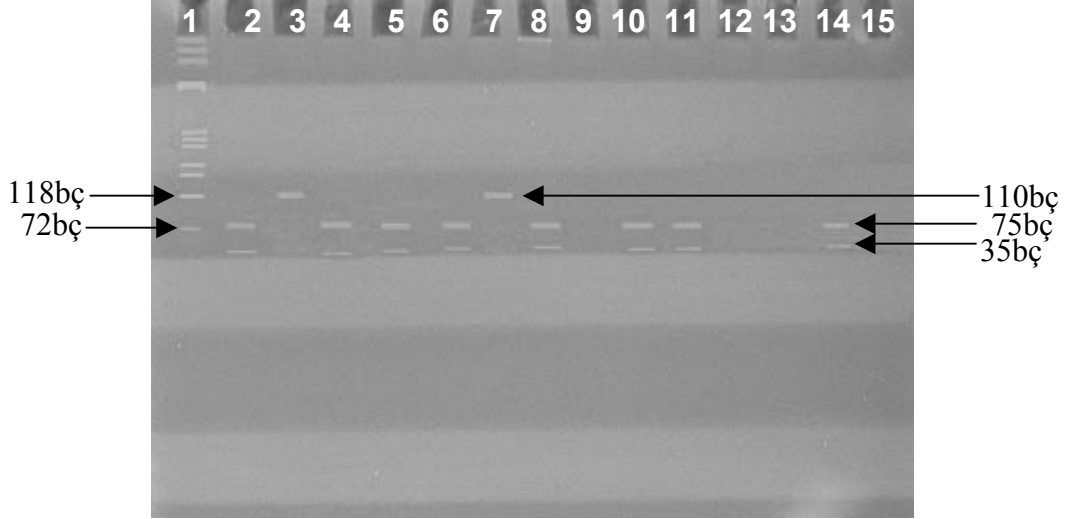
Şekil 3.3. Agaroz jel 5. ekson enzim kesim görüntüleri.

- | | | |
|----------------------|-------------|-------------|
| 1. Kuyu : Marker DNA | 5. Kuyu: 10 | 8. Kuyu: 8 |
| 2. Kuyu: 3 | 6. Kuyu: 11 | 9. Kuyu: 12 |
| 3. Kuyu: 5 | 7. Kuyu: 9 | 10. Kuyu: 7 |
| 4. Kuyu: 4 | | |

7. ekson amplifikasyon ürünlerinin mutasyonun olması halinde bu ekson için kullanılan HaeIII enziminin tanıdığı bölgenin ortadan kalkması ile kesim gerçekleşmediğinden agaroz jelde 110 baz çifti uzunluğunda tek bir bant görülecektir. Mutasyon olmaması durumunda enzim 175. kodonda bulunan tanıma bölgesinde kesim gerçekleştireceğinden, jelde 75 ve 35 baz çifti uzunluğunda 2 bant görülecektir.

Çalışmamızda 7. ekson için uygulanan enzim kesimi sonucunda 17, 18, 20 ve 22 nolu olgulara ait örneklerin poliakrilamid jel elektroforezi sonucunda 110 baz çifti uzunluğunda tek bir bant görüldü. 7, 8, 9, 12, 13, 14, ve 16 nolu olgulara ait örneklerin poliakrilamid jel elektroforezi sonucunda bu örneklerde

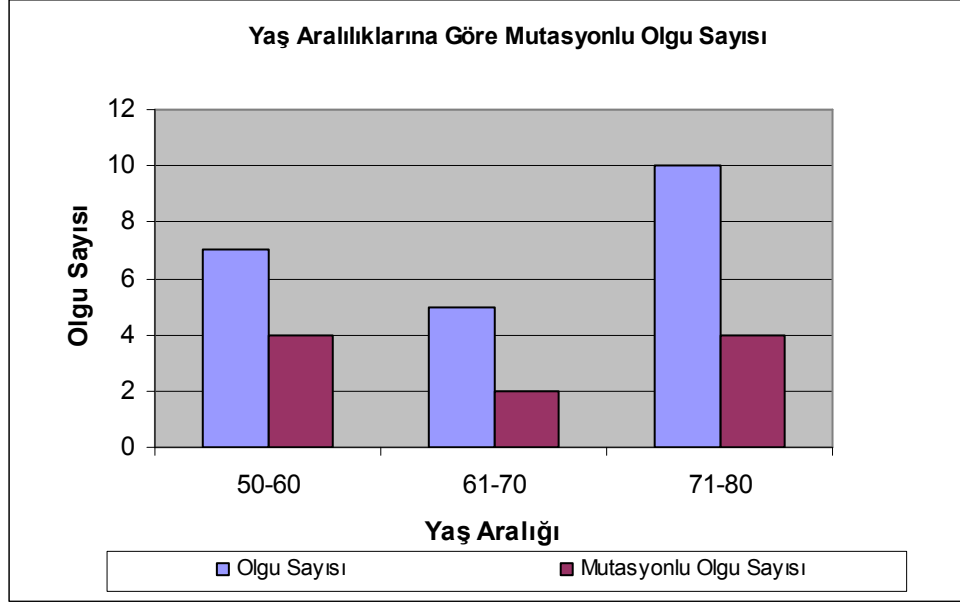
PCR amplifikasyonu gerçekleşmediği için hiç bant görülmedi. Yedinci ekson için enzim kesim görüntüleri Şekil 3.4.'de verildi.



Şekil 3.4. Poliakrilamid jel 7. ekson enzim kesim görüntüleri.

