



**ÜROTELYAL KARSİNOMLARLA İLİŞKİLENDİRİLMİŞ TÜMÖR
BASKILAYICI GENLERİN MULTIPLEX LIGATION-DEPENDENT
PROBE AMPLIFICATION (MLPA) YÖNTEMİ İLE METİLASYON
PATERNLERİNİN BELİRLENMESİ**

Sıddıka BOZTAŞ

**Kasım 2013
DENİZLİ**

**ÜROTELYAL KARSİNOMLARLA İLİŞKİLENDİRİLMİŞ TÜMÖR
BASKILAYICI GENLERİN MULTIPLEX LIGATION-
DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION (MLPA) YÖNTEMİ İLE
METİLASYON PATERNLERİNİN BELİRLENMESİ**

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

Sıddıka BOZTAŞ

Danışman: Prof. Dr. Gülseren BAĞCI

İkinci Danışman: Doç. Dr. Emre TEPELİ

**Kasım, 2013
DENİZLİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAY FORMU

Sıddıka BOZTAŞ tarafından, Prof. Dr. Gülseren BAĞCI yönetiminde hazırlanan “Ürotelyal Karsinomlarla İlişkilendirilmiş Tümör Baskılayıcı Genlerin Multiplex Ligation- Dependet Probe Amplification (MLPA) Yöntemi ile metilasyon Paternlerinin Belirlenmesi” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Gülseren BAĞCI
Jüri Başkanı(Danışman)



Doç. Dr. Emre TEPELİ
Jüri Üyesi(II.Danışman)



Doç. Dr. Vildan CANER
Jüri Üyesi



Yrd. Doç. Dr. G. Ozan ÇETİN
Jüri Üyesi



Doç. Dr. İbrahim AÇIKBAŞ
Jüri Üyesi

Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 27.12/2017 tarih ve 20.3/21-4 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Z. Melek BOR KÜÇÜKATAY
Müdür



TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans öğrenimim boyunca ve tez çalışmam süresince bana her türlü desteği veren değerli tez danışman hocam Prof. Dr. Gülseren BAĞCI'ya teşekkür ederim. Ayrıca Yüksek Lisans öğrenimim boyunca ve tez çalışmam sırasında bilgilerini ve yardımlarını esirgemeyen ikinci danışmanım Doç. Dr. Emre TEPELİ'ye ve hocam Doç. Dr. Vildan CANER'e, ayrıca Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Nilay ŞENTÜRK'e, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Ömer Levent TUNCAY ve Yrd. Doç. Dr. Ali Ersin ZÜMRÜTBAŞ'a, emeği geçen bütün hocalarıma ve arkadaşlarıma, özellikle sonsuz desteklerinden dolayı arkadaşım Levent ELMAS'a ve tez projemi destekleyen Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne çok teşekkür ederim. Özellikle her zaman yanımda olan ve desteklerini esirgemeyen eşim Bayram BOZTAŞ'a, ağabeyim Yrd. Doç. Dr. Mehmet ÇİÇEK'e ve aileme de sonsuz teşekkür ederim.

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

İmza :
Öğrenci Adı Soyadı : Sıddıka BOZTAŞ

ÖZET

ÜROTELYAL KARSİNOMLARLA İLİŞKİLENDİRİLMİŞ TÜMÖR BASKILAYICI GENLERİN MULTIPLEX LIGATION-DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION (MLPA) YÖNTEMİ İLE METİLASYON PATERNLERİNİN BELİRLENMESİ

Boztaş, Sıddıka

Yüksek Lisans Tezi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Gülseren BAĞCI

2. Danışman: Doç. Dr. Emre TEPELİ

Kasım 2013, 111 sayfa

Mesane kanserlerinin yaklaşık % 10'u skuamöz hücreli karsinom ya da adenokarsinom, % 90'ından fazlası ürotelyal karsinomlardır. Ürotelyal karsinomlar, dünyadaki mesane kanserinin büyük çoğunluğunu oluşturur. Mesane kanseri çok faktörlü bir hastalıktır, bu yüzden hem çevresel hem de genetik faktörlerin hastalığın gelişiminde ve ilerlemesinde rolü vardır.

Kanser gelişiminde ve ilerlemesinde epigenetik mekanizmalar önemlidir. CpG adalarının hipermetilasyonu özellikle tümör baskılayıcı genlerin transkripsiyonal sessizleşmesinde kritik rol oynar. Spesifik tümör baskılayıcı genlerin promoterlerinin DNA metilasyonu en çok çalışılan epigenetik mekanizmadır.

Bu çalışmada, Metilasyon spesifik-Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MS-MLPA) yöntemi kullanılarak mesane kanserleriyle daha önceden ilişkilendirilmiş 25 tümör baskılayıcı genin promoter bölgelerinin metilasyon paternlerinin incelenmesi amaçlandı.

Bu çalışmaya ürotelyal karsinomu olan 80 olgu dahil edildi. DNA metilasyon analizi formalinle fikse edilmiş parafine gömülü mesane kanseri doku örneklerinde gerçekleştirildi. DNA izolasyonunu takiben, SALSA MS-MLPA ME002-B1 tumor suppressor probemix kiti kullanılarak MS-MLPA yöntemi ile 25 tümör baskılayıcı genin promoter bölgelerinin metilasyon paternleri analiz edildi.

Mesane kanseri doku örneklerinin % 75'i metile, % 25'i unmetile olarak belirlendi. Metillenmiş genler arasında en yüksek metilasyon oranı *MSH6*, *WTL*, *RBI* ve *CDH13* genlerinde tespit edildi. Bu dört genin metilasyon durumları ile klinikopatolojik parametreler karşılaştırıldığında aradaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

Sonuç olarak, MS-MLPA yönteminin mesane kanserinin metilasyon profillerinin taranmasında kullanılabilecek, ucuz ve hızlı sonuç verebilen bir teknik olduğu görüldü. Mesane kanserinin erken tanısında MS-MLPA yönteminin rutin kullanıma geçirilmesinde daha kapsamlı araştırmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Sözcükler: Ürotelyal karsinom, Tümör baskılayıcı genler, DNA metilasyonu, MS-MLPA

ABSTRACT**Determination of Methylation Patterns of Tumor Suppressor Genes Associated with Urothelial Carcinoma by Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification (MLPA) method.**

Boztaş, Sıddıka

M. Sc. Thesis in Department of Medical Biology

Supervisor: Prof. Dr. Gülseren BAĞCI

Co-adviser: Doç. Dr. Emre TEPELİ

November 2013, 111 pages

Approximately 10% of bladder cancer is squamous cell carcinoma or adenocarcinoma, more than 90% are urothelial carcinomas. Urothelial carcinomas constitute the majority of bladder cancer in the world. Bladder cancer is a multifactorial disease, so both environmental and genetic factors play a role in disease development and progression.

