



**MESANE KANSERİ OLGULARINDA FİBROBLAST BÜYÜME
FAKTÖRÜ RESEPTÖR 3 (FGFR3) A248C, S249C, G372C, T375C
MUTASYONLARININ VARLIĞI**

Yavuz DODURGA

**Ağustos,2006
DENİZLİ**

**MESANE KANSERİ OLGULARINDA FİBROBLAST BÜYÜME
FAKTÖRÜ RESEPTÖR 3 (FGFR3) A248C, S249C, G372C, T375C
MUTASYONLARININ VARLIĞI**

**Pamukkale Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yüksek Lisans Tezi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı**

Yavuz DODURGA

Danışman: Doç. Dr. N. Lale ŞATIROĞLU-TUFAN

**Ağustos,2006
DENİZLİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAY FORMU

Yavuz DODURGA tarafından Doç. Dr. N. Lale ŞATIROĞLU TUFAN yönetiminde hazırlanan “**Mesane kanseri olgularında fibroblast büyüme faktörü reseptör 3 (FGFR3) A248C, S249C, G372C, T375C mutasyonlarının varlığı**” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı

Jüri Üyesi

Jüri Üyesi

Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun / / tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Doç. Dr. A. Çevik TUFAN
Müdür

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırılmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

İmza :
Öğrenci Adı Soyadı : Yavuz DODURGA

TEŞEKKÜR

Bu tezin hazırlanmasında maddi-manevi desteklerini esirgemeyen, Doç. Dr. N. Lale ŞATIROĞLU TUFAN'a, ayrıca Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı başkanı Prof. Dr. Hüseyn BAĞCI ve Sağlık Bilimleri Enstitü müdürü Doç. Dr. A. Çevik TUFAN'a teŐekkürü bir borç bilirim.

ÇalıŐmadaki örnekleri sağlayan ve patolojik bilgilerini esirgemeyen Dr. Canten TATAROĞLU'na, ayrıca tez süresince desteklerini yine esirgemeyen tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan ve bana inanan aileme ve arkadaşlarıma sonsuz sevgiler ve teŐekkürler...

ÖZET

MESANE KANSERİ OLGULARINDA FİBROBLAST BÜYÜME FAKTÖRÜ RESEPTÖR 3 (FGFR3) A248C, S249C, G372C, T375C MUTASYONLARININ VARLIĞI

Dodurga, Yavuz
Yüksek Lisans Tezi, Tıbbi Biyoloji ABD
Tez Yöneticisi: Doç. Dr. N. Lale Şatıroğlu Tufan

Ağustos 2006, 61 Sayfa

Üriner sistemde oluşan kanserlerinin büyük kısmı mesaneden gelişir ve yaklaşık %90'ı transisyonel hücre karsinomudur. Fibroblast büyüme faktörü reseptörleri (FGFR) yapısal olarak reseptör tirozin kinaz ailesindedir ve hücre farklılaşmasında, proliferasyonunda, sinyal yollarının düzenlenmesinde ve embriyonik gelişmede önemli roller oynamaktadır. FGFR3 geni kromozom 4p16.3 bölgesine lokalizedir ve çeşitli yanlış anlamlı mutasyonlar sonucunda otozomal kalıtmı çeşitli iskelet sistemi hastalıkları ortaya çıkmaktadır ve ayrıca onkogenik etkisi olduğu da düşünülmektedir. Bu yüksek lisans tezinde, FGFR3 tanatoforik displazi mutasyonları olarak gruplandırılan ekzon 7 A248C, S249C ve ekzon 10 G372C, T375C kodonlardaki olası yanlış anlamlı mutasyonların mesane kanseri hasta popülasyonundaki varlığı ve klinikopatolojik parametreler üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

Denizli Devlet Hastanesi Patoloji bölümüne tanı alma amacıyla başvuran 56 olguya ait mesane transizyonel hücre karsinomu doku örneği çalışma kapsamına alınmıştır. Parafin kesitlerden DNA izolasyonunun sonrasında, FGFR3 geni ekzon 7 A248C, S249C ve ekzon 10 G372C ve T375C kodonlarını içeren DNA parçaları polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılıp, A248C ve S249C kodonlarındaki mutasyonlar Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi yöntemi ile ve ekzon 10 G372C ve T375C kodonlarındaki mutasyonlar DNA dizi analizi ile araştırılmıştır.

Bu çalışma kapsamına alınan 56 adet mesane transizyonel hücre karsinomunun 14 tanesi (%25) pTa, 23 tanesi (%41,1) pT1, 19 tanesi (%33,9) pT2 olarak evrelendirilmiştir. Ayrıca 56 olgunun 5 tanesi (% 8.9) G1, 25 tanesi (% 44.6) G2, 26 tanesi (% 46.4) G3 olarak derecelendirilmiştir.

FGFR3 genindeki tanatoforik displazi mutasyonları olarak gruplandırılan ekzon 7 A248C, S249C ve ekzon 10 G372C, T375C kodonlardaki tespit edilen toplam mutasyon varlığı 56 olgunun 23 tanesi (%41.1) normal, 33 tanesi (%58.9) heterozigot mutant olarak değerlendirilmiştir. 56 olgunun 7'sinde (%12.5) A248C ve 28'inde (%50) S249C, 3'ünde (%5.4) T375C kodonlarında yanlış anlamlı mutasyon saptanmış olup bu oran literatürdeki diğer çalışmaları desteklemektedir.

FGFR3 genindeki ekzon 7 A248C, S249C ve ekzon 10 G372C ve T375C mutasyon sonuçları tek tek ve toplu olarak değerlendirildiğinde, daha önce yapılmış çalışmalardan farklı olarak tümör evresine ve derecesine göre homojen dağılımlı olduğu saptanmıştır. Ancak daha fazla sayıda erken evre ve düşük derece tümör örneğinin araştırma kapsamında değerlendirilmesi gerektiği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Mesane tümörü, FGFR3 geni, mutasyon, PCR, restriksiyon enzim kesimi, sekans analizi.

ABSTRACT

FIBROBLAST GROWTH FACTOR RECEPTOR 3 (FGFR3) A248C, S249C, G372C, T375C MUTATIONS INCIDENCE IN BLADDER CANCER

Dodurga, Yavuz

Thesis in Medical Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. N. L. Satrioglu-Tufan

August 2006, 61 Pages

Bladder cancer is the most frequent cancer derived from urinary system and %90 of them is transitional cell carcinomas. Fibroblast growth factor receptors (FGFR) belong to the tyrosine kinase family and have important roles in cellular differentiation, proliferation, cell signaling and embryonic development. FGFR3 is localized chromosome 4p16.3. Missense mutations of fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) are associated with autosomal dominant human skeletal disorders and some oncogenic effects. In this thesis study, we investigated the incidence of FGFR3 thanatophoric dysplasia mutations located at exon 7 A248C, S249C and exon 10 G372C, T375C in a bladder carcinoma patient population and its correlation to clinicopathological parameters.

Fifty six paraffin embedded specimens of transitional cell carcinoma of the urinary bladder were obtained from Denizli State Hospital Pathology department and included in this study. After the DNA isolation from the paraffin sections, PCR amplification of DNA segments including exon 7 A248C, S249C and exon 10 G372C, T375C was performed for Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) and DNA sequencing analysis.

Among the 56 transitional cell carcinomas, 14 of them (%25) were classified as pTa, 23 of them (%41,1) were classified as pT1 and 19 of them (%33,9) were classified as pT2. In addition, 5 of them (% 8.9) were graded as G1, 25 of them (% 44.6) were graded as G2, 26 of them (% 46.4) were graded as G3.

FGFR3 thanatophoric dysplasia mutations located at exon 7 A248C, S249C and exon 10 G372C, T375C were detected in 33 of the patients (%58.9) (heterozygous mutant) and 23 of the patients (%41.1) were found to be normal. Among the 56 transitional cell carcinomas, missense point mutations were detected in 7 of them (%12.5) at codon A248C, 28 of them (%50) at codon S249C, and 2 of them (%5.4) at codon T375C and these results are in agreement with the previous research reports in the literature.

When the results of the FGFR3 thanatophoric dysplasia mutations located at exon 7 A248C, S249C and exon 10 G372C, T375C were analyzed one by one or as a group, despite the findings of previous research reports, it has been suggested that these mutations are detected homogenously regardless of the tumor classification and tumor grade in our study. Hence, it is our intention to include more early stage and low grade tumor samples in this research project.

Key Words: Bladder cancer, FGFR3 gene, mutation, PCR, Restriction fragment length polymorphism, sequence analysis

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
Tez Onay Sayfası.....	i
Bilimsel Etik Sayfası.....	ii
Teşekkür.....	iii
Özet.....	iv
Abstract.....	v
İçindekiler Dizini.....	vi
Şekiller Dizini.....	vii
Tablolar Dizini.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Mesane Kanseri Risk Faktörleri ve Patogenezi.....	2
1.2. Mesane Kanserinin Histopatolojisi.....	4
1.3. Mesane Kanseri Klinik Belirtiler.....	6
1.4. Mesane Kanseri Evrelendirme.....	6
1.5. Derceleme (Grade'leme).....	9
1.6. Mesane Kanseri Prognoz Tayininde Kullanılabilen Moleküler Belirteçler ve Roller.....	11
1.7. Mutasyon.....	13
1.8. Genetik ve Kanseri.....	17
1.9. Büyüme Faktörleri.....	20
1.10. Fibroblast Büyüme Faktörleri.....	21
1.11. Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörleri (FGFR).....	23
1.12. FGFR Aracılığı ile Sinyal İletimi.....	25
1.13. Tirozin Kinaz Reseptörleri.....	27
1.14. Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü 3.....	29
2. MATERYAL VE METOT.....	34
2.1. Örnekler.....	34
2.2. DNA İzolasyonu.....	34
2.3. DNA Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	37
2.4. Mutasyon Analizi-Polimeraz Zincir reaksiyonu (PZR).....	38
2.5. PZR Ürününün Görüntülenmesi.....	39
2.6. Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP).....	39
2.7. DNA Dizi Analizi.....	40
2.8. İstatistiksel Analiz.....	40
3. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	41
4. SONUÇ.....	55
5. KAYNAKLAR.....	56
6. ÖZGEÇMİŞ.....	61

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1. Mesane kanserinin evrelendirilmesi (Tanagho vd 2004).....	8
Şekil 1.2 İnsan fibroblast büyüme faktör reseptörleri	23
Şekil 1.3 FGF reseptörleri aracılığıyla sinyal iletimi	26
Şekil 1.4 FGFR 3 izoformları (Eswarakumar vd 2005).....	30
Şekil 1.5 %2`lik agaroz jeldeki ekzon 7 PZR görüntüleri. M: 100 baz çifti (bç) Marker.....	41
Şekil 1.6 %2`lik agaroz jeldeki ekzon 10 PZR görüntüleri. M: 100 baz çifti (bç) Marker.....	42
Şekil 1.7 %3`lük MS agaroz jeldeki ekzon 7 A248C kodonu Hae II enzim kesim görüntüleri.4,6,7,8,9 kuyucuklar A248C mutant. M: 100bç Marker.....	43
Şekil 1.8 %3`lük MS agaroz jeldeki ekzon 7 S249C kodonu Tse I enzim kesim görüntüleri. 1-12 kuyucuklar S249C mutant, 13 PZR ürünü M: 100bç Marker.....	45
Şekil 1.9 FGFR3 ekzon 10 T375C mutasyonlu 20 numaralı örnek. Daire içindeki alan normal kodonu göstermektedir.....	45
Şekil 1.10 FGFR3 ekzon 10 T375C mutasyonlu 16 numaralı örnek. Daire içindeki alan TAT-TGT değişimiyle sonuçlanan kodonu göstermektedir.....	46
Şekil 1.11 FGFR3 ekzon 10 T375C mutasyonlu 41 numaralı örnek. Daire içindeki alan TAT-TGT değişimiyle sonuçlanan kodonu göstermektedir.....	47
Şekil1.12 FGFR3 ekzon 10 T375C mutasyonlu 54 numaralı örnek. Daire içindeki alan TAT-TGT değişimiyle sonuçlanan kodonu göstermektedir.....	47
Şekil 1.13 16 numaralı örneğe ait sekans dizisi. * Gri boyalı alan A ve G değişimini göstermektedir.....	48
Şekil 1.14 41 numaralı örneğe ait sekans dizisi. * Gri boyalı alan A ve G değişimini göstermektedir.....	48
Şekil 1.15 54 numaralı örneğe ait sekans dizisi. * Gri boyalı alan A ve G değişimini göstermektedir.....	49
Şekil 1.16 20 numaralı örneğe ait sekans dizisi. * Gri boyalı alan A ve G değişimi gözlenmemiştir.....	49

TABLULAR DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 1.1 Bazı büyüme faktörleri	20
Tablo 1.2 İnsan FGF reseptör genlerinin karşılaştırılması (%).....	24
Tablo 1.3 FGFR izoformlarının özgün ligandları (Eswarakumar vd 2005).....	30
Tablo 1.4 FGFR3 mutasyonları ile ilişkili bazı iskelet anomalileri	31
Tablo 1.5 Mesane Tümörlü 56 Olgunun Tedavi Sonuçları ve Karakteristik Özellikleri.....	34
Tablo 1.6 Hastaların yaş, cinsiyet, tanı, evre ve derece dağılımı.....	36
Tablo 1.7 DNA örneklerinin spektrofotometrik ölçümleri.....	37
Tablo 1.8 FGFR3 Çoğaltılmasında Kullanılan Primerler	38
Tablo 1.9 FGFR3 A248C, S249C, G372C ve T375C mutasyonlarının dağılımı.....	50
Tablo 1.10 Mesane tümörlerinde FGFR3 mutasyonları.....	51
Tablo 1.11 Mesane kanseri hasta popülasyonunda FGFR3 genine ait Tanatoforik Displazi Mutasyon varlığı sonuçları ile cinsiyet, tümör evresi ve derecesi ile olan ilişkisi.....	52

1. GİRİŞ

Üriner sistemde meydana gelen kanserlerinin büyük kısmı mesaneden gelişir. Erkeklerde prostat, akciğer ve kolorektal kanserlerden sonra dördüncü sırada görülen en yaygın kanserdir. Kadınlarda görülen kanserler arasında sıklık bakımından sekizinci sırada yer alır. Çocuklar da dahil olmak üzere her yaşta görülebilir. Ancak orta yaş ve ileri yaşlarda görülme oranı yüksektir. Tanı sırasında yaş ortalaması yaklaşık 65'tir. Mesane kanseri olgularında tanı konulduğu anda bulguların yaklaşık %85'i mesanede lokalize olup, %15'i bölgesel lenf düğümlerine veya uzak bölgelere yayılmış olarak görülür (Messing vd 1998, Petersen vd 1992). Erkeklerde kansere bağlı ölüm nedenleri arasında 5'inci sırada yer alır. Yaşlılarda mesane kanserinden ölüm oranı daha yüksektir.

Erişkinde boş mesane, pelvis minörün anterio-inferior bölümünde yer alır ve dört yüzlü ters çevrilmiş piramite benzeyen, vezikal fasiya tarafından sarılmış bir organdır. Mesane boynu kadında pubovezikal ligament, erkekte puboprostatik ligament tarafından sıkıca sarılmış durumdadır. Mesanenin diğer bölümleri pelvisin fibroadipö dokusu içinde kısmen serbest olarak uzanır. Üst kısmında yer alan süperior yüzey, pelvik parietal periton tarafından sarılmaktadır. Mesane tabanı olarak da bilinen posterior yüzey posterior/inferior yönde uzanır. Kadınlarda uterin serviks ve vajinanın proksimal kısmı, erkeklerde vezikülo seminalisler ve vas deferens tarafından rektumdan ayrılır. Trigon adı verilen yapı ise, mesanenin tabanında lokalize olmuş kompleks anatomik bir yapıdır ve mesane boynunun posterioruna doğru uzanır. Mesanenin iki inferolateral yüzeyi lateral, inferior ve anterior yönlerde uzanır ve levator ani kasının fasiyası ile bağlantılıdır. Apeks olarak bilinen yapı; mesanenin en üst noktasıdır ve süperior yüzün ve iki inferolateral yüzün bileşim noktasında yer alır (Reuter vd 1997).

Mesane duvarında en iç tabakayı "ürotelyum" olarak adlandırılan epitelyal yüzey oluşturur ve içten dışa doğru lamina propria, muskularis propria ve adventisya tabakaları yer alır. Mesanenin üst yüzeyi parietal periton ile devamlılık gösterir ve bu nedenle serozaya sahiptir. Bu tabakalar üroteliyal karsinomlara sahip hastaların evrelemesi, tedavi seçimi ve beklenen sağ kalım süresinin belirlenmesi için hem patolojik hem de klinik olarak kullanılmaktadır. Bu nedenle mikroskopik tanının doğru şekilde ayırt edilmesi önem taşımaktadır (Reuter vd 1997).

1.1. Mesane Kanseri Risk Faktörleri ve Patogenezi

Günümüzde, yüzeysel ve yavaş ilerleyen mesane tümörlerinin oluşumunda genetik yatkınlığın varlığı, agresif değişici epitel karsinomlarının ve skuamoz hücre karsinomlarının ise çeşitli karsinojenlerin, kimyasalların etkisiyle sonradan geliştiği düşünülmektedir. Mesane kanserinin oluşumunda birçok faktörün rol aldığı bilinmektedir. Etiyolojik faktörler arasında genetik yatkınlığın dışında, sigara, mesleki karsinojenler, kronik enfeksiyonlar, mesane taşı/yabancı cisimler, analjezikler, pelvik radyasyon, sitotoksik kemoterapi ve bazı gıdalar sayılabilir (Tanagho vd 2004).

Mesane kanseri gelişiminde sigara kullanımı erkek ve kadın olgularda sırasıyla %50 ve %31'inden sorumludur. Genellikle sigara kullanmayanlara göre, sigara kullananlarda mesane kanseri gelişme riski 2 kat daha artmış olup, aradaki ilişkinin doza bağlı olduğu düşünülmektedir (Anafarta vd 1998).

Mesleki maruziyet durumunda ise, erkeklerde %15-35 ve kadınlarda %1-6 oranında sorumlu olduğu görülmüştür. Kimyasal sanayi, petrol, kauçuk, boya, deri ve basım fabrikalarında çalışanlar yüksek bir risk altındadır. Spesifik mesleki karsinojenler arasında benzidin, beta naftilamin ve 4-aminobifenil sayılabilir ve bu ajanlara maruz kalma ile tümör gelişimi arasındaki latent dönem uzayabilir. Farklı malign hastalıkların tedavisi için siklofosfamid alan hastalar da risk grubu altındadır. Yapay tatlandırıcıların kullanımı da bir risk faktörü olarak öne sürülmüştür. Enfeksiyon, enstrümantasyon ve taşların indükte ettiği fiziksel travmalar, malignite riskini arttırmaktadır.

Mesane kanserinin gelişmesine yol açan genetik olayların niteliği tam olarak aydınlatılamamakla birlikte, birden fazla genetik mekanizmanın etkili olduğu düşünülmektedir. Örneğin, onkogenlerin aktivasyonu ve tümör baskılayıcı genlerin fonksiyon kaybı, kanser oluşumunda rol alan en önemli sebeplerdendir. Dokuz numaralı kromozomun uzun kolu (9q) üzerindeki genetik materyalin kaybı, hem düşük patolojik derece ve evreli, hem de yüksek derece ve evreli olgularda sürekli saptanan bir bulgu olması nedeniyle bu değişikliğin belki de mesane kanseri gelişiminin erken evresinde meydana gelen bir fenomen olduğunu düşündürmektedir. İnvaziv mesane tümörlerine özgü farklı genetik değişiklikler de ifade edilmektedir. Mesane kanserlerinin yaklaşık %40'ında c-Ha-ras proto-onkogenini içeren 11p delesyonunun varlığı görülmüştür. Tüm

invaziv mesane kanserlerinin %60'ını aşkın bölümünde kromozom 17p'de delesyonlar gözlenmiş olup, yüzeysel tümörlerde kromozom 17p delesyonları henüz tanımlanamamıştır. p53 tümör baskılayıcı geni kromozom 17p'de lokalize olduğundan, bu bölgedeki delesyonlar ve sonuçları anlamlı olarak değerlendirilmiştir (Anafarta vd 1998, Tanagho vd 2004).

Mesane kanserinde ilk gözlenen, üroepitelial hiperplazi ve hücre tabaka sayısındaki artıştır. Tabaka sayısındaki artışı, polarite ve farklılaşma izler, bu evrede muayene edilen mesanede, transisyonel hücreli epitelin, glandüler, tübüler veya skuamöz epitele transformasyonu gözlenebilir. Displaziyi, neoplazi izler.

