

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

MESANE KANSERLİ OLGULARIN MESANE YIKAMA
SIVILARINDA MOLEKÜLER MARKERLARIN FISH YÖNTEMİ
İLE İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

EBRU ERZURUMLUOĞLU

DANIŞMAN

PROF. DR. SEVİLHAN ARTAN

OCAK 2012

KABUL VE ONAY SAYFASI

Ebru ERZURUMLUOĞLU' nun Yüksek Lisans Tezi olarak hazırladığı “Mesane Kanserli Olguların Mesane Yıkama Sıvılarında Moleküler Markerların FISH Yöntemi İle İncelenmesi” başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirilerek “KABUL” edilmiştir.

18.01.2012

Üye: Prof.Dr. Sevilhan ARTAN(Danışman)

Üye: Prof.Dr. İrfan DEĞİRMENCI

Üye: Yrd.Doç.Dr. Muhsin ÖZDEMİR

Üye: Yrd.Doç.Dr. Beyhan DURAK ARAS

Üye: Yrd.Doç.Dr. Oğuz ÇİLİNGİR

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 20.01.2012 tarih ve 902/4204 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof.Dr.Kazım ÖZDAMAR
Enstitü Müdürü

ÖZET

Mesane kanseri, gelişmiş ülkelerde genitoüriner sistemde, prostat kanserinden sonra ikinci sıklıkla görülen kanserdir. Gelişmiş ülkelerde, mesane kanserlerinin %90'ından fazlasını ürotelyal orijinli DEK (Değişici Epitel Karsinomu) oluşturur.

Serin/treonin kinaz ailesinin üyesi olan Aurora kinazların hücre bölünmesi sırasında, iğ ipliklerinin oluşumu ve stabilitesi, sentrozom ayrılma ve olgunlaşması, kromozom kondensasyonu, ayrılması ve sitokinezde çeşitli rolleri vardır.

Çalışmamızda AURKA ve AURKB genlerinin mesane kanserindeki değişimlerini incelemek, bu değişiklikleri tümör evre ve derecesiyle ilişkilendirmek ve mesane kanserlerinde progresyon için bir belirteç olup olmadıklarını değerlendirmek amaçlanmıştır.

Çalışmamızda mesane kanseri tanısı almış 28 olgu ve 10 sağlıklı kontrol olgusundan alınan mesane yıkama sıvılarında AURKA ve AURKB genlerine ait değişimler ile CIN (kromozomal düzensizlik) durumu FISH yöntemi ile incelenmiştir.

Olgularımızda, AURKA amplifikasyonlarının yüksek derece tümörler ve CIN ile birlikteliği anlamlı bulunmuştur. AURKA amplifikasyon miktarı patolojik evre ile korelasyon göstermiş fakat istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Ancak çalışmamız sonucunda AURKA gen amplifikasyonlarının mesane kanseri progresyonunda önemli bir rol oynayabileceği ve bu amplifikasyonların mesane kanserli hastalarda prognozunu belirlemede bir marker olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

AURKB genine ait incelemelerde, örneklerin %13'ünde delesyon gözlenmiş, tümör evre ve derecesiyle delesyonlar arasında istatistiksel bir anlam gözlenmemiştir. Ayrıca olgularımızın %20'sinde CEP 17 artışları tespit edilmiştir.

Çalışmamız, Türk toplumunda Aurora kinazların mesane kanseri üzerinde etkisini ortaya koyan ilk çalışmadır. Çalışmamız ve bundan sonraki çalışmaların sonuçları, mesane kanseri ve Aurora Kinazlar arasındaki ilişkinin daha iyi anlaşılmasına, erken tanı ve tedavide yeni yaklaşımlar geliştirilebilmesine katkı sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: Mesane kanseri, AURKA, AURKB, CIN, FISH

SUMMARY

Bladder cancer is the second most frequently diagnosed genitourinary tumor after prostate cancer. In developed countries, >90% of bladder cancers are (Transitional Cell Carcinoma) of urothelial origin.

The Aurora A kinase belongs to serine/threonine group of kinases which are involved in centrosome separation and maturation, spindle assembly and stability, chromosome condensation, congression and segregation, and cytokinesis.

The aim of our study was to investigate alterations of AURKA and AURKB genes; determine relationship between the alteration and tumor grade, stage and to assess their relevance as markers of progression in bladder cancers.

In this study, FISH tests were used to examine AURKA, AURKB gene copy numbers and CIN (chromosomal instability) in bladder washing samples from 28 patients with bladder cancer and 10 healthy control subjects.

As a result of our work, increased copy number of Aurora-A was linked to high grade tumor and CIN. Level of AURKA amplification was correlated with pathological stage but it was not statistically significant. Our study suggests that amplification of AURKA gene may play an important role in the progression of bladder cancer and that AURKA amplification for predicting the prognosis of bladder cancer in patients can be used as a marker.

The results of AURKB gene analysis, deletion was observed in 13% of the samples for this gene. No statistically significant difference could be found between AURKB gene deletion and tumor grade, stage. Additionally, increased signals of CEP17 were found in 20% of cases.

Our study is the first data demonstrating the effect on bladder cancer of Aurora Kinases in Turkish patients. The results of our study and many other studies contribute to the efforts to understand the association between bladder cancer and Aurora Kinases as well as to prospective diagnosis and treatment phases.

Key Words: Bladder Cancer, AURKA, AURKB, CIN, FISH

İÇİNDEKİLER

ÖZET	v
SUMMARY	vi
TABLolar DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
ŞİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1.Mesane Kanseri.....	3
2.1.1. Mesane Kanserinde Etiyoloji, Epidemiyoloji ve Risk Faktörleri.....	3
2.1.2. Mesane Kanseri Patofizyolojisi	6
2.1.2.1. Ürotelyal Karsinom (Değişici Epitel Karsinomu).....	6
2.2.Mesane Kanserinde Evreleme.....	8
2.3.Mesane Kanseri Genetiği.....	9
2.4. Mesane Kanseri Gelişiminde Etkili Onkogenler.....	10
2.4.1. Harvey Rat Sarkoma Onkogeni.....	10
2.4.2. Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü.....	11
2.4.3. FGFR3.....	12
2.5. Mesane Kanseri Gelişiminde Etkili Tümör Baskılayıcı Genler.....	12
2.5.1. TP53.....	12
2.5.2. RB.....	14
2.5.3. Kromozom 9 Değişimleri.....	15
2.6.Hücre Döngüsü Ve Kanser.....	16
2.7. Aurora Kinazlar.....	17
2.7.1. Aurora Kinaz A.....	18

2.7.1.1. Aurora Kinaz A'nın Fonksiyonları.....	19
2.7.1.2. Aurora Kinaz A'nın Fonksiyonel Regülasyonu.....	20
2.7.2. Aurora Kinaz B.....	22
2.7.2.1. Aurora Kinaz B'nin Fonksiyonları.....	23
2.7.2.2. Aurora Kinaz B'nin Fonksiyonel Regülasyonu.....	24
2.8. Aurora Kinazlar Ve Kanser.....	26
2.8.1. Hücre Ploidilerine Etkileri.....	26
2.8.2. Diğer Yolaklarla İlişkileri.....	28
2.8.3. Prognozdaki Önemleri.....	30
2.9. Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH).....	31
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	33
3.1. Gereç.....	33
3.1.1. Araştırma Grubu Bireyleri.....	33
3.1.2. Kullanılan Gereçler.....	33
3.1.3. Cam Malzeme.....	34
3.1.4. Kimyasal Maddeler.....	34
3.1.5. Kullanılan Problar.....	35
3.2. Yöntem.....	35
3.2.1. Materyal Alımı.....	35
3.2.2. Örneklerin FISH Analizine Hazırlanması.....	36
3.2.3. FISH Analizi.....	36
3.2.3.1. FISH Tekniğinin Uygulanması.....	36
3.2.3.1.1. Preparatların Ön Yıkaması ve Denatürasyonu.....	37
3.2.3.1.2. Prob Denatürasyonu.....	37
3.2.3.1.3. Hibridizasyon.....	37
3.2.3.1.4. Hibridizasyon Sonrası Yıkamalar.....	38

3.2.3.1.5. Hibridize Olan Bölgelerin Görüntülenmesi.....	38
3.2.3.1.6. Preparatların Mikroskopta İncelenmesi.....	39
3.2.3.1.7. Değerlendirme.....	39
3.2.4. İstatistiksel Analiz.....	41
3.3.Kullanılan Stok Solüsyonlar.....	41
4. BULGULAR.....	43
4.1. Yöntem ve Değerlendirmeye İlişkin Bulgular.....	46
4.2. FISH Analiz Bulguları.....	46
4.2.1. AURKA Gen Bölgesine Ait Bulgular.....	48
4.2.2. AURKB Gen Bölgesine Ait Bulgular.....	51
4.2.3. Kromozomal İnstabilitelere Ait Bulgular.....	53
4.2.4. CEP17 Aberasyonlarına Ait Bulgular.....	57
4.2.5. Patolojik Bulgular İle FISH Bulgularının Karşılaştırılması.....	60
4.3. İstatiksel Verilerin Değerlendirilmesi.....	60
5. TARTIŞMA.....	62
5.1. FISH Yöntemi İle Saptanan Anomalilerle Literatür Bilgilerinin Karşılaştırılması.....	63
5.1.1. AURKA Gen Değişimlerinin Tumor Evre ve Derecesi ile Bağlantısının Literatür Bilgileriyle Karşılaştırılması.....	63
5.1.2. AURKA Gen Değişimlerinin Kromozomal İnstabilitelere İle Bağlantısının Literatür Bilgileriyle Karşılaştırılması.....	68
5.1.3 AURKB ve AURKA Gen Değişimlerinin Literatür Bilgileriyle Karşılaştırılması.....	72
5.1.4. CEP 17 Aberasyonlarının Literatür Bilgileriyle Karşılaştırılması.....	76
6. SONUÇ.....	80
7. KAYNAKLAR DİZİNİ.....	82
ÖZGEÇMİŞ.....	91

TABLULAR DİZİNİ

Tablo	Sayfa
Tablo 2.1. Mesane Tümörlerinin Sınıflandırılması.....	6
Tablo 2.2. Ürotelyal Kanserlerin Sınıflandırılması.....	7
Tablo 2.3. Mesane Tümörlerinin Evrelemesi.....	8
Tablo 2.4. Mesane Kanserinde Değişimi Gözlenen Bazı Genler ve Görülme Sıklıkları.....	15
Tablo 3.1. Carnoy's Fiksatif Solüsyonu.....	41
Tablo 3.2. Preparatların Ön Yıkama Solüsyonları.....	41
Tablo 3.3. Preparatların Denatürasyon Solüsyonu.....	42
Tablo 3.4. Hibridizasyon Sonrası Solüsyonlar.....	42
Tablo 3.5. Görüntüleme Sistemleri Solüsyonu.....	42
Tablo 4.1. Çalışma Grubu Hastalarının Yaş, Cinsiyet Ve Histopatolojik Aşamaları.....	44
Tablo 4.2. Çalışma Grubu Örneklerinin Histopatolojik Tanıları ve FISH Analiz Sonuçları.....	47
Tablo 4.3. AURKA gen bölgesine ait değişimlerin tümör derecesine göre değerlendirilmesi.....	49
Tablo 4.4. AURKA gen bölgesine ait değişimlerim tümör evresine göre değerlendirilmesi.....	49
Tablo 4.5. AURKB gen bölgesine ait değişimlerim tümör derecesine göre değerlendirilmesi.....	52
Tablo 4.6. AURKB gen bölgesine ait değişimlerim tümör evresine göre değerlendirilmesi.....	52
Tablo 4.7. Kromozomal instabilitelerin tümör derecesine göre değerlendirilmesi.....	54
Tablo 4.8. Kromozomal instabilitelerin tümör evresine göre değerlendirilmesi.....	54

TABLolar DİZİNİ (devam ediyor)

Tablo 4.9. CEP17 aberasyonlarının tümör derecesine göre değerlendirilmesi.....	58
Tablo 4.10. CEP17 aberasyonlarının tümör evresine göre değerlendirilmesi.....	58
Tablo 4.11. Tümör Derecesi ve klinik evre ile FISH bulgularının istatistiksel değerlendirilmesi.....	61
Tablo 4.12. AURKA amplifikasyonlarının diğer parametreler ile istatistiksel değerlendirmesi.....	61
Tablo 5.1. Çalışmamızdaki AURKA, AURKB ve CIN bulgularının literatür ile karşılaştırılması.....	77

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1 Mesane Kanserinde Gözlenen Önemli Moleküler Değişiklikler.....	9
Şekil 2.2. Tümör Baskılayıcı P53 Gen Ürününün Hücre Siklusundaki Etkisi.....	13
Şekil 2.3 Aurora Kinazların Organizasyonundan Sorumlu Bölgeler.....	17
Şekil 2.4. Aurora Kinaz A 'nın Mitoz Sırasındaki Lokalizasyonları.....	18
Şekil 2.5. Aurora A' nın Sentrozomla İlişkisi.....	19
Şekil 2.6. Aurora Kinaz A'nın Regülasyonu.....	21
Şekil 2.7. Aurora Kinaz B 'nin Mitoz Sırasındaki Lokalizasyonları.....	22
Şekil 2.8. Aurora Kinaz B'nin Fosforilasyon Yoluyla Regülasyonu ve Etkileşimleri.....	25
Şekil 2.9. Metafaz-Anafaz Geçişinde İğ Defektleri.....	27
Şekil 2.10. Aurora'A nın P53 Üzerindeki Etkisi.....	29
Şekil 4.1. Çalışma Grubu Örneklerinin Tümör Derecelerinin Yüzdelik Dağılımları.....	45
Şekil 4.2. Çalışma Grubu Örneklerinin Tümör Evrelerinin Yüzdelik Dağılımları.....	45
Şekil 4.3. AURKA geni ve 20q11 için normal hücrelere sahip olgu 3' e ait FISH görüntüsü.....	50
Şekil 4.4. AURKA geni düşük amplifikasyona sahip olgu 18'e ait ve AURKA geni yüksek amplifikasyona sahip olgu 10'a ait FISH görüntüsü.....	50
Şekil 4.5. AURKB geni delesyonuna sahip olgu 11'e ait FISH görüntüsü.....	53
Şekil 4.6. CIN+ olarak değerlendirilen olgu 15'e ait tetrazomi 20 ve polizomi 10 FISH görüntüsü	55

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam ediyor)

Şekil 4.7. CIN+ olarak değerlendirilen olgu 22'ye ait trizomi 17 ve polizomi 20 FISH görüntüsü	55
Şekil 4.8. CIN+ olarak değerlendirilen olgu 10'a ait tetrazomi 17 ve polizomi 7 FISH görüntüsü.....	56
Şekil 4.9. CIN+ olarak değerlendirilen olgu 19'a ait trizomi 10 ve polizomi 20 FISH görüntüsü	56
Şekil 4.10. Olgu 24 'e ait CEP17 Aberasyonu FISH görüntüsü.....	59
Şekil 4.11. Olgu 16 'ya ait CEP17 Aberasyonu FISH görüntüsü.....	59

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
DNA	Deoksiribonükleik asit
RNA	Ribonükleikasit
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
AURKA	Aurora Kinaz A
TACC3	Transforming, acidic coiled-coil containing protein3
TPX2	Targeting protein for Xklp2
PP1	Protein phosphatase 1
APC/C	Anaphase promoting complex/cyclosom
AURKB	Aurora Kinaz B
MCAK	Mitotic Centromere-Associated Kinesin
SAC	Spindle assembly checkpoint
INCENP	Inner centromere protein
FISH	Florosan In Situ Hibridizasyon
CIN	Chromosomal Instability
NaCl	Sodyum klorür
NaOH	Sodyum hidroksit
DAPI	4',6'-diamino-2-fenilindol
PBS	Phosphate buffered saline
SSC	Saline-Sodium Citrate

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Mesane kanseri, prostat kanserinden sonra en sık gözlenen ikinci üriner sistem malignitesidir. Bu tümörlerin yaklaşık %90'ı ürotelyal kökenlidir. Geriye kalanlar ise skuamoz hücreli kanserler ile adenokarsinomlardır (4,34).

Mesane kanseri her yaşta gözlenebilen bir kanser türü olmakla birlikte görülme sıklığı orta ve ileri yaşlarda, özellikle de 70' li yaşlardan sonra artmaktadır. İstatistiksel veriler değerlendirildiğinde mesane kanseri tanısı konan hastaların %35'i 50-70 yaş arasında iken %62'si 70 yaşın üzerindedir (25). Mesane kanserinin risk faktörleri arasında mesleki etkenler, sigara, Schistosoma haematobium, aneljezik alışkanlığı ve tatlandırıcılar sayılmaktadır (69).

Tanı anında olguların yaklaşık %70'i invaze olmayan tümörlere sahiptirler. Transüretral rezeksiyonu (TUR) takiben hastaların %70'inde rekürrens gözlenmekle beraber, düşük dereceli papiller tümörler nadiren kas dokusu invazyonu yapacak şekilde progresyon göstermektedirler (32). Ancak invazyon potansiyeline sahip mesane tümörlerinin belirlenmesini sağlayacak biyolojik markerlerin arayışı geniş kapsamlı olarak pek çok araştırma grubu tarafından sürdürülmektedir.

Bir çok güncel tedavi yaklaşımına rağmen ileri evre mesane kanserinde 5 yıllık sağ kalım % 20-40 civarındadır. Teknolojik gelişmelere rağmen bu oran 20 yıldır değişmemiştir ve rekürrenslerin sıklıkla olması ülkelerin sağlık harcamalarına büyük yük getirmektedir (10). Bu açıdan mesane kanserinin etiyolojisinin aydınlatılıp, yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi gerektiği ortaya çıkmakta ve belirlenecek biyomarkerlar önem kazanmaktadır.

Aurora kinazlar hücre döngüsü kontrolünde görevli serine/treonin kinaz ailesinin bir üyesidirler (29). İnsan AURKA geni (Aurora 2/ BTAK / STK15) 20q13.2'de haritalanmıştır. Sentrozom olgunlaşması, mitoz giriş, kromozom ayrılması, çift kutuplu iğ oluşumu ve mitozdan çıkış aşamalarında işlev göstermektedir.

Aurora kinaz B (AURKB) geni ise, kromozom 17q13'de haritalanmış bir genidir. Kromozomal segregasyon, sitokinez, sentrozomlardaki doğru protein lokalizasyonu, doğru mikrotübül kinetokor bağlantısı ve mitotik kontrol noktalarının regülasyonundan sorumlu kromozomal passenger protein kodlayan bir genidir (20).

Kanser gelişimi sırasında en sık gözlenen genetik hasarlar kromozomun tamamının ya da bir kısmının kaybı veya kazanımıdır. Anöploidiler tümör progresyon ve prognozunda önemli bir belirteçtir.

Mesane karsinomları, tiroid kanserleri, gastrik karsinomlar gibi kanser tiplerinde anöploidiler kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir. Aurora A kopya sayısı artışı ve/veya aşırı ürün oluşturması ile anöploidiler arasında yüksek korelasyon gözleendiğinden, Aurora A artışlarının da kötü prognoz ile ilişkilendirilebileceğini düşündürmektedir (22). Diğer bir Aurora kinaz olan AURKB geninin aşırı ürün oluşturması kromozom segregasyon hatalarına ve yanlış sitokineze neden olmakta ve bu da çoklu nükleus ile poliploidiler ile sonuçlanmaktadır (20).

Çalışmamızda, mesane kanserli olgulara ait mesane yıkama sıvılarında AURKA ve AURKB genlerine ait değişimler ile CIN (kromozomal düzensizlikler) durumu FISH yöntemi ile incelenmiş olup bu değişimlerin tümör evre ve derecesiyle arasındaki bağlantıların kurularak mesane kanseri progresyonu hakkında önceden bilgi edinebilecek marker değerlendirmesinin yarı invaziv bir yöntemle elde edilen tümör hücrelerinde incelenebilirliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

Kanser; genetik ve epigenetik değişlikleri kapsayan çok aşamalı bir süreç sonucu gelişen hastalık grubudur (23). Kontrolsüz çoğalma kanserdeki temel özellik olmakla birlikte, kanser hücrelerini normal hücrelerden ayıran farklı biyolojik özellikler de vardır. Bunlar arasında hücre kültürlerinde kontakt inhibisyonundan kaçabilme, bölünebilmek için sinyallere gereksinim göstermeme, çoğalmayı baskılayıcı sinyallere duyarsızlık, apoptozisten kaçabilme, anjiyogenezi uyarabilme ve metastaz yapabilme sayılabilir (18).

Kansere yol açan değişimler çevresel ve/veya genetik olabilir (23). DNA'daki hasarlar kendiliğinden oluşup mutasyona neden olabileceği gibi virüsler, radyasyon, kimyasal maddeler gibi pek çok mutajen ya da karsinojenden kaynaklanan somatik hücre mutasyonlarına bağlı olarak kanser gelişebilir (24).

2.1.Mesane Kanseri

2.1. 1. Mesane Kanserinde Etiyoloji, Epidemiyoloji ve Risk Faktörleri

Üretra bölgesinin epitel çizgisi, renal pelvisten üretraya kadar uzanır. Bu bölge mesaneden köken alan 15 kadar yaygın kanser türünün kaynağıdır (58).

Mesane kanseri ürogenital kanserler içinde prostat kanserinden sonra ikinci, erkekte gelişen kanserler arasında dördüncü, dünya genelinde ise tüm kanser tipleri arasında yedinci sırada yer alan kanser tipidir. Her yıl 350.000 dolaylarında yeni tanı

alan olgu olduğu rapor edilmektedir (12). Amerika Birleşik Devletleri'nde 2010 yılı boyunca 70,530 yeni mesane kanseri vakasının saptanacağı ve 14.680 hastanın mesane kanseri nedeniyle hayatını kaybedeceği öne sürülmüştür (34).

Mesane kanseri her yaşta gözlenebilen bir kanser türüdür. Ancak, genellikle orta ve ileri yaşlarda daha sık gözlenmektedir. Kanser tanısı alan hastaların %35'i 50–70 yaş arasında, %62'si ise 70 yaşın üzerindedir.

Mesane kanseri, erkeklerdeki kanser ölümlerinin %2.9'unu, kadınlarda ise %1.5'ini oluşturur. Beş yıllık sağkalım oranları erkeklerde kadınlardan daha yüksektir (43). Hayatta kalma süresi beyaz ırkta daha uzundur. Mesane kanserinin insidansı 1950'den beri yaklaşık olarak %50 artmıştır. Yaşlı popülasyonun artması ile birlikte bu artışın devam edeceği tahmin edilmektedir (25).

Türkiye' de yapılan bir çalışmada ise mesane kanseri, ülke genelinde ölüme neden olan hastalıklar arasında, 60 yaş üstü erkeklerde onuncu (%1.6), aynı yaş grubundaki kadınlar da ise on dokuzuncu (%0.4) sırada yer almaktadır (59).

Batı dünyası ülkelerinin hemen tümünde ürotelyal tip mesane kanseri anlamlı oranda yüksek sıklıkta gözlenmekte olduğu, olguların büyük bölümünün sigara orijinli karsinogenlerden kaynaklandığı, buna karşılık endemik ülkelerde, mesane kanserlerinin büyük bölümünün squamoz hücre karsinomları olduğu rapor edilmektedir. Farklı ülke ve etnik gruplar arasında mesane kanseri insidansı, morbidite ve mortalite oranlarında anlamlı değişkenlikler söz konusudur (48).

Mesane kanseri oluşumunda en önemli risk faktörlerinden biri sigaradır. Sigara içenlerde mesane epitelinin proliferatif yanıtı, karsinogenlere ve genetik yatkınlığa duyarlılığı artmıştır. Mesane kanseri riski; içilen sigara miktarı, süresi ve inhalasyonun

derecesi ile doğru orantılıdır. Erkeklerde %50 ve kadınlarda %23 oranla sigara en önemli etiyolojik faktördür (70). Yapılan olgu-kontrol çalışmalarının çoğunda sigaranın, mesane kanseri gelişmesini sigara içmeyenlere göre 2 ila 6 kat arttırdığı belirtilmektedir (69). Sigarayı bırakanlarda riskin 2 ila 4 yıl içinde % 30-60 azaldığı bildirilmiştir (2).

