

T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

KROMOZOM 8 KAZANCI VE C-MYC'GEN
AMPLİFİKASYONUNUN PROSTAT KANSERİ
PROGNOZUNDAKİ YERİ VE ÖNEMİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

118833

TC YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

EBRU ETEM

ELAZIĞ-2002

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Halit OCAL

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Yüksek Lisans Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Halit ELYAS

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Halit ELYAS

Danışman

Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Halit ELYAS

Prof. Dr. Halit KETİCİ

Doç. Dr. Halit CANATAN

Nusret Arıpolat

Hüseyin Yüce

Prof. Dr. Halit KETİCİ

Doç. Dr. Halit CANATAN

Nusret Arıpolat

Hüseyin Yüce

TEŞEKKÜRLER

Yüksek lisans öğrenimim süresince emeklerini esirgemeyen ve çalışmalarında beni destekleyen başta danışman hocam Prof. Dr. Halit ELYAS olmak üzere, Doç. Dr. Halit CANATAN, Yrd. Doç. Dr. Hüseyin Yüce ve Yrd. Doç. Dr. Haluk Akın'a, tez çalışmam sırasında bilgilerinden faydalandığım Doç.Dr. Yasemin AÇIK hanıma, çalışmalarında bana yardımcı olan M.Sc. Deniz Erol'a ve tüm yaşamım boyunca beni her konuda maddi ve manevi olarak destekleyen aileme teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER

1. ÖZET.....	1
2. ABSTRACT.....	3
3. GİRİŞ.....	4
3.1 DNA'nın yapısı ve Organizasyonu.....	4
3.2 İnsan Genomu.....	5
3.3 İnsan Gen Ekspresyonu.....	7
3.4 Mutasyonlar.....	7
3.5 Kanser.....	8
3.5.1 Onkogenler.....	9
3.3.1.1 Büyüme Faktörleri.....	9
3.3.1.2 Büyüme Faktör Reseptörleri.....	10
3.3.1.3 Hücre İçi İleticiler.....	10
3.3.1.4 Nükleer Transkripsiyon Faktörleri.....	11
3.5.2 Tümör Süpressör Genler.....	13
3.5.3 Mutator Genler.....	14
3.6 Metastaz Biyolojisi.....	15
3.6.1 Tümör Hücrelerinin Çevresi ile Bağlantılarını Koparması.....	15
3.6.2 Bazal Membranı Geçmeyi ve Ekstrasellüler Matriks İçinde İlerlemeyi Sağlayan Enzimler.....	17
3.6.2.1 Matriks Metalloproteinazların (MMP) Salınması.....	17
3.6.2.2 Urokinaz Plasminojen Aktivatör/Urokinaz Plasminojen Aktivatör Reseptör Sistemi (uPA/uPAR).....	17

3.6.2.3 Katepsin B.....	18
3.6.3 Tümör Hücrelerinin Kan veya Lenf Damarları İçine Girmesi.....	19
3.6.4-5 Dolaşımında Canlı Kalma.....	20
3.6.6 Kemik Metastazları.....	20
3.6.7 Angiogenesis.....	22
3.7 Prostat.....	23
3.7.1 Anotomisi.....	23
3.7.2 Histolojisi.....	24
3.8 Prostat Kanseri.....	25
3.8.1 Doğal Seyri.....	25
3.8.2 İnsidans.....	26
3.8.3 Etiyolojisi.....	26
3.8.3.1 Genetik Yatkınlık.....	26
3.8.3.2 Hormonal Etkiler.....	27
3.8.3.3 Diyetik ve Çevresel Faktörler.....	36
3.8.3.4 Enfeksiyon Ajanları.....	37
3.8.3.5 Patolojisi.....	37
3.8.5.6 Prostat Adenokarsinomunun Kromozomal Temeli.....	39
4. GEREÇ VE YÖNTEM.....	41
4.1 FISH Tekniği ve Patolojik Boyamalarda Kullanılan Preparatların Hazırlanması.....	41
4.1.1 FISH Tekniğinde Kullanılacak Preparatların Hazırlanması.....	41
4.1.2 Patolojik Boyama Yapılan Preparatların Hazırlanması.....	42

4.2 Patolojik Boyama Teknikleri.....	43
4.2.1 MGG(My Grunwald-Giemsa) Yöntemi.....	43
4.2.2 PAP (Papanicolaou Gynaekologie) Yöntemi.....	44
4.3 FISH (fluoresans in situ hibridizasyon) Tekniği.....	46
4.4 İstatistik Analizler.....	50
5. BULGULAR.....	51
4.1 Anomalilerin Ortaya Konması İçin FISH Kriterleri.....	51
6. TARTIşMA.....	62
7. KAYNAKLAR.....	75
8. ÖZGEçMİş.....	83



ŞEKİL LİSTESİ

ŞEKİL 1: DNA molekülünün kromozom olarak paketlenmesi.....	6
ŞEKİL 2: Prostat bezinin kesiti.....	25
ŞEKİL 3: Androjenler tarafından düzenlenen genler.....	30
ŞEKİL 4 (A-F): PK, PIN ve BPH'li hastaların doku örneklerinden FISH yöntemiyle kromozom 8 ve C-MYC geni için belirlenen aberasyonların floresans mikroskopta görünümü.....	59-61



TABLO LİSTESİ

TABLO 1: PIN'lerde hücrelerin %20'sinden daha fazlasında görülen sinyal sayılarının dağılımı.....	54
TABLO 2: Adenokarsinomlarda hücrelerin %70'inden daha fazlasında görülen sinyal sayılarının dağılımı.....	54
TABLO 3: Adenokarsinomlarda, hücrelerdeki ortalama sinyal sayısı temel alındığında C-MYC ve kromozom 8 kazancı dağılımları.....	55
TABLO 4: PIN'lerde, hücrelerdeki ortalama sinyal sayısı temel alındığında C-MYC ve kromozom 8 kazancı dağılımları.....	55
TABLO 5: Hastaların (Adenokarsinom) patolojik tanı, C-MYC gen amplifikasyonu, kromozom 8 kazancı ve C-MYC ekstra kopya sayısı dağılımları.....	56
TABLO 6: Hastaların (PIN) patolojik tanı, C-MYC gen amplifikasyonu, kromozom 8 kazancı ve C-MYC ekstra kopya sayısı dağılımları.....	56

KISALTMALAR LİSTESİ

- ADT: Androgen Deprivation Therapy (Androjen Yokluk Terapisi)
- AKT: Protein Kinase B/PKB (Protein Kinaz B)
- AMF: Autocrine Motility Factor (Otokrin Hareketlilik Faktörü)
- AR: Androgen Receptor (Androjen Reseptörü)
- ARE: Androgen Responsible Element (Androjen Cevap Elementi)
- BFGF: Basic Fibroblast Growth Factor (Basit Fibroblast Büyüme Faktörü)
- BPH: Benign Prostatic Hiperplasia (Benign Prostatik Hiperplazi)
- CDK: Cycline Dependent Kinase (Siklin Bağımlı Kinaz)
- DHT: Dihidrotestosterone (Dihidrotestesteron)
- DNA: Deoxiribonucleic Acid (Deoksiribonükleik Asit)
- ECM: Extracellular Matrix (Ekstrasellüler Matriks)
- EGF: Epidermal Growth Factor (Epidermal Büyüme Faktörü)
- EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor (Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü)
- ER: Estrogen Receptor (Östrojen Reseptörü)
- ET: Endothelin (Endotelin)
- FISH: Fluorescence *in situ* Hybridization (Floresans *in situ* Hibridizasyon)
- GRP: Gastrin- Releasing Peptit (Gastrini Serbestleştiren Peptid)
- HS: Heparan Sulfate (Heparan Sülfat)
- IGFBP: Insuline-Like Growth Factor Binding Protein (İnsüline Benzer Büyüme Faktörüne Bağlanan Protein)
- ILGF: Insuline-Like Growth Factor (İnsüline Benzer Büyüme Faktörü)
- ILK: Integrin Linked Kinase (İntegrin Bağımlı Kinaz)

KGF: Keratinocyte Growth Factor (Keratinosit Büyüme Faktörü)

LOH: Loss of Heterozygosity (Heterozigositenin Kaybı)

MAP: Mitogen-Activated Kinase (Mitojenlerle Aktive Edilen Proteinkinaz)

MMP: Matrix Metalloproteinase (Matriks Metalloproteinaz)

NE: Neuroendocrine (Nöroendokrin)

OPG: Osteoprotegerin

PAI: Plasminogen Activator Inhibitor (Plasminojen Aktivatör İnhibitörleri)

PDGF: Platelet Derived Growth Factor (Platelet Kökenli Büyüme Faktörü)

PK: Protein Dependent Kinase (Protein Bağımlı Kinaz)

PIP₃: Phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphate (Fosfatidilinozitol 3,4,5 trifosfat)

PIN: Prostatic Intraepithelial Neoplasia (Prostatik İntraepitelyal Neoplazi)

PK: Prostate Cancer (Prostat Kanseri)

PLG: Plasminogen (Plasminojen)

PSA: Prostate Specific Antigen (Prostat Spesifik Antijen)

PTHrP: Parathormon Related Peptide (Parathormon Hormon İlgili Peptid)

RANK: Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B (Nükleer Faktör- κ B'nin Reseptör Aktivatörü)

RANKL: Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B Ligand (Nükleer Faktör- κ B Ligandın Reseptör Aktivatörü)

SF/HGF: Scatter Factor/Hepatosite Growth Factor (Dağılma Faktörü/Hepatosit Büyüme Faktörü)

STAT: Signal Transducers and Activators of Transcription (Sinyal İleticileri ve Transkripsiyon Aktivatörleri)

T: Testosterone (Testesteron)

TCR: T Cell Receptor (T Hücre Reseptörü)

TGF: Transforming Growth Factor (Transforme Edici Büyüme Faktörü)

TNF: Tumor Necrosis Factor (Tümör Nekrozis Faktör)

TSP-1:Thrombospondin-1 (Trombospondin-1)

UPA: Urokinase Plasminogen Activator (Urokinaz Plasminojen Aktivatör)

UPAR:Urokinase Type Plasminogen Activator Receptor (Urokinaz Plasminojen Aktivatör Reseptörü)

NOT: Gen adları büyük harflerle, kodladıkları proteinler küçük harflerle ifade edilmiştir.

1. ÖZET

Prostat kanserinin klinik gidişatı oldukça kompleksir ve tümörögenenezisin temelini oluşturan genetik faktörler çok az anlaşılmıştır. Son zamanlarda, sitogenetik ve moleküler genetik çalışmalar C-MYC geninin lokalize olduğu band 8q24'ün özellikle ilerlemiş ve rekürrent prostat kanserlerinde yaygın olarak amplifiye olduğunu göstermiştir.

İnterfaz hücrelerinde Flouresans *in situ* hibridizasyon (FISH) geleneksel sitogenetik metotların tespit etmede zorlandığı kromozomal değişimlerin tespitine izin vermektedir. FISH tekniği kullanılarak 9 adenokarsinom, 6 prostatik intraepitelial neoplazi (PIN) ve 9 benign prostatik hiperplazi (BPH)'den oluşan 24 örneğin tamamı incelendi. İnterfaz-FISH metodu kromozom 8 için sentromerik proba ve C-MYC için lokus spesifik proba yapıldı.

Adenokarsinomların %88.8'inde tanımlanan kromozom 8 kazancının metastatik prostat kanseriyle beraberliğini gösterdik ($p<0.04$). C-MYC gen amplifikasyonu adenokarsinomların %11.1'inde bulundu, ama PIN ve BPH'li vakalarda tespit edilemedi. PIN ve karsinomada en sık görülen anomali kromozom 8 kazancıdır ve bu anomalinin varlığıyla yüksek Gleason Skoru güçlü olarak paralellik gösterir.

C-MYC geninin overekspresyonunda temel mekanizmanın amplifikasyon olmayabileceğine inanmaktayız. Sonuçlarımız C-MYC gen overekspresyonunda temel mekanizmanın basit kromozom 8 kazancı veya 8q kazancı olabileceğini göstermektedir. Sonuçlarımız, "PIN muhtemelen karsinomanın prokürsörüdür" diyen diğer yazarların bulguları ile tutarlıdır.

Anahtar kelimeler: prostat kanseri, gen amplifikasyonu, FISH, C-MYC



2. ABSTRACT

The clinical course of the prostate cancer is highly complex and genetic factors underlying tumorigenesis are poorly understood. Recently, cytogenetic and molecular biological studies have identified the band 8q24, where C-MYC gene located is commonly amplified in prostate cancer, especially in advanced and recurrent ones.

Fluorescence in situ hybridization (FISH) technique of interphase cells allows the detection of chromosomal alterations which are difficult to evaluate using conventional cytogenetic methods. We examined a total of 24 specimens, including 9 adenocarcinoma, 6 prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) and benign prostatic hyperplasia (BPH) by FISH. Interphase-FISH method was performed with locus specific probe for C-MYC and centromeric probe for chromosomes 8.

Gain of chromosome 8 identified in 88.8% of adenocarcinomas was associated in metastatic prostate cancer ($p < 0.04$). C-MYC gene amplification was found in 11.1% of adenocarcinoma, but never detected cases of PIN and BPH. The most frequent anomaly in PIN and carcinoma was a gain of chromosome 8, and the presence of this anomaly strongly correlated with high Gleason Score.

We believe that basic mechanism in overexpression of C-MYC gene may not be amplification. Our results indicate that basic mechanism of C-MYC gene overexpression may be gain of simple chromosome 8 or gain of "8q". Our results agree with findings of other authors that PIN is probably a precursor of carcinoma.

Key words: prostate cancer, gene amplification, FISH, C-MYC

3.GİRİŞ

3.1 Deoksiribonükleik Asit (DNA)'lerin Yapısı ve Organizasyonu

Bütün canlılar bir veya daha fazla hücreden meydana gelmişlerdir. Hücre, canlının yaşama ve çoğalma yeteneğindeki en küçük birimdir. Ökaryotik canlılar genetik materyallerini nükleus adı verilen zarla çevrili bir kompartımanda taşırlar ve genetik materyal olan DNA nükleusta bulunmaktadır. Hücrenin interfaz evresinde nükleusta 4 bölge ayrıt edilir. Bunlar nükleus zarı, nükleus plazması, kromatin ağı ve nükleolusdur. Nükleus plazması nükleus zarı tarafından çevrilmiş olup kromatin ağı ve nükleolus dışında kalan sahayı doldurur. RNA, protein, lipid benzeri maddeleri içerir (6). İnterfaz nükleusunda DNA kromatin ağı halinde bulunmaktadır. Genetik bilgi DNA molekülünde yazılıdır. DNA'lar nükleusta kromozomlar halinde bulunmaktadır. Bir DNA molekülü biri diğeri ile saat yönünde sarmal yapan iki iplikten oluşmaktadır. Bu iki ipliğin oluşturduğu sarmal merdivendeki basamaklar, bazın içerdiği halka sayısına göre pürin (adenin ve guanin çift halkalı) ve pirimidin (sitozin ve timin tek halkalı) diye adlandırılan 4 tür organik baz çiftinden oluşmaktadır. Pürin bazları sadece pirimidin bazları ile hidrojen bağı kurabilirler. Bu nedenle adenin yalnızca timin ve guanin yalnızca sitozele bağı oluşturabilir. Adenin ile timin arasında iki ve guaninle sitozele arasında üç hidrojen bağı bulunmaktadır. Pürin veya pirimidin bazlarının 5 karbonlu bir şeker olan deoksiribozla birleşmesiyle deoksinükleozid ve nükleozid yapısına bir fosfat grubunun katılmasıyla deoksiribonükleotid oluşmaktadır. Polimer şeklindeki DNA'nın oluşması için bir nükleotidin şeker halkasının 5' karbon atomuna bağı fosfat grubu (PO_4^{-3}) ile diğeri bir nükleotidin şeker halkasının 3' karbon atomu arasında kovalent bir bağı oluşması gerekmektedir. 5'-3' yönündeki bu bağlar fosfodiester bağı olarak adlandırılmaktadır. DNA heliksinin çapı 2 nm olup sarmal yapı 10 nükleotitde bir

tekrarlanmaktadır. İki iplik antiparaleldir ve bazlar çift sarmalın eksenine doğru olduğu halde şeker-fosfat zinciri eksenin dışına doğrudur (89).

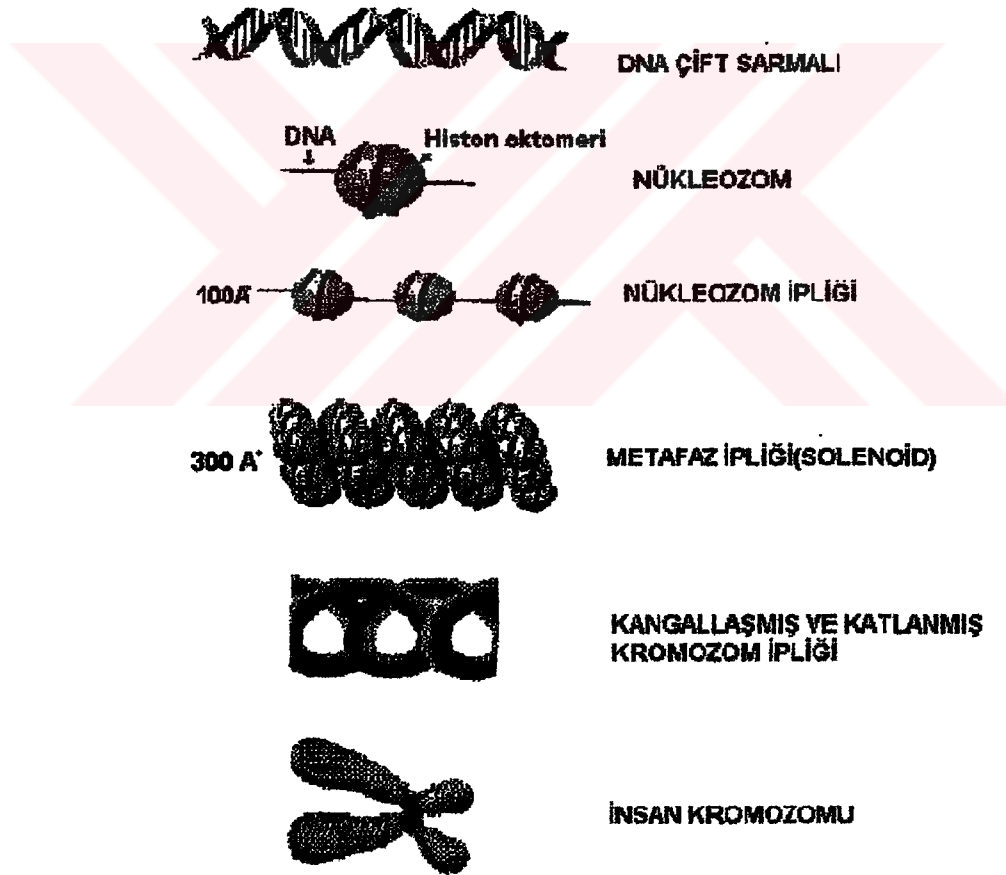
İnterfaz nükleusundaki kromatin yapısı DNA, RNA, histon (bazik proteinler) ve histon olmayan proteinlerden (asidik proteinler) oluşmaktadır. H1, H2a, H2b, H3 ve H4 olmak üzere 5 sınıfa ayrılan histon proteinlerden H2A, H2B, H3 ve H4 histonlarının bir araya gelerek oluşturdukları 8 molekül histon içeren oktomerik yapıya histon kor partikülü denmektedir. Histon kor partikülü ve onun etrafında yaklaşık 2 tam dönüş yapan 146-200 baz çifti uzunluğundaki DNA iplikçığı ve histon kor partikülüne giren ve çıkan DNA iplikçığını perçinleyen H1 histonunun katılımıyla oluşan 110Å^o çapındaki yapı *nükleozom* adını almaktadır (6). Nükleozomları birbirine bağlayan DNA 15-100 nükleotid çifti uzunluğundadır. Nükleozomlardan oluşan iplikçik 6 nükleozomun katılımıyla gerçekleşen dönüşler yaparak solenoid yapıyı yada kromatin fiberini oluşturmaktadır. Kromatin fiberinin çapı 300Å^o'dur. Mitoz yada mayoz bölünme sırasında, kromatin fibere histon olmayan skaffolt adı verilen proteinlerin katılımıyla laemli lop yapısı oluşmaktadır. Laemli lop yapısının daha ileri katlanmalarıyla 0,6 µm çapında kromatid oluşmaktadır (Şekil 1) (14, 89).

3.2 İnsan Genomu

İnsan genomu, insan hücrelerindeki DNA içeriği olarak tanımlanabilir. Hücreler bu açıdan nükleer genom ve mitokondrial genomu içermektedirler. Hücrenin toplam genomunun ancak %0,5'ini oluşturan ve maternal olarak kalıtılan mitokondrial genom, mitokondrilerdeki ribozomlar üzerinde translasyona uğrayan mRNA'ları kodlamaktadır. Mitokodrial proteinlerin büyük kısmı nükleer genom kodları ile sitoplazmik

ribozomlarda sentezlenmektedir. Nükleer genom, kromozom bant teknikleriyle kolayca ayrılabilir 2 seks ve 22 otozom kromozomu kapsamaktadır (89).

Kromozom uçlarında yer alan telomerler liner DNA'nın replikasyonunda, nükleus zarına kromozomların tutunmasında, kromozomlar arasında normal şartlarda canlı aleyhine olabilecek rekombinasyonların ve füzyonların engellenmesinde görevlidirler. Telomerler kromozomların stabilitesini sağlamak için telomer lopunun oluşumunu gerçekleştirirler (12).



ŞEKİL 1: DNA molekülünün kromozom olarak paketlenmesi (6).

3.3 İnsan Gen Ekspresyonu

Genomda fonksiyonel birimler olarak iş gören belirli uzunluktaki DNA dizileri özel polipeptidleri veya RNA'ları kodlamaktadır. *Gen* adı verilen bu diziler yapısal proteinler ve olgun RNA ürünlerini oluşturmaktadır. İnsan genomu yaklaşık olarak 35 000 gen içermektedir. Genlerin ekspresyonu ve ekspresyonu düzenlemek için kullanılan kontrol mekanizmalarının en önemlileri farklı transkripsiyon faktörleri, multigenik transkripsiyon unitleri, alternatif promotorlar, alternatif splicing, alternatif poliadenilasyon ve post-transkripsiyonel kesim olup bu kontrol mekanizmalarıyla bir genden farklı polipeptitlerin sentezlenmesi gerçekleşebilir (89).