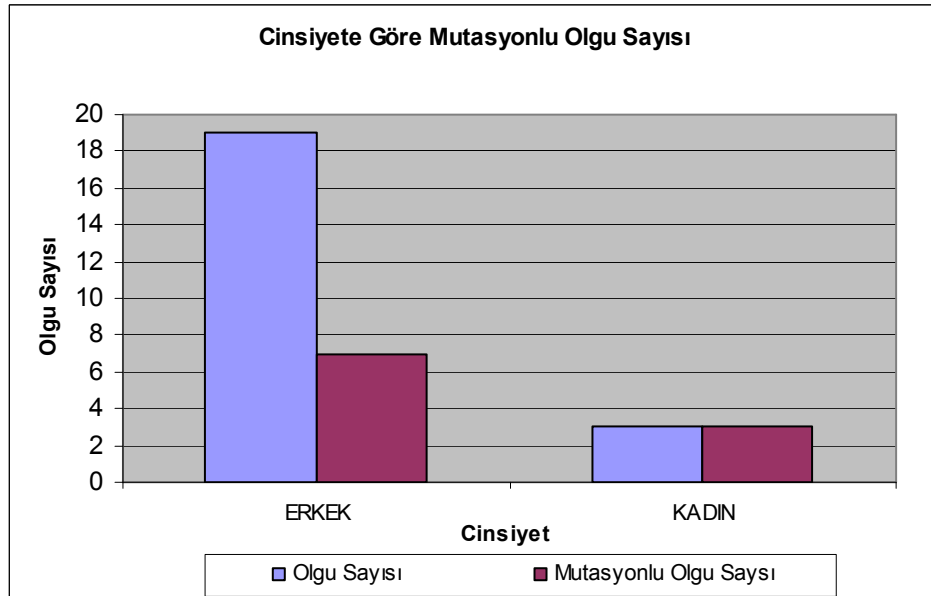
- | | | |
|----------------------|-------------|--------------|
| 1. Kuyu : Marker DNA | 6. Kuyu: 2 | 11. Kuyu: 5 |
| 2. Kuyu: 1 | 7. Kuyu: 22 | 12. Kuyu: 8 |
| 3. Kuyu: 17 | 8. Kuyu: 3 | 13. Kuyu: 9 |
| 4. Kuyu: 19 | 9. Kuyu: 7 | 14. Kuyu: 10 |
| 5. Kuyu: 21 | 10. Kuyu: 6 | |

Yaş aralığına göre olgu sayısı ve mutasyonlu olgu sayıları karşılaştırıldığında; en fazla olgunun 51-60 yaş aralığında görülmesine rağmen mutasyonlu olgu sayısı en fazla 71-80 yaş aralığında görüldü. Bu yaş aralığındaki mutasyon yüzdesi %45,5 idi. Bu değerler Grafik 3.1.'de verildi.



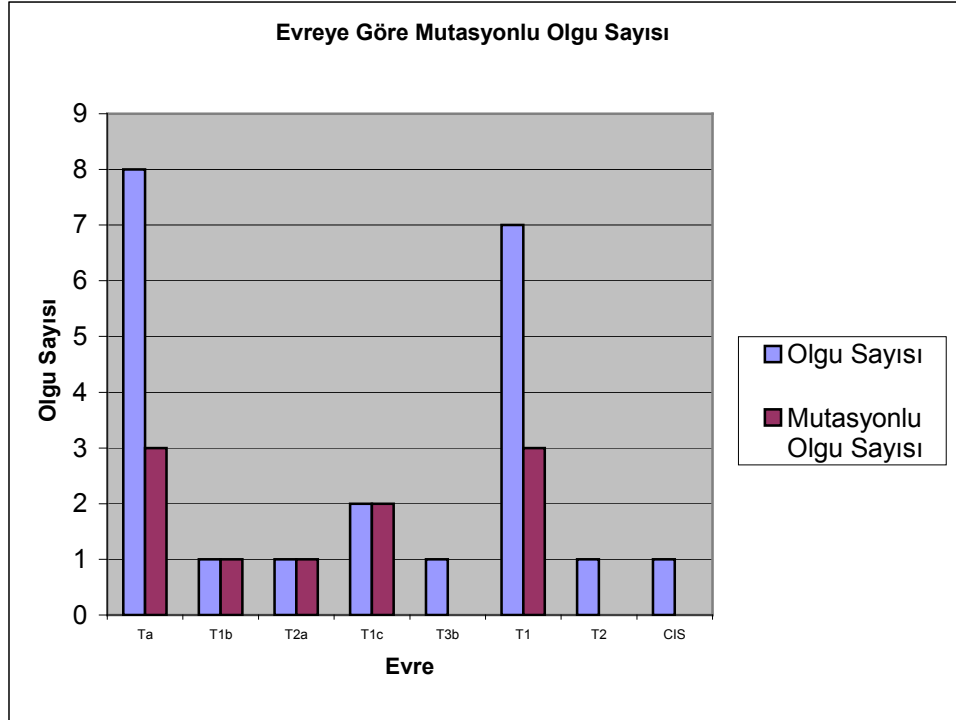
Grafik 3.1. Yaş aralıklarına göre mutasyonlu olgu sayısı.

Mesane kanserli olguların büyük bölümünü erkekler oluşturur. Cinsiyete göre mutasyonlu olgu sayısı, toplam mutasyonlu olgu sayısı ile karşılaştırıldığında erkeklerdeki mutasyon oranının %36,8, kadınlardaki oran ise %100 olduğu görüldü. Bu değerler Grafik 3.2' de gösterildi.