Sigarada mesane kanseri gelişiminden sorumlu spesifik karsinojenler tam olarak aydınlatılmamış olmakla birlikte nitrozaminler, β - naftilamin, 2- naftilamin ve özellikle de 4-aminobifenil bugün için bilinenlerdir. Sigara içenlerin %50'sinde, üriner karsinojenik triptofan metabolitlerinin (α -aminoferol, kynurenin ve türevleri) ve nitrozaminlerin idrarla atılımı artmaktadır (33).

Mesane kanseri gelişimde diğer bir risk faktörü mesleksi etkenlerdir. Mesleksi etkenlerin başında anilin boyaları gelmektedir ve bu boyalar ürotelyal karsinojendir. Mesane kanseri için karsinojen olduğu gösterilen diğer kimyasallar; 2-naftilamin, 4-aminobifenil, 4-nitrobifenil, 4-4-diaminobifenil (benzidin) ve 2-amino-1-naftol; yanıcı gazlar ve kömür tozu, muhtemelen klorize alifatik hidrokarbonlar; ve kimyasal boyalarda, lastik ve tekstil sanayinde kullanılan akroleyn gibi aldehitlerdir. Mesane tümörünün yaklaşık %20'sinin kimyasallara maruz kalma ile oluştuğu tahmin edilmektedir (13, 58). Kimyasal ajanlara maruziyet ve sigara içiciliği bireylerde genetik değişikliklere sebep olmaktadır (11).

Mesane kanserinin etiyolojisinde mesleksi etkenler ve sigara dışında üzerinde en çok çalışılan önemli etkenler arasında *Schistosoma haematobium*, aneljezik alışkanlığı ve tatlandırıcılar sayılmaktadır (69).

2.1.2. Mesane Kanseri Patofizyolojisi

Mesane de ortaya çıkan malign tümörlerin çok büyük bir oranı eskiden transisyonel hücre karsinomu olarak bilinen fakat 2004 ‘den bu yana ürotelyal karsinom olarak adlandırılan histolojik sınıfa aittir (17,50).

Mesane kanseri, tümörün sitolojik ve büyüme paterni özelliklerine göre sınıflandırılmış ve tümörün dokuda ilerleyişine göre evrelendirilmiştir (Tablo 2.1)

Tablo 2.1. Mesane Tümörlerinin Sınıflandırılması (WHO 2004)

İnvaziv rotelyal Tümörler
Non-invazif rotelyal Tümörler
Skvamz Neoplaziler
Glandüler Neoplaziler
Nöroendokrin Tümörler
Mezenkimal Tümörler (leiomyosarkom, rbdomyosarkom, hemanjiom, anjiosarkom)
Hematopoetik-Lenfoid Neoplaziler
Sekonder Tümörler (prostat, serviks, uterus, rektosigmoid)

2.1.2.1. Ürotelyal Karsinom (Değişici Epitel Karsinomu)

Malign mesane tümörlerinin yaklaşık % 90-95’i ürotelyal hücre (değişici hücre) karsinomudur. Geri kalanı ise mezenşimal neoplazmlar ve diğer epitel tümör tipleridir (13,50). Skvamz hücreli kanser ve adenokarsinom en sık rastlanılan primer non-transisyonel hücreli kanserlerdir (30).

Ürotelyal kanserlerin sınıflandırılmasında yaygın olarak kullanılan WHO 2004 sınıflamasına göre, ürotelyal neoplazi, papillom ve karsinom arasında olan düşük malign potansiyelli neoplazi olarak yer almaktadır (Tablo 2.2)

Bununla birlikte karsinomlar grade I, II, III yerine düşük ve yüksek dereceli olarak iki gruba ayrılmıştır. Grade I karsinom düşük dereceli, grade II ve III ise yüksek dereceli karsinom olarak nitelendirilmektedir.

Düşük dereceli papiller ürotelyal karsinomlar önceki WHO sınıflamasında grade I ile eşanlımlıdır. Düşük dereceli mesane kanserli hastaların yaklaşık %80'i süperfisial mukoza ile sınırlıdır. Bu yüzeysel tümörlerin tekrarlama riski %70'lerde ve bunların da yaklaşık %15'i daha yüksek derece ve evreye ilerleme gösterir, progresyon ve mortalite oranı azdır (10, 11).

Tablo 2.2. Ürotelyal Kanserlerin Sınıflandırılması (*WHO 2004 / ISUP Sınıflaması*)

Papiller Ürotelyal Lezyonlar
Hiperplazi
Papillom
Papiller Neoplazi (Düşük Malign Potansiyelli Papiller Ürotelyal Neoplazi)
Ürotelyal Karsinom (Düşük ve Yüksek Dereceli)
Papiller Olmayan Ürotelyal Lezyonlar
Hiperplazi
Ürotelyal Atipi(Reaktif ve önemi bilinmeyen atipi)
Displazi (Düşük dereceli intraürotelial lezyon)
Karsinoma in situ (Yüksek dereceli intraürotelyal lezyon)

Yüksek dereceli papiller ürotelyal karsinomlar ise önceki WHO sınıflamasında grade II, III ile eş anlamlıdır. Tekrarlama (rekürrens), ilerleme (progresyon) ve mortalite oranı; düşük dereceli ürotelyal karsinomlara oranla daha fazladır (10). Primer terapi ve sistemik kemoterapideki son gelişmeler hastaya 7-10 aylık yaşam süresi kazandırmaktadır (17).

2.2.Mesane Kanserinde Evreleme

Mesane kanserinin tedavisini ve prognozunu tayin edebilmek için klinik olarak tümörün lokalizasyonunun, mesane duvarına infiltrasyon olup olmadığı, infiltrasyon varsa derinliğinin, lokal veya uzak metastazlarının olup olmadığı bilinmesi, tam olarak evrelendirilmesi gereklidir. 2002 yılında UICC (Union International Contre le Cancer) tarafından kabul edilen tümör-nodül-metastaz (TNM) sınıflandırması (Tablo2.3) kullanılmaktadır (56).

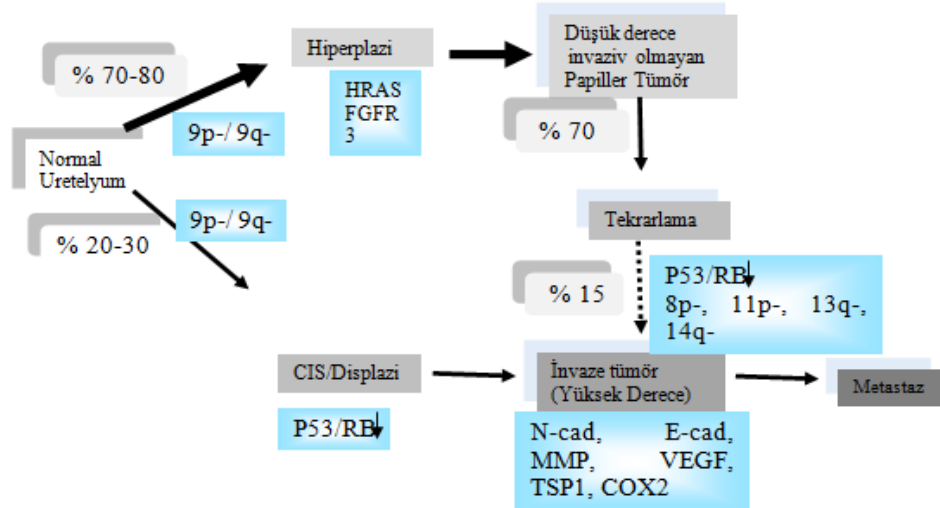
Tablo 2.3. Mesane tümörlerinin evrelemesi (TNM)

T-Primer tümör
Ta: non-invazif papiller kanser
Tis: karsinoma insitu
T1: tümör subepitelyal konnektif dokuya yayılmıştır.(lamina propria invazyonu)
T2 :tümör kas tabakasına yayılmıştır.
T3: tümör perivezikal dokuya yayılmıştır.
T4: tümör prostat, uterus, vajen, pelvik duvar veya abdominal duvara yayılmıştır

Mesane kanserlerinin yaklaşık %70 ini düşük dereceli invaziv olmayan papiller tümörler oluşturmaktadır (evre Ta), geri kalanı ise kasa invaziv tümörlerdir ($\geq T1$). Aynı zamanda bazı tümörler bazal membrana nüfus ederler ancak mesane duvarının kas tabakasına invaziv olmazlar (evre T1). Yüksek derece T1 tümörler kasa invazyon açısından yüksek risk taşımaktadırlar. Düşük derece Ta tümörlerinin prognozları iyi seyredir, fakat rekürrens riskleri fazladır. Sadece % 10-%15 kadarı invaziv hastalığa dönüşmektedirler (39).

2.3.Mesane Kanseri Genetiği

Mesane karsinomları iki farklı yoldan köken almaktadır. Bunlar papiller ve non-papiller lezyonlardır. Papiller lezyonlar hiperplazik ürotelyumdan meydana gelirken, invazif tümörler displazik ürotelyumdan oluşurlar (58).



Şekil 2.1. Mesane Kanserinde Gözlenen Önemli Moleküler Değişiklikler (Kaynak 65’ den değiştirilerek alınmıştır)

Papiller tümörler genellikle RAF/MEK/ERK ve PIK3CA yolağındaki genlerin değişimi ile ilgilidir. Papiller olmayan invazif tümörler ise p53 ve pRb yolağındaki değişimlerden kaynaklanır. Her iki yolağında kromozom 9 değişikliklerinden kaynaklandığı düşünölmektedir. Mesane kanseriyle ilgili yapılan çalışmalarda, özellikle kromozom 9'da delesyon bulunması, bu kromozom üzerinde daha başka tümör baskılayıcı genlerin olduğunu düşöndürmektedir (1, 58).

2.4. Mesane Kanseri Gelişiminde Etkili Onkogenler

2.4.1. Harvey Rat Sarkoma Onkogeni (H-RAS)

Hücre zarı ile ilişkilendirilen, hücre büyümesini ve bölünmesini düzenleyen sinyal iletim moleküllerini RAS gen ailesi kodlamaktadır. Hücre büyüme faktörü ile uyarıldığında hücre zarında bulunan büyüme faktörü reseptörleri büyüme faktörüne bağlanmakta ve reseptörün sitoplazmaya bakan kısmı otofosforilasyona uğramaktadır. Bu durum normalde GDP'ye bağlı inaktif formda gözlenen RAS proteininin GDP'den ayrılıp GTP'ye bağlanarak aktif forma geçmesine neden olmaktadır. Aktif haldeki RAS proteini sitoplazmadaki bir dizi proteinin fosforilasyonu için gerekli sinyallerin gönderilmesinde görev yapmaktadır.

Bir protoonkogen olan RAS genini onkogene dönüştüren mutasyolar GTP' nin GDP'ye hidrolizine engel olarak RAS proteinini aktif formda tutup hücreyi sürekli bölünmeye teşvik etmektedirler (38)

Harvey Rat Sarkoma Onkogeni hücrel transform gen ailesini temsil etmektedir. Gen transformasyonu iki şekilde gerçekleşmektedir. İlk mekanizma RAS proteininin

kodlandığı bölgedeki mutasyonun enzimatik aktiviteyi etkilemesi ile gerçekleşir. Bu mutasyonlardan en yaygın olanları 12, 13, 59 ve 61. kodonlarda gözlenenlerdir ve ürotelyal malignansilerin yaklaşık %30-40' ında gözlenmektedirler.

İkinci mekanizma ise RAS gen ekspresyonunu etkileyen son kodon içerisindeki kesilme ve yapışma (internal splicing)dır. Kesilme ve yapışma mekanizması içindeki mutasyonlar ve kodlayan bölge mutasyonları gen ürününün aşırı ürün oluşturmaya (overekspresyon) neden olmaktadır. Bu durum yüksek derece ve evreli mesane kanserlerinde dahi %10' dan daha az gözlenmektedir (11,17). Fakat H-RAS genindeki aşırı ekspresyonun invazif olmayan hastalarda erken nüksle sonuçlanacağını öne süren çalışmalar olmasına rağmen, bu durumun tersini savunan çalışmalar da bulunmaktadır (1,58).

2.4.2. Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü

Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR) ailesi veya ERBB gen ailesi, transmembran tirozin kinaz reseptör proteinleri kodlar. Bunlar, normal hücrelerin çoğalmasında ve farklılaşmasında önemli rol oynamaktadırlar. Mesane kanserinin başlangıç ve ilerlemesinde ERBB sinyal düzenlenmesindeki değişikliklerin, reseptörün kendisiyle veya ligandıyla ilgili olabileceği bildirilmiştir. Mesane tümörüne sahip hastalarda yapılan çalışmalarda, ERBB2'nin aşırı ekspresyon olması ile tümörün derecesi ve evresi arasında anlamlı korelasyon olduğu gözlenmiştir (1).

Ekstraselüler ortamdan EGFR'lere bağlanan ligandların, sadece mitojeniteyi uyararak değil aynı zamanda EGFR stimülasyonunu uyararak da tümör invazyonunu sağladığı düşünülmektedir (11, 35).

2.4.3. Fibroblast Büyüme Faktör Reseptörü 3 (FGFR3)

Fibroblast Büyüme Faktör Reseptörü 3 (FGFR3) mutasyonu genellikle süperfisial papiller mesane kanserlerinde rapor edilmiştir. Tüm Ta lezyonlarının %75'inden fazlasında FGFR3 mutasyonu gözlenirken, karsinoma *in situ* (CIS) FGFR3'e ait mutasyonlar bildirilmemiştir. Bu veri de erken tedavide FGFR3'ün önemli bir terapötik ajan olabileceği fikrini gündeme getirmektedir (1,11).

2.5. Mesane Kanseri Gelişiminde Etkili Tümör Baskılayıcı Genler:

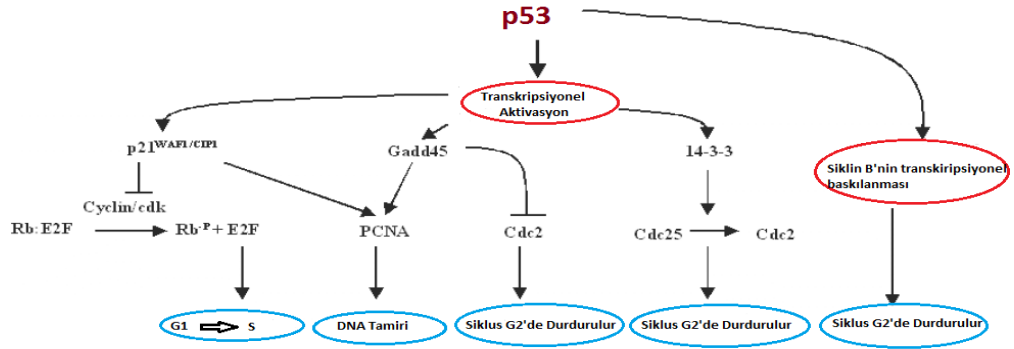
Karsinoma *in situ* (CIS) yüksek dereceli invaziv kanserdir. Papiller süperfisial düşük dereceli tümörlerin aksine, TP53, RB gibi tümör baskılayıcı genleri içeren mutasyonlar taşırlar. Genetik instabiliteler ve antiapoptotik fenotipler bu gibi mutasyonlar sonucu, fonksiyon kayıplarıyla ortaya çıkmaktadırlar (11 ,17).

2.5.1. Tümör Baskılayıcı P53 Geni

Tümör baskılayıcı P53 gen mutasyonları insan tümörlerinde, özellikle agresif tümörlerde en yaygın görülen genetik defektlerdir. Bu gen tarafından kodlanan ve bir transkripsiyon faktörü olan P53 proteininin, anjiyogenez, DNA onarımı ve apoptoziste önemli rolleri vardır. Hücrede bir DNA hasarı oluştuğunda P53 protein üretimi artmakta ve DNA tamir mekanizmalarının aktif hale getirilmesi için gerekli yolları çalıştırıp hücre döngüsünü durdurmaktadırlar. Böylece DNA'daki hasarın giderilmesi ve hatanın ilerlemesinin önlenmesi sağlanmaktadır (1,64).

Genellikle normal hücrelerde, P53 MDM2 proteinine bağlı olarak inaktiftir. P53/MDM2 übikitin ligazla yıkıma uğradıktan sonra aktive olmaktadır. Aktive olan P53, P21 ekspresyonunu aktive etmekte, aktifleşen P21 proteini CDK4/siklin D1 kompleksini baskılayarak hücrenin G1'den S evresine geçişini önlemektedir. Siklusun durması hücreye tamir için zaman kazandırır (9). DNA hasarı kinazların aktive olmasını sağlayarak P53'ünde fosforlanmasını sağlamaktadır. Fosforile durumdaki P53, MDM2 ile kompleks oluşturamayacağı için P53 ve MDM2 miktarı artar. DNA tamir genleri üzerinde bir transkripsiyon faktörü olarak görev yapan P53 sayesinde ilgili genlerin transkripsiyonu gerçekleştirilir (16,42).

Eğer DNA hasarı onarılamayacak kadar büyükse bu durumda P53 apoptozisi indükler. Apoptozis üzerindeki etkisini BAX'ın ekspresyonunu artırarak göstermektedir. Artmış BAX ekspresyonu ile BCL2/BAX heterodimer oranı değişmekte ve hücre apoptoza gitmektedir (16). Şekil 2.2' de P53 proteinin hücre siklusu sırasında etkileşime girdiği bazı proteinler ve bu etkileşimlerin sonuçları gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Tümör Baskılayıcı P53 Gen Ürününün Hücre Siklusundaki Etkisi

(Kaynak 57'den değiştirilerek alınmıştır)

Çalışma verilerine göre yüksek dereceli mesane tümörlerinde, kromozom 17p'de heterozigosite kaybı (Loss of Heterozygosity=LOH) yüksek oranlarda gözlenmektedir. Mesane kas dokusuna invazyon gösteren transisyonel hücreli karsinomların yaklaşık olarak %50'sinde, P53'ün nukleusta aşırı ifadesine bağlı oluşan mutant proteinin varlığı gösterilmiştir. Mutant proteinin varlığı, tümör dokusunun derecesinin ve klinik evresinin artmasıyla ilişkili bulunmuştur (11, 64, 66).

2.5.2. Retinoblastoma Geni

Retinoblastoma gen kaybı yada mutasyonu mesane kanserinde içinde bulunduğu pek çok tümörde gözlenmektedir .

Retinoblastoma proteini, hücre döngüsünün G1-S kontrol noktasında S evresine geçişi denetleyen bir tümör baskılayıcı gendir. Hücre döngüsünün G0 fazında pRB fosforillenmemiş formda E2F transkripsiyon faktörlerine bağlı bulunmakta ve bu transkripsiyon faktörünün inaktivasyonunu sağlamaktadır.

Büyüme faktörleriyle uyarılan hücrede, G1 fazı boyunca pRB proteini CDK4/siklin D1 kompleksi tarafından fosforillenir. RB proteininin fosforillenmesi, pRB ve E2F kompleksinin bozulmasına E2F ve diğer regülatör proteinlerin pRB'den ayrılarak serbest kalmasına neden olur. Bu durum G1 fazından S fazına geçiş için gerekli olan bir çok genin ifadesini uyarmaktadır. Bu etkileşimlerden herhangi birindeki değişim, kontrolsüz hücre büyümesine yol açabilir. Mesane kanserlerinin yaklaşık olarak %30'unda RB gen mutasyonları gözlenmiştir (1, 38, 64).

2.5.3. Kromozom 9 Değişimleri

Mesane kanserlerinin tüm derece ve evrelerinin %60' dan fazlasında kromozom 9 delesyonları görülmektedir. Moleküler ve sitogenetik çalışmalara göre kromozom 9 anomalileri, hastalığın başlangıcında vardır ve hastalığın erken yaşta gözlenmesiyle ilişkili bulunmuştur (35)

Özellikle non-invaziv papiller neoplazilerin başlangıcında, aday tümör baskılayıcı genlerin haritalandığı 9q'da çeşitli değişiklikler saptandığı bir çok yayında bildirilmektedir. Bu bölgede bildirilen aday tümör baskılayıcı genler : Tuberos Sclerosis 1" (TSC1 - 9q34), "Patched (Drosophila) Homolog" (PTCH - 9q22.3), ve "Deleted in Bladder Cancer 1"(DBC1 - 9q32–33) genleridir (11). Tablo 2.4.'de mesane kanserinde sıklıkla değişimi gözlenen genler listelenmiştir.

Tablo 2.4. Mesane Kanserinde Değişimi Gözlenen Bazı Genler ve Görülme Sıklıkları (Kaynak 53'den uyarlanmıştır)

GEN	DEĞİŞİKLİKLER	ETKİ	SIKLIK
TP53	Delesyon ,mutasyon ,protein akümülyasyonu	Yüksek derece, invaze hastalık	%70
RB	Delesyon,mutasyon,hiperfosforilasyon	Yüksek derece, invaze hastalık	%37
PTEN	Delesyon,mutasyon,azalmış protein ekspresyonu, hipermetilasyonu	Kötü prognoz	LOH %30-35 Mutasyon %17
DBC1	Delesyon/metilasyon	Erken evre	LOH <%60
FGFR3	Aktive edici mutasyon	Düşük derece/erken evre	%0-34

2.6. Hücre Döngüsü Ve Kanser

Theodore Boveri 1902'de, mitotik anormalliklerin genetik instabilitelere ve kansere neden olabileceğini öne sürmüştür. Mitoz, G2-M geçişi ortaya çıkmadan önce koordine edilen olaylar serisidir. Hücre döngüsünün S evresinin sonunda, hücre duplike olmuş ve DNA replikasyonu gerçekleşmiştir. Profazın sonunda, duplike olmuş sentrozomlar ayrılır. Prometafaz sırasında, iki sentrozom ve kromozomlar mitotik mikrotübüllere bağlanır (29).

Prometafazdan metafaza doğru gerçekleşen süreçte kromozomlar metafaz düzlemine doğru yönelirler. Bu yönelme, sentrozomlara bağlı kinetokorların mikrotübül organizasyonu ile gerçekleştirilir. Bu süreç sırasında, mitotik kontrol noktaları sürekli aktif haldedir. Mikrotübül bağlanması ve gerilimi gerçekleştiği zaman, kontrol sinyalleri kapatılır, kromatidler ayrılır. Telofazda, nükleer göç gerçekleşir ve hücre sitokineze gider. Son olarak, her kardeş hücre tek bir set sentrozom ve kromozom taşır (29).

Mitozun bu kompleks durumu düşünüldüğünde, mitotik defektlerin anöploid kardeş hücrelere yol açması sürpriz bir durum değildir. Anöploid hücre değişmiş DNA içeriğine sahiptir (anormal kromozom sayısı) (29).

Mitoz sırasında anöploidilere gidiş yolları şunlardır;

- 1) İnterfaz sırasındaki yanlış sentrozom duplikasyonu, çok kutuplu (multipolar) iğ iplikçesine yada yanlış sentrozom ayrılmasına neden olabilir
- 2) Sitokineзде hata gerçekleşebilir.
- 3) Kromozom yanlış düzenlenmeleri olabilir.

2.7. Aurora Kinazlar

Aurora kinazlar hücre döngüsü kontrolünde görevli serine/treonin kinaz ailesinin bir üyesidir. İlk olarak *Drosophila*'da tanımlanmışlardır (28). Aurora kinazların sentrozom ayrılma ve olgunlaşması, iğ iplikçiği oluşumu ve stabilitesi, kromozom kondensasyonu, ayrılması ve sitokinezde çeşitli rolleri vardır (29). Omurgalılarda Aurora ailesinin 3 üyesi tanımlanmıştır. Bunlar Aurora A, Aurora B ve Aurora C'dir (28,29,36).

İnsan Aurora kinazları 309-409 aminoasit arasında değişen büyüklükte dirler (8). Aurora kinazlarda, NH2 terminalinde düzenleyici bölge ve COOH terminalinde katalitik bölge olmak üzere iki farklı bölge saptanmıştır. Aurora kinaz tipleri arasında düzenleyici bölge büyük ölçüde farklılık gösterirken, katalitik bölgeleri %70 civarında benzerlik göstermektedir (28).



