

Mesane Kanseri Tanılı Olgularda p53 Geni Mutasyon Analizi

p53 Gene Mutation Analysis in Cases with Bladder Cancer

Asuman ÖZGÖZ¹, Hale ŞAMLI¹, Mustafa SOLAK¹, Fatma AKTEPE²,
Mihrican AYDIN ÖZGÜR², Kutsal YÖRÜKOĞLU³

¹Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD, Afyonkarahisar

²Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji AD, Afyonkarahisar

³Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji AD, İzmir

ÖZET: p53 geni, insan malignitelerinin yaklaşık %50'sinde mutasyona uğrayan bir tümör supresör genidir. p53 geni, mesane kanserinde en fazla mutasyona uğrayan tümör supresör geni olma özelliğini taşımaktadır. Bu yüzden mesane kanserinin prognozunun belirlenmesinde önemli bir biomarker olabilir. Bu çalışmada, mesane kanseri teşhisi konmuş 22 olguya ait mesane tümör doku örneklerinden DNA izole edilip, PCR metoduyla 5. ve 7. ekson bölgeleri amplifiye edildikten sonra, enzim kesimi yapılarak 5. ve 7. eksonlarda p53 geni mutasyon analizi gerçekleştirilmiştir. Mutasyon analizi gerçekleştirilen olguların %45'inde p53 geni mutasyonu saptanmış olup, saptanan mutasyonların %60'ının 5. eksonda bulunan 175. kodonda, %40'ının ise 7. eksonda bulunan 249. kodonda olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: p53 geni, mesane kanseri, PCR, enzim kesimi.

ABSTRACT: p53 gene is a tumor suppressor gene mutated in approximately 50% of human malignities. p53 gene has the property of being the most mutated tumor suppressor gene in bladder cancer. Due to this, it may be an important biomarker in bladder cancer prognosis. In this study, DNA was isolated from bladder tumor tissue samples of 22 cases diagnosed to be bladder carcinoma. After then, 5th and 7th exons of p53 were amplified by PCR method and p53 mutation analysis was performed by enzyme restriction in 5th and 7th exons. In 45% of cases performed mutation analysis, p53 gene mutation was detected. 60% of mutations were in 5th exon, codon 175 and 40% of mutations were in 7th exon, codon 249.

Key Words: p53 gene, bladder cancer, PCR, enzyme restriction

GİRİŞ

İnsanda oluşan kanserlerde p53 geninin rolü göz ardı edilemez. Tüm insan malignitelerinin yaklaşık yarısı p53 geninde mutasyonlara sahiptir (1). p53 gen mutasyonları ile ilgili olarak birçok tümör tipinde önemli klinopatolojik korelasyonlar gösterilmiştir. Genitoüriner kanserlerde çoğunlukla p53 mutasyonları görülmemesine karşın, mesane ve prostat kanserlerinde p53 mutasyonlarına rastlamak mümkündür. p53 gen mutasyonlarının mesane kanserinin patogenezinde erken, diğer kanser tiplerinde geç olduğu bilinmektedir (2, 3).

Mesane transizyonel hücre karsinomu (TCC) prostat kanserinden sonra genitoüriner sistemin ikinci en yaygın malignite tipidir (4). Mesane kanserinde gözlenen süperfisyel tümörlerin nüks etmesi yaygındır ve bu tümörlerin %15'inden fazlası

nükslerinde muskularis propria invazyonu gösterecek ileri evreye geçmektedir. Kas invazyonuna sahip olgularda, sistektomiden sonra tümörün tamamının çıkarıldığı söylene de bu olgular nüks etme, ilerleme ve metastaz için hala yüksek risk altındadırlar. İlerlemiş düzeydeki hastalığın tedavisinde kemoterapi ve radyasyon uygulamalarından yeterli sonuçlar alınamamaktadır. Hastalığın tedavisini optimize etmek ve yaşam süresini artırmak için, nüks ve metastaz riski taşıyan hastalarda hastalığın tanımlanmasında ek parametrelere ihtiyaç vardır. Sonuçları hep aynı olmasa da, mesane kanserinde p53'ün potansiyel bir biomarker olduğu konusundaki çalışmalar, mesane tümörlerinde prognoz ile p53 mutasyonları arasında negatif bir korelasyon olduğunu göstermiştir (5-7).

Çalışmamızda mesane kanseri tanısı alan olgularda p53 gen mutasyon analizi gerçekleştirmek üzere, izole edilen DNA'lardan, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) metodu kullanılarak 5. ve 7. ekson amplifiye edildi. Bu eksonlarda bulunan en çok mutasyona uğrayan "hot spot" kodonlardan olan 175. ve 249. kodonlara yönelik mutasyonları saptamak üzere enzim kesimi yapıldı.