Cancer is important epigenetic mechanisms in the development and progression. Hypermethylation of CpG islands, especially the transcriptional silencing of tumor suppressor genes plays a critical role. DNA methylation of promoters of specific tumor suppressor genes most studied epigenetic mechanism.

In this study, it was aimed to analyze methylation pattern of 25 tumor suppressor genes promoter regions previously associated with bladder cancer using Methylation specific-Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MS-MLPA) technique.

80 patients with urothelial carcinoma were included in this study. The analysis of DNA methylation was performed on formalin fixed paraffin embedded bladder cancer tissue samples. After DNA isolation, methylation patterns of 25 tumor suppressor genes promoter regions with MS-MLPA technique using SALSA MS-MLPA ME002-B1 tumor suppressor probe mix kit were analyzed.

Methylated 75% of bladder tissue samples, unmethylated 25%. Between methylated genes were identified the highest rate of methylation in *MSH6*, *WT1*, *RB1* and *CDH13* genes. These four gene methylation status and clinicopathological parameters were compared, statistically significant differences were found.

As a result, it was determined that MS-MLPA is a technique which can give cheap, fast and reliable results in screening methylation pattern of bladder cancer. Realising routinely used MS-MLPA technique in the early diagnosis of bladder cancer is needed more extensive research.

Key Words: Urothelial carcinoma, Tumor suppressor genes, DNA methylation, MS-MLPA.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
İçindekiler	vi
Şekiller Dizini	viii
Tablolar Dizini	ix
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini	x
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI	4
2.1. Kanser	4
2.2. Mesane Kanseri	5
2.2.1. Mesane kanserinin etiyolojisi	5
2.2.2. Mesane kanserinin epidemiyolojisi	6
2.2.3. Mesane kanserinin Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 2004 sınıflaması	8
2.3. Ürotelyal Karsinom	9
2.4. Ürotelyal Karsinomun WHO 2004 Sınıflaması	10
2.4.1. Non-invaziv papiller ürotelyal lezyonlar	10
2.4.1.1. Ürotelyal papillom	11
2.4.1.2. İverted tip ürotelyal papillom	12
2.4.1.3. Düşük malignite potansiyelli papiller ürotelyal karsinom	13
2.4.1.4. Non-invaziv düşük dereceli papiller ürotelyal karsinom.....	14
2.4.1.5. Non-invaziv yüksek dereceli papiller ürotelyal karsinom	15
2.4.2. İnvaziv ürotelyal neoplaziler	18
2.4.2.1. Lamina propria invazyonu	18
2.4.2.2. Muskularis propria (detrusor kası) invazyonu	19
2.5. Ürotelyal Karsinomun Histolojik Varyantları	20
2.6. Ürotelyal Karsinomun Derecelenmesi	21
2.7. Ürotelyal Karsinomun TNM (Primer tümör/ Lenf nodu/ Uzak metastaz) Evrelemesi	23
2.8. Mesane Kanserinde Tümör Baskılayıcı Genler	26
2.9. Mesane Kanserinde Epigenetik Mekanizmalar	27
2.9.1. DNA metilasyonu	28
2.9.2. Histon modifikasyonları ve kromatinin yeniden düzenlenmesi	39
2.9.3. MikroRNA'lar	41
2.10. Metilasyon spesifik-Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MS-MLPA) Yöntemi	42
3. MATERYAL VE METOT	45
3.1. Materyallerin Toplanması	45
3.2. FFPE Mesane Dokularından Genomik DNA İzolasyonu	46
3.2.1. DNA izolasyon protokolü	46
3.3. İzole Edilen Genomik DNA Örneklerinin Konsantrasyon ve Safılık Değerlerinin Belirlenmesi	49
3.4. İzole Edilen DNA Örneklerinin MS-MLPA Yöntemiyle Analizi	50
3.4.1. DNA denatürasyonu (1. gün)	50
3.4.2. Hibridizasyon (1. gün)	50
3.4.3. Ligasyon ve enzim kesim reaksiyonu (2. gün).....	53
3.4.4. PCR reaksiyonu (2. gün)	54
3.4.5. Örnekleri Beckman Coulter CEQ™ 8000 Genetic Analysis System	

cihazına yükleme	55
3.4.6. Değerlendirme	55
3.5. İstatistiksel Analiz	56
4. BULGULAR	57
4.1. DNA Örneklerinin Konsantrasyon ve Saflık Değerleri	57
4.2. Ürotelyal Karsinom’lu Olgulara Ait Klinikopatolojik Parametreler	60
4.3. Metilasyon Profili	62
5. TARTIŞMA	78
6. SONUÇ	99
7. KAYNAKLAR	102
8. ÖZGEÇMİŞ	111