3.4 Mutasyonlar

Genler, normal şartlar altında yukarıda bahsedilen mekanizmalarla doku spesifik ekspresyonlarını mükemmel şekilde gerçekleştirirler. Ancak insan genomundaki DNA tam olarak stabil değildir. Mutasyonlar, dış çevrede veya intrasellüler çevrede meydana getirilen *mutajen* olarak adlandırılan etkenlere DNA'nın maruz kalmasıyla oluşmaktadır. Ancak mutasyonların çoğu DNA replikasyonu ve onarımındaki spontan hatalar şeklinde olup endojen kaynaklıdır. Bu şekilde meydana gelen hataların çoğu DNA tamir mekanizmalarıyla onarılmaktadır. Kansere neden olan mutasyonlar özellikle intragenik DNA dizilerinde (ekzonlar, intronlar ve regülatör diziler) meydana gelmektedir. Bu dizilerde meydana gelen mutasyonlar 3 şekilde gerçekleşmektedir. Baz substitüsyonu tek bir bazın değişimi şeklinde gerçekleşmektedir. Aynı tip bazların yer değiştirmesine transisyon, farklı tip bazların yer değiştirmesine transversiyon denmektedir. Delesyon bir veya daha fazla nükleotidin aradan çıkması şeklinde

gerçekleşmektedir. İnsersiyon ise bir veya daha fazla nükleotidin bir dizi içine yerleşmesidir. Bir gendeki mutasyon kendini fenotipte iki şekilde ortaya koymaktadır. İlk olarak, oluşan ürün ya normal fonksiyonunu tamamen kaybetmiştir yada azalmıştır. İkinci olarak, normal dışı fonksiyona sahip bir ürün oluşmaktadır (89).

3.5 Kanser

Kanser terimi tek bir hastalık adı olmayıp temel nedeni, kontrolsüz büyüme olan habis (malign) tümörlerin tümüne verilen bir addır ve hücre çoğalması sonucu bir kitle (neoplazma) haline gelmektedir. Kanserde temel sorun, hücre çoğalmasındaki kontrolün kaybolmasıdır ve çoğalma ya da büyüme, genlerin kontrolü altında olduğuna göre genetik faktörler tüm kanser türlerinde etkilidir. Bazı kanser türlerinde primer faktör olarak anormal bir gen sorumlu tutulurken diğer bazı kanserlerde çevresel faktörler sorumlu tutulmaktadır. Kansere hangi faktör neden olursa olsun tüm kanser türlerinin somatik hücrelerdeki mutasyon yada mutasyonlar sonucu oluştuğu ve mutasyonların da bir seri genin ekspresyonunu etkilediği bilinen bir gerçektir (6).

Her tümör, hücrel DNA molekülündeki bir yada daha fazla mutasyon sonucu ortaya çıkmaktadır. Bu şekildeki mutasyonları içeren hücreler 2 yolla malign bir tümör oluşturabilirler. İlk olarak, mutasyon normal olarak hiç veya çok az replike olan bir hücrenin anormal proliferasyonuna neden olmaktadır. Böylece mutant hücrelerin bir klonu oluşturabilir. İkinci olarak, mutasyon tüm organizmanın yapısını etkileyecek şekilde erken embriyogenez aşamalarında oluşabilir. Son çalışmalar kanserin ortaya çıkmasında genlerin 3 grubunun rol oynadığını ortaya koymuştur (89).

3.5.1 Onkogenler

Hücre proliferasyonu üzerinde pozitif etkiye sahip olan genlerdir. Normal, yani mutasyona uğramamış formları proto-onkogen olarak adlandırılmaktadır. Çeşitli nedenlerle aktive olan bir onkogenin aşırı ekspresyonu veya uygun olmayan fonksiyonları gerçekleştirmesi sonucu kanseri oluşturabilecek olan transforme hücreler meydana gelmektedir. Bir tek mutant allel hücrenin fenotipinde etkili olabilir. Pek çok onkogen hücre proliferasyonunu kontrol eden yollarda görev alan proteinleri kodlamaktadır. Proteinlerin 4 tipi hücre proliferasyonunu kontrol etmektedir. Bunlar büyüme faktörleri, büyüme faktör reseptörleri, hücre içi iletiler ve nükleer transkripsiyon faktörleridir (15, 18).

3.5.1.1 Büyüme Faktörleri

Büyüme faktörü analogunu kodlayan onkogenlerin bilinen tek örneği SIS onkogeni olup trombosit kökenli büyüme faktörü (PDGF)'nin iki polipeptid zincirinden birini şifrelemektedir. Doğal olarak trombosit büyüme faktör reseptörüne sahip hücreleri transforme edebilir. Büyüme faktörü olarak görev yapan onkogen proteinler genellikle tümör hücreleri tarafından anormal şekilde eksprese edilirler. Tümör hücreleri aynı zamanda eksprese ettikleri büyüme faktörlerine cevap vermek için gerekli olan spesifik reseptörleri de eksprese etmektedirler. Büyüme faktör ve reseptörünü eksprese eden tümör hücreleri otokrin olarak uyarılmaktadır. Sonuçta anormal hücre proliferasyonundan dolayı tümör gelişmektedir (15, 18).

3.5.1.2 Büyüme Faktör Reseptörleri

Bazı hücre yüzey reseptörleri sitoplazmik alanlarında integral protein tirozin kinazlara sahiptirler. Bu reseptörler bir veya daha fazla hedef proteini fosforlayarak büyüme sinyallerini iletmektedirler. Bu reseptörleri kodlayan genlerde, ligandın yokluğunda bile sürekli aktif kalmalarını sağlayan mutasyonların ortaya çıkması onların onkojenik potansiyel kazanmalarına neden olmaktadır. Örneğin G protein reseptörleri bazı kanserlerde onkogen olarak rol oynamaktadırlar. Tiroit tümörlerinde bir G protein reseptörü olan tirotropin reseptörünü kodlayan gende oluşan mutasyon sonucu bir onkogen meydana gelmektedir. Tiroit tümörlerinde tirotropin reseptörünün mutasyonları reseptörün sürekli aktivasyonuna neden olmakta ve c-AMP sinyal yolunun aktivasyonu ile anormal hücre proliferasyonu gerçekleşmektedir (15).

C-kit (hücre yüzey reseptörü) ve ligandı kök hücre faktörü (SCF) melanositler, mast ve germ hücrelerinin fonksiyonu ve gelişiminde önemli rollere sahiptir. Mutant c-kit, Stat3 ve Stat1'in sürekli olarak aktivasyonunu indüklemektedir. Stat3'ün artan ekspresyonu Bcl-XL ve c-myc'yi aktive eder. Mutant C-KIT'e sahip insan lösemi hücreleri kontrolsüz bir şekilde sürekli olarak bölünmektedir. Ayrıca mutant C-KIT varlığı diğer malignansilerde de gösterilmiştir (64, 84).

3.5.1.3 Hücre İçi İleticiler

Hücre içi sinyal iletiminden sorumlu proteinler olup nükleusda bulunan bazı genlerin aktivasyonunu sağlayarak hücre proliferasyonunda önemli roller almaktadırlar. Örneğin Ras ve G proteinler bazı kanser tiplerinde onkogen olarak rol oynamaktadır. G proteininin α subunitini kodlayan G proteininin α polipeptid zinciri (GSP)'ni kodlayan onkogende meydana gelen mutasyonlar α subunitinin sürekli aktivasyonuna yol

açtığından adenozin tri fosfattan siklik adenozin mono fosfat oluşumunu sağlayan adenilaz siklaz enziminin sürekli aktivasyonu neden olmaktadır. Siklik adenozin mono fosfatın hücre içi düzeyinin artması anormal hücre proliferasyonuna neden olmaktadır. GSP onkogeninin mutasyonlarına tiroit ve hipofiz tümörlerinde rastlanmaktadır. Ras proteinleri, büyüme faktörünün bağlanmasıyla aktive olan büyüme faktör reseptörlerinden aldıkları sinyalleri bir proteinkinaz olan Raf proteinlerine iletmede önemli role sahiptirler. Aktive olan Raf, hücre gelişimini ve farklılaşmasını düzenleyen bir proteinkinaz olan mitojenlerle aktive olan proteinkinaz (MAP)'nın aktivasyonunu sağlamaktadır. RAS genlerinde meydana gelen mutasyonlar Ras'ın aktif formda kalmasına neden olmaktadır. Böylece onkojenik Ras proteinleri MAP kinaz yolunu sürekli uyararak hücre proliferasyonuna neden olurlar ve hücreler büyüme faktörlerinin yokluğunda bile bölünmeye devam ederler (15).

3.5.1.4 Nükleer Transkripsiyon Faktörleri

Bu onkogenler tarafından kodlanan proteinler nükleer fonksiyonlar üzerinde doğrudan etkilidirler. MAP kinaz yolu, büyüme faktörlerine cevapta rol alan c-myc gibi transkripsiyon faktörlerini aktive etmektedir (15). Myc onkoproteini Max, Mad1, Mxi1, Mad3, Mad4 ve Mnt (veya Rox) proteinleriyle heterodimerler oluşturmaktadır. Myc/Max/Mad şebekesi apoptozis, proliferasyon ve farklılaşmanın düzenlenmesinde temel rollere sahiptir (57). Myc/Max ve Mad/Max dimerleri aynı DNA dizilerine bağlanırlar ve transkripsiyon üzerinde karşıt etkilere sahiptirler. Myc'nin Max ile yaptığı heterodimerler transkripsiyonu aktive ederken, Mad/Max heterodimerleri transkripsiyonu baskılamaktadır. Myc proteini istirahatdaki (bölünmekte olmayan) hücrelerde ya tespit edilemez ya da çok azdır. C-MYC sadece proliferasyon yapan hücrelerde

ve faklılaşmamış hücrelerde eksprese olurken MAX ve MNT sürekli olarak eksprese olmaktadır. Dinlenen hücrelerde, c-myc'nin transformasyon yeteneğini inhibe eden Mad ve Max proteinleri eksprese olmaktadır (87). C-MYC'nin overekspresyonu proliferasyonu sağlarken Mad proteinlerinin sürekli ekspresyonu hücre siklusunun durması ve hücrenin dinlenme fazına girmesini sağlamaktadır. C-MYC'nin transkripsiyonu büyüme faktörleri ve çeşitli mitojenik stimülatörler tarafından hızlı bir şekilde indüklenebilirken transforme edici büyüme faktörü- β (TGF- β) ve diğer proliferasyon inhibitörleri tarafından baskılanmaktadır. Büyüme faktörlerinin mevcudiyetinde c-myc protein ve mRNA düzeyi artışı hücre proliferasyonuna neden olmaktadır. Büyüme faktörlerinin yokluğunda ise C-MYC ekspresyonu apoptozu sağlamaktadır. C-MYC onkogeninin aktivasyonu amplifikasyonla gerçekleşmektedir. Böyle bir durum, genin ekspresyon düzeyinde ve ürün miktarında çok büyük bir artışa neden olacağından kanser oluşumuna yol açmaktadır (63).

Heat shock proteinler (HSP) hücrel proliferasyon ve apoptozisde rol oynamaktadırlar. Heat shock faktörler (HSF) HSP genlerinin transkripsiyonel indüksiyonunda aracıdır. C-MYC protoonkogen ürünü HSF3'e doğrudan bağlanarak onu aktive etmektedir. HSF3'ün c-myc tarafından indüklenen aktivasyonu P53'ün HSF3'e bağlanmasıyla negatif olarak düzenlenmektedir. Böylece c-myc ve HSF3 arasındaki etkileşim bloklanmaktadır. Kazein kinaz tarafından fosforlanınca aktive olan ve DNA'ya bağlanabilen c-myc'nin 11. ve 12. serin amino asitleri hücre siklusu boyunca fosforludur. Böylece çeşitli genlerin ekspresyonları c-myc tarafından aktive edilmekte ve hücre siklusunun devamı sağlanmaktadır (16, 91).

3.5.2 Tümör Süpressör (Baskılayıcı) Genler

Tümörögenesis sadece onkogenlerin aktivasyonu ile gerçekleşmez aynı zamanda diğer genlerinde fonksiyon kaybına neden olan mutasyonlardan da kaynaklanmaktadır. Tümör baskılayıcı genler olarak bilinen bu genler hücre siklusunun negatif düzenleyicileridir. Tümör baskılayıcı genlerin fonksiyon kaybına neden olan çeşitli mekanizmalar vardır. Bunlar arasında mitotik non-disjunctionla bir kromozomun kaybı, promotor metilasyonu, mutasyonlar ve vahşi tip allelin delesyonu sayılabilir. Tümör baskılayıcı genlerin fonksiyon kaybına neden olan en önemli mekanizmalardan biri heterozigositenin kaybı (LOH)'dır. Bu tümör baskılayıcı geni taşıyan kromozomun tamamen kaybı veya kromozomun tümör baskılayıcı geni taşıyan kısmının kaybı şeklinde gerçekleşmektedir. Tümör dokusunda heterozigositenin kaybı homozigot veya heterozigot olabilir. Ancak tümör dokularında homozigot kayıplar daha yaygındır (108). Süpressör gendeki ilk mutasyon ya zigotta meydana gelmektedir (mutasyon etkilenmiş ebeveynden veya yeni bir mutasyon taşıyan germ hücresinden yeni nesillere aktarılabilir) ya da ilgili dokudaki tek bir hücrede oluşabilmektedir (somatik mutasyon) (6, 89). İnsanda tümör baskılayıcı fonksiyona sahip pek çok gen vardır.

Örnek olarak; PTEN, fosfolipit fosfotazı kodlayan kromozom 10q23 üzerine lokalize bir tümör baskılayıcı gendir. PTEN'nin fosfataz aktivitesi onun tümör baskılayıcı fonksiyonu için gereklidir. PTEN büyüme faktörlerinin yokluğunda aktive olarak hücre yaşamının devam etmesini sağlar. Büyüme faktörlerinin varlığında ise inaktif olur. Hücre büyüme faktörleriyle uyarıldığında fosfotidil inozitol 3,4,5 trifosfat (PIP₃) tarafından protein bağımlı kinaz (PDK) ve protein kinaz B/PKB (AKT) gibi kinazlar aktive edilmektedir. AKT fosforlandığında aktif hale geçmektedir ve

apoptozisde görevli olan kaspaz-9 ve BAD'ı fosforlayarak apoptozisi inhibe etmektedir. PTEN mutasyonları sonucunda PIP₃'ün artan düzeyinden dolayı PKB aktif hale gelmektedir. Aktive olan PKB BAD'ı fosforlayarak onu inaktif hale getirmekte ve apoptozisi baskılamaktadır. İntegrin bağımlı kinaz (ILK) ve PKB, PTEN ekspresyonunun eksikliğinde insan prostat karsinoma hücrelerinde sürekli aktiftir (11, 60, 71).

BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki mutasyonlar tüm ailesel meme kanserlerinin 3/2'sinden sorumludur. BRCA1 mutasyonları meme ve ovarian kanserlerin %90'ında bulunmuştur. BRCA1'in fonksiyon kaybı genetik instabilite, tümörigenezis, artan apoptozis, hücre siklusunun durması, anormal sentrozom duplikasyonu ve bozuk DNA hasar tamirine neden olmaktadır. BRCA1'in kaybı durumunda P53-P21 aracılı hücre siklusu kontrol noktası devreye girmekte ve apoptozis gerçekleşmektedir (21).

Yukarıda bahsedilen tümör süpressör genlere ilaveten P16, RB (Retinoblastom), NF1 (Nörofibromatozis tip 1), NF2 (Nörofibromatozis tip 2), WT1 (Wilm's Tümör), VHL (Von Hippel –Lindau Hastalığı), BCNS (Golin's Basal Cell Nevus Syndrome), DCC (Deleted Colon Carcinoma) ve MEN1 (Multiple Endocrine Neoplasia) gibi pek çok tümör süpressör gen vardır (89).

3.5.3 Mutator Genler

Bu genlerde meydana gelen mutasyonlar DNA'nın onarımının gerçekleşmemesine veya yetersiz replikasyonuna neden olurlar. Genetik bilginin integrasyonunu sağlamada genel bir role sahiptirler. Eukaryotlarda en azından 5 gen DNA tamiri ile ilgilidir. Bunlar hMSH2, hMLH1, hMSH6, hPMS1 ve hPMS2'dir. LNCaP prostat kanser (PK) hücre hattında hMSH2'nin ekzon 9 ve 16'sında homozigot delesyonuna ilaveten

PK'nde PMS1 ve PMS2 genlerinde ekspresyon kaybı gösterilmiştir (13, 52). Kolon kanserlerinin çoğunluğu sporadik olup mutator genlerdeki mutasyonların neden olduğu familial vakalar Familial Adenomatosis Poliposis (FAP veya APC) ve Herediter Nonpoliposis Kolon Kanseri (HNPCC) olmak üzere iki kategoride toplanmaktadır (49,89).

3.6 Metastaz Biyolojisi

Bir tümör, benign veya malign olan hücrelerin anormal proliferasyonu ile oluşmaktadır. Temelde benign olandan farklılaşan malignant tümörlerin en önemli özellikleri, onların invaziv olmaları ve vücuda yayılmalarıdır. Malign tümörler çevre dokuları istila ederler, vücudun dolaşım sistemi içerisine girerler ve orijin olarak bulundukları yerlerden proliferasyon olacakları uzak yerlerde yeniden malign tümörler oluşturabilirler. Tümör hücrelerinin yayılımı ve geliştikleri sekonder yerler oluşturmaları metastaz olarak adlandırılır. Metastaz kanser hücresinin çevresindeki hücrelerden ayrılması, bazal membranı geçme ve ekstrasellüler matriks içinde ilerleme, kan veya lenf damarlarına girme, dolaşımda canlı kalma, dolaşımdan yeni bir dokuya çıkma, sekonder tümör odağının gelişmesi ve sekonder tümör odağının damarlanması (angiogenezis) aşamalarından oluşmaktadır (18).

3.6.1 Tümör Hücrelerinin Çevresi İle Bağlantılarını Koparması

Tümör hücrelerinin çevresi ile bağlantılarını koparmasında görevli olan pek çok molekül tanımlanmıştır. Bunlardan biri olan E-kaderin tümör baskılayıcı gen olarak fonksiyon gören bir epitelial hücre adezyon molekülüdür. E-kaderin submembranöz proteinlerin bir grubu ile etkileşme yoluyla hücre-hücre adezyonunu sağlamaktadır. Bu

submembranoz proteinlerden olan kateninler (α, β, δ) hücre iskeletin mikrofilyamentleri ile E-kaderinin bağlantısını sağlarlar. E-kaderin ekspresyonunun azalması yada kaybı hücrel bağlantıların azalmasına yol açarak kanser hücrelerinin invazyonunda potansiyel bir artışa ve metastaza neden olmaktadır. PK'inde promotor metilasyonu, heterozigosenin kaybı ve mutasyon E-kaderin geninin inaktivasyonuna neden olmaktadır. β -katenin E-kaderinin sitoplazmik alanıyla doğrudan etkileşerek onun α -kateninle bağlantısını sağlamaktadır. Böylece bu adezyon kompleksinin hücre iskeleti ile bağlantısı sağlanmaktadır. Kaderin-katenin komplekslerinin fonksiyon görmemesi katenin moleküllerinin değişen ekspresyonuyla oluşabilir ve bu durum hücre invazyon ve hareketliliğinde artışa neden olmaktadır. β -kateninin mutasyon yada disfonksiyonu sonradan invazyona yardımcı olan hücre-hücre ayrılmasına yardımcı olmaktadır. β -katenin mutasyonları E-kaderin ve α -katenin arasındaki etkileşimi bozmaktadır. α -katenin ekspresyonunun azalması yada kaybı özafagus, kolon, mesane, mide, meme ve birkaç PK hücre hattında gösterilmiştir (19, 55).

Hücre adezyonundan sorumlu reseptörlerden olan integrinler, ekstrasellüler matriks (ECM)'e hücrelerin tutunmasını sağlarlar. Integrinler hücre siklusu, apoptozis ve hücre göçünde önemli rollere sahiptirler. Integrin aracılı proliferasyonda farklı integrinler ve büyüme faktörleri rol oynamaktadır. Endotel hücrelerde basit fibroblast büyüme faktörü (bFGF) ve $\alpha v \beta 3$ integrin sinyalizasyonu hücre siklusunun devamı için gerekmektedir. Farklı integrinler farklı tümör hücrelerinin invazyonu ve metastazını sağlamaktadır. $\alpha 6 \beta 4$ integrin tümörigenezisde önemlidir ve pek çok tümör hücresi tarafından eksprese edilmektedir (8).

3.6.2 Bazal Membranı Geçmeyi ve ECM İçinde İlerlemeyi Sağlayan Enzimler

3.6.2.1 Matriks Metalloproteinazların (MMP) Salınması

Matriks MMP'lar normal ve malignant dokularda ECM'in çoğu bileşenini parçalayan Zn (çinko) bağımlı endopeptidazların bir ailesidir. ECM parçalanması ve hücrelerin adhesiv bir fenotipten non-adhesiv bir fenotipe geçmesiyle hücre göçünü etkileyebilen MMP'lar hücre proliferasyonu, apoptozis ve morfogenezisi sağlamak için ECM mikro çevresini değiştirebilirler. MMP aktivitesi proliferatif bir sinyal meydana getirmek için gerekmektedir (99). MMP inhibitörleri kaderinlerin dış alanının kesimini engelleyerek ve ECM parçalanmasının inhibisyonuyla hücre adezyonunu arttırmaktadırlar. MMP'lar bazal membranın parçalanmasında aracı olduklarından tümör hücre invazyonunu sağlarlar. MMP-2 ve MMP-9'un ECM bileşenlerini hidrolize etme yetenekleri çok güçlü olduğundan invazyonda önemlidirler ve onların ekspresyonu epitelial kökenli malignansilerin çeşitli tiplerinde artmıştır (36, 37).

3.6.2.2 Urokinaz Plasminojen Aktivatör/Urokinaz Plasminojen Aktivatör Reseptör Sistemi (uPA/uPAR)

Plasminojen/plasminojen aktivatör sisteminin proteazları ECM parçalanmasını sağlayarak göç ve doku yeniden oluşumunda önemli roller oynamaktadırlar. Urokinaz tip plasminojen aktivatör (uPA) ve doku tip plasminojen aktivatörlerin (tPA) her ikisi zimojen plasminojeni (PLG), aktif formu olan plasmine çevirerek onu aktive edebilir. UPA, pro uPA olarak sentezlenir ve pro uPA ile uPAR'ın beraberliği plasma membranına bağlı PLG'in az miktarıyla aktive edilmektedir (54). Enzimatik olarak aktif uPA daha fazla plasmin meydana getirmek için PLG'i aktive etmektedir. Reseptöre

bağlı pro uPA plasminojen aktivatör inhibitörleri (PAI) tarafından inhibe edilmektedir. uPA ve tPA'nın fizyolojik inhibitörü olan PAI-1 tarafından reseptöre bağlı uPA'nın inhibisyonu kompleksin hücre içine alınmasını ve parçalanmasını sağlamaktadır (48). uPA-PAI-1 kompleksi lizozomlarda parçalanmaktadır ve uPAR hücre yüzeyine geri dönmektedir (92). PAI-1 tümör hücreleri tarafından beklenenin aksine yüksek düzeyde eksprese edilmektedir. Bu paradoks PAI-1'in tümör angiogenezi ve gelişimini teşvik ettiğinin bulunmasıyla aşılmıştır (5, 73).