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

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu araştırmada Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi ve Dokuz Eylül Üniversitesi Üroloji Anabilim Dalları'nda mesane kanseri tanısı alan sırasıyla 9 ve 13 olgununun parafine gömülü mesane tümör doku kesitlerinden "ksilen-tuzla uzaklaştırma" metodu (parafinin uzaklaştırılması, yıkama, parçalama, saflaştırma, çöktürme, yıkama ve süspanse etme) uygulanarak genomik DNA'ları izole edildi (8). İzolasyonu takiben DNA'ların varlığı spektrofotometrik ölçüm ile doğrulandı. Elde edilen genomik DNA ile p53 geninin 5. ve 7. ekson bölgelerinin PCR metoduyla amplifiye edilmesi için, primerleri birlikte dizayn edilen 5-6. eksonlar ve 7. ekson için uygun PCR miksleri ve PCR koşulları oluşturuldu. 5. ve 6. ekson amplifikasyonu için 94 °C'de 7 dakika ilk denatürasyon, -35 döngü 94 °C'de 1 dakika denatürasyon, 55 °C'de 2 dakika bağlanma, 72 °C'de 2 dakika uzama- ve 72 °C'de 7 dakika son uzama; 7. ekson amplifikasyonu için 94 °C'de 7 dakika ilk denatürasyon, -35 döngü 94 °C'de 1 dakika denatürasyon, 55 °C'de 1 dakika bağlanma, 72 °C'de 1 dakika uzama- ve 72 °C'de 7 dakika son uzama olan PCR koşullarıyla programlanan thermal cycler'da amplifikasyona bırakıldı.

PCR uygulaması sonucunda, amplifikasyon ürünleri %2'lik agaroz jel elektrofeziyle, ΦX174 DNA/BsuRI (HaeIII) Marker, 9 kullanılarak kontrol edildi. Daha sonra p53 geninin 5. ve 6. eksonlarının amplifikasyon ürünü, 5. eksonun 175. kodonunda

CGC tanıma sekansı olan Hae II (Haemophilus aegyptius) enzimi ile muamele edildi. 5. ve 6. eksonların PCR amplifikasyon ürününün, mutasyon olmaması durumunda, Hae II ile kesildiğinde 163 ve 234 bazlık iki DNA parçasına ayrılması, mutasyon durumunda ise Hae II kesim noktası ortadan kalkacağı için 397 bazlık kesilmemiş tek parça DNA'nın görülmesi beklendi. p53 geninin 7. ekson PCR amplifikasyon ürünü ise, 7. eksonun 249. kodonunda GGCC tanıma sekansı olan Hae III (Haemophilus aegyptius) enzimi ile muamele edildi. 110 bp olan 7. ekson PCR ürününün, mutasyon olmaması durumunda, Hae III ile kesildiğinde 75 ve 35 bazlık iki DNA parçasına ayrılması, mutasyon durumunda ise Hae III kesim noktası ortadan kalkacağı için 110 bazlık kesilmemiş tek parça DNA'nın görülmesi beklendi. 5. ve 6. eksonların amplifikasyon ürününün Hae II enzimi, 7. ekson amplifikasyon ürününün Hae III enzimi ile muamelesi için, 1µl enzim, 1µl 10X M tamponu ve 8,5 µl PCR amplifikasyon ürünü 0,2 ml'lik steril ependorf tüpüne konulduktan sonra, 1 saat 37 °C etüvde inkübe edildi. İnkübasyon sonrası enzim aktivitesi 10X yükleme tamponu ile durduruldu. ΦX174 DNA/BsuRI (HaeIII) Marker, 9 kullanılarak, 5. ve 6. eksonların enzim kesim ürünü %2'lik agaroz jel, 7. ekson enzim kesim ürünü %10'luk (%5 gliserinli) poliakrilamid jel elektroforezinde yürütüldü. Sonuçlar UV transillüminatörde değerlendirildi.

BULGULAR

Çalışmamızda, mesane kanseri tanısı almış olgulara ait parafine gömülü mesane tümör dokusu örneği kullanıldı. Bu olgulara ait laboratuvar çalışma numaraları, olgu yaşı, cinsiyeti, tanısı, tümör evresi ve grade bilgileri Tablo 1.'de verilmiştir.