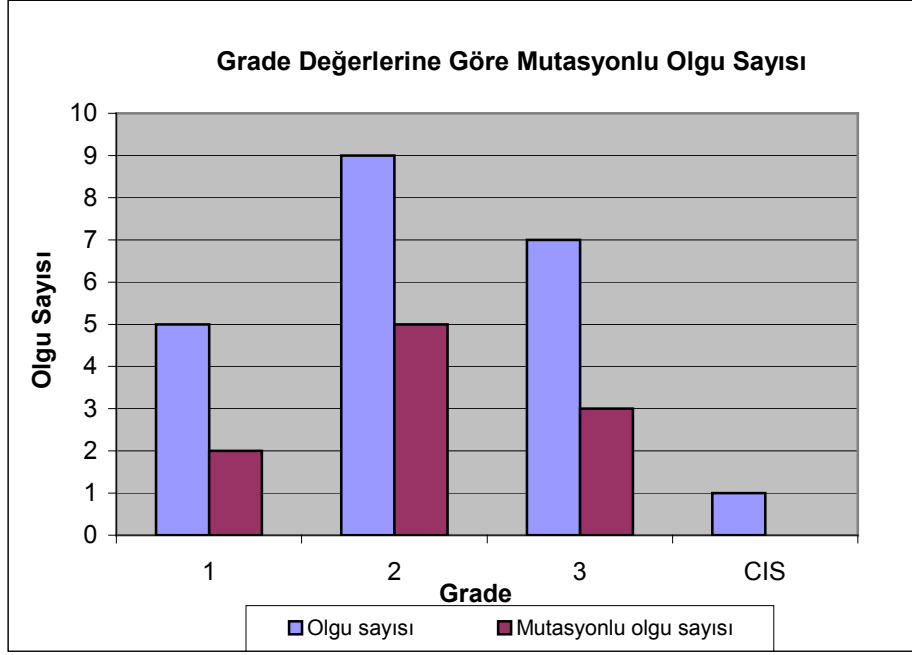
Grafik 3.2. Cinsiyete göre mutasyonlu olgu sayısı.

Çalışılan mesane kanserli olguların tümör evrelerinin değerlendirilmesi için, evreye göre mutasyon sayısı, mutasyonlu olgu sayısı ile karşılaştırıldığında mutasyonlu olgu sayısının en yüksek olduğu tümörler sırasıyla, Ta ve T1 evreli tümörlerdi. Ta evreli tümörlerin mutasyon oranı %37,5 iken, T1 evreli tümörlerin mutasyon oranı %42,9 olarak saptandı. Bu değerler Grafik 3.3' de gösterildi.



Grafik 3.3. Evreye göre mutasyonlu olgu sayısı.

Kanser tanısı alan bir olgunun tümör derecesi (grade) hastalığın prognozu açısından önemlidir. Çalışılan olgular bu açıdan değerlendirildiğinde toplam olgu ve mutasyonlu olgu sayısının en yüksek olduğu tümörler grade 2 tümörler idi. Mutasyon görülme yüzdesine bakıldığında ise %55,6 ile yine grade 2 en yüksek orana sahipti. Bu değerlendirmeler Grafik 3.4. de verildi.



Grafik 3.4. Grade değerlerine göre mutasyonlu olgu sayısı.

4. TARTIŞMA

Vücutta her organ, milyonlarca hücreden oluşmuştur. Hücreler , yaşlı veya hasarlı hücrelerin yerine yenilerinin geçebilmesi için sürekli olarak bölünürler. Bu sebeple sürekli bir “hücre döngüsü” söz konusudur. Hücre döngüsü, organların fonksiyonelliğinin devamı açısından çok önemlidir. Eğer bir organda bulunan bir hücre, hatalı olarak bölünmeye devam ederse, anormal bir gelişme yani tümör oluşacaktır. Oluşan bu tümör, invazyon potansiyeli kazanarak “kanser” hastalığına dönüşebilir. Kanser, birden çok genetik değişikliğin somatik hücrelerde oluşmasıyla ortaya çıkan bir hastalıktır. İnvazif bir kanseri tanımlarken, tümör derecesini anlamak çok önemlidir. Anormal davranan hücreler, kaynak aldıkları normal hücreler gibi görünebilir veya görünmeyebilirler. Örneğin mesane kanserlerinin %90’dan fazlasını oluşturan ve transisyonel epitelyumdan kaynaklanan TCC’de, düşük grade TCC oluşturan hücreler, etraflarındaki normal transisyonel epitelyuma oldukça benzer bir görünüm sergilerlerken, invaze olan kanser transisyonel hücreleri farklı görünümündedir. Aslında, bu hücrelerin davranışları oldukça normal olan görünüşleriyle çelişmektedir. Diğer yandan, yüksek dereceli TCC, normal görünümlü ilk halinden, mikroskopik olarak çok farklıdır. Gerçekte, yüksek dereceli bir tümör, normal doku tipine hiç benzerlik göstermez (9).

Mesane kanserine neden olan bazı risk faktörlerinin, gözlenen mutasyonların yerini, sıklığını ve türünü etkilediği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Örneğin yapılan bir çalışmada, mesane kanserli sigara içen olgularda saptanan p53 mutasyonu, 273. kodonda %12 olarak saptanırken, sigara içmeyenlerde bu mutasyon gözlenmemiştir (105). Phenacetin veya phenacetinin derivatlarından biri gibi analjezikleri yirmi yıldan daha uzun süredir kullanan kadınlar ürotelyal kanser geliştirme riskine sahiptirler (15, 16). Bu durum maruz kalınan risk faktörlerinin, maruz kalma süresi ve

cinsiyete bağılı olarak mutasyon oluşturma durumunda değişiklik yapabileceğini akla getirmektedir.

p53 mutasyonlarının yaklaşık %87'si 5-8. exonlarda ve %75'i G:C çiftlerinde oluşurken, mutasyon tiplerinin frekansı kanser türüne özgüdür (106). Ayrıca başka bir yayında p53 genindeki mutasyonların %28 kadarının evrimsel olarak korunmuş olan 5-8. eksonların dışındaki eksonlarda olduğu bildirilmiştir (107).