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1 Türkiye’de 2008 yılı kadın ve erkek kanser insidans değerlerinin karşılaştırılması	7
Şekil 2.2 Ürotelyal papillomun histolojik görüntüsü	11
Şekil 2.3 Glandüler tip inverted ürotelyal papillomun histolojik görüntüsü	12
Şekil 2.4 DMPPÜN’nin histolojik görüntüsü	14
Şekil 2.5 DDPÜK’un histolojik görüntüsü	15
Şekil 2.6 YDPÜK’un histolojik görüntüsü	16
Şekil 2.7 Lamina propria içine invazyon yapan pT1 ürotelyal karsinomun histolojik görüntüsü	19
Şekil 2.8 Muskularis propria içine invazyon yapan pT2 ürotelyal karsinomun histolojik görüntüsü	20
Şekil 2.9 Mesane kanserinde TNM evreleme sistemi	26
Şekil 2.10 DNA metilasyonu.	30
Şekil 2.11 Histon modifikasyonları	41
Şekil 2.12 MS-MLPA reaksiyonunun aşamaları	44
Şekil 4.1 Patolojik evreye göre alt grupların yüzdelik dağılımı	61
Şekil 4.2 Klinikopatolojik özelliklerin hasta sayısına göre yüzdelik dağılımı	62
Şekil 4.3 Normal metilasyon profiline sahip bir hastanın ürotelyal karsinom dokusuna ait enzim kesimi yapılmış MS-MLPA pik görüntüsü	65
Şekil 4.4 Ürotelyal karsinom dokusunda <i>MSH6</i> geninde metilasyon saptanan bir hastanın pik görüntüsü	65
Şekil 4.5 Ürotelyal karsinom dokusunda <i>WT1</i> geninde metilasyon saptanan bir hastanın pik görüntüsü	66
Şekil 4.6 Ürotelyal karsinom dokusunda <i>TP53</i> , <i>PTEN</i> , <i>CDH13</i> , <i>TP73</i> , <i>WT1</i> ve <i>RB1</i> genlerinde metilasyon saptanan bir hastanın pik görüntüsü	66
Şekil 4.7 Ürotelyal karsinom dokusunda <i>CDH13</i> geninde metilasyon saptanan bir hastanın pik görüntüsü	67
Şekil 4.8 Ürotelyal karsinom’lu 80 olguda en yüksek oranlarda metilasyon gözlenen <i>CDH13</i> , <i>WT1</i> , <i>RB1</i> ve <i>MSH6</i> genlerinde metilasyon saptanan bir hastanın pik görüntüsü	67
Şekil 4.9 Ürotelyal karsinom tanısı almış tüm hastaların <i>MSH6</i> metilasyon profii	70
Şekil 4.10 Ürotelyal karsinom tanısı almış tüm hastaların <i>WT1</i> metilasyon profili.....	72
Şekil 4.11 Ürotelyal karsinom tanısı almış tüm hastaların <i>RB1</i> metilasyon profili	74
Şekil 4.12 Ürotelyal karsinom tanısı almış tüm hastaların <i>CDH13</i> metilasyon profili .	76

TABLOLAR DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1 Mesane kanserinin WHO 2004 sınıflaması	8
Tablo 2.2 Ürotelyal karsinomun WHO 2004 sınıflaması	10
Tablo 2.3 Ürotelyal papiller lezyonların histolojik özellikleri	17
Tablo 2.4 Ürotelyal papiller lezyonların prognozu	18
Tablo 2.5 Ürotelyal karsinomun histolojik varyantları	21
Tablo 2.6 Ürotelyal karsinomun TNM sınıflaması ve evre grupları	24
Tablo 2.7 Mesane kanserleri ile ilgili literatür taramasında hipermetile olan genler	31
Tablo 2.8 Literatür çalışmalarında mesane kanserindeki bazı tümör baskılayıcı genlerin metilasyon yüzdelerinin yıllara göre dağılımı	36
Tablo 3.1 DNA izolasyon kiti (QIAamp DNA Mini Kit) içeriği	46
Tablo 3.2 "SALSA MS-MLPA ME002-B1 tumor suppressor probemix, MRC, Hollanda" içinde mevcut olan kontrol problemleri ve incelenecek genlere ait problemlerin listesi	51
Tablo 3.3 Hibridizasyon karışımının içeriği	53
Tablo 3.4 Ligaz-65 karışımının içeriği	54
Tablo 3.5 Ligaz-kesim karışımının içeriği	54
Tablo 4.1 DNA örneklerinin konsantrasyon ve saflık değerleri	57
Tablo 4.2 Ürotelyal karsinom tanısı almış 80 hastanın klinikopatolojik özellikleri	60
Tablo 4.3 Ürotelyal karsinom tanısı almış 80 hastada kullanılan "SALSA MS-MLPA ME002-B1 tumor suppressor probemix, MRC, Hollanda" yer alan genlerin açılımı ve belirlenen metilasyon yüzdeleri	63
Tablo 4.4 Ürotelyal karsinom tanısı almış 80 olgunun metilasyon profili ve klinikopatolojik parametrelerle ilişkisi	68
Tablo 4.5 Ürotelyal karsinom tanısı almış 80 olguda <i>MSH6</i> metilasyon profili	69
Tablo 4.6 <i>MSH6</i> geninin metilasyon profili ve klinikopatolojik parametrelerle ilişkisi	70
Tablo 4.7 Ürotelyal karsinom tanısı almış 80 olguda <i>WT1</i> metilasyon profili	71
Tablo 4.8 <i>WT1</i> geninin metilasyon profili ve klinikopatolojik parametrelerle ilişkisi ..	72
Tablo 4.9 Ürotelyal karsinom tanısı almış 80 olguda <i>RBI</i> metilasyon profili	73
Tablo 4.10 <i>RBI</i> geninin metilasyon profili ve klinikopatolojik parametrelerle ilişkisi	74
Tablo 4.11 Ürotelyal karsinom tanısı almış 80 olguda <i>CDH13</i> metilasyon profili	75
Tablo 4.12 <i>CDH13</i> geninin metilasyon profili ve klinikopatolojik parametrelerle ilişkisi	76

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

AJCC	American Joint Committee on Cancer
APAF1	Apoptotik peptidaz aktive edici faktör 1
APC	Adenomatöz polipozis koli
ATM	Ataksi telanjiektazi mutasyonu
BCL2	B-hücreli lenfoma 2
BRCA1	Meme kanseri yatkınlığı tip 1
BRCA2	Meme kanseri yatkınlığı tip 2
CADM1	Hücre adezyon molekülü 1/ İmmünglobülin süperaile üyesi 4 (IGSF4)
CAGE1	Kanser antijeni 1
CASP 8	Kaspaz 8, apoptoz ile ilişkili sistein peptidaz
CCND2	Siklin D2
CDH1	Kaderin 1 (E-kaderin)
CDH4	Kaderin 4
CDH13	Kaderin 13 (H-kaderin)
CDKN2A	Siklin-bağımlı kinaz inhibitörü 2A/p16INK4A
CDKN2B	Siklin-bağımlı kinaz inhibitörü 2B/p15INK4B
CHFR	Checkpoint with forkhead and ring finger domains
COL1A2	Tip 1 kollajen alfa 2
COX2	Siklooksijenaz 2; PTGS2 (prostaglandin endoperoksid sentaz)
DAPK1	Ölümlle ilişkili protein kinaz 1
DBC1	Mesane kanserinde delesyon 1
DBCCR1	Mesane kanserinde delesyon olmuş aday kromozom 1 bölgesi
DDPÜK	Düşük dereceli papiller ürotelyal karsinom
DKK3	Dickkopf homolog 3
DMPPÜN	Düşük malignite potansiyelli papiller ürotelyal neoplazm
DNMT	DNA metiltransferaz
DR3	Ölüm reseptörü 3
DR6	Ölümreseptörü6
DRC1	Antiapoptotik yıkım reseptörü 1
DRC2	Antiapoptotik yıkım reseptörü 2
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EDNRB	Endotelin reseptör tip B
ESR1	Östrojen reseptörü 1
FFPE	Formalinle fikse edilmiş parafine gömülü doku
FHIT	Frajil histidin triad proteini
GATA5	GATA'ya bağlanan protein 5
GSTP1	Glutatyon S-transferaz P 1
HAT	Histon asetiltransferaz
HDAC	Histon deasetilaz
HDMT	Histon demetilaz