Önce neoplazik değişiklikler meydana gelir. Kanser süperfisiyal (yüzeyel) ve invaziv veya metastatik olabilir. Tümör ilerlemesi için sorumlu olayların doğası tam olarak bilinmemektedir. Başlangıçta tümör hücreleri bazal membrana bağlanır. Bazal membranın bozulması, tip IV kollajenazın proteaz üretimi ile kolaylaşır. Tümörün ilerlemesi hücre motilite artışına sebep olan otokrin motilite faktör ve sitokinleri sekrete eden hücrelerle tamamlanır ve bunlar invazyon hatta metastaza sebebiyet verirler. Klinik olarak otokrin motilite faktörü konsantrasyonu, invaziv tümörlü hastaların idrarında, süperfisiyal tümörlü hastalarinkine oranla oldukça fazladır.

1.2. Mesane Kanserinin Histopatolojisi

Çoğu transisyonel epitel hücreli karsinomlar olmakla birlikte tüm mesane kanserlerinin %95'i epitelyal malignitelerdir (Tanagho vd 2004).

Normal Ürotelyum

Ürotelyum, ekstraselüler matriksten (kollajen, glikozaminoglikanlar, adeziv glikoproteinler) ibaret bazal membran üzerine oturan 3-7 katman değişici epitel hücrelerden oluşmuştur. Epitelyum hücrelerin görünümü değişkenlik gösterir. Aktif olarak çoğalan bazal membran üzerindeki bazal hücreler, luminal hücreler ve belki de normal mesane epitelinin en önemli özelliği olan büyük şemsiyeye benzer sıkıca birbirine bağlı hücreler görülür. Bazal membranın ilerisinde, bazen düz kas liflerini içeren gevşek bağ dokusu yapısındaki lamina propria bulunur. Bu lifler daha derindeki gerçek muskularis propriayı belirleyen daha yaygın kas elemanlarından ayırt edilmelidir. Mesanenin musküler duvarında, farklı yönlere giden kas demetleri mevcuttur. Bunlar mesane boynu düzeyinde birbirlerine yaklaştığında içte ve dışta uzunlamasına ve ortada dairesel düzenli tabaka olmak üzere 3 bölge ayırt edilebilir.

Papilloma

Dünya Sağlık Örgüt'üne (DSÖ) göre papillom, normal karakterde değişici epitelle döşeli fibrovasküler stromada bulunan benign tabiatlı bir tümör türüdür. Ayrıca papillom fibrovasküler bir sap etrafında gelişen doğal özellikte üroteliyal epitelyum ile örtülü benign nitelikte papiller bir tümördür. Tüm üroteliyal karsinom olgularının %1'ni oluşturur. Prognoz iyidir ve ayrıca ilerleme riski olmadığı kabul edilmektedir.

Değişici Epitel Hücreli Karsinom

Tüm mesane kanserlerinin yaklaşık %90'ı değişici epitel hücreli karsinomlardır. Bu tümörler sıklıkla papiller, ekzofitik lezyonlar halinde görülür. Papiller yapıda olanlar genellikle yüzeysel olmasına karşın, sapsız tümörler invazivdir.

Karsinom in situ (KIS) düz, papiller yapıda olmayan, neoplazik epitel olarak bilinir. Ürotelyum normal hücresel polariteden yoksun, hücreler geniş ve göze çarpan nükleuslara sahiptir. KIS ekzofitik bir lezyonun yakınında veya uzağında lokalize olabilir veya nadir makroskobik tümörleri olmayan hastada fokal veya yaygın lezyonlar halinde oluşabilir. Tümörün seyri değişkendir ve invaziv olabilir.

Tümör invazyonunun sıklığı, tekrarlaması ve ilerlemesi tümörün derecesiyle güçlü bir korelasyon içindedir.

Değişici Epitel Hücreleri İçermeyen Karsinomlar

- Adenokarsinom: Tüm mesane kanserlerinin %2'sinden azını oluşturur. Histolojik açıdan adenokarsinomlar mukus salgılar ve glandüler, kolloid veya yüzük şeklinde görülebilirler. Bu tip tümörlerde genellikle kas tutulumu vardır.
- Yassı Epitel Hücreli Karsinom: Tüm mesane kanserlerinin %5-10'unu oluşturur ve sıklıkla kronik enfeksiyon, mesane taşı veya kronik katater kullanım öyküsüyle ilişkilidir. Mısır, Afrika'nın bazı bölgeleri ve Orta Doğu'da tüm mesane kanserlerinin yaklaşık %60'ını oluşturur. Bu tümörlere tanı konulduğunda sıklıkla nodüler ve invaziv karakterdedir.
- Farklılaşmamış Karsinomlar: Nadir görülen mesane tümörlerindedir. Bu tümör tipinde epiteliyal elemanlar yoktur. Histolojik açıdan akciğer lezyonlarını andıran küçük hücreli bir tip tanımlanmıştır.
- Mikst Karsinom: Tüm mesane kanserlerinin yaklaşık %4-6'sını oluşturur. Değişici epitel hücreleri, glandüler, yassı epitel hücreleri ve farklılaşmamış bileşenleri içerir. Bu kansinoma tanı konulduğunda, büyük ve infiltran tiptedir.

Nadir Görülen Epiteliyal Olan ve Olmayan Kanserler

Mesane de görülen nadir epiteliyal kansinoma lar; karsinoid tümörler, villöz adenomalar, karsinosarkomalar ve melanomlardır. Mesane de nadir görülen ve epitel kökenli olmayan kanserleri; lenfomalar, feokromositomalar, koriyokarsinoma lar ve çeşitli mezenşimal tümörlerdir (hemanjiyom, miyosarkoma vb.).

1.3. Mesane Kanserinde Klinik Belirtiler

Mesane kanserli hastaların %85-90'ında hematüri ilk gözlenen semptomdur. Hematüri mikroskobik ve sürekli olabildiği gibi, bazı hastalarda vezikal irritabilite (sık sık idrara çıkma, idrarını yetiştirememesi gibi) görülebilir. Hastalığın ileri evrelerinde kemik metastazlarına bağlı olarak kemik ağrıları, üretral obstrüksiyon ve retroperitoneal metastazlara bağlı olarak lomber ağrı gözlenebilir.

Hastalık yüzeysel natürde ise herhangi bir morfolojik belirti vermez. Geniş tümörler veya invaziv tümörler olduğunda genel anestezi altında bimanuel muayene ile bu tümörlerin palpasyonu olasıdır. Tümörün genel anestezi altında rezeksiyondan önce ve sonra palpe edilip edilmemesi hastalığın invaziv olup olmadığının belirtisidir. Diseksiyon sonrası palpe edilen tümörün varlığında hastalık T3a'dan daha ileri olduğu anlamındadır. T2-T3a tümörde rezeksiyon sonrası tümör palpe edilmez. Eğer tümör rektum, prostat veya vaginaya fikse ise T4 tümörden söz edilir.

1.4. Mesane Kanserinde Evrelendirme

Mesane kanserinin klinik ve patolojik evrenmesi hastalara uygulanacak olan uygun tedavinin seçilmesinde çok önemli rol oynar. Mesane kanseri klinikte yüzeysel ve invaziv kanser olarak tanımlanır. Yüzeysel kanserler mesanenin muskularis propria'sına invaze olmayan tümörleri içerirken (evre Ta, Tis ve T1), invaziv kanserler muskularis propria ve ötesine invaze tümörleri içermektedir (evre T2, T3, T4). Bu sebeple, patolojik evrelemede en önemli olan aşama, tümörün muskularis propria'ya invaze olup olmadığının tespit edilmesidir.

Günümüzde, Jewett ve Strong tarafından 1946 yılında öne sürülmüş olan sistemin modifikasyonu olan Marshall ve American Joint Commission for Cancer Union International Contre le Cancer (AJCC-UICC) sınıflandırmaları klinikte uygulan iki ana sistemdir. Her iki evreleme sisteminde de, mesane duvarı içine invazyon derinliği, bölgesel ve uzak metastaz paternini temel alınmaktadır (Grignon vd 1997). Mesane tümörlerinin AJCC-UICC sistemine göre evreleme sistemi (TNM sistemi) (TNM: Tümör-Lenf Nodu-Metastaz) aşağıda özetlenmiştir:

Primer Tumor (T)

T0→ Primer tumorün kanıtı yok.

Ta→ Non-invaziv papiller karsinom.

Tis→ Karsinom in situ.

T1→ Tumor subepitelial konnektif dokuya (lamina propria) invaze.

T2→ Tumor yüzeysel kas tabakasına invaze.

T3→ T3a: Tumor derin kas tabakasına invaze.

→ T3b: Tumor perivezikal yağ tabakasına invaze.

T4→ Tumor prostat, uterus, vajina, pelvik duvarı veya abdominal duvara invaze.

Lenf Nodu (N)

N0→ Bölgesel lenf nodu metastazı yok.

N1→ En büyük çapı 2 cm veya daha küçük olan bir tane metastatik lenf nodu.

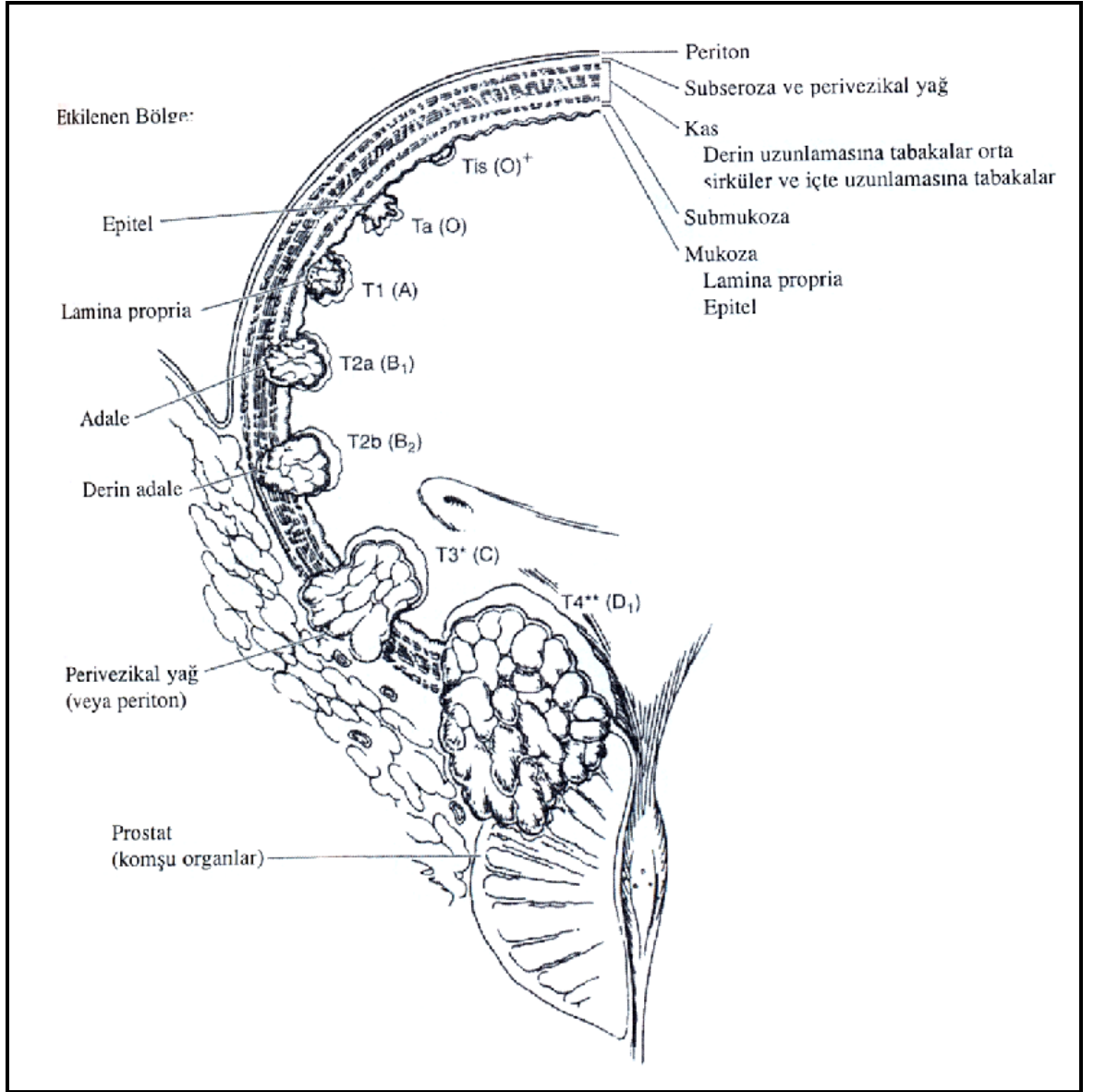
N2→ Çapı 2 cm'den büyük, ama 5 cm'den küçük bir tane metastatik lenf nodu veya hiç birisinin çapı 5 cm'den büyük olmayan çoklu lenf nodu metastazı.

N3→ En büyük çapı 5 cm'den büyük lenf nodu metastazı.

Uzak Metastaz (M)

M0→ Uzak metastaz yok.

M1→ Uzak metastaz var.



Şekil 1.1. Mesane kanserinin evrelendirilmesi (Tanagho vd 2004).

1.5. Dereceleme (Grade'leme)

Üroteliyal karsinomun ilk dereceleme şeması 1922'de Mayo Klinik'te, Broders tarafından önerilmiş ve diferansiye tümör hücrelerinin yüzdesinin hesaplanmasını temel almıştır. En yaygın olarak kullanılan dereceleme sistemi DSÖ tarafından 1973'te yayınlanan dereceleme sistemidir (Grignon vd 1997). Burada yapısal ve sitolojik değişikliklerin derecesi temel alınmaktadır. Bunun yanı sıra DSÖ/ISUP (International Society Urology Patology) 1998 ve DSÖ 1999 sınıflandırmaları da kullanılmaktadır, ancak diğerleriyle karşılaştırıldığında DSÖ 1973, klinik olarak doğrulanabilen, yaygın şekilde kullanılan, zaman içinde test edilen ve tutarlılığı yüksek olan dereceleme sistemidir.

1973'te yayınlanan Dünya Sağlık Örgütü'nün sınıflaması (DSÖ 1973) aşağıda özetlenmiştir (Montironi vd 2003).

Üroteliyal papilloma; mitotoik figürler olmaksızın sitolojik ve yapısal olarak normal üroteliyumla döşeli, küçük, ince fibrovasküler korlu, genellikle soliter, papiller lezyon olarak tanımlanmıştır.

Papiller üroteliyal karsinomların derecelenmesinde kesitlerde görülen en kötü derece temel alınmaktadır.

Derece 1 veya G1 karsinoma; minimal hafif nükleer irileşme, normal veya hafif bozulmuş yapı ve mitoz içermeyen veya nadir mitotik figür gösteren, 7 hücre tabakasından fazla hücre içeren kalınlaşmış üroteliyumdan meydana gelir.

Derece 2 veya G2 karsinoma; belirgin nükleer pleomorfizm, kaba kümelenen kromatin ve normal yapısının bir miktar bozulmasını gösterir.

Derece 3 veya G3 karsinoma; son derece belirgin nükleer değişiklikler gösterir. Hücre sayısında artış, polaritenin bozulması, hücre boyutunda düzensizlik, bazaldan yüzeyel mukozoya kadar diferansiyasyonun yokluğu, kromatin paterninde farklılık, artmış mitotik figürler ve nadiren tümör dev hücrelerinin varlığı olarak tanımlanan hücresel anaplazi grade 3 karsinomanın karakteristik özellikleri arasındadır.

Mesanein üroteliyal karsinomlarının DSÖ/ISUP 1998 sınıflandırması, efektif olarak kullanılabilen mesane neoplazisi için evrensel olarak kabul edilmektedir. Bu sistem, hem neoplastik hem de reaktif düz (flat) ve papiller lezyonları içeren tanısal antitelerden oluşmaktadır (Epstein vd 1998).

DSÖ/ISUP 1998 sınıflaması aşağıdaki gibidir (Epstein vd 1998);

- Normal
 - Normal
- Hiperplazi
 - Düz hiperplazi
 - Papiller hiperplazi
- Atipili düz lezyonlar
 - Reaktif atipi
 - Önemi bilinmeyen atipi
 - Displazi (düşük derece introüroteliyal neoplazi)
 - Karsinoma in situ (yüksek derece introüroteliyal neoplazi)
- Papiller neoplazmlar
 - Papilloma
 - İverted papilloma
 - Düşük malign potansiyelli papiller neoplazm
 - Düşük derece papiller karsinoma
 - Yüksek derece papiller karsinoma
- İnvaziv neoplazmlar
 - Lamina propria neoplazmı
 - Muskularis propria invazyonu

1.6. Mesane Kanseri Prognoz Tayininde Kullanılabilen Moleküler Belirteçler ve Roller

Normal hücresel proliferasyonda hücresel döngülerden düzenli bir şekilde geçmeyi gerektirirken, malignite kontrolsüz çoğalma ile karakterize edilir. Siklinler ve sikline bağımlı kinazlar gibi hücre döngüsüne bağımlı protein kompleksleri bu ilerlemeleri sıkıca kontrol etmektedir. Bu protein kompleksleri p53 geni ve retinoblastom (Rb) geni gibi hücre döngüsündeki geçiş noktalarında bulunan önemli proteinleri fosforile eder. Hücre döngüsündeki kontrol kaybı karsinogenezin gelişmesinde önemli ve erken bir adım olabilir.

İnvaziv mesane kanseri görülen hastalarda en yaygın olarak tanımlanmış moleküler belirteç p53 ifadenmesidir. p53 geni hücre döngüsünün düzenlenmesinde anahtar rol oynayan bir tümör baskılayıcı gendir. DNA hasarı oluştuğunda p53 proteinin miktarı artarak hücre döngüsünün durmasına ve bu esnada DNA'nın tamir edilmesine neden olur. Normal p53 ifadenmesi olan hastalarla karşılaştırıldığında p53 ifadenmesi bozulmuş hastalarda hastalığın yenileme riski artmış ve genel sağ kalımı kötüleşmiş olduğu görülmektedir. İmmünohistokimyasal p53 boyanması göstermeyen pT1, pT2 ve P3a kanserlerde tekrarlama oranları sırasıyla %7, %12, %11 iken, p53 boyanması pozitif kanserlerde karşıt tekrarlama oranları sırasıyla %62, %56, %80 düzeyindedir (Anafarta vd 1998, Tanagho vd 2004).

İmmünohistokimyasal yöntemlerle belirlenen Rb ifade değişimleri yüksek derece ve evredeki mesane kanserleriyle ilişkilendirilmiştir. Doğal tip, orijinal p53 ve Rb'lerini muhafaza eden tümörlü hastalarla karşılaşıldığında invaziv mesane kanserli hastalarda hem p53 hem de Rb'i inceleyen çalışmalar her iki gende oluşan ifade değişimli mesane tümörlü hastalarda daha kötü bir prognoz ve daha düşük bir genel sağ kalımın varlığını düşündürmektedir. Bu genlerden sadece birinin ifadesinin değiştiği tümörlerin davranışı bu iki uç arasındadır.

Tümör büyümesi ve metastazı yeni kan damarlarının oluşmasını yani anjiyogenezi gerektirir. Yeni damarların gelişmesi sıkı biçimde hem anjiyogenetik uyarıcılar hem de fibroblastik büyüme faktörleri, trombospondin-1 ve anjikiyostatin gibi anjiyojenik inhibitörlerle düzenlenmektedir. İncelenen tümörlerde geliştirilen immünohistokimyasal

yöntemlerle mikro damarların yoğunluğu ölçülerek anjiyogenezin derecesi hesaplanır. Mikro damarların yoğunluğu mesane kanseri de dahil olmak üzere insanlardaki çeşitli kanserlerin yararlı bir prognostik belirteçidir. Mesane kanserinde mikro damarların yoğunluğu radikal sistektomi ile tedavi edilmiş hastalarda hastalığın ilerlemesi, lenf düğümü metastazları ve genel sağ kalımla ilişkilendirilmiştir (Tanagho vd 2004).

Mesane kanserli hastalarda prognoz ile ilişkili olabilen tümör büyüme fraksiyonu (proleferatif indeks) ve çeşitli hücresel adezyon molekülü ifadenmesi (E-kaderin) gibi başka belirteçler de değerlendirilmektedir.

1.7. Mutasyon

Mutasyon, kalıtım molekülü olan DNA dizisinde ve/veya düzenlenmesindeki değişikliklerdir. Genel olarak üç grupta toplanır;

- *Gen mutasyonları:* Tek bir genin nükleotid dizi değişimine neden olan mutasyonlar,
- *Kromozom mutasyonları:* Kromozomların yapılarını değiştiren mutasyonlar,
- *Genom mutasyonları:* Hücrede toplam kromozom sayısını etkileyen mutasyonlardır.