Yapılan çalışmalar incelendiğinde mesane kenserinde p53 geninin 8. eksonunda bulunan mutasyonların bütün p53 mutasyonları içinde %40-57 arasında orana sahip olduğu gözlenmiştir (107, 108).

Yine literatürde p53 geninin 5. eksonunda gözlenen mutasyon sıklığının %14-32 olduğu gözlenmiştir (30, 109-111). Bu çalışmada p53 geninin 5. eksonunda saptanan mutasyon oranı ise %27'dir. Elde edilen bu oran literatürle uyumludur.

Yapılan çalışmalarda p53 geninin 7.eksonunda gözlenen mutasyon sıklığının %5,25-44,5 olduğu gözlenmiştir (30, 109-111). Bu çalışmada p53 geninin 7. eksonunda saptanan mutasyon oranı ise %36'dır. Elde edilen bu sonuç literatürle uyumlu olmakla birlikte, 7. ekson için kurulan PCR sunucunda, olgulara ait DNA örneklerinin hepsinde amplifikasyon elde edilemediği göz önünde bulundurulursa bazı çalışmalara göre yüksek bulunabilecek olan bu oranın normal olduğu düşünülebilir.

p53 geni yaklaşık olarak mesane tümörlerinin %40'ında mutasyona uğramıştır (105). Bununla birlikte, Lin ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada çalışmaya dahil edilen TCC'li olguların %67'sinde p53 mutasyonları saptanmıştır (112). Bu çalışmada ise toplam 22 olgunun 10'unda olmak üzere %45'lik p53 geni mutasyonu gözlenmiştir. Elde edilen bu sonuç literatürle uyum göstermektedir.

Çalışmaya dahil edilen 22 olgunun 19'unun erkek 3'ünün kadın olması, mesane kanserinin erkeklerde görülme oranının kadınlara göre daha yüksek olduğunu doğrular niteliktedir. Nitekim Lin ve arkadaşlarının yaptığı 11 yıllık çalışma sonucu, çalışmaya dahil ettikleri 75 olgunun 54 erkek, 21 kadından oluşması bu yönde paralellik göstermektedir (112). Çalışılan 19

erkek olguda gözlenen p53 mutasyon oranı %36,8 iken 3 kadın olguda %100 olarak saptanmıştır. Bu sonuç çalışmaya dahil edilebilen olgu sayısının az oluşu ve kadın olguların normal insidanstan daha az oluşuna bağlanabilir (Grafik 3.2).

Mesane tümörlerinin ortalama görülme yaşı 65 olmakla birlikte, 60 yaşından sonra görülme sıklığı artmaktadır (8). Bu çalışmaya dahil olan olguların ortalama yaşı 66,6 olup, olguların %68'i 60 yaşın üzerindedir. 50-60 yaş aralığındaki olgularda saptanan p53 mutasyon oranı %57, 61-70 yaş aralığındaki olgularda saptanan p53 mutasyon oranı %40, 71-80 yaş aralığındaki olgularda saptanan p53 mutasyon oranı ise %40 olarak bulunmuştur (Grafik 3.1).

Lorenzo Romero ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, mesane kanserindeki p53 mutasyon sıklığının en yüksek olarak grade 2 ve grade 3 tümörlerde olduğunu tespit etmişlerdir (113). Bu çalışmada ise grade 2 ve grade 3 tümörlerde saptadığımız mutasyon oranı %80 olmak üzere, Lorenzo Romero ve arkadaşlarının ulaştığı sonuçla paralellik göstermektedir (Grafik 3.4).

Literatürde, mesane kanserinde, mutasyon sayısı ile, tümör invazyon artışı ve evre arasında bir korelasyon söz konusudur (114-116). Lorenzo Romero ve arkadaşlarının çeşitli tümör tipleriyle yaptıkları çalışmada Ta evre tümörlerde %30,3, T2 evre tümörlerde ise %63,2 oranında, yine aynı grubun yüzeyel tümörlerde yaptığı başka bir çalışmada ise T1 evre tümörlerde yüksek oranda mutasyon saptanmıştır (113, 116).

LaRue ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada mesane kanserinde mutasyonların %68,8'i T1 evre tümörlerde, %31,3'ü Ta evre tümörlerde gözlenmiştir (106).

Bu çalışmada ise en yüksek mutasyon oranını T1 (% 42,9) ve Ta (%37,7) evre tümörler göstermektedir. Diğer tümör evrelerine sahip örneklerin sayısı, % oranı hesaplamak için yetersizdir. Tümör evrelerine göre saptanan mutasyon sıklığı literatürle uyumludur (Grafik 3.3).

p53 mutasyonlarının mesane kanserinde insidansının yüksek oluşu ve patogenezinin erken oluşması, p53 mutasyonlarının hastalığın kliniğinin

belirlenmesi ve tedavinin yönlendirilmesinde faydalı bir prognostik faktör olabileceği görüőünü desteklemektedir.