3.6.2.3 Katepsin B

Lizozomal bir sistein proteaz olan katepsin B'nin yayılımı kanserlerin pek çok tipinde (meme, kolorektal, akciğer, mesane) peri nükleer lizozomlarda gösterilmiştir. Katepsinin plasma membranında yayılımı bir biyolojik kompartımandan diğerine tümör hücrelerinin progresyonu ve ECM proteinlerinin (laminin, fibronektin ve kolljen 4) parçalanmasını sağlamaktadır. Katepsinin enzimatik fonksiyonu endojen bir sistein proteaz inhibitörü tarafından düzenlenmektedir. Malignant tümörlerde katepsinin artmış aktiviteye ve sistein proteaz inhibitörünün ise azalan bir aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir (86).

Tümör hücresinin hareketlilik kazanmasında reseptörleri yoluyla etkili olan iki molekül tanımlanmıştır. İlki otokrin motilite faktör (AMF) ve reseptörü (gp78)'dür. AMF tümör hücreleri tarafından sentezlenen bir sitokin olup reseptörü yoluyla hücre hareketlilik ve gelişimi düzenlemektedir. Reseptörünün aktivasyonu bazal membrana invazyonu teşvik etmektedir. Reseptör aktivasyonu kanser hücrelerinin metastatik yeteneği arttırmaktadır (45). Hepatasellüler karsinoma hücrelerinde gp78 ve ligandı AMF yüksek düzeyde üretilmektedir. AMF ve gp78 hepatoma hücrelerinde bir taraftan

hareketlilik, adezyon ve MMP-2 sekresyonunu uyarırken diğer taraftan stroma içerisinde invazyon ve portal vene hücre yönelmesini sağlamaktadırlar (27, 85, 94). İkincisi ise dağılma faktörü veya hepatosit büyüme faktörü (SF/HGF) ve reseptörü (c-met)'dür. HGF/SF epitel hücrelerin morfogenezisi, hareketliliğini ve gelişimini uyarır ve stromal epitelial haberleşmede aracıdır (30). HGF/SF iki farklı reseptöre sahiptir. Birincisi c-met proto-onkogeninin ürünü olan bir transmembran tirozin kinaz, diğeri heparan sülfat (HS) veya dermatan sülfat taşıyan proteoglikandır. HGF/SF hücre göçü ve bölünmesini teşvik etmek için HS proteoglikan reseptörü ile c-met reseptörünü içeren ikili bir reseptör sistemiyle etkileşmelidir. HS c-met'le etkileşerek HGF sinyallerinin iletimini kolaylaştırmaktadır. HS'm bu etkileşimi ona HGF'nün bağlanmasından bağımsızdır. Böylece hücre yüzeyinde HS-c-met etkileşimiyle hücre proliferasyonu ve göçü sağlanmaktadır. HGF/SF ve c-met ekspresyonu meme, glioma ve diğer pek çok tümörün progresyonu boyunca artmaktadır. HGF/SF DNA hasar ajanları tarafından indüklenen hücre iskelet hasarının doğurduğu apoptozise karşı çeşitli epitel ve karsinoma hücrelerini korumaktadır (79, 83).

3.6.3 Tümör Hücrelerinin Kan veya Lenf Damarları İçine Girmesi

Tümör hücrelerinin damar endoteline tutunması integrin ve adezyon molekülleriyle sağlanmaktadır (70). Hücre-hücre etkileşimini sağlayan bir transmembran hücre yüzey glikoproteini olan CD44 (adezyon molekülü), çeşitli insan malignant tümörlerinde tümör hücrelerinin damar endoteline tutunması ve damar içine girmesine yardım ederek metastatik prosesin ilk aşamasında rol oynamaktadır. Klinik olarak lokalize prostat kanserlerinde, metastaz yokluğunda kanser hücrelerinin kan dolaşımına geçişi CD44'dün yeniden ekspresyonuyla gerçekleşmektedir. Kromozom

11p13'de lokalize olan CD44 ECM'de hem kollejen hem de hiyalurona bağlanarak hücre-ECM bağlantısını sağlamaktadır. CD44 hücre içinde de doğrudan hücre iskeletiyle bağlantılıdır CD44 ve reseptörü olan hiyaluronat invazyonda da önemli rollere sahiptirler. Tümör hücrelerinde CD44'ün azalan ekspresyonuna karşın hiyaluronatın ekspresyonunun arttığı bulunmuştur. CD44-hyaluronat bağlanması tümör hücre göçünü azaltmaktadır (1, 29). CD44 ekspresyonunun azalmasına promotorde bulunan CpG adacığının hipermetilasyonu neden olmaktadır. Azalan CD44 ekspresyonu metastatik davranışa geçmede gerekmektedir. Spesifik CD44 izoformlarının overekspresyonu ise artan metastatik potansiyeli sağlamaktadır (56, 61).

3.6.4-5 Dolaşımda Canlı Kalma

Tümör hücrelerinin yüzeyinde *Fas* ligandın ekspresyonu tümör içindeki ve dolaşımdaki T lenfositlerin apoptozisini indüklemektedir. Tümörler immün sistemi baskılayan moleküller üretmektedirler. Bir kez dolaşıma giren tümör hücreleri sekonder lenfoid organlara ulaşmaktadır. Sekonder lenfoid organlar tümör antijenleri için immün sistemin spesifik toleransının gerçekleştiği yerlerdir. Damardan yeni bir dokuya çıkmada damar içine girmeyi sağlayan adezyon molekülleri ve çeşitli faktörler görev yapmaktadır (81).

3.6.6 Kemik metastazları

Kemik metastazlarının çoğu kanser hücrelerinin kan yoluyla yayılması sonucu meydana gelmektedir. Kemik kanser hücrelerinin çoğalmasını indükleyen mitojenik peptitlerin bir kaynağı olması, kan akımı tarafından primer olarak oluşturulan mikrokompartmentlardan meydana gelmesi ve kan akımında dolaşan ve bir primer

tümörden çıkan malignant hücrelerin karşılaştığı ilk organ olması gibi özellikleri bir metastatik hedef olarak tek olmasına katkıda bulunmaktadır. Kemikte kanser hücrelerinin çoğalması mineralize kollejen kemik matriksinin osteolizisi ile gerçekleşmektedir. Tümör hücreleri tarafından salgılanan maddelerin pek çoğu kemiğin osteolizisini ve tümör hücrelerinin bölünmesini sağlamaktadır (34, 68, 78).

Hiperkalsemi oluşturan tümörlerin bir ürünü olarak keşfedilmiş olan paratiroid hormon ilgili peptit (PTHrP)'nin amino ucu paratiroid hormon (PTH)/PTHrP reseptörü ile etkileşir ve hiperkalsemiyi içeren doğal PTH'nın biyolojik etkilerinin büyük kısmını gerçekleştirmektedir. Ekspresyonu sitokinler, büyüme faktörleri ve hormonlar tarafından düzenlenen PTHrP, prostat ve meme karsinomlarında eksprese edilmektedir. Osteolizide TGF- β osteolitik kemik emiliminin bir sonucu olarak kemik mikro çevresinde aktif formda salınmakta ve tümör hücreleri tarafından PTHrP'nin üretimini sağlamaktadır (34, 42).

Son zamanlarda osteoklastların apoptozisi, aktivasyonu, birleşmesi, farklılaşması ve proliferasyonu düzenleyen bir sitokin sistemi tanımlanmıştır. Bu sitokin sistemi bir ligand [Nükleer faktör-kB ligandın reseptör aktivatörü (RANKL)], onun spesifik reseptörü [Nükleer faktör-kB'nin reseptör aktivatörü (RANK)] ve onun diğer reseptörü [Osteoprotegerin (OPG)]'ünden oluşmaktadır. RANKL/RANK/OPG sitokin sistemi tümör hücre-kemik etkileşimlerinin düzenlenmesinde temel role sahiptir. RANK ile RANKL'nin etkileşimi osteoklast farklılaşması ve aktivasyonunu teşvik etmektedir ve aktive olmuş osteoklastlar, kanserle bağlantılı olarak gelişen ağrılar, patolojik kırıklar, osteolitik metastazlar ve malignansilerin hiperkalsemisine neden olurlar. OPG, RANKL'yi nötralize eden ve böylece RANKL tarafından RANK aktivasyonunu engelleyen bir reseptör olarak rol oynamaktadır. Pek çok molekül osteoklast

farklılaşması ve aktivasyonunu düzenlemek için RANKL ve OPG'nin düzeyini birbirine yakın tutmaktadır. İterlökin 1- β (IL-1 β) ve tümör nekrozis faktör (TNF- α) RANKL ve OPG üretimini arttırmaktadır. Aksine PTH, PTHrP ve glukokortikoidler aynı anda OPG üretimini azaltırken RANKL üretimini arttırırlar. Normal stromal hücreler kemik yeniden oluşumu için gerekli stabil RANKL-OPG oranını korurlar. Myeloma ve meme kanser hücrelerinin bazı formları OPG sentezini inhibe eden ve RANKL sentezini indükleyen PTHrP sentezlerler. Bunun sonucu olarak artan bir RANKL/OPG oranı malignansilerin kalsemi ve osteolizisini sağlamaktadır (38).

3.6.7 Angiogenezis

Var olan mikro damarlardan yeni kapillar kan damarlarının oluşumu olarak tanımlan angiogenezin tüm formları, endotel hücrelerinin mitozu, göçü, lümen formasyonu, dolaşıma yeni vasküler segmentlerin bağlanması ve proteazlar tarafından ECM'nin yaygın olarak yeniden oluşturulması safhalarını içermektedir (22).

Angiogenezis neoplastik proseslerde de temel rollere sahip olup tümör progresyonu ve solid tümörlerin metastatik yayılımı için gerekmektedir. Ekstrasellüler mikro çevrede sentezlenen stimülatör ve inhibitörler arasındaki dengeyle sağlanan angiogenezin patolojik ve fizyolojik durumlarda gerçekleşmesi için stimülatörlerin inhibitörlere baskın olması gerekmektedir. Angiojenik özelliklere sahip peptit büyüme faktörlerinden (örneğin TGF, PDGF) biri olan vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) endotelial proliferasyon, göç ve vasküler permeabiteyi arttıran ve vasküler endotel hücreler üzerinde pek çok spesifik etkisi olan bir glikoproteindir (35). Çevresel faktörlerden olan ve tümörün mikro çevresinde görülen hipoksi, VEGF gibi angiojenik faktörlerin ekspresyonunu etkileyerek hipoksi durumlarına cevapta VEGF

transkripsiyonu arttırmaktadır. Androjen yokluğu VEGF'ün 3'transle edilmeyen bölgesine bağlanan hipoksinin indüklediği proteinin yerini değiştirmektedir. Hipoksi durumunda androjenler yoksa VEGF mRNA'sının stabilizasyonu engellenmektedir (74). Ovarian steroidler (örneğin östrodiol) insan endometriumunda VEGF mRNA'sını ve protein düzeyini arttırmaktadır. Bu bulgular östrodiolün östrojene duyarlı MCF-7 meme karsinoma hücrelerinde sabit durumda ki VEGF mRNA düzeyini arttırdığına dair elde edilen bulgularla tutarlıdır. Bu steroid hormonların, fizyolojik ve patofizyolojik durumlarda angiogenезisin önemli stimülatörleri olduğunu göstermektedir (88).

Antiangiogenik faktörlerden olan thrombospondin-1 (TSP-1) normal dokularda eksprese olurken kanserli dokularda ekspresyonu azalmıştır. Azalmış TSP-1 ekspresyonuna, genin 5'promoter bölgesinde yer alan birkaç CpG adacığının hipermetilasyonu neden olmaktadır (22, 53).

Angiogenезis endotel hücrelerinin ECM'ye göçü, MMP salınması, uPA/uPAR aktivasyonu gibi temel aşamalardan oluşmaktadır. Bazal membran parçalanması in vivo angiogenезis boyunca MMP'ların en önemli fonksiyonudur. Endotel hücrelerinin vasküler yaralanmaya cevap olarak fazla miktarda urokinaz reseptörü ve urokinaz eksprese ettikleri gösterilmiştir. Endotel hücre göçünde uPA ve uPAR'ın koordineli ekspresyonuyla ECM'in parçalanması sağlanmaktadır (22, 36,54).

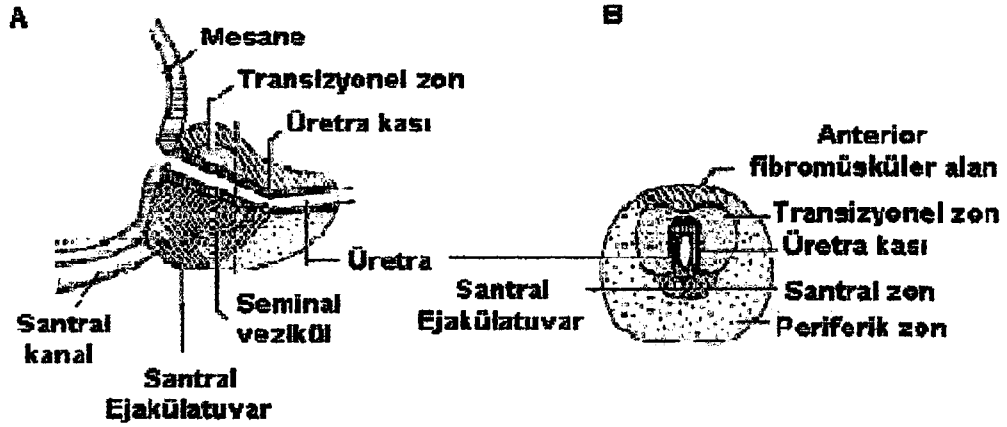
3.7 Prostat Bezi

3.7.1 Anotomisi: Prostat mesanenin hemen alt bölümünde bulunan fibromüsküler ve glandüler yapıda bir organdır. Normal prostat yaklaşık 20 gr ağırlığındadır ve yaklaşık 2.5 cm uzunluğundaki posterior üretrayı içerir. Endopelvik fasyadan türeyen başka bir prostatik kılıfın örttüğü prostat kapsülüyle sarıdır. Önden puboprostatik

bağlar, alt yüzden ürogenital diyaframla desteklenir. Lowsley sınıflandırmasına göre prostat anterior, posterior, median, sağ lateral ve sol lateral olmak üzere 5 lob içerir. Prostatın içinden geçen üretraya prostatik üretra denir. Prostat adenomu orta veya dış yan loplardaki periüretral bezlerden gelişir. Posterior lop kanserleşme eğilimindedir (90).

3.7.2 Histolojisi: Prostat altında dairesel düz kas liflerinin ve üretrayı çevreleyen kollejen dokunun bulunduğu ince fibröz bir kapsülle sarıdır. Bu tabakanın altında içinde epitelyal bezlerin yerleştiği bağ dokusu, elastik doku ve düz kas liflerinden ibaret prostatik stroma bulunmaktadır. Bu bezler, üretra tabanına açılan yaklaşık 25 kadar ana salgı kanalıyla drene olurlar. Prostatik üretranın transizyonel epitelinin hemen altında periüretral bezler bulunmaktadır (90).

Fetal testisten çıkan androjenik hormonların etkisi altında fetal yaşamın 12. haftasından itibaren gelişmeye başlamaktadır. Prostat bezi basık ters dönmüş bir koni şeklinde olup malignite derecesine göre büyüklüğü değişkenlik göstermektedir. Hatta benign prostatik hiperplasi (BPH)'de %100-200 misli büyüyebilir. Yapısal olarak fibromüsküler doku (%30-50) ve glandüler epitelyal hücrelerden (%50-70) ibarettir. Mc Neal prostat içerisindeki neoplastik süreçlerin lokalizasyonunu ve kökenini tanımlamada bir dayanak olarak kullanılan zonal anatomi kavramını ileri sürmüştür. Bu kavrama göre prostatın glandüler bölümü geniş bir periferik ve küçük bir merkezi zonla birlikte prostatın %95'ini oluştururken geri kalan %5'i transizyonel zonlu içermektedir. Transizyonel zon BPH oluşumundan tümüyle sorumlu olduğu varsayılan periüretral bezlerden ibarettir. PK %60-70'i periferik, %10-20'si transizyonel ve %5-10'uda santral zondan kaynaklanmaktadır (Şekil 2) (90).



ŞEKİL 2: A: Prostatın şematik lateral kesiti, B: A'da gösterilen alanın enine kesiti (90).

3.8 Postat Kanseri

PK BPH'da olduğu gibi bir yaşlılık hastalığıdır. 40 yaş altı erkeklerde nadiren oluşur ve insidansı 80'li yaşlarda doruk noktasına ulaşana kadar giderek yükselmektedir. Klinik olarak tanınanlar arasında geniş bir biyolojik davranış ve metastatik potansiyel farkı mevcuttur. Bu heterojenite ve klinik davranış farkı nedeniyle PK'nin çeşitli stajelerine uygun tedavisinin ne olacağı sorun olmaya devam etmektedir (90).

3.8.1 Doğal Seyri: PK'nin doğal seyri, kanserin evresi, derecesi, yaş ve malignitelerin varlığından etkilenmektedir. Tedavi olsa da olmasa da genellikle düşük evreli ve düşük gradeli PK'nin prognozu iyi, yüksek evreli ve yüksek gradeli PK'nin ise kötüdür. Son zamanlarda yayınlanan bir çalışmada, dikkatli gözlem altındaki 828 hastayı kapsayan 6 serinin analizi iyi ve orta derecede fakılaşmış kanserlerde 10 yıllık sağ kalım oranının %87 olduğunu göstermiştir. İyi, orta ve kötü derecede fakılanmış kanser gruplarında sağ kalım oranları sırasıyla %81, 58 ve 26 olarak bulunmuştur (90).

3.8.2 İnsidans: Amerika Birleşik Devleti (ABD)'nde PK en sık görülen ikinci ölüm nedenidir. Kanser hacminin önemine ilişkin doğal seyir ve patoloji verileri 0.5 cc'den büyük kanserlerde daha yüksek derece, kapsül dışı yayılım ve metastaz eğiliminin bulunduğunu göstermektedir (90).

3.8.3 Etyolojisi: Epidemiolojik gözlemlere dayanarak prostat kanserinde olasılıkla en azında 4 etyolojik faktörden söz edilmektedir. Bunlar genetik yatkınlık, hormonal etkiler, çevresel faktörler (diyet dahil) ve enfeksiyöz ajanlardır (26).

3.8.3.1 Genetik yatkınlık: Herediter prostat kanseri yüksek oranda penetran bir genin çok nadir otozomal dominant geçişi ile karakterizedir. Bu çalışmalar bir germ hattı mutasyonunun en azından bazı prostat kanserlerinde önemli olabileceğini ortaya koymaktadır (26, 90). Androjen reseptörünün (AR) N terminal alanı bir glutamin tekrarı barındırır ve normal bireylerde uzunluğu 8'den 39 rezidüye kadar değişebilir. Glutamin tekrar uzunluğunda bir azalma AR aktivitesinde bir artışla sonuçlanır. Bu da PK için daha yüksek AR aktivitesinden dolayı daha yüksek risk anlamına gelmektedir. Germ hattındaki mikrosatellitlerin boyu ne kadar kısa ise hücrelerin androjene cevabı o kadar fazla olmaktadır. Siyah erkeklerin beyazlara göre ve prostat kanserli beyazların kontrol gruplarına göre daha yüksek oranda kısa CAG alleleline sahip olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmalar androjen reseptör genindeki mikrosatellitlerin uzunluğu ile prostat kanseri gelişimi arasında bir ilişki olduğunu ortaya koymaktadır (41).

3.8.3.2 Hormonal etkiler: Prostat bezinin gelişmesinde başta androjenik hormonlar olmak üzere östrojenler ve peptid hormonlar (büyüme hormonu, prolaktin ve doku büyüme faktörleri) üç değişik yoldan rol oynamaktadırlar (26).

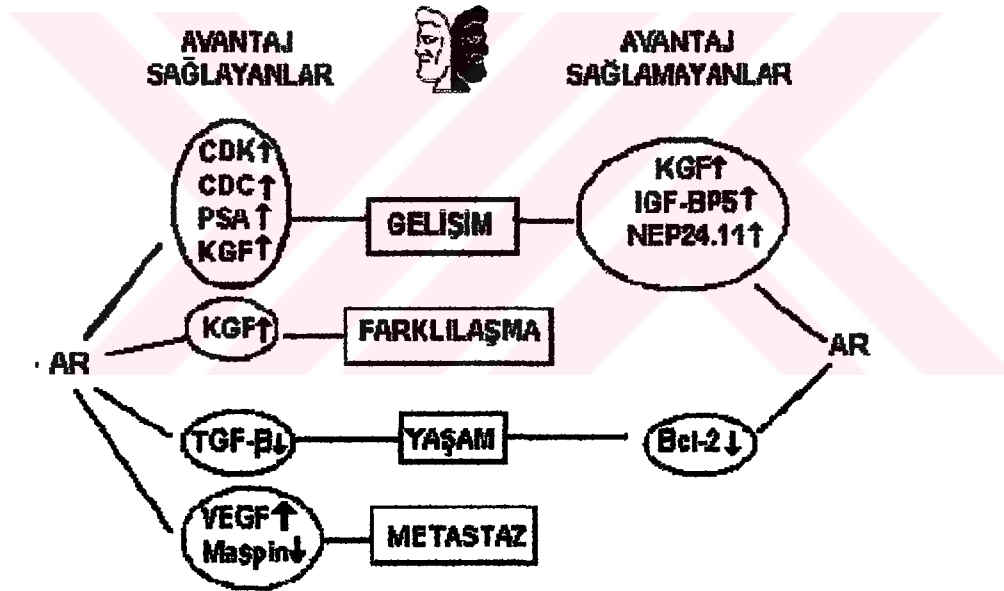
Prostatın hormonal stimölasyonunun ana yolu hipotalamik-pituiter-testiküler-prostatik yoldur. Hipotalamustan salgılanan lüteinizan hormonu serbestleştiren hormon hipofizal portal dolaşım ile hipofizin anterior lobuna gelir ve buradan luteinizan hormon salgılanmasına yol açmaktadır. Lüteinizan hormonda testiste leydig hücrelerinden testesterona ve androstenedione salınımına neden olmaktadır. Testiküler androjenler prostat dokusunun gelişme ve büyümesindeki bir numaralı etkindir. Diğer bir yolda hipotalamik-pituiter-adrenal yoldur. Hipotalamustan salgılanan kortikotropin serbestleştiren hormon pituiterden adrenokortikotropik hormonunu salınımını sağlamaktadır. Adrenokortikotropik hormon adrenalden androsteonedione, dihidroepiandosterone ve bunun sülfatının sekresyonuna neden olmaktadır. Adrenal kaynaklı androjenler prostat büyümesinde testiküler kaynaklılar kadar etkin değildirler (26).