Tablo 1. Olgulara ait laboratuvar çalışma numaraları, olgu yaşı, cinsiyeti, tanısı, tümör evresi ve grade bilgileri

Olgu No	Yaş	Cinsiyet	Tanı	Evre	Grade
1	67	E	Ürotelyal Karsinom	Ta	1
2	77	E	Ürotelyal Karsinom	Ta	2
3	73	E	Ürotelyal Karsinom	T1	2
4	69	E	Ürotelyal Karsinom	Ta	1
5	63	E	Ürotelyal Karsinom	T2	3
6	55	E	Ürotelyal Karsinom	Ta	1
7	71	E	Ürotelyal Karsinom	Ta	1
8	74	K	Ürotelyal Karsinom	T1	3
9	57	K	Ürotelyal Karsinom	T1	2
10	59	E	Ürotelyal Karsinom	T3	2
11	63	E	Ürotelyal Karsinom	T1	3

Olgu No	Yaş	Cinsiyet	Tanı	Evre	Grade
12	71	E	Ürotelyal Karsinom	Ta	1
13	77	E	Ürotelyal Karsinom	T1	3
14	77	E	Ürotelyal Karsinom	Ta	2
15	55	E	Ürotelyal Karsinom	T1	3
16	74	E	Ürotelyal Karsinom	T1	3
17	72	K	Ürotelyal Karsinom	T1	2
18	60	E	Ürotelyal Karsinom	Ta	2
19	72	E	Ürotelyal Karsinom	T2	2
20	57	E	Ürotelyal Karsinom	T1	3
21	57	E	Ürotelyal Karsinom	Tis	
22	65	E	Ürotelyal Karsinom	T1	2

E: Erkek, **K:** Kadın, **Tis:** Karsinoma in situ, **Ta:**Non-invaziv papiller karsinom, **T1:** Epitel altı bağ dokuya tümör invazyonu var (T1a; lamina propriada yüzeysel invazyon, T1b; lamina popriada muskularis mukoza seviyesine kadar invazyon, T1c; lamina prioriada muskularis mukozanın invazyonu) **T2:** Kas invazyonu var (T2a;1/2 üst kısım kas invazyonu, T2b; 1/2 alt kısım kas invazyonu) **T3;** Perivezikal yağ doku tutulumu, makroskobik (ekstra vezikal kitle).

Ekson 7 için kurulan PCR sonucunda 7, 8, 9, 12, 13, 14 ve 16 nolu olgulara ait örneklerde DNA miktarlarındaki yetersizlik nedeniyle amplifikasyon gerçekleşmedi.

Mutasyon analizi için PCR sonucunda elde edilen amplifikasyon ürünlerine uygulanan enzim kesimi sonuçları Tablo 2’de verildi.

Tablo 2. Olgulara ait DNA izolasyon, PCR ve enzim kesim sonuçları.

Olgu No	Exon 5-6 Amplifikasyonu	Exon 7 Amplifikasyonu	Exon 5 Mutasyon (Hae II Enzim Kesimi ile)	Exon 7 Mutasyon (Hae III Enzim Kesimi ile)
1	+	+	Yok	Yok
2	+	+	Yok	Yok
3	+	+	Var	Yok
4	+	+	Yok	Yok
5	+	+	Var	Yok
6	+	+	Var	Yok
7	+	-	Var	AY
8	+	-	Var	AY
9	+	-	Var	AY
10	+	+	Yok	Yok
11	+	+	Yok	Yok
12	+	-	Yok	AY
13	+	-	Yok	AY
14	+	-	Yok	AY
15	+	+	Yok	Yok
16	+	-	Yok	AY
17	+	+	Yok	Var
18	+	+	Yok	Var
19	+	+	Yok	Yok
20	+	+	Yok	Var
21	+	+	Yok	Yok
22	+	+	Yok	Var

AY: Amplifikasyon Yok

TARTIŞMA

Mesane kanserine neden olan bazı risk faktörlerinin bu kanser türünde, gözlenen mutasyonların yerini, sıklığını ve türünü etkilediği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (9-11).

p53 mutasyonlarının yaklaşık %87'si 5-8. eksonlarda ve %75'i G:C çiftlerinde oluşurken, mutasyon tiplerinin frekansı kanser türüne özgüdür (12). Ayrıca başka bir çalışmada p53 genindeki mutasyonların %28 kadarının evrimsel olarak korunmuş olan 5-8. eksonların dışındaki eksonlarda olduğu bildirilmiştir (13).

Literatürde p53 geninin 5. eksonunda gözlenen mutasyon sıklığının %14-32 olduğu tespit edilmiştir (14, 15-17). Bu çalışmada p53 geninin 5. eksonunda saptanan mutasyon oranı ise %27 kadardır.