Mutasyon Çeşitleri

Somatik Mutasyonlar

Genler somatik veya germ hücreli dokuda mutasyona uğrayabilirler. Gelişen somatik dokunun bir tek hücresinde meydana gelen bir mutasyon, bu öncül mutant hücreden bir popülasyon gelişimine neden olabilir. Diploid hücrelerde, bir dominant (baskın) mutasyon içeren hücre veya hücre kolonisinde fenotipin ortaya çıkması beklenir. Diğer taraftan, bir resesif (çekinik) mutasyon, normal allel tarafından gizlendiği için ifade fenotipe yansımayacaktır. Ancak, diğer allelde aynı gene ait ikinci bir mutasyonla homozigot çekinik mutasyon oluşabilir.

Germ Hücre Mutasyonları

Yumurta, sperm ve bu hücreleri oluşturan öncül hücrelerde görülen mutasyonlardır. Bir germ hücresi mutasyonu, gelişim sırasında cinsiyet hücrelerinin oluşumuna ayrılan özel dokusu içinde oluşur. Eğer döllenmeye, mutant bir eşey hücresi katılırsa bu mutasyon dölden döle aktarılabilir

Sonuçlarına göre Mutasyonlar

Mutasyonların sonuçları ilgili gene ve gene ait DNA'daki yeri, şekli ve büyüklüğüne göre değişebilmektedir. Bu nedenle mutasyonların fenotipe yansımaları genin ifade kontrol bölgelerinde, intronların içinde veya intron-ekzon kesim bölgelerinde veya polipeptidi kodlayan ekzon bölgelerinde oluşmasına göre değişebilmektedir. Sonuçları etkileyen başka faktörler arasında genetik şifredeki kodon dejenerasyonu olgusu ve protein sentezini sonlandıran “dur” kodonlarının varlığı sayılabilir.

Sessiz Mutasyonlar

Çok hücreli organizmalardaki nokta mutasyonlarının tamamına yakını fenotipik yönüyle nötraldir (insanlarda %93-97). Geriye kalan şifre konumunda olan kodonlardaki değişikliklerin 1/3 kadarı sessizdir; yani kodondaki mutasyonel değişiklik amino asit değişikliğine yansımaz. Çünkü DNA'dan mRNA'ya yansıyan değişiklik, yine aynı amino asiti kodlayan diğer bir kodona dönüşmüştür. Bu olay genetik şifredeki kodon dejenerasyonu olgusu ile açıklanabilir

Yanlış Anlamli Mutasyonlar

Bu tip mutasyonlarda, kodondaki nükleotit değişikliği, amino asit değişikliğine neden olur. Fenotipik yansımaları kodon veya nükleotit tipine göre farklı olabilir. Örneğin, polipeptitteki değişiklik benzer kimyasal özelliğe sahip bir amino asit olarak gerçekleşmişse etkisi daha az (Polar-Polar), kimyasal özelliği farklı bir amino asit yer almışsa etkisi daha fazla olabilir (Asidik-Bazik).

Anlamsız Mutasyonlar

Kodondaki nükleotit değişikliği, normal bir kodonun yerine mRNA'dan translasyonun (protein sentezinin) sona ermesini sağlayan “dur” kodonlarından (UAA, UAG ve UGA) birinin oluşmasına neden olur. Polipeptit sentezi erken sonlanır ve işlevsiz bir ürün oluşur.

Çerçeve Kayması Mutasyonları

Üçün katları dışında oluşan nükleotit eklenmesi veya eksilmesi şeklindeki DNA değişiklikleri, mRNA'daki üçlü kodon okuma çerçevesini tümüyle değiştirebilir. Aynı şekilde iki veya daha fazla nükleotidin DNA'ya katılması veya ayrılmasıyla da çerçeve kayması meydana gelir. Değişikliğin fenotipe yansımaları, bu tip düzensizliklerin genin 5' veya 3' bölgesine yakınlığına göre farklı olabilir. Sonuçta, proteinin tüm yapısı ve işlevi ortadan kalkabilir veya farklı bir işlev kazanmasına neden olabilir.

Gen Düzenleyici Bölgede Mutasyonlar

Genlerin ifade edilmesi, RNA polimerazın ve transkripsiyon faktörlerinin bağlandığı etkinleştirici (promotor ve hızlandırıcı) veya sessizleştirici özgün hedef bölgelerden kontrol edilir. Bu özgün hedef bölgelerin dizilimini değiştiren mutasyonlar, proteinin yapı ve işlevini değiştirmez ancak, belirli dokularda, belirli zamanda oluşacak ürün miktarını azaltabilir veya tümüyle ortadan kaldıracaklardır.

Bir düzenleyici gen, bir başka genin ifadenmesini denetleyen ürün oluşturabilir. Ayrıca genin yakınındaki veya uzağındaki bir DNA bölgesi genin etkinliğini değiştirebilir. Bu iki olgudaki mutasyonlar, normal düzenleyici sistemi bozabilir, geni sürekli olarak etkinleştirir veya etkisizleştirir. İfadenmeyi etkileyen bu iki sistemin birindeki mutasyon diğerindeki baskılayıcı bir mutasyon ile düzeltilebilir.

Baskılayıcı Mutasyonlar

Birincil mutasyonun neden olduğu fenotipin, aynı gende ikinci bir mutasyonla (gen içi) veya başka bir gendeki (gen dışı) mutasyonla düzeltilmesidir. Gen içi baskılayıcı mutasyonlar, bağlantı analizi yapılarak gen dışı baskılayıcı mutasyonlardan ayırt edilebilir.

Genetik bilginin DNA'dan proteine akışını değiştiren baskılayıcı mutasyonlar, enformasyonel baskılayıcılar olarak da tanımlanabilir. Birincil mutasyon bir proteinin miktarını veya etkinliğini azaltabilir. İkinci mutasyon bu tip miktar değişikliğini, genin

özgün düzenleyicilerini değiştirerek düzeltebilir. Mutant bir proteinin özgün aktivitesini düzenleyen alt birimlerini doğrudan etkileyen değişikliklerle veya translasyon sonu değişiklikleri etkileyerek etkinliğini düzenleyebilirler. Buna en basit örnek, iki protein arasındaki etkileşimi sağlayan moleküllerdeki değişikliklerdir. İki protein arasındaki ara yüzeyde yer alan amino asit değişimi birbirleri ile etkileşimini bozabilir, ikinci proteindeki amino asit değişikliği ile bu etkileşim yeniden kurulabilir. İşlev kazandıran dominant bir mutasyonun baskılanması orijinal proteinin miktarı, proteinin aktivitesi veya metabolik yolunun aktivitesi azaltılarak sağlanabilir.

Öldürücü Mutasyonlar

Öldürücü bir mutant allel, organizmanın hayatta kalmasını etkileyebildiği zaman tanınabilmektedir ve çoğunlukla ölüm nedeni gizli kalmaktadır. Ancak mutajenlerin uyarımıyla ortaya çıkan bazı mutasyonların hücrelerin çoğalmalarını engelledikleri iyi bilinmektedir. Ölüm, DNA sentezi engellenerek (Örneğin mitomisin C uygulanarak), mutasyonla çok gerekli bir ürünün sentezi (örneğin bir RNA polimeraz enziminin alt birimi) engellenerek veya mutant ürün oluşumu sonucu oluşabilir. Gereksindiği özgün bir amino asiti sentezleyemeyen mutant bir bakteri eğer içinde bulunduğu ortamda bu amino asit bulunmuyorsa çoğalamaz. Tay-sachs ve Huntington gibi bu tip mutasyonlarla karakterize insan genetik hastalıkları, yaşamın farklı dönemlerinde öldürücüdür. Bunun yanında organizma genomunda bir mutasyon bulunsa bile, belirli koşullarda fenotip ortaya çıkmayabilir. Örneğin ısıya duyarlı mutasyonlarda, ürünü normal işleyen mutant gen, sadece aşırı sıcaklıkta bu işlevini yitirebilir, ve belki de öldürücü olabilir.

1.8. Genetik ve Kanser

Kanser, hücrelerin kontrolsüz çoğalması ile karakterize, kompleks bir hastalık grubudur. Temel bozukluk DNA düzeyindedir ve bu nedenle kanser genetik bir hastalıktır. Çeşitli mutasyonların gen ifadesini değiştirmesi tüm kanserlerin ortak özelliği olarak bilinmektedir. Kanser çeşitlerinin çoğunda mutasyonlar somatik hücrelerde meydana gelir ve bu mutasyonlar üreme hücreleriyle gelecek kuşaklara aktarılmaz. Başka bir deyişle her kanser kalıtsal değildir. Ancak, kanser olgularının %1'inde, eşey kök hücrelerin çeşitli genlerinde meydana gelen mutasyonlar sonraki kuşaklara aktarılır ve bu değişim, yeni kuşakların kansere olan yatkınlığında büyük rol oynar. Ancak, kalıtsal mutasyonlar kanser oluşumunda tek başına yeterli olmayabilir. Kanser oluşumunun tamamlanması ve homozigot mutant genlerin oluşması için, homolog lokuslarda ek somatik mutasyonların oluşması gerekir. Hangi durumda olursa olsun, kanser hücre seviyesinde genetik bir bozukluk olarak kabul edilmektedir (Klug vd 2003).

Genomik değişiklikler kanserle ilişkilidir. Örneğin; tek nükleotid değişimi gibi küçük ölçekli veya kromozom kazanımı veya kaybı, kromozomal yeniden düzenlenmeler, viral genomun hücre genomuna katılımı gibi büyük ölçekli değişiklikler kanserle ilgili genomik değişikliklerdir. Büyük ölçekli genomik değişiklikler kanserin önemli özelliklerinden biridir. İnsan tümörlerinin büyük çoğunluğunda da bu tip kromozomal değişikliklere rastlanır. Bu değişiklikler hastalığın teşhisi, seyri ve şiddeti hakkında bize doğru tahminde bulunmamıza yardımcı olur.

Birçok ailesel kanser formları için kalıtımın net ve ayırıcı özelliği belirgin değildir. Hastalar kansere neden olan genin sadece bir mutant allelini kalıtım yoluyla ebeveyninden alırlar. Bu gen sayesinde hastalar kansere yatkın hale gelir. Sonunda da kişi, büyük olasılıkla başlı başına diğer alleldeki gende oluşan mutasyonla, veya diğer genlerdeki mutasyonlara ve çevresel faktörlere bağlı olarak kansere yakalanacaktır. İyonize radyasyon, kimyasallar ve virüsler gibi çevresel karsinojenler genelde etkilerini mutasyonlara neden olarak gösterirler. Oluşan bu mutasyonlar kanserde merkezi rol oynar.

Kanser hücreleri temel olarak iki özelliğe sahiptir;

- Kontrolsüz bölünme
- Bulunduğu yerden vücudun başka bir yerine yayılma veya metastaz yapabilme yeteneğidir.

Hücre bölünmesi hücre döngüsü kontrolü altındadır. Kanser hücrelerinde çoğunlukla hücre döngüsünün kontrolü kaybolmuş ve hücre çoğalması otonom hale gelmiştir (Nussbaum vd 2005).

Kanserin Genetik Yapısı

1. Bir kanserin sporadik olarak bireylerde izlenmesine veya kalıtsal bir özellik göstererek bir ailenin bazı fertlerinde tekrar etmesine bakılmaksızın, kanserin genetik bir hastalık olduğunu söylemek doğru olacaktır.
2. Kanser başlangıcında farklı türlerde genlerin rol aldığı bildirilmektedir. Bu grupta yer alan genler;
 - Hücre proliferasyonunda yer alan proteinlerini,
 - Mitotik döngü düzenleyicilerini,
 - Sinyal iletiminde yer alan proteinlerini,
 - Programlanmış hücre ölüm komponentlerini,
 - Kontakt inhibisyonun oluşumunda yer alan hücre komponentlerini,
 - Mutasyonların tanımlanması ve tamirinden sorumlu olan proteinleri kodlayan genlerdir.
3. Kanser oluşumundan sorumlu farklı tipte mutasyonlar tanımlanmıştır. Bu mutasyonlar;
 - Bir *tümör baskılayıcı gene* ait, bir allelin dominant negatif mutasyonu veya her iki allelin fonksiyon kaybı,
 - Bir *proto-onkogenin*, bir allelinin fonksiyon kazandıran mutasyonla aktivasyonu,
 - Genlerin yanlış ifade edilmesine veya yeni bir fonksiyonel özellik kazandıran, kimerik genlerin oluşumuna neden olan *kromozomal translokasyonlardır*.

4. Olay bir kez başladığında; sitogenetik yapının korunmasında ve DNA'nın yapısında oluşabilecek hasarı tamirden sorumlu hücrel mekanizmaları kodlayan genlerin değişime uğraması veya epigenetik sessizliği şeklinde ilave genetik hasarların biriken etkisiyle kanser yaygınlaşır.

Tümör Baskılayıcı Genler

Hücre döngüsü bölümlerinden geçişi baskılayan veya inaktive eden ve hücre bölünmesini durduran genlerdir. Eğer bu genler kalıcı olarak inaktive edilirse veya mutasyonlarla fonksiyonları ortadan kaldırılırlarsa, hücre bölünmesinin kontrolü kaybolur ve hücre kontrolsüz bir şekilde bölünüp çoğalmaya başlar. Kanser gelişiminde tümör baskılayıcı genlerde fonksiyon kaybı oluşabilmesi için her iki allelinde mutasyona uğraması gerekmektedir (Çekinik etki). (Klug vd 2003).

Tümör baskılayıcı genler fonksiyonları bakımından son derece heterojendirler. Bazıları hücre döngüsünün düzenlenmesinde veya hücre-hücre teması ile büyümenin engellenmesinde doğrudan yer almaları açısından gerçekten tümör baskılayıcıları olup, bu tip tümör baskılayıcılar, hücre büyümesini doğrudan düzenlediklerinden "gatekeepers" olarak bilinirler. Diğer genler, DNA hasarını tamir etmede ve genomik bütünlüğü sürdürmede yer aldıklarından "caretakers" olarak adlandırılırlar. DNA hasarının tamirinde veya kromozom kırıklarında yer alan genlerin her iki allelinin kaybolması, ikinci bir mutasyonun proto-onkogenlerde veya diğer tümör baskılayıcı genlerde gerçekleşmesiyle birlikte, kanser oluşumuna dolaylı bir şekilde yol açar (Nussbaum vd 2005).

Proto-onkogenler

Normal fonksiyonu olarak hücre çoğalmasında rol olan genler proto-onkogenler olarak adlandırılırlar. Eğer proto-onkogenler çeşitli mutasyonlar sonrasında sürekli aktif hale gelirse kontrolsüz hücre bölünmesine neden olur, bu da tümör oluşumuna öncülük eder. Proto-onkogen mutasyonlarının bir sonucu olarak böyle bir durum olduğunda, bu genlere *onkogen* adı verilir. Çünkü, bu genler kanserle ilişkili olarak hücre çoğalmasını uyarılırlar. Kanser gelişimini uyarmak için bir genin her iki allelinde de mutasyonun olmasının gerektiği tümör baskılayıcı genlerin aksine, malignensinin indüklenmesi için bir proto-onkogenin iki kopyasının sadece birinde mutasyonun olması yeterlidir (baskın etki) (Klug vd 2003).

1.9. Büyüme Faktörleri

Büyüme faktörleri, organizmanın biyolojik olaylarının düzenlenmesini sağlayan en önemli protein grubudur. Türlerine özgü hücre membran reseptörleri aracılığıyla hücre içi sinyal iletimini başlatan peptid veya polipeptidlerdir. Otokrin, parakrin veya endokrin yollarla hücre üzerinde etkilerini gösterirler. Hücre büyümesinin yanı sıra proliferasyonu ve migrasyonu gibi diğer hücre fonksiyonları üzerinde etkilidirler. Çeşitleri oldukça fazladır ve her birinin özgün fonksiyonları vardır. Bazı büyüme faktörleri ve görevleri tabloda gösterilmiştir (Tablo 1.1).

Tablo 1.1. Bazı büyüme faktörleri ve görevleri

Büyüme Faktörleri	Görevleri
Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF)	Birçok hücre grubunda proliferasyonu stimüle etmek, embriyonik gelişmede uyarıcı sinyaldir, çeşitli stem hücrelerinde farklılaşmayı engellemek
Platelet Kökenli Büyüme Faktörü (PDGF)	Büyüme, canlılık ve proliferasyonu stimüle etmek
İnsülün Benzeri Büyüme Faktörü I (IGFI)	Canlılığı korumak, hücre proliferasyonunu uyarmak, hücre metabolizmasını uyarmak
Epidermal Büyüme Faktörü (EGF)	Proliferasyonu stimüle etmek, embriyonik gelişmede uyarıcı sinyal görevini gerçekleştirmek
Transfome Edici Büyüme Faktörü (TGF)	Embriyonik gelişmede uyarıcı sinyal görevini gerçekleştirmek, çoğu hücrede diğer büyüme faktörlerine cevabı oluşturmak veya inhibe etmek, bazı hücrelerde farklılaşmayı düzenlemek
Sinir Büyüme Faktörü (NGF)	Spesifik nöronların yaşamını ve büyümesini stimüle eder
İnterlökin 2 (IL-2)	Aktif T lenfositlerin proliferasyonunu uyarmak
İnterlökin 3 (IL-3)	Çeşitli kan hücre öncüllerinin proliferasyonunu uyarmak

1.10. Fibroblast Büyüme Faktörleri

Fibroblast büyüme faktörleri (FGF) diğer büyüme faktörlerinden farklı olarak pleiotrofik aktivite gösterirler. FGF'ler hem gelişmekte olan, hem de gelişmiş olan dokularda ifade edilmekte olup, hücrede çeşitli fonksiyonların yerine getirilmesinde görev alırlar. Bu görevler;

- Hücre farklılaşması
- Hücre büyümesi
- Hücre migrasyonu
- Anjiogenez
- Mitojenite
- Doku zedelenmelerinde tamir...vb sayılabilir.

FGF ailesi geniş bir grup olup, insanda bugüne kadar 22 üyesi tanımlanmıştır. Çok iyi bilinen iki FGF, izoelektrik noktalarının (pI) farklı olması nedeni ile birbirinden kolayca ayırt edilmiştir. Asidik FGF (aFGF, FGF-1; 15 kDa)'nin pI 4.5-6, bazik FGF (bFGF, FGF-2)'nin ise pI 9.6-9.8'dir. Bu iki büyüme faktörünün amino asit dizisi %55 oranında benzerliğine sahiptir. Asidik FGF (aFGF=FGF1) ile bazik FGF (bFGF=FGF2) beyin ve hipofizden izole edilmiş ilk fibroblast mitojenlerdir (Wang vd 1996).

aFGF ve bFGF her biri 155 aminoasitlik protein kodlar. Birçok FGF'nin N-terminal ucunda sinyal peptid sekansları bulunur. Bunun yanında FGF 1, 2, 9, 16, 20'de bu sinyal peptid sekansları bulunmaz. N-terminal ucundan sinyal sekansı bulunmamasına karşın FGF 9, 16, 22 hücreden salgılanabilmektedir, ancak FGF 1 ve 2 hücreden salgılanmaz. Bu yüzden, FGF 1 ve 2'nin hücre dışına salgılanması sadece hücrenin parçalanması veya endoplazmik retikulum-golgi yolundan bağımsız bir ekzositoz yoluyla mümkündür. FGF 22'nin sinyal peptidi ise hücre yüzeyine tutunur. FGF 11, 14'ün de sinyal sekansları yoktur ve hücre içinde kalırlar ve hücre içinde reseptörden bağımsız olarak görev yaparlar. Bu FGF'ler dokuya özgü protein kinaz modülünün hücre içi komponentleri olabilir ve diğer FGF'lerle fonksiyonel değil ama yapısal homoloji gösterirler.

FGF 16 dışında kalan diğer tüm FGF'lerin kromozom üzerindeki lokalizasyon bölgeleri bilinmektedir ve pekçok FGF genlerinin genom boyunca dağıldığı da

görülmektedir. aFGF'yi kodlayan gen kromozom 5, bFGF'yi kodlayan gen ise kromozom 4 üzerine lokalizedir. Farklı kromozomal lokuslarda olmalarına rağmen FGF genlerinde benzer yapısal organizasyon bulunmaktadır. Örneğin; her ikisinde de benzer lokalizasyona sahip 2 intron ve 3 ekzon bulunmaktadır. Bu her iki FGF'nin mezenşimal ve nöro-ektodermal orijinli hücreler için mitojen, in vivo olarak da anjiyogenik oldukları bildirilmektedir. Dolayısıyla bu FGF'ler endotelial hücreler üzerindeki etkileri ile vasküler sistemin normal gelişiminde önemli roller oynamaktadır. Ayrıca FGF'ler kollejenaz ve plazminojen aktivatörlerin hücresel üretimini de uyarırlar. Bu özellikleri ile tümör yayılmasını harekete geçirirler.