HIC1	Hipermetile kanser 1
HMT	Histon metiltransferaz
ICAM1	Hücreler arası adezyon molekülü 1
IGFBP3	İnsülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein 3
ISUP	Uluslararası Ürolojik Pataloji Derneği
KISS1	Metastaz baskılayıcı gen 1
KİS	Karsinoma in situ
LAMA3	Laminin alfa 3
LAMB3	Laminin beta 3
LAMC2	Laminin gama 2
LINE	Uzun dağılmış nükleer eleman
MBP	Metil-CpG'ye bağlanan proteinler
MGMT	O6- metilguanin DNA metiltransferaz
MiRNA	MikroRNA
MLH1	MutL homolog 1, kolon kanseri, nonpolipozis tip 2
MLPA	Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification
MSH6	Mut S homolog 6
MS-MLPA	Metilasyon spesifik-Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification
MSP	Metilasyon-spesifik polimeraz zincir reaksiyonu
MYO	Myoglianin
NMIBC	Kasa invaze olmayan mesane kanseri
PAH	Polisiklik aromatik hidrokarbonlar
PAX5A	Box 5 geni
PAX6	Box 6 geni
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PMF1	Poliamin ile modüle edilmiş faktör 1
PRSS3	Proteaz serin 3
PTEN	Fosfataz ve tensin homologu
PYCARD	Apoptoz ile ilişkili leke benzeri protein (ASC)
p14ARF	CDKN2A (Siklin-bağımlı kinaz inhibitörü 2A) izoform 4
QMSP	Kantitatif metilasyon-spesifik PCR
RAR β	Retinoik asit reseptörü β
RASSF1A	Ras ilişkili domain aile üyesi 1 A
RB1	Retinoblastoma 1
RISC	RNA ile indüklenen susturma kompleksi
RUNX3	Runt-ilişkili transkripsiyon faktörü 3
S100A	S-100 ailesi
SAM	S-adenozilmetionin
SCBC	Küçük hücreli mesane karsinomu
SCC	Skvamöz hücreli karsinom
SFRP1	Secreted frizzled-related protein 1
SFRP2	Secreted frizzled-related protein 2
SFRP4	Secreted frizzled-related protein 4
SFRP5	Secreted frizzled-related protein 5
SINE	Short interspersed nuclear element
SOCS1	Sitokin sinyali baskılayıcı 1
SQR-PCR	Yarı kantitatif ters transkriptaz-PCR
STAT1	Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü 1
STK11	Serin/treonin kinaz 11
SOX9	Cinsiyet belirleyen bölge Y box 9

TCC	Transizyonel hücreli karsinom
TERT	Telomeraz ters transkriptaz
THBS1	Thrombospondin 1
TIG1	Tazaroten kaynaklı 1; RARRES1 (Retinoik asit reseptörüne cevap 1)
TIMP3	Metalloproteinaz doku inhibitörü 3
TNFRSF21	Tümör nekroz faktörü reseptörü süper aile üyesi 21
TNFRSF25	Tümör nekroz faktörü reseptörü süper aile üyesi 25
TNM	Tümör-Nod-Metastaz
TP53	Tümör proteini p53
TP73	Tümör proteini p73
TSG	Tümör baskılayıcı gen
TUR	Transüretral rezeksiyon
UICC	International Union Against Cancer
UTT	Üst üriner sistem tümörü
ÜK	Ürotelyal karsinom
VIM	Vimentin
VHL	von Hippel-Lindau tümör baskılayıcı
WIF1	WNT inhibitör faktörü 1
WT1	Wilm's tümörü 1
YDPÜK	Yüksek dereceli papiller ürotelyal karsinom

1. GİRİŞ

Kanser, insanoğlunun çare bulmaya çalıştığı, her iki cinsiyet ve her yaştan bireyin sağlığını önemli ölçüde tehdit eden, çeşitli genetik ve epigenetik değişiklikler sonucunda, onkogenlerin aktif ve tümör baskılayıcı genlerin inaktif hale gelmesi ile gelişen kompleks bir hastalıktır.

Kanserin patogenezi, gen mutasyonları, gen ekspresyonundaki değişiklikler, protein fonksiyonları ve diğer hücresel süreçler dahil birden fazla moleküler değişikliklere dayandırılabilir. Özellikle, tümör baskılayıcı genlerin promoter bölgelerindeki hipermetilasyon, karsinogenez sırasında düzenleyici genlerin transkripsiyonal susturulması ile ilişkili erken evrede ve sık görülen bir olaydır (Jarmalaite vd 2008). Bu yüzden günümüzde oldukça fazla sayıda kanserle ilgili çalışma bulunmaktadır. Görülme sıklığına bağlı olarak mesane kanseri de çok yönlü araştırılan kanserlerden birisidir.

Mesane kanseri, dünyada genitoüriner sistemin en yaygın görülen ikinci kanseridir ve üriner sistem rahatsızlığı olan hastalarda kanserle ölümlerin başlıca ikinci nedenidir (Enokida ve Nakagawa 2008). T. C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu 2008 yılı Türkiye kanser istatistiklerine göre, mesane kanseri en sık görülen ilk 12 kanser türü arasında erkeklerde 3. sırada, kadınlarda ise 11. sırada yer almaktadır (WEB_1, 2013). Mesane kanserlerinin, yaklaşık % 10'u (skuamöz hücreli karsinom ya da adenokarsinom) ürotelyal kökenli değilken (Jeronimo ve Henrique 2011), % 90'ından fazlası ürotelyumdan gelişen ve en sık görülen tipi olan ürotelyal karsinomlardır (Jeronimo ve Henrique 2011, Kim ve Quan 2005).