5. SONUÇ

Mesane kanserine neden olan genetik değişimlerin başında, bu kanserde en çok mutasyona uğrayan tümör supresör gen olma özelliğini de taşıyan p53 geni gelmektedir. Çalışmamızda mesane kanserli olgularda tespit ettiğimiz p53 geni mutasyon oranı, bu özelliği doğrular niteliktedir. İnsanlarda oluşan kanserlerin yaklaşık olarak yarısında p53 mutasyonları oluşması, özellikle de mesane kanserinde bu oluşumun erken dönemde gerçekleşmesi, kliniğe, hastalığın prognozunun tahmini konusunda yardımcı olacaktır.

p53 mutasyonlarının bir prognostik faktör olarak mesane kanseri prognozunun saptanmasına yardımcı olmasıyla, metastaz ve hastalığın tekrar edebilme riski ve tedaviye olumlu yanıt verme konusunda bilgi sahibi olunabilecektir.

KAYNAKLAR

1. Levine A.J. (1997) p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* **88(3)**, 323-331.
2. Hollstein M., Rice K., Greenblatt M.S., et al. (1994) Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res* **22(17)**, 3551-3555.
3. DeWolf W.C. (1995) p53: an important key to understanding urologic cancer. *AUA Update Series* **15**, 258.
4. Vet J. A., Witjes J. A., Marras S. A., et al. (1996) Predictive value of p53 mutations analyzed in bladder washings for progression of high-risk superficial bladder cancer. *Clin Cancer Res.* **2(6)**, 1055-1061.
5. Zlotta A. R., Noel J.-C., Fayt I., et al (1999) Correlation and prognostic significance of p53, p21^{WAF1/CIP1} and Ki-67 expression in patients with superficial bladder tumors treated with bacillus Calmette-Guerin intravesical therapy. *J Urol.* **161(3)**, 792-798.
6. Fleshner N., Kapusta L., Ezer, D., Herschorn S., Klotz L. (2000) p53 nuclear accumulation is not associated with decreased disease-free survival in patients with node positive transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol.* **164(4)**, 1177-1182.
7. Borden L.S. Jr., Clark P.E., Hall, M.C. (2003) Bladder cancer (Genitourinary system). *Curr Opin Oncol* **15(3)**, 227-233.
8. http://www.akdeniz.edu.tr/tip/web/ders_form/UROLOJI/baykara_mesane.htm
9. <http://cornellurology.com/cornell/bladder/gi/cancer.shtml>
10. <http://tip.erciyes.edu.tr/anabil/uroloji/ders%20notlari.htm>
11. Silverman D.T., Hartge P., Morrison A.S., et al. (1992) Epidemiology of bladder cancer (Review). *Hematol Oncol Clin North Am* **6(1)**, 1-30.
12. Hartge P., Harvey E.B., Linehan M.W., et al. (1990) Unexplained excess risk of bladder cancer in men. *J Natl Cancer Inst* **82(20)**, 1636–1640.

13. Augustine A., Hebert J.R., Kabat G.C., et al. (1988) Bladder cancer in relation to cigarette smoking. *Cancer Res* **48(15)**, 4405-4408.
14. Burch J.D., Rohan T.E., Howe G.R., et al. (1989) Risk of bladder cancer by source and type of tobacco exposure: a case-control study. *Int J Cancer* **44(4)**, 622-628.
15. McCredie M., Stewart J.H., Ford J.M., et al. (1983) Phenacetin-containing analgesics and cancer of the bladder or renal pelvis in women. *Br J Urol* **55(2)**, 220-224.
16. Piper J.M., Tonocia J., Matanoski G.M. (1985) Heavy phenacetin use and bladder cancer in women aged 20 to 49 years. *N Engl J Med* **313(5)**, 292-295.
17. Tawfik H.N. (1987) Carcinoma of the urinary bladder associated with schistosomiasis in Egypt: The possible causal relationship. *Princess Takamatsu Symp* **18**, 197-209.
18. Kantor A.F., Hartge P., Hoover R.N., et al. (1984) Urinary tract infection and risk of bladder cancer. *Am J Epidemiol* **119(4)**, 510-515.
19. Hartge P., Hoover R.N., West P.W., et al. (1983) Coffee drinking and risk of bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* **70(6)**, 1021-1026.
20. Risch H.A., Burch J.D., Miller A.B., et al. (1988) Dietary factors and the incidence of cancer of the urinary bladder. *Am J Epidemiol* **126(6)**, 1179-1191.
21. Kantor A.F., Hartge P., Hoover R.N., et al. (1985) Familial and environmental interaction in bladder cancer risk. *Int J Cancer* **35(6)**, 703-706.
22. Miyao N., Tsai Y.C., Lerner S.P., et al. (1993) Role of chromosome 9 in human bladder cancer. *Cancer Res* **53(17)**, 4066-4070.
23. Orlow I., Lianes P., Lacombe L., et al. (1994) Chromosome 9 allelic losses and microsatellite alterations in human bladder tumors. *Cancer Res* **54(11)**, 2848-2851.