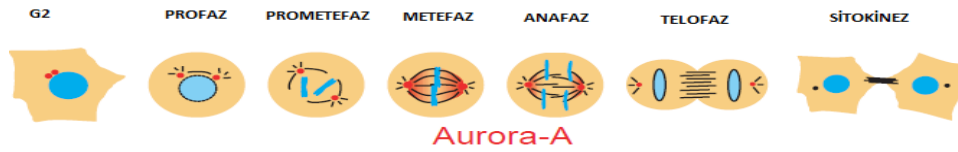
Şekil 2.3. Aurora Kinazların Organizasyonundan Sorumlu Bölgeler (*Kaynak 36'dan değiştirilerek alınmıştır*)

Bu farklılıklar Aurora kinazların lokalizasyonlarında değişikliğe ve mitoz sırasında farklı işlevler görmelerine neden olmaktadır (29). Degredasyondan sorumlu bölgeler, COOH terminalindeki D-kutusu ve NH₂ terminalindeki A-kutusudur. (Şekil 2.3). Katalitik bölge içindeki treonin fosforilasyonun, kinaz aktivitesinden sorumlu olduğu yapılan dizi analizlerinde belirlenmiştir (6,20, 28, 36).

2.7.1. Aurora Kinaz A

İnsan AURKA geni (Aurora 2/ BTAK / STK15) 20q13.2'de haritalanmıştır. AURKA, S fazından başlayıp M fazı boyunca ekspres edilerek hücre siklusunun regülasyonunda görev almaktadır. Sentrozom olgunlaşması, mitoz giriş, kromozom ayrılması, çift kutuplu iğ oluşumu ve mitozdan çıkışta görevleri bulunmaktadır.

Aurora kinaz A (Şekil 2.4'de kırmızı ile gösterilmiştir) mitoz sırasında farklı lokalizasyonlarda bulunmaktadır. Sentez (S) fazının sonundan, izleyen G1 fazının başına kadar duplike olmuş sentrozomlarda lokalizedir. Bu kinaz metafazdan, anafazın sonuna kadar kutuplara yayılır ve G1' in başında sentrozomda kalmaktadır (29).



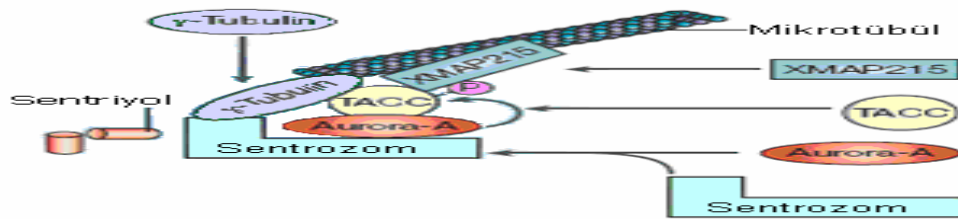
Şekil 2.4. Aurora Kinaz A 'nın Mitoz Sırasındaki Lokalizasyonları (*Kaynak 29'dan değiştirilerek alınmıştır*)

2.7.1.1. Aurora Kinaz A'nın Fonksiyonları:

Hücre siklusunun G2 fazı boyunca bazı proteinler sentrozoma lokalize olmaktadır. Bu durum sentrozomal mikrotübül aktivesinin artmasında ve düzenlenmesinde etkilidir. Bu süreç sentrozom olgunlaşması olarak adlandırılır (22).

Hücre siklusunun G2 fazında, Aurora A ilk olarak perisentriolar materyalde lokalizedir ve LIM proteini Ajuba tarafından aktive edilmektedir. Bu aktivasyon sentrozom olgunlaşması için gereklidir. Geç G2 fazında, gama-tubulin ve Coiled-coil proteinleri gibi perisentriolar proteinlerin mikrotübül oluşumunu güçlendirdiği bilinmektedir. Aurora A inhibisyonunda sentrozomal gama-tubülin yoğunluğunun azaldığı, C.elegans embriyolarında gösterilmiştir (28,63).

Transforming, acidic coiled-coil containing protein 3 (TACC3), XMAP215'in regülasyonundan sorumlu Maskin proteininin insandaki homologudur. Mitoz sırasında Aurora A, TACC3'ü sentrozomal bölgenin etrafında fosforiller ve bu proteinin erken mitozda sentrozomla birleşmesini kolaylaştırır. Msp/ XMAP215 mikrotübül ilişkili protein ile kompleks oluşturarak sentozom etrafındaki mikrotübüllerin stabilizasyonunu sağlamaktadır (28) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Aurora A'nın Sentrozomla İlişkisi (Kaynak 45'den değiştirilerek alınmıştır)

Sentrozom olgunlaşmasından sonra, sentrozomlar G2 boyunca iki farklı kutuba göç etmektedirler. Aurora A delesyonu yada inhibisyonunda tek kutuplu (monopolar) iğ oluşumu gözlenmiştir. Aurora A'nın astral mikrotübül varlığını etkilediği bilinmektedir (63).

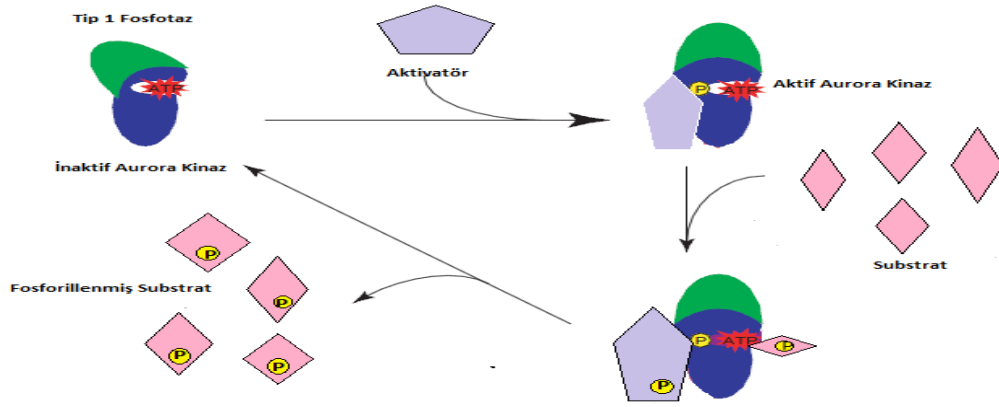
Bazı çalışmalar Aurora A'nın, Plk1'in T-loop bölgesinin direkt olarak fosforilasyonu yoluyla G2 aktivasyonunu tetiklediğini göstermişlerdir. Bu fosforilasyon Aurora A'nın kofaktörünü gerektirir. Aktif Plk1, siklin B /CDK1 aktivitesini kontrol eder, bu kontrol Cdk1 inhibitörü Wee'in degradasyonu ve Cdc25B fosfatazının fosforilasyonu yoluyla gerçekleştirilir (49,63).

2.7.1.2. Aurora Kinaz A'nın Fonksiyonel Regülasyonu:

Aurora kinaz A'nın kinaz aktivitesi hücre döngüsü boyunca düzenlenmektedir. Bu mekanizma fosforilasyon ve degradasyonun karışık bir süreci olarak ortaya çıkmaktadır (28). Aurora kinazlar aktivasyon looplarından otofosforilasyon yoluyla aktive edilmektedirler (63).

Aurora A'nın en iyi karakterize edilen kofaktörü TPX2 proteindir (27). TPX2 Aurora A'ya oldukça korunmuş olan N terminal domaininden bağlanmaktadır. TPX2 fonksiyonu GTPaz Ran tarafından düzenlenir. Ran-GTP; TPX2'nin inhibitörleri olan İmportin alfa ve betanın TPX2'ye bağlanmasını engeller. TPX2 serbest kaldığında PP1 (protein fosfataz 1) bağlanabilir (Şekil 2.6). Böylece PP1'in Aurora A'yı inaktive etmesi önlenir. TPX2 Aurora A'yı iğ kutuplarına taşır ve orada aktive eder. TPX2'nin amino ucu, Aurora A'nın katalitik bölgesinin karboksil ucundaki T loop bölgesine bağlanarak Aurora A'yı hızla fosforile eder (29, 63).

Targeting protein for Xklp2 (TPX2)'ye ek olarak Aurora A'nın başka substratlara bağlandığı da gösterilmiştir. İlk olarak Aurora A, Ajuba'ya bağlanır ve fosforiler. Bu protein sentrozomda lokalizedir ve Aurora A'nın otoposforilasyonu için gereklidir. Ajuba Aurora A'nın COOH terminal katalitik bölgesiyle etkileşim halindedir. Fakat Ajubanın Aurora A'yı hangi moleküler mekanizmalarla aktive ettiği henüz tam olarak bilinmemektedir (63). Özet olarak Aurora A aktivitesi için çeşitli proteinler görev almakla birlikte bu farklı proteinlerin birbirleriyle ilişkileri ve hücre siklusu boyunca farklı sinyal yollarını nasıl etkiledikleri hala tam olarak anlaşılmaş değildir (63).



Şekil 2.6. Aurora Kinaz A'nın Regülasyonu (Kaynak 29'dan değiştirilerek alınmıştır)

Aurora A aktivasyon segmenti, TPX2 yokluğunda inaktif durumdadır ve önemli fosfotreoninlere maruz kalarak deaktivasyona açık hale gelir. Anderson ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, TPX2 bağlanmasının Aurora A'nın reaksiyon mekanizmasında herhangi bir değişikliğe yol açmadığı da rapor edilmiştir (20).

Anafaz başlangıcından sonra, Aurora A seviyesi ubiquitin bağlı proteolizisin sonucu olarak azaltılır. Bu azalma ubiquitin ligaz Cdh1-APC/CA'ya bağlı ilerlemektedir.

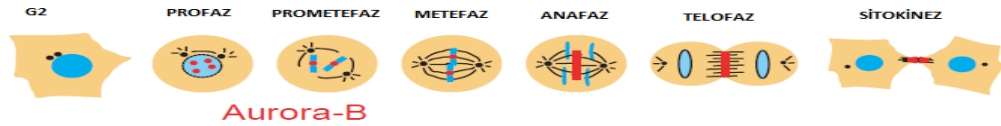
Aurora A'da iki motif tanımlanmıştır. Bunlar C terminalde D-kutusu ve N terminalde A- kutusudur.

Aurora A degradasyonunun Serin51'in fosforilasyonu ile kontrol edildiği düşünülmektedir. Son zamanlarda Aurora A degradasyonundan sorumlu yeni nükleer proteinler tanımlanmaya devam edilmektedir (46).

2.7.2.Aurora Kinaz B

Aurora kinaz B (AURKB), 17q13'de haritalanmış bir genidir. Kromozomal segregasyon, sitokinez, sentrozomlardaki doğru protein lokalizasyonu, doğru mikrotübül kinetokor bağlantısı ve mitotik kontrol noktalarının regülasyonundan sorumlu kromozomal passenger protein kodlayan bir genidir (20).

Aurora kinaz B (AURKB), inhibisyonu artmış poliploid fenotipi ortaya çıkartmaktadır. AURKB mRNA ve protein ekspresyon seviyesi G2/M geçişinde en üst düzeydedir. Maksimum kinaz aktivitesini mitoz sonunda göstermektedir. (Şekil 2.7.) Aurora kinaz B fonksiyonu, substratları ile koordine edilir (20).



Şekil 2.7. Aurora Kinaz B ' nin Mitoz Sırasındaki Lokalizasyonları (*Kaynak 29'dan değiştirilerek alınmıştır*)

2.7.2.1.Aurora Kinaz B'nin Fonksiyonları:

Kompakt yapıdaki kromozom kondensasyonu, hatasız kardeş kromatid segregasyonu için gereklidir. Bu durum, kondensin kompleksinin aktivitesiyle gerçekleştirilir. Serin10 üzerindeki histon H3'ün geç G2/ profaz sırasında Aurora B tarafından fosforillenmesi, kromozom kondensasyonu ile bağlantılıdır (63).

Çift kutuplu olmayan bağlanmalarda, her iki kinetokor aynı kutuptaki mikrotübüllere bağlanır. Bu bağlanmalar, Aurora B aktivasyonu ile destabilize olurlar. Bipolar bağlanmalar elde edilene kadar serbest kinetokorlar yeni bir siklusa girer. İki önemli kinetokor mikrotübül yakalama faktörü vardır. Bunlar Ncd80/Hec1 ve Dam1 kompleksleridir. Bu faktörler, Aurora B tarafından fosforegülasyona maruz kalırlar. Ncd80/Hec1'in Aurora B tarafından fosforillenmesi, bu kompleksin mikrotübüllere afinitesini azaltır. Ayrıca Aurora B, MCAK'ı (mitotic centromere-associated kinesin) fosforiller ve defektif bağlanmaları düzeltmeye katkıda bulunur.

Özet olarak Aurora B kinetokor üzerindeki mikrotübül yakalama faktörlerinin fonksiyonlarını kontrol ederek, mikrotübül kinetokor etkileşiminin stabilizasyonunu etkilemektedir. Çift kutuplu olmayan bağlanmaları düzeltme yeteğine sahiptir ve kardeş kromatidlerin doğru segregasyonundan sorumludur (29,63).

Merotelik bağlanmalar (tek kinetokorun her iki iğ kutbundan kaynaklanan mikrotübüllere bağlanması) sıklıkla erken mitozda ortaya çıkar ve anöploidilere yol açarlar. Merotelik bağlanmaların çoğunluğu prometafazda çözümlenirler. Aurora B, bu sürecin doğru devam etmesinde görevlidir. Aurora B, merotelik bağlı kinetokorların sentromerlerinde zenginleştirilir ve burada MCAK regülasyonu yoluyla kinetokor mikrotübül ilişkisini kontrol eder (63).

İğ ipliği kontrol noktası (SAC) inaktivasyonunu APC/C, cdc20 Siklin B ve sekurinin parçalanmasını teşvik ederek anafaz başında başlatır. Kardeş kromatidler arasındaki kohezyonun ve Siklin B ile ilişkili Cdk1 aktivitesinin azalmasına neden olur. Anafazdan itibaren, Aurora B hücre korteksine ve her iki merkez iğe lokalizedir. Aurora B aktivitesi anafaz ve sitokinezin sağlıklı bir şekilde yürütülebilmesi için gereklidir. Aurora B'nin merkez iğe lokalizasyonu, anafaz sırasında mikrotübül hareketlerinin hızına katkı sağlamaktadır, aynı zamanda telofaz sırasında mitotik iğlerin dağılması içinde gereklidir (63).

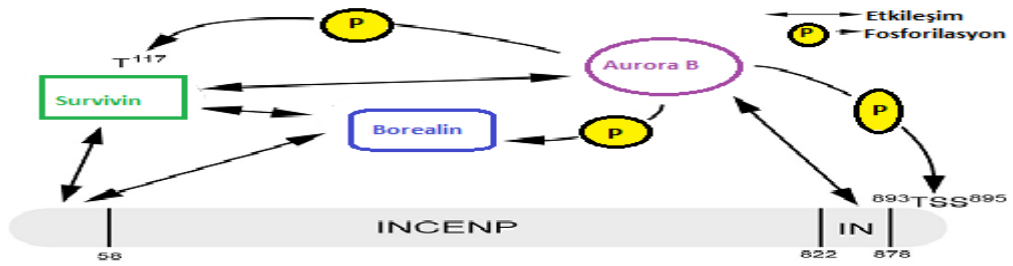
Sitokinez sırasında, sitoplazma her biri tek nukleus içeren iki kardeş hücreye ayrılır. Bu ayrılmanın temel belirleyicisi GTPaz RhoA'dır. Sitokinez sürecince RhoA fonksiyonu centralspindlin denilen bir kompleks tarafından kontrol edilir. Bir GTPaz aktive protein (GAP) ve kinesinden oluşan bu kompleks RhoA'yı etkiler. Centralspindlinin doğru lokalizasyon ve fonksiyonunun Aurora B'nin fonksiyonuna bağlı olduğu düşünülmektedir. Aurora B sitokinezde vimentin, myosin 2, desmin ve GFAP gibi bazı proteinleri fosforilleyerek de sitokinez sürecini etkiler (29,63).

2.7.2.2. Aurora Kinaz B'nin Fonksiyonel Regülasyonu

Aurora B'nin otofosforilasyonu, onun aktivasyon segmenti olan treonin232'de meydana gelir. Aurora B'nin tam aktivasyonu, otofosforilasyonuna ve INCENP'e bağlanmasına bağlıdır. Aurora B, INCENP'in COOH terminalindeki korunmuş IN-box bölgesi ile iletişim halindedir ve bu iletişim Aurora B'nin kısmi aktivasyonunu sağlamaktadır. Aurora B'nin tam aktivasyonu INCENP içindeki TSS motifinin otofosforilasyonu ile gerçekleşmektedir (Şekil 2.8). Bu otofosforilasyonun muhtemelen

Aurora B' nin katalitik domaini içerisinde konformasyonel değişikliklere sebep olduğu düşünölmektedir (20,27).

Aurora B, INCENP ile direkt etkileşiminin yanı sıra , Survivin ve Borealin ile birlikte multi protein olan Chomosomal Passenger Complex' de lokalizedir (Şekil 2.7). Son zamanlarda bazı kinazların da, Aurora B aktivasyonunda rolü olduğu bildirilmiştir. Bunlardan Msp1, kontrol noktası kinazıdır ve bu kinaz Borealin' in CPC alt ünitesini fosforiller. Bu olay Aurora B'nin tam aktivasyonuna sebep olur. Chk1 ise Aurora B'yi direkt olarak fosforilleyerek aktivasyonuna neden olmaktadır (20,28,63).



Şekil 2.8. Aurora Kinaz B'nin Fosforilasyon Yoluyla Regölasyonu ve Etkileşimleri (Kaynak 62'den değiştirilerek alınmıştır)

Memelilerde Aurora B'nin dinein, CENP-E, BubR1 ve Mad2'ide içeren kontrol noktası komponentlerini regöle ettiği bildirilmiştir (46).

Aurora A ve B'nin herikisinde Anaphase Promoting Complex/Cyclosome (APC/C) adı verilen E3-Ubikitin ligazca hedeflenir. Aurora kinazlara bağlı proteinleri APC/C hedefleyerek mitoz çıkışı sırasında onları parçalar ve G1'deki hücrelerde bu proteinlerden az miktarda olmasını sağlar. Anaphase Promoting Complex/Cyclosome

(APC/C)'nin yanı sıra Cullin 3 (Cul3)-based E3 ligazında in vivo ve in vitro ortamda Aurora B'yi übikitine ettiği gösterilmiştir. Übikitinasyon, metafaz kromozomlarından Aurora B'nin ayrılmasını sağlamaktadır (63).

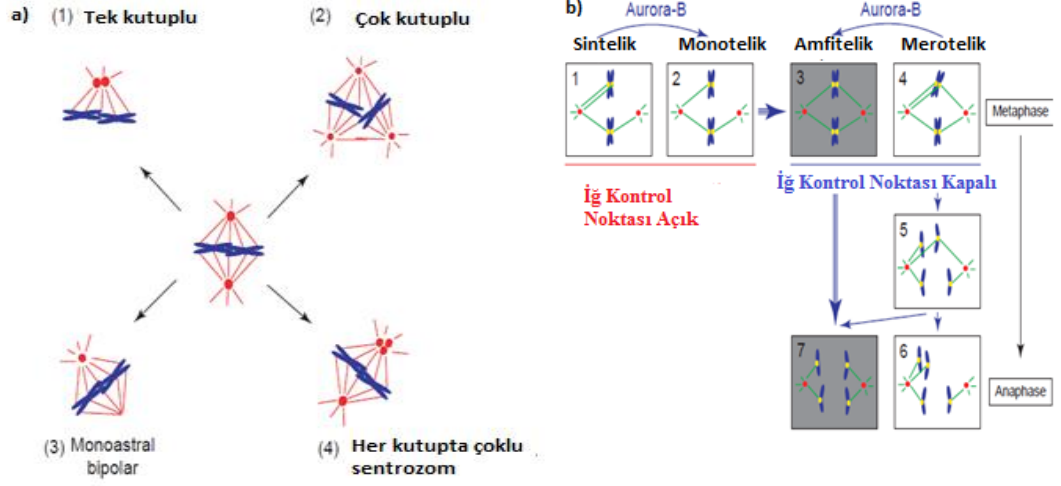
2.8.Aurora Kinazlar Ve Kanser

Aurora kinazların deregülasyonu tümörögenезle bağlantılıdır. Özellikle Aurora A anomalileri, kanserle yüksek derecede ilişkili bulunmuştur. Aurora B anomalilerin de tümörögenезe katkıda bulunduğu bildirilmiştir. Ancak Aurora C'nin kanser üzerinde henüz herhangi bir rolü saptanmış değildir (20).

2.8.1.Hücre Ploidilerine Etkileri

Hücreler Aurora kinaz yokluğunu tolere edemezler. Aurora A yokluğunda, sentrozomlar bipolar iğlerde toplanmakta başarısız olurlar.

İğ ipliklerinin oluşumu boyunca, kardeş kromatidler kohesinle bağlı kalır. Duplike olmuş kromozomların herbirinin kardeş kromatidlerinde, sentromer bölgesinde yeni mikrotübül düzenleyici merkez olan kinetokor gelişir. İğ iplikçikleri kromatid göçüne hazırlık için kinetokora bağlanırlar. Bütün kinetokorlar mikrotübüllere bağlanana kadar, iğ ipliği kontrol noktaları (SAC) metafaz anafaz geçişini inhibe eder (29).



Şekil 2.9. Metafaz-Anafaz Geçisinde İğ Defektleri (Kaynak 29'dan değiştirilerek alınmıştır)

Çift kutuplu iğ oluşumu boyunca Aurora B'nin fonksiyonu, kinetokor çiftlerinin mikrotübüllere anormal şekilde bağlanmasını düzeltmektedir. Normal durumda karşılıklı sentrozomların kardeş kinetokorlara amfitelik bağlanması (Şekil 2.9 b,3), iğ ipliği kontrol noktasının kapanmasına ve normal bir anafaza (Şekil 2.9 b,7) öncülük eder. Monotelik bağlanmanın varlığında (sadece tek bir kinetokorun tek bir kutba bağlandığı durumdur) (Şekil 2.9 b,2) yada sintelik bağlanma (her iki kardeş kinetokorun tek kutba bağlandığı durum) (Şekil 2.9 b,1) hallerinde, iğ iplikçisi kontrol noktası açık kalır ve kardeş kromatidlerin ayrımı gerçekleşemez. Ancak, Aurora B' nin yokluğunda, anormal merotelik bağlanmalar iğ ipliği kontrol noktası tarafından tespit edilemez, anafaz ilerler (Şekil 2.9 b,5) ve anöploidiler ortaya çıkar. (Şekil 2.9 b,6)

Aurora A, sentrozom maturasyonu ve iğ ipliği oluşumundan sorumludur. Aurora A' nin eksikliğinde bir çok iğ iplikçisi defekti ortaya çıkar (Şekil 2.9, a). Kutuptaki sentrozomlar ile tek kutuplu iğ ipliği oluşumu (Şekil 2.9 a,1), her bir kutuptaki

sentrozom ile çok kutuplu iğ oluşumu, monoastral çift kutuplu iğlerin tek kutubunda sentrozom eksikliği (Şekil 2.9 a,3), çift kutuplu iğ oluşumu ve kutuplarda bir çok sentrozom oluşumu (Şekil 2.9 a,4) ortaya çıkabilir (29).

Aurora A'nın indüklediği poliploid hücreler P53-RB yolağına bağlı post mitotik kontrol noktasında bekletilir ve hücrelerin bir çoğu apoptoza yönlendirilir. Ancak bu hücrelerde P53 kaybı olduğu zaman, hiperploidler tespit edilemez ve DNA replikasyonuna ve hücre bölünmesine giderler. Bu durumda anormal sentrozom sayısına sahip anöloid hücreler oluşmaktadır.