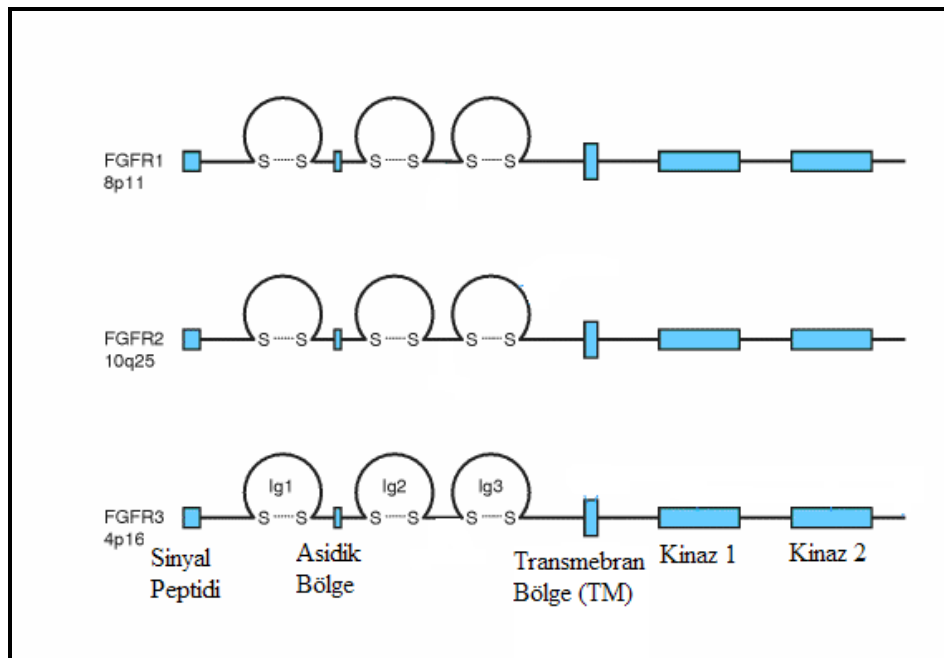
FGF'lerin bu görevlerinin yanı sıra farklı hücre tiplerinde farklılaşmadan da sorumludurlar. Örneğin, readiposit fibroblastların adipositlere, hippokampal nöronlar ile serebral kortikal nöronlardan nöritlerin farklılaşmasında etkilidir. Ayrıca fenotipik farklılaşmaları uyardıkları gibi inhibe de edebilirler.

Çeşitli hücre tiplerinde farklılaşmadaki rolleri nedeniyle FGF'lerin gelişme sırasında da etkili olabilecekleri düşünülmüştür. Bu yüzden *Xenopus* embriyolarıyla yapılan deneylerde FGF eklenmesi mezoderm indüksiyonuna yol açmıştır. FGF reseptörleriyle gerçekleşen iletim yolunda bir hasar oluşması durumunda *Xenopus* embriolarındaki mezoderm formasyonunun ağır şekilde inhibe olmasına, gastrulasyon ve posterior gelişim defektlerinin ortaya çıkmasına sebep olmuştur.

1.11. Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörleri (FGFR)

Fibroblast büyüme faktörleri (FGF), fibroblast büyüme faktörü reseptörleri (FGFR) olarak adlandırılan transmembran reseptör tirozin kinazlara bağlanarak sitoplazmada etki gösterirler. FGFR'ler, FGFR 1, 2, 3, 4 olmak üzere dört ana grupta toplanmaktadır. Bu reseptörler yapısal olarak reseptör tirozin kinaz ailesinin üyeleridir ve biyolojik sinyal yollarının düzenlenmesinde, farklılaşmada, proliferasyonda ve embriyonik gelişimde önemli roller oynamaktadır. Büyüme faktörü reseptörü olan tirozin kinazlar genel özellikleri aşağıda özetlenmiştir;

- Transmembran bir proteindir.
- Ekstraselüler bölgede iki veya üç immunoglobulin (Ig) benzeri domain ve heparin bağlanma bölgesi içerir.
- İki tane intraselüler tirozin kinaz domaini içerir.



Şekil 1.2. İnsan fibroblast büyüme faktör reseptörleri

İnsan FGFR 1, 2, 3, 4 amino asit sekansları açısından karşılaştırıldığında kodlanan proteinlerin benzerlik olduğu ve yapılan çalışmalar sonucunda en çok benzerlik gösterenlerin FGFR1 ve FGFR2 olduğu saptanmıştır.

Tablo 1.2. İnsan FGF reseptör genlerinin karşılaştırılması (%)

	FGFR2	FGFR3	FGFR4
FGFR1	%72	%62	%55
FGFR2			%57
FGFR3			%61

FGFR'leri bölgesel olarak karşılaştırıldığında evrimsel olarak çok iyi korunduğu görülmektedir. Ancak en iyi korunan bölgenin kinaz 1 ve kinaz 2 domainleri (%80) ve en az korunan bölgenin ise sinyal peptid sekansı (%20), Ig domain I (%19), transmembran domaini (%24) şeklinde sıralandığı görülmektedir.

FGFR'nin yapısında bulunan bölgelerin fonksiyonları üzerine yapılan çalışmalar devam etmektedir. Ancak Ig domain I'in ligand bağlamada fonksiyonel olmadığı, onun yerine bu görevin Ig II ve özellikle Ig III'ün üstlendiği söylenebilir.

Çoklu FGFR formu bazı ortak bağlanma özellikleri göstermekle birlikte, ligand bağlanma yönünden çeşitli farklılıklar görülmektedir;

- Aynı genden değişik ekzon ve/veya intron düzenlenmeleri ile oluşan farklı FGFR formları birbirinden ayrı ligand bağlanma özelliklerine sahip olabilir. Özel olarak Ig III bağlanma görevinde bulunur. Bu reseptörün bağlanma özellikleri Ig III'ün ikinci bölümünü kodlayan ekzon tarafından belirlenir.
- Farklı FGFR genlerinden oluşan kesip-ekleme varyantları FGF ailesinin farklı üyelerine bağlanır.

Son zamanlarda yapılan çalışmalar, FGFR'lerin hücre-hücre etkileşiminde rol alan çeşitli proteinlerle ilişkili olarak kanser metastazının mekanizmasına katkıda bulunabileceği gösterilmiştir. Örneğin; FGFR1 ve FGFR4'ün N-CAM ve N-

kaderinlerle ilişkisi gösterilmiştir (Cavallaro vd 2004, Kiselyov vd 2003, Suyama vd 2002). Meme kanseri hücre dizileriyle yapılan deneylerde, bu hücrelerden N-kaderinler ve FGFR1 ifadenmesi, FGF2'nin etkisiyle matriks metalloproteinaz 9'un sentezinin artması ve hücrenin matrikse doğru invazyonunu kolaylaştırır.

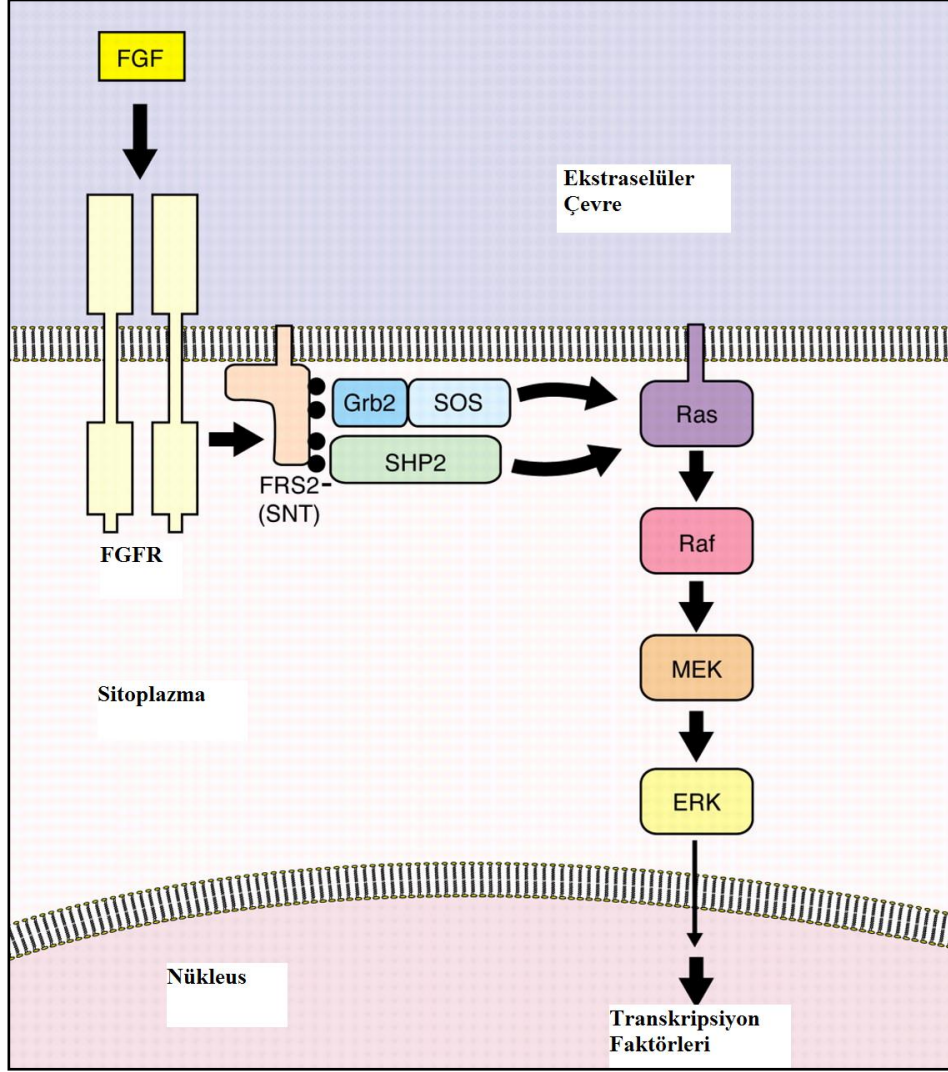
1.12. FGFR Aracılığı ile Sinyal İletimi

FGF'lerin hücre içi fonksiyonları arasında intraselüler pH ve Ca^{2+} 'nin miktarını artırılması, hücre içi çeşitli proteinlerin fosforilasyonu ile c-myc veya c-fos gibi genlerin transkripsiyonunu arttırabilir. Hücre tipine göre, farklı FGF'lere maruz kalma farklılaşmaya, proliferasyona, farklılaşmanın baskılanmasına veya farklılaşmış fenotipin korunmasına neden olabilir.

FGF'ye bağlı sinyal iletimi öncelikle FGF'nin reseptörüne bağlanması ile başlar. aFGF veya bFGF'nin reseptörüne bağlanması reseptör dimerizasyonunu uyarır. Bağlanma ile aynı zamanda, reseptör tirozin kinaz aktivitesi ve reseptör otofosforilasyonunu uyararak hücre membranından sitoplazmaya doğru sinyal iletimi başlamış olur. In vitro koşullarda ligand-reseptör etkileşimi için heparin veya heparan sülfat proteoglikan olması gerekliliği, FGF'nin reseptörünü aktive etmesi sırasında ligand, reseptör ve heparin benzeri molekül kompleksinin oluştuğu görülmektedir. Çoğu durumda farklılaşma ve proliferasyonda FGFR sinyal iletimi aşağıdaki proteinler arası etkileşim ile gerçekleşmektedir (Şekil 1.2);

- Sitoplazmik proteinler (Src-homoloji domain-içeren proteinler: Grb2)
- Guanin-nükleotidi-serbestleştirici faktör (Sos)
- GTP-bağlayıcı proteinler (Ras)
- Fosforilasyon ile intranükleer transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu sağlayan kinaz grupları

Bu mekanizmaya alternatif olarak minör etkili kısa bir yol daha vardır; aktive olan FGFR'ler reseptörün aracılık ettiği endositoz ile FGF'lerin nükleusa geçişi sağlanır. Bu durumda ilgili gen ifadesi direkt olarak etkilenir.



Şekil 1.3. FGF reseptörleri aracılığıyla sinyal iletimi

1.13. Tirozin Kinaz Reseptörleri

Büyüme faktör reseptörleri olarak da adlandırılan bu reseptörler, adlarını ilişkiye girdikleri ligandlarından alırlar. Örneğin; tirozine özel protein kinaz olduğu tanımlanan ilk reseptör epidermal büyüme faktörü (EGF) reseptörüdür. Bu tipteki bütün reseptörler ortak bir yapı gösterirler: Bunlar integral zar proteinleri olup N uçları zarın ekstraselüler yüzünde, C uçları zarın sitoplazmik yüzünde bulunur. Bazı reseptörler tek bir polipeptid zincirinden ibaretken, bazıları disülfid bağlarıyla birbirine bağlanmış dimer halindedir. Ekstraselüler bölgeleri karakteristik yapıda olan tekrarlayan motifler içerir ve bu bölgede ligand bağlanma bölgelerine sahiplerdir. Tirozin kinaz katalitik bölgesi sitoplazmik bölgede yer alır ve yaklaşık olarak 250 amino asit rezidüden meydana gelmiş büyük bir bölgedir. Bir büyüme faktörü reseptörüne bağlanınca, katalitik bölgenin aktivitesi değişir. Katalitik bölgenin aktivasyonu durumunda, bu bölgedeki tirozinin fosforlanması gerekmektedir. Ekstraselüler kısma bir ligand bağlanması sonucu oluşan sinyal ve reseptörün katalitik bölgenin aktifleşmesindeki genel prensip, reseptörü oluşturan proteinde meydana gelen yapısal değişikliktir. Hepsi protein kinaz oldukları için hedef proteinlere fosfat gruplarını ilave ederler. Tirozin kinaz reseptörlerini aktifleştiren faktörlerin bir kısmı Tablo 1.1'de verilmiştir. Bilindiği gibi proteinler zarda lateral difüzyon yapabilirler. Dolayısıyla bu lateral hareket mevcut olan sinyal bilgisinin zarın diğer kısımlara aktarılmasını sağlar. Bu tip reseptörlere bir ligand bağlanması, reseptörlerin ekstraselüler bölgelerinde yapısal bir değişikliğin olmasını sağlar. Yani iki monomerin dimerleşmesine (iki reseptör monomerinin yan yana gelmesi) neden olur. Dimerizasyon, transmembran bölgelerin lateral difüzyonu sayesinde gerçekleşir. Bunların sonucu olarak, sitoplazmik bölgeler birbirini etkileyerek katalitik bölgenin aktifleşmesini, başka bir deyişle kinaz aktivasyonunun ortaya çıkmasını sağlar (Güneş vd 2003).

Dimerizasyon farklı şekillerde olabilir;

- Ligand bir monomere veya iki monomere birden bağlanabilir ve onları dimer haline getirebilir.
- Dimerleşmeyi sağlayan ligand iki farklı monomere aynı anda bağlanabilir.
- Ligand ekstraselüler bölgelerinden disülfid bağlarıyla birbirine bağlı dimer halindeki reseptörlere bağlanarak onları aktifleştirebilir.

Bütün bu olaylar sonucu bir araya gelen sitoplazmik bölgelerin karşılıklı olarak birbirlerini fosforlamasıyla kinaz aktivitesi ortaya çıkar. Reseptörün sitoplazmik kısımların birbirini fosforlamasına *otofosforilasyon* denir.

Reseptör aracılı uyarı oluşmasında ofofosforilasyonun iki önemli görevi vardır;

1. Kinaz bölgesinin fosforlanması katalitik aktiviteyi artırır.
2. Sitoplazmik bölgedeki tirozin rezidü dışında başka bir rezidünün fosforlanması, ilave proteinlerin buraya bağlanmasını, böylece gelen uyarının hücre içindeki bir başka bileşene geçmesini sağlar.

Otofosforilasyona uğrayan tirozin rezidüleri hücre içindeki hedef proteinler için yüksek afiniteli bağlanma bölgeleri olarak görev yapar. Hücre içinde görev yapacak olan bu proteinler, reseptöre tutunur tutunmaz fosforlanır ve aktif hale geçerler. Farklı protein kinaz reseptörleri farklı hedef proteinlere bağlandığı için hücrelerde oluşan cevaplar da farklıdır.

Aktifleşmiş protein reseptör kinaz, reseptörle ilişkiye giren üç tip hücre içi protein tanımlanmıştır;

1. Reseptörle birleşmesi sonucu aktifleşen proteinler: Kendi kendilerine fosforlanamazlar. Hedef protein katalitik aktivitesi olmayan adaptör bir proteindir (Grb 2) veya reseptörle birleşince aktifleşen bir enzimdir (PI3 kinaz).
2. Hedef protein bir enzim substratı olabilir.
3. Bazı hedef proteinler sinyal faaliyet yolundaki son noktada görev alabilir.

Sinyal faaliyet yollarında görev alan proteinlerin birbiriyle ilişki kurmalarını sağlayan önemli iki bölge vardır:

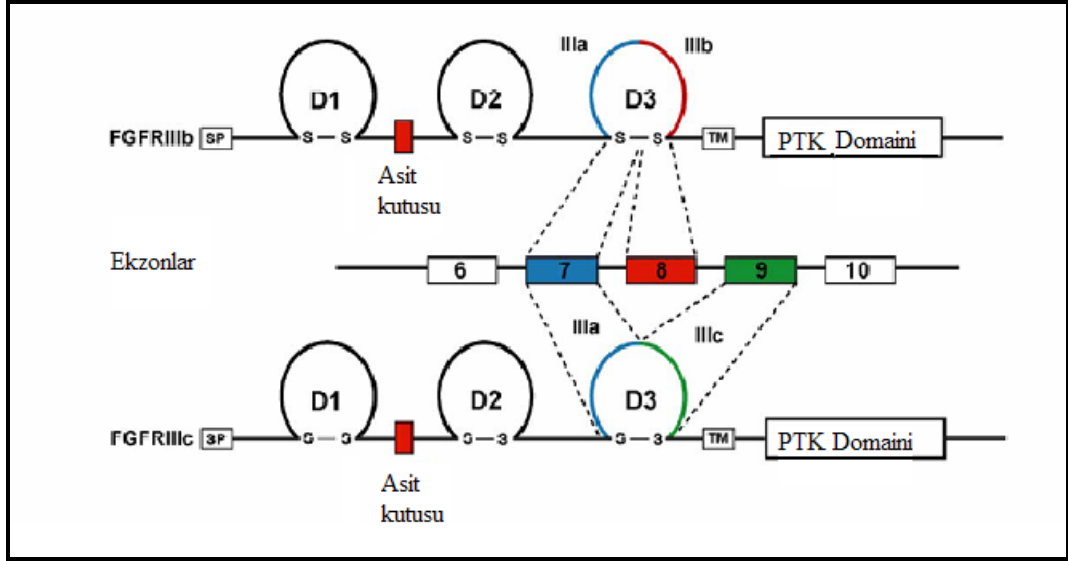
- *SH2 bölgesi*: Faaliyet yolunda görev yapan diğer proteinlerin hedef bölgesi ile ilişki kuran, ~100 amino asitlik bir bölgedir. Tirozin kinazın ofofosforilasyonu reseptörün sitoplazmik kısmında yer alan bu SH2 bağlanma bölgesinin fosforlanmasını sağlar. Böylece SH2 bölgesi taşıyan bir protein, ancak SH2 bağlanma bölgesi fosforlanmış olan reseptöre bağlanabilir.
- *SH3 bölgesi*: SH2 bölgesi bulunan proteinlerde efektör olarak fonksiyon yapar.

Kinazlar hücre içerisinde değişik faaliyet yollarını kullanarak uyarının etkisinin güçlenmesine ve cevabın oluşmasını sağlar. Bu yollara örnek olarak, Ras faaliyet yolu, Map-kinaz faaliyet yolu, Jak-Stat faaliyet yolu verilebilir (Güneş vd 2003).

1.14. Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü 3

FGFR3 geni kromozom 4p16.3 bölgesine lokalizedir. Buradan sentezlenen gen ürünü hücre proliferasyonu ve hücre farklılaşması gibi birçok olayda görev aldığı gösterilmiştir. Bu gen bölgesinde meydana gelen çeşitli aktive edici mutasyonlarla kanser gelişimi ve otozomal kalıtmıli çeşitli iskelet sistemi hastalıkların ortaya çıkması yanında, translokasyonlarla çeşitli onkogenik sonuçların da ortaya çıktığı gösterilmiştir (Munro vd 2003)

FGFR 3 geninin transkripti, 19 ekzon içermektedir ve gen ürünü 2-18 ekzonları arasından sentezlenir (Wuchner vd 1997). Her bir FGFR ailesi üyesi için çeşitli tipte alternatif kesip-ekleme'ler gözlenmiştir ve bu kesip-ekleme'ler sonucu farklı izoformların ortaya çıktığı bilinmektedir. Farklı FGFR kesip-ekleme izoformlarına, değişik affinitedeki ligandlar bağlanmakta ve çok çeşitli kombinasyonlar ortaya çıkmaktadır. FGFR3'ün ekstraselüler bölgesindeki üçüncü Ig domaininin alternatif kesip-ekleme ile farklı iki izoformda reseptörler oluşmaktadır. Bunlar FGFR3 IIIb ve FGFR3 IIIc olarak adlandırılır ve ligand ile reseptör arasındaki bağlanma spesifikliğini oluşturmasını sağlar. Örneğin; FGFR3 IIIc kondrositlerde ifade edilmekte ve çeşitli mutasyonlarla bazı iskelet anomalilerine neden olur. FGFR3 IIIb ise epitel hücrelerde ifade edilmektedir ve mutasyonlar ile aktive edildiğinde, bazı dokularda hücre proliferasyonunu etkileyip, tümör gelişimine neden olduğu düşünülmektedir (Wuchner vd 1997, Corine vd 2005).