24. Waldman F.M., Carroll P.R., Kerschmann R., et al. (1991) Centromeric copy number of chromosome 7 is strongly correlated with tumor grade and labeling index in human bladder cancer. *Cancer Res* **51(14)**, 3807-3813.
25. Presti J.C. Jr., Reuter V.E., Galan T., et al. (1991) Molecular genetic alterations in superficial and locally advanced human bladder cancer. *Cancer Res* **51(19)**, 5405-5409.
26. Sato K., Moriyama M., Mori S., et al. (1992) An immunohistologic evaluation of c-erbB-2 gene product in patients with urinary bladder carcinoma. *Cancer* **70(10)**, 2493-2498.
27. Coombs L.M., Pigott D.A., Sweeney E., et al. (1991) Amplification and overexpression of c-erbB-2 in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Br J Cancer* **63(4)**, 601-608.
28. Knowles M.A., Williamson M. (1993) Mutation of H-ras is infrequent in bladder cancer: confirmation by single-strand conformation polymorphism analysis, designed restriction fragment length polymorphisms, and direct sequencing. *Cancer Res* **53(1)**, 133-139.
29. Agnantis N.J., Constantinidou A., Poullos C., et al. (1990) Immunohistochemical study of the ras oncogene expression in human bladder endoscopy specimens. *Eur J Surg Oncol* **16(2)**, 153-160.
30. Sidransky D., von Eschenbach A., Tsai Y.C., et al. (1991) Identification of p53 gene mutations in bladder cancers and urine samples. *Science* **252(5006)**, 706-709.
31. Cordon-Cardo C., Dalbagni G., Saez G.I., et al. (1994) p53 mutations in human bladder cancer: genotypic versus phenotypic patterns. *Int J Cancer* **56(3)**, 347-353.
32. Esrig D.E., Elamjian D., Groshen S., et al. (1994) Accumulation of nuclear p53 and tumor progression in bladder cancer. *N Engl J Med* **331(19)**, 1259-1264.

33. Spruck C.H. III., Ohneseit P.F., Gonzalez-Zulueta M., et al. (1994) Two molecular pathways to transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer Res* **54(3)**, 784-788.
34. Cairns P, Proctor AJ, Knowles MA. (1991) Loss of heterozygosity at the Rb locus is frequent and correlates with muscle invasion in bladder carcinoma. *Oncogene* **6(12)**, 2305-2309.
35. <http://cornellurology.com/uro/cornell/bladder/causes>
36. <http://cornellurology.com/cornell/bladder/gi/types.shtml>
37. Mostofi F.A., Sobin L.H., Torloni M. (1973) Histological typing of urinary bladder tumor, in International Histological Classification of Tumor, No. 10. *Geneva, World Health Organization*.
38. Lieskovsky G. (1983) The staging and classification of bladder cancer and the management of superficial disease. In: Skinner G. (eds) *Urological Cancer. Grune & Stratton, New York*.
39. http://www.wfurology.org/tnm.html#urinary_bladder
40. <http://www.urologyhealth.org/adult/index.cfm?cat=03&topic=37&drawings=yes>
41. <http://www.ensembl.org>
42. http://p53.free.fr/p53_Info/p53_Story_1.html
43. Chang C., Simmons D.T., Martin M.A., Mora P.T. (1979) Identification and partial characterization of new antigens from simian virus 40-transformed mouse cells. *J Virol* **31(2)**, 463-471.
44. Kress M., May E., Cassingena R., May P. (1979) Simian Virus 40-transformed cells express new species of proteins precipitable by anti-simian virus 40 tumor serum. *J Virol* **31(2)**, 472-483.
45. Lane D.P., Crawford L.V. (1979) T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* **278(5701)**, 261-263.

46. Linzer D.I.H., Levine A.J. (1979) Characterization of a 54 K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* **17(1)**, 43-52.
47. Melero J.A., Stitt D.T., Mangel W.F., Carroll R.B. (1979) Identification of new polypeptide species (48-55K) immunoprecipitable by antiserum to purified large T antigen and present in simian virus 40-infected and -transformed cells. *Virology* **93(2)**, 466-480.
48. De Leo A.B., Jay G., Appella E., Dubois G.C., Law L.W., Old L.J. (1979) Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**, 2420-2424.
49. Crawford L.V., Pim D.C. and Bulbrook R.D. (1982) Detection of antibodies against the cellular protein p53 in sera from patients with breast cancer. *Int J Cancer* **30(4)**, 403-408.
50. Caron de Fromentel C., May-Levin F., Mouriesse H., Lemerle J., Chandrasekaran K., May P. (1987) Presence of circulating antibodies against cellular protein p53 in a notable proportion of children with B-cell lymphoma. *Int J Cancer* **39(2)**, 185-189.
51. Reich N.C., Levine A.J. (1984) Growth regulation of a cellular tumour antigen, p53, in nontransformed cells. *Nature* **308(5955)**, 199-201.
52. Milner J., McCornick F. (1980) Lymphocyte stimulation: concanavalin A induces the expression of a 53K protein. *Cell Biol Int Rep* **4(7)**, 663-667.
53. Mercer W.E., Avignolo C., Baserga R. (1984) Role of the p53 protein in cell proliferation as studied by microinjection of monoclonal antibodies. *Mol Cell Biol* **4(2)**, 276-281.
54. Mercer W.E., Nelson D., DeLeo A.B., Old J., Baserga R. (1982) Microinjection of monoclonal antibody to protein p53 inhibits serum-induced DNA synthesis in 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **79(20)**, 6309-6312.
55. Deppert W., Buschhausendenker G., Patschinsky T., Steinmeyer K. (1990) Cell cycle control of p53 in normal (3T3) and chemically