Kanser gelişiminde ve ilerlemesinde genetik mekanizmaların yanında epigenetik mekanizmalar da çok önemlidir (Sanchez-Carbayo 2012). Bunların içinde CpG

adalarının hipermetilasyonu, transkripsiyonal susturulmada ve tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonunda kritik rol oynar (Kawamoto vd 2006, Christoph vd 2007, Jarmalaite vd 2010, Sanchez-Carbayo 2012). Özellikle sık metillenmiş genler, hücre döngüsünün kontrolü, DNA onarımı, apoptoz ve invazyon gibi farklı biyolojik yollarda yer alır (Jarmalaite vd 2008, Sanchez-Carbayo 2012). Mesane kanserinde, epigenetik mekanizmalardan DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve mikroRNA'ların en etkili mekanizmalar olduğu görülmekte olup (Jeronimo ve Henrique 2011, Dudzic vd 2011), spesifik tümör baskılayıcı genlerin promoter DNA metilasyonu en çok çalışılan epigenetik mekanizmadır (Marsit vd 2007).

DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları gen regülasyonunda önemli epigenetik mekanizmalardır ve tümörün oluşmaya başlamasında ve ilerlemesinde, hem her iki mekanizma birbirinden bağımsız hem de aynı zamanda işbirliği içinde çalışır. Mesane kanserlerinde DNA hipermetilasyonu ve değişmiş histon asetilasyonu gibi anormal epigenetik olayların her ikisinin de çok sayıda geni etkilediği gözlenmiştir (Jarmalaite vd 2008).

DNA metilasyonu aracılığı ile gen ekspresyonunun baskılanması, karsinogenezin tüm evrelerinde gözlemlenebilen önemli bir değişimdir. Birçok genin ilk ekzonuna yerleşik CpG'den zengin bölgelerin metilasyonu, bu bölgeye metil-CpG'ye bağlanan proteinlerle birlikte histon deasetilazlar, metiltransferazlar ve ATP-bağımlı kromatin-remodeling enzimler gibi transkripsiyonal sessizleşme ile ilişkili proteinlerin toplanmasına neden olur (Abbosh 2008). Önemli tümör baskılayıcı proteinleri, ilaç metabolize edici enzimleri ve DNA tamir proteinleri gibi önemli anahtar proteinleri kodlayan genlerin transkripsiyonal sessizleşmesi karsinogenez sürecinde, invazivlik ve metastatik yeteneğin kazanılmasında, anjiogenezde ve tedavi direncinin oluşmasında önemli rol oynamaktadır. Bu nedenle, birçok çalışmada DNA metilasyonu hem biyomarker olma hem de tedavi stratejilerinin belirlenmesinde önemli bir hedef olarak yer almaktadır. Özellikle klinik örneklerle yapılan çalışmalar, kanserin patofizyolojisinin aydınlatılmasında çok daha yararlı ve yeni bilgilerin elde edilmesine yardımcı olmaktadır (Abbosh 2008, Rodriguez-Paredes ve Esteller 2011, Taberlay ve Jones 2011).

Bu çalışma ile Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda histopatolojik olarak incelenen 'Ürotelyal karsinom' tanısı almış 80 mesane kanseri dokusuna ait parafin blok örnekleri ile 25 tümör baskılayıcı genin metilasyon paternleri, Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA) yönteminin bir türü olan Metilasyon spesifik-Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MS-MLPA) tekniği ile değerlendirildi, Mesane kanseri patogenezinde bu değişimlerin önemlerinin belirlenmesinin yanı sıra elde edilen verilerle olgulara ait patolojik verileri karşılaştırarak mesane kanserlerinde tümör davranışı hakkında bilgi edinilmesi, tanı, tedavi ve prognoz için literatüre katkı sağlanması amaçlandı.

2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI

2.1. Kanser

Kanser, çok basamaklı ve çok faktörlü bir süreç olup, hücrenin normal davranışlarını düzenleyen mekanizmaların bozulmasıyla ortaya çıkmaktadır. Özellikle, moleküler ve hücresel seviyede değerlendirilmesi gereken bir hastalık olan kanser, hücredeki ana düzenleyici mekanizmalardaki hasarlardan meydana gelir. Hücrelerin sürekli ve kontrolsüz çoğalması kanser gelişimine sebep olan temel değişikliklerden en önemlisidir. Hücrenin normal davranışlarını kontrol eden sinyallere doğru cevabı vermektense, kontrolsüz çoğalmaya ve bölünmeye devam eden, normal doku ve organları ele geçirerek tüm vücuda yayılan hücreler kanser hücreleri olarak nitelendirilir (Cooper ve Hausman 2006).

Kanser patolojisinde, en önemli konu benign ve malign tümörleri birbirinden ayırabilmektir. Hücrelerin anormal çoğalması sonucunda ortaya çıkan tümör benign ya da malign olabilir. Benign tümörler, çevredeki dokuya ya da vücudun uzak bölgelerine yayılmadan oluştukları yerde kalan ve lokal cerrahi rezeksiyonla alınan basit tümör türüdür. Malign tümörler, hem çevredeki normal dokuya, hem de kan ya da lenfatik sistem aracılığıyla vücudun diğer bölgelerine metastaz yaparak yayılır. Sadece malign tümörler kanserdir. Kanseri tehlikeli yapan, bunların yayılma ve metastaz yapma durumundan kaynaklanır (Cooper ve Hausman 2006).

Günümüzde kanserle ilgili yapılan çalışmaların sayısı oldukça fazladır. Mesane kanseri de görülme sıklığına bağlı olarak çok yönlü araştırılan kanserlerden biridir.

2.2. Mesane Kanseri

Mesane kanseri tüm dünyada en sık görülen malign genitoüriner tümörlerden biridir ve yüksek morbidite ve mortalite ile ilişkilidir (Lin vd 2012). Mesane kanseri, genetik, epigenetik ve çevresel faktörlerin çok aşamalı birikimi ile yönlendirilen moleküler bir hastalıktır (Agundez vd 2011, Cabello vd 2011).

2.2.1. Mesane kanserinin etiyojisi

Mesane kanserleri ile ilgili pek çok potansiyel risk faktörleri bilinmektedir. Mesane kanseri oluşumundaki faktörler; sigara kullanımı, mesleki karsinojenler, içme suyu, toplam sıvı alımı, kahve, alkol, çay, hayvansal yağların ve işlenmiş etlerin aşırı tüketimi, kronik sistit yada spesifik olmayan idrar yolu enfeksiyonu, uzun süre kateter kullanımı, üriner schistosoma, Diabetes Mellitus, tedavi edilemeyen hiperlipidemi, fenasetin içeren ilaçların kronik olarak tüketimi, genetik faktörler (N-asetiltransferaz 1 ve 2, GSTM1), radyasyon, pelvik radyoterapi, cinsiyet, yaş ve ırk olarak özetlenebilir (Marsit vd 2006, Jankovic ve Radosavljevic 2007, Tanaka vd 2011, Bachir ve Kassouf 2012). Bu faktörlerin en etkili olanlarından bazıları aşağıda kısaca özetlenmiştir.