Dolaşımdaki androjenlerin ana kaynağı testislerdir ve primer prostatik kanserler, gelişmek ve yaşamak için androjenlere bağımlıdır. Adrenal ise dolaşımdaki androjenlerin %30'unu karşılar. Androjenler plasmada ve prostatda testesterona ve dihidrotestesteron (DHT)'a dönüşürler. Dolaşımdaki testesteronun %95'i testesteron bağlayan globülin ve albumine bağlıdır. Serbest olan %2 ise prostatta ki androjene duyarlı hücreler üzerinde etkilidir ve prostat dokusunun büyümesi ve gelişmesini sağlamaktadır. Testesteron prostat epitel hücrelerine girdikten sonra 5 α redüktaz enzimi ile DHT'ye dönüşür (26). 5 α redüktaz tip 2 eksikliği belirsiz dış genital ve palpe edilemeyen prostat gelişimine neden olmaktadır. Benzer bir dönüşüm vezikula seminalis ve yağ bezleri gibi androjene duyarlı hücreleri olan diğer organlarda da olmaktadır. DHT spesifik bir nükleer reseptör olan AR'ne bağlanmaktadır. İnaktif olduğu durumda heat-shock proteinlerine bağlı olan AR'ü, testesteron (T) veya DHT

bağlandığı zaman heat-shock proteinlerinden ayrılmakta ve androjen cevap elementleri (ARE) olarak bilinen spesifik DNA elementlerine bağlanmaktadır (41). Androjenlerin doku spesifik etkileri AR ve DNA'ya bağlanan reseptör olmayan proteinler arasında etkileşimler yoluyla sağlanmaktadır. AR/Myc etkileşimleri, gelişen prostatta AR mRNA'sının androjen aracılı düzenlenmesinde temel oluşturmaktadır. AR kodlayan bölgede 4 ARE ve bir Myc bağlanma yeri tanımlanmıştır. AR geninde yer alan ARE-1 ve ARE-2 AR mRNA'sının androjen aracılı ekspresyonunun artmasında aracıcıdır. Fonksiyonel Myc ve Max proteinleri bu cevap bölgesinin androjen tarafından düzenlenmesinde görevlidirler. Prostat kanser hücrelerinde c-myc'nin overekspresyonu AR mRNA düzeyinde ve androjence stimüle edilen proliferasyonda etkilidir (32). AR'ünde ki pek çok mutasyon AR'ünün fonksiyonunu değiştirmektedir. Bunlar AR fonksiyonunu etkilemeyen, AR fonksiyonunu inaktive eden ve ligand spesifikliğini değiştirebilen mutasyonlardır (41). Primer tümörlerde az miktarda androjen reseptör mutasyonu belirlenmiştir. Ancak metastatik olan ve androjen bağımsız gelişen PK'li hastaların kemik iliğinden elde edilen hücrelerin %50'sinde bu mutasyonlar görülmektedir. AR'nde ki bu mutasyonların, androjen ablasyonundan sonra PK hücrelerine selektif bir büyüme avantajı sağladığı ifade edilmektedir. Bu mutasyonlar, AR'lerinin insulin büyüme faktörü (IGF-1) ve keratinosit büyüme faktörü (KGF) gibi büyüme faktörlerine cevap vermesine yol açmaktadır. Bu büyüme faktörleri mutasyona uğramış AR'lerine bağlanarak hücrelerin androjen yokluğunda bile proliferasyonu indüklemektedir. Androjenlerin yokluğunda IGF-1, KGF, luteinizan hormonu serbestleştiren hormon ve interlekin 6 (IL-6)'nın AR geninin transkripsiyonunu arttırması androjen konsantrasyonu azaldığında tam AR fonksiyonu için gerekmektedir (26).

Ekspresyonu androjenler tarafından düzenlenen pek çok gen vardır. Gelişim, hücre yaşamı, apoptozis ve farklılaşmayı içeren çeşitli prosesleri düzenleyen androjenler, diğer faktörlerle beraber normal prostatta bulunan farklı hücre tipleri içerisinde bu prosesler arasında bir denge oluşmasını ve korunmasını sağlarlar. BPH ve PK'nde bu denge bozulmaktadır. Kanser hücreleri apoptozisi engellemek için androjenlere ihtiyaç duyarlar. Epitelial hücrelerde androjenler siklin bağımlı kinaz (CDK)'lar (CDK-1, CDK-2 ve CDK-4), siklinler (Siklin D3 ve Siklin A) ve hücre siklusu inhibitörleri (P21, P27 ve P16)'ni içeren hücre siklusunu düzenleyen proteinleri direk veya indirek olarak düzenlerler. VEGF endotelial hücre proliferasyon ve göçünü indükleyen çok iyi bir angiojenik faktör olup ekspresyonu androjenler tarafından arttırılmaktadır (41). Kromozom 18q21.3-q23'de haritalanmış olan bir tümör baskılayıcı gen tarafından eksprese edilen "maspin" adlı protein tümör invazyon ve hareketliliğini inhibe etmektedir. Prostat hücrelerinde maspin ekspresyonu AR tarafından tanınan ve genin promoter bölgesinde yer alan negatif bir ARE ve pozitif bir ETS elementi tarafından düzenlenmektedir. Androjenler maspinin transkripsiyonunun baskılanmasında rol oynamaktadırlar. ETS elementi normal prostat epitel hücrelerinde aktiftir, ama tümör hücrelerinde inaktiftir (102). Maspin ayrıca PK'nde neovaskülarizasyonu inhibe etmektedir ve hücre yüzeyine bağlı uPA'yı inhibe etmek için PAI-1 ve PAI-2 gibi bilinen diğer plasminojen aktivatörlerle yarışmaktadır. Maspin temeline dayanan terapötik yaklaşımlar uPA pozitif PK'lerinin invazyon ve metastazlarının durdurulmasında faydalı olabileceği düşünülmektedir. Maspin ekspresyonu prostat kanserinde azalmıştır ve özellikle lenfoid nod ve uzak metastazlarda ya hiç eksprese olmamakta ya da çok az eksprese olmaktadır (80). Nötral endopeptidaz 24-11 (NEP) bir hücre yüzey enzimi olup büyümeyi stimüle eden nöropeptidlere bağlanmakta ve onları

inaktive etmektedir. NEP'in ekspresyonu, androjenler tarafından arttırılmakta ve androjen yokluğunda ise azalmaktadır. Bcl-2'nin ekspresyonu androjen yokluğunda artmaktadır (Şekil 3) (41). Bir homeobox gen olan NKX3-1 8p21'de haritalanmıştır. Gen PK için potansiyel bir tümör baskılayıcı gen olup PK'inde mutasyonları tespit edilememesine rağmen muhtemelen NKX3-1'in post-transkripsiyonel modifikasyonlarında değişimler mevcuttur. NKX3-1 ekspresyonu sadece normal ve malignant prostat epitelyumuyla sınırlı olup ekspresyonu androjenlerle düzenlenmektedir. Bu nedenle prostat spesifik antijen (PSA)'e göre daha iyi bir markır olabileceği ileri sürülmektedir (67).



ŞEKİL 3: AR yolu prostat epitel ve kanser hücrelerinin hücre gelişimi, farklılaşması, çevresi ve yaşamına etki eden pek çok faktörü düzenlemektedir (artma↑,azalma↓). Bu faktörlerin bazıları bu prosesle aktive edilirken diğerleri inhibe edilmektedir (41).

Stroma, epitelial hücre davranışını doğrudan etkilemekte ve yaralanmaya cevapta doku onarımını sağlamaktadır. Epitelial hücreler, epitelial tabakada granülasyon dokuyu

oluştururken proliferere olmak ve göç etmek için stroma tarafından sentezlenen çeşitli faktörlerle uyarılmaktadır. Patolojik durumlarda stromada, fibroblastların değişimiyle oluşan myofibroblastların hakimiyeti söz konusudur. Düz kas α -aktini immünohistokimya ile miyofibroblastları tanımlamada kullanılan en yaygın belirteçtir. Çevre dokuya bazal membran yoluyla invazyon ve normal hücre proliferasyonunun bozulması olarak değerlendirilen reaktif stroma (desmoplasia) kanserde, inflamatuvar hücrelerin varlığı, ECM'in yeniden oluşumu, stromal hücrelerin fenotipik değişimi ve artan angiogenezis, proteaz aktivitesi, büyüme faktör mevcudiyeti ile karakteristiktir (95).

Bazı faktörlerin, hem androjene duyarlı PK hem de androjene duyarsız PK'inin gelişiminde etkili olduğu gösterilmiştir. Bu büyüme faktörleri endokrin, parakrin ve otokrin şekilde rol oynamaktadırlar (46).

Epidermal büyüme faktör yolu (EGF): Tanımlanmış olan ilk peptit büyüme faktörlerinden biri olup 170 kD EGF reseptörü yoluyla rol oynamaktadır. TNF- α ve EGF prostat epitelial hücrelerinin proliferasyonunu uyarmaktadır. EGF olgun prostatda primer olarak üretilirken, TNF- α neonatal ve prenatal dönemde prostatda predominant olarak üretilmektedir (46). Epidermal büyüme faktör reseptörü (EGFR)/TGF- α sistemi prostat kanseri progresyonu boyunca etkilidir. TNF- α 'nın birkaç bölgesindeki polimorfizm ve genotip değişiklikler prostat kanseri ile beraber göstermektedir (66). BPH'da epitelial hücreler EGFR'ünü eksprese ederken, stromada TGF- α üretilmektedir. PK'lerinin pek çok tipinde EGFR ve TGF- α beraberce eksprese edilmekte ve böylece parakrin stimülasyondan otokrin stimülasyona geçilmektedir (77). EGF ekspresyonu normal prostat hücrelerinde daha yüksekken EGFR ekspresyonu BPH'lı hücrelerle karşılaştırıldığında PK hücrelerinde daha yüksek bulunmuştur. EGF kültüre alınan

normal prostat hücrelerinin proliferasyonunu uyarmaktadır. EGF'nin ekspresyonu androjenlerle düzenlenir ve düzenlenmesi normal ve neoplastik prostatda farklı şekilde gerçekleşmektedir. Androjenler normal prostat dokularında EGFR düzeyini PK'ine göre 6 kez azaltırken, PK'inde EGFR düzeyinde artışa neden olmaktadır. EGF ve TGF- α androjene duyarsız tümörlerin gelişimini teşvik edebilir. C-erbB-2 EGFR ile homologdur. Hormona duyarlı LNCaP prostat kanser hücrelerinde c-erbB-2'nin overekspresyonuyla c-erbB-2 tarafından AR sinyal iletim yolunun ligandsız aktivasyonu, PK'nin androjen bağımsız gelişimini indükleyebilir (46).

Transformasyona neden olan büyüme faktör yolu (TGF- β): TGF- β epitelial hücre proliferasyonunu durduran, mezensimal hücrelerin proliferasyonunu arttırabilen, ECM'nin yeniden oluşumunu düzenleyen, yara iyileşmesinde angiogenezi indükleyebilen önemli bir büyüme faktörüdür. Yaklaşık olarak %80 protein dizi homolojisi gösteren 5 TGF- β subtipi tanımlanmıştır. TGF- β hem stromal hem de epitelial hücreler tarafından üretilen bir immünoregülatör protein olup ekspresyonu androjenler tarafından azaltılabilir. Androjen yokluğu, androjene duyarlı PK hücre hatlarında ve normal prostatda TGF- β 'nın indüksiyonuna neden olmakta ve TGF- β apoptozisi gerçekleştirmektedir. Çünkü TGF- β ve TGF- β reseptör ekspresyonu kastrasyondan sonra artmakta ve 8. günde en üst düzeye ulaşmaktadır. TGF- β prostat epitelial veya stromal hücrelerin proliferasyonunu ve Rb fosforilasyonunu inhibe etmektedir. Böylece Rb'nin c-myc ile etkileşmesini engellenmektedir (46). TGF- β kanserlerin pek çok tipinde karsinoma hücreleri tarafından overeksprese edilmekte ve tümörde bulunan makrofajlar tarafından sitotoksik moleküllerin ekspresyonunu inhibe ederek immün sistemi baskılamaktadır. İn vitro epitelial hücre gelişimini inhibe etmesine rağmen prostat kanser hücrelerinde TGF- β 'nın overekspresyonu in vivo tümör

gelişimini teşvik etmektedir. PK hücreleri TGF- β reseptör ekspresyonunu azaltarak TGF- β 'nın gelişimi inhibe etmesinden kaçınmaktadırlar. TGF- β prostat stromasında yer alan fibroblastların miyofibroblast farklılaşmasını düzenlemektedir. TGF- β aynı zamanda pek çok ECM bileşeninin (kollejen tip-2 ve tip-3, fibronektin, tenascin, throspondin ve versican) sentezini de indüklemektedir. TGF- β FGF-2, VEGF ve konnektif doku büyüme faktörünü de içeren yara tamir ve angiogeneziste görevli büyüme faktörlerinin stromal ekspresyonunu sağlamaktadır. TGF- β ve konnektif doku büyüme faktörü kanserin reaktif stromasında, fibrozisde ve yara tamir yerlerinde beraberce eksprese olurlar (95).

İnsüline benzer büyüme faktör yolu (IGF): IGF insülini de içeren peptid büyüme faktörlerinin bir üyesi olup IGF-1 ve IGF-2 olmak üzere iki tipi tanımlanmıştır. Bu ligandlar insülin büyüme faktör reseptörü-1 (IGFR-1) ve IGFR-2 olmak üzere iki reseptöre bağlanırlar. IGFR-1'e hem IGF-1 hem de IGF-2 bağlanırken, IGF-2 sadece IGFR-2'ye bağlanmaktadır. IGF büyüme hormonunu serbestleştiren hormon (GH-RH)'na cevapta çeşitli dokularda ve karaciğerde sentezlenmektedir. IGF'nin mitojenik etkilerinin çoğunda IGFR-1 aracıdır (46). Normal prostatda ve BPH'de, IGF-1 ve IGF-2 stromada üretilerek sentezlenmektedir. Prostat epitel hücreleri üzerinde IGFR-1 ve IGFR-2 yoluyla parakrin etki göstermektedir. PK'de ise hem IGF hem de reseptörünün epitel hücreler tarafından sentezlenmesiyle otokrin etki mekanizması devreye girmektedir (77). Epitel hücreler normal prostatta IGF'ye bağlanan proteinler (IGFBPs) üretirler. Bunlardan IGFBP5'in ekspresyonu androjenler tarafından arttırılmaktadır. Bu da epitelial hücre proliferasyonunda androjenler için negatif bir rolün göstergesidir. Yine PSA androjence düzenlenen bir serin proteaz olup, IGF'yi serbestleştiren

IGFBP3'e bağlanmakta ve stromal hücreler tarafından eksprese edilmektedir. IGFB2'nin serum düzeyi prostat kanserli hastalarda %17 oranında artmıştır (46).

Fibroblast büyüme faktör yolu (FGF): FGF ailesi 4 transmembran tirozin kinaz reseptörü ile etki göstermektedir. FGF-1 fibroblast büyüme faktör reseptör (FGFR)'lerinin 4 subtipinde bağlanabilirken FGF-2 sadece ilk 3 subtipi bağlanabilir. FGF-1 ve FGF-2 normal prostatta epitel ve stromal hücreler tarafından eksprese edilmektedir. FGF-1 PK gelişiminin potent bir aracısı olup angiogenezi indüklemeye yeteneğindedir (46). FGFR ekspresyonu prostat kanser karsinogenezi ve progresyonu boyunca artmaktadır. PK'inde FGF2 ekspresyonu normal prostat dokularıyla karşılaştırıldığında endotel hücrelerde ve stromal fibroblastlarda artmaktadır. FGF-2 fibroblast proliferasyonu, ECM üretimi ve proteaz sekresyonunu uyarmakta, reaktif stroma oluşumu ve angiogenezi indükleyerek kanser progresyonunu teşvik etmektedir (95). Keratinosit büyüme faktörü (KGF/FGF-7) normal prostatta stromal hücreler tarafından sentezlenmekte ve epitelial hücrelerde yer alan FGF2(3)b reseptörü ile parakrin etki yoluyla epitelial hücrelerin proliferasyonunu stimüle etmektedir. AR sinyal yolu androjenlerin yokluğunda KGF aracılığıyla aktive edilmekte ve prostat epitel hücrelerinin çoğalması teşvik edilmektedir. KGF'nin LNCaP hücre hattında androjen bağımlı genlerin transkripsiyonunu ve AR'ünü aktive ettiği gösterilmiştir (72).

Endotelin-1 aracılı yol (ET-1): ET-1 prostatik epitelyumu da içeren pek çok endotel ve epitel hücre tipleri tarafından üretilen bir polipeptittir. Seminal plazmada ET-1 konsantrasyonu seruma göre 500 kez daha yüksektir. ET-1 ekspresyonu hem primer hem de metastatik prostat kanser hücrelerinde tespit edilmiştir. Endotelinler (ET-1, 2 ve 3) ET-A ve ET-B olmak üzere iki reseptöre bağlanarak rol oynarlar. ET-A reseptörleri predominant olarak stromada ve ET-B reseptörleri ise epitelyumda

lokalizedir. ET-B reseptörleri, BPH hücrelerinde tespit edilmesine rağmen PK hücrelerinde tespit edilememiştir. ET-1 vazokonstriktör olup, insan PK hücreleri tarafından sentezlenmekte ve düzeyi androjen bağımsız PK'li hastalarda plasmada artmaktadır. ET-1 in vitro PK hücrelerinin proliferasyonunu arttırmaktadır. Osteoblastlar için mitojenik olan ET-1 diğer büyüme faktörleri gibi prostatik hücrelerin proliferatif cevabını ve hücre içi kalsiyum düzeyini artırabilir (28, 46).

Prostatik gelişimi ve fonksiyonunu etkileyen östrojenlerin, stromal adenokarsinomunun ve stromal hücre hiperplazilerinin gelişiminde rolü olduğu gösterilmiştir. İnsan prostatında östrojen birikimi yaşa bağlı bir olaydır. Östrodiol 17- β ve östrojenin normal ve hiperplastik prostatda konsantrasyon analizleri artan yaşla beraber stromada her iki östrojeninde düzeyinde artış olduğunu göstermiştir. Aksine epitelial dokuda düzeyleri değişmeden kalmıştır. İlginç olan, epitelde DHT konsantrasyonu artan yaşla azalırken stromada DHT düzeyi değişmeden kalmaktadır. Yaşla prostatın transisyonel zonunda DHT düzeyi azalmıştır. Stromal hiperplaziye orta yaşla artan bir östrojenik durum neden olmaktadır. Yaşla testosteron düzeyi azalırken östrojen düzeyi periferik adipoz doku tarafından adrenal androjenlerin aromatisasyonu ile daha yaşlı erkeklerde korunmaktadır. Stromal dokudan yassı epitelial metaplazinin gelişmesini östrojenler stromada yer alan östrojen reseptör- α (ER- α) reseptörleri yoluyla sağlarlar. Yine prostatda tanımlanan ER- β , ER- α gibi östrodiol 17- β 'ya yüksek bağlanma afinitesine sahiptir. İlaveten diyet olarak alınan bir fitoöstrojen olan genistein ER- β 'ya bağlanmaktadır. Doğumda, prostat glandında ER- β mRNA ekspresyonu düşüktür (epitelyumda fazla ve stromada azdır). Puberteyle sekretor epitelde ekspresyonu artmaktadır. Hücre proliferasyonunun gerçekleştiği yer olan prostatik kanalların distal bölgesinde maksimal düzeyde eksprese olmaktadır. ER- β

aracılı yol antiproliferatif etkiye sahiptir ve böylece abnormal gelişim önlenmektedir. Fitoöstrojenler ER- β yoluyla malignant kanserin progresyonuna karşı koruyucu etki gösterirler. Epitelial hücrelerde ER- β için başka bir rolde anti-oksidan etkisidir. Genistein ER- α 'ya göre ER- β 'ya daha yüksek bağlanma afinitesine sahiptir (39).

İnsan prostat glandlarında epitel hücrelerin 3 tipi vardır [bazal, sekretor epitel ve nöroendokrin (NE) hücreler] (10). Prostatik hücre popülasyonunun %1'inden azını oluşturan NE hücreler 200 farklı peptit pek çok biojenik amin üretirler. NE hücreler kromograninA, nöron spesifik enolaz, maddeP, kalsitonin, PHrP ve anti-apoptotik bir protein olan survivin eksprese etmektedirler (46, 101). NE hücrelerin bazı subpopulasyonları EGFR'ü ve c-erbB-2 üretmektedirler. AR içermeyen NE hücreler PK'nin androjenden bağımsız gelişiminde temel rollere sahiptirler. Prostatın küçük hücreli karsinoması NE hücreler tarafından oluşturulmaktadır. NE hücre farklılaşmasına sahip PK'li hastalarda ölüm oranı daha fazla olmaktadır. Androjen bağımsız PK'li hastalarda NE hücrelerden sentezlenen kromogranin A ve bir peptit olan bombesinin artan serum düzeyi göze çarpan bir bulgudur. Kültüre alınan PC-3 hücre hattı bombesine cevap olarak proliferasyon göstermektedir. Bombesin/gastrin-serbesleştiren peptit (GRP) antikoru ile androjen bağımsız PK'nin muamelesi kanser gelişimini inhibe etmektedir. Bombesin/GRP intrasellüler kalsiyum düzeyini artırarak tümör hücre proliferasyonu ve invazyonunu sağlamaktadır (46).