PTK: Protein tirozin kinaz

Şekil 1.4. FGFR 3 izoformları (Eswarakumar vd 2005)

FGFR'ler, kesip-eklemeler sonucu farklı ligandlarla aktive olarak fonksiyon yapabilmektedir. Örneğin; FGFR3 IIIb ve IIIc izoformları FGF 1 ve FGF 9 tarafından aktive edilmektedir. Ayrıca bunlara ilave olarak, FGF 2, 4, 6, ve 8'de genellikle FGFR 3 IIIc'ye bağlanır (Kanai vd 1997, Liu vd 2002, Ohbayash vd 2002). Son yapılan çalışmalarda, FGF 18'inde yardımcı ligand olarak görev yaptığı da gösterilmiştir. Daha ayrıntılı olarak reseptör-ligand eşleştirilmesi Tablo 1.3'de verilmiştir.

Tablo 1.3. FGFR izoformlarının özgün ligandları (Eswarakumar vd 2005)

FGFR izoformları	Özgün ligandlar
FGFR 1b	FGF1, 2, 3, 10
FGFR 1c	FGF1, 2, 4, 5, 6
FGFR 2b	FGF1, 3, 7, 10, 22
FGFR 2c	FGF1, 2, 4, 6, 9, 17, 18
FGFR 3b	FGF1, 9
FGFR 3c	FGF1, 2, 4, 8, 9, 17, 18, 23
FGFR 4	FGF1, 2, 4, 6, 8, 16, 17, 18, 19

FGFR3 çeşitli dokularda ifade olabilmektedir ve ifade olduğu dokuya bağlı olarak farklı etkilere sahiptir. Bu protein, mesane, böbrek, akciğer, barsak, kartilaj, pankreas gibi birçok organ doku hücrelerinde sentezlenmektedir ve ancak en çok üzerinde durulan dokular epitel dokusu ve kemik dokusudur (Patstone vd 1993, Pringle vd 2003, Vidrich vd 2004).

FGFR3 mutasyonları, iç organlarda protein ifadesinde meydana gelen değişiklikler sonucu organ tümörlerine sebep olması yanında, kemik dokuda meydana gelen değişiklikler sonucunda da farklı iskelet anomalilerine neden olabilmektedir. Genellikle otozomal dominant kalıtılan iskelet sistemi hastalıkları arasında tanatoforik displazi, akondroplazi, hipokondroplazi, SADDAN displazi, apert sendromu sayılabilir. Farklı sendromlara neden olan mutasyonlar protein ürünü üzerinde özgün etkilerle kendini göstermektedir (Kimura vd 2001, Corine vd 2005, Adar vd 2002). FGFR3 üzerindeki meydana gelen mutasyonlar reseptörün transmembran domaini, ekstraselüler domaini veya dur kodonu oluşturmak üzere etkilidir. Bu değişiklikler ve sonucunda ortaya çıkan iskelet anomalileri ve bu değişikliğin lokalizasyonu Tablo 1.4’de gösterilmektedir.

Tablo 1.4. FGFR3 mutasyonları ile ilişkili bazı iskelet anomalileri

Kodon	Amino asit Değişimi	Fenotip	Lokalizasyon
248	Arg→Cys	Tanotoforik Displazi I	IgII ve IgIII arası
249	Ser→Cys	Tanotoforik Displazi I	IgII ve IgIII arası
346	Gly →Glu	Akondroplazi	IgIII ve TM arası
375	Gly→Cys	Akondroplazi	TM domaini
391	Ala→Glu	Crouzon sendromu	TM domaini
650	Lys→Asn	Hipokondroplazi	TKII domaini
807	Lys→Met	SADDAN	Dur kodonu

Ig: İmmünoglobulin, TM: Transmembran, TK: Tirozoin Kinaz

FGFR3 Mutasyonları ve Kanser

Son yıllarda yapılan araştırmalar FGFR3 protein fonksiyonunu sürekli aktive eden çeşitli nokta mutasyonlarının onkogenik davranış gösterebileceği düşünölmektedir.

FGFR3 geninin lokalize olduğu 4 numaralı kromozomda oluşan çeşitli translokasyonlar, bu genin onkogenik etkisine neden olmaktadır. Örneğin; B-hücreli neoplazilerdeki t(4;14)(p16.3;q32) sonucu FGFR3 ifadelenmesinde ektopik değişikliklere neden olmakta ve bu translokasyon multiple myeloma'nın gelişmesinde erken genetik değişiklik olarak gözlenmektedir (Chesi vd 1997, Richelda vd 1997). Son zamanlarda yapılan çalışmalar FGFR3 genindeki mutasyonların ayrıca kolon kanserin oluşumunda da bazı etkilere neden olabileceğini göstermiştir. Ancak, yapılan diğer çalışmalarda prostat, deri, akciğer, beyin veya böbrek tümörlerinde FGFR3 geninde oluşan bir mutasyona henüz rastlanmamıştır (Karoui vd 2001, Sibley vd 2001)

Mesane ve serviks epitel hücrelerinde tespit edilen FGFR3 nokta mutasyonları hücre proliferasyonunda çeşitli değişikliklere neden olmaktadır. Bunlar, çoğunlukla A248C, S249C, G372C, T375C gibi kodonları içine alan ekzon 7 ve ekzon 10'daki yanlış anlamlı mutasyonlardır. Genin G380R kodonunda meydana gelen mutasyon neonatal ölümcül olan Tanotoforik Displazi'ye göre daha hafif bir iskelet anomalisi olan akondroplaziye neden olmakla birlikte bu mutasyonu taşıyan olguların bazılarında mesane kanseri de gözlenmiştir. Mesane kanserinin çeşitli kimyasallarla, sigara, karsinojenler ve çeşitli çevresel faktörler nedeni ile genetik materyal üzerinde hasar oluşumuna neden olmakta ve sonuçta ise replikasyon hataları ortaya çıkmaktadır (Van Rhijn vd 2002, Patton vd 2002).

Ayrıca, FGFR3 geninde oluşan mutasyonların yanı sıra TP53'te oluşan mutasyon varlığı bazı özel mesane kanserlerinde gözlenmektedir (Bakar vd 2003,). Bu durum süperfisial papillom mesane kanserlerinin erken evrelerinde görölebilmeyin yanında kasa invazyon durumlarında da gözlenebilir.

Çoğu mesane kanseri (%90) transisyonel hücre karsinom olarak gözlenir. Bu tümörler farklı invazyon derecelerinde örneğin; süperfisial veya invaziv olabilir. Bazı araştırmalar, FGFR3 mutasyonlarının düşük dereceli süperfisial mesane kanserleri ile

ilişkisi olduğunu düşündürmektedir. Bu gendeki mutasyonun etkisi kanserin erken evresinde görülüp, tümör ilerlemesi ile ilişkili olmadığı öne sürülmüştür. Ancak farklı etnik kökenlere ait hasta gruplarında FGFR3 mutasyonlarının varlığı ve klinikopatolojik parametrelerle olan ilişkisi henüz araştırılmamıştır (Kimura vd 2001, Billerey vd 2001, Bakar vd 2003).

Bu yüksek lisans tezi araştırmasında, FGFR3 genindeki tanatoforik displazi mutasyonları olarak gruplandırılan ekzon 7 A248C, S249C ve ekzon 10 G372C, T375C kodonlardaki olası yanlış anlamlı mutasyonların mesane kanseri hasta popülasyonundaki varlığı ve klinikopatolojik parametreler üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Örnekler

Denizli Devlet Hastanesi Patoloji bölümüne tanı alma amacıyla başvuran toplam 56 olguya ait parafine gömülü mesane transizyonel hücre karsinomu doku örneği çalışma kapsamına alındı. American Joint Commission for Cancer Union International Contre le Cancer (AJCC-UICC) göre 56 olgunun 14 tanesi (%25) pTa, 23 tanesi (%41,1) pT1, 19 tanesi(%33,9) pT2 olarak evrelendirildi. Dünya Sağlık Örgütü'nün sınıflaması göre 56 olgunun 5 tanesi (% 8.9) G1, 25 tanesi (% 44.6) G2, 26 tanesi (% 46.4) G3 olarak derecelendirildi. Olguların 49 tanesi (%87.5) erkek 7 (%12.5) tanesi kadındı. Olguların yaş dağılımı 28-83 arasında değişmekteydi. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda olguların yaş ortalaması $65,5\pm 10,6$ bulundu (Tablo 1.5).

Tablo 1.5. Mesane tümörlü 56 Olgunun Tedavi Sonuçları ve Karakteristik Özellikleri

Karakteristik	n (%)
Yaş	28-83 ($65,5\pm 10,6$)
Tümör Evresi (pT)	
a	14 (%25)
1	23 (%41.1)
2	19 (%33,9)
Hücresel Derece (G)	
1	5 (%8,9)
2	25 (%44.6)
3	26 (%46,4)

Ayrıca 6 adet sağlıklı erkek periferik kanından izole edilen DNA örnekleri araştırılan tüm mutasyonlar için kontrol grubu olarak kullanıldı.

2.2. DNA İzolasyonu

Parafine gömülü mesane transizyonel hücre karsinomu doku örneklerinden geniş tümör alanlı bloklar seçilerek 5 mikronluk kesitler alındı ve deparafinizasyon sonrasında DNA izolasyonu Qiagen DNA Mini Kit (katalog no: 51106) protokolü kullanılarak gerçekleştirildi.

Parafine Gömülü Dokudan Genomik DNA izolasyonu

Parafine Gömülü Dokudan Genomik DNA izolasyonunda uygulanan aşamalar şunlardır;

- 1) Parafine gömülü dokudan 5 mikronluk 3 kesit alındı ve 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne kondu
- 2) 1200 µl ksilen eklendi ve kısa karıştırma yapıldı.
- 3) Oda sıcaklığında 5 dakika tam devirde (13 000 rpm) santrifüj yapıldı.
- 4) Pipetle üst sıvı kısmı atıldı ve çökelek kısmına dokunulmadı
- 5) 1200 µl etanol eklendi (%96-100). Kısa karıştırma yaparak ksilenin uzaklaşması sağlandı. (Not: Karıştırma 5-10 dakika aralarla yapılarak etanolün doku içine daha iyi girmesi sağlandı.)
- 6) Oda sıcaklığında (15-25 °C), 5 dakika tam devirde santrifüj yapıldı.
- 7) Pipetle etanol üstten atıldı ve çökelek kısma dokunulmadı.
- 8) Etanolla yıkama 5-7 kez tekrarlandı.
- 9) Etanolün evapore olması için mikrosantrifüj tüpleri, 10-15 dakika 37 °C'lik etüvde kapakları açık şekilde inkübasyona bırakıldı.
- 10) Doku çökelekin üstüne 180 µl solüsyon (Buffer) ATL eklendi.
- 11) 20 µl Proteinaz K eklenerek karıştırıldı, (gerekirse kısa santrifüj yapılır) doku tamamen parçalanana kadar 56 °C'de 1 saat-1 gece inkübe edildi.
- 12) Örneğe 200 µl solüsyon (Buffer) AL eklendi ve 15 saniye boyunca sürekli karıştırıldı ve 70 °C'de 10 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası, kısa santrifüj yapıldı.
- 13) Örneğe 200 µl etanol (%96-100) eklendi ve 15 saniye boyunca sürekli karıştırıldı. İyice homojenize olduktan sonra, kısa santrifüj yapıldı.
- 14) Örneği (presipitatu içerecek şekilde) dikkatli bir biçimde 2 ml toplama tüpü içindeki koluma, kenarını ıslatmaksızın, dikkatli bir biçimde aktarıldı. Kapağını kapatıp 8000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Kolum, temiz bir 2 ml toplama tüpüne yerleştirildi ve filtrat içeren tüp atıldı.
- 15) Kolum dikkatlice açıldı ve kenarına değdirmeden 500 µl solüsyon AW1 eklendi. Kapağı kapatıldı ve 8 000 rpm, de 3 dakika santrifüj edildi. Kolum temiz bir 2 ml toplama tüpüne yerleştirildi ve filtrat içeren toplama tüpü atıldı.
- 16) Kolum dikkatlice açıldı ve kenarına değdirmeden 500 µl solüsyon AW2 eklendi. Kapağı kapatıldı ve yüksek devirde, 13 000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.

17) Kolum temiz bir 1,5 ml tüpe yerleştirildi ve filtrat içeren toplama tüpü atıldı. Kolum dikkatlice açıldı ve 200 µl solüsyon AE veya distile su eklendi. Oda ısısında 5 dakika inkübe edildi ve 8 000 rpm`de 3 dakika santirfuj edildi.

18) Son basamak tekrarlandı.

Tablo 1.6. Olguların yaş, cinsiyet, tanı, evre ve derece dağılımı.

OLGULAR	YAŞ	CİNSİYET	TANI	EVRE	DERECE
1	72	E	THK	1	2
2	60	E	THK	2	3
3	83	E	THK	1	2
4	59	E	THK	a	2
5	67	E	THK	1	2
6	72	E	THK	1	3
7	69	K	THK	a	1
8	56	E	THK	1	2
9	55	E	THK	a	1
10	72	E	THK	2	3
11	79	E	THK	2	3
12	68	E	THK	a	2
13	74	E	THK	a	1
14	75	E	THK	1	3
15	54	E	THK	1	3
16	61	K	THK	2	3
17	61	E	THK	2	3
18	65	K	THK	a	1
19	55	E	THK	1	2
20	46	E	THK	1	2
21	70	E	THK	1	3
22	73	E	THK	2	3
23	53	E	THK	2	3
24	73	E	THK	a	2
25	57	K	THK	1	2
26	63	K	THK	1	2
27	77	E	THK	2	3
28	62	E	THK	2	3
29	43	E	THK	1	3
30	79	E	THK	2	3
31	57	E	THK	1	3
32	65	E	THK	2	3
33	74	E	THK	1	2
34	64	E	THK	2	3
35	67	E	THK	2	3
36	55	E	THK	1	2
37	80	E	THK	2	3
38	65	E	THK	a	2
39	75	E	THK	2	3
40	53	E	THK	1	2
41	56	E	THK	1	2
42	82	E	THK	2	2
43	60	E	THK	a	1
44	28	E	THK	1	2
45	75	K	THK	a	2
46	59	E	THK	2	3
47	71	E	THK	a	2
48	77	E	THK	2	3
49	70	E	THK	a	2
50	57	E	THK	1	2
51	77	K	THK	2	3
52	74	E	THK	1	2
53	71	E	THK	a	2
54	73	E	THK	a	2
55	63	E	THK	1	3
56	68	E	THK	1	3

2.3. DNA Konsantrasyonunun Belirlenmesi

DNA izolasyonu yapılan örneklere ait DNA konsantrasyonu “Eppendorf BioPhotometer” spektrofotometre cihazı ile ölçülmüş ve elde edilen sonuçlar aşağıdaki tabloda verilmiştir (Tablo 1.7).

Tablo 1.7. DNA örneklerinin spektrofotometrik ölçümleri

ÖRNEKLER	µg/µl	260/280 A°	260 A°	280 A°
1	1,1	1,43	0,022	0,015
2	1,0	1,36	0,020	0,016
3	1,6	1,28	0,032	0,025
4	2,8	1,73	0,056	0,032
5	1,2	1,29	0,024	0,019
6	1,8	1,09	0,037	0,033
7	2,7	1,58	0,054	0,034
8	2,0	1,43	0,040	0,028
9	1,7	1,34	0,035	0,026
10	2,1	1,27	0,042	0,033
11	2,3	1,51	0,047	0,031
12	1,9	1,29	0,039	0,030
13	1,5	1,41	0,029	0,021
14	1,9	1,37	0,037	0,027
15	2,9	1,44	0,057	0,040
16	2,5	1,42	0,050	0,035
17	1,4	1,39	0,028	0,020
18	1,2	1,64	0,025	0,015
19	2,9	1,72	0,058	0,034
20	2,8	1,68	0,057	0,034
21	1,7	1,40	0,034	0,024
22	2,1	1,23	0,042	0,034
23	1,3	1,23	0,026	0,021
24	1,5	1,43	0,031	0,022
25	2,7	1,40	0,054	0,038
26	1,6	1,39	0,032	0,023
27	1,7	1,31	0,035	0,027
28	1,8	1,31	0,036	0,028
29	2,7	1,47	0,053	0,036
30	1,5	1,30	0,030	0,023
31	2,1	1,32	0,041	0,031
32	1,6	1,33	0,032	0,024
33	1,5	1,31	0,030	0,023
34	1,8	1,45	0,036	0,025
35	1,5	1,35	0,031	0,023
36	2,1	1,32	0,042	0,032
37	1,6	1,34	0,032	0,024
38	1,3	1,38	0,027	0,020
39	1,6	1,33	0,032	0,024
40	1,8	1,35	0,037	0,027
41	2,0	1,33	0,040	0,030
42	1,9	1,31	0,038	0,029
43	1,1	1,21	0,021	0,017
44	1,3	1,32	0,026	0,020
45	1,0	1,30	0,020	0,015
46	1,3	1,32	0,026	0,020
47	1,3	1,34	0,027	0,020
48	1,6	1,25	0,032	0,026
49	0,9	1,35	0,018	0,014
50	3,7	1,21	0,073	0,061
51	1,0	1,41	0,021	0,015
52	1,0	1,42	0,020	0,014
53	1,0	1,50	0,020	0,013
54	1,2	1,69	0,024	0,014
55	1,0	1,70	0,020	0,012
56	0,7	1,29	0,013	0,010

2.4. Mutasyon Analizi-Polimeraz Zincir reaksiyonu (PZR)

FGFR3 geni 7. ve 10. ekzonunda bulunan 248, 249, 372 ve 375 kodonları içeren DNA parçası polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltıldı. PZR ile FGFR3 geninin 7. ve 10. ekzonlarındaki ilgili kodonları içeren DNA parçasını çoğaltmak için kullanılan primerler Tablo 1.8’de verilmiştir;

Tablo 1.8. FGFR3 Çoğaltılmasında Kullanılan Primerler

Kodon	Ekzon	Primer Dizisi	PZR Ürünü (bç)
248, 249	7	F: 5’- CGGCAGTGGCGGTGGTGGTG -3’ R: 5’- AGGACCGCCGTCTGGTG -3’	120 bç
372, 375	10	F: 5’- CAGGCCAGGCCTCAACGCCC -3’ R: 5’- AGGCCTGGCGGGCAGGCAGC -3’	270 bç

F: İleri dizi (Forward) Primer
R: Geri dizi (Reverse) Primer

PZR ile çoğaltmada toplam 50 µl’lik reaksiyon için; 25 µl HotStar Tag Tag PZR Karışımı (2.5 ünite HotStar Tag DNA polimeraz, 1.5 mM MgCl₂, 200 µM dNTP-Qiagen Cat # 203445) 2 µl FGFR3 (ekzon 7 veya 10 özgülü) ileri-geri primer karışımı, 13 µl H₂O ve 10 µl DNA kullanıldı.

PZR çoğaltma için kullanılan PZR kurulumları;

Ekzon 7 İçin PZR döngü basamakları;

Enzim aktivasyonu; 95 °C`de 15 dakika

Denatürasyon	95°C`de 1 dakika;	}	40 döngü
Primer Bağlanması	67°C`de 1 dakika;		
Primer Uzama	72°C`de 1 dakika;		

Son Uzama; 72 °C`de 10 dakika

Ekzon 10 İçin PZR döngü basamakları;

Enzim aktivasyonu; 95 °C`de 15 dakika

Denatürasyon	95°C`de 1 dakika;	}	40 döngü
Primer Bağlanması	72°C`de 1 dakika;		
Primer Uzama	72 °C`de 1 dakika;		

Son Uzama; 72 °C`de 10 dakika

2.5. PZR Ürününün Görüntülenmesi

PZR rnleri etidyum bromid ile hazırlanmış %2`lik agoroz jele yüklendi ve sonrasında görüntüleme işlemi “Vilber Lourmat” UV görüntüleme cihazında yapıldı.

2.6. Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)

Elde edilen PZR rnlerinin görüntülenmesinin ardından, 7. ekzonun 248. ve 249. kodonlarındaki mutasyonların varlığını saptamak için ilgili restriksiyon enzimler kullanılarak kesim işlemi yapıldı.

A248C kodonundaki mutasyonu saptamak için Hae II (BioLabs, New England) restriksiyon enzimi, S249C kodonundaki mutasyonu saptamak için Tse I (BioLabs, New England) restriksiyon enzimi kullanıldı. Reaksiyon toplam hacmi 20 µl olacak şekilde hazırlandı.