Sigara kullanımı; Sigara kullanımı, Ürotelyal karsinomun (ÜK) gelişimi ile ilişkili bilinen en önemli risk faktörüdür (Marsit vd 2006, Jankovic ve Radosavljevic 2007, Horstmann vd 2008, Bachir ve Kassouf 2012, Brait vd 2013). Sigara dumanı içinde bulunan karsinojenlere maruz kalmanın ÜK'da mutasyonlara, kromozomal delesyona ve epigenetik değişikliklere neden olarak doğrudan ya da dolaylı olarak DNA'ya hasar verdiği bilinir (Brait vd 2013). Mesane kanseri ve sigara kullanımı arasındaki ilişki epidemiyolojik bir çok çalışmanın konusu olmuştur ve neredeyse bu çalışmaların tümünde sigara içenler ile içmeyenler karşılaştırıldığında sigara içenlerde mesane kanseri oluşma riskinin yaklaşık 2-3 kat daha fazla gözlenmiştir (Jankovic ve Radosavljevic 2007). Sigara, kimyasal karsinojenler olan aromatik aminler, N-nitrozo bileşikler, polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH) özellikle 2-naftilamin, 4-aminobifenil gibi 60'dan fazla karsinojenik bileşik içerir (Jankovic ve Radosavljevic 2007, Tanaka vd 2011, Bachir ve Kassouf 2012). Kanseri için sigaranın sayısı, sigara içilen sürede dumanın inhalasyon derinliği, ilk sigaraya başlama yaşı önemlidir. Sigarayı bırakan kişilerde mesane kanseri riski açısından, sigarayı bıraktıktan sonra ilk

dört yıl içinde yaklaşık % 30-40 oranında azaldığı ortaya çıkmıştır (Jankovic ve Radosavljevic 2007). Bu yüzden, sigarayı bırakma ürotelyal karsinom insidansını azaltmada çok önemli bir kriterdir (Bachir ve Kassouf 2012).

Mesleki Maruziyet; çok sayıda meslek grubunda çalışan işçilerin bir çok kanserojen maddeye maruz kaldığı bilinmektedir, bunların çoğunda ÜK gelişme riskinin arttırdığı görülmektedir (Bachir ve Kassouf 2012). Erkeklerde görülen mesane kanserlerinin yaklaşık % 27'sine, 19. yüzyılın sonunda Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa'da yapılan çalışmalarda mesleki mazuriyetin neden olduğu bildirilmektedir (Jankovic ve Radosavljevic 2007, Bachir ve Kassouf 2012). Benzidin, 2-naftilamin, 4-aminobifenil, 4-nitrobifenil, 4-4-diaminobifenil (benzidin) ve 2-amino-1-naftol gibi aromatik aminler ve PAH mesane kanseri riskini artırır (Marsit vd 2006, Jankovic ve Radosavljevic 2007, Tanaka vd 2011, Bachir ve Kassouf 2012).

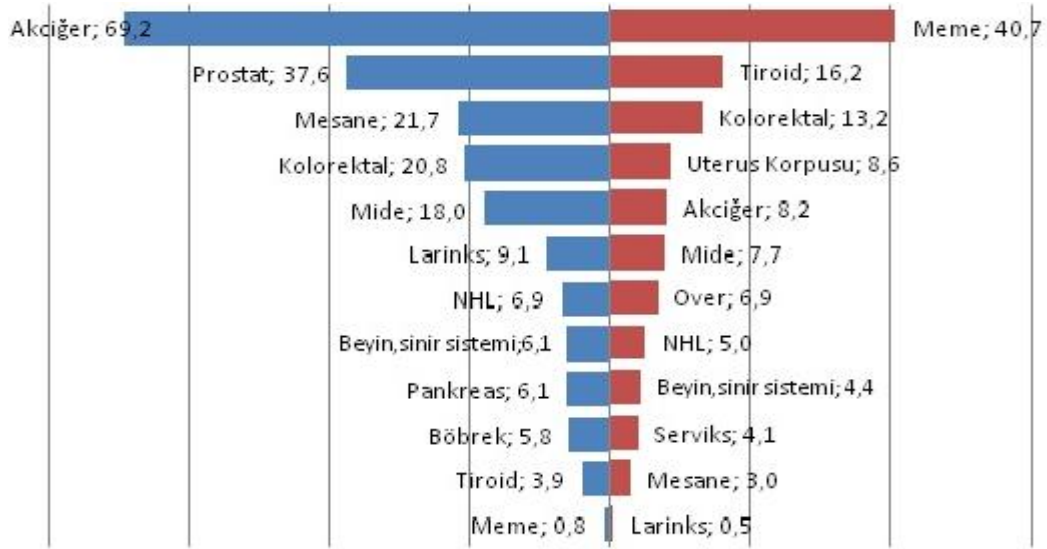
İçme suyu; içme suyundaki arsenik, klor ve nitrat bileşikleri genellikle mesane kanseri oluşumunda etkilidir (Jankovic ve Radosavljevic 2007). İçme suyundaki arsenikten günlük 200 µg gibi yüksek bir konsantrasyonda alınması mesane kanseri riskinde bir artışa neden olduğu bildirilmiştir (Marsit vd 2006, Jankovic ve Radosavljevic 2007, Bachir ve Kassouf 2012).

2.2.2. Mesane kanserinin epidemiyolojisi

Mesane kanseri, batı ülkelerinde erkekler arasında en yaygın görülen 4. kanserdir (Jarmalaite vd 2008). Mesane kanseri erkeklerde, prostat kanserinden daha az yaygın görülmekle birlikte, dünya çapında tahminen hesaplanan, yılda 848.170 yeni kanser vakası ve 301.820 kanserden ölüm sayısı ile en sık görülen 10 kanser türü arasındadır. Mesane kanseri, Amerika Birleşik Devletleri 2012 verilerine göre, 73.510 tahmin edilen yeni vaka sayısı ve 14.880 tahmin edilen ölüm sayısı ile yüksek mortalite ve morbiditeye sebep olmaktadır. Mesane kanserleri erkeklerde prostat, akciğer, kolorektal kanserlerden sonra sıklık açısından 55.600 tahmini yeni vaka sayısı ile 4. sırada yer almaktadır ve erkeklerdeki bütün kanserlerin % 7'sini oluşturmaktadır. Erkeklerde 10.510 tahmini ölüm sayısı ile ilk 10 kanser arasında ve % 3 sıklıkla 8. sırada yer almaktadır. Kadınlarda mesane kanseri % 1'den az bir oranla en sık görülen ilk 10 kanser türü arasında yer almamaktadır. Mesane tümörlerinin yaklaşık % 76'sı

erkeklerde, % 24'i kadınlarda görülmektedir. Amerika Birleşik Devletleri verilerine göre mesane tumörü erkeklerde kadınlardan 3 kattan daha fazla sıklıkta görülmektedir (Siegel vd 2012).