3.8.3.3 Diyetik ve Çevresel Faktörler: Yağlı diyetin seks hormonlarının üretimini değiştirdiği ve prostat glandında kanser riskine yol açtığı ileri sürülmektedir. Bu hipotez sadece yağlı diyet için değil, yağda eriyen A, D, E vitaminleri ve çinko gibi eser elementler içinde geçerlidir. Kadmium sigara içenlerde bulunan eser bir mineral

olup PK ile kadmium arasında zayıf bir ilişkinin varlığını ortaya koymuştur. Laboratuvar çalışmaları D vitamininin prostat kanser hücrelerinin büyümesini yavaşlattığını göstermiştir (26). 1,25-(OH)2D3 antiproliferatif bir özelliğe sahiptir. Nükleer reseptörü ile etki gösterir. Reseptöre ligandın bağlanmasıyla oluşan aktif kompleks vitamin D cevap elementine sahip genlerin transkripsiyonunu düzenler. 1,25-(OH)2D3 c-myc ve Bcl-2 gibi onkogenlerin ekspresyonunu azaltmakta ve apoptozisi uyarmaktadır. Ayrıca P21/WAF1'in, 1,25-(OH)2D3'ün kültüre alınan LNCaP hücre hattına ilavesinden sonra stimüle olduğu gösterilmiştir. 1,25-(OH)2D3 IGFBP-3'ün ekspresyonunu artırarak gelişimi inhibe etmektedir (7).

3.8.3.4 Enfeksiyon ajanları: Son moleküler çalışmalar aktive olan Ras onkogenlerinin ve insan papilloma virüslerinin prostat karsinogenezisinde rolü olduğunu ileri sürmektedir. Almanyada son zamanlarda yapılan bir çalışmada PK'li hastalarda HPV-16 DNA'sının artan düzeyi Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile tespit edilmiştir. Kültüre alınan insan prostat epitel hücrelerinin immortalizasyonunu, HPV-18 genomunun transfeksiyonuyla oluşturulabilir ve sonradan non-tümörijenik değişim gerçekleşir. Ancak aktive olan K-Ras onkogeninin ilavesiyle tümörijenik hücreler oluşur. HPV-18 enfeksiyonu neoplastik bir fenotipin kazanılmasını sağlamaz, ancak kültürde insan prostat hücrelerinin sürekli proliferatif kapasite kazanmasını sağlar (78).

3.8.4 Patolojisi: Olguların %70'i periferik glanddan gelişir. %15-%20'si santral zondan kaynaklanır. Prostat kanseri orijin aldığı hücre tipine göre epitelyal [a. Adenokarsinom, b. Değişici epitel hücreli karsinom (İntraduktal, invaziv ve yassı

hücreli), c. Nöroendokrin karsinoma, d. Karsinoid tümör, e. Küçük hücreli karsinom], stromal [a. Rabdomyosarkom, b. Leiomyosarkom] ve sekonder [a. Mesaneden direk invazyon, b. Kolon adenokarsinomunun invazyonu, c. Metastaz, d. Lenfoma] olarak sınıflandırılmaktadır (90).

Prostatik intraepitelyal neoplazi (PIN) yapısal olarak benign prostatik asini ve duktusların sitolojik olarak atipik hücrelerle çevrenmesi ile karakterizedir. PIN1 hafif displaziye, PIN2 orta displaziye ve PIN3 ciddi displaziye eşit ifadelerdir. Çoğu yazar PIN1 için düşük grade'li PIN, PIN2 ve PIN3 için yüksek dereceli PIN ifadesini tercih etmektedir. PIN2 ve PIN3'ün yüksek grade'li PIN olarak kabul görmesinin iki sebebi vardır. İlki, PIN2 ve PIN3'ün ayrımında fazlaca değişik gözlemler vardır. İkincisi ise iğne biyopsisi ile PIN2 veya PIN3 tanısı konulması daha sonraki biyopsilerde aynı derecede kanser belirlenmesi riskine sahiptir. Kanserli prostatlar, kansersiz olanlarla karşılaştırıldığında yüksek Grade'li PIN odağının sayısında ve büyüklüğünde artış vardır. Eldeki kanıtlar PIN'in bir çok prostat kanserinin gelişim sürecinde erken stage'i oluşturduğu yolundadır (26).

Adenokarsinomlarda major tümör kitlesi periferik yerleşimlidir. Diğerlerinde predominant olarak transizyonel zon lokalizasyonu mevcuttur. Metastatik prostat kanserinin en sık yayılma yeri lenf nodları ve bunu takiben kemiklerdir. Daha sonraki yayılım yerleri mesane, karaciğer, adrenal ve testistir. Prostat kanserinin bir çok grade'leme sistemi vardır. Hepsi, glandüler diferansiyasyon, sitolojik atipi ve nükleer anomalite derecesinin belirlenmesi esasına bağlıdır. En yaygın kullanılan Gleason Gradeleme sistemidir. Burada, alandaki glandüler diferansiyasyonun major ve minor paterninin belirlenmesi temeli üzerine her bir kanser alanında iki Grade'leme yapılır. Bunlardan birisi daha baskın olan primer, diğeri daha az tipik olan sekonder olmak

üzere 2 histolojik derecelendirir. Bunlardan her ikisinde 1-5 arasında derecelendirilir ve daha sonra bütün skorlar toplanarak 2-10 arasında değişen en son Gleason Skor'u hesaplanır. Bu sisteme göre, Gleason 2-4, iyi diferansiye kanser, 5-7, orta derecede diferansiye kanseri, 8-10 ise kötü diferansiye kanseri belirler (26).

Hücrelerin şekil ve boyut olarak birbirinden farklılık göstermesi pleomorfizm olarak tanımlanır. Hücre şekil ve boyut olarak köken aldığı hücrelere ne kadar benziyorsa okadar iyi diferansiye olduğu ve ne kadar benzemiyorsa o kadar kötü diferansiye olduğunu belirlemede kullanılan önemli bir kriter olup hücre farklılaşmasının derecesini göstermektedir (26, 90).

3.8.5 Prostat Adenokarsinomunun Kromozomal Temeli

Sayısal kromozomal anomaliler PIN'lerin %67, karsinomaların %68 ve metastazların %96'ında bulunmuştur (40). Prostat adenokarsinomunda klonal anomaliler -1, +1, +4, -6q, -7, +7, -8, +8, +i (8q), -9, -9p, -10, +10, +11, -12, -13q, -16, -16q, +16, -17, +17, +17q, -18, -18q, +18, +19p, +20q, +X, -Xq, -Y ve +Y'dir (97). En yaygın kaybedilen kromozom kolları 13q (%55), 8p (%48), 6q (%43), 5q (%32), 16q (%25), 18q (%20), 2q (%18), 2q (%18), 4q (%18), 10q (%18) ve Y (%16)'dir. Sıklıkla kazanılan kromozom kolları 8q (%36), 17q (%23), Xq (%23), 7q (%21), 3q (%18), 1q (%16) ve Xp (%16)'dir (3). 7q22-31, 8p21-22, 8q24-qter, 10q23-24, 16q24 ve 18q22.2 gibi spesifik kromozol bölgelerde meydana gelen değişimlerin prostat kanser gelişiminde önemli olabileceği ileri sürülmektedir. Son zamanlarda 1q12 (delesyonu), 1q24-25 ve 1q42.2-43'de prostat kanserine yatkınlık sağlayabilecek genler olduğu rapor edilmiştir (97).

İnterfaz hücrelerinde yapılan Floresans *İn Situ* Hibridizasyon (FISH) tekniği sitogenetik olarak tespit edilmesi zor olan kromozomal değişimlerin ortaya konulmasını sağlamaktadır. Potansiyel biomarker incelemelerinde kromozom 7 ve 8'in ekstra kopyaları gösterilmiştir. Bu metotla tespit edilen kromozom 7 ve 8 kazancı özellikle hastalığın prognozu ve tanısı açısından potansiyel bir belirteç olarak görülmektedir (3).

Kromozom 7 ve 8 kazancı yüksek Gleason Skoru ile paralellik göstermektedir. Basit kromozom 8 kazancı ve C-MYC gen amplifikasyonu PIN, kanser ve metastazlarda farklı oranlarda bulunmuştur (44). Prostat kanserinin erken teşhisi, izlenmesi, hastalığın gelişimi ve ilerlemesinde etkili olan moleküler mekanizmaların anlaşılması daha spesifik ilaçların geliştirilmesinde önemlidir. Hastalığın oluşumunda ve ilerlemesinde C-MYC onkogeninin overekspresyonu ve amplifikasyonunun (metastatik adenokarsinomların %14'ünde tespit edilmiştir) önemli bir role sahip olduğu düşünülmektedir (62). Bu çalışmanın amacı, kromozom 8 kazancı ve 8. kromozomun q kolunda yer alan C-MYC onkogeninin PK oluşumu ve prognozunun FISH yöntemi ile değerlendirilmesi ve kromozomal anomalilerin tespitini sağlayan FISH yönteminin genetik çalışmalardaki uygulanabilirliğinin araştırılmasıdır.

4. GEREÇ VE YÖNTEM

Prostat kanseri şüphesiyle 2000-2002 tarihleri arasında Elazığ ili Fırat Tıp Merkezi (1'den 6'ya kadar olan vakalar) , Sosyal Sigortalar Kurumu Hastanesi (10'dan 15'e kadar olan vakalar ve 9 BPH vakası) ve Devlet Hastanesi (7, 8 ve 9. vakalar)'nin üroloji kliniklerine başvuran toplam 24 vaka incelemeye alındı. Çalışma materyali olarak ameliyata alınan hastaların prostat doku örnekleri kullanıldı. Patolojik tanısı kanser, PIN ve BPH olan toplam 24 vakada standart interfaz-FISH (Fluoresans *in situ* Hibridizasyon) tekniği kullanılarak değerlendirmeler yapıldı.

4.1 FISH Tekniği ve Patolojik Boyamalarda Kullanılan Preparatların Hazırlanması

4.1.1 FISH Tekniğinde Kullanılacak Preparatların Hazırlanması

a. Kullanılan Solüsyonlar

1. Transport Medyum

Medyum 199100 ml

Nöroksin.....1 ml (100 ml Bazal medyumda 1

gr'lık nöroksin tabletlerinin eritilmesiyle hazırlandı)

Amfoterisin B.....2 ml

Penisilin-Streptomisin-Niasin.....5 ml

Yukarıda belirtilen oranlar kullanılarak hazırlanan transport medyumdan steril, kapaklı tüplere 5 ml konularak +4°C'de saklandı. Çalışmaya alınan vakalara ait dokular ameliyat sırasında steril koşullar altında transport medyum içine alındı.

2. %50, %70, %90 ve %95'lik etil alkol serisi.
3. -20°C metanol.
4. Fiksatif (3:1-Metanol:Asetik Asit)

b. Kullanılan Gereçler

1. Şale, petri, pens, sargı bezi, makas yada bisturi ve lam.

c. Preparatların Hazırlanması

1. Transport besiyerinden petriye aktarılan doku örnekleri makas yardımıyla pens ile tutulabilecek büyüklükte parçalara ayrıldı.
2. Doku sargı bezi arasına konularak hafifçe bastırıldı. Daha sonra pens yardımıyla doku hafifçe lam üzerine bastırılarak hücrelerin yapışması sağlandı.
3. Preparatlar derhal -20°C'de ki metanol içerisine konarak 20 dakika bekletildi.
4. Daha sonra oda ısısındaki fiksatif içerisinde 20 dakika bekletildi.
5. %50, %70, %90 ve %96'lık alkol serisinin her birinde 5 dakika bekletildikten sonra havada kurutulan preparatlar kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı (17, 44).

4.1.2 Patolojik Preparatların Hazırlanması

a. Kullanılan Solüsyonlar

1. %95'lik etil alkol.

b. Kullanılan Gereçler

1. Lam, şale, pens, makas, sargı bezi ve petri.

c. Preparatların Hazırlanması

1. Aynı ön işlemler uygulanarak hazırlanan doku parçaları pens yardımıyla lam üzerine sürülerek hazırlanır.
2. Pap boyaması uygulanacak olan preparatlar 20 dakika %95'lik alkolde bekletilir ve preparatlar kurutulduktan sonra pap boyaması yapılır (4).

4.2 Patolojik Boyama Teknikleri

4.2.1 MGG (My Grunwald-Giemsa) Yöntemi

a.Kullanılan Solüsyonlar

1. Tampon Solüsyonu

A solüsyonu: 300 ml distile suda 8,16gr KH_2PO_4 çözülerek hazırlanır.

B solüsyonu: 250 ml distile suda 2gr NaOH çözülerek hazırlanır.

Tampon 58 ml A ve 25 ml B solüsyonundan alınıp 2000 ml tamamlanarak hazırlanır.

2. Giemsa boyası

300 ml tampon çözelti üzerine 75 ml Giemsa karıştırılarak hazırlanır.

b. Kullanılan Gereçler

1. Şale.
2. Entellan.
3. Lamel.
4. Işık mikroskobu.

c. Boyama Tekniği

1. My Grunwald'da preparatlar 1,5-2 dakika bekletildi.
2. Tampon çözeltide 1 dakika bekletildi.

3. Giemsa boyasında 5,5-6 dakika bekletildi.
4. Tampon çözeltide 1 dakika bekletildi.
5. Tampon çözeltide 1 dakika bekletildi.
6. Preparatlar kurutulduktan sonra lam üzerine 1-2 damla kanada balzamu damlatılarak kalıcı preparatlar hazırlanır (4).

4.2.2 PAP (Papanicolaou Gynaekologie) Yöntemi

a. Kullanılan Solüsyonlar

1. %96, %70 ve %50'lik etil alkol serileri.

2. Distile su.

3. Hematoksilen boyasının hazırlanması:

Hematoksilen..... 2gr

Şap.....40gr

Civa oksit (Merkürük Asit).....1gr

Hematoksilen boyası 20ml absölü alkolde ve şap ısıtılarak 400 ml suda eritildi. Hazırlanan iki karışım karıştırıldı ve alev arttırılarak kaynama noktasına getirildi. Kaynadıktan sonra merkürük asit eklendi ve ateşte koyu erguvan rengi oluşuncaya kadar kaynatmaya devam edildi. Sonra hızla soğutuldu.

4. Amonyak alkolün hazırlanması:

Amonyak.....1 ml

%50'lik alkol.....99 ml

1 ml amonyağın üzerine 99 ml %50'lik alkol ilave edilerek hazırlandı.

5. Orange G boyası.

6. İsopropanol alkol.

7. EA 50 boyası.

b. Kullanılan Gereçler

1. Şaleler.

2. Lamel.

3. Entellan.

4. Işık Mikroskobu.

c. Boyamanın Tekniği

1. Preparatlar %96, %70 ve %50'lik alkol serilerinin her birinde 1 dakika bekletildi.
2. Distile suda 1 dakika bekletildi.
3. Hematoksilen boyasında 1 dakika bekletildi.
4. Preparat 2 ayrı şaleye hazırlanmış olan distile suların her birinde 1 dakika bekletildi.
5. Preparatlar çeşme suyunda 1 dakika süreyle yıkandı.
6. Preparatlar %50, %70, %96 ve %99'luk alkol serilerinin her birinde 1 dakika bekletildi.
7. Orange G boyasında 5 dakika bekletildi.
8. İki ayrı şaleye hazırlanan %96'lık alkol serilerinin her birinde 1 dakika bekletildi.
9. EA50 boyasında 1,5-2 dakika bekletildi.
10. Farklı şalelere hazırlanmış olan 3 tane %96'lık alkol serilerinin her birinde 1 dakika bekletildi.

12. Preparatların kuruması beklendi ve lam üzerine 1-2 damla kanada balzamı damlatılarak kalıcı preparat haline getirildi (4).

4.3 FISH (Floresan *in situ* Hibridizasyon) Tekniği

Uzman patologlar tarafından yapılan patolojik inceleme sonucunda tanısı prostat adenokarsinomu ve prostatik intraepitelial neoplazi olan vakalarda, bulguların değeriendirilmesi için interfaz FISH tekniği kullanıldı.

a. Kullanılan Solüsyonlar

1. 20xSSC (Standart Sodyum Sitrata) (1 litre)

Sodyum klorür (Merck, Darmstadt, Germany)..... 175,2 gr

Tri sodyum-sitrat (Merck, Darmstadt, Germany)..... 88,2 gr

700 ml distile suda eritilerek 1 litreye tamamlandı. pH=5,98'e ayarlandı. Otoklavda sterilize edildi ve buzdolabında +4°C'de muhafaza edildi.

2. 2XSSC (500 ml)

50 ml 20XSSC solüsyonuna 450 ml distile su ilave edilerek 2XSSC hazırlandı. pH=7'ye ayarlanır.

3. Aseton.

4. %70, %80 ve %100'lük etil alkol serisi.

5. Bir tane %70'lik ve üç tane %50'lik formamide çözeltisi (50 ml).

Formamide (HCONH₂, Merck, Darmstadt, Germany)

6. %70'lik formamide..... 35 ml 2XSSC + 15 ml formamide

%50'lik formamide..... 25 ml 2XSSC + 25 ml
formamide

Formamid'in toksik olması nedeniyle çözeltiler çeker ocakta
hazırlandı.

7. DAPI (4,6-diamino-2-phenyl-indole) yüzey boyası (Cytocell, Banbury
Business Park Addenbury, Oxfordshire, United Kingdom)
8. PI (Propidium iodide) yüzey boyası ($C_{27}H_{34}N_4I_2$, Serva, Heidelberg,
Germany).
9. NP-40 yıkama solüsyonu (Nonidet NP-40, Amresco, Solon, Ohio,
United States).

50 ml 2XSSC solüsyonu içerisine 50 μ l NP-40 ilave edilerek hazırlandı.

b. Kullanılan Gereçler

1. 0,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpleri.
2. Mikropipet ve uçları (1, 10 ve 100 μ l'lik).
3. 37°C'a ayarlanmış benmari.
4. 65°C'a ayarlanabilen benmari.
5. Plastik şale.
6. Lamel.
7. Rubber solüsyonu (Fixogum Rubber Cement, Marabu, Germany).
8. Floresans mikroskop.
9. İmmersiyon yağı.

c. Problar

Kromozom 8q24 (C-MYC) / α -satellit 8 kokteyl prob (Q.BIO gene, Deutschland, France).

C-MYC spesifik DNA probu rhodamine ile direk işaretli olup interfaz yaymalarında 8q24 bölgesi üzerinde yer alan C-MYC geninin kopya sayısını tespit etmek için kullanıldı.

Kromozom 8 α -satellit prob ise fluorescein ile direk işaretli olup kromozom 8 kazancını incelemek için kullanıldı.

d. Hedef Örneklerin Hazırlanması

1. Patolojik inceleme sonucunda elde edilen pozitif vaka preparatlarında, elmas uçlu bir kalemle hibridizasyon alanı işaretlendi.
2. Preparat, şaleye konulan 2XSSC solüsyonunda 37°C'de 15 dakika bekletildi.
3. %70, %85 ve %100'lük alkol serisinde ikişer dakika tutuldu.
4. Asetonda 10 dakika bekletildi.

e. Prob Hazırlanması

Her bir hedef saha için mikrosantrifüj tüpüne 8 μ l prob kondu. İçinde prob bulunan ependorf tüpler vortekslenerek mikrosantrifüjde çöktürüldü.

f. Denatürasyon ve Hibridizasyon

1. Asetondan çıkarılıp havada kurutulan preparatlar, denatürasyon solüsyonunda (%70'lik formamid) 67°C'de 6 dakika denatüre edildi.
2. Denatüre edilen preparatlar hemen 3 dakika için -20°C'deki %70'lik alkole alındı.

3. İkişer dakika için %85 ve%100'lük alkol serisinden geçirilerek kurutuldu.
4. Prob 85°C'lik benmaride preparatlarla eş zamanlı olarak 10 dakika denatüre edildi.
5. Preparattaki hedef alana toplam 8µl denatüre prob konularak lamel kapatıldı.
6. Lamelin kenarları rubber solüsyonu ile kapatıldı.
7. Preparatlar 37-40°C benmaride yaklaşık 20 saat bekletilerek prob ile hedef DNA'nın hibridizasyonu sağlandı.

g. Hibridizasyon Sonrası Yıkama ve Görüntüleme

Yıkama işlemiyle spesifik olarak hibridize olmayan problemlerin ortamdan uzaklaştırılması ile sinyal kalitesinin artırılması sağlandı.

1. Lamelin etrafındaki rubber solüsyonu uzaklaştırıldı.
2. Preparatlar lamellerin düşmesi için 44°C benmaride 2xSSC solüsyonuna konularak 5 dakika için bekletildi.
3. 44°C benmaride, içinde %50'lik formamid bulunan üç şalenin her birinde 5 dakika tutuldu.
4. 44°C benmaride, içinde 2xSSC solüsyonunu bulunan iki şalenin her birinde 5 dakika bekletildi.
5. 44°C benmaride, içinde NP-40 yıkama solüsyonu bulunan şalede 5 dakika bekletildi ve havada kurumaya bırakıldı.
6. Hedef alana 8,5µl DAPI ve 1,5 µl PI karışımı eklenerek lamel ile kapatıldı.

7. +4°C’de en az 1 saat bekletildikten sonra fluoresans mikroskopta incelendi.

Prob hazırlanması, denatürasyon, hibridizasyon, yıkama ve görüntüleme aşamalarının karanlık ortamda yapılmasına dikkat edildi. Bunun temel nedeni flouresan maddelerle işaretli olan problemlerin ışık varlığında renklerinin solması ve bunun da sinyal kalitesini etkilemesidir (2, 17).

FISH analizi için interfaz hücrelerinin incelenmesinde fluoresans mikroskop kullanıldı. Bu mikroskop uni-color FISH için özel olarak filtrelendirilmiştir.

4.4 İstatistik Analizler

Veriler SPSS (Statistical Packages of Social Sciences, SPSS for Windows, Version 9.0, Inc, Chicago, IC, USA) programına kaydedilmiştir. Hata kontrolleri, tablolar ve istatistik analizler yine bu programda yapılmış, verilerin önemlilikleri ki-kare, fisher ki-kare analizi yapılarak sınanmış, aritmetik ortalamaları standart sapma ile gösterilmiştir (69).

5. SONUÇLAR

Çalışmaya alınan toplam 24 hastadan BPH'li olan 9 vaka kontrol olarak kullanıldı. Tüm vakaların yaş ortalaması 68,87 (47-90) (Standart sapma 10,46) olarak belirlendi. Uzman bir patoloğ tarafından hücre sitolojisi açısından değerlendirilen toplam 24 hastanın 6'sı PIN, 9'u prostat adenokarsinomu ve 9'u BPH tanısı aldı. PIN tanısı alan hastaların yaş ortalaması 68,16 (Standart sapma 4,53), BPH tanısı alan hastaların yaş ortalaması 60,44 (Standart sapma 6,44) ve adenokarsinom tanısı alan hastaların yaş ortalaması 77,71 (Standart sapma 9,52) olarak belirlendi. Üç grup arasında yaş ortalaması açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0.05$). Çalışmaya alınan 15 vakadan 2'sinde metastaz (bir vakada pelvik lenfoid nod ve diğerinde kürek kemiği) mevcuttu ve 2 vaka lokal olarak rekürrent prostat adenokarsinomuydu. Tüm vakalarda kanserin primer odağı prostat olup diğer dokulardan metastaz yoluyla gelişen vakalar çalışmaya alınmamıştır. Toplam 24 vakanın tümünde FISH yöntemi başarıyla uygulanmıştır. Adenokarsinom tanısı alan vakalar farklı gleason skorlarında olmakla beraber tümörlerin %78'i (8 vaka) Gleason Skor 9-10 ve %22.2'si (2 vaka) 6-7 içinde yer almaktaydı.