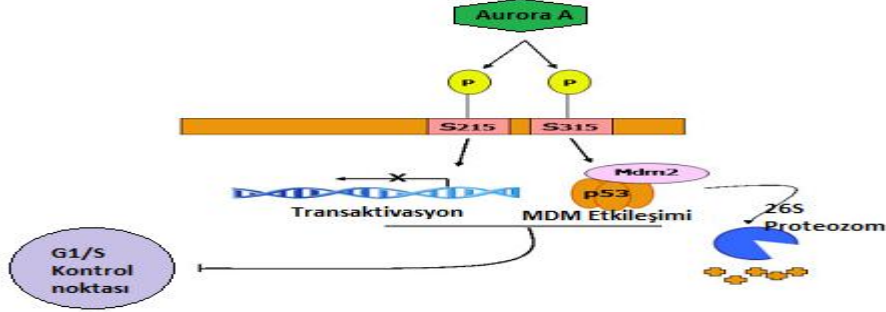
Aurora B'nin artmış ekspresyonu (overekspresyon), artmış ploidlere neden olmaktadır. Defektli bir P53 ise fenotipin şiddetini arttırmaktadır. Aurora B aşırı ekspresyonunun metafaz gerilemesine, kromozom segregasyon hatalarına ve sitokinez hatalarına neden olarak karsinogenezi indüklediği rapor edilmiştir (20,28)

2.8.2.Diğer Yolaklarla İlişkileri

Auroraların herhangi birinin aşırı ekspresyonu sadece çoklu sentromer içeren poliploid hücrelerin oluşumuna neden olmaz, aynı zamanda kinazların gereksiz aktivite göstermesine de neden olur (29).

Aurora A; P53, BRCA1, NM23-H1 gibi tümör baskılayıcı gen ürünleriyle ilişki içerisindedir. Aurora A'nın P53 ile etkileşimi en iyi bilinen etkileşimdir. P53, Aurora A indüklü sentrozom amplifikasyonunu ve hücrel dönüşümü baskılamaktadır (28).

Aurora A, P53 yolağını iki şekilde etkilemektedir. İlki p53'ü Ser315'den direkt olarak fosforilleyerek kanser hücrelerinde p53'ün MDM-2 yoluyla degradasyonunu kolaylaştırır. Aynı zamanda p53'ü Ser215'den fosforilleyerek transkripsiyonel aktivitesini baskılar (20,37).(Şekil 2.10)



Şekil 2.10. Aurora A' nın P53 Üzerindeki Etkisi (*Kaynak 36'dan değiştirilerek alınmıştır*)

Aurora kinaz A aşırı ekspresyonunun, P53 gen defekti olan kanser hücrelerinde, TAP73'ü baskıladığı bildirilmiştir. TAP73, P53 ailesinin bir üyesidir ve P53 ile önemli derecede homoloji göstermektedir. TAP73, sitotoksik ajanlarla indüklenen apoptozda rol oynamaktadır. AURKA aşırı ekspresyonu ile P53 ve TAP73'ün baskılanması, tümör hücrelerinde apoptozu baskılamaktadır (20).

Aurora A aşırı ekspresyonunun, SAC'ı etkileyerek de tümöregeneze sebep olabileceği düşünülmektedir. Fakat Aurora A'nın bu kontrol noktasında direkt olarak rolü tanımlanmamıştır. Aurora B'nin SAC içindeki rolü bilinmektedir ve Aurora Kinazlar benzer fosforilasyon motiflerine sahiptirler. Bu durum Aurora A aşırı ekspresyonunun, diğer Aurora kinazların hücre içindeki fonksiyonlarını da etkileyerek tümöregeneze neden olabileceğini düşündürür.

Aurora A' nın aşırı ekspresyonu (overekspresyon), sadece anormal mitozu neden olmaz aynı zamanda P53 bağımlı G1 post mitotik kontrol noktalarından kaçışı da sağlar. Sadece aktif Aurora A, primer hücrelerde poliploidiye neden olabilir. İnaktif Aurora A' nın aşırı ekspresyonu anormal iğleri, uzamış mitozu, G1 kontrol noktalarında arresti ve hücre ölümünü tetikler. Buna karşılık aktif Aurora A'nın overekspresyonu anormal

iğleri ki bu yolla uzamış mitozu tetikler, fakat hücreler yaşamaktadır. Çünkü aktif Aurora A, P53 ürününü inaktive ederek degradasyonuna neden olur (29).

Aurora B'nin artmış ekspresyonu, kromozom segregasyon hataları ve yanlış sitokineze neden olarak kanser üzerinde etki göstermektedir. AURKB, hücre dönüşümünü tek başına gerçekleştirmez, fakat H-RAS yolağını indükleyerek bu dönüşümü sağladığı tespit edilmiştir (20).

2.8.3. Prognozdeki Önemleri

Kromozom 20q13 amplifikasyonu ilk olarak meme kanserlerinde ortaya konulmuştur. Primer tümör hücrelerinin bu amplifikasyonla, %12 -40 arasında arttığı belirlenmiştir. Ayrıca Aurora A amplifikasyonu, meme kanserlerinde kötü prognoz olarak bildirilmiştir (22). Primer kolorektal tümörlerin %54'ünde, 4 ila 28 kat arasında mRNA artışı gözlenmiştir (5). Aurora A overekspresyonu, tümör invazivliği ve mutant p53 proteini birikimi arasında yüksek derecede ilişki gözlenmiştir (60).

Mesane karsinomları, tiroid kanserler, gastrik karsinomlar gibi kanser tiplerinde anöploidiler kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir. Aurora A aşırı ekspresyonu ve anöploidiler arasında yüksek korelasyon gözlenmekte olduğundan, bu aşırı ekspresyonda kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (20).

Bölümümüzde 2011 yılında gerçekleştirilen bir çalışmada mesane tümörlerinde AURKA ve AURKB genlerindeki değişimler FISH analizi ile incelenmiştir. Çalışma sonucunda AURKA genindeki yüksek amplifikasyonlar ve AURKB genine ait delesyonlar ile yüksek tümör derecesi arasında ilişki gözlenmiştir (61).

Aurora B'nin kolon, meme, akciğer, prostat kanserlerinde aşırı ekspresyonu gözlenmiştir. Artmış AURKB, kolorektal kanserlerin ilerlemiş evrelerinde gözlenmektedir. AURKB aşırı ekspresyonu, çoklu nükleusa ve poliploidilere sebep olmaktadır (20).

Aurora A aşırı ekspresyonu ve yüksek dereceli tümörler arasında önemli korelasyon gözlenmiştir. Bu da Aurora kinazların önemli bir prognostik faktör olabileceğini akla getirmektedir (22). Over kanserlerinde yapılan bir çalışmada, Aurora A'nın terapötik bir hedef olabileceği de savunulmaktadır (40).

2.9. Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH)

Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH), nükleik asit problemleri aracılığı ile preparat üzerinde bulunan hücresel yada kromozomal DNA veya RNA'nın incelenmesi temeline dayanan bir tekniktir. Moleküler sitogenetik metodları (ISH, FISH, CGH) klasik sitogenetik yöntemlerle tanımlanamayan kromozomal mikroadesyonlar ve yeniden düzenlenmeleri ortaya koyma olanağı sağlar. Bu yöntem aracılığıyla 1-3Mb arasında olan yapısal düzensizlikler saptanabilmektedir (21).

İlk kez 1969 yılında Gall ve Pardeu tarafından gerçekleştirilen sitolojik preparatlarda RNA'nın DNA ile hibridizasyonu, işaretlenmiş DNA dizilerinin sitolojik preparatlarda lokalize olduklarını göstermişlerdir. Büyümekte olan hücrelere tritium verilmiş ve işaretli nükleik asitler nükleer emülsiyon aracılığı ile belirlenmiştir (3).

Bu tekniğin özellikle kanser genetiğinde kısa sürede geniş uygulama alanı bulmasının temel nedeni interfaz nükleuslarında DNA/RNAYA ilişkin bilgilerin hücresel

ortamda belirlenebiliyor olmasıdır. Günümüzde gerek araştırma amaçlı gerekse tanı amaçlı yaygın olarak kullanılmaktadır.

Son yıllarda yapılan çalışmalar da mesane kanserlerinde FISH tekniğinin genetik değişiklikleri belirlemede etkin bir yöntem olduğu görüşünü desteklemektedir. Lokeshwar ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada FISH' in duyarlılığı %69-87 olarak bulunmuştur. Çalışmada düşük derece ve evre olan olgularda duyarlılığın daha düşük olduğunu ancak yüksek derece ve evre tümörlerin tespitinde duyarlılığın oldukça yüksek olduğu (%83-97) tespit edilmiştir. CIS tespitinde ise duyarlılığın tama yakın olduğu, özgüllük ise %80-95 olarak bildirilmiştir. (4,31).

Urovysion FISH analizi (Urovysion Systems Vysis, Abbott) mesane kanserinde sıklıkla kromozomal değişimlerin görüldüğü bölgelere yönelik problemlerle (CEP 17, CEP 3, CEP 7 ve LSI 9p21) yapılan FISH testidir. Urovysion testinin mesane kanseri tanısındaki değeri Mowatt ve ark. tarafından 2010 yılında 12 çalışmanın (Toplam 2535 hasta) analizi yapılarak değerlendirilmiştir. Duyarlılık %76, özgüllük ise % 85 olarak bildirilmiştir (10).

Bölümümüzde mesane yıkama sıvıları ve idrar örneklerinde 2007 yılında gerçekleştiren bir çalışmada, FISH tekniğinin değişici hücre karsinomu tanısı koymada spesifikliğı %100, sensitivitesi ise mesane yıkama sıvılarında %96.7, idrar örneklerinde %92.6 olarak hesaplanmıştır (19).

FISH analizlerinin ürotelyal karsinom tanısında ve takibinde kullanımı yaygın olmakla birlikte özellikle invaze olma potansiyeli olan olgularda erken tanıyı sağlayacak yeni markerlerin arayışı sürmektedir.

3. GEREÇ ve YÖNTEMLER

3.1. Gereç

3.1.1. Araştırma Grubu Bireyleri

Çalışmamız mesane kanserlerinde Aurora Kinaz A ve Aurora Kinaz B gen değişikliklerini incelemek amacıyla Ocak 2010 ve Mart 2011 tarihleri arasında Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalında gerçekleştirilmiştir. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı ve Yunus Emre Devlet Hastanesi Üroloji Kliniği tarafından, mesane kanseri tanısı konan 28 olgunun mesane yıkama sıvıları ile 10 normal mesaneli kontrol bireyinden alınan mesane yıkama sıvılarında FISH analizi ile AURKA ve AURKB lokusları ile kromozom 7, 10 ve 17 sentromer kopya sayısı değişiklikleri analiz edilmiştir.

3.1.2. Kullanılan Gereçler

Elektronik terazi (Seuter, Ainworth-AA-250)	pH Metre (Jenco)
Deep-Freeze (Heraeus)	Su banyosu (Nüve)
Etüv (Friocell MMM Med Center)	Floresan mikroskop (Olympus BX-61)
Vortex (Janke and Kunkel, UF-2)	Image Analyser (Cytovysion 3.93)

Sensys kamera (Sensys)	Zaman Ayarlı Santrifüj (Heraeus)
Mikropipet (Eppendorf)	Pipet uçları
Mikrosantrifüj(Eppendorf Centrifuge 5415)	Kronometre Eppendorf tüpü (1,5 ml lik)

3.1.3. Cam Malzemeler

Beher (500 ml, 1000 ml)	Mezür
Erlenmayer (500 ml, 1000 ml)	Yatay ve dikey Şale

3.1.4. Kimyasal Maddeler

Ethonol (Merck)	NaCl (Merck)	KCl
DAPI (Sigma)	NaOH (Merck)	Rubber Cement (Marabu Fixo gum)
HCl (Merck)	KH ₂ PO ₄ (Merck)	
Immersiyon yağı (Merck)	Glacial Acetic Acid (Meck)	Tween 20 (Sigma)
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ .2H ₂ O (Carlo Erba)	Methanol (Meck)	VECTASHIELD Mounting Medium (Vector Labs)

3.1.5.Kullanılan Problar

LSI AURKA (20q13) Spectrum Orange / 20q11 Spectrum Green

(Kreatech Cat.# KBI-10721)

LSI AUKRB (17p13) Spectrum Orange / CEP 17 Spectrum Green

(Kreatech Cat.# KBI-10722)

LSI EGFR / CEP 7 (Vysis)

LSI PTEN / CEP 10 (Vysis)

3.2.Yöntem

Mesane kanseri tanısı almış olgulardan ve normal kontrol grubundan alınan mesane yıkama örneklerinden elde edilen hücrelere interfaz FISH analizi uygulanmıştır.

3.2.1.Materyal Alımı

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı ve Yunus Emre Devlet Hastanesi Üroloji kliniğinde mesane kanseri tanısı almış 28 olgudan ve 10 normal mesaneli kontrol bireyinden, yaklaşık 50-100 ml mesane yıkama sıvısı steril kap içerisine alınmıştır. Örnekler alındıktan sonra Anabilim Dalımız Sitogenetik Laboratuvarına ulaştırılmıştır.

3.2.2.Örneklerin FISH Analizine Hazırlanması

1. Boşaltılmış mesane yıkama örnekleri 10 ml ekim tüplerine aktarılmıştır.
2. Örnekler 10 dakika santrifüj edilip süpernatant atılmıştır.
3. Hücreler 10 ml PBS solüsyonu ile yıkanıp, tüpler 1300 rpmde 8 dakika santrifüj edilip süpernatant atılmıştır.
4. Pelet üzerine önceden 37 °C'ye getirilmiş hipotonik (0.075 M KCL) solüsyonundan 5 ml ilave edilerek 37 °C' de 25-30 dakika inkübe edilmiştir.
5. Süre sonunda vortex eşliğinde taze hazırlanmış Carnoy's Fiksatif Solüsyonundan 10 damla ilave edilerek 1300 rpmde 8 dakika santrifüj edilip süpernatant atılmıştır.
6. Pelet üzerine 5 ml Carnoy's Fiksatif Solüsyonu ilave edilerek 1300 rpmde 8 dakika santrifüj edilip süpernatant atılmıştır.
7. 6.basamak 3 defa tekrarlanmıştır.
8. Tüplere 5 ml Carnoy's Fiksatif Solüsyonu ilave edilmiş ve kapakları kapalı şekilde buzdolabında -20 derece FISH analizi yapılmak üzere saklanmıştır.
9. Elde edilen örnekler pozitif şarjlı lamlara yayılarak bir gece oda ısısında yaşlanmaya bırakılmıştır. (27. kaynaktan uyarlanmıştır)

3.2.3. FISH Analizi

3.2.3.1. FISH Tekniğinin Uygulanması

FISH tekniğinde Rieder ve arkadaşları tarafından geliştirilen protokol modifiye edilerek uygulanmıştır (52).

3.2.3.1.1. Preparatların Ön Yıkaması ve Denatürasyonu

Preparatlar birer dakika olmak üzere sırasıyla % 100- %70- %50- %30 luk alkol serisinden ve 0,1XSSC solüsyonundan geçirilerek dehidre edilmiştir. Dehidratasyon sonrası preparatlar 70 °C deki 2XSSC solüsyonunda 30 dakika inkübasyona bırakılmışlardır. Süre sonunda içerisinde preparatların bulunduğu 2XSSC solüsyonu içeren şale soğuk su içerisine konulmuş ve solüsyon ısısının 37 °C'ye gelmesi sağlanmıştır. Sıcaklığı 37 °C'ye düşen 2XSSC içerisindeki preparatlar oda sıcaklığında bulunan 0,07 M'lık NaOH solüsyonuna alınmış ve birer dakika bekletilerek denatüre edilmişlerdir. Denatürasyonu takiben oda sıcaklığında bulunan 0,1XSSC ve ardından +4 °C'de olan 0,1XSSC ve 2XSSC solüsyonlarında birer dakika bekletilerek dehidratasyon işlemi tamamlanan preparatlar sırasıyla %30- %50- %70- %100'lük alkollerde birer dakika bekletilmişlerdir.

3.2.3.1.2.Prob Denatürasyonu

- Çalışmamızda kullanılan problemlerin üretici firmalar tarafından öngörülen denatürasyon prosedürleri uygulanmıştır. LSI EGFR / CEP 7, LSI PTEN / CEP 10, (Vysis) problemler 70 °C'de 5 dakika, LSI AUKRB (17p13) / CEP 17, LSI AURKA (20q13) / 20q11 (Kreatech) problemler 80°C'de 10 dakika bekletilerek denatüre edilmişlerdir.

3.2.3.1.3. Hibridizasyon

Probun bulunduğu ependorf tüpü santrifüj edilerek tüm probun dibe çökmesi sağlanmıştır. Denatüre edilen preparatlarda belirlenen alana prob (5 µl) eklenmiş ve

üzerlerine 24 mm'lik lamel kapatılmıştır. Lamel çevresi su girmemesi için rubber cement ile yalıtılmıştır. Preparatlar 37 °C'de nemli ortamda iki gece hibridizasyona bırakılmışlardır.

3.2.3.1.4. Hibridizasyon Sonrası Yıkamalar

Bu yıkamalarda spesifik olarak bağlanmayan prob DNA'sının ortamdan uzaklaştırılması ve olgu DNA'sına tam komplementer olan (% 80–100) dizilerin hedef bölgede sabit hale getirilmesi amaçlanmaktadır. Bu amaçla gerçekleştirilen aşamalarda prob üretici firmaların prosedürleri değiştirilerek aşağıdaki gibi uygulanmıştır.

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

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

- Preparatlar 1XSSC solüsyonu ile 74 °C'de 5 dakika bekletilmişlerdir.

- Takiben 2XSSC/T-20 solüsyonunda 5 dakika bırakılmışlardır

3.2.3.1.5. Hibridize Olan Bölgelerin Görüntülenmesi

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

Hibridizasyon sonrası yıkamaları yapılan preparatlar 4XSSC/DAPI solüsyonunda iki dakika bekletilmiş, süre sonunda 20 µl yüzey boyası (VECTASHIELD Mounting Medium) damlatılıp lamel kapatılmıştır. İnceleme aşamasına kadar preparatlar – 20 °C de ve karanlıkta bekletilmişlerdir.

3.2.3.1.6. Preparatların Mikroskopta İncelenmesi

Preparatlar Olympus BX-61 Floresan mikroskobunda uygun filtrelerle incelenmiştir. Floresan mikroskoba bağlı soğutmalı kamera ve görüntü analiz sistemi (Applied Imaging) aracılığıyla her olguya ilişkin FISH analiz verileri incelenmiş, fotoğraflanmış ve arşivlenmiştir.

3.2.3.1.7. Değerlendirme

Mesane kanseri tanısı alan ve kontrol grubu olarak kullanılan olguların mesane yıkama örneklerinden hazırlanan preparatlara FISH analizi uygulanmış olup her olgu için ortalama 100 hücre değerlendirilmiştir. Sinyal değerlendirmeleri yapılırken birbirine çok yakın sinyaller ve sinyal çap büyüklüğü birbirlerinden farklı olan (iki katı ya da daha fazla) değerlendirmeye alınmamıştır.

FISH pozitifliği değerlendirmeleri yapılırken ;

AURKA gen kopya sayısı artışları iki grupta incelenmiştir;

3-4 kopya sayısı içeren hücreler düşük amplifiye,

>4 kopya içeren hücreler yüksek amplifiye olarak sınıflandırılmıştır.

Değerlendirilen tüm hücrelerin %5' inden fazlasında amplifikasyon gözleendiğinde amplifikasyon pozitif olarak değerlendirilmiştir (47).

AURKA ve AURKB gen kopya sayısı değişikliklerinin kontrol bölgelerine özgü problemler ile birlikte değerlendirilmesi, anomalinin kromozom ve/veya gen düzeyinde olduğunu ortaya koyması açısından önem taşımaktadır. Ayrıca CIN açısından hücrelerin incelenebilmesi için kromozom 17 ve 20 ye ek olarak kromozom 7 ve 10'a ait incelemelerde yapılmış, incelenen 7, 10, 17 ve 20. kromozomlardan;

En az ikisine ait, iki farklı sayısal anomali içeren hücreler CIN pozitif,

Anormal hücre sayısının tüm sayılan hücrelerin %10 ve üzerinde görülmesi durumunda, bu olgular CIN pozitif olarak değerlendirilmiştir.

AURKB geninin iki sinyalden daha az gözlenmesi durumunda, hücreler AURKB delesyonu olarak değerlendirilmiş, sayılan toplam hücre sayısının %5 'inden fazlasında AURKB delesyonu gözlenmiş ise olgu AURKB delesyonu pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Hücrelerde AURKB kopya sayısının 2 katı yada daha fazla sayıda CEP 17 sinyali görülmesi durumunda, hücreler CEP 17 aberasyonu pozitif olarak değerlendirilmiştir.

3.2.4. İstatistiksel Analiz

SPSS 15.0 istatistik programında χ^2 istatistik testi kullanılarak hastaların tümör dokularının histopatolojik durumu ile çalışmada saptanan genetik anomaliler ve gözlenen genetik anomalilerin birbirleri ile arasındaki ilişkiler araştırılmıştır. Fisher's Exact Testine göre p değerleri hesaplanmıştır. $P < 0.05$ düzeyi istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Ayrıca tümör evreleri ve genetik anomalilerin karşılaştırılması için Two-Sample Kolmogorov-Smirnov Testi kullanılmış $p < 0.05$ düzeyi istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3.3.Kullanılan Stok Solüsyonlar

Tablo3.1. Carnoy's Fiksatif Solüsyonu

Metanol	3 kısım
Glasiyal Asetik Asit	1 kısım

Tablo 3.2. Preparatların Ön Yıkama Solüsyonları

<u>20XSSC Solüsyonu</u>		<u>0,1XSSC Solüsyonu</u>	
NaCl (3 M)	175,3 gr	20XSSC	3 ml
Tri Sodyum Sitrat (0,3 M)	88,24 gr	Distile su	597 ml
Distile su	1000 ml	Tüm solüsyonlar HCl ile pH 7.0 a ayarlanır.	

Tablo 3.3. Preparatların Denatürasyon Solüsyonu

<u>0,07 M NaOH</u>	
1M NaOH	14 ml
Distile su	200 ml

Tablo 3.4. Hibridizasyon Sonrası Solüsyonlar

<u>1XSSC Solüsyonu</u>	
20XSSC	10 ml
Distile su	190 ml
<u>2XSSC Solüsyonu</u>	
20XSSC	20 ml
Distile su	180 ml
<u>2XSSC/Tween-20 Solüsyonu</u>	
20XSSC	20 ml
Tween 20	100 µl
Distile su	180 ml

Tablo 3.5. Görüntüleme Sistemleri Solüsyonu

<u>DAPI/Antifade Solüsyonu</u>	
2XSSC	20 ml
DAPI	100 µl
Distile su	80 ml

4. BULGULAR

Çalışmamız Ocak 2010 ve Mart 2011 tarihleri arasında Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı'ndan ve Yunus Emre Devlet Hastanesi Üroloji Kliniği'nden gelen, mesane kanseri tanısı almış 28 olguya ait 30 mesane yıkama sıvısı (iki olguda rekürrens örnekleri de dahil) ve 10 normal mesane dokusuna sahip bireyden alınan mesane yıkama sıvıları ile Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir.

Çalışmamızda AURKA ve AURKB genleri ile kromozom 7, 10 ve 17 ve 20' nin mesane kanserinde gözlenen kopya sayısı değişimlerinin saptanması, bu değişimlerin tümör evre ve derecesiyle arasındaki bağlantıların kurularak mesane kanseri progresyonu hakkında önceden bilgi edinebilmek, yarı invaziv bir yöntemle elde edilen tümör hücrelerinin FISH ile belirlenebilirliğinin ortaya konması amaçlanmıştır.

Çalışmaya dahil edilen 28 hastanın, 26 tanesi erkek 2 tanesi kadındır. Olguların yaş ortalaması $67,20 \pm 1,65$ 'dir. Hastaların histolojik tanısı ve tümör derecelendirmesi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı ve Yunus Emre Devlet Hastanesi Patoloji Bölümleri tarafından AJCC/TNM Sınıflandırma Sistemi ve 1998/2004 WHO/ISUP Sınıflandırma Sistemine göre yapılmıştır. Tablo 3.1'de çalışma grubunun yaş, cinsiyet ve histopatolojik verileri detaylı olarak gösterilmiştir.