A248C için Hae II restriksiyon enzim kesimi kurulumu;

6 µl H₂O

2 µl solüsyon 4 (1×NE buffer 4)

1 µl BSA (Sığır Serum Albumin)

10 µl PZR ürünü

1 µl Hae II restriksiyon enzimi

Reaksiyon 37°C`de 1 saat bekletilerek gerçekleştirilmiştir.

S249C için Tse I restriksiyon enzim kesimi kurulumu;

7 µl H₂O

2 µl solüsyon 3 (1×NE buffer 3)

10 µl PZR ürünü

1 µl Hae II restriksiyon enzimi

Reaksiyon 65°C’de 1 saat bekletilerek gerçekleştirilmiştir.

Mutasyon analizi için, enzim kesimi sonrasında elde edilen ürünler etidyum bromid ile hazırlanmış %3’lük Molecular Screening Agoroz (MS Agarose-Roche Diagnostics) jele yüklendi ve görüntüleme işlemi “Vilber Lourmat” UV görüntüleme cihazında yapıldı.

10. ekzondaki G372C, T375C kodonlarındaki olası mutasyonlarda DNA dizi analizi ile araştırılmıştır.

2.7. DNA Dizi Analizi

DNA dizi analizi, Otomatik Kapiler Jel Elektroforez cihazı ile (ABI PRISM 310 Genetik Analizör Applied Biosystems, Foster City, USA) İontek'te (İontek A.Ş. İstanbul, Türkiye) saptanmıştır.

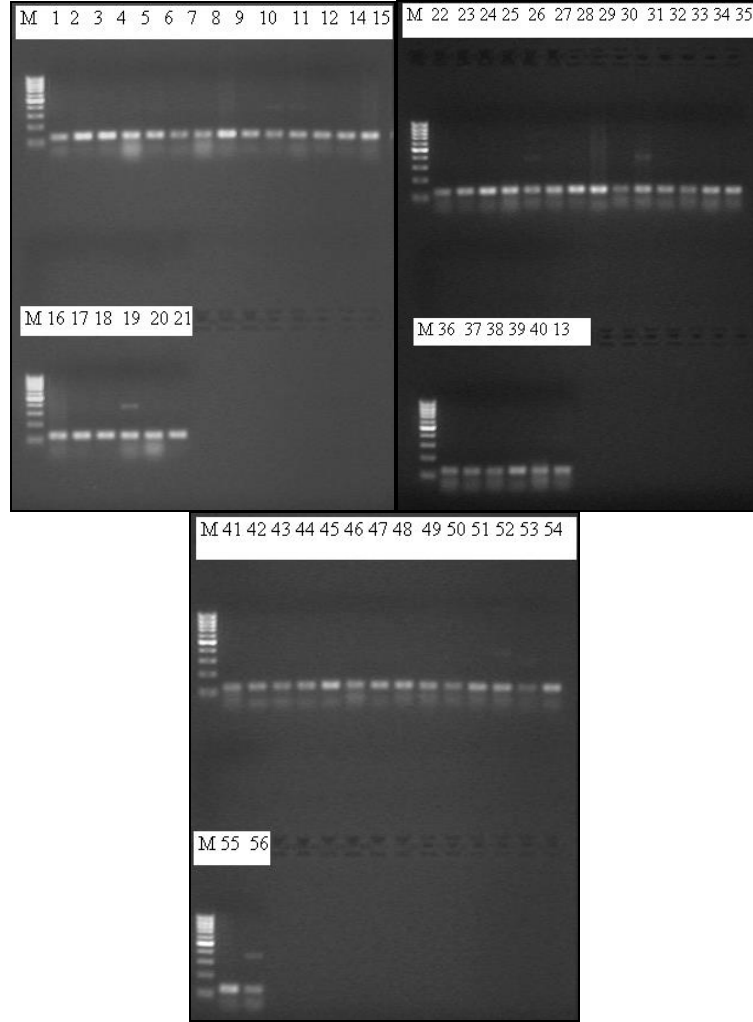
Kısaca, boya terminasyon işaretleme adı verilen bir metod kullanılarak farklı bazlarda (A, G, T, C) sonlanan DNA sentez ürünlerine florasan işaretli boyalar iliştilir. Elektroforez, örnekler bir kapillerden geçirilirken uygulanır. Floresan işaretli boyaları uyararak için bir lazer, boyaların yaydığı ışığı toplamak içinse bir CCD kamera kullanılır. Böylece, lazer uyarımının ardından dört boya tarafından yayılan farklı dalga boylarındaki ışık tek kulvarda ayırt edilebilir. Floresan miktarlarının ölçülmesi ve yorumlanmasının ardından DNA örneğindeki baz dizisi saptanır.

2.8. İstatistiksel Analiz

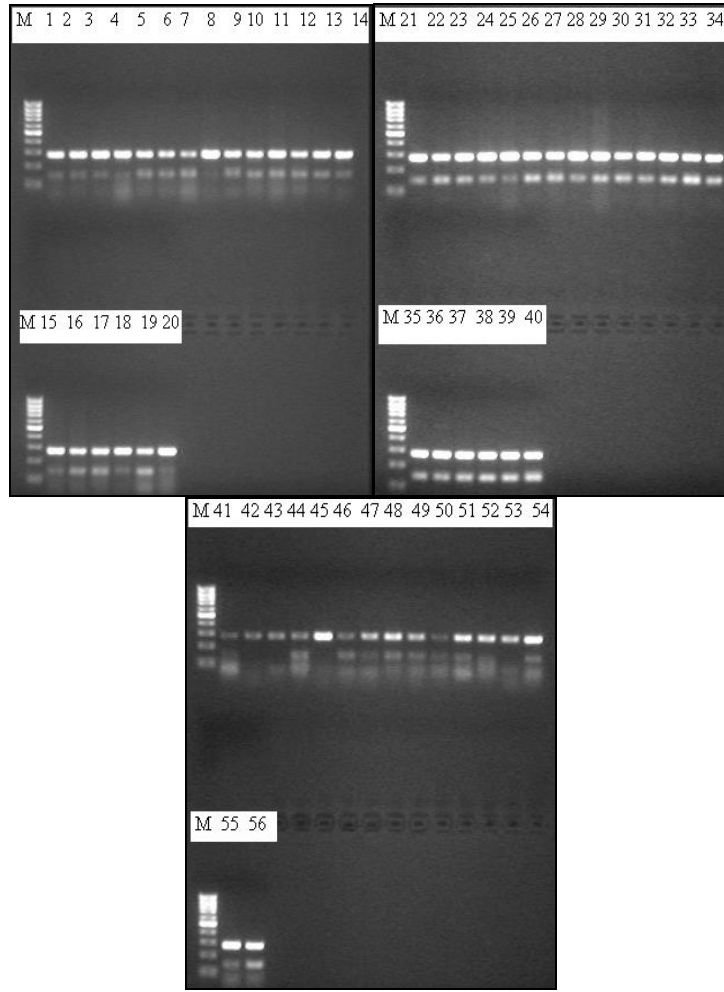
İstatistiksel analiz, SPSS paket programı 10.0 kullanılarak örneklere ki kare testi uygulanarak yapılmıştır.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

Denizli Devlet Hastanesi Patoloji bölümüne tanı alma amacıyla başvuran toplam 56 olguya ait parafine gömülü mesane transizyonel hücre karsinomu doku örneklerinden DNA izolasyonu yapıldı. FGFR3 geninin 7. ve 10. ekzonunda bulunan 248, 249, 372 ve 375 kodonları içeren DNA parçasını çoğaltmak amacıyla ilgili bölgeler için dizayn edilen primerler kullanılarak PZR uygulandı. PZR ile çoğaltılan FGFR3 geni ekzon 7'den 120 bç DNA parçası ve ekzon 10'dan 270 bç DNA parçası agaroz jel görüntüleri Şekil 1.5 ve Şekil 1.6'de verilmiştir.



Şekil 1.5 %2'lik agaroz jeldeki ekzon 7 PZR görüntüleri. M: 100 baz çifti (bç) Marker



Şekil 1.6 %2'lik agaroz jeldeki ekzon 10 PZR görüntüleri. M: 100 baz çifti (bç) Marker

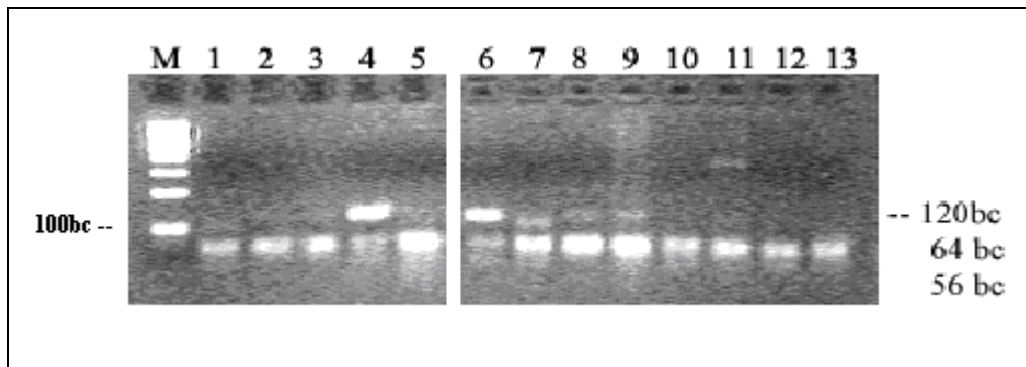
PZR ile çoğaltılan FGFR3 geninin 7. ekzonundaki (120 bç) A248C ve S249C kodonlarında meydana gelen yanlış anlamlı mutasyonların saptanması için PZR ürünleri elde edildikten sonra Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi yöntemi ile mutasyon araştırmasına uygun olarak seçilmiş restriksiyon enzimleri kullanılarak kesim işlemi yapılmıştır.

Ekzon 7 A248C mutasyon analizi için PZR sonrası Hae II restriksiyon enzim kesimi uygulanmıştır. 120 bç Ekzon 7 PZR ürünü Hae II restriksiyon enzim kesimi sonrasında mutasyon yokluğunda 64 bç ve 56 bç DNA parçası, mutasyon varlığında da 120 bç'lik DNA parçası gözlemlenmiştir (Şekil 1.7).

Ekzon 7 A248C için, toplam 56 olgunun 7 tanesi (%12.5) heterozigot mutant olarak bulunmuş olup, 49 olguda (%87.5) ise bu mutasyon tespit edilmemiştir. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda, A248C mutasyonu açısından 7 kadın olgudan (%12.5) 6 tanesi normal olup, 1 tanesi (%14.3) heterozigot mutant olarak, 49 erkek olgudan (%87.5) ise, 43 tanesi normal olup 6 tanesi (%12.2) heterozigot mutant olarak görülmüştür. Bu sonuca göre cinsiyet ile A248C mutasyonu arasında anlamlı bir bağlantı kurulmamıştır.

Tümör evresi ve mutasyon varlığı arasındaki bağlantıya bakıldığında, 14 adet (%25) pTa evre tümörleri arasında 12 olgu normal, 2 olgu (%14.3) mutant; 23 adet (%41.1) pT1 evre tümörleri arasında 21 olgu normal, 2 olgu (%8.7) mutant; 19 adet (%33.9) pT2 evre tümörleri arasında 16 olgu normal, 3 olgu (%15.8) mutant olarak bulunmuştur. Buna göre olgularımız içinde tespit edilen A248C mutasyon varlığı tümör evresine göre homojen dağılımlıdır.

Tümör derecesi ile A248C mutasyon varlığı arasındaki istatistiksel ilişkiye bakıldığında, 5 adet (%8.9) G1 tümör içinde 4 tanesi normal, 1 tanesi (%20) mutant; 25 adet (%44.6) G2 tümör içinde 22 tanesi normal, 3 tanesi (%12) mutant; 26 adet (%46.4) G3 tümör içinde 23 tanesi normal, 3 tanesi (%11.5) mutant olarak saptanmış olup, olgularımız içinde tespit edilen A248C mutasyon varlığı tümör derecesine göre homojen dağılımlı olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 1.7 %3'lük MS agaroz jeldeki ekzon 7 A248C kodonu Hae II enzim kesim görüntüleri.4,6,7,8,9 kuyucuklar A248C mutant. M: 100bç Marker

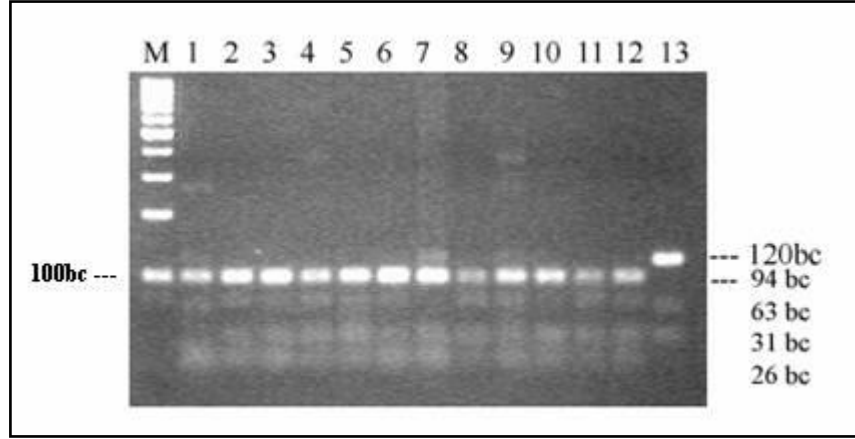
Ekzon 7 S249C mutasyon taraması için Tse I restriksiyon enzim kesimi uygulanmıştır. 120 bç Ekzon 7 PZR ürünü Tse I restriksiyon enzim kesimi sonrasında mutasyon varlığında 63 bç, 31 bç ve 26 bç'lik DNA parçaları, mutasyon yokluğunda da 94 bç ve 26 bç'lik DNA parçaları gözlemlenmiştir (Şekil 1.8).

Toplam 56 olgudan 28 tanesinde (%50) S249C yanlış anlamlı mutasyon saptanmış olup, bunların tamamı heterozigot mutasyon olarak değerlendirilmiştir.

Yapılan istatistiksel analiz sonucunda, S249C mutasyonu açısından 7 kadın olgudan 1 tanesi normal olup 6 tanesi (%85.7) heterozigot mutant olarak, erkek olguların ise, 27 tanesi normal olup 22 tanesi (%44.9) heterozigot mutant olarak saptanmıştır. Bu sonuca göre cinsiyet ile S249C mutasyonu varlığı arasında kadın olgularda daha fazla tespit edilme eğilimi gözlemlense de istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır.

Tümör evresi ve S249C mutasyon varlığı arasındaki bağlantıya bakıldığında, 14 adet (%25) pTa evre tümörü arasında 8 olgu normal, 6 olgu (%42.9) mutant; 23 adet (%41,1) pT1 evre tümörü arasında 11 olgu normal, 12 olgu (%52.2) mutant; 19 adet (%33,9) pT2 evre tümörü arasında 9 olgu normal, 10 olgu (%52.6) mutant olarak tespit edilmiştir ve S249C mutasyonun varlığı tümör evresine göre homojen dağılımlı olarak değerlendirilmiştir.

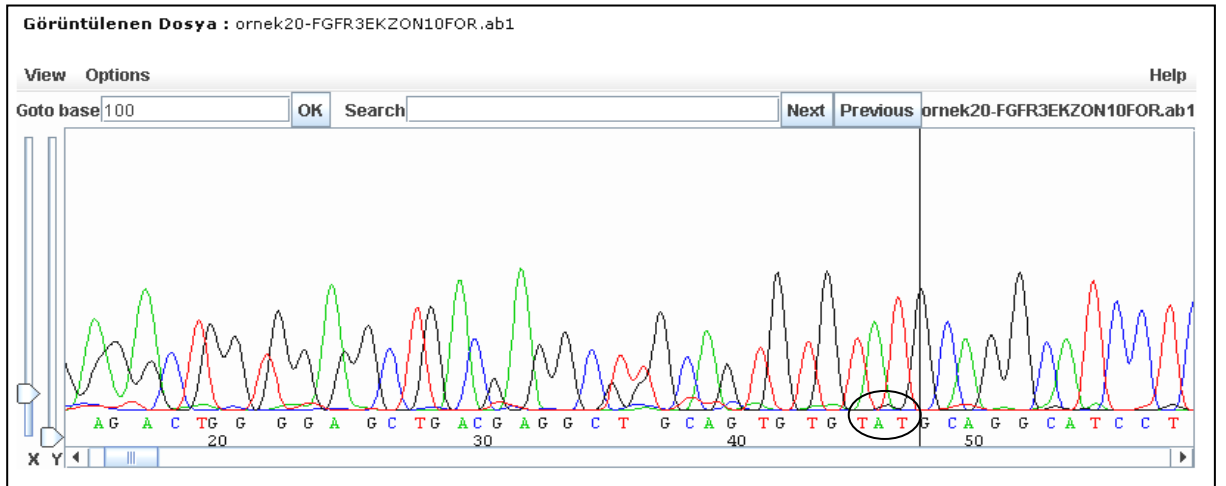
Tümör derecesi ile S249C mutasyon varlığı arasındaki istatistiksel ilişkiye bakıldığında, bu mutasyon açısından 5 adet (%8,9) G1 tümör içinde 4 tanesi normal, 1 tanesi (%20) mutant; 25 adet (%44,6) G2 tümör içinde 11 tanesi normal, 14 tanesi (%56) mutant; 26 adet (%46,4) G3 tümör içinde 13 tanesi normal, 13 tanesi (%50) mutant olarak saptanmış olup, olgularımız içinde tespit edilen S249C mutasyonları tümör derecesine göre homojen dağılımlı olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 1.8. %3'lük MS agaroz jeldeki ekzon 7 S249C kodonu Tse I enzim kesim görüntüleri. 1-12 kuyucuklar S249C mutant, 13 PZR ürünü M: 100bc Marker

FGFR3 ekzon 10'daki G372C ve T375C kodonlarında meydana gelen yanlış anlamlı mutasyonlar DNA dizi analizi ile araştırılmıştır (İontek A.Ş.)

Toplam 56 olgunun hiç birisinde G372C yanlış anlamlı mutasyon saptanmamış olup, olguların tümü (%100) normal olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 1.9. FGFR3 ekzon 10 T375C mutasyonlu 20 numaralı örnek. Daire içindeki alan normal kodonu göstermektedir.

Toplam 56 olgunun 3 tanesinde (%5.4) ekzon 10 T375C yanlış anlamlı mutasyon saptanmış olup, 53 tanesi (%94.6) normal olarak değerlendirilmiştir (Şekil 1.10, 1.11, 1.12). Bu mutasyon açısından 7 kadın olgudan 6 tanesi normal olup, 1 tanesi heterozigot

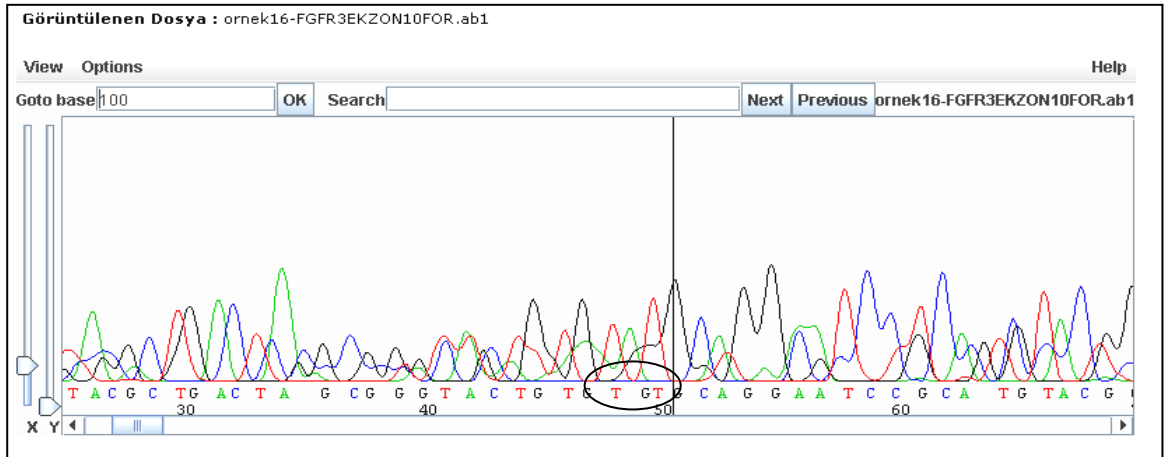
mutant olarak; erkek olguların ise, 47 tanesi normal olup, 2 tanesi heterozigot mutant olarak tespit edilmiştir. Bu sonuca göre cinsiyet ile T375C mutasyon varlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir bağlantı bulunamamıştır.