4.1 Anomalilerin Ortaya Konması İçin FISH Kriterleri

Probun sinyal yeterliliğinin test edilmesi için 1 interfaz kan ve BPH preparatında üretici firmanın prosedürüne uygun olarak standart interfaz-FISH uygulandı. Her preparatta toplam 100 hücredeki sinyaller sayıldı. Kan ve BPH preparatlarında hibridizasyon yeterliliği %95'den daha yüksekti.

Çalışmaya alınan vakalarda standart olarak uygulanan FISH yönteminde, bazı vakalarda incelenen problemler için bu oran daha düşüktü. Her vaka için 1 preparata FISH uygulandı ve her preparatta 100 hücrede C-MYC ve sentromer 8 sinyalleri sayılarak 100 hücredeki ortalama sinyal sayıları hesaplandı.

Adenokarsinomlarda hücrelerin en az %70'inden daha fazlasında sentromer 8 probu için 3 veya daha fazla sinyal alındığı durumlar kromozom 8'in basit kazancı olarak değerlendirildi. Hücrelerin en az %70'inden daha fazlasında C-MYC için 3 veya daha fazla sinyalin alındığı durumlar C-MYC kopya sayısının kazancı şeklinde değerlendirildi. Tablo 1'de adenokarsinomlarda hücrelerin %70'inden daha fazlasında görülen sinyal sayısı verilmiştir.

PIN'lerde hücrelerin %20'sinden daha fazlasında sentromer 8 probu için 3 veya daha fazla sinyal alındığı durumlar kromozom 8'in basit kazancı olarak değerlendirildi. Hücrelerin en az %20'sinden daha fazlasında C-MYC için 3 veya daha fazla sinyalin alındığı durumlar C-MYC kopya sayısının kazancı şeklinde değerlendirildi. Tablo 2'de PIN'lerde hücrelerin %20'sinden daha fazlasında görülen sinyal sayısı verilmiştir.

PIN ve adenokarsinomlarda 100 hücredeki ortalama sinyal sayıları hesaplandı ve C-MYC/sentromer 8 oranının 1.1'den büyük olduğu durumlarda C-MYC geninin amplifiye olduğu kabul edildi. Vaka 6 ve 8'de sırasıyla hücrelerin %70'inden daha fazlasında sentromer 8 için 3 ve 2, C-MYC için 4 ve 3 sinyal alındığından dolayı C-MYC/sentromer 8 oranı 1.1'in üstünde olmasına rağmen bu vakalar amplifikasyon değerlendirmesine alınmamıştır. Yine vaka 14'de hücrelerin %20'sinden daha fazlasında sentromer 8 için 2 ve C-MYC için 3 sinyal alındığından C-MYC/sentromer 8 oranı 1.1'in üstünde olmasına rağmen bu

vaka amplifikasyon değerlendirmesine alınmamıştır. Tablo 3 ve 4’de tüm vakalar için 100 hücredeki ortalama sinyal sayısı ve C-MYC/sentromer 8 oranı verilmiştir. Tablolarda hem C-MYC hem de kromozom 8 için 2 sinyalin alındığı durumlar normal veya dizomik olarak değerlendirilirken her iki prob içinde 3 ve üstü sinyalin alındığı durumlar ise kazanç olarak değerlendirilmiştir.

Vakalar C-MYC’nin ekstra kopyalarının varlığına göre 3’e bölündü.

Bunlar;

- a. Kromozom 8 sentromeri ve C-MYC için alınan sinyallerin birbirine yakın olduğu durumlar kromozom 8’in basit kazancı şeklinde değerlendirildi.
- b. Hücrelerin çoğunda C-MYC için alınan sinyallerin kromozom 8 sentromeri için alınan sinyallere göre fazla olduğu durumlar (Örneğin; Vaka 6’da hücrelerin çoğunda C-MYC için 4 sinyal alınırken sentromer 8 için 3 sinyal alınmıştır) 8q kazancı olarak değerlendirildi.
- c. Kromozom 8 sentromerine göre C-MYC için alınan sinyallerin büyük orandaki artışları amplifikasyon olarak değerlendirildi.

Tablo 5 ve 6’da C-MYC gen amplifikasyonu, C-MYC’nin ekstra kopya sayısı ve kromozom 8 kazancı dağılımları gösterilmiştir.

Tablo 1: Adenokarsinomlarda hücrelerin %70'inden daha fazlasında görülen sinyal sayılarının dağılımı.

Hasta No	Hücrelerin %70'inden Daha Fazlasında Görülen Sinyal Sayısı	
	CEP 8	C-MYC
1	4	4
2	3	3
3	4	4
4	4	4
5	6	6
6	4	3
7	4	4
8	2	3
9	3	3

Tablo 2: PIN'lerde hücrelerin %20'sinden daha fazlasında görülen sinyal sayılarının dağılımı.

Hasta No	Hücrelerin %20'sinden Daha Fazlasında Görülen Sinyal Sayısı	
	CEP 8	C-MYC
10	3	3
11	2	2
12	2	2
13	2	2
14	2	3
15	2	2

Tablo 3: Adenokarsinomlarda, hücrelerdeki ortalama sinyal sayısı temel alındığında C-MYC ve kromozom 8 kazancı dağılımları.

Hasta No	Nükleuslardaki Ortalama sinyal Sayısı		Ortalama MYC/CEP8 Sinyal Oranı	FISH Sınıflandırması	
	Kromozom 8 için	C-MYC için		8 Sentromeri	C-MYC
1	373	386	1.03	Kazanç	Kazanç
2	272	308	1.13	Kazanç	Kazanç
3	378	385	1.01	Kazanç	Kazanç
4	384	400	1.04	Kazanç	Kazanç
5	596	618	1.03	Kazanç	Kazanç
6	318	389	1.22	Kazanç	Kazanç
7	387	391	1.01	Kazanç	Kazanç
8	395	225	1.75	Normal	Kazanç
9	250	271	1.08	Kazanç	Kazanç

Tablo 4: PIN'lerde, hücrelerdeki ortalama sinyal sayısı temel alındığında C-MYC ve kromozom 8 kazancı dağılımları.

Hasta No	Nükleuslardaki Ortalama sinyal Sayısı		Ortalama MYC/CEP8 Sinyal Oranı	FISH Sınıflandırması	
	Kromozom 8 için	C-MYC için		8 Sentromeri	C-MYC
10	214	218	1.01	Kazanç	Kazanç
11	180	174	1.03	Normal	Normal
12	178	191	1.07	Normal	Normal
13	186	197	1.05	Normal	Normal
14	181	209	1.15	Normal	Kazanç
15	180	183	1.01	Normal	Normal

Tablo 5: Hastaların (Adenokarsinom) patolojik tanı, C-MYC gen amplifikasyonu, kromozom 8 kazancı ve C-MYC ekstra kopya sayısı dağılımları.

Hasta No	Hastanın Yaşı	Gleason Skoru	Pleomorfizm	C-MYC Amplifikasyonu	Kromozom 8 Kazancı	C-MYC Ekstra Kopya Sayısı
1	80	9 (5+4)	4	-	+	+
2	90	9 (5+4)	4	+	+	+
3	86	9 (5+4)	4	-	+	+
4	82	10 (5+5)	3	-	+	+
5	84	10 (5+5)	4	-	+	+
6	77	10 (5+5)	4	-	+	+
7	64	10 (5+5)	3	-	+	+
8	75	6 (3+3)	2	-	-	+
9	62	7 (3+4)	3	-	+	+

Tablo 6: Hastaların (PIN) patolojik tanı, C-MYC gen amplifikasyonu, kromozom 8 kazancı ve C-MYC ekstra kopya sayısı dağılımları.

Hasta No	Hastanın Yaşı	Pleomorfizm	C-MYC Amplifikasyonu	Kromozom 8 Kazancı	C-MYC Ekstra Kopya Sayısı
10	71	PIN (3)	-	+	+
11	68	PIN (2)	-	-	-
12	62	PIN (2)	-	-	-
13	68	PIN (1)	-	-	-
14	75	PIN (2)	-	-	+
15	65	PIN (1)	-	-	-

PIN ve adenokarsinomların %60'ında kromozom 8 kazancı ve %66.6'sında C-MYC ekstra kopya sayılarının varlığı saptandı. Adenokarsinomların %88.8'inde kromozom 8 kazancı ve %100'ünde C-MYC ekstra kopyalarının varlığı gösterildi. PIN'lerin %16.6'sında kromozom 8 kazancı ve C-MYC geninin ekstra kopyalarının varlığı %33.3'ünde bulundu. 8q kazancı tüm vakaların %20'sinde, adenokarsinomların %22.2'sinde ve PIN'lerin %16.6'sında gösterildi. BPH'li vakaların hiçbirinde C-MYC ekstra kopya sayısı yada amplifikasyonu ve kromozom 8 kazancı gösterilemedi. C-MYC gen amplifikasyonu PIN ve adenokarsinom tanısı alan vakaların %6.6'sında, adenokarsinomların %11.1'inde bulunurken PIN ve BPH'lilerin hiçbirinde bulunamadı.

Çalışmamıza alınan 2 rekürrent tümörde hücrelerin çoğunda C-MYC ve kromozom 8 için 4 sinyal alındı (%100). Kromozom 8 için 6 primer tümörün 2'sinde 4, 3'de 3 ve bir tanesinde 2 sinyal alındı. C-MYC ekstra kopya sayısı, primer tümörlerin 2'sinde 4 ve 4 tanesinde 3 olarak belirlendi.

Çalışmamızda tüm adenokarsinom vakalarının %88.8'inde, Gleason Skor 9-10 arasındaki vakaların %100'ünde ve Gleason Skor 6-7 olanların %50'sinde kromozom 8 kazancı tespit edildi.

Çalışmamızda kromozom 8 için PIN ve adenokarsinomların %26.6'sında 3 sinyal, %26.6'sında 4 sinyal ve %6.6'sında 6 sinyal alındı.

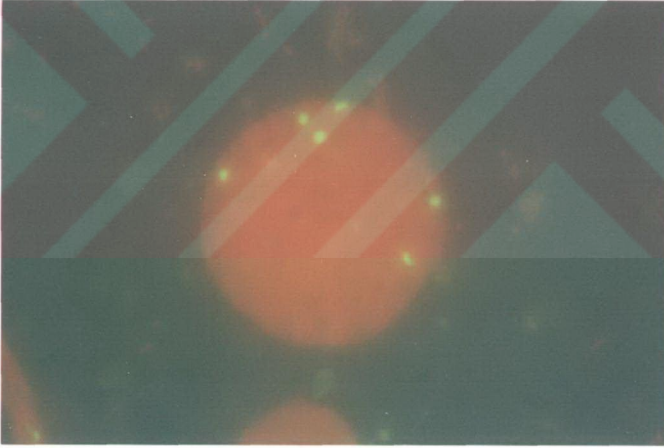
C-MYC ve kromozom 8 için alınan sinyaller ve metastaz arasında anlamlı bir ilişki bulunamadı (Sırasıyla; $p=0.14$, $p=0.95$). Ancak liner korelasyon testinde kromozom 8 için alınan sinyallerle metastaz arasında anlamlı bir ilişki bulundu ($p=0.038$).

Fisher ki-kare testinde C-MYC ve kromozom 8 için alınan sinyallerle rekürrens arasında anlamlı bir korelasyon bulunamadı (Sırasıyla; $p=0.14$, $p=0.95$). Ancak liner korelasyon testinde kromozom 8 için alınan sinyallerle metastaz arasında anlamlı bir ilişki bulundu ($p=0.04$).

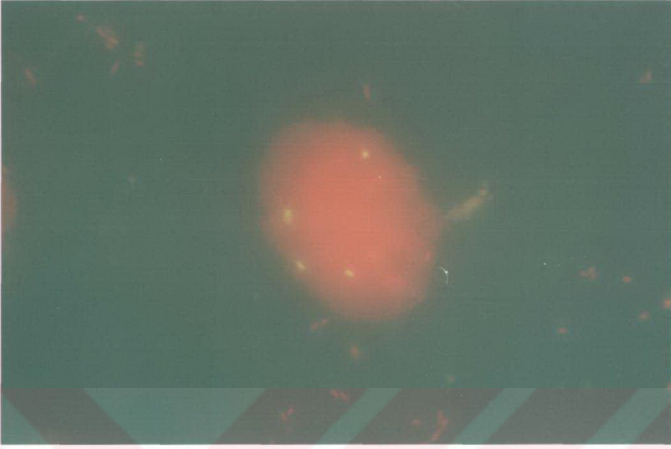
Pleomorfizm ile metastaz yada nüks arasında korelasyon bulunamadı (Sırasıyla; $p=0.48$, $p=0.48$).

Hücrelerin çoğunluğunda C-MYC ve kromozom 8 için alınan sinyalleri PIN ve karsinomalarda karşılaştırdığımızda iki grup arasında anlamlı bir fark olduğunu ortaya koyduk (Sırasıyla; $p=0.02$ ve $p=0.04$).

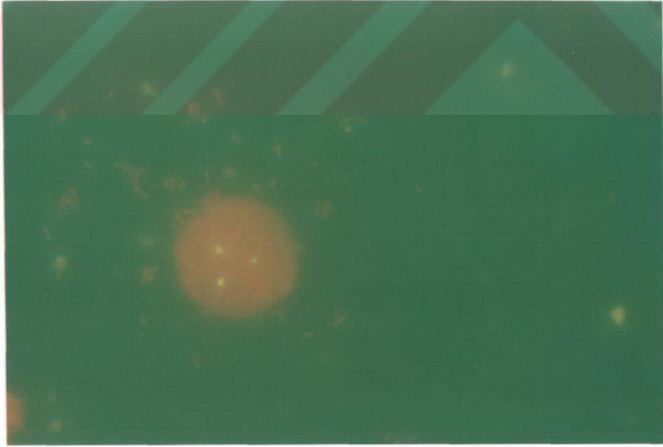
Şekil 4 (A-F): PK, PIN ve BPH'li hastaların doku örneklerinde FISH yöntemiyle kromozom 8 ve C-MYC geni için belirlenen belirlenen aberasyonların floresans mikroskopta görünümü.



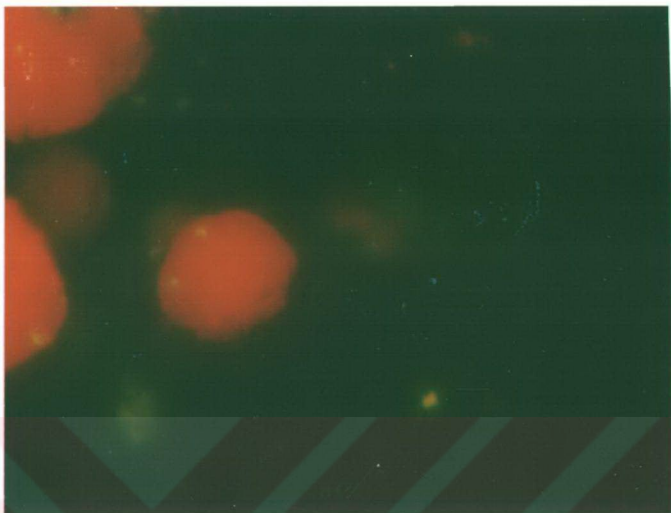
4. A. Kromozom 8 poliploidisi (X100)



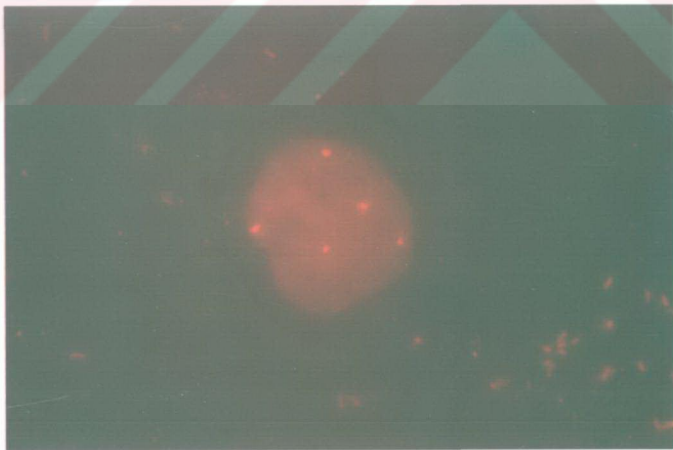
4. B. Kromozom 8 poliploidisi (X100)



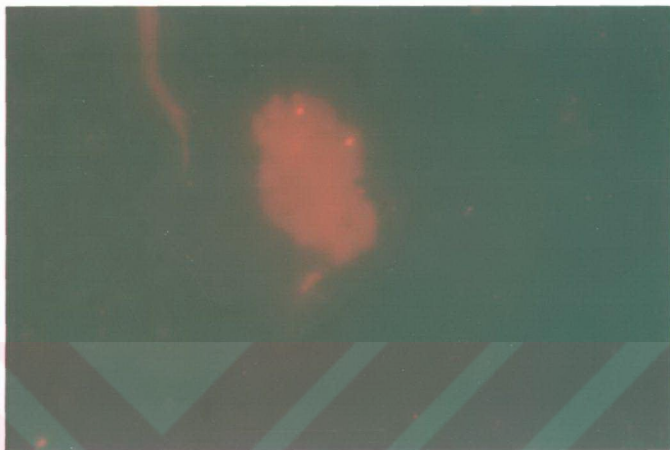
4. C. Kromozom 8 poliploidisi (X100)



4. D. Kromozom 8 dizomisi (X100)



4. E. C-MYC gen poliploidisi (X100)



4. F. C-MYC gen dizomisi (X100)

6. TARTIŞMA

Androjen bağımlı ve androjen bağımsız PK'nin gelişimi ve progresyonunun genetik instabilitenin bir sonucu olarak meydana gelen pek çok genetik değişikliğin gerçekleşmesiyle ortaya çıktığına inanılmaktadır. Hastalığın doğası ve sorumlu olan genetik mekanizmalar hala çok az anlaşılmıştır (52, 62). PK'inde kromozomal bölgelerden bazıları sıklıkla değişmektedir. Bu bölgelerde PK'nin gelişiminde ve progresyonunda önemli rol oynayan onkogen ve tümör süpressör genlerinin yer aldığı görüşü hakimdir. Yaygın olarak kaybedilen bölgeler 8p, 13q, 1p, 10q, 17q, 19 ve 22'dir. Yaygın olarak kazanılan bölgeler 8q, 7q, Xq, 18q ve 8p'dir. Bu bölgelerdeki değişimlerin çoğu CGH, FISH veya LOH çalışmalarıyla PK'nin erken dönemlerinde ortaya konabilir (65).

Solid tümörlerin sitogenetiği kültür kurmadaki sorunlar, kontaminasyon, düşük mitotik indeks ve kompleks aneuploidy gibi nedenlerden dolayı oldukça güçtür. FISH metodunda kullanılan problemlerin kromozomun tümüne spesifik, sentromerik ve lokus spesifik olması bu metodu, çeşitli sayısal değişikliklerin yanı sıra mikradelesyon ve spesifik gen dizilerinin amplifikasyonunun tespitine de elverişli kılmaktadır (97). Çalışmamızda kullandığımız interfaz-FISH metodu, interfaz hücrelerine uygulanması ve başarı oranının oldukça yüksek olmasından avantajlı sayılmaktadır.

Çalışmamızda saptadığımız C-MYC'nin ekstra kopya sayılarının görülmesine çeşitli faktörler neden olabilir.

a. 8p kayıpları prostat tümörigenezisinin erken dönemlerinde gerçekleşmektedir. Tümörigenezisin erken dönemi olarak kabul edilen PIN'lerde 8p'nin (8p25, 8p12-22) LOH'u gösterilmiştir. 8p'nin kaybının ve 8q kazancının ilerlemiş PK'nde i(8q) oluşumuna neden olabileceği ileri sürülmektedir (47, 58, 65).

b. Tümör dokusundaki yüksek proliferasyon indeksinden dolayı kromozomların kromatidlerine ayrılmış olması C-MYC'nin ekstra kopya sayılarının görülmesine neden olabilir (11).

Nupponen ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, 37 rekürrent prostat karsinoma dokusunun (1 tanesi Grade 1, 15 tanesi Grade 2 ve 21 tanesi Grade 3) parafin bloklarından aldıkları kesitlerde C-MYC lokus spesifik ve sentromer 8 problemleriyle FISH ve CGH (Comparative genomic hybridization) metodlarını kullanmışlardır (65). FISH ve CGH sonuçlarının vakaların %78'inde tutarlı olduğunu bulmuşlardır. Vakaların %73'ünde 8q kazancı ve %29'unda C-MYC gen amplifikasyonunun varlığını göstermişlerdir. Ayrıca primer ve rekürrent tümörlerdeki yaygın kromozomal değişimleri karşılaştırdıklarında 8. kromozomun p kolunun kaybı ve q kolunun kazancını her iki grupta benzer oranlarda olduğunu ortaya koymuşlardır. Hem primer hem de rekürrent tümörlerde 6 vakanın 4'ünde 8p'nin kaybını, primer tümörlerde 6 vakanın 4'ünde ve rekürrent tümörlerde 6 vakanın 5'inde 8q kazancı varlığını ortaya koymuşlardır. Hormon bağımlı PK'nde yalnızca primer tümörlerde ölçülebilen markırların hormon bağımlı PK'nin biyolojik özelliklerinin sınırlı bir kısmına sahip olduğunu ileri sürmüşlerdir. 8q kazancının primer tümörlerle karşılaştırıldığında rekürrent tümörlerde daha fazla olduğunu belirtmektedirler. Kromozom 8 sentromerinin ekstra kopyalarının varlığının kısa progresyonla ve 8q24

bölgesinin amplifikasyonunun lenfoid nod metastazlarının varlığıyla beraberlik gösterdiğini rapor etmişlerdir. Özellikle 8q kazancının hastalığın progresyonuyla beraberlik gösterdiğini ve tümör progresyonunda önemli bir mekanizma olabileceğini ileri sürmektedirler (65).