- transformed (Meth-A) mouse cells .II. Requirement for cell cycle progression. *Oncogene* **5(11)**, 1701-1706.
56. Steinmeyer K., Maacke H., Deppert W. (1990) Cell cycle control by p53 in normal (3T3) and chemically transformed (Meth-A) mouse cells .I. Regulation of p53 expression. *Oncogene* **5(11)**, 1691-1699.
57. Eliyahu D., Raz A., Gruss P., Givol D., Oren M. (1984) Participation of p53 cellular tumour antigen in transformation of normal embryonic cells. *Nature* **312(5995)**, 646-649.
58. Jenkins J.R., Rudge K. Currie G.A. (1984) Cellular immortalization by a cDNA clone encoding the transformation-associated phosphoprotein p53. *Nature* **312(5995)**, 651-654.
59. Parada L.F., Land H., Weinberg R.A., Wolf D., Rotter W. (1984) Cooperation between gene encoding p53 tumour antigen and ras in cellular transformation. *Nature* **312**, 649-651.
60. Jenkins J.R., Rudge K., Chumakov P., Currie G.A. (1985) The cellular oncogene p53 can be activated by mutagenesis. *Nature* **317**, 816-818.
61. Mowat M., Cheng A., Kimura N., Bernstein A., Benchimol S. (1985) Rearrangements of the cellular p53 gene in erythroleukaemic cells transformed by Friend virus. *Nature* **314**, 633-636.
62. Finlay C.A., Hinds P.W., Tan T.H., Eliyahu D., Oren M., Levine A.J. (1988) Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms an hsc70-p53 complex with an altered half life. *J Virol.* **8**, 531-539.
63. Soussi T., Caron de Fromentel C., May P. (1990) Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution. *Oncogene* **5**, 945-952.
64. Soussi T., Caron de Fromentel C., Méchali M., May P., Kress M. (1987) Cloning and characterization of a cDNA from *Xenopus laevis* coding for a protein homologous to human and murine p53. *Oncogene* **1**, 71-78.
65. Eliyahu D., Michalovitz D., Eliyahu S., Pinhasikimhi O., Oren M. (1989) Wild-Type p53 can inhibit oncogene-mediated focus formation. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**, 8763-8767.

66. Finlay C.A., Hinds P.W., Levine A.J. (1989) The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* **57**, 1083-1093.
67. Vogelstein B., Fearon E.R., Hamilton S.R., et al. (1988) Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* **319**, 525-532.
68. Lavigueur A., Maltby V., Mock D., Rossant J., Pawson T., Bernstein A. (1989) High incidence of lung, bone, and lymphoid tumors in transgenic mice overexpressing mutant alleles of the p53 oncogene. *Mol Cell Biol* **9**, 3982-3991.
69. Malkin D., Li F.P., Strong L.C., et al. (1990) Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* **250**, 1233-1238.
70. Srivastava S., Zou Z.Q., Pirolo K., Blattner W., Chang E.H. (1990) Germ-line transmission of a mutated p53 gene in a cancer-prone family with li-fraumeni syndrome. *Nature* **348**, 747-749.
71. Milner J., Medcalf E.A. (1991) Cotranslation of activated mutant p53 with wild type drives the wild-type p53 protein into the mutant conformation. *Cell* **65**, 765-774.
72. Halevy O., Michalovitz D., Oren M. (1990) Different tumor-derived p53 mutants exhibit distinct biological activities. *Science* **250**, 113-116.
73. Michalovitz D., Halevy O., Oren M. (1991) p53 mutations - gains or losses. *J Cell Biochem* **45**, 22-29.
74. Smith N.D., Rubenstein J.N., Eggener S.E., et al. (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.
75. Prokocimer M, Rotter V. (1994) Structure and function of p53 in normal cells and their aberrations in cancer cells: projection on the hematologic cell lineages (Review). *Blood* **84(8)**, 2391-2411.
76. http://p53.free.fr/p53_Info/gene/p53GENE.html
77. Vousden K.H., Lu X. (2002) Live or let die: the cell's response to p53 (Review). *Nat Rev Cancer* **2(8)**, 594-604.

78. Oren M. (2003) Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death Differ* **10(4)**, 431–442.
79. Soussi T., Lozano G. (2005) p53 mutation heterogeneity in cancer (Review). *Biochem Biophys Res Commun* **331(3)**, 834-842.
80. Ko L. J., Prives C. (1996) p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev* **10(9)**, 1054-1072.
81. http://p53.free.fr/p53_Info/p53PROT.html
82. Cadwell C., Zambetti G.P. (2001) The effects of wild-type p53 tumor suppressor activity and mutant p53 gain-of-function on cell growth (Review). *Gene* **277**, 15-30.
83. <http://www.bimcore.emory.edu/home/Kins/CHEM441/Gabe/p53/text1.html#VI>
84. Guidos C.J., Williams C.J., Grandal I., Knowles G., Huang M.T., Danska J.S. (1996) V(D)J recombination activates a p53-dependent DNA damage checkpoint in scid lymphocyte precursors. *Genes Dev* **10(16)**, 2038-2054.
85. Linke S.P., Clarkin K.C., DiLeonardo A., Tsou A., Wahl G. M. (1996) A reversible, p53-dependent G0/G1 cell cycle arrest induced by ribonucleotide depletion in the absence of detectable DNA damage. *Genes Dev* **10(8)**, 934-947.
86. Gottlieb T.M., Oren M. (1996) p53 in growth control and neoplasia. *Biochim Biophys Acta* **1287(2-3)**, 77-102.
87. Lowe S.W., Schmitt E.M., Smith S.W., Osborne B.A. Jacks T. (1993) p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* **362(6423)**, 847-849.
88. Wagner A.J., Kokontis J.M., Hay N. (1994) Myc-mediated apoptosis requires wild-type p53 in a manner independent of cell cycle arrest and the ability of p53 to induce p21waf1/cip1. *Genes Dev* **8(23)**, 2817-2830.
89. Yonish-Rouach E., Resnitzky D., Lotem J., Sachs L., Kimchi A., Oren M. (1991) Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* **352(6333)**, 345-347.
90. Johnson P., Chung S., Benchimol S. (1993) Growth suppression of Friend virus-transformed erythroleukemia cells by p53 protein is accompanied by