Tümör evresi ve T375C mutasyon varlığı arasındaki bağlantıya bakıldığında, 14 adet (%25) pTa evre tümörleri arasında 13 olgu normal, 1 olgu (%7.1) mutant; 23 adet (%41,1) pT1 evre tümörleri arasında 22 olgu normal, 1 olgu (%4.3) mutant; 19 adet (%33,9) pT2 evre tümörleri arasında 18 olgu normal, 1 olgu (%5.3) mutant olarak değerlendirildi. Bu sonuçlara göre T375C mutasyonun varlığı tümör evresine göre homojen dağılımlı olarak değerlendirilmiştir.

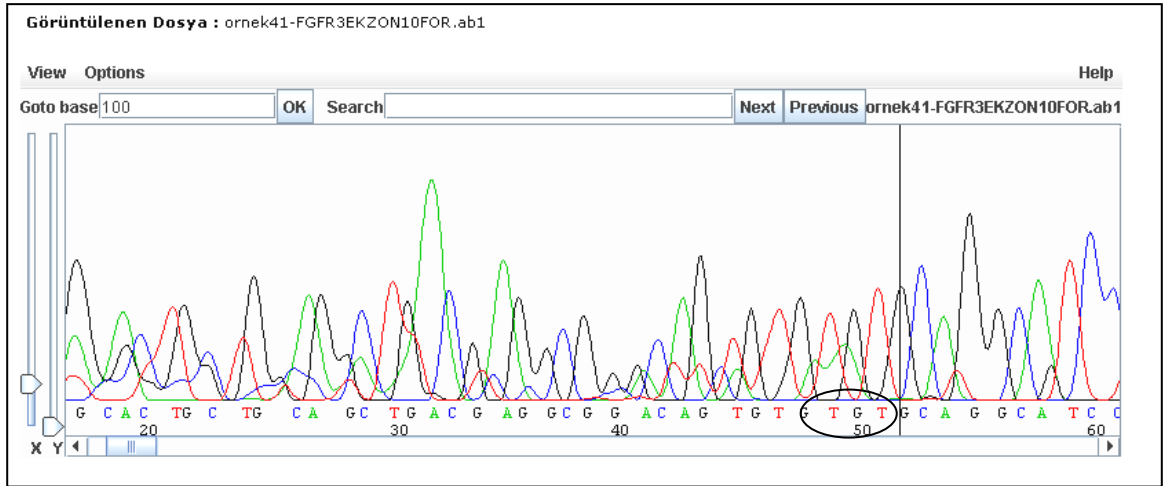
Tümör derecesi ile T375C mutasyon varlığı arasındaki istatistiksel ilişkiye bakıldığında, bu mutasyon açısından 5 adet (%8,9) G1 tümör içinde hepsi normal; 25 adet G2 (%44,6) tümör içinde 23 tanesi normal, 2 tanesi (%8) mutant; 26 adet (%46,4) G3 tümör içinde 25 tanesi normal, 1 tanesi (%3.8) mutant olarak tespit edilmiştir. Tümör derecesine göre T375C mutasyon varlığı homojen dağılımlı olarak değerlendirilmiştir.

Ayrıca 6 adet sağlıklı erkek periferik kanından izole edilen DNA örnekleri araştırılan tüm mutasyonlar için kontrol grubu olarak kullanılmış ve hiçbirinde mutasyon tespit edilmemiştir.

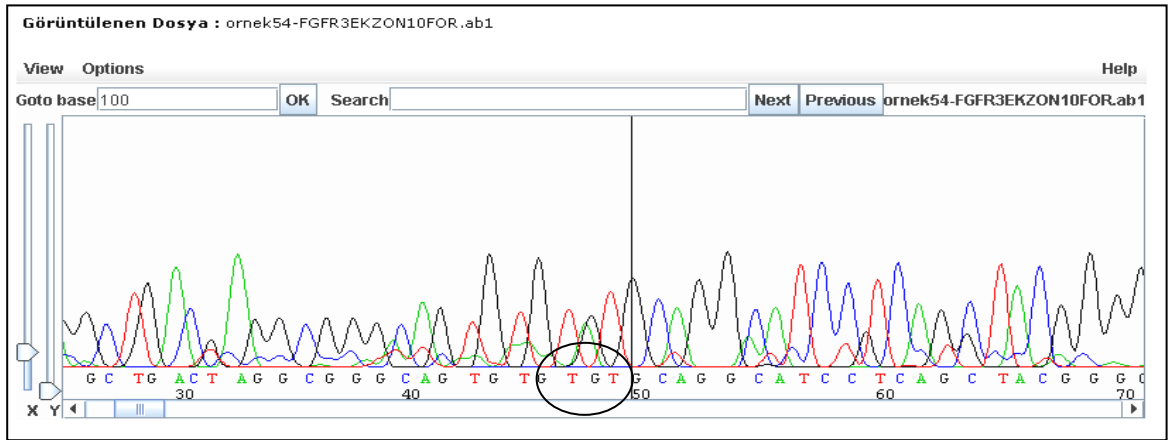
Araştırılan mutasyonların özeti tablo 1.9 ve 1.10'da özetlenmiştir.



Şekil 1.10. FGFR3 ekzon 10 T375C mutasyonlu 16 numaralı örnek. Daire içindeki alan TAT→TGT değişimiyle sonuçlanan kodonu göstermektedir.



Şekil 1.11. FGFR3 ekzon 10 T375C mutasyonlu 41 numaralı örnek. Daire içindeki alan TAT→TGT değişimiyle sonuçlanan kodonu göstermektedir.



Şekil 1.12. FGFR3 ekzon 10 T375C mutasyonlu 54 numaralı örnek. Daire içindeki alan TAT→TGT değişimiyle sonuçlanan kodonu göstermektedir.

Aşağıda mutasyonlu ve normal saptanan örneklere ait DNA dizileri verilmiştir.

```
CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment ÖRNEK-16-FOR

gi|13112046_40-2460          TCTGCGTGGCTGGTGGTGCTGCCAGCCGAGGAGGAGCTGGTGGAGGCTGA 1100
gi|13112046_ornekl6ekzon10for -----GGACGCTACGAGAGACTGCTGTACGCTGA 29
                                   * * * * * * * * * * * * * * * *

gi|13112046_40-2460          CGAGGCGGGCAGTGTGTATGCAGGCATCCTCAGCTACGGGGTGGGCTTCT 1150
gi|13112046_ornekl6ekzon10for CTAG-CGGGTAAGTGTGTGCAGGAATCCGCATGTACGGGGTGGTCTTCT 78
                                   * * * * * * * * * * * * * * * *

gi|13112046_40-2460          TCCTGTTCATCCTGGTGGTGGCGGCTGTGACGCTCTGCCGCCTGCCGAGC 1200
gi|13112046_ornekl6ekzon10for TCATGTTCATCCTGGTGGTGGCGGCTGTGTAGCTCTGCCGCCTGCCGAGC 128
                                   ** * * * * * * * * * * * * * * * *

gi|13112046_40-2460          CCCCCAAGAAAGGCCTGGGCTCCCCACCGTGCACAAGATCTCCCGCTT 1250
gi|13112046_ornekl6ekzon10for CCCCCAAGAAAGGCCTGGGCTCCCCACCGTGCACAAGATCTCCCGCTT 178
                                   * * * * * * * * * * * * * * * *

gi|13112046_40-2460          CCCGCTCAAGCGACAGGTGTCCCTGGAGTCCAACGCGTCCATGAGCT-CC 1299
gi|13112046_ornekl6ekzon10for CCCGCTCAAGCGACAGGTAACAGAAAGTAGATACCAGGTTCTGAGCTGCC 228
                                   * * * * * * * * * * * * * * * *

gi|13112046_40-2460          AACACACCACTGGTGCAGCATCGCAAGGCTGTCTCAGGGGAGGGCCCCAC 1349
gi|13112046_ornekl6ekzon10for TGCCCCCAGGCCTAA----- 244
                                   * * * * * *
```

Şekil 1.13. 16 numaralı örneğe ait DNA dizisi. * Gri boyalı alan A ve G değişimini göstermektedir.

```
CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment ÖRNEK-41-FOR

gi|13112046_40-2460          TCTGCGTGGCTGGTGGTGCTGCCAGCCGAGGAGGAGCTGGTGGAGGCTGA 1100
gi|13112046_ornek41ekzon10for -----TTNNGGCCGCTACGGCGCA-CTGCTGCAG-CTGA 32
                                   * * * * * * * * * * * * * * * *

gi|13112046_40-2460          CGAGGCGGGCAGTGTGTATGCAGGCATCCTCAGCTACGGGGTGGGCTTCT 1150
gi|13112046_ornek41ekzon10for CGAGGCGGACAGTGTGTGCAGGCATCCTCAGCTACGGGGTGGGCTTCT 82
                                   * * * * * * * * * * * * * * * *

gi|13112046_40-2460          TCCTGTTCATCCTGGTGGTGGCGGCTGTGACGCTCTGCCGCCTGCCGAGC 1200
gi|13112046_ornek41ekzon10for TCCTGTTCATCCTGGTGGTGGCGGCTGTGTAGCTCTGCCGCCTGCCGAGC 132
                                   * * * * * * * * * * * * * * * *

gi|13112046_40-2460          CCCCCAAGAAAGGCCTGGGCTCCCCACCGTGCACAAGATCTCCCGCTT 1250
gi|13112046_ornek41ekzon10for CCCCCAAGAAAGGCCTGGGCTCCCCACCGTGCACAAGATCTCCCGCTT 182
                                   * * * * * * * * * * * * * * * *

gi|13112046_40-2460          CCCGCTCAAGCGACAGGTGTCCCTGGAGTCCAACGCGTCCATGAGCT-CC 1299
gi|13112046_ornek41ekzon10for CCCGCTCAAGCGACAGGTAACAGAAAGTAGATACCAGGTTCTGAGCTGCC 232
                                   * * * * * * * * * * * * * * * *
```

Şekil 1.14. 41 numaralı örneğe ait DNA dizisi. * Gri boyalı alan A ve G değişimini göstermektedir

```

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment ÖRNEK-54-FOR

gi|13112046_40-2460          TCTGCGTGGCTGGTGGTGTGCCAGCCGAGGAGGAGCTGGTGGAGGCTGA 1100
gi|13112046_ornek54ekzon10for -----GGGGCTCCGAGAGACTGGTGGAG-CTGA 27
                                     * *   ***   *****   ****

gi|13112046_40-2460          CGAGGCGGGCAGTGTGTATGCAGGCATCCTCAGCTACGGGGTGGGCTTCT 1150
gi|13112046_ornek54ekzon10for CTAGGCGGGCAGTGTGTATGCAGGCATCCTCAGCTACGGGGTGGGCTTCT 77
                                     * *****

gi|13112046_40-2460          TCCTGTTCATCCTGGTGGTGGCGGCTGTGACGCTCTGCCGCTGCGCAGC 1200
gi|13112046_ornek54ekzon10for TCCTGTTCATCCTGGTGGTGGCGGCTGTGACGCTCTGCCGCTGCGCAGC 127
                                     *****

gi|13112046_40-2460          CCCCCAAGAAAGGCCTGGGCTCCCCACCGTGCACAAGATCTCCCGCTT 1250
gi|13112046_ornek54ekzon10for CCCCCAAGAAAGGCCTGGGCTCCCCACCGTGCACAAGATCTCCCGCTT 177
                                     *****

gi|13112046_40-2460          CCCGCTCAAGCGACAGGTGTCCCTGGAGTCCAACGCGTCCATGAGCT-CC 1299
gi|13112046_ornek54ekzon10for CCCGCTCAAGCGACAGGTAAACAGAAAGTAGATACCAGTTCTGAGCTGCC 227
                                     ***** *           ** *   ***** **

```

Şekil 1.15. 54 numaralı örneğe ait DNA dizisi. * Gri boyalı alan A ve G değişimini göstermektedir

```

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment ÖRNEK-20-FOR

gi|13112046_40-2460          TCTGCGTGGCTGGTGGTGTGCCAGCCGAGGAGGAGCTGGTGGAGGCTGA 1100
gi|13112046_ornek20ekzon10for -----CCTACTC--CGAGAGACTG--GGGAGCTGA 25
                                     *** *   ***   ***   **   *****

gi|13112046_40-2460          CGAGGCGGGCAGTGTGTATGCAGGCATCCTCAGCTACGGGGTGGGCTTCT 1150
gi|13112046_ornek20ekzon10for CGAGGCTG-CAGTGTGTATGCAGGCATCCTCAGCTACGGGGTGGGCTTCT 74
                                     ***** * *****

gi|13112046_40-2460          TCCTGTTCATCCTGGTGGTGGCGGCTGTGACGCTCTGCCGCTGCGCAGC 1200
gi|13112046_ornek20ekzon10for TCCTGTTCATCCTGGTGGTGGCGGCTGTGACGCTCTGCCGCTGCGCAGC 124
                                     *****

gi|13112046_40-2460          CCCCCAAGAAAGGCCTGGGCTCCCCACCGTGCACAAGATCTCCCGCTT 1250
gi|13112046_ornek20ekzon10for CCCCCAAGAAAGGCCTGGGCTCCCCACCGTGCACAAGATCTCCCGCTT 174
                                     *****

gi|13112046_40-2460          CCCGCTCAAGCGACAGGTGTCCCTGGAGTCCAACGCGTCCATGAGCT-CC 1299
gi|13112046_ornek20ekzon10for CCCGCTCAAGCGACAGGTAAACAGAAAGTAGATACCAGTTCTGAGCTGCC 224
                                     ***** *           ** *   ***** **

```

Şekil 1.16. 20 numaralı örneğe ait DNA dizisi. * Gri boyalı alan A ve G değişimi gözlenmemiştir.

Tablo 1.9. FGFR3 A248C, S249C, G372C ve T375C mutasyonlarının dağılımı

Numara	A248C	S249C	G372C	T375C
1	Normal	Normal	Normal	Normal
2	Normal	Normal	Normal	Normal
3	Normal	Normal	Normal	Normal
4	Normal	Heterozigot	Normal	Normal
5	Normal	Normal	Normal	Normal
6	Normal	Normal	Normal	Normal
7	Normal	Normal	Normal	Normal
8	Normal	Normal	Normal	Normal
9	Normal	Normal	Normal	Normal
10	Normal	Normal	Normal	Normal
11	Normal	Normal	Normal	Normal
12	Normal	Normal	Normal	Normal
13	Normal	Normal	Normal	Normal
14	Normal	Normal	Normal	Normal
15	Normal	Normal	Normal	Normal
16	Normal	Heterozigot	Normal	Heterozigot
17	Normal	Normal	Normal	Normal
18	Normal	Heterozigot	Normal	Normal
19	Normal	Heterozigot	Normal	Normal
20	Normal	Normal	Normal	Normal
21	Normal	Normal	Normal	Normal
22	Normal	Heterozigot	Normal	Normal
23	Normal	Heterozigot	Normal	Normal
24	Heterozigot	Heterozigot	Normal	Normal
25	Normal	Heterozigot	Normal	Normal
26	Heterozigot	Heterozigot	Normal	Normal
27	Heterozigot	Heterozigot	Normal	Normal
28	Heterozigot	Heterozigot	Normal	Normal
29	Heterozigot	Normal	Normal	Normal
30	Normal	Heterozigot	Normal	Normal
31	Normal	Heterozigot	Normal	Normal
32	Normal	Heterozigot	Normal	Normal
33	Normal	Heterozigot	Normal	Normal
34	Normal	Heterozigot	Normal	Normal
35	Normal	Normal	Normal	Normal
36	Normal	Heterozigot	Normal	Normal
37	Normal	Heterozigot	Normal	Normal
38	Normal	Heterozigot	Normal	Normal
39	Normal	Normal	Normal	Normal
40	Normal	Heterozigot	Normal	Normal
41	Normal	Normal	Normal	Heterozigot
42	Heterozigot	Normal	Normal	Normal
43	Heterozigot	Normal	Normal	Normal
44	Normal	Heterozigot	Normal	Normal
45	Normal	Heterozigot	Normal	Normal
46	Normal	Normal	Normal	Normal
47	Normal	Normal	Normal	Normal
48	Normal	Normal	Normal	Normal
49	Normal	Heterozigot	Normal	Normal
50	Normal	Heterozigot	Normal	Normal
51	Normal	Heterozigot	Normal	Normal
52	Normal	Heterozigot	Normal	Normal
53	Normal	Normal	Normal	Normal
54	Normal	Normal	Normal	Heterozigot
55	Normal	Heterozigot	Normal	Normal
56	Normal	Heterozigot	Normal	Normal

Tablo 1.10. Mesane tümörlerinde FGFR3 mutasyonları

Ekzon	Kodon	Nt pozisyonu	Mutasyon	Değişim	Tümör Sayısı	
					<u>Normal</u>	<u>Heterozigot</u>
7	248	742	CGC→TGC	Arg→Cys	49 (%87.5)	7 (%12.5)
7	249	746	TCC→TGC	Ser→Cys	28(%50)	28(%50)
10	372	1114	GGC→TGC	Gly→Cys	56 (%100)	-
10	375	1124	TAT→TGT	Tyr→Cys	53(%94.6)	3 (%5.4)

Nt: Nükleotit

Araştırma kapsamına çalışılan mesane kanseri hasta grubunda FGFR3 genindeki tanatoforik displazi mutasyonları olarak gruplandırılan ekzon 7 A248C, S249C ve ekzon 10 G372C, T375C kodonlardaki tespit edilen toplam mutasyon varlığı 56 olgunun 23 tanesi (%41.1) normal, 33 tanesi (%58.9) heterozigot mutant olarak değerlendirilmiştir. Bu sonuçlar daha önce yapılmış çalışmalar ile örtüşmektedir. Ayrıca 56 olgunun 5 tanesinde (Olgu no: 16, 24, 26, 27, 28) iki ayrı mutasyon varlığı tespit edilmiştir (Tablo 1.9, Tablo 1.10 ve Tablo 1.11).

Tablo 1.11 Mesane kanseri hasta popülasyonunda FGFR3 genine ait Tanatoforik Displazi Mutasyon varlığı sonuçları ile cinsiyet, tümör evresi ve derecesi ile olan ilişkisi

Karakteristik	n (%)	A248C	S249C	G372C	T375C	Sonuçlanan Tanatoforik Displazi Mutasyonları
Cinsiyet						
K	7 (%12.5)	1 (%14.3)	6 (%85.7)	-	1(%14.3)	6 (%85.7)
E	49 (%87.5)	6 (%12.2)	22 (%44.9)	-	2 (%4.1)	27 (%55.1)
Tümör Evresi (pT)						
a	14 (% 25)	2 (%14.3)	6 (%42.9)	-	1 (%7.1)	8 (%57.1)
1	23 (% 41.1)	2 (%8.7)	12 (%52.2)	-	1 (%4.3)	14 (%60.9)
2	19 (% 33.9)	3 (%15.8)	10 (%52.6)	-	1 (%5.3)	11 (%57.9)
Hücrel Derece (G)						
1	5 (% 8.9)	1 (%20)	1 (%20)	-	-	2 (%40)
2	25 (% 44.6)	3 (%12)	14 (%56)	-	2 (%8)	17 (%68)
3	26 (% 46.4)	3 (%11.5)	13 (%50)	-	1 (%3.8)	14 (%53.8)

FGFR3 genindeki ekzon 7 A248C, S249C ve ekzon 10 G372C ve T375C kodonlarındaki yanlış anlamlı mutasyonların saptanması, bu mutasyonların mesane tümörlerinin derecesi ile ilişkilendirilmesi önemlidir. Daha önce yapılmış farklı ülkelerden kaynaklanan araştırmalar bu mutasyonların tümör gelişiminin erken evresinde görüldüğünü ve tümörün geç evrelerinde bu mutasyonların saptanamadığı, ancak her kodondaki mutasyonun görülme sıklığının da aynı olmadığı göstermektedir.

Van Rhijn BWG ve ark.'ları FGFR3 mutasyonlarını tümör dereceleri ile ilişkilendirdiklerinde, derece arttıkça mutasyonun görülme olasılığının azaldığını bulmuşlardır. G1 dereceli 32 olguda 27 mutasyon, G2 dereceli 29 olguda 16 mutasyon ve G3 dereceli 71 olguda 5 mutasyon saptamışlardır (Van Rhijn BWG vd 2002).

Bizim çalışmamızda G1 dereceli 5 olgunun 2'sinde (%8.9), G2 dereceli 25 olgunun 17'sinde (%44.6), G3 dereceli 26 olgunun 14'ünde (%46.4) mutasyon saptanmıştır. FGFR3 genindeki ekzon 7 A248C, S249C ve ekzon 10 G372C ve T375C mutasyon sonuçları tek tek ve toplu olarak değerlendirildiğinde, daha önce yapılmış çalışmalardan farklı olarak tümör evresine ve derecesine göre homojen dağılımlı olduğu saptanmıştır. Ancak yukarıda bahsi geçen diğer çalışmalardaki olgulara göre, bizim çalışma grubumuzdaki olgularda daha çok geç evre ve yüksek derecede tümörlerin varlığı, daha

az erken evre ve düşük dereceli tümör varlığı nedeniyle saptamış olduğumuz mutasyonların homojen dağılımından sorumlu olabilir. Bu nedenle erken evre ve düşük derece tümör grubunun sayıca arttırılması düşünülmektedir. Ancak Türkiye'deki mesane kanserleri olguları daha çok geç ve ileri evrede patolojik tanı almaları nedeniyle geç evre ve yüksek derecedeki örnek sayısına göre, erken evre ve düşük derece tümör materyali sayısı daha azdır.