Çalışma grubu olgularından alınan örneklerin 19 tanesi düşük dereceli, 11 tanesi yüksek dereceli tümör olarak sınıflandırılmıştır. Klinik evreleri ise yirmi tanesi Ta, dört tanesi T1, dört tanesi T2, iki tanesi de T4 şeklindedir. Hastaların tümör derecelerinin yüzdelik dağılımı şekil 4.1, klinik evrelerinin yüzdelik dağılımları ise şekil 4.2'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1: Çalışma Grubu Hastalarının Yaş, Cinsiyet Ve Histopatolojik Aşamaları

HASTA NO	YAŞ	CİNSİYET	EVRE	DERECE	TANI
1	67	E	Ta	Düşük	ÜK
2	82	E	T1	Düşük	ÜK
3	68	E	T1	Düşük	ÜK
4	63	E	T1	Düşük	ÜK
5	60	K	Ta	Düşük	ÜK
6	67	E	Ta	Düşük	ÜK
7	77	E	Ta	Düşük	ÜK
8	71	E	Ta	Düşük	ÜK
9	61	K	Ta	Düşük	ÜK
10	56	E	T2	Yüksek	ÜK
11	79	E	Ta	Düşük	ÜK
12	68	E	T2	Yüksek	ÜK
13	52	E	Ta	Yüksek	ÜK
14	72	E	Ta	Düşük	ÜK
15	73	E	T4	Yüksek	ÜK
16	79	E	T2	Yüksek	ÜK
17	71	E	T4	Yüksek	ÜK
18	58	E	Ta	Düşük	ÜK
19	63	E	T1	Yüksek	ÜK
20	61	E	T2	Yüksek	ÜK
21	66	E	Ta	Düşük	ÜK
22	77	E	T1	Yüksek	ÜK
23	63	E	Ta	Düşük	ÜK
24	72	E	Ta	Yüksek	ÜK
25	78	E	Ta	Düşük	ÜK
26	53	E	Ta	Düşük	ÜK
27	51	E	Ta	Düşük	ÜK
28	58	E	Ta	Düşük	ÜK
29	52	E	Ta	Düşük	ÜK
30	77	E	Ta	Düşük	ÜK

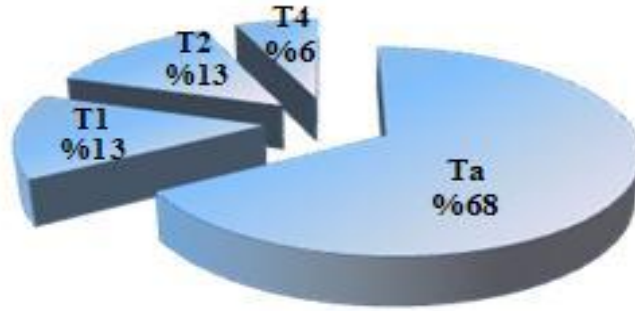
ÜK (Ürotelyal Karsinom)

7. örnek tekrarlayan tümörleri olan birinci olgunun ilk örneği, 22. örnek ise ikinci örneğidir.

11. örnek tekrarlayan tümörleri olan ikinci olgunun ilk örneği, 16. örnek ise ikinci örneğidir.



Şekil 4.1: Çalışma Grubu Örneklerinin Tümör Derecelerinin Yüzdeleri Dağılımları



Şekil 4.2: Çalışma Grubu Örneklerinin Tümör Evrelerinin Yüzdeleri Dağılımları

4.1. Yöntem ve Değerlendirmeye İlişkin Bulgular

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı'ndan ve Yunus Emre Devlet Hastanesi Üroloji Kliniği'nden gelen mesane kanseri tanısı almış 28 olgudan alınan 30 mesane yıkama sıvıları ile kontrol grubu amaçlı 10 normal mesaneli bireyden alınan mesane yıkama sıvıları FISH yöntemine hazır hale getirildikten sonra floresan işaretli DNA probları ile hibridizasyon gerçekleştirilmiştir. Hibridizasyon sonrası AURKA/20q11, AURKB/CEP 17, EGFR/CEP 7, PTEN/ CEP 10 bölgelerine özgü tasarlanan problardan alınan sinyaller analiz edilmiştir. Analiz edilen vakaların tümünden sonuç alınmıştır. Çalışmamızın başarı oranı % 100 olarak saptanmıştır.

Çalışmamızda, her olgudan ortalama 100 hücre analiz edilmiştir. Analiz edilen hücre sayısı , hücre miktarı ve görüntü kalitesine bağlı olarak değişiklik göstermiştir.

4.2. FISH Analiz Bulguları

Mesane kanseri tanısı konmuş 28 hastaya ait 30 örneğin FISH analiz bulguları hastaların derece ve klinik evrelerine bağlı olarak değişiklik göstermiştir. Kontrol grubunu oluşturan 10 bireyden alınan mesane yıkama sıvısı örneklerinde ise incelenen bölgeler açısından herhangi bir kopya sayısı değişikliği saptanmamıştır. Tablo 4.2'de incelenen bölgeler açısından hastalara ait değişimler verilmiştir.

Tablo 4.2: Çalışma Grubu Örneklerinin Histopatolojik Tanımları ve FISH Analiz Sonuçları
(Amp.: Amplifikasyon, Del: Delesyon)

Örnek No	Derece	Evre	CEP17 Aberasyonu	CIN	AURKA Amp.(Düşük)	AURKA Amp.(Yüksek)	AUKB Del.
1	Düşük	Ta	-	-	-	-	-
2	Yüksek	T1	-	-	-	-	-
3	Düşük	Ta	-	-	-	-	-
4	Düşük	T1	-	+	-	-	-
5	Düşük	Ta	-	-	-	-	-
6	Düşük	Ta	-	+	-	-	-
7*(1.ö)	Düşük	Ta	+	+	-	+	+
8	Düşük	Ta	-	-	-	-	-
9	Düşük	Ta	-	-	-	-	-
10	Yüksek	T2	+	+	-	+	-
11^(1.ö)	Düşük	Ta	+	+	-	+	+
12	Yüksek	T2	-	-	+	-	+
13	Yüksek	Ta	-	+	+	-	-
14	Düşük	Ta	-	-	+	-	-
15	Yüksek	T4	-	+	+	+	-
16^(2.ö)	Yüksek	T2	+	+	-	+	-
17	Yüksek	T4	-	+	+	+	-
18	Düşük	Ta	-	-	+	-	-
19	Yüksek	T1	-	+	+	+	-
20	Yüksek	T2	-	-	+	-	-
21	Düşük	Ta	-	-	-	-	-
22*(2.ö)	Yüksek	T1	-	+	-	+	-
23	Düşük	Ta	-	-	-	-	-
24	Yüksek	Ta	+	+	-	+	-
25	Düşük	Ta	+	+	-	-	+
26	Düşük	Ta	-	-	-	-	-
27	Düşük	Ta	-	-	-	-	-
28	Düşük	Ta	-	-	-	-	-
29	Düşük	Ta	-	-	-	-	-
30	Düşük	Ta	-	-	-	-	-

4.2.1. AURKA Gen Bölgesine Ait Bulgular

AURKA gen bölgesi incelemelerinde, amplifikasyon değerlendirmeleri iki şekilde gerçekleştirilmiştir;

3-4 kopyaya sahip olan hastalar düşük amplifikasyon,

>4 kopyaya sahip olan hastalar yüksek amplifikasyon

Bu değerlendirmeye göre hastaların %30'u yüksek amplifikasyon gösterirken, %27'sinde düşük amplifikasyon tespit edilmiştir. Bu amplifikasyonlar olguların tümör derecesi ve evresine bağlı olarak değişiklik göstermiştir.

Yüksek dereceli mesane kanserine sahip 11 örneğin %54,54'ünde yüksek amplifikasyon, %63,63'ünde ise düşük amplifikasyon saptanmıştır. 11 örnek içerisinde üç örnekte mozaik formda her iki amplifikasyon tipi de gözlenmiştir.

Düşük dereceli 19 örnekte ise %10,52 oranında düşük amplifikasyon ve aynı oranda yüksek amplifikasyon gözlenmiştir.

Olgularımızda gözlenen normal hücreler ait FISH görüntüleri Şekil 4.3' de, düşük ve yüksek amplifikasyonlara ait görüntüler Şekil 4.4' de gösterilmiştir.

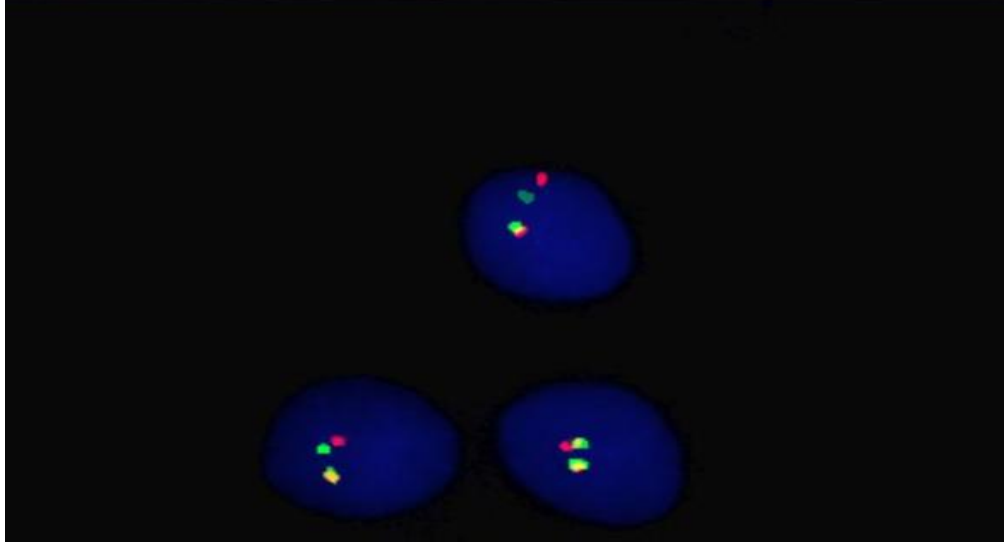
Tablo 4.3'de AURKA amplifikasyonlarının tümör dereceleri, Tablo 4.4'de ise klinik evreleri açısından değerlendirilmeleri sonucunda hesaplanan yüzdeler ve hasta sayıları gösterilmiştir.

Tablo 4.3. AURKA gen bölgesine ait değişimlerin tümör derecesine göre değerlendirilmesi

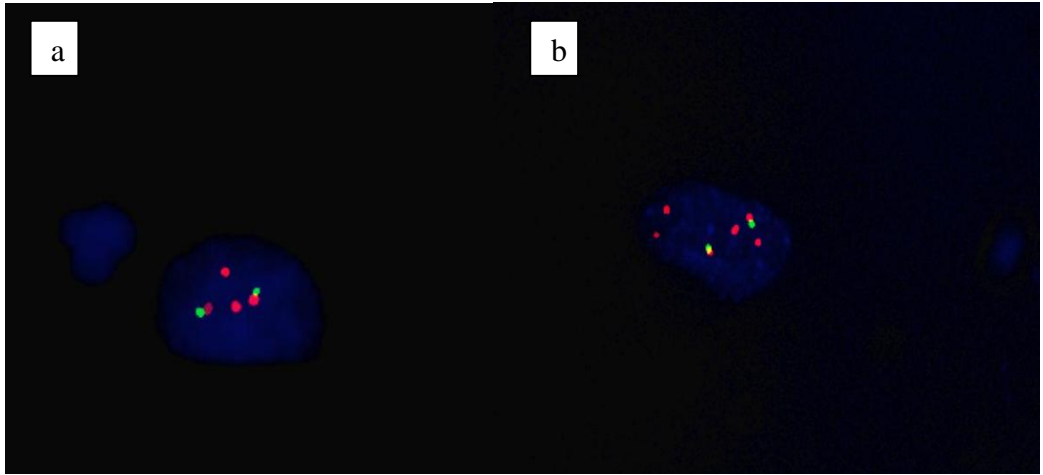
Patoloji	AURKA Amp. + (Düşük)	AURKA Amp. + (Düşük)	AURKA Amp. -
Düşük Derece	%10.52 (2/19)	%10.52 (2/19)	%78.94 (15/19)
Yüksek Derece	%54.54 (6/11)	%63.63 (7/11)	%9.09 (1/11)

Tablo 4.4. AURKA gen bölgesine ait değişimlerin tümör evresine göre değerlendirilmesi

Evre	AURKA Amp. + (Düşük)	AURKA Amp. + (Düşük)	AURKA Amp. -
pTa	%15 (3/20)	%15 (3/20)	%70 (14/20)
pT1	%25 (1/4)	%50 (2/4)	%25 (1/4)
pT2	%50 (2/4)	%50 (2/4)	0
pT4	%100 (2/2)	%100 (2/2)	0



Şekil 4.3. AURKA geni ve 20q11 için normal hücelere sahip olgu 3' e ait FISH görüntüsü (20q11 yeşil sinyal, AURKA kırmızı sinyal).



Şekil 4.4. AURKA geni düşük amplifikasyona sahip olgu 18'e ait FISH görüntüsü (a) AURKA geni yüksek amplifikasyona sahip olgu 10'a ait FISH görüntüsü (b) (20q11 yeşil sinyal, AURKA kırmızı sinyal)

4.2.2. AURKB Gen Bölgesine Ait Bulgular

Çalışmamızda, olgularımızın %13,3'ünde AURKB genine ait delesyon gözlenmiş olup çalışma grubumuzda en az gözlenen anomalidir. Ayrıca AURKB delesyonuna sahip dört olgunun hepsi CIN pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Delesyon pozitif olarak değerlendirilen 4 hastanın iki tanesinde rekürrens gözlenmiştir. Bu hastaların birinde; gelen ilk örnek düşük derece Ta olarak evrelendirilmiştir. Bu olgunun ilk örneğinde, AURKA yüksek amplifikasyonu, CIN ve AURKB delesyonu birlikte gözlenmiştir. İkinci örnek, yüksek derece T1 olarak evrelendirilmiştir. Bu örnekte de AURKA yüksek amplifikasyonu ve CIN pozitifliği saptanmıştır.

Rekürrens gösteren ikinci olgunun ilk gelen örneği için düşük derece Ta evrelemesi yapılmıştır. Yapılan FISH analizleri sonucunda AURKA yüksek amplifikasyonu, AURKB delesyonu ve CIN pozitifliği saptanmıştır. Olguya ait olan ikinci örnek ise yüksek derece T2 olarak evrelendirilmiş olup AURKA yüksek amplifikasyonu ve CIN pozitifliği gözlenmiştir.

Rekürrensin gözlendiği her iki olgunun ilk örneklerinde AURKB delesyonu, yüksek AURKA amplifikasyonu ile birlikte gözlenirken, AURKB delesyonunun gözlendiği ve çalışma verilerinin değerlendirildiği döneme kadar rekürrensin gözlenmediği diğer iki örnekte ise bu ortak bulguya rastlanmamıştır. Bir diğer ilginç bulgu da rekürrensin gözlendiği iki olgunun yüksek dereceli ikinci örneklerinde AURKB delesyonlarının olmamasıdır. Buradan AURKB delesyonunun erken evre

anomalisi olabileceği söylenebilir ki Tablo 4.5’ de de görüldüğü gibi düşük dereceli tümörlerde AURKB anomalisi görülme oranı daha yüksektir.

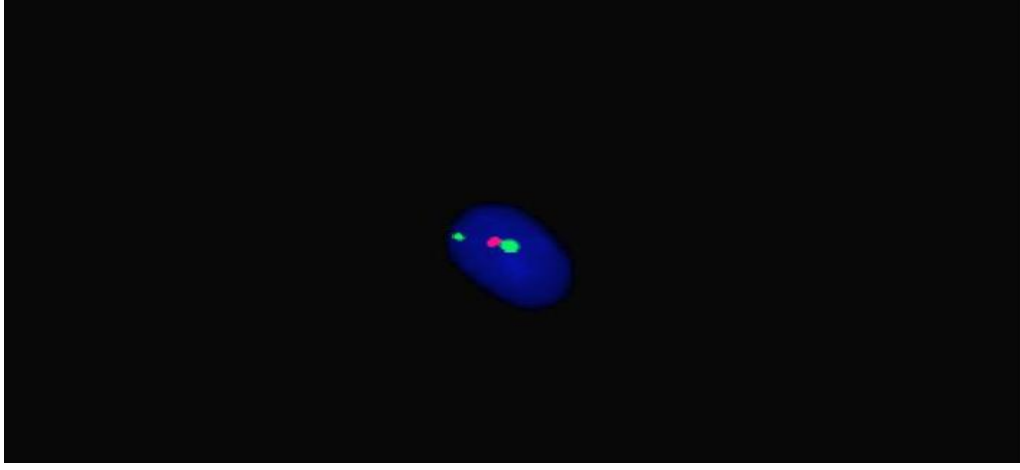
AURKB delesyonunun tümör derecesine bağlı olarak görülme oranı Tablo 4.5’de, klinik evreye göre görülme oranı Tablo 4.6’da verilmiştir.

Tablo 4.5. AURKB gen bölgesine ait değişimlerim tümör derecesine göre değerlendirilmesi

Patoloji	AURKB Del.+	AURKB Del.-
Düşük Derece	%15.78 (3/19)	%85.22 (19/16)
Yüksek Derece	%9.09 (1/11)	%90.91 (10/11)

Tablo 4.6. AURKB gen bölgesine ait değişimlerim tümör evresine göre değerlendirilmesi

Evre	AURKB Del.+	AURKB Del.-
pTa	%15 (3/20)	%85 (17/20)
pT1	0	%100 (4/4)
pT2	%25 (1/4)	%75 (3/4)
pT4	0	%100 (2/2)



Şekil 4.5. AURKB geni delesyonuna sahip olgu 11'e ait FISH görüntüsü

(CEP17 yeşil sinyal, AURKB kırmızı sinyal)

4.2.3. Kromozomal İnstabilitelere Ait Bulgular

Çalışmamızda kromozom 7, 10, 17 ve 20' ye ait sayısal değişiklikler incelenmiş ve bu kromozomlara ait üçten dokuza kadar değişen sayısal varyantlar belirlenmiştir.

İncelenen kromozomlardan, en az ikisine ait, iki farklı sayısal anomali içeren olgular CIN pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Çalışma grubumuzda kullandığımız 30 örnekten 13'ünde (%43), incelenen kromozom sentromerlerine ve gen bölgelerine ait sayısal anomaliler saptanmıştır. Bu olguların tümü incelenen kromozomlar açısından farklı klon tipleri göstermektedir. Özellikle trizomik ve tetrazomik klonların birlikteği düşük derece tümörlerde

gözlenirken, yüksek derece tümörler de bu anomalilere ek olarak polizomik klonlarda gözlenmektedir.

Çalışmamızda kromozomal instabilitelerin özellikle yüksek tümör derecesi ile miktarının arttığı tespit edilmiştir. Tetrazomik hücreler çoğunlukla AURKB delesyonu ile birlikte gözlenmiştir. Bunun yanısıra, CIN pozitif olarak değerlendirilen olguların %77'sine AURKA amplifikasyonlarından en az biri de eşlik etmektedir.

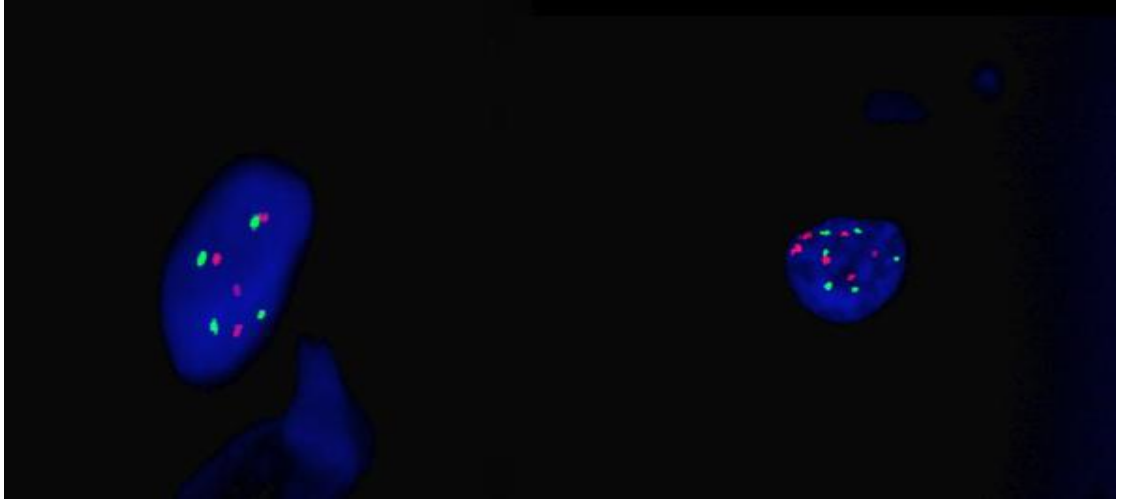
Kromozomal instabilitelerin (CIN) tümör derecesine bağlı olarak görülme oranı Tablo 4.7.' de, klinik evreye göre görülme oranı Tablo 4.8'de verilmiştir.