- hemoglobin production and is sensitive to erythropoietin. *Mol Cell Biol* **13(3)**, 1456-1463.
91. Maheswaran S., Englert C., Bennett P., Heinrich G., Haber D. A. (1995) The WT1 gene product stabilizes p53 and inhibits p53-mediated apoptosis. *Genes Dev* **9(17)**, 2143-2156.
 92. Fukasawa K., Choi T., Kuriyama R., Rulong S., Vande Woude G.F. (1996) Abnormal centrosome amplification in the absence of p53. *Science* **271(5256)**, 1744-1747.
 93. Cross S. M., Sanchez C. A., Morgan C. A., et al. (1995) A p53-dependent mouse spindle checkpoint. *Science* **267(5202)**, 1353-1356.
 94. Bouck N. (1996) p53 and angiogenesis. *Biochim Biophys Acta* **1287(1)**, 63-66.
 95. Volpert O. V., Stellmach V., Bouck N. (1995) The modulation of thrombospondin and other naturally occurring inhibitors of angiogenesis during tumor progression (Review). *Breast Cancer Res Treat* **36(2)**, 119-126.
 96. Dameron K. M., Volpert O. V., Tainsky M. A., Bouck N. (1994) Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science* **265(5178)**, 1582-1584.
 97. Cetin-Atalay R., Ozturk M. (2000) p53 mutations as fingerprints of environmental carcinogens. *Pure Appl Chem* **72(6)**, 995-999.
 98. Cho Y., Gorina S., Jeffrey P.D., Pavletich N.P. (1994) Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science* **265(5170)**, 346-355.
 99. Wong K.B., DeDecker B.S., Freund S.M., Proctor M.R., Bycroft M., Fersht A.R. (1999). Hot-spot mutants of p53 core domain evince characteristic local structural changes. *Proc Natl Acad Sci USA* **96(15)**, 8438-8442.
 100. Soussi T., Beroud C. (2003) Significance of TP53 mutations in human cancer: a critical analysis of mutations at CpG dinucleotides. *Hum Mutat* **21(3)**, 192-200.
 101. Dittmer D., Pati S., Zambetti G., et al. (1993) Gain of function mutations in p53. *Nat Genet* **4(1)**, 42-46.

102. Milner J. (1995) Flexibility: the key to p53 function? *Trends Biochem Sci* **20(2)**, 49–51.
103. http://p53.free.fr/Database/Mutation_Analysis/p53_databaseBLADDER.html
104. Shiao YH, Rugge M, Correa P, Lehmann HP, Scheer WD. (1994) p53 alteration in gastric precancerous lesions. *Am J Pathol* **144(3)**, 511-517.
105. Moore L.E., Smith A.H., Eng C. et al. (2003) p53 alterations in bladder tumors from arsenic and tobacco exposed patients. *Carcinogenesis* **24(11)**, 1785-1791.
106. LaRue H., Allard P., Simoneau M., et al. (2000) p53 point mutations in initial superficial bladder cancer occur only in tumors from current or recent cigarette smokers. *Carcinogenesis* **21(1)**, 101-106.
107. Greenblatt M.S., Bennett W.P., Hollstein M., Harris C.C. (1994) Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis (Review). *Cancer Res* **54(18)**, 4855-4878.
108. Kuczyk M,A,, Serth J,, Hervatin C., et al. (1994) Detection of P53 tumor-suppressor-gene protein in bladder tumors and prostate cancer: possible clinical implications. *World J Urol* **12(6)**, 345-351.
109. Yoshimura I., Kudoh J., Saito S., Tazaki H., Shimizu N. (1995) p53 gene mutation in recurrent superficial bladder cancer. *J Urol* **153(5)**, 1711-1715.
110. Taylor J.A., Li Y., He M., et al. (1996) p53 mutations in bladder tumors from arylamine-exposed workers. *Cancer Res* **56(2)**, 294-298.
111. Xu X., Stower M.J., Reid I.N., Garner R.C., Burns P.A. (1996) Molecular screening of multifocal transitional cell carcinoma of the bladder using p53 mutations as biomarkers. *Clin Cancer Res* **(10)**, 1795-1800.
112. Lin H.Y., Huang C.H., Wu W.J., Chou Y.H., Fan P.L., Lung F.W. (2005) Mutation of the p53 tumor suppressor gene in transitional cell carcinoma of the urinary tract in Taiwan. *Kaohsiung J Med Sci* **21(2)**, 57-64.

113. Lorenzo Romero J.G., Salinas Sanchez A.S., Gimenez Bachs J.M. (2004) p53 Gene mutations in superficial bladder cancer. *Urol Int* **73(3)**, 212-218.
114. Oyasu R., Nan L., Szumel R.C., Kawamata H., Hirohashi S. (1995) p53 gene mutations in human urothelial carcinomas: analysis by immunohistochemistry and single-strand conformation polymorphism. *Mod Pathol* **8(2)**, 170-176.
115. Phillips H.A., Howard G.C., Miller W.R. (2000) p53 mutations as a marker of malignancy in bladder washing samples from patients with bladder cancer. *Br J Cancer* **82(1)**, 136-41.
116. Lorenzo Romero J.G., Salinas-Sanchez A.S., Gimenez-Bachs J.M. et al. (2003) Prognostic implications of p53 gene mutations in bladder tumors. *J Urol* **169(2)**, 492-499.