Cappellen D. ve ark.'larının yaptığı çalışmada 76 erken evre mesane tümörü olgularında FGFR3b varyantının 70 olguda ifade edildiğini göstermişler ve daha sonraki çalışmalarında ise uyguladıkları başka bir yöntemle bu 70 olgunun 26'sında nükleotid değişikliği olduğunu (26 olgunun 9'unda A248C, S249C, G372C ve K652E kodonlarında tek nükleotid değişimi) saptamışlardır. Ayrıca çalışmalarında en çok S249C kodonunda mutasyon olduğunu belirtmişlerdir. (9 olgunun 5'inde) (Cappellen vd. 1999).

Billerey C. ve ark.'ları 132 olgu (20 karsinom in situ, 50 pTa, 19 pT1 ve 43 pT2-4) arasında daha çok erken evre tümörlerde olmak üzere toplam 48 (%36.36) yanlış anlamlı mutasyon saptamışlardır ve bunlardan 33 tanesi S249C kodonunda ve 8 tanesi A248C kodonunda olduğunu belirtmişlerdir. (Billerey C. vd 2001). Van Rhijn BWG ve ark.'ları 12 üreteliyal papillom ve 79 pTaG1 tümürlü olgulardan 77 tanesinde (49 tanesi S249C, 7 tanesi A248C) yanlış anlamlı mutasyon saptamışlardır (Van Rhijn BWG vd 2002).

Kimura ve ark.'ları 81 THK'lu (düşük derece veya süperfisial mesane karsinomu) olgunun 25'inde nokta mutasyonu saptamışlardır ve bu nokta mutasyonlarının 2 tanesi A248C kodonunda, 11 tanesi S249C kodonunda olduğunu gözlemlemişlerdir.

Bizim çalışmamızda da 56 olgunun 7'sinde (%12.5) A248C ve 28'inde (%50) S249C, 3'ünde (%5.4) T375C kodonlarında yanlış anlamlı mutasyon saptanmış olup bu oran literatürdeki diğer çalışmaları desteklemektedir.

Mesane ve diğer kanser olgularında yapılmış çalışmalarda en çok gözlenen mutasyonun S249C'de olmasının yanı sıra, tanatoforik dizplazili olgularda bu mutasyonun daha az gözlendiği (62 olguda 7 mutasyon, %11.5) ve bu sendromda çoğunlukla A248C mutasyonu olduğu gözlemlenmiştir (62 olguda 26 mutasyon, %42) (Bonaventure J vd, basılmamış data).

4. SONUÇ

Bu çalışma kapsamına alınan 56 adet mesane transizyonel hücre karsinomunun 14 tanesi (%25) pTa, 23 tanesi (%41,1) pT1, 19 tanesi (%33,9) pT2 olarak evrelendirilmiştir. Ayrıca 56 olgunun 5 tanesi (% 8.9) G1, 25 tanesi (% 44.6) G2, 26 tanesi (% 46.4) G3 olarak derecelendirilmiştir.

FGFR3 geni ekzon 7 A248C kodonundaki yanlış anlamlı mutasyon DNA izolasyonu, PZR ve Hae II restriksiyon enzim kesimi sonuçlarına göre 56 olgunun 7'sinde (%12.5) belirlenmiştir.

FGFR3 geni ekzon 7 S249C kodonundaki yanlış anlamlı mutasyon DNA izolasyonu, PZR ve Tse I restriksiyon enzim kesimi sonuçlarına göre 56 olgunun 28'inde (%50) belirlenmiştir. Toplam 7 kadın olgudan 1 tanesi normal olup 6 tanesi (%85.7) heterozigot mutant olarak, 49 erkek olgudan 27 tanesi normal olup 22 tanesi (%44.9) heterozigot mutant olarak saptanmıştır. Bu sonuca göre cinsiyet ile S249C mutasyonu varlığı arasında kadın olgularda daha fazla tespit edilme eğilimi gözlemlense de istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır. Ayrıca mesane kanserlerinde en çok sıklıkla gözlemlenen FGFR3 geni ekzon 7 S249C kodonundaki yanlış anlamlı mutasyonu araştırılan diğer mutasyonlara göre bu çalışmada da en fazla sayıda saptanmış ve literatür çalışmalarını desteklemektedir.

FGFR3 geni ekzon 10 G372C kodonundaki yanlış anlamlı mutasyon DNA izolasyonu, PZR ve DNA dizi analizi ile araştırılmıştır ve 56 olgunun hiç birinde belirlenmemiştir.

FGFR3 geni ekzon 10 G372C kodonundaki yanlış anlamlı mutasyon DNA izolasyonu, PZR ve DNA dizi analizi ile araştırılmıştır ve 56 olgunun 3'ünde (%5.3) belirlenmiştir.

FGFR3 genindeki ekzon 7 A248C, S249C ve ekzon 10 G372C ve T375C mutasyon sonuçları tek tek ve toplu olarak değerlendirildiğinde daha önce yapılmış çalışmalardan farklı olarak tümör evresine ve derecesine göre homojen dağılımlı olduğu saptanmıştır. Ancak daha fazla sayıda erken evre ve düşük derece tümör örneğinin araştırma kapsamında değerlendirilmesi gerektiği düşünülmektedir.

5. KAYNAKLAR

- Adar, R. Monsonogo-Ornan, E. David, P. Yayon A. (2002) Differential Activation of Cysteine-Substitution Mutants of Fibroblast Growth Factor Receptor 3 is Determined by Cysteine Localization, *J Bone Miner Res.*, May;17(5):860-8.
- Anafarta K, Göğüş O, Bedük Y, Arıkan N. (1998) Temel Üroloji, *Güneş Kitabevi*, 707-712.
- Bakar, A. A. Wallerand, H. Radvanyi, F. Lahaye, J. B. Pissard, S. Lecerf, L. Kouyoumdjian, J. C. Abbou, C. C. Paireon, J. C. Jaurand, M. C. Thiery, J. P. Chopin, D. K. Gil Diez De Medina, S. (2003) FGFR3 and TP53 Gene Mutations Define Two Distinct Pathways in Urothelial Cell Carcinoma of the Bladder, *Cancer Res.*, 63 8108–8112.
- Billerey, C. Chopin, D. Aubriot-Lorton, M. H. Ricol, D. Gil Diez de Medina, S. Van Rhijn, B. Bralet, M. P. Lefrere-Belda, M. A. Lahaye, J. B. Abbou, C. C. Bonaventure, J. Zafrani, E. S. Van der Kwast, T. Thiery, J. P. Radvanyi, F. (2001) Frequent FGFR3 Mutations in Papillary Non-Invasive Bladder (pTa) Tumors, *Am. J. Pathol.*, 158 1955–1959.
- Cappellen, D. De Oliveira, C. Ricol, D. De Medina, S. Bourdin, J. Sastre-Garau, X. Chopin, D. Thiery, J. P. Radvanyi, F. (1999) Frequent Activating Mutations of FGFR3 in Human Bladder and Cervix Carcinomas, *Nat. Genet.*, 23 18–20.
- Cavallaro, U. Christofori, G. (2004) Cell Adhesion and Signalling by Cadherins and Ig-CAMs in Cancer. *Nat Rev Cancer.*, Feb;4(2):118-32.
- Cavallaro, U. Niedermeyer, J. Fuxa, M. Christofori, G. (2001). N-CAM Modulates Tumour-Cell Adhesion to Matrix by Inducing FGF-Receptor Signalling, *Nat. Cell Biol.*, 3(7):650-7.
- Chesi, M. Nardini, E. Brents, L. A. Schrock, E. Ried, T. Kuehl, W. M. Bergsagel, P. L. (1997) Frequent Translocation t(4;14)(p16.3;q32.3) in Multiple Myeloma is Associated with Increased Expression and Activating Mutations of Fibroblast Growth Factor Receptor 3, *Nat. Genet.*, 16 260–264.
- Cohen, M. M. Jr. (2003) Neoplasms Associated With Alterations in Fibroblast Growth Factor Receptors, *American Journal of Medical Genetics*, 119A:97–100
- Epstein, J. I. Amin, M. B. Reuter, V. R. Mostofi, F. K. (1998) Bladder Consensus Conference Committee. The World Health Organisation/International Society of

- Urological Pathology Concensus Classification of Urothelial (Transitional Cell) Neoplasms of the Urinary Bladder, *Am J Surg Pathol*, 22 (12): 1435-1448
- Erble, J. N. Sauter, G. Epstein, J. I. Sesterhenn, I. A. (2004), (Eds.): World Health Organization Classification of Tumors, *Pathology and Genetics of Tumors of the Urinary System and Male Genital Organs*, IARC Pres:Lyon
- Eswarakumar, V. P. Lax, I. Schlessinger, J. (2005) Cellular Signaling by Fibroblast Growth Factor Receptors, *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 16 139–149
- Givol, D. Yayon, A. Complexity of FGF Receptors: Genetic Basis for Structural Diversity and Functional Specificity, *The FASEB Journal*, Vol 6, 3362-3369
- Grignon, D. Neoplasms of the Urinary Bladder (1997) In. Bostwick, D. G. Eble, J. N. *Urologic Surgical Pathology*,. Missouri: Mosby Year Book, 221-253
- Güneş, H. V. (2003). Moleküler Hücre Biyolojisi. Etam, *Kaan Kitabevi*, Eskişehir, s328-334
- Jang, J. H. Shin, K. H. Park, J. G. (2001) Mutations in Fibroblast Growth Factor Receptor 2 and Fibroblast Growth Factor Receptor 3 Genes Associated with Human Gastric and Colorectal Cancers, *Cancer Res.*, 61 3541– 3543.
- Jang, J. H. Shin, K. H. Park, J. G. Lee, R. J. McKeehan, W. L. Park, J. G. (2000) Novel Transcripts of Fibroblast Growth Factor Receptor 3 Reveal Aberrant Splicing and Activation of Cryptic Splice Sequences in Colorectal Cancer, *Cancer Res.*, 60 4049– 4052.
- Johnston, C. L. Cox, H. C. Gomm, J. J. Coombes, R. C. (1995) Fibroblast Growth Factor Receptors (FGFRs) Localize in Different Cellular Compartments. A Splice Variant of FGFR-3 Localizes to the Nucleus, *J. Biol. Chem.*, 270 30643– 30650.
- Kanai, M. Goke, M. Tsunekawa, S. Podolsky, D. K. (1997) Signal Transduction Pathway of Human Fibroblast Growth Factor Receptor 3. Identification of a Novel 66-kDa Phosphoprotein, *J Biol Chem.*, Mar 7;272(10):6621-8.
- Karoui, M. Hofmann-Radvanyi, H. Zimmermann, U. Couvelard, A. Degott, C. Faridoni-Laurens, L. Ahomadegbe, J. C. Gazzeri, S. Brambilla, E. Clerici, T. Charbonnier, P. Tresallet, C. Mitry, E. Pena, C. Rougier, P. Boileau, C. Thiery, J. P. Nordlinger, B. Franc, B. Radvanyi, F. (2001) No Evidence of Somatic FGFR3 Mutation in Various Types of Carcinoma, *Oncogen*, 20 5059– 5061.
- Kausch, I. Böhle, A. (2001) Bladder Cancer: II. Molecular Aspects and Diagnosis, *Eur Urol.*, 39: 498-506

- Kimura, T. Suzuki, H. Ohashi, T. Asano, K. Kiyota, H. Eto, Y. (2001) The Incidence of Thanatophoric Dysplasia Mutations in FGFR3 Gene is Higher in Low-Grade or Superficial Bladder Carcinomas, *Cancer*, 92 2555– 2561.
- Kiselyov, V. V. Skladchikova, G. Hinsby, A. M. Jensen, P. H. Kulahin, N. Soroka, V. Pedersen, N. Tsetlin, V. Poulsen, F. M. Berezin, V. Bock, E. (2003) Structural Basis for a Direct Interaction Between FGFR1 and NCAM and Evidence for a Regulatory Role of ATP, *Structure*. 11(6):691-701.
- Klug, W. S. Cummings, M. R. (2003) Genetik Kavramlar (Öner, C.), *Palme Yayıncılık*, Ankara, s635-651.
- Liu, Z. Xu, J. Colvin, J. S. Ornitz, D. M. (2002) Coordination of Chondrogenesis and Osteogenesis by Fibroblast Growth Factor 18, *Genes Dev.*, Apr 1;16(7):859-69.
- L'Hote, C. G. M. Knowles, M. A. (2005) Cell Responses to FGFR3 Signaling: Growth, Differentiation and Apoptosis, *Experimental Cell Research*, 304 417- 431.
- Messing, E. M. Catalona, W. Urothelial Tumors of the Urinary Tract. (1998) In. Walsh, P. C, Retik, A. B. Vaughan, E. D. Wein, A. J. Campell's Urology. *Philadelphia: WB Saunders*, 2337-2383.
- Montironi, R. Beltran, A. L. Mazzucchelli, R. Bostwick, D. G. (2003) Classification and Grading of the Gon-Invasive Urethelial Neoplasms: Recent Advances and Cotroversies, *J Clin Pathol.*, 56: 91-95
- Munro, N. P. Knowles, M. A. (2003) Fibroblast Growth Factors and Their Reseptors in Transitional Cell Carcinoma, *American Urological Association*, 0022-5347/03/1692-0675/0, Vol. 169, 675–682, February
- Nussbaum, R. L. McInnes, R. R. Willard, H. F. (2005) Thompson&Thompson Tibbi Genetik, *Güneş Kitabevi Ltd. Şti.*, Ankara, s79-82;311-315.
- Ohbayashi, N. Shibayama, M. Kurotaki, Y. Imanishi, M. Fujimori, T. Itoh, N. Takada, S. (2002) FGF18 is Required for Normal Cell Proliferation and Differentiation During Osteogenesis and Chondrogenesis, *Genes Dev.*, Apr 1;16(7):870-9.
- Passos-Bueno, M. R. Wilcox, W. R. Jabs, E. W. Sertie, A. L. Alonso, L. G. Kitoh, H. (1999) Clinical Spectrum of Fibroblast Growth Factor Receptor Mutations, *Hum. Mutat.*, 14(2):115-25
- Patstone, G. Pasquale, E. B. Maher, P. A. (1993). Different Members of the Fibroblast Growth Factor Receptor Family are Specific to Distinct Cell Types in the Developing Chicken Embryo. *Dev Biol.*, Jan;155(1):107-23.

- Patton, S. E, Hall, M. C, Ozen, H. (2002) Bladder Cancer, *Curr. Opin. Onco.*, 14 265–272.
- Petersen, R. O. (1992) Urinary Bladder In. Urologic Pathology. Philadelphia: **JB Lippincott Company**, 260-367
- Pringle, N. P. Yu, W. P. Howell, M. Colvin, J. S. Ornitz, D. M. Richardson, W. D. (2003) Fgfr3 Expression by Astrocytes and Their Precursors: Evidence that Astrocytes and Oligodendrocytes Originate in Distinct Neuroepithelial Domains, *Development*, Jan;130(1):93-102.
- Reuter, V. E. (1997) Urinary Bladder, Ureter and Renal Pelvis In. Sternberg SS. *Histology for Pathology*, Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 835-847
- Richelda, R. Ronchetti, D. Baldini, L. Cro, L. Viggiano, L. Marzella, R. Rocchi, M. Otsuki, T. Lombardi, L. Maiolo, A. T. Neri, A. (1997) A Novel Chromosomal Translocation t(4;14)(p16.3;q32) in Multiple Myeloma Involves The Fibroblast Growth-Factor Receptor 3 Gene, *Blood*, 90 4062–4070.
- Rosai, J. (1996) Staging of Cancer In. Ackerman's Surgical Pathology. *St. Louis, Missouri: Mosby Year Book*, Inc, 2607-2608
- Schlessinger, J. Plotnikov, A. N. Ibrahimi, O. A. Eliseenkova, A. V. Yeh, B. K. Yayon, A. Linhardt, R. J. Mohammadi, M. (2000) Crystal Structure of a Ternary FGF-FGFR-Heparin Complex Reveals a Dual Role for Heparin in FGFR Binding and Dimerization, *Mol Cell.*, Sep;6(3):743-50.
- Shimizu, A. Tada, K. Shukunami, C. Hiraki, Y. Kurokawa, T. Magane, N. Kurokawa-Seo, M. (2001) A Novel Alternatively Spliced Fibroblast Growth Factor Receptor 3 Isoform Lacking the Acid Box Domain is Expressed during Chondrogenic Differentiation of ATDC5 Cells, *J. Biol. Chem.*, 276 11031–11040.
- Shimizu, A. Takashima, Y. Kurokawa-Seo, M. (2002) FGFR3 Isoforms have Distinct Functions in the Regulation of Growth and Cell Morphology, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 290 113– 120.
- Sibley, K. Stern, P. Knowles, M. A. (2001) Frequency of Fibroblast Growth Factor Receptor 3 Mutations in Sporadic Tumours, *Oncogene*, 20 4416– 4418.
- Suyama, K. Shapiro, I. Guttman, M. Hazan, R. B. (2002) A Signaling Pathway Leading to Metastasis is Controlled by N-cadherin and the FGF Receptor, *Cancer Cell*, Oct 2(4):301-14.

- UICC, (1978) TNM Classification of Malignant Tumors, Bladder, *Union Internationale Contre le Cancer*, Geneva.
- Van Rhijn, B. W. Lurkin, I. Radvanyi, F. Kirkels, W. J. van der Kwast, T. H. Zwarthoff, E. C. (2001), The Fibroblast Growth Factor Receptor 3 (FGFR3) Mutation is a Strong Indicator of Superficial Bladder Cancer with Low Recurrence Rate, *Cancer Res.*, 61 1265– 1268.
- Van Rhijn, B. W. Montironi, R. Zwarthoff, E. C. Jobsis, A. C. van der Kwast, T. H. (2002) Frequent FGFR3 Mutations in Urothelial Papilloma, *J Pathol.*, 198: 245–251.
- Van Rhijn, B. W. Van Tilborg, A. A. Lurkin, I. Bonaventure, J. De Vries, A. Thiery, J. P. van der Kwast, T. H. Zwarthoff, E. C. Radvanyi, F. (2002) Novel Fibroblast Growth Factor Receptor 3 (FGFR3) Mutations in Bladder Cancer Previously Identified in Non-Lethal Skeletal Disorders, *Eur. J. Hum. Genet.*, 10 819– 824.
- Vidrich, A. Buzan, J. M. Ilo, C. Bradley, L. Skaar, K. Cohn, S. M. (2004) Fibroblast Growth Factor Receptor-3 is Expressed in Undifferentiated Intestinal Epithelial Cells during Murine Crypt Morphogenesis, *Dev Dyn.*, May;230(1):114-23.
- Walsh, P. C. Retik, A. B. Stamey, T. A. Vaughan, E. D. (1998) Campbell's Urology, Seventh Edition, *W.B. Saunders Co.*, Philadelphia, 2329-2337
- Wang, Y. J. Shahrokh, Z. Vemuri, S. Eberlein, G. Beylin, I. Busch, M. (1996) Characterization, Stability, and Formulations of Basic Fibroblast Growth Factor Pearlman R, Wang Y. J (derleyenler) *Formulation and Characterization, and Stability of Protein Drugs*, New York, London, Plenum Press, s.141-180.
- Webster, M. K. Donoghue, D. J. (1997) FGFR Activation in Skeletal Disorders: Too Much of a Good Thing, *Trends Genet.*, 13(5):178-82.
- WHO, (1973) Histological Typing of Urinary Bladder Tumours, Int. *Histol. Classif. Tumours*.
- Williams, S. G. Stein, J. P. (2004) Molecular Pathways in Bladder Cancer, *Urol. Res.*, 32: 373–385
- Wuchner, C. Hilbert, K. Zabel, B. Winterpacht, A. (1997) Human Fibroblast Growth Factor Receptor 3 Gene (FGFR3): Genomic Sequence and Primer Set Information for Gene Analysis, *Hum Genet.*, Aug;100(2):215-9.

ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında Denizli`de doğdu. İlk ve orta öğrenimini sırasıyla Sümer İlkokulu ve Pamukkale Orta Okulu`nda yaptı. Lise öğrenimini Denizli Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi`nde tamamladıktan sonra, 2000 yılında Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü`nde lisans öğrenimine başladı.

2004 yılında Biyoloji Bölümü`nden mezun olduktan sonra, aynı yıl Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı`nda Yüksek Lisans öğrenimine başladı. Halen bu bölümde yüksek lisans çalışmalarına devam etmektedir.