Tablo 4.7. Kromozomal instabilitelerin tümör derecesine göre değerlendirilmesi

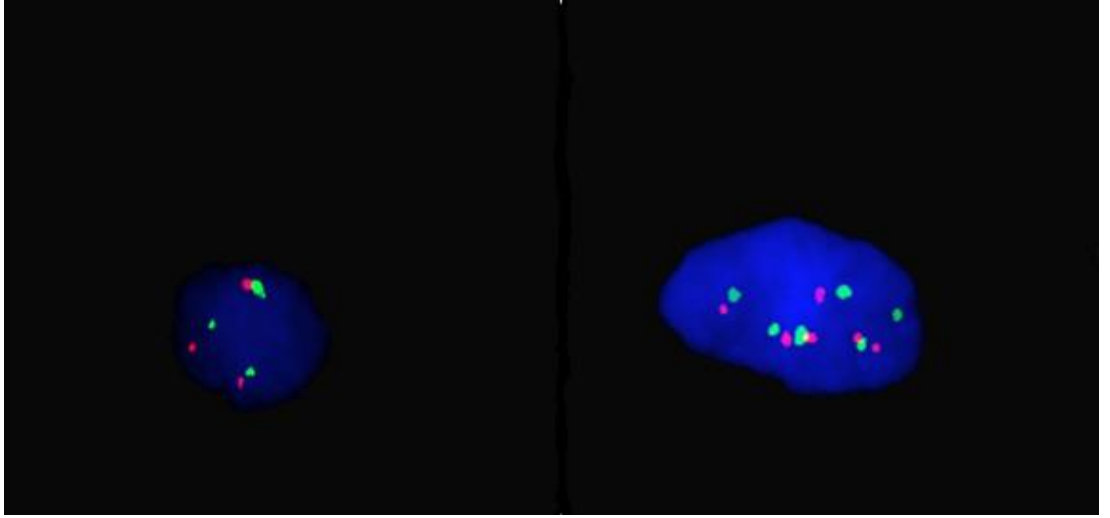
Patoloji	CIN +	CIN -
Düşük Derece	% 26.31(5/19)	%73.68 (11/19)
Yüksek Derece	%72.72 (8/11)	%27.28 (3/11)

Tablo 4.8. Kromozomal instabilitelerin tümör evresine göre değerlendirilmesi

Evre	CIN +	CIN -
pTa	%25 (6/20)	%75 (14/20)
pT1	%75 (3/4)	%25 (1/4)
pT2	%50 (2/4)	%50 (2/4)
pT4	%100 (2/2)	0

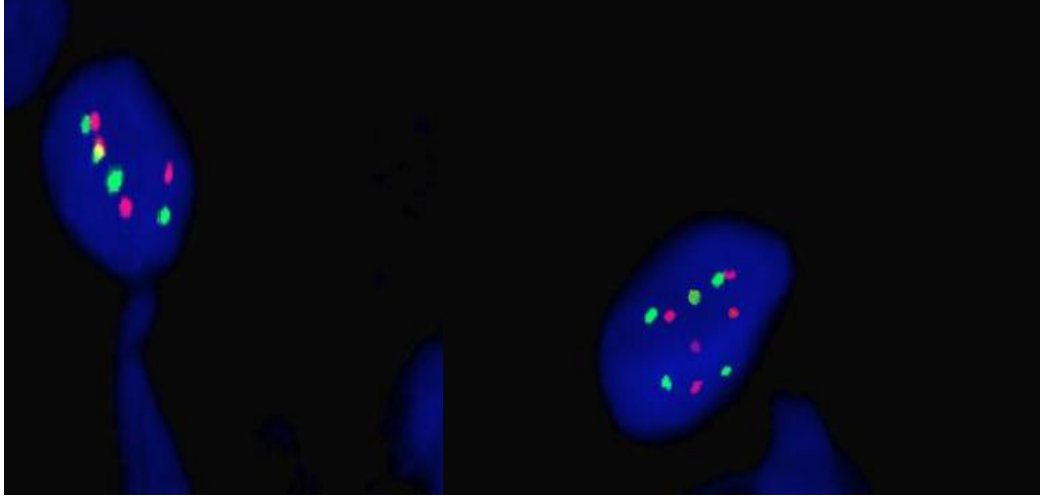


Şekil 4.6. CIN+ olarak değerlendirilen olgu 15'e ait tetrazomi 20 ve polizomi 17 FISH görüntüsü
(20q11 yeşil sinyal, AURKA kırmızı sinyal) (CEP17 yeşil sinyal, AURKB kırmızı sinyal)

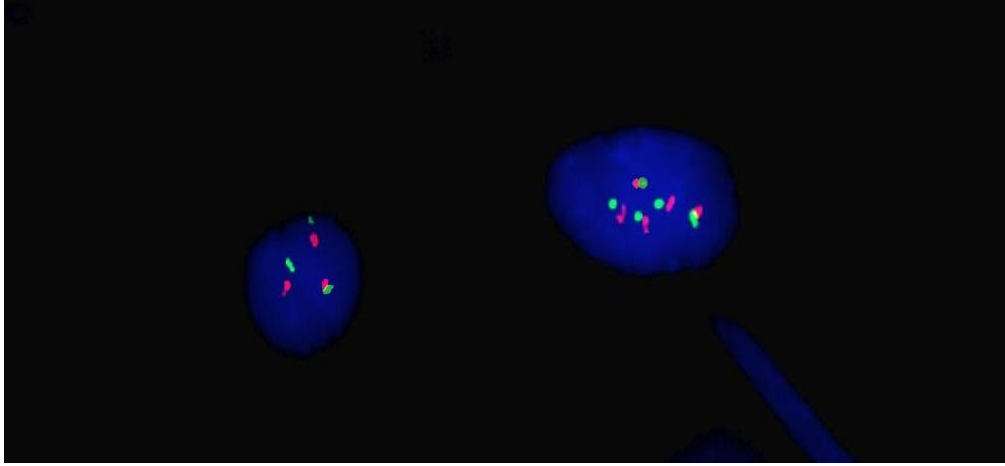


Şekil 4.7. CIN+ olarak değerlendirilen olgu 22'ye ait trizomi 17 ve polizomi 20 FISH görüntüsü

(CEP17 yeşil sinyal, AURKB kırmızı sinyal) (20q11 yeşil sinyal, AURKA kırmızı sinyal)



Şekil 4.8. CIN+ olarak değerlendirilen olgu 10'a ait tetrazomi 17 ve polizomi 7 FISH görüntüsü
(CEP 17 yeşil sinyal, AURKB kırmızı sinyal) (CEP 7 yeşil sinyal, EGFR kırmızı sinyal)



Şekil 4.9. CIN+ olarak değerlendirilen olgu 19'a ait trizomi 10 ve polizomi 20 FISH görüntüsü
(CEP 10 yeşil sinyal, PTEN kırmızı sinyal) (20q11 yeşil sinyal, AURKA kırmızı sinyal)

4.2.4. CEP17 Aberasyonlarına Ait Bulgular

Çalışmamızda AURKB geni kopya sayısı değişikliklerinin yanısıra, genin lokalize olduğu kromozom 17'nin kopya sayısı anomalileri de ayrıca değerlendirilmiştir. AURKB geni kopya sayısı değişikliklerinin sadece gene özgü mü, yoksa sentromer düzeyinde bir anomali mi olduğunu açıklığa kavuşturmamız gerekiyordu. İki AURKB floresan sinyal ile iki sentromer 17 sinyali normal olarak değerlendirilirken, iki sentromer sinyaline rağmen bir AURKB sinyali gen delesyonu, >3 sentromer sinyali ise kromozom 17 sentromer aberasyonu olarak yorumlanmıştır.

Kromozom 17 sentromerik bölge artışları toplam 6 örnekte gözlenmiş olup bu artışlar AURKB gen bölgesini içermeyen artışlar olarak saptanmıştır. Bu nedenle hücreler polizomik olarak değerlendirmeye alınmayıp, CEP 17 aberasyonu olarak yorumlanmıştır.

Çalışmamızda CEP 17 aberasyonu pozitif olarak değerlendirilen 6 örnek (%20) mevcuttur. Bu örneklerin 3 tanesi düşük dereceli tümöre sahip, 3 tanesi yüksek dereceli tümöre sahip olgulara ait örneklerdi. CEP 17 aberasyonu pozitif olarak değerlendirilen olguların hepsi aynı zamanda CIN pozitifliğine de sahip iken 5 örnekte bu iki anomaliye ek olarak AURKA yüksek amplifikasyonu da gözlenmiştir.

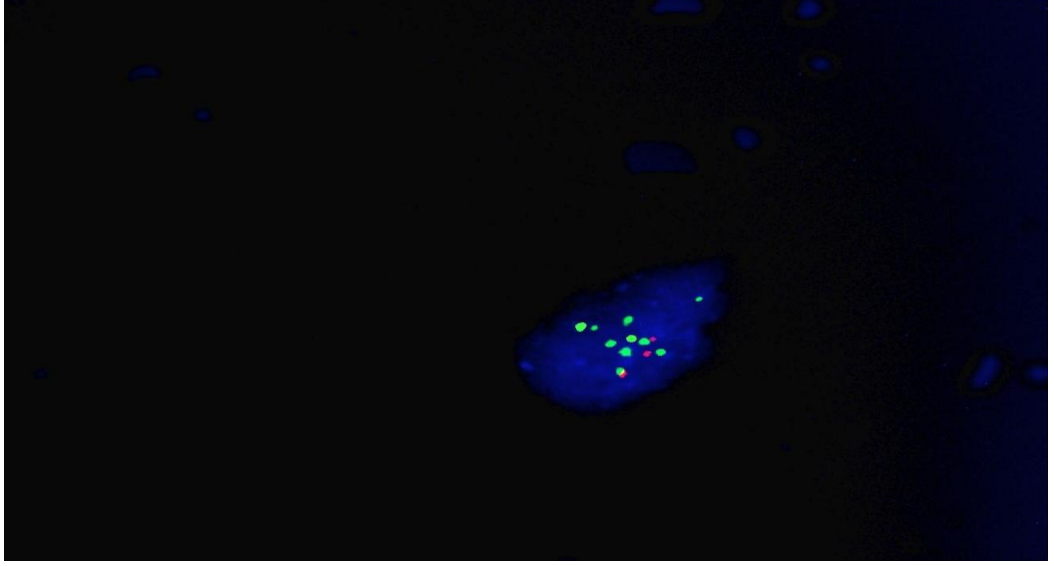
Tablo 4.9'da CEP17 aberasyonlarının olguların tümör dereceleri, Tablo 4.10'de ise klinik evreleri açısından değerlendirilmeleri sonucunda hesaplanan yüzdeler ve hasta sayıları gösterilmiştir.

Tablo 4.9. CEP 17 artışlarının tümör derecesine göre değerlendirilmesi

Patoloji	CEP 17 Artışı +	CEP 17 Artışı -
Düşük Derece	% 15.78 (3/19)	%84.22 (16/19)
Yüksek Derece	%72.73 (3/11)	%27.27 (8/11)

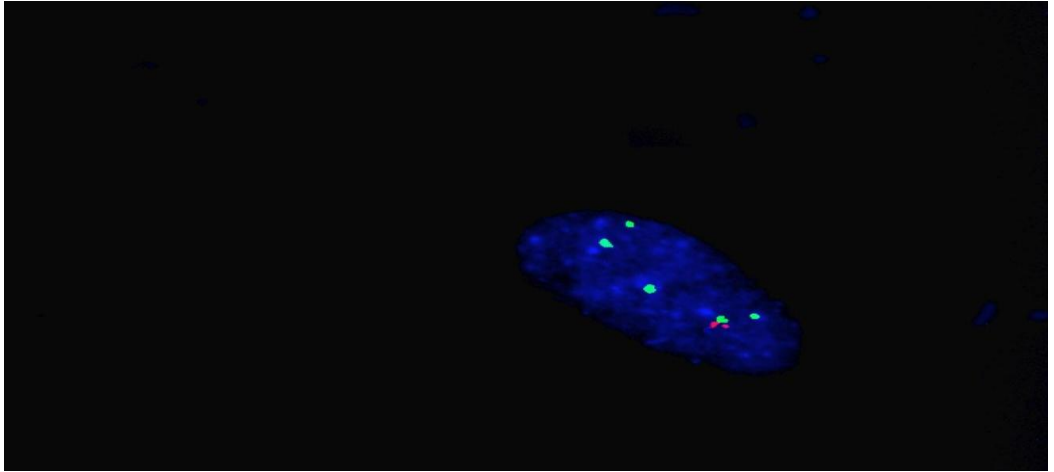
Tablo 4.10. CEP17 artışlarının tümör evresine göre değerlendirilmesi

Evre	CEP 17 Artışı +	CEP 17 Artışı -
pTa	%20 (4/20)	%80 (16/20)
pT1	0	%100 (4/4)
pT2	%50 (2/4)	%50 (2/4)
pT4	0	%100 (2/2)



Şekil 4.10. Olgu 24 'e ait CEP17 Aberasyonu FISH görüntüsü

(CEP17 yeşil sinyal, AURKB kırmızı sinyal)



Şekil 4.11. Olgu 16 'ya ait CEP17 Aberasyonu FISH görüntüsü

(CEP17 yeşil sinyal, AURKB kırmızı sinyal)

4.2.5. Patolojik Bulgular İle FISH Bulgularının Karşılaştırılması

Çalışmamızda 28 olguya ait 30 mesane yıkama örneğinin histopatolojik sınıflamaları Tablo 4.1' de verilmiştir. 30 örneğe ait patolojik incelemelerde örneklerin tamamına ürotelyol karsinom tanısı konulmuştur.

Yüksek derece mesane karsinomuna sahip olgularda AURKA amplifikasyonları ve CIN pozitifliği düşük derece olgulara oranla anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.

4.3. İstatiksel Verilerin Değerlendirilmesi

Çalışmamızda tespit edilen genetik anomaliler, histolojik derece ve tümör evrelerinin değerlendirilmesi için SPSS 15.0 istatistik programı kullanılmıştır. Fisher's Exact Testine göre p değerleri hesaplanmıştır. Ayrıca klinik evre ve genetik anomalilerin karşılaştırılması Two-Sample Kolmogorov-Smirnov Testi ile yapılmıştır.

Tüm bu parametrelere göre elde edilen istatistiksel sonuçlar değerlendirildiğinde, klinik evre ile CIN, AURKA yüksek amplifikasyonu, AURKA düşük amplifikasyonu, AURKB delesyonu ve CEP17 aberasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir ($P>0.05$).

Yapılan istatistiksel çalışmada olguların tümör dereceleri ile bulguların karşılaştırması sonucu bazı parametreler ve tümör derecesi arasında anlamlı sonuçlar elde edilmiştir (Tablo 4.11).

Tablo 4.11. Tümör Derecesi ve klinik evre ile FISH bulgularının istatistiksel değerlendirmesi

Patoloji	CEP17 Aberasyonu	CIN	AURKA Amp.(Yüksek)	AURKA Amp.(Düşük)	AURKB Del.
Derece	p >0.05	P <0.025	P <0.001	P <0.025	P >0.05
Evre	p >0.05	P >0.05	P >0.05	P >0.05	P >0.05

AURKA amplifikasyonlarının diğer FISH bulguları ile karşılaştırılması sonucunda, AURKA yüksek amplifikasyonlarının CIN ve CEP 17 aberasyonları ile birlikteliği anlamlı olarak değerlendirilmiştir (Tablo 4.12).

Tablo 4.12. AURKA amplifikasyonlarının diğer parametreler ile istatistiksel değerlendirmesi

	CIN	CEP17Aberasyonu	AURKB Del.
AURKA Amp (Yüksek)	P <0.001	P <0.05	P >0.05
AURKA Amp (Düşük)	P >0.05	P >0.05	P >0.05

5.TARTIŞMA

Mesane ürotelyal karsinomları tüm kanserler arasında %3.2 oranında saptanmakta olup erkeklerde kadınlardan daha sık görülmektedir (43). Tüm kanserler arasında mesane kanseri, tanıdan ölüme kadar geçen süreç içerisinde hasta başına düşen medikal maliyetin en yüksek olduğu kanser tipidir. Bu kadar yüksek harcama rekürrens oranının yüksek olması ve bir bölümünün progresyonu nedeniyle yapılan medikal tedavilerden kaynaklanmaktadır. Erken tanı ve öncü lezyonların belirlenmesi harcamaların azalmasını ve morbidite/mortalite oranlarının azalmasını sağlayacaktır

Tanı anında yaklaşık olarak % 70 olgu non-invazivdir ve bunların sadece %5-10'u infiltratif tümöre ilerlemektedir. Olguların %50-80'inde lokal rekürrens, %10-20'sinde progresyon gözlenmektedir (10,11).

Ürotelyal karsinomlar çoğunlukla farklı morfolojik ve klinik özelliklere sahip heterojen hücre popülasyonları karışımıdır. Tümörler lokal olarak tekrarlama eğilimindedirler fakat kasa invazyon ya da metastaz sıklığı oldukça düşüktür. Radikal sistektomi ve sistemik terapiye rağmen invaziv tümörlerin % 50 kadarı metastaz nedeniyle ölmektedirler. İlk tedavi sonrası hastalar için üç temel risk bulunur. Bunlar tümör rekürrensi, ileri evre /dereceye ilerleme ve tümör metastazıdır. Konvansiyonel klinik ve patolojik değerler tümörleri derecelendirmek ve evrelemek için kullanılmaktadır ve klinik seyir hakkında varsayımlarda bulunmaktadır. Ancak bu değerlerin tahmin derecesi sınırlı kalmakta, bireysel riskler hakkında bilgi verememektedirler. Bu nedenle son yıllarda tanı, tümör klasifikasyonu, prognoz ve tedaviye verilen bireysel yanıtlara ilişkin moleküler düzeydeki marker arayışlarında büyük gelişmeler dikkati çekmektedir. Bununla beraber, mesane kanserinde biyomarkerlerin nasıl etkin bir şekilde kullanılabileceğine ilişkin bilgilerimiz henüz çok

yetersizdir. Mesane kanserlerinde araştırılan yeni moleküler belirteçler hem klinik seyrin takibine, hemde geliştirilecek yeni tedavi yaklaşımlarına ışık tutacaktır.

Çalışmamızda 28 olgudan alınan 30 mesane yıkama sıvısında AURKA ve AURKB genlerine ait değişimler ile CIN durumu FISH yöntemi ile incelenmiş ve sonuçlar literatür eşliğinde tartışılmıştır.

5.1. FISH Yöntemi İle Saptanan Anomalilerle Literatür Bilgilerinin Karşılaştırılması

5.1.1. AURKA Gen Değişimlerinin Tümör Evre ve Derecesi ile Bağlantısının Literatür Bilgileriyle Karşılaştırılması

Çalışmamızda AURKA gen bölgesi için tespit edilmiş amplifikasyonlar Park ve arkadaşlarının yaptıkları çalışma referans alınarak iki grupta incelenmiştir.

Park ve arkadaşlarının, 2008 yılında mesane kanser tanısı almış hastaların ürin sedimentleri ve mesane tümörlerini kullanarak AURKA gen kopya sayısındaki artışın ve aşırı ekspresyonunun mesane kanserini belirlemede kullanılabilecek bir biyomarker olup olmadığını saptamak amacıyla; 23 mesane tümörü, 7 kontrol grubu olgusu ve 100 mesane kanserli hastadan alınan idrar örneği ve 148 kontrol grubu olgusu ile yapılan çalışmada RT-PCR, FISH ve immunohistokimyasal analizlerden yararlanmıştır. AURKA gen ekspresyon seviyesinin yüksek tümör derecesi ve anöploidilerle ilişkili olduğu saptanmıştır. Yapılan çalışmada amplifikasyon değerlendirmesi iki şekilde yapılmıştır. Hücrede 3 yada 4 kopya düşük amplifikasyon olarak değerlendirilirken, 4'ten fazla kopya sayıları yüksek amplifikasyon olarak yorumlanmıştır. Düşük derece

karsinomaya sahip olguların amplifikasyon düzeylerinin, yüksek derece karsinomlara sahip olguların amplifikasyon düzeylerine göre çok daha az olduğu gözlenmiştir. Kontrol örneklerinde AURKA gen sayısı normal olarak değerlendirilmiştir. AURKA gen amplifikasyonu ve aşırı ekspresyonunun yüksek dereceli mesane kanseriyle ilişkili olduğu saptanmıştır. Ek olarak yapılan çalışmanın bulgularına dayanılarak, AURKA FISH testinin mesane kanserini belirlemek açısından sitolojiden daha etkili olabileceği sonucuna varılmıştır (47).

Çalışmamızda, 19 tanesi düşük dereceli, 11 tanesi yüksek dereceli tümör olarak değerlendirilen 30 mesane yıkama sıvısı çalışmaya dahil edilmiştir. Yüksek derece karsinomaya sahip olguların sadece bir tanesi dışında hepsi amplifikasyon pozitif olarak değerlendirilmiştir. Amplifikasyon negatif olarak değerlendirilen bu olguya ait mesane yıkama sıvısının kanlı olması ve incelenen hücrelerin lenfosit hücrelerine benzerlik göstermesi sebebiyle, normal olarak değerlendirilen bu hücrelerin lenfosit olduğu şüphesi doğmuştur.

Çalışmamızda, Park ve arkadaşlarının bulgularına paralel olarak AURKA amplifikasyonlarının yüksek tümör derecesi ile ilişkili olduğu, tümör derecesi arttıkça amplifikasyon miktarında da belirgin bir artış olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamız, mesane yıkama sıvısında bulunan ürotelyal hücrelerde FISH testinin etkinliğine ve cerrahi yöntemlerle kıyaslandığında, non invaziv denilebilecek bu yöntemle tümör markerlarının incelenebilirliğine dikkat çeken bir çalışmadır.

Schultz ve arkadaşları 2007 yılında STK15 (AURKA) T91A polimorfizmlerinin ve mRNA ekspresyonlarının ürotelyal karsinomlardaki prognostik rolünü saptamak amacıyla 103 ürotelyal karsinom tanısı almış hasta üzerinde RT-PCR yöntemi kullanarak bir çalışma yapmışlardır. Toplam 62 Ta, 20 T1, 21 T2 ve üstü evreye sahip

olgunun örneklerini kullanarak yapılan çalışmada, STK15 ekspresyon seviyesinin invaziv ve yüksek dereceli tümörlerde anlamlı oranda arttığını gözlemlemişlerdir. Ek olarak yüzeysel tümörlere sahip ve rekürrens gösteren hastalarda, rekürrens göstermeyen hastalara oranla yüksek STK15 ekspresyonu tespit etmişlerdir. Aynı zamanda Ta tümörlere sahip olguların yüksek STK15 mRNA seviyesi göstermesi durumunda, tümör progresyon hızında artış gözlenmiştir. Bu bulgular eşliğinde yüksek STK15 mRNA seviyesine sahip ürotelyal karsinom vakalarının, düşük mRNA seviyesine sahip vakalarla karşılaştırıldığında daha kötü bir hastalık seyri göstereceği sonucuna varılmıştır. Yüksek STK15 mRNA seviyesi gösteren olgular için, daha şiddetli bir tedavi gerekliliğinin ortaya çıktığı düşünülmüştür (54).

Compérat ve arkadaşları agresivitesi farklı evrelerde olan yüzeysel mesane tümör dokularında, Aurora-A ve MIB-1 ekspresyonunu araştırmak ve bu iki belirtecin tümör rekürrensindeki özgülüğü ve duyarlılığını belirlemek amacıyla bir çalışma yapmışlardır. Mesane kanseri tanısı almış 128 olgu çalışmaya dahil edilmiştir. 128 olgunun 90 tanesinde Aurora-A immün boyaması pozitif olarak tespit edilmiştir. Relapsı olan 58 tümördeki Aurora-A aşırı ekspresyonuna karşı %12'lik orandaki tümörde relaps görülmemiştir. Çalışmada Aurora-A immün boyamasının pTa mesane tümörlerinde iyi bir öncü marker olduğu desteklenmektedir. Elde edilen sonuçlar ile araştırmacılar, Aurora-A ekspresyonunun hasta izleniminde kullanılabilir bir ayırıcı olduğunu ve Aurora-A negatif tümörlerde daha az sıklıkta rutin kontrollerin gerektiğini vurgulamışlardır. Erken evrelerde bu belirtecin ekspresyonunun çok önemli pozitif prediktif değer içerdiği sonucuna varılmıştır (14).

Lei ve arkadaşları 2010 yılında yaptıkları çalışmada Aurora -A gen ekspresyonunun mesane kanserinde prognostik bir faktör olup olmadığını araştırmışlardır. Çalışmada 96 mesane kanserli olguda ve 20 kontrol olgusunda RT-

PCR yöntemi kullanılarak Aurora A gen ekspresyon seviyeleri incelenmiştir. Daha sonra bu örnekler immunohistokimya analizleri ile de değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda, mesane kanserli olgulardaki Aurora A mRNA seviyesinin normal kontrol olgularına nazaran çok yüksek olduğu saptanmıştır. Yüksek dereceli olgularda Aurora A protein ekspresyonunun, düşük dereceli olgulara oranla çok daha fazla olduğu istatistiksel olarak tespit edilmiştir. Bunun yanısıra evresi daha yüksek olan olgularda da Aurora A mRNA seviyesinin, düşük evreli olgularla karşılaştırıldığında daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ancak yaş ve cinsiyetle herhangi bir bağlantı kurulamamıştır. Aurora A protein ekspresyonunun, mesane karsinomlarının progresyonunda bağımsız bir öngörücü olabileceği sonucuna varılmıştır (41).

Çalışmamızda tümör evresi ve AURKA amplifikasyonları arasında istatistiksel olarak herhangi bir anlam bulunamamıştır. Ancak çalışmada kullanılan olgu sayısı azlığının bu duruma sebep olduğu söylenebilir. Çünkü tümör evresi ve AURKA amplifikasyonları birlikte değerlendirildiğinde, oran olarak oldukça anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. Lei ve arkadaşlarının bulgularına paralel olarak yüksek derece kasa invaze olgularda, AURKA amplifikasyonu pozitif olarak gözlenmiştir.

Bulgular bölümünde belirttiği üzere Ta olarak evrelendirilmiş olguların 4 tanesinde, AURKA amplifikasyonu pozitif olarak tespit edilmiştir. Bu olgulardan 2 tanesi rekürrens gösteren olgulardır. Düşük derece ve Ta olarak evrelendirilen bu olguların, her ikisi de ilk örneklerinde yüksek amplifikasyon göstermişlerdir. İkinci örnekleri yüksek derece tümör olarak sınıflandırılmış, evrelemeleri ise T1 ve T2 olan bu örneklerde amplifikasyon miktarlarında artış ve ilave anomaliler tespit edilmiştir. Rekürrens gösterecek olan Ta evreli olgularda AURKA amplifikasyonu pozitif olarak değerlendirilmiştir. Bu bulgular eşliğinde erken evre mesane tümörlerinde gözlenen AURKA amplifikasyonlarının kötü hastalık seyrine işaret eden bir ipucu verdiği

söylenbilir. Bu veriler çerçevesinde çalışmamız Schultz ve arkadaşlarının aynı zamanda Compérat ve arkadaşlarının bulgularını destekler niteliktedir.