Yapılan çalışmalarda p53 geninin 7. eksonunda gözlenen mutasyon sıklığının ise %5,25-44,5 olduğu tespit edilmiştir (14, 15-17). Bu çalışmada p53 geninin 7. eksonunda saptanan mutasyon oranı ise %36'dır. Elde edilen bu sonuç literatürle uyumlu olmakla birlikte, 7. ekson için kurulan PCR sonucunda, olgulara ait DNA örneklerinin hepsinde amplifikasyon elde edilemediği göz önünde bulundurulursa bazı çalışmalara göre yüksek bulunabilecek olan bu oranın normal olduğu düşünülebilir.

p53 geni yaklaşık olarak mesane tümörlerinin %40'ında mutasyona uğramıştır (9). Bununla birlikte, Lin ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada çalışmaya dahil edilen TCC'li olguların %67'sinde p53 mutasyonları saptanmıştır (18). Bu çalışmada ise toplam 22 olgunun 10'unda olmak üzere %45'lik p53 geni mutasyonu gözlenmiştir. Elde edilen bu sonuç literatürle uyum göstermektedir.

Çalışmaya dahil edilen 22 olgunun 19'unun erkek 3'ünün kadın olması, mesane kanserinin erkeklerde görülme oranının kadınlara göre daha yüksek olduğunu doğrular niteliktedir. Nitekim Lin ve arkadaşlarının yaptığı 11 yıllık çalışma sonucu, çalışmaya dahil ettikleri 75 olgunun 54 erkek, 21 kadından oluşması bu yönde uyum göstermektedir (18). Çalışılan 19 erkek olguda gözlenen p53 mutasyon oranı %36,8 iken 3 kadın olguda %100 olarak saptanmıştır. Bu sonuç kadınlarda görülen mesane kanserlerinde p53 mutasyon oranının erkeklerde görülen mesane kanserlerine oranla daha yüksek olduğunu düşündürülebilir ancak çalışmaya dahil edilebilen olgu sayısının ve bu gruptaki kadın hasta sayısının az olması nedeniyle bunu söylemek zordur. Böyle bir farklılığı araştırmaya yönelik daha geniş katımlı çalışmalara gereksinim vardır. Mesane tümör-

lerinin ortalama görülme yaşı 65 olmakla birlikte, 60 yaşından sonra görülme sıklığı artmaktadır (19). Bu çalışmaya dahil olan olguların ortalama yaşı 66,6 olup, olguların %68'i 60 yaşın üzerindedir. 50-60 yaş aralığındaki olgularda saptanan p53 mutasyon oranı %57, 61-70 ve 71-80 yaş aralığındaki olgularda saptanan p53 mutasyon oranı %40 olarak bulunmuştur.

Romero ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, mesane kanserindeki p53 mutasyonunun grade 2 ve grade 3 tümörlerde daha sık olduğunu tespit etmişlerdir (20). Bu çalışmada da grade 2 ve grade 3 tümörlerde saptadığımız mutasyon oranı %80'dir.

Literatürde, mesane kanserinde, mutasyon sayısı, tümör invazyon derinliği ve evre arasında bir korelasyon söz konusudur (21-23). Romero ve arkadaşlarının çeşitli tümör tipleriyle yaptıkları çalışmada Ta evre tümörlerde %30,3, T2 evre tümörlerde ise %63,2 oranında, yine aynı grubun yüzeysel tümörlerde yaptığı başka bir çalışmada ise T1 evre tümörlerde yüksek oranda mutasyon saptanmıştır (20, 23).

LaRue ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada mesane kanserinde mutasyonların %68,8'i T1 evre tümörlerde, %31,3'ü Ta evre tümörlerde gözlenmiştir (12).

Bu çalışmada, Ta evre tümörlerde mutasyon oranı %37,7 ve T1 evre tümörlerde mutasyon oranı ise %42,9'dur. Diğer tümör evrelerine sahip örneklerin sayısı, yüzde oranı hesaplamak için yetersizdir.

p53 mutasyonlarının mesane kanserinde insidansının yüksek oluşu ve patogenezinin erken oluşması, p53 mutasyonlarının hastalığın kliniğinin belirlenmesi ve tedavinin yönlendirilmesinde faydalı bir prognostik faktör olabileceği görüşünü desteklemektedir.

Yaş aralığına göre olgu sayısı ve mutasyonlu olgu sayıları karşılaştırıldığında; en fazla olgunun 51-60 yaş aralığında görülmesine rağmen mutasyonlu olgu sayısı en fazla 71-80 yaş aralığında görüldü. Bu yaş aralığındaki mutasyon yüzdesi %45,5 olarak saptandı.