Ülkemizde ise, T. C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu 2008 yılı Türkiye kanser istatistiklerine göre, mesane kanseri en sık görülen ilk 12 kanser türü arasında erkeklerde 100.000'de 21.7 insidans ile 3. sırada, kadınlarda ise 100.000'de 3 insidans ile 11. sırada yer almaktadır (Şekil 2.1) (WEB_1, 2013).



Şekil 2.1 Türkiye'de 2008 yılı kadın ve erkek kanser insidans değerlerinin karşılaştırılması (WEB_1, 2013)

Mesane kanseri, her yaşta görülebilmesine rağmen genellikle orta veya ileri yaşlı insanların hastalığıdır (Aslan ve Mammadov 2010) ve olguların çoğu 50 yaş üzerinde (Kaya vd 2009) ortalama 70'li yaşlarda görülmektedir (Sexton vd 2010). Erkeklerde, kadınlara (E:K 3.8:1) oranla daha sık görülür (Gao vd 2012). Ürotelyal karsinomun, görülme sıklığı 60 yaşından sonra giderek artmasına karşın, 40 yaşından önce görülme oranı azdır ve genellikle iyi prognoza sahiptir (Oğuztüzün vd 2009). Kadınlar erkeklere kıyasla daha kötü prognoz göstermektedir (Altunoluk vd 2011).

Mesane kanseri insidansı ülkeler arasında dikkate değer ölçüde farklılıklar göstermektedir. Bu farklılıklar büyük oranda çevresel ve genetik etiyolojik faktörlere bağlanmaktadır. Çevresel faktörlerin yanı sıra ırk, cinsiyet ve yaş özellikleri de mesane

kanseri gelişimi için belirleyici risk faktörlerindedir (Jankovic ve Radosavljevic 2007). Gelişmiş sanayi ülkelerinde mesane kanseri sıklığı, gelişmemiş ülkelere göre fazladır, gelişmiş ülkelerdeki prevalans gelişmekte olan ülkelerdekini yaklaşık 6 katıdır (Keleş vd 2011).

2.2.3. Mesane Kanserinin Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 2004 sınıflaması

Tablo 2.1 Mesane kanserinin WHO 2004 sınıflaması (Eble vd 2004)

1- Ürotelyal tümörler
2- Skuamöz neoplaziler - Skuamöz hücreli karsinom - Verruköz karsinom - Skuamöz hücreli papillom
3- Glandüler neoplaziler - Adenokarsinom * Enterik * Müsinöz * Taşlı yüzük hücreli * Berrak hücreli - Villöz adenom
4- Nöroendokrin tümörler - Küçük hücreli karsinom - Karsinoid - Paraganglioma
5- Melanositik tümörler - Malign melanom - Nevüs
6- Mezenkimal tümörler - Rabdomyosarkom - Leiomyosarkom - Anjiosarkom

Devamı arkada

<ul style="list-style-type: none"> - Osteosarkom - Malign fibröz histiyositom (MFH) - Leiomyom - Hemanjiom - Diğerleri
<p>7- Hematopoetik ve lenfoid tümörler</p> <ul style="list-style-type: none"> - Lenfoma - Plazmositom
<p>8- Diğer Tümörler</p> <ul style="list-style-type: none"> - Skene, Cowper ve Littre glandlarının karsinomları - Metastatik tümörler ve diğer organlardan uzanan tümörler

2.3. Ürotelyal Karsinom (ÜK)

Histolojik olarak, mesane kanserinin % 90'ından fazlasını ürotelyal karsinom (ÜK) (aynı zamanda transizyonel hücreli karsinom, TCC olarak bilinir) oluşturur (Prat vd 2010, Chen vd 2011, Chung vd 2011, Lin vd 2012). ÜK, ABD'de ikinci en yaygın görülen genitoüriner malign bir hastalıktır (Brait vd 2013). Ürotelyal karsinomlar, histopatoloji ve klinik davranışına göre noninvaziv, invaziv mesane kanseri olarak 2 kategoride sınıflandırılabilir (Enokida ve Nakagawa 2008, Prat vd 2010). Mesane kanserlerinin yaklaşık % 70'i ilk tanıda kasa invaze olmayan yüzeysel tümörlerdir (pTa, pTis ve pT1). Bu tümörlerin % 50-70'inin tam transüretal rezeksiyon (TUR) sonrası nüks olmasına (Chen vd 2011, Lin vd 2011, Lin vd 2012) ve % 10-20'sinin kasa invazive kanserlere (pT2, pT3 ve pT4) ilerlemesine rağmen (Lin vd 2011, Lin vd 2012), genellikle non-invaziv tümörlerin prognozu iyidir. Mesane tümör tanısı için altın standart, şüpheli lezyonların biyopsi ile birlikte sistoskopi sonuçlarıdır (Chung vd 2011). Tanı anında, kas invazyonu gösteren mesane kanserlerinin (\geq pT2) kalan % 20-% 30'u yüzeysel papiller tümörler ile ilişkili değildir ve karsinoma *in situ*'dan kaynaklandığı düşünülmektedir. Kasa invaziv tümörleri olan hastaların yaklaşık % 50'sinde metastaz gelişir (Prat vd 2010). Mesane kanseri ölümleri tümör invazyonuyla artar. 5 yıllık genel sağkalım oranı, non-invaziv hastalıklar için % 90'dan az, hastalık evreleri pT2 için % 60, pT3 için % 35 ve pT4 için % 25'dir (Lin vd 2011, Lin vd 2012).

ÜK'lar, çok aşamalı bir süreçte meydana gelir. Birinci aşamada, hücre tabakalarının nükleer veya yapısal anomali olmadan çoğaldığı epitelyal hiperplazi oluşur. İkinci aşamada, değişici epitelyumun matür glandüler, tübüler veya skuamöz epitele dönüşmesiyle metaplastik değişiklikler meydana gelir. Üçüncü aşamada, kanser yüzeyel kalabilir, invazyon gösterebilir veya metastaz yapabilir (Bedük 2007). Ürotelyal karsinom herhangi bir bölgede görülebilir, ancak daha çok trigonda, üreter orifislerinde ya da mesane yan duvarlarda görülmektedir (Sertçelik 2007).