Özellikle Ta tümörlerde AURKA amplifikasyonlarının saptanmasının, erken tanı ve hastalığın seyrini önceden belirlemek açısından önemli bir bulgu olabileceğini düşünmekteyiz. Ancak rekürrens olgu sayısının azlığı sebebiyle bu durum istatistiksel verilere yansımamaktadır. Olgu sayısı artırılarak daha anlamlı ve mutlak sonuçlar elde edilebilir. Ayrıca çalışma verilerimiz protein analiz çalışmalarıyla desteklenmelidir.

Compérat ve arkadaşları 2009 yılında Aurora A, MIB-1, P53 ve survivin ekspresyon seviyelerinin papiller mesane karsinomlarında klinik sonuçlarını, tümör progresyonu üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla bir çalışma yapmışlardır. Çalışmaya 18 hasta dahil edilmiştir. Bu hastalardan biri pTa , ikisi pT1, ikisi pT2, dördü pT3 ve sekizi pT4 olarak sınıflandırılmıştır. T4 tümörlerin 4 tanesinde prostat tutulumunun mevcut olduğu bildirilmiştir. Yapılan immunohistokimyasal analiz sonucu Aurora A'nın aşırı ekspresyonu bütün olgularda gözlenmiştir. Hastaların %77 sinde Survivin, %67 sinde MIB1 ve P53'ün aşırı ekspresyonu saptanmıştır. Sonuç olarak Aurora A'nın artmış ekspresyonunun papiller karsinomlarda kötü prognoz olarak değerlendirilebileceği ve mesane kanserleri için hastalığın progresyonu hakkında bilgi verici olabileceği sonucuna varılmıştır (15).

Çalışmamızda T4 evresi almış iki olgunun her ikisinde de prostat tutulumu mevcut olmakla birlikte, bu iki olguda AURKA düşük ve yüksek amplifikasyonları birlikte gözlenirken, amplifikasyon seviyeleri diğer olgulara göre çok yüksek düzeylerdeydi. Ta olguların % 30'unda ,T1 ve T2 evrelemesi yapılan olguların ise hepsinde amplifikasyon tiplerinden en az biri gözlenmiştir. Bu bulgu AURKA amplifikasyonlarının, tümör derecesi kadar tümör evresi yükseldikçe de miktarı artan

bir anomali olduğu görüşünü destekler nitelikte olup Compérat ve arkadaşlarının bulgularına benzerlik göstermektedir.

Çalışmamızdaki verilere dayanarak AURKA gen değişimlerinin mesane karsinomlarında prognostik bir öneme sahip olduğu ve rutin olarak kullanımının etkili olabileceği söylenebilir Ancak olgu sayısı arttırılarak yapılacak çalışmalardan daha güvenilir sonuçlar alınacağı görüşünderiz. Olgu sayısının artırılmasının yanı sıra çalışmamız, AURKA amplifikasyon ve aşırı ekspresyon düzeylerinin korelasyonunu saptamak amacıyla mutlaka immünohistokimsayal ya da diğer ekspresyon analizleri ile desteklenmelidir.

5.1.2. AURKA Gen Değişimlerinin Kromozomal İnstabiliteler ile Bağlantısının Literatür Bilgileriyle Karşılaştırılması

AURKA mitozda görevli önemli bir gendir. Bu gendeki değişimler mesane kanserini de kapsayan bir çok kanser türünde çoklu sentromer içeren poliploid hücrelerin oluşumuna sebep olarak, kromozomal instabilitelere neden olmaktadır (28).

Çalışmamızda AURKA amplifikasyonları ve kromozomal instabiliteler arasında yüksek korelasyon gözlenmiş ve bulgular literatür eşliğinde tartışılmıştır.

Sen ve arkadaşları 2002 yılında mesane kanserli olguların tümör örneklerini kullanarak STK15 gen kopya sayısının ve/veya protein ekspresyon farklılıklarının anöploidilerle bağlantısını, klinik olarak mesane kanseri üzerinde etkisini saptamak amacıyla yaptıkları çalışmada, Southern Blot, FISH ve immunohistokimyasal analizler

kullanılmıştır. Yapılan FISH analizinde 21 örnekte kromozom 3, 17 ve 21 sentromerik bölgeleri ile 20q13 değerlendirilmiştir.

Bu çalışmada amplifikasyon değerlendirmeleri iki şekilde yapılmıştır;

Üç yada dört kopya görülen gen bölgesi düşük amplifikasyon, dörtten fazla kopya görülen gen bölgesi ise yüksek amplifikasyon olarak değerlendirilmiştir. STK15 gen kopyası sayısında diploid- yakın diploid (neardiploid) ve anöploid tümörler arasında önemli derecede fark gözlemlenmiştir. Diploid–yakın diploid tümörlerde, olguların neredeyse %40-%50 kadarı üç ya da dört STK15 gen kopyası taşıırken, sadece %2-20 kadarı 4'ten fazla gen kopyası taşıdıklarını, buna karşılık yüksek dereceli anöploid tümörlerin en az %20 oranında 4'ten fazla kopya sayısı taşıdığını tespit etmişlerdir. Gen amplifikasyonunun arttığı olgularda yüksek derece anöploidi oranı gözlenmiştir. Sonuç olarak STK15 geninin kromozomal instabiliteleri önlemek için terapötik bir hedef aynı zamanda erken teşhis için önemli bir prognostik faktör olabileceği sonucuna varmışlardır (55).

Çalışmamızda CIN pozitif olarak değerlendirilen olguların % 77' sinde AURKA amplifikasyonu gözlenmiştir. Ancak geriye kalan olgularda kromozomal instabiliteler nedeniyle de AURKA aşırı ekspresyonu beklenebilir. Diploid hücrelerde gözlenen düşük amplifikasyon oranı % 13, 33 olarak hesaplanmıştır. Fakat diploid hücreye sahip hiç bir olguda yüksek amplifikasyona rastlanmamıştır. AURKA yüksek amplifikasyonu gösteren olguların hepsi aynı zamanda CIN pozitif olarak değerlendirilen olgulardır.

Çalışmamızın verileri, Sen ve arkadaşlarının bulgularına benzerlik göstermektedir. AURKA yüksek amplifikasyonları ve CIN arasında istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar alınmıştır. (Tablo 4.12) Çalışmamız sonucunda, AURKA amplifikasyonlarının düşük derece tümörlerde de gözlenmesi, yüksek derece tümörlerde

amplifikasyon düzeyinde artış saptanması ve bu amplifikasyonların CIN ile istatistiksel olarak anlamlı bulunması düşünüldüğünde, AURKA amplifikasyonlarının agresif fenotipe işaret eden anöploid hücre gelişimini tetiklediğini düşündürmektedir.

Fraizer ve arkadaşları mesane kanseri hücre serilerinde Aurora A ekspresyon seviyelerinin, kromozomal instabilitelere etkisinin olup olmadığını anlamak amacıyla bir çalışma planlamışlardır. Çalışmada immunohistokimyasal boyamalar, Northern ve Western blot analizleri kullanılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda, Aurora A aşırı ekspresyonu gösteren hücre serilerinde, ileri derecede kromozomal instabilitelere rastlanmıştır. Ek olarak 20q amplifikasyonuna sahip ölümsüz E7 hücrelerinde , 20q amplifikasyonu saptanmayan E6 hücre serilerine göre Aurora A overekspresyon seviyesinin arttığı tespit edilmiştir. Bu bulgular eşliğinde T3 mesane tümörlerinde, yüzeysel mesane tümörlerine oranla, çok daha fazla Aurora A mRNA miktarı olduğu kanısına varılmıştır (26).

Yamamoto ve arkadaşları 2006 yılında mesane kanserinde CIN ve MSI arasındaki farklılıkları ve genetik instabilitelere rolünü anlamak amacıyla 100 mesane kanserli olgudan alınan örneklerle yaptıkları çalışmada immunohistokimyasal ve FISH yöntemi kullanmışlardır. MLH1, MSH2, Aurora-A ve p53 protein analizleri, immunohistokimyasal yöntemlerle gerçekleştirilmiş, FISH yöntemi ile kromozom 7, 9, 17 ve 20q13 değişimleri incelenmiştir.

Yapılan analizler sonucunda 49 olguda sentromerik sinyallerin değişik varyantları gözlenmiştir. Toplam 64 vakada sentrozom amplifikasyonu, 65 vakada Aurora A' nın aşırı ekspresyonu rapor edilmiştir. Kromozom 20q13 kopya sayısı 42 tümörde artış gösterirken, DNA anöploidileri 47 olguda saptanmıştır. Kromozom 20q13 kazanımı ve sentrozom amplifikasyonu arasındaki ilişkiyi kurmak amacıyla hastaları 3 grup halinde

incelemişlerdir. Birinci grupta bulunan hastaların hepsinde kromozom 20q13 kazanımı, sentrozom amplifikasyonu ve Aurora A'nın aşırı ekspresyonu gözlenmiştir. İkinci gruptaki hastalarda sentrozom amplifikasyonu pozitif, kromozom 20q13 kazanımı negatif olarak bildirilmiştir. Üçüncü gruptaki hastalarda ise sentrozom amplifikasyonu ve kromozom 20q13 kazanımı negatif olarak gözlenmiştir. Bu üç grup arasında CIN sıklığı açısından önemli farklılıklar gözlenmiştir. Birinci gruptaki tümörler, DNA anöploidilerini yüksek sıklıkta göstermekle birlikte diğer gruplara nazaran daha yüksek tümör derecesi ve ilerlemiş tümör evresine sahiptirler. Üçüncü gruptaki tümörlerde ise diğer gruplara nazaran tümörün derecesinin ilerleme riskinin daha az olduğu sonucuna varmışlardır. Kromozom 20q13 kazanımı olan bütün tümörlere, Aurora A'nın aşırı ekspresyonu ve sentrozom amplifikasyonu eşlik etmektedir. Kromozom 20q13 kazanımı pTa tümörlerin sadece %7 sinde gözlenirken, lamina propira ve kasa invaze olan tümörlerin %92 sinde gözlenmiştir. Bu klinikopatolojik ve moleküler farklılıklar kromozom 20q13 kazanımı olan yada olmayan tümörler arasında belirgindir. Kromozom 20q13 kazanımı, Aurora A aşırı ekspresyonu ve sentrozom amplifikasyonundan kaynaklı CIN'ler, yüksek malign mesane tümörleriyle ilişkilidir. Sonuç olarak mesane kanserinde CIN'le ilişkili moleküler markerların çalışıldığı bu çalışmada, sentrozom amplifikasyonun hastalık progresyonu için güçlü bir öngörücü olduğu sonucuna ulaşılmıştır (68)

Bulgular bölümünde belirttiği üzere çalışmamızda, 20 Ta evreli tümöre sahip olgudan alınmış mesane yıkama sıvılarının % 15'inde düşük amplifikasyon ve yine aynı oranda yüksek amplifikasyon saptanmıştır. Fakat Ta dışındaki diğer evrelere sahip tümörlerin, %70'i AURKA amplifikasyonlarından en az birini göstermektedir. Olgu sayısının azlığı nedeniyle, oranlarda küçük değişiklikler olmakla birlikte çalışmamız Yamamoto ve arkadaşlarının bulgularına yakınlık göstermektedir.

Çalışmamız, özellikle T4 tümöre sahip olgularda AURKA amplifikasyonlarının her ikisinin birden gözlenmesi ve bu olgularda CIN pozitifliğinin de mevcut olması, aynı zamanda yüksek dereceli olguların %72,72'sinde CIN pozitifliğinin saptanmasına dayanarak tümör derecesi kadar evresi arttıkça da anomali miktarında belirgin artış gözleendiği görüşünü desteklemektedir. Bu bulgular eşliğinde çalışmamız Fraizer ve arkadaşlarının verileriyle uyum içindedir.

Çalışmamız sonucunda erken evre mesane karsinomlarında özellikle Ta tümöre sahip olgularda, AURKA amplifikasyonlarının daha sonradan gelişecek ve agresif fenotip belirteci CIN'lerin habercisi niteliğinde olduğu söylenebilir.

5.1.3. AURKB ve AURKA Gen Değişimlerinin Literatür Bilgileriyle Karşılaştırılması

Bufo ve arkadaşları 2010 yılında farklı derece ve evredeki mesane kanserine sahip olguların Aurora A ve Aurora B proteinlerindeki değişimlerin klinik ve patolojik parametlerle ilişkisini saptamak amacıyla yaptıkları çalışmada, mesane kanseri hücre serilerindeki ekspresyon analizleri için Western Blot yöntemini kullanmışlardır. 85 olguda Aurora A ve B ekspresyon analizleri için daha sonra immunohistokimyasal analizler gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizler sonucunda, Aurora A'nın yüksek ekspresyonu ile yüksek dereceli ve ileri evre tümörler arasında önemli derecede korelasyon gözlenmiştir. Aurora B artmış ekspresyonu ise hem düşük dereceli tümörlerde hemde yüksek dereceli tümörlerde gözlenmiştir. Yaş ve cinsiyet açısından ise herhangi bir anlam gözlenmemiştir. Bu bulgular göstermektedir ki; Aurora A ve Aurora B mesane kanseri tümörogenezinde önemli bir basamaktır ve spesifik anti mitotik ajanlar kullanılarak hedef terapiler geliştirilebilir (8)

Çalışmamızda, AURKA gen amplifikasyonu ve yüksek dereceli tümörler arasındaki ilişki, istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Tümör evresi ve amplifikasyonlar arasında istatistiksel olarak bir anlam saptanmamış olmasına rağmen, bu durum örnek sayısı azlığı ve örneklerin evre dağılımlarının orantısız olmasına bağlanabilir. Bu açıdan bakıldığında çalışmamızın AURKA amplifikasyonları ile ilgili olan bulguları Bufo ve arkadaşlarının bulgularına paralellik göstermektedir. Ancak çalışmamızda Bufo ve arkadaşlarından farklı olarak, çalışılan 30 örneğin 4'ünde AURKB genine ait delesyon saptanmıştır. Delesyon saptanan olguların 3 tanesi düşük derece Ta, bir tanesi ise yüksek derece T1 olarak sınıflandırılmıştır. Aynı zamanda delesyon pozitif olan düşük dereceli ve Ta tümöre sahip olguların hepsinde CIN pozitifliğide gözlenmiştir. Çalışmamızda kullanılan teknik sadece kromozomal değişimleri inceleyen bir tekniktir. Bufo ve arkadaşlarının saptadığı AURKB aşırı ekspresyonunun, olgularımızda kromozomal instabilitelerden kaynaklı artmış ekspresyon olabileceğini ancak bu görüşün desteklenmesi için olgularımızda mutlaka ekspresyon çalışmaları yapılması gerektiğini düşünmekteyiz.

Bruyere ve arkadaşları 2008 yılında Aurora kinaz ailesi üyelerinin ekspresyon değişikliklerini mesane tümörlü olgularda inceleyip rekürrens ile ilgilerini, patolojik ve onkolojik özelliklerini karşılaştırmayı amaçlayarak yaptıkları çalışmada 73 kasa invazive olmayan ürotelyal karsinom tanısı almış örnek kullanılmıştır. Bu örneklerden 12 tanesi düşük malign potansiyelli ürotelyal lezyon, 52 tanesi düşük derece ürotelyal karsinom, 9 tanesi yüksek derece ürotelyal karsinom tanısı almıştır. Bu olgular üzerinde Aurora A ve, Aurora B ekspresyon paternleri incelenmiştir. Aurora kinaz A ve Aurora kinaz B'nin aşırı ekspresyonu ile tümör rekürrensi arasında istatistiksel olarak herhangi bir anlam gözlenmemiştir. Ancak G1 kontrol noktası bozukluklarında, Aurora kinaz A overekspresyonu gözlenen olguların tümör rekürrensine eğilim gösterdiği saptanmıştır. G1 kontrol noktası bozukluğu tespit edilen, Aurora B'nin aşırı ekspresyonuna sahip

tümörlerde bu aşırı ekspresyonun, olguları rekürrensten koruduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak özellikle Aurora Kinaz B inhibitörleri kullanımının yüzeysel mesane kanserlerinde kullanımlarının zararlı olabileceği sonucuna ulaşmışlardır (7).

Çalışmamızda rekürrens olgu sayısının azlığı nedeniyle AURKA amplifikasyonları ve tümör rekürrensi arasında istatistiksel bir çalışma gerçekleştirilememiştir. Ancak iki rekürrens gösteren olgunun ikisinde ilk örnekleri düşük derece Ta olarak evrelendirilip, her ikisinde de yüksek amplifikasyon gözlenmesi ve ikinci örneklerinde amplifikasyon miktarındaki artışla birlikte ilave anomalilerin gözlenmesi tümör rekürrensi için belirleyici bir marker olabileceğini düşündürmektedir. Ancak olguların detaylı bilgilerine ulaşamadığından, bu süre içinde tedavi görüp görmedikleri bilinmemektedir. Bu bilgiler eşliğinde daha sıkı bağlantılar kurulması muhtemeldir. Ayrıca Bruyere ve arkadaşlarının saptadığı gibi G1 noktası bozukluğunun tespit edilmesi için çalışmamızın ilerleyen aşamalarında bu kontrol noktasında görevli genler içinde analizlerin planlanması, bu yolağın mesane kanserindeki değişimlerini saptamak açısından faydalı olabilir.

Çalışmamızda gözlenen ilginç bir bulgu da, bu iki rekürrens olgunun ilk örneklerinde AURKB delesyonunda bulunmasıdır. İkinci örneklerde AURKB delesyonu gözlenmemiş fakat artmış CIN ve AURKA amplifikasyonu gözlenmiştir. Bu yönleriyle çalışmamız Bruyere ve arkadaşlarının bulgularıyla uyum göstermemiştir. Ancak çalışmamızda AURKB delesyonu gözlenen olgularda 17p'ye ait bir başka bölge incelenmemiştir. Bu yüzden bu delesyonun sadece AURKB gen bölgesini içeren bir delesyonmu yoksa mesane karsinomlarında sıklıkla gözlenen 17p kaybını olduğu netleştirilememiş, 17p'yi içeren farklı prob setleri kullanılarak çalışmanın desteklenmesi gerekliliği ortaya çıkmıştır. Çalışmamızda gözlenen AURKB allel kaybının netleştirilmesi durumunda düşük dozda ekspresyonun olması gerçeğine bağlı olarak

ürün azlığı oluşabileceği, AURKB inhibitör kullanımının yaratabileceği sorunlara dikkat çekmesi açısından önemli olacaktır.

NIR fiziksel olarak P53 ile etkileşime girerek P53'ün transkripsiyonel aktivitesini baskılayan bir repressördür. Ancak bu mekanizma henüz tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. 2011 yılında Wu ve arkadaşları proteomik tekniklerle NIR'in yeni bir bağlanma partneri olarak Aurora B'yi tanımlamışlardır. Araştırmacılar Aurora B'nin NIR'a bağlandığı bölgede Aurora B, NIR ve P53'ün protein kompleksi halinde bulduklarını göstermişlerdir. Aynı zamanda, Aurora B'nin yada NIR'in aşırı ekspresyonunun P53'ün transkripsiyonel aktivitesini baskıladığını, Aurora B yada NIR azalmasının ise P53'e bağlı apoptozise sebep olduğunu göstermişlerdir. Bunun yanı sıra Aurora B'nin P53'ü farklı bölgelerinden fosforilettiğini in vitro olarak göstermişlerdir. Aurora B aracılı Ser(269) yada Thr(284) fosforilasyonunun P53'ün transkripsiyonel aktivitesini negatif yönde etkilediğini düşünmektedirler. Sonuç olarak araştırmacılar NIR aracılı P53 baskılanmasının, P53 regülasyonunda ek bir yolak olduğunu desteklemektedir (67).

Çalışmamızda AURKB delesyonunun başka bir anomali olmadan tek başına bulunduğu bir olgu yoktur. Delesyon pozitif vakalarımızda, özellikle CIN pozitifliğinin mevcudiyeti de gözlenmektedir. Bu durumun AURKB'nin sitokinez üzerindeki etkisinin kaybı ile ortaya çıktığı düşünülebileceği gibi, mesane kansinomlarında sıklıkla gözlenen 17p kaybı ile gözlenen P53 delesyonu ile de ortaya çıkması muhtemeldir. Ayrıca Wu ve arkadaşlarının bulguları çalışmamıza başka açıdan bakmaya da fayda sağlamıştır. AURKB'nin P53 üzerindeki indirekt etkisini Wu ve arkadaşları çalışmalarında göstermişlerdir. AURKB delesyonunun P53'ün baskılanması ile de kromozomal instabiliteler ortaya çıkarabileceği ve olgularımızda saptanan CIN ve AURKB birlikteliğinin bir sebebinin de apoptozis mekanizmasının baskılanması

olabileceğini düşünmekteyiz. Ancak P53 analizleri ile bu görüşün desteklenmesi gerekmektedir.

5.1.4. CEP 17 Aberasyonlarının Literatür Bilgileriyle Karşılaştırılması

Marchi`o ve arkadaşları 2009 yılında yaptıkları çalışmada meme kanserinde artmış CEP 17 kopya sayılarının, kromozom 17 polizomilerini gösterip göstermediğini değerlendirmişlerdir. Yapılan çalışmada FISH ve aCGH yöntemleri kullanılmıştır. 18 rastgele seçilen CEP17 polizomik vaka ve 10 CEP 17 dizomik kontrol grubu kullanılmıştır.

Polizomik olarak değerlendirilen olgular aCGH ile incelenmiş ve 18 olgunun sadece bir tanesinin polizomik olduğu tespit edilmiştir. Diğer olguların 11 tanesinde sentromer bölgesini de içeren 17q artışı, bir tanesinde sentromer bölgesini içermeyen 17q artışı geriye kalan beş olguda da sadece sentromerik bölgede amplifikasyon olduğunu tespit etmişlerdir. Çalışma sonucunda gerçek polizomi 17'lerin meme kanserlerinde oldukça nadir gözlenen bir olay olduğunu ve CEP17 kopya sayısının üçten fazla olduğu durumların sıklıkla sentromerik bölge kazanımı yada amplifikasyonu ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir (44).

Çalışmamıza dahil edilen 30 mesane yıkama sıvısı örneğinin 6'sında AURKB geni ile birlikte incelenen kromozom 17'ye ait sentromer bölgesinde artış tespit edilmiştir. Ancak çalışmamızda 17q'ya ait herhangi bir bölge analizi yapılmamıştır. Bulgularımızın 17q artışı olasılığı nedeniyle bu bölgeye ait gen analizlerince desteklenmesi ile olgularımızda saptadığımız CEP17 artışlarının, 17q kazanımları ile ilgili yoksa sadece sentromerik bölge amplifikasyonları ile ilgili ortaya çıktığı açıklık kazanacaktır.

Mesane karsinomlarında kromozom 17'ye ait anomaliler sıklıkla gözlenmekte ancak CEP17 amplifikasyonu olasılığından bahseden herhangi bir yayın bulunmamaktadır. Çalışmamız mesane karsinomlarında ilk defa CEP 17 amplifikasyonu olasılığını ortaya koyması ile özellik kazanmaktadır. Ayrıca FISH yöntemi ile polizomik vaka değerlendirmelerinde sadece sentromerik bölgenin incelenmesinin güvenilirliği tartışmaya açık hale gelmiştir.