Çalışmamıza alınan 2 rekürrent tümörde hücrelerin çoğunda C-MYC ve kromozom 8 için 4 sinyal alındı. Kromozom 8 için 6 primer tümörün 2'sinde 4, 3'de 3 ve bir tanesinde 2 sinyal alındı. C-MYC için, primer tümörlerin 2'sinde 4 ve 4 tanesinde 3 sinyal alındı. Çalışmamızda primer ve rekürrent tümörlerde kromozom 8'in basit kazancı ve C-MYC ekstra kopya sayısı açısından benzer sonuçlar elde ettik. Vakaların %20'sinde (2'si adenokarsinom 1 tanesi PIN) 8q kazancını gösterdik. Bu bulgu Nupponen ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada elde ettikleri sonuçtan tamamen farklıdır. Bu farklılık çalışmaya aldığımız vakaların sınırlı sayıda olmasından kaynaklanabilir.

Jenkins ve arkadaşları hormon veya radyasyon terapisi almamış, klinik olarak lokalize 25 prostat kanser dokusunun parafin bloklarından aldıkları kesitlerde 7, 8, 10, 12, 8, Y için sentromerik ve C-MYC için lokus spesifik probler kullanarak FISH metodunu uygulamışlardır (40). Toplam 71 karsinoma lokusu (Gleason Skorları: 4-6 olan 28 lokus, 7 olan 20 lokus ve 8-10 olan 23 lokus), 48 PIN lokusu ve 23 lenfoid nod metastaz lokusunu incelemişlerdir. C-MYC'nin ekstra kopyalarının görüldüğü lokuslar kromozom 8 kazancı açısından 3'e bölmüşlerdir. a) C-MYC ve kromozom 8 için alınan sinyallerin birbirine yakın olduğu durumları kromozom 8'in basit kazancı şeklinde değerlendirmişlerdir. Basit kromozom 8 kazancını, PIN'lerin %42, karsinomaların %25 ve lenfoid nod metastazlarının %46'sında tanımlamışlardır. b)

Kromozom 8 sentromerine göre C-MYC için orta derecede sinyalin alındığı durumlardır. PIN'lerin %8'inde, karsinomaların %11'inde ve lenfoid nod metastazlıların %25'inde bulmuşlardır. c) Kromozom 8 sentromerine göre C-MYC için çok yüksek düzeyde sinyallerin alındığı durumları C-MYC amplifikasyonu olarak değerlendirdiklerinde PIN'lerin hiçbirinde, karsinomaların %8'inde ve metastazlıların %21'de C-MYC amplifikasyonu tespit etmişlerdir. PIN ve karsinomada en yaygın anomalinin kromozom 8 kazancı olduğunu ve kromozom 8 kazancının Gleason Skoru ile beraberlik gösterdiğini ortaya koymuşlardır. Gleason Skor 4-6 arasında olan lokusların %19'unda, 7 olanların %25'inde ve 8-10 olanların %31'inde kromozom 8'in basit kazancını tespit etmişlerdir. Gleason Skor 4-6 olanların 4'ünde, 7 olanların 11'inde ve 8-10 olanların %11'de C-MYC gen amplifikasyonunu göstermişlerdir. İntra tümöral ve intra glandular genetik heterojenite varlığının oldukça yaygın olduğunu belirlemişlerdir. PIN'lerin, karsinomaların öncü lezyonları olduğunu ileri sürmüşlerdir (40).

Çalışmamızda benzer kriterler kullandığımızda; a. Kromozom 8 kazancı kanserlerin %88.8'inde ve PIN'lerin %16.6'da saptandı, b. Kromozom 8'e göre C-MYC'nin ekstra kopyalarının varlığı karsinomaların %22.2'sinde ve PIN'lerin %16.6'sında saptandı, c. C-MYC gen amplifikasyonu, karsinomaların %11.1'inde tespit edilirken PIN'lerin hiçbirinde tespit edilemedi. Çalışmamız PIN'lerde C-MYC gen amplifikasyonunun tespit edilememiş olması yönünden Jenkins ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmayla tutarlıdır. Çalışmamızda kromozom 8 basit kazancının yüksek oranda bulunmasının temel nedeni Gleason Skor'larının yüksek olmasıdır.

Miyoshi ve arkadaşları 33 primer tümör, 4 lenfoid nod metastazlı, 5 androjen terapisi almış rekürrent tümör olmak üzere toplam 42 prostat kanser örneğinden elde ettikleri taze dokulardan hazırladıkları preparatlarda C-MYC ve sentromer 8 problemleri kullanarak FISH metodunu uygulamışlardır. Tüm PK örneklerinin %54'ünde, yeni tanı konmuş prostat kanserlerinin %42.4'ünde ve lenfoid nod metastazlarının %100'ünde kromozom 8 kazancının varlığını tespit etmişlerdir. Kromozom 8 kazancını androjen deprivasyon terapisi almış olan tümörlerin tümünde bulmuşlardır. Tümör rekürrensi ve kromozom 8 kazancı arasında paralellik gösterememişlerdir. Bununla birlikte kromozom 8 kazancı ve Gleason Skoru arasında paralellik olduğunu belirtmektedirler. Kromozom 8 kazancını, Gleason Skor 9-10 olan vakaların tümünde ve Gleason skor 6-7 olan vakaların %43.7'sinde göstermişlerdir ve C-MYC gen amplifikasyonunu tüm vakaların %14.3'ünde bulmuşlardır (62).

PK'nde gen amplifikasyonu diğer pek çok kanserle karşılaştırıldığında daha azdır. CGH analizleriyle prostat kanserinin erken dönemlerinde 8q üzerinde yaygın olarak amplifiye olan iki bölge tanımlanmıştır. Bu bulgular 8q kazancının 2 hedef genin kopya sayısındaki artışa ilaveten aktivasyonlarında da artışa neden olduğunu doğrular niteliktedir. Bu genlerden biri C-MYC (8q24)'dir. Diğer 8q24.2'de lokalize olan PSCA (Prostat Stem Cell Antijen) genidir. PSCA bir hücre yüzey reseptörü olup normal prostat epitel hücrelerinin %20'sinde sentezlenmektedir ve bu oran artan yaşla azalmaktadır. PSCA ekspresyonu tümör stage, grade ve androjen bağımsız PK'nin gelişimiyle paralellik gösterir. Primer prostat kanserlerinin %94'ünde ve kemik metastazlarının %100'ünde tespit edilmiştir. Prostat kanserlerinin %80'inden daha

fazlasında allelik kazancı gerçekleşmektedir. Bu kazanç büyük oranda 8q'nun kazancından kaynaklanmaktadır (23, 33, 75, 100).

Reiter ve arkadaşları 20 PK dokusunun parafin bloklarından aldıkları kesitlerde yaptıkları FISH çalışmasında sentromer 8 ve PSCA (Prostat Stem Cell Antijen) - C-MYC lokus spesifik problemleri kullanmışlardır. Hastaları farklı Gleason Skor'larına (7-10 (17 tümör) ve 6 (3)) sahip olanlardan seçmişlerdir. Vakaların %40'ı (8 vaka) her 3 sinyal içinde normal olarak bulmuşlardır. Vakaların %25'inde (5 vaka) her 3 sinyal için basit bir kazancın (hepsi için 3 sinyal) varlığını göstermişlerdir. Kalan 7 vakada (%35) sentromer 8'e göre C-MYC'nin ekstra kopyalarının varlığını tespit etmişlerdir. Gleason Skor 9-10 içerisinde yer alan vakaların tümünde C-MYC ve basit kromozom 8 kazancını tespit etmişlerdir. MYC ve PSCA kopya sayılarının vakaların %90'ında (20/19) uyumlu olduğunu göstermişlerdir. MYC ve PSCA'nın bu uyumunun lokal olarak ilerlemiş prostat kanserlerinde yaygın bir özellik olduğunu ileri sürmüşlerdir (76).

Çalışmamızda tüm adenokarsinom vakalarının %88.8'inde, Gleason Skor 9-10 arasındakilerin %100 (9 vakanın 7'si)'ünde ve 6-7 olanların %50'sinde kromozom 8 kazancı tespit edildi. Çalışmamız hem Yasuhide ve arkadaşları hem de Reiter ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalarla tutarlıdır. Bu özellikle kromozom 8 kazancı ve yüksek Gleason Skor'u arasında paralellik olduğunu desteklemektedir.

Visakorpi ve arkadaşları yaptıkları benzer bir çalışmada, 8q kazancının primer kanserlere göre lokal olarak rekürrent kanserlerde daha fazla olduğunu bulmuşlardır ve 8q DNA dizilerinin amplifikasyonunu lenfoid nod metastazlarında %75 olduğunu belirtmektedirler. PIN ve karsinoma lokuslarında sayısal kromozomal anomalilerin ve

ekstra C-MYC kopya sayılarının sıklığının benzer oranlarda olduğunu bulmuşlardır (98).

Bubendorf ve arkadaşları toplam 371 prostat dokusunun [32'si BPH, 223 primer tümör, 54 lokal olarak rekürrent ve 62 metastaz dokusu (metastazik dokular pelvik lenfoid nod (8), akciğer (21), karaciğer (16), plevra (5), adrenal bez (5), böbrek (2), Mediasten lenfoid nodu (1), periton (1), mide (1) ve üreter (1)] parafin bloklarından aldıkları kesitlerde sentromer 8 ve C-MYC lokus spesifik problemler kullanarak çalışmışlardır. Metastatik dokuların 5 tanesinde (%10.6) yüksek düzeyde ve lokal olarak rekürrent vakaların 2'sinde (%4.3) C-MYC gen amplifikasyonunu bulmuşlardır. 168 primer ve 31 BPH'nin hiçbirinde C-MYC gen amplifikasyonu bulamamışlardır. C-MYC gen amplifikasyonunun metastatik prosesle beraberlik gösterdiğini ileri sürmektedirler (9).

Çalışmamızda metastazı olan 2 vakadan birinde kromozom 8 ve C-MYC için 4 sinyal aldık. Diğer vakada kullanılan her iki prob içinde hücrelerin büyük çoğunluğunda 6 sinyal alındı. Çalışmaya alınan tümörler içerisinde en yüksek sinyal ortalamasına sahip olan vakada (6 sinyal) ve diğerinde C-MYC gen amplifikasyonu tespit edilemedi. Çalışmamızda kromozom 8 kazancı ile metastaz arasında lineer korelasyon ($p=0.04$) bulundu. Çalışmamız, Bubendorf ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmayla BPH'li vakaların hiçbirinde C-MYC gen amplifikasyonu tespit edilememiş olması yönünden tutarlıdır.

Sato ve arkadaşları yaptıkları benzer bir çalışmada 8p (lipoprotein), sentromer 8 ve C-MYC lokus spesifik problemler kullanarak FISH çalışması yapmışlardır. Toplam

144 hastanın tümünü yüksek stage ve grade'li olan vakalardan seçmişlerdir. 8p22'nin değişimlerinin sistemik progresyon veya hasta ölümü ile istatistik olarak anlamlı bir beraberlik göstermediğini, bunun yanında C-MYC değişimlerinin hem sistemik progresyon ($p=0.024$) hem de hasta ölümü ($p=0.039$) ile beraberlik gösterdiğini ortaya koymuşlardır (82).

Alers ve arkadaşları 56 hastanın (23 primer, 48 bölgesel lenfoid nod metastazlı, 15 uzak metastazlı) formalinde fikse edilip parafine gömülmüş olan dokularını ekstrakte ederek CGH metodunu kullanmışlardır. Kromozom 8q kazancının progresif ve non-progresif tümörler arasında doğru bir ayırım yaptığını ileri sürmüşlerdir ($p=0.005$) (3).

Kaltz-Wittmer ve arkadaşları lokal olarak rekürrent veya metastaz yapmış olan toplam 63 hastanın PK dokularının parafin bloklarından aldıkları kesitlerde yaptıkları çalışmada C-MYC lokus spesifik probler kullanmışlardır. ADT (Androjen deprivasyon terapisi)'nden önce tümörlerin %33'ünde C-MYC gen amplifikasyonunun varlığını göstermişlerdir. ADT'den sonra amplifikasyon oranını %57 olarak belirlemişlerdir. 8q kazancı ADT'den önce %6, ADT'den sonra %89 ve metastatik olanların %85'inde belirlemişlerdir. ADT'den önce ve sonra gen kopya sayısındaki artışlar ve amplifikasyon androjen kontrolünden kaçış ve tümöre pozitif bir büyüme avantajı sağladığını ileri sürmektedirler (43).

Karashima ve arkadaşları 5 metastatik PK hastasından iğne biyopsisiyle elde ettikleri materyallerden "imprinting" yöntemini kullanarak FISH preparatı hazırlamışlardır. Kromozom 7 ve 8 için sentromerik probler kullanmışlardır. Biopsiler 1, 4, 12 ve 24. haftalarda alınmıştır. Hormonal terapi boyunca kromozom 7

ve 8'in artan sentromerik kopya sayılarına sahip hücre sayısının, 5 vakanın 4'ünde azaldığını göstermişlerdir. Kromozom 7 ve 8'in ekstra kopya sayılarındaki azalmanın terapi boyunca azalan PSA konsantrasyonu ile paralellik gösterdiğini tespit etmişlerdir. Hormonal terapinin kromozom 7 ve 8'in artan kopyalarına sahip hücrelerde etkili olduğunu ileri sürmektedirler. Kromozom 7 kazancından sonra kromozom 8 kazancının (sıklıkla tetrazomi 8 varlığı) en yaygın ikinci anomali olduğunu göstermişlerdir. Kromozom 8 kazancının yüksek stage ve grade ile paralellik gösterdiğini rapor etmişlerdir. Gleason Skor 6, 8 ve 9 olan 4 vakada her iki kromozom için anomali gösterdikleri halde, Gleason Skor 8 olan bir vakada incelenen her iki kromozom açısından herhangi bir anomali gösterememişlerdir. Sonuç olarak kromozom 7 ve 8 kazancının hormona duyarlı safhada uygulanan hormonal terapinin etkinliğini belirlemede potansiyel bir sitogenetik markır olduğunu belirtmektedirler (44).

Çalışmamızda kromozom 8 için tüm vakaların %26.6'sında 3 sinyal, %26.6'sında 4 sinyal ve %6.6'sında 6 sinyalin varlığını gösterdik.

Mark ve arkadaşları prostatektomi ile alınan 36 prostat kanser dokusunun parafin bloklarından aldıkları kesitlerde sadece C-MYC lokus spesifik probler kullanarak FISH metodunu kullanmışlardır. Hastalar Stage T2 ve T3 içerisinde olup farklı Gleason skorlarına sahiplerdi. Tümörlerin %31'inde C-MYC'nin ekstra kopyalarının (11 vakada hücrelerin %15 ve daha fazlasında 3 ve daha üstü sinyal ve bunların sadece %19'unda (7) hücrelerin %20 ve daha fazlasında 3'ün üstünde sinyal) varlığını göstermişlerdir. C-MYC onkogen amplifikasyonunun veya ekstra kopya sayılarının varlığının önemli bir bulgu olmadığını ileri sürmektedirler (59).

Latil ve arkadaşları 33 primer prostat kanserinde (23 klinik olarak lokalize, 10 uzak metastazlı ve 3 rekürrent) yaptıkları çalışmada telomeraz enziminin katalitik subuniti (Htert)'nin ekspresyonu ve C-MYC'nin overekspresyonu arasında paralellik olup olmadığını Real-Time PCR ile değerlendirmişlerdir. MYC over ekspresyonu ile "htert" ekspresyonu arasında anlamlı bir ilişki olduğunu bulmuşlardır ($p=0.0024$). C-MYC onkogeninin hücre transformasyonu ve immortalizasyonu sağlamasında telomeraz aktivitesinin artmasının önemli bir aşama olduğunu belirtmişlerdir. Real-Time PCR ile yaptıkları çalışmada 33 tümörün hiçbirinde C-MYC amplifikasyonu gösterememişlerdir. MYC over ekspresyonunda temel mekanizmanın gen amplifikasyonu olmadığını ileri sürmüşlerdir (51).

Çalışmamızda C-MYC gen amplifikasyonunu tüm vakaların %6.6'sında ve adenokarsinom tanısı alan vakaların %11.1'inde tespit ettik. C-MYC gen amplifikasyonu ile metastaz yada rekürrens arasında herhangi bir anlamlı ilişki gösterilememiştir. C-MYC amplifikasyonunu gösterdiğimiz vaka primer tümör olup herhangi bir tedavi almamıştır. Çalışmamız, C-MYC gen amplifikasyonun, overekspresyonda temel mekanizma olmayabileceğini ve temel mekanizmanın kromozom 8'in basit kazancı yada 8q kolunun kazancından kaynaklanan ekstra kopyaların varlığından kaynaklanabileceğini ileri süren diğer çalışmaları desteklemektedir.

Son zamanlarda "htert" geni östrojenlerin bir hedefi olarak tanımlanmıştır. Endometriumda menstrual siklus boyunca c-myc düzeyi, östrojen düzeyi ve "htert" ekspresyonu arasında paralellik olduğu gösterilmiştir. 17 β -östrodiolün MCF-7 meme

kanser hücre hattında östrojen reseptörü (ER)'ne bağlanmasıyla oluşan kompleks htert promotorunda yer alan östrojen cevap elementi (ERE)'ne bağlanarak "htert"'in transkripsiyonunu sağlamaktadır. Östrojenler ayrıca MCF-7 hücrelerinde C-MYC'nin ekspresyonunu da stimüle etmektedirler. Böylece östrojenler htert promoteri üzerinde direk veya indirek yollarla telomeraz aktivitesini arttırmaktadır (50). Östrojenler prostat stromasında benzer şekilde ER- α yoluyla etkilerini göstermektedirler. Östrodiol 17- β , ER- α 'ya yüksek bağlanma afinitesine sahiptir (39).

MYC bozuk Wnt/APC/ β -katenin yolunda geç bir hedef olarak tanımlanmıştır. APC mutasyonları β -kateninin nükleusta toplanmasına neden olmaktadır ve sonra β -katenin Tcf-4 (Tcell factor-4) transkripsiyon faktörüne bağlanmaktadır. Bu kompleks MYC'nin transkripsiyonel aktivasyonunun artmasına neden olmaktadır. APC geninin LOH'una prostat tümörlerinin %20'sinde rastlanmış ve β -katenin genindeki mutasyonlarda prostat kanserlerinde tespit edilmiştir. Bu yolun prostat kanserinde önemli bir rolü olabileceğini ve C-MYC'nin aktivasyonunu sağlayan bir mekanizma olabileceğini göstermektedir (51, 96).

Tümör süpressör gen özelliğine sahip olan MXI1 c-myc'nin partneri olan Max'la yarışarak, c-myc'nin transkripsiyonel aktivitesini baskılamaktadır. MXI1 prostat kanserinde sıklıkla değişmektedir. MBP-1 prostat kanserinde sıklıkla delesyona uğramaktadır. C-MYC'nin transkripsiyonel aktivitesini baskılamaktadır. 17q21 bölgesinin prostat kanserinde sıklıkla LOH'si gösterilmiş olup bu bölgede c-myc'nin negatif düzenleyicisi olan BRCA1 geni yer almaktadır (51).

Tümör süpressör gen özelliğine sahip olan ve 2q14'de yer alan BIN-1 geninin kodladığı protein c-myc ile etkileşmektedir. Bu bölge metastatik prostat kanserlerinde sıklıkla delesyona uğramaktadır. Prostat kanserlerinin %40'ında LOH'u gösterilmiştir. BIN-1'in kaybı veya inaktivasyonu MYC aracılı apoptozis veya farklılaşma sinyallerine duyarsız hücrelerin oluşumuna yardımcı olmaktadır ve c-myc'nin tam onkojenik aktivasyonu için gerekli olan mekanizmalardan biridir (27, 36). Ayrıca myc bağımlı ve myc bağımsız mekanizmalarla malign hücrelerin proliferasyonunu engellemektedir ve BIN-1 myc aracılı apoptozis için gerekmektedir (24, 31).

Fare ve insan prostat kanserinde overeksprese olan Caveolin-1 geni 7q31'de lokalize olup çeşitli yollarla c-myc'nin indüklediği apoptozisi baskılamaktadır (93).

Çalışmamızda FISH metodunun solid tümörlerdeki kromozomal değişimlerin ortaya konmasında oldukça başarılı bir metod olduğunu, ancak herhangi bir kromozomdaki sayısal ve yapısal değişimlerin tespit edilmesinde kullanılan problemlerin p, q ve sentromerik bölgelere spesifik seçilmesi gerektiğini düşünmekteyiz. FISH metodu ile amplifikasyon değerlendirmesi yapılırken mutlaka proliferasyon indeksi ölçülmelidir. Çünkü tümör dokusu içerisinde gerçekleşen hızlı proliferasyondan dolayı kromatidlerine ayrılan kromozomların varlığı yalancı pozitiflik varlığının gösterilmesine neden olabilir. Çalışmamıza alınan PIN ve adenokarsinom vakaları olarak seçilmesi her iki neoplazinin karşılaştırılması olanağı sağlamıştır. Özellikle yüksek Gleason Skor'lu PIN'ler adenokarsinomlarda görülen genetik değişikliklerin çoğunu içermektedirler. Bu nedenle PIN'lerin adenokarsinomların öncül lezyonları olabileceğini ve bu nedenle her iki neoplazinde ortak bir patogeneze sahip

olabileceğini düşünmekteyiz. C-MYC gen amplifikasyonun, overekspresyonda temel mekanizma olmayabileceğini ve temel mekanizmanın kromozom 8'in basit kazancı yada 8q kolunun kazancından kaynaklanan ekstra kopyaların varlığından kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz. Kromozom 8 kazancı özellikle yüksek Gradeli tümörlerin yaygın bir fenomenidir. Kromozom 8 kazancı ve buna paralel olarak kromozom 8 üzerinde yer alan çeşitli genler prostat karsinogenezisinde ve progresyonunda önemli roller oynayabildiği çeşitli çalışmalarla saptanmıştır (97). Bunlardan biri olan C-MYC geni apoptozis (hücre ölümü), proliferasyon ve farklılaşma gibi çok önemli proseslerde rol alan bir onkogen olup AR'ünün fonksiyonunda işe karışmaktadır. C-MYC ekspresyonunu baskılayacak ilaçların geliştirilmesi tedavide yeni bir yöntem olabileceği kanaatindeyiz.