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

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

KAYNAKLAR

1. Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, 1997; 88(3): 323-331.
2. Hollstein M, Rice K, Greenblatt MS, et al. Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res*, 1994; 22(17): 3551-3555.
3. DeWolf WC. p53: an important key to understanding urologic cancer. *AUA Update Series*, 1995; 15: 258.
4. Smith ND, Rubenstein JN, Eggner SE, et al. The p53 Tumor Suppressor Gene and Nuclear Protein: Basic Science Review and Relevance in the Management of Bladder Cancer (Clinical Urology: Review Article). *J Urol*, 2003; 169(4): 1219-1228.
5. Vet JA, Witjes JA, Marras SA, et al. Predictive value of p53 mutations analyzed in bladder washings for progression of high-risk superficial bladder cancer. *Clin Cancer Res*, 1996; 2(6): 1055-1061.
6. Zlotta AR, Noel J-C, Fayt I, et al. Correlation and prognostic significance of p53, p21WAF1/CIP1 and Ki-67 expression in patients with superficial bladder tumors treated with bacillus Calmette-Guerin intravesical therapy. *J Urol*, 1999; 161(3): 792-798.
7. Fleshner N, Kapusta L, Ezer D, Herschorn S, Klotz L. p53 nuclear accumulation is not associated with decreased disease-free survival in patients with node positive transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol*, 2000; 164(4): 1177-1182.
8. Shiao YH, Ruge M, Correa P, Lehmann HP, Scheer WD. p53 alteration in gastric precancerous lesions. *Am J Pathol*, 1994; 144(3): 511-517.
9. Moore LE, Smith AH, Eng C, et al. p53 alterations in bladder tumors from arsenic and tobacco exposed patients. *Carcinogenesis*, 2003; 24(11): 1785-1791.
10. McCredie M, Stewart JH, Ford JM, et al. Phenacetin-containing analgesics and cancer of the bladder or renal pelvis in women. *Br J Urol*, 1983; 55(2): 220-224.
11. Piper JM, Tonocia J, Matanoski GM. Heavy phenacetin use and bladder cancer in women aged 20 to 49 years. *N Engl J Med*, 1985; 313(5): 292-295.
12. LaRue H, Allard P, Simoneau M, et al. p53 point mutations in initial superficial bladder cancer occur only in tumors from current or recent cigarette smokers. *Carcinogenesis*, 2000; 21(1): 101-106.
13. Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis (Review). *Cancer Res*, 1994; 54(18): 4855-4878.
14. Sidransky D, von Eschenbach A, Tsai YC, et al. Identification of p53 gene mutations in bladder cancers and urine samples. *Science*, 1991; 252(5006): 706-709.
15. Yoshimura I, Kudoh J, Saito S, Tazaki H, Shimizu N. p53 gene mutation in recurrent superficial bladder cancer. *J Urol*, 1995; 153(5): 1711-1715.
16. Taylor JA, Li Y, He M, et al. p53 mutations in bladder tumors from arylamine-exposed workers. *Cancer Res*, 1996; 56(2): 294-298.
17. Xu X, Stower MJ, Reid IN, Garner RC, Burns PA. Molecular screening of multifocal transitional cell carcinoma of the bladder using p53 mutations as biomarkers. *Clin Cancer Res*, 1996; (10): 1795-1800.
18. Lin HY, Huang CH, Wu WJ, Chou YH, Fan PL, Lung FW. Mutation of the p53 tumor suppressor gene in transitional cell carcinoma of the urinary tract in Taiwan. *Kaohsiung J Med Sci*, 2005; 21(2): 57-64.
19. http://www.akdeniz.edu.tr/tip/web/ders_form/UROLOJI/baykara_mesane.htm Erişim 20.06.2005
20. Lorenzo Romero JG, Salinas Sanchez AS, Gimenez Bachs JM. p53 Gene mutations in superficial bladder cancer. *Urol Int*, 2004; 73(3): 212-218.
21. Oyasu R, Nan L, Szumel RC, Kawamata H, Hirohashi S. p53 gene mutations in human urothelial carcinomas: analysis by immunohistochemistry and single-strand conformation polymorphism. *Mod Pathol*, 1995; 8(2): 170-176.
22. Phillips H.A., Howard G.C., Miller W.R. p53 mutations as a marker of malignancy in bladder washing samples from patients with bladder cancer. *Br J Cancer*, 2000; 82(1): 136-41.
23. Lorenzo Romero JG, Salinas-Sanchez AS, Gimenez-Bachs JM, et al. Prognostic implications of p53 gene mutations in bladder tumors. *J Urol*, 2003; 169(2): 492-499.