Tablo 5.1. Çalışmamızdaki AURKA, AURKB ve CIN bulgularının literatür ile karşılaştırılması

Araştırmacı	Örnek Tipi	Yöntem	Çalışılan Genler	Sonuç
Sen ve ark. (2002)	205/21 Tümör dokusu	İHK FISH	AURKA	Düşük dereceli diploid tümörlerde %40-50 düşük amp., %2-20 yüksek amp., Yüksek dereceli anoploid tümörlerde %40 düşük amp., %50 yüksek amp. saptanmıştır
Yamamoto ve ark. (2006)	100 Tümör dokusu	İHK FISH	AURKA Kromozom 7, 9, 17, 20q13 kopya sayısı değişiklikleri	20q13 kazanımı; %7 pTa tümörleri, %92 lamina propria ve kasa invaziv AURKA amplifikasyonu ile kromozomal instabiliteler arasında yüksek korelasyon
Fraizer ve arkadaşları (2004)	Mesane Kanseri Hücre Serileri	İHK Northern ve Western Blot	AURKA	Yüzeysel mesane tümörleri mRNA < T3 mesane tümörleri mRNA Aurora A aşırı ekspresyonu gösteren hücre serilerinde ileri derecede kromozomal instabilite
Compérat ve ark. (2006)	128 Tümör dokusu	İHK	AURKA	Relaps(+) olguların %95'inde aşırı, relaps(-) olguların %40'ında aşırı ekspresyon

Schultz ve ark. (2007)	103 Tumor dokusu	RT-PCR	AURKA	Yüksek dereceli ve rekürrens gösteren olgularda aşırı ekspresyon
Park ve ark. (2008)	23 tumor dokusu 100 idrar örneği	RT-PCR FISH İHK	AURKA	Düşük derece tümörlerde <%20 düşük ve yüksek amp. Yüksek derece tümörlerde >%20 düşük ve yüksek amp.
Bruyere ve arkadaşları (2008)	73 Tumor dokusu (yüzeysel)	İHK Array	AURKA AURKB	Aurora A ve Aurora B'nin aşırı ekspresyonu ile tümör rekürrensi arasında istatistiksel anlan bulunamamıştır G1 kontrol noktası bozukluklarında, Aurora A overekspresyonu gözlenen olgularda tümör rekürrensine eğilim, Aurora B'nin aşırı ekspresyonuna sahip tümörlerde bu aşırı ekspresyonun, olguları rekürrensten koruduğu tespit edilmiştir
Compérat ve ark. (2009)	18 Tumor dokusu	İHK	AURKA, MIB-1, p53 ve Survivin	%100 AURKA, %77 Survivin, %67 MIB1 ve p53 aşırı ekspresyonu
Marchi`o ve arkadaşları (2009)	18 Meme Kanseri Tumorü	FISH aCGH	CEP polizomileri 17	FISH ile polizomik olarak değerlendirilen olgular aCGH ile incelenmiş, 18 olgunun bir tanesinde polizomi 17 11 tanesinde sentromer bölgesini de içeren 17q artışı bir tanesinde sentromer bölgesini içermeyen 17q artışı beş olguda da sadece sentromerik bölgede amplifikasyon
Lei ve ark (2010)	96 Tumor dokusu	RT-PCR	AURKA	Ekspresyon düzeyi; Yüksek dereceli > düşük dereceli

Bufo ve ark. (2010)	85 Tümör dokusu	Western Blot	AURKA AURKB	Aurora A yüksek ekspresyonu ile yüksek dereceli+ ileri evre tümörler arasında önemli derecede korelasyon Aurora B yüksek ekspresyonu ; hem düşük dereceli tümörlerde hem de yüksek dereceli tümörlerde
Bizim çalışmamız (2011)	30 Mesane yıkama SIVISI	FISH	AURKA AURKB CIN analizi (Kromozom 7, 10, 17 ve 20 ile)	Yüksek dereceli mesane kanserinde %54,54' yüksek amp ,%63,63 düşük amplifikasyon, Düşük dereceli mesane kanserinde %10,52 düşük amplifikasyon %10,52 yüksek amplifikasyon, %13,3 AURKB delesyonu, %43 CIN + %20 CEP 17 aberasyonu

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda 28 mesane kanseri tanısı almış olgudan alınan 30 ve normal mesaneye sahip 10 olgudan alınan mesane yıkama sıvısı örneklerinde hücrelerindeki AURKA ve AURKB genlerine ait değişimler ile CIN durumu FISH yöntemi ile incelenmiş ve bu değişimlerin tümör evre, derecesiyle arasındaki bağlantıların kurularak mesane kanseri progresyonu hakkında önceden bilgi edinebilecek marker değerlendirmesinin yarı invaziv bir yöntemle elde edilen tümör hücrelerinde incelenebilirliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Analiz edilen 28 mesane kanserli ve 10 normal mesaneli olguların tümünden sonuç alınmıştır. Çalışmamızın başarı oranı %100 olarak saptanmıştır. Normal mesane sıvılarında incelenen genler ve dizilerle ilgili herhangi bir anomali gözlenmemiştir. Buna karşılık mesane tümörü sıvılarında;

- 1) AURKB delesyonu çalışmamızda en az gözlenen anomali olarak tespit edilmiş olup rekürrens olgularında gözlenmesi dikkat çekmiştir.
- 2) AURKA amplifikasyonlarının kromozomal instabilitelerle birlikteliği önemli derecede anlamlı bulunmuştur.
- 3) Tümör derece ve evresi arttıkça AURKA amplifikasyonlarının ve CIN'in oransal artışları tespit edilmiştir.
- 4) Kromozom 17 ye ait sentromerik bölge aberasyonları tespit edilmiştir.
- 5) Interfaz FISH analizi ile mesane yıkama sıvılarındaki ürotelyal hücrelerde genetik markerların incelenebilirliği ortaya konulmuştur.

Çalışmamızda elde edilen veriler doğrultusunda AURKA'nın mesane kanseri progresyonu için bir biyomarker olabileceği, ancak daha geniş araştırma popülasyonunda ekspresyon çalışmaları ile birlikte değerlendirilerek netlik kazanacağı sonucuna varılmıştır.

Bugüne kadar diğer kanser tiplerinde AURKB aşırı ekspresyonu rapor edilmiştir. Ancak genomik kopya açısından değerlendirilen çalışmalar eksiktir. Çalışmamızda, aşırı ekspresyona neden olan kopya sayısı artışı yerine özellikle rekürrens gözlemlendiği iki örnekte erken evrelerde AURKB delesyonunun saptanması ilginç bir bulgu olarak değerlendirilmiştir. Ancak bu kaybın gen ya da kromozom 17p orjinli olduğunun kesinleştirilmesinin gerektiği görüşündeyiz. AURKB gen delesyonunun belirlenmesi halinde bu bulgu AURKB inhibitör tedavisinin kullanımının yaratabileceği sorunlara dikkat çekmesi açısından önemli olacaktır.

AURKA amplifikasyon ve aşırı ekspresyonlarının sentrozom hiperamplifikasyonlarına neden olarak kromozomal instabilitelerine yol açtığı bazı kanser türlerinde gösterilmiştir. Çalışmamızın devamı olarak, AURKA amplifikasyonu gözlenen olgular üzerinde sentrozom değişimlerinin tespitinin yapılması ile mesane karsinomlarının, erken tanıda kullanılacak önemli bir biyomarker daha kazanması beklenmektedir.

Çalışmamız Türk popülasyonunda mesane kanserli olgularda AURKA ve AURKB genlerinin incelendiği ilk çalışma olma özelliğindedir. Bu çalışmanın yukarıda belirtilen yönleriyle de incelenmesi ile mesane karsinomu rekürrens, progresyon tespitinde ve hedefe yönelik tedavi protokollerinin geliştirilmesinde katkısı olacağını düşünmekteyiz.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ

- 1) Altaylı, E., Güneş, S., 2011, Mesane Kanseri Gelişiminde Moleküler Mekanizmaların Rolü, Türkiye Klinikleri, J Med Sci;31(1):191-205
- 2) Ataus, S., 2008, Mesane Kanseri Tanı ve Tedavisi, Klinik Gelişim Üroloji Özel Sayısı, Cilt: 21, No:3, s.130
- 3) Başaran, N., 1999, Tıbbi Genetik. 7. Baskı, Güneş ve Nobel Tıp Kitabevi, Bursa
- 4) Binbay, M., Berberoğlu, Y., Yazıcı, Ö., Akman, T., Sarılar, Ö, Müslümanoğlu, AY., 2010, Mesane Kanseri Tanısında ve Takibinde Kullanılan İdrardaki Tümör Belirteçleri, Haseki Tıp Bülteni ,48: 121-5
- 5) Bischoff JR, Anderson L., Zhu Y., Mossie K.,Ng L., Souza B., et al., 1998, A homologue of Drosophila aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers, EMBO J;17:3052–65
- 6) Bolanos-Garcia, V. M., 2005, Aurora kinases. Int. J. Biochem. Cell. Biol. 37:1572–1577.
- 7) Bruyere, F., Corcoran, N.M., Berdjis, N., Namdarian, B., Pedersen, J., Ockrim, J., Voelzke, B.B., Costello, A.J., and Hovens, C.M., 2008, Aurora kinase B is an independent protective factor in superficial bladder tumours with a dysfunctional G1 checkpoint, BJU International ,Volume 102, Issue 2, p. 247–252
- 8) Bufo, P., Sanguedolce, F., Tortorella, S., Cormio, L., Carrieri, G., Pannone, G., 2010, Expression of mitotic kinases phospho-aurora A and aurora B correlates with clinical and pathological parameters in bladder neoplasms, Histol Histopathol.;25(11):1371-7

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- 9) Cabadak,H., 2008 ,Hücre siklusu ve kanser, ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi, s.51 - 61
- 10) Cantürk, K.M., Mesane kanserlerinde miRNA'ların ekspresyonlarının belirlenmesi, Uzmanlık Tezi, ESOGÜ, 76 s.
- 11) Castillo-Martin, M., Domingo-Domenech, J., Karni-Schmidt, O., Matos T, Cordon-Cardo C , 2010, Molecular pathways of urothelial development and bladder tumorigenesis. Urol Oncol 28,p. 401–408.
- 12) Cheng L., Zhang S., MacLennan GT., Williamson SR., Lopez-Beltran A., Montironi R., 2011, Bladder cancer: translating molecular genetic insights into clinical practice. Human Pathology 42, 455–481
- 13) Cole, P., Hoover, R., Friedel, GH., 1972, Occupation and cancer of lower urinary tract.Cancer;29:1250-1260.
- 14) Comperat, E., Camparo, P., Haus, R., Chartier- Kastler, E., Radenen, B., Richard, F., Capron, F., Paradis, V., 2007, Aurora- A/STK-15 is a predictive factor for recurrent behaviour in non-invasive bladder carcinoma: a study of 128 cases of non-invasive neoplasms, Virchows Arch; 450: 419–424.
- 15) Comperat, E., Roupret, M., Conort, P., Chartier-Kastler, E., Bitker, M-O., Richard, F., Capron, F., Haertig, A., Cussenot, O., Camparo, P.,2009, Aurora-A/STK-15 Is Differentially Expressed in the Micropapillary Variant of Bladder Cancer, Urol Int;82:312-317
- 16) Cooper,G.M.,Hausman,R.E., 2006, Hücre:Moleküler yaklaşım, 3.baskı

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- 17)** Cordon-Cardo, C., 2008, Molecular alterations associated with bladder cancer initiation and progression, *Scand. J. Urol. Nephrol.* 42: 154–165
- 18)** Çefle, K., 2009, Kanser Genetiği, *Klinik Gelişim Klinik Fizyopatoloji Sayısı*, Cilt: 22 / NO:3, s.50
- 19)** Çimen,İ., 2007, Değişici epitel karsinomalı (DEK) hastalarda mesane yıkama ile elde edilen hücrelerde genetik markerların FISH analizi belirlenmesi, *Yüksek Lisans Tezi*, ESOGÜ, 102s.
- 20)** Dar, AA., Goff, LW., Majid, S., Berlin, J., El-Rifai, W., 2010, Aurora kinase inhibitors—rising stars in cancer therapeutics? *Mol Cancer Ther* 9:268–278
- 21)** Durak, B., 2005, Hematolojide FISH, *Moleküler Hematoloji ve Sitogenetik Alt Komitesi Temel Moleküler Hematoloji Kurs Kitapçığı*, s.13
- 22)** Dutertre, S., Descamps, S., and Prigent, C., 2002, On the role of Aurora-A in centrosome function. *Oncogene* 21, 6175– 6183
- 23)** Ekmekçi A., 2006, *Gen Genetik Değişim Ve Hastalıklar*;Ankara, Gazi Kitapevi. 217-219s.
- 24)** Ekmekçi A.,Erbaş D.,1991, *Kanserin Moleküler Mekanizması*; Ankara; TDFO, D 56 57
- 25)** Fleshner N., Herr H., Stewart AK., 1996, The National Cancer Database Report on Bladder Carcinoma, *Cancer* 1996;78:1505.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- 26)** Fraizer, GC., Diaz, MF., Lee, IL., Grossman, HB., Sen, S., 2004, Aurora-A/STK15/BTAK enhances chromosomal instability in bladder cancer cells, *Int J Oncol*; 25: 1631–1639.
- 27)** Frau, D.V, Usai, P., Dettori, T., Caria, P., De Lisa, A., and Vanni,R., 2006, Fluorescence in situ hybridization patterns in newly diagnosed superficial bladder lesions and corresponding bladder washings, *Cancer Genetics and Cytogenetics Volume 169, Issue 1, p. 21-26*
- 28)** Fu J, Bian M, Jiang Q, Zhang C., 2007, Roles of aurora kinases in mitosis and tumorigenesis, *Mol Cancer Res*;5:1 -10
- 29)** Giet, R., Petretti, C. and Prigent, C., 2005, Aurora kinases, aneuploidy and cancer, coincidence or a real link? *Trends Cell Biol. 15, 241-250*
- 30)** Günlüsoy, B., Arslan, M., Değirmenci, T., Nergiz, N., Minareci, S., Ayder, A.R., 2005, Mesanenin Non-Transisyonel Hücreli Kanseri, *Türk Üroloji Dergisi, Cilt:31 Sayı:4, s.469*
- 31)** Halling, K.C., Kipp, B.R., 2008, Bladder cancer detection using FISH, *Adv.Anat. Pathol, 15: 279-286*
- 32)** Herr, HW., Sogani, PC., 2001, Does early cystectomy improve the survival of patients with high risk superficial bladder tumors? *J Urol, 166:1296-9.*
- 33)** İnci O.,1995, Ürogenital Tümörler, İstanbul. Nobel Tıp Kitapevleri, s. 51-104
- 34)** Jacobs BL, Lee CT, Montie JE., 2010, Bladder cancer in 2010: how far have we come?; *CA Cancer J Clin, 60(4):244-272*

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- 35)** Jung I, Messing E., 2000, Molecular mechanisms and pathways in bladder cancer development and progression, *Cancer Control* 7(4), p.325-34.
- 36)** Karthigeyan, D., S.B. Prasad, J. Shandilya, S. Agrawal, and T.K. Kundu.,2010, Biology of Aurora A kinase: Implications in cancer manifestation and therapy, *Med. Res. Rev* 31:n/a. doi: 10.1002/med.2020
- 37)** Katayama, H., Sasai, K., Kawai, H., Yuan, Z.M., Bondaruk, J., Suzuki, F., Fujii, S., Arlinghaus, R.B., Czerniak, B.A., Sen, S., 2004, Phosphorylation by aurora kinase A induces Mdm2-mediated destabilization and inhibition of p53, *Nat Genet*;36:55 – 62.
- 38)** Klug,W.S.,Cummings, M.R., Spencer, C.A., 2011, *Genetik kavramlar*, 8. baskıdan çeviri
- 39)** Knowles, MA., 2008, Molecular pathogenesis of bladder cancer, *IntJ Clin Oncol*,13:2872
- 40)** Lassus, H., Staff, S., Leminen, A., Isola, J. and Butzow, R., 2011, Aurora-A overexpression and aneuploidy predict poor outcome in serous ovarian carcinoma, *Gynecologic Oncology*. 120, 1, p. 11-17
- 41)** Lei, Y., Yan, S., Ming-De, L., Na, L., Rui-Fa, H.,2010, Prognostic significance of Aurora-A expression in human bladder cancer, *Acta Histochemica*, Volume 113, Issue 5, p. 514-518
- 42)** Lüleyap,H.Ü., 2008, *Moleküler Genetiğin Esasları*,1.baskı
- 43)** Lynch CF, Cohen MB.,1995, Urinary system, *Cancer* 1995;75,p.316.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- 44)** Marchio, C., Lambros, MB., Gugliotta, P., Di Cantogno, LV., Botta, C., Pasini, B., Tan, D.SP., Mackay, A., Fenwick, K., Tamber, N., Bussolati, G., Ashworth, A., Reis-Filho, JS. and Sapino, A., 2009, Does chromosome 17 centromere copy number predict polysomy in breast cancer? A fluorescence in situ hybridization and microarray-based CGH analysis. *J Pathol* 219:16–2
- 45)** MarumotoT, Zhang D, Saya H., 2005, Aurora-A_a guardian of poles, *Nat Rev Cancer*;5:42-50
- 46)** Meraldi P, Honda R, Nigg EA., 2004, Aurora kinases link chromosome segregation and cell division to cancer susceptibility. *Curr Opin Genet Dev*;14:29 – 36
- 47)** Park, HS., Park, WS., Bondaruk, J., Tanaka, N., Katayama, H., Lee, S., Spiess, PE., Steinberg, JR., Wang, Z., Katz, RL., Dinney, C., Elias, KJ., Lotan, Y., Naeem, RC., Baggerly, K., Sen, S., Grossman, HB., Czerniak, B., 2008, Quantitation of Aurora kinase A gene copy number in urine sediments and bladder cancer detection, *J Natl Cancer Inst*;100(19):1401–1
- 48)** Parkin, DM., 2008, The global burden of urinary bladder cancer. *Scand J Urol Nephrol Suppl*:12-20
- 49)** Perez de Castro, I., de Carcer, G. and Malumbres, M., 2007, A census of mitotic cancer genes: new insights into tumor cell biology and cancer therapy, *Carcinogenesis* 28, 899-912
- 50)** Reuter VE, 2006, The pathology of bladder cancer, *Urology*; 67:11–18.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- 51)** Reznikoff, CA., Sarkar, S., Julicher, KP., Burger, MS., Puthenveetil, JA., Jarrard, DF., Newton, MA., 2000, Genetic alterations and biological pathways in human bladder cancer pathogenesis, *Urol Oncol*;5:191–20
- 52)** Rieder, H., Bonwetsch, C., Janssen, LAJ., Maurer, J., Janssen, IWG., Schwartz, S., Ludwig, WD., Gassmann, W., Bartram, CR., Thiel, E., Löffler, H., Gökbuget, N., Hoelzer, D., Fonatsch, C., 1998, High rate of chromosome abnormalities detected by fluorescence in situ hybridization using BCR and ABL probes in adult acute lymphoblastic leukemia, *Leukemia*, 12:1473-1481
- 53)** Rosenberg JE., Hahn WC., 2009, Bladder cancer: modeling and translation. *Genes Dev*; 23(6): 655–9
- 54)** Schultz, I.J., Kiemeny, L.A., Roelofs, R., Van Aarssen, Y., Babjuk, M., Willems, J.L., Malmström, P.U., Swinkels, D.W., Witjes, J.A., De Kok, J.B., 2007, The prognostic role of the STK15 T91A polymorphism and of STK15mRNA expression in patients with urothelial cell carcinoma, *Anticancer Res.* 27 1025–1030.
- 55)** Sen, S., Zhou, H., Zhang, R. D., Yoon, D. S., Vakar-Lopez, F., Ito, S., Jiang, F., Johnston, D., Grossman, H. B., Ruifrok, A. C., Katz, R. L., Brinkley, W., and Czerniak, B., 2002, Amplification/overexpression of a mitotic kinase gene in human bladder cancer, *J. Natl. Cancer Inst.*, 94: 1320 –1329
- 56)** Sobin, DH. and Witteking, CH., 2002, *TNM Classification of Malignant Tumours*, 6th edn. New York: Wiley-Liss, p. 199-202.
- 57)** Somasundaram, K., El-Deiry, W., 2000, Tumor Suppressor P53: Regulation and Function, *Frontiers in Bioscience*

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- 58)** Speiss, PE., Czerniak, B., 2006, Dual-track pathway of bladder carcinogenesis: practical implications, Arch Pathol Lab Med;130:844–852.
- 59)** T.C. Sağlık Bakanlığı, Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı Hıfzıssıhha Mektebi Müdürlüğü. [National Burden of Diseases and Cost-Effectiveness Final Report 2000]. Ankara: TUSAK; 2004;110.
- 60)** Takahashi, T., Futamura, M., Yoshimi, N., Sano, J., Katada, M., Takagi, Y., Kimura, M., Yoshioka, T., Okano, Y., and Saji, S., 2000, Centrosomal kinases, HsAIRK1 and HsAIRK3, are overexpressed in primary colorectal cancers. Jpn. J. Cancer Res., 91: 1007–1014
- 61)** Tüfekçi, B., 2011, Mesane kanserli olgulardan alınan tümör örneklerinde Aurora Kinaz A ve Aurora Kinaz B gen değişikliklerinin floresan in situ hibridizasyon (FISH) yöntemiyle belirlenebilmesi, Yüksek Lisans Tezi, ESOGÜ, 99s.
- 62)** Vader, G. and Lens, S. M., 2008, The Aurora kinase family in cell division and cancer. Biochim. Biophys. Acta 1786, 60–72
- 63)** Vader, G., Medema, RH., Lens, SM., 2006, The chromosomal passenger complex: guiding Aurora-B through mitosis, JCell Biol, 173:833-7
- 64)** Williams SG., Stein JP., 2004, Molecular pathways in bladder cancer, Urol Res, 32, p. 373–385
- 65)** Wu X-R., 2009, Biology of urothelial tumorigenesis: insights from genetically engineered mice. Cancer Metastasis Rev 28:281–29

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- 66)** Wu, L., Ma, CA., Zhao, Y., Jain, A., 2011, Aurora B interacts with NIR-p53, leading to p53 phosphorylation in its DNA-binding domain and subsequent functional suppression, *J Biol Chem.*;286(3):2236-44
- 67)** Wu,X.R., 2005, Urothelial tumorigenesis: a tale of divergent pathways, *Nat. Rev. Cancer*, 5, 713–725.
- 68)** Yamamoto, Y., Matsuyama, H., Kawauchi, S., Furuya, T., Liu, X., Ikemmoto, K., Oga, A., Naito, K., and Sasaki, K., 2006, Biological characteristics in bladder cancer depend on the type of genetic instability. *Clin Cancer Res*,12: 2752 - 8.
- 69)** Yarış F, Sabuncu H., 2002, Mesane Kanserinde Etiyolojik Faktörler, *Türkiye Aile Hekimliği Uzmanlık Derneği*, s.62-64
- 70)** Zeeger MP, Tan FE, Dorant E., 2000, The impact of characteristics of cigarette smoking on urinary tract cancer risk:meta-analysis of epidemiologic studies, *Cancer*.2000; 89:630-639.

ÖZGEÇMİŞ

Bireysel Bilgiler

Adı Soyadı : Ebru ERZURUMLUOĞLU

Doğum Tarihi ve Yeri : 08.09.1984- KAYSERİ

Uyruğu : T.C.

Medeni Durumu : Bekar

İletişim Adresleri : İstiklal Mah. Çandarlı Sok. No: 2/26 ESKİŞEHİR

ebruerzurumluoglu@gmail.com

0 539 794 64 67

Eğitim Durumu

2008 - 2012 ESOĞÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans

2003 - 2008 ESOĞÜ Fen Edebiyat Fak. Biyoloji Bölümü- ESKİŞEHİR

Lisans

1998 – 2002 Nuh Mehmet Baldöktü Anadolu Lisesi- KAYSERİ

Lise

1995 – 1998 Sümer İlköğretim Okulu- KAYSERİ

Ortaokul

1990 – 1995 60. Yıl Cumhuriyet İlköğretim Okulu- KAYSERİ

İlkokul

Uluslar Arası Toplantılarda Sunulan Yazılı Bildiriler

1. Ozdemir M., Emre R., Aras B.D., Cilingir O. , Kucuk H.O., Erzurumluoglu E., Aslan H., Artan S., A rare case of (inv21)(p12q22.1) in a man and holoprocencephaly in the fetus, 8.European Cytogenetics Conference, Porto, 2011, Chromosome Research Vol:19, No:1, P73

2. Durak Aras B., Ozdemir M., Tanir M., Dikoglu E., Yuksel Z., Erzurumluoglu E., Kucuk H., Cilingir O., Artan S., A clinical report of a prenatally diagnosed

inv dup (15) syndrome, IX. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi, İstanbul, 2010

Katıldığı Ulusal Bilimsel Toplantılar

1. II . Ulusal Hücresel Tedavi ve Rejeneratif Tıp Kongresi, Şubat 2011, İzmir