7. KAYNAKLAR

1. Aaltomaa S, Lipponen P, Ala-Opas M, Kosma VM. (2001). Expression and prognostic value of Cd44 standard and variant v3 and v6 isoforms in prostate cancer. *European Urology* 39: 138-144
2. Acar H, Artan S, Silahtaroglu A. (1996). Teorik ve Pratik Floresan in situ Hibridizasyon. Başaran N (Editör). Etam Anonim Şirketi, Eskişehir. Sayfa 34-40
3. Alers JC, Rochat J, Krijtenburg PJ, Hop WC, Kranse R, Rosenberg C, Tanke HJ, Schroder FH, van Dekken H. (2000). Identification of genetic markers for prostatic cancer progression. *Laboratory Investigation* 80: 931-942
4. Atay Z, Topalidis T. (1994). Cytodiagnostic der Serösen Höhlen. Atlas and Lehrbuch. Wolfgang Pabst Verlag Langerich, Berlin. Sayfa 356
5. Bajou K, Masson V, Gerard RD, Schmitt PM, Albert V, Praus M, Lund LR, Frandsen TL, Brunner N, Dano K, Fusenig NE, Weidle U, Carmeliet G, Loskutov D, Collen D, Carmeliet P, Foidart JM, Noel A. (2001). The plasminogen activator inhibitor PAI-1 controls in vivo tumor vascularization by interaction with protease not vitronectin. Implication for antiangiogenic strategies. *The Journal of Cell Biology* 152: 777-784
6. Başaran N. (1999). Tıbbi Genetik. Güneş & Nobel Tıp Kitapevi, İstanbul. Sayfa 5-384
7. Boyle BJ, Zhao XY, Cohen P, Feldman D. (2001). Insulin-like growth factor binding protein-3 mediates $1\alpha, 25$ -dihydroxyvitamin d (3) growth inhibition in the LNCaP prostate cancer cell line through P21/WAF1. *The Journal of Urology* 165: 1319-1324
8. Brakebusch C, Bouvard D, Stanchi F, Sakai T, Fassler R. (2002). Integrins in invasive growth. *Journal of Clinical Investigation* 109: 999-1006
9. Bubendorf L, Kononen J, Koivisto P, Schraml P, Moch H, Gasser TC, Willi N, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP. (1999). Survey of gene amplifications during prostate cancer progression by high throughput fluorescence in situ hybridization on tissue microarrays. *Cancer Research* 59: 803-896
10. Burchardt T, Burchardt M, Chen MW, Cao Y, de la Taille A, Shabsigh A, Hayek O, Dorai T, Buttge R. (1999). Transdifferentiation of prostate cancer cells to a neuroendocrine cell phenotype in vitro and in vivo. *The Journal of Urology* 162: 1800-1805
11. Cantley LC, Neel BG. (1999). New insights into tumorsuppression: PTEN supresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/ AKT pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 4240-4245
12. Cerni C. (2000). Telomeres, telomerase and MYC. An update. *Mutational Research* 462: 31-47

13. Chen Y, Wang J, Fraig MM, Metcalf S, William R, Turner WR, Bissada NK, Watson DK, Schweinfest CW. (2001). Defects of DNA mismatch repair in human prostate cancer. *Cancer Research* 61: 4112-4121
14. Connor JM. (1993). *Essential Medical Genetics*. Blackwell Scientific Publications, Cambridge. Sayfa: 38
15. Cooper G.M. (2000). *The Cell: A Molecular Approach (Second Edition)*. ASM Press, Washington. Sayfa 609-641
16. Cures A, House C, Kanci-Ishii C, Kemp B, Ramsay RG. (2001). Constitutive c-myc amino terminal phosphorylation and DNA binding activity uncoupled during entry and passage through the cell cycle. *Oncogene* 20: 1784-1792
17. Czepulkowski BH. (1992). *A Practical Approach (Volume 1)*. Rooney DE (Editor). Oxford University Press, New York. Sayfa 157-190
18. Darnell J, Lodish H, Baltimore D. (1990). *Molecular Cell Biology*. Scientific American Books, New York. Sayfa 955-995
19. Davies G, Jiang WG, Mason MD. (2000). Cell-cell adhesion molecules and signaling intermediates and their role in invasive potential of prostate cancer cells. *The Journal of Urology* 95: 985-990
20. Deflos LS. (2000). Prostate carcinoma. *Cancer* 88: 3002-3008
21. Deng CX, Brodie SG. (2000). Roles of BRCA1 and its interacting proteins. *Bio Essays* 22: 728-737
22. Doll JA, Reiher FK, Crawford SE, Pins MR, Campbell SC, Bouck NP. (2001). Thrombospondin 1, vascular endothelial growth factor and fibroblast growth factor 2 are key functional regulators angiogenesis in the prostate. *The Prostate* 49: 293-305
23. Dubey P, Wu H, Reiter RE, Witte ON. (2001). Alternative pathways to prostate carcinoma activate prostate stem cell antigen expression. *Cancer Research* 61: 3256-3261
24. Elliott K, Ge K, Du W, Prendergast GC. (2000). The c-myc-interacting adaptor protein Bin1 activates a caspase-independent cell death program. *Oncogene* 19: 4669-4684
25. Elliott K, Sakamuro D, Basu A, Du W, Wunner W, Staller P, Gaubatz S, Zhang H, Prochownik E, Eilers M, Prendergast GC. (1999). Bin 1 functionally interacts with Myc and inhibits cell proliferation via multiple mechanisms. *Oncogene* 18: 3564-3573
26. Erözenci A. (1997). *Prostat Kanserinde Güncel Yaklaşımlar*. Doyuran Matbaası, İstanbul. Sayfa 115-131
27. Funasaka T, Haga A, Raz A, Nagase H. (2001). Tumor autocrine motility factor is an angiogenic factor that stimulates endothelial cell motility. *Biochemical Biophysical Research Communications* 285: 118-128

28. Ganji K, Kitazawa S, Tamada H. (2001) Expression of endothelial receptor associated with prostate cancer progression. *The Journal of Urology* 165: 1033-1036
29. Gao AC, Lou W, Dong JT, Isaacs JT. (1997). CD44 is a metastasis suppressor gene for prostatic cancer located on human chromosome 11p13. *Cancer Research* 57: 846-849
30. Gao M, Fan S, Goldberg D, Laterra J, Kitsis RN. (2001). Hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) blocks the mitochondrial pathway of apoptosis signaling in breast cancer cells. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 47257-47265
31. Ge K, Minhas F, Duhadaway J, Mao NC, Wilson D, Buccafusca R, Sakamura D, Nelson P, Malkowicz SB, Tomaszewski J, Prendergast GC. (2000). Loss of heterozygosity and tumor suppressor activity of Bin1 in prostate carcinoma. *International Journal of Cancer* 86: 155-161
32. Grad JM, Dai JL, Wu S, Burnstein KL. (1999). Multiple androgen response elements and a Myc consensus site in the androgen receptor (AR) coding region are involved in androgen-mediated up-regulation of AR messenger RNA. *Molecular Endocrinology* 13: 1896-1911
33. Gu Z, Thomas G, Yamashiro J, Shintaku IP, Dorey F, Raitano A, Witte ON, Said JW, Loda M, Reiter RE. (2000). Prostate stem cell antigen (PSCA) expression increases with high gleason score, advanced stage and bone metastasis in prostate cancer. *Oncogene* 19: 1288-1296
34. Guise TA. (2000). Molecular mechanisms of osteolytic bone metastases. *Cancer* 88: 2892-2898
35. Hahn D, Simak R, Steiner GE, Handisurya A, Susani M, Marberger M. (2000). Expression of the VEGF-Receptor Flt-1 in benign, premalignant and malignant prostate tissues. *The Journal of Urology* 164: 506-510
36. Hara I, Miyake H, Hara S, Arakawa S, Kamidono S. (2001). Significance of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases expression in the recurrence of superficial transitional cell carcinoma of the bladder cancer. *The Journal of Urology* 165: 1769-1772
37. Ho A.T, Voura E.B, Soloway P.D, Watson K.L.M, Khokka R. (2001). MMP inhibitors augment fibroblast adhesion of focal adhesion contacts and up-regulation of cadherin function. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 40215-40224
38. Hofbauer LC, Neubauer A, Heufelder AE. (2000). Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and osteoprotegerin. *Cancer* 92: 460-470
39. International prostate health council study group. (2000). Estrogen and prostatic disease. *The Prostate* 45: 87-100
40. Jenkins RB, Qian J, Lieber MM, Bostwick DG. (1997). Detection of c-myc amplification and chromosomal anomalies in metastatic prostatic carcinoma by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Research* 57: 524-531
41. Jenster G. (1999). The role of the androgen receptor in the development and progression of prostate cancer. *Oncology* 26: 407-421

42. Kaj H, Canaff L, Lebrun JJ, Goltzman D, Hendy GN. (2001). Inactivation of menin, A Smad 3-interacting protein, blocks transforming growth factor type β signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 3837-3842
43. Kaltz-Wittmer C, Klenk U, Glaessgen A, Aust DE, Diebold J, Lohrs U, Baretton GB. (2000). FISH analysis of gene aberrations (MYC, CCND1, ERBB2, RB, and AR) in advanced prostatic carcinomas before and after androgen deprivation therapy. *Laboratory Investigation* 80: 1455-1464
44. Karashima T, Taguchi T, Yoshikawa, Kamada M, Kasahara K, Kazunari Y, Shuin T. (2000). Numerical chromosomal changes in metastatic prostate cancer following anti-androgen therapy: fluorescence in situ hybridization analysis of Japanese cases. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 120: 148-154
45. Klotzsch J, Robert KH, Sundqvist KG. (1998). A tumor derived motility factor that stimulates cell migration on extracellular matrix. *Anticancer Research* 18: 1601-1612
46. Konety BR, Nelson JB. (2001). Nonandrogenic mediators of prostatic growth. *Hematology/Oncology Clinics of North America* 15: 459-477
47. Konig JJ, Teubel W, van Steenbrugge GJ, Romijn JC, Hagemeijer A. (1999). Characterization of chromosome 8 aberrations in the prostate cancer cell line LNCaP-FGC and sublines. *Urological Research*, 27: 3-8
48. Koolwijk P, Sidenius N, Peters E, Sierc F, Hanemaaijer R, Blasi F, van Hinsbergh VW. (2001). Proteolysis of the urokinase-type plasminogen activator receptor by metalloproteinase 12: implication for angiogenesis in fibrin matrices. *Blood* 97: 3123-3128
49. Kulke MH, Thakore KS, Thomas G, Wang H, Loda M, Eng C, Odze RD. (2001). Microsatellite instability and hMLH1/hMSH2 expression in Barrett Esophagus-Associated Adenocarcinoma. *Cancer* 91: 1451-1457
50. Kyo S, Takakura M, Kanaya T, Zhuo W, Fujimoto K, Nishio Y, Orimo A, Inoue M. (1999). Estrogen activates telomerase. *Cancer Research* 59: 5917-5921
51. Latil A, Vidaud D, Valeri A, Fournier G, Vidaud M, Lidereau R, Cussenot O, Bieche I. (2000). Htert expression correlates with myc overexpression in human prostate cancer. *International Journal of Cancer* 89: 172-176
52. Leach FS, Velasco A, Hsieh JT, Sagalowsky AI, McConnell J. (2000). The mismatch repair gene hMSH2 is mutated in the prostate cancer cell line LNCaP. *The Journal of Urology* 164: 1830-1834
53. Li Q, Ahuja N, Burger PC, Issa SP. (1999). Methylation and silencing of the thrombospondin-1 promoter in human cancer. *Oncogene* 18: 3284-3289

54. Lluís F, Roma J, Suelves M, Parra M, Aniorte G, Gallardo E, Illa I, Rodríguez L, Hughes SM, Carmeliet P, Roig M, Muñoz-Canoves P. (2001). Urokinase dependent plasminogen activator is required for efficient skeletal muscle regeneration in vivo . *Blood* 97: 1703-1711
55. Long-Cheng LI, Zhao H, Nakajima K, OH BR, Filho LAR, Carroll P, Dahiya R. (2001). Methylation of the E- cadherin gene promoter correletes with progression of prostate Cancer. *The Journal of Urology*, 166: 705-709
56. Lou W, Krill D, Dhii R, Becich MJ, Dong JT, Frierson HF, Isaacs WB, Isaacs JT, Gao AC. (1999). Metyhlation of the CD44 metastasis supressor gene in human prostate cancer. *Cancer Research* 59: 2329-2331
57. Luscher B, Larssan LG. (1999). The basic region/helix-loop-helix/leucine zipper domain of Myc protooncoproteins: Function and regulation. *Oncogene* 18: 2955-2966
58. Macoska JA, Beheshti B, Rhim JS, Hukku B, Lehr J, Pienta KJ, Squire JA. (2000). Genetic chracterization of immortalized human prostate epithelial cell cultures: Evidence for structural rearrangements of chromosome 8 and i(8q) chromosome formation in primary tumor-derived cells. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 120: 50-57
59. Mark HFL, Samy M, Santoro K, Mark S, Feldman D. (2000). Flourescence in situ hybridization study of c-myc oncogene copy number in prostate cancer. *Experimental and Molecular Pathology* 68: 65-69
60. McMenamin M.E, Soung P, Perera S, Kaplan I, Loda M. (1999). Loss of PTEN expression in parafin-embeded primary prostate cancer corraletes with high gleason score. *Cancer Research* 59: 4291-4296
61. Miyake H, Hara I, Okamoto I, Gohji K, Yamanaka K, Arakawa S, Saya H, Kamidiono S. (1998). Interaction between CD44 and hyaluronic acid regulates human prostate cancer development. *The Journal of Urology*, 160: 1562-1566
62. Miyoshi Y, Uemura H, Fujinami K, Mikata K, Harada M, Kitamura H, Koizumi Y, Kubota Y. (2000). Flourescence in situ hybridization evaluation of c-myc and androgen receptor gene amplification and chromosomal anomalies in prostate cancer in japanese patients. *The Prostate* 43: 225-232
63. Nasi S, Ciarapica R, Jucker R, Rosati J, Soucek L. (2001). Making decisions through Myc. *FEBS Letters* 490: 153-162
64. Ning ZQ, Li J, Arceci RJ. (2001). Signal transducer and activator of transcription 3 activation is required for Asp816 mutant c-kit –mediated cytokine-independent survival and proliferation in human leukemia cells. *Blood* 97: 3559-3567
65. Nupponen NN, Kakkola L, Koivisto P, Visakorpi T. (1998). Genetic alterations in hormone-refractory recurrent prostate carcinomas. *American Journal of Pathology* 153: 141-148

66. Oh BR, Sasaki M, Perinchery G, Ryu SB, Park YI, Carroll P, Dahiya R. (2000). Frequent genotype changes at -308, and 488 regions of the tumor necrosis factor- α (TNF- α) gene in patients with prostate cancer. *The Journal of Urology* 163: 1584-1587
67. Ornstein DK, Cinquanta M, Weiler S, Duray PH, Emmert-Buck MR, Vocke CD, Linehan WM, Ferretti JA. (2001). Expression studies and mutational analysis of the androgen regulated homeobox gene NKX3.1 in benign and malignant prostate epithelium. *The Journal of Urology* 165: 1329-1333
68. Orr FW, Lee J, Duivenvoorden WC, Singh G. (2000). Pathophysiologic interactions in skeletal metastasis. *Cancer* 88: 2912-2918
69. Özdamar K. (1999). SPSS ile Biyoistatistik. Etam Anonim Şirket Matbaası, Eskişehir. Sayfa 57-93
70. Paradis V, Eschwege P, Loric S, Dumas F, Ba N, Benoit G, Jardin A, Bedossa P. (1998). De nova ekspression of CD44 in prostate carcinoma is correlated with systemic dissemination of prostate cancer. *Journal of Clinical Pathology* 51: 798-802
71. Persad S, Attwell S, Gray V, Delcommenne M, Troussard A, Sanghera J, Dedhar S. (2000). Inhibition of integrin linked kinase (ILK) supression activation of protein kinase B/Akt and induces cell cycle arrest and apoptosis of PTEN-mutant prostate cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 3207-3212
72. Planz B, Wang Q, Kirlhey SD, Marberger McDougal WS. (2001). Regulation of keratinocyte growth factor receptor and androgen receptor in epithelial cells of the human prostate. *The Journal of Urology* 166: 678-683
73. Plesner T, Behrendt N, Ploug M. (1997). Structure, function and expression on blood and bone marrow cells the urokinase-type plasminogen activator receptor uPAR. *Stem Cells* 15: 398-408
74. Reiher FK, Ivanovich M, Hisang H, Smith NP, Bouck NP, Campbell SC. (2001). The role of hypoxia and p53 in the regulation of angiogenesis in bladder cancer. *The Journal of Urology* 165: 2075-2081
75. Reiter RE, Gu Z, Watabe T, Thomas G, Szigeti K, Davis E, Wahl M, Nisitani S, Yamashiro J, Beau MM, Loda M, Witte ON. (1998). Prostate stem cell antigen: A cell surface marker overexpressed in prostate cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 1735-1740
76. Reiter RE, Sato I, Thomas G, Qian J, Gu Z, Watabe T, Loda M, Jenkins RB. (2000). Coamplifications of prostate stem cell antigen (PSCA) and MYC in locally advanced prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 27: 95-103
77. Rennie PS, Nelson CC. (1999). Epigenetic mechanisms for progresion of prostate cancer. *Cancer and Metastasis* 17: 401-409

78. Rhim SS. (2001). Molecular and genetic mechanisms of prostate cancer. *Radiation Research* 155: 128-132
79. Rubin JS, Day RM, Breckenridge D, Atabey N, Taylor WG, Stahl SJ, Wingfield PT. (2001). Dissociation of heparan sulfate and receptor binding domains of hepatocyte growth factor reveals that heparan sulfate c-met interaction facilitates signaling. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 32977-32983
80. Sager R, Sheng S, Pemberton P, Hendrix MSC. (1996). Maspin: A tumor suppressing serpin. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 213: 51-64
81. Santin AD. (2000). Lymph Node Metastases. *Cancer* 88: 175-179
82. Sato K, Qian J, Slezak JM, Lieber MM, Bostwick DG, Bergstralh EJ, Jenkins RB. (1999). Clinical significance of alterations of chromosome 8 in high-grade, advanced, nonmetastatic prostate cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 91: 1574-1580
83. Sergeant N, Lyon M, Rudland S, Fernig D.G, Deleheder M. (2000). Stimulation of DNA synthesis and cell proliferation of human mammary myoepithelial-like cells by hepatocyte growth factor/ scatter factor depends on heparan sulfate proteoglycans and sustained phosphorylation of mitogen-activated protein kinases P42/44. *Blood* 275: 17094-17099
84. Shimizu M, Minakuchi K, Tsuda A, Hiroi T, Tanaka N, Koga J, Kiyono H. (2001). Role of stem cell factor and c-kit signaling in regulation of fetal intestinal epithelial cell adhesion to fibronectin. *Experimental Cell Research* 266: 311-322
85. Silletti S, Paku S, Raz A. (1998). Autocrine motility factor and the extracellular matrix.2: Degradation or remodelling of substratum components direct the motile response of tumor cells. *International Journal of Cancer* 30: 129-135
86. Sinha AA, Jamuar M, Wilson M.J, Rozhin J. (2001). Plasma membrane association of cathepsin B in human prostate cancer biochemical and immunology electron microscopic analysis. *The Prostate* 49: 172-84
87. Sommer A, Bousset K, Kremmers E, Austen M, Luscher B. (1998). Identification and characterization of specific DNA-binding complexes containing members of the Myc/Max/Mad network of transcriptional regulators. *The Journal of Biological Chemistry* 273: 6632-6642
88. Stewart RJ, Panigrahy D, Flynn E, Folkman J. (2001). Vascular endothelial growth factor expression and tumor angiogenesis are regulated by androgen in hormone responsive human prostate carcinoma: Evidence for androgen dependent destabilization of vascular endothelial growth factor transcripts. *The Journal of Urology* 165: 688-693
89. Strachan T, Read AP. (1996). *Human Molecular Genetics*. Bios Scientific Publishers, Oxford. Sayfa 147-478
90. Tanagho EA, McAninch JW. (1995). *Smith Genel Üroloji*. Kazancı G (Çeviri Editörü). Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti, İstanbul. Sayfa 8-411

91. Tanikawa J, Ichikawa-Iwata E, Kanei-Ishii C, Ishii S. (2001). Regulation of c-myc activity by tumor suppressor p53. *Blood Cells, Molecules and Diseases* 27: 479-482
92. Tauri T, Mazar AP, Cine DB, Takada Y. (2001). Urokinase-type plasminogen activator receptor (CD87) is a ligand for integrins and mediates cell-cell interaction. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 3983-3990
93. Timme T, Goltsov A, Tahir S, Li L, Wang J, Ren C, Johnston RJ, Thompson TC. (2000). Caveolin-1 regulated by c-myc and suppresses c-myc-induced apoptosis. *Oncogene* 19: 3256-3265
94. Torimura T, Ueno T, Kim M, Kawaguchi T, Harada M, Kumashiro R, Watanabe H, Avraham R, Sata M. (2001). Autocrine motility factor enhances hepatoma cell invasion across the basement membrane through activation of beta-1 integrins. *Hepatology* 34: 62-71
95. Tuxhorn JA, Ayala GE, Rowley DR. (2001). Reactive stroma in prostate cancer progression. *The Journal of Urology* 166: 2472-2483
96. Uthoff SMS, Eichenberger MR, McAuliffe TL, Hamilton CJ, Galandiuk S. (2001). Wntless-type frizzled protein receptor signaling and its putative role in human colon cancer. *Molecular Carcinogenesis* 31: 56-62
97. Verma RS, Manikal M, Conte RA, Godec C.J. (1999). Chromosomal basis of adenocarcinoma of the prostate. *Cancer Investigation* 17: 441-447
98. Visakorpi T, Kallioniemi AH, Syvanen AC, Hyytinen ER, Karhu R, Tammela T, Isola JJ, Kallioniemi OP. (1995). Genetic changes in primary and recurrent prostate cancer by comparative genomic hybridization. *Cancer Research* 55: 342-347
99. Vu TH, Werb Z. (2000). Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes and Development* 14: 2123-2133
100. Watabe T, Lin M, Ide H, Donjacour AA, Cunha GR, Witte ON, Reiter RE. (2002). Growth, regeneration, and tumorigenesis of the prostate activates the PSCA promoter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 401-406
101. Xing N, Oian J, Bostwick D, Young C. (2001). Neuroendocrine cells in human prostate overexpress the anti-apoptosis protein survivin. *The Prostate* 48: 7-15
102. Zhang M, Magit D, Sager R. (1997). Expression of maspin in prostate cells is regulated by a positive ets element and a negative hormonal responsive element site recognized by androgen receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 5673-5678

8. ÖZGEÇMİŞ

1979 Kocaeli doğumluyum. İlkokul öğrenimimi Adıyaman'da tamamladım. Orta ve lise öğrenimimi Elazığ'da tamamladım. 1996 yılında Fırat Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandım ve 2000 yılında mezun oldum. Aynı yıl Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında yüksek lisansa başladım.