2.4. Ürotelyal Karsinomun WHO 2004 Sınıflaması

Tablo 2.2 Ürotelyal karsinomun WHO 2004 Sınıflaması (Eble vd 2004)

1. Non-invaziv ürotelyal neoplaziler
* Ürotelyal hiperplazi (Flat (düz) ve Papiller)
* Reaktif atipi
* Önemi bilinmeyen atipi
* Ürotelyal displazi (düşük dereceli intraürotelyal neoplazi)
* Ürotelyal karsinoma <i>in situ</i> (yüksek dereceli intraürotelyal neoplazi)
* Ürotelyal papillom
* İnvverted tip ürotelyal papillom
* Düşük malignite potansiyelli papiller ürotelyal neoplazi
* Non-invaziv düşük dereceli papiller ürotelyal karsinom
* Non-invaziv yüksek dereceli papiller ürotelyal karsinom
2. İnvaziv ürotelyal neoplaziler
* Lamina propria invazyonu
* Muskularis propria (detrusor kası) invazyonu

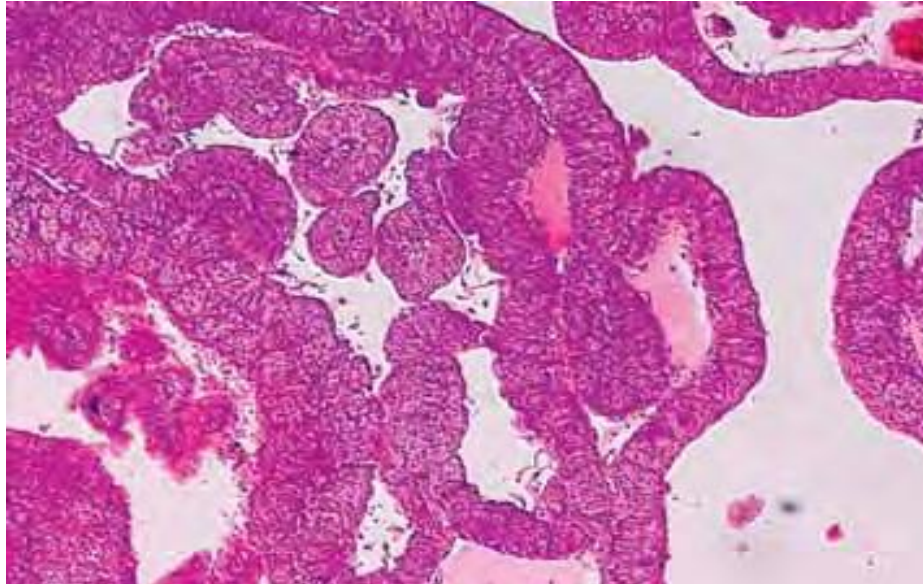
2.4.1. Non-invaziv papiller ürotelyal lezyonlar

Non-invaziv papiller ürotelyal lezyonlar kategorisinde yer alan ürotelyal papillom, invverted tip ürotelyal papillom, düşük malignite potansiyelli papiller ürotelyal neoplazi,

non-invaziv düşük dereceli papiller ürotelyal karsinom ve non-invaziv yüksek dereceli papiller ürotelyal karsinom aşağıda kısaca açıklanmıştır.

2.4.1.1. Ürotelyal papillom

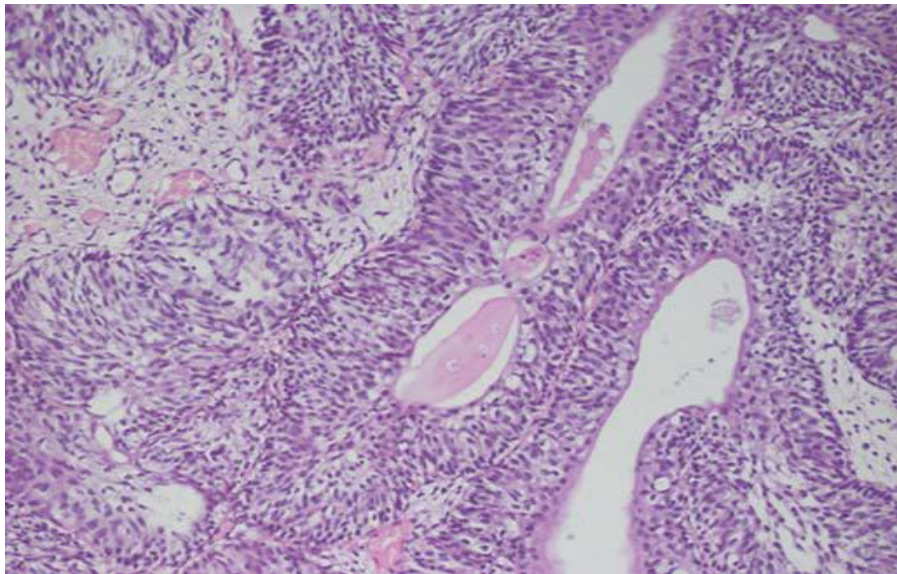
Ürotelyal papillom, normal kalınlıkta ürotelyum ve sitoloji ile kaplı olan merkezi fibrovasküler bir sap etrafında minimal dallanmalar yapabilen benign ekzofitik papiller büyüme gösteren neoplazi olarak tanımlanır (Eble vd 2004, Lopez-Beltran vd 2008). Düşük nüks oranına sahiptir (Lopez-Beltran vd 2008, Montironi 2008), ancak hiçbir ilerleme göstermez (Lopez-Beltran vd 2008). Mitoz nadir ya da yoktur ve mitoz sadece bazal hücrelerde görülür. Stroma, ödemli ve dağınık inflamatuvar hücreleri içerir (Eble vd 2004, Montironi ve Lopez-Beltran 2005). Küçük çaplı tek lezyon şeklinde ortaya çıkan papillomların, mesane tümör materyallerinde görülme insidansı düşük olup % 1-4'ten daha azdır. Erkeklerde kadınlara göre 1.9:1 oranında papillom görülür (Eble vd 2004). Hematüri yaygın gözlenir (Montironi ve Lopez-Beltran 2005). Çoğu papillom genç yaşlarda görülme eğiliminde olup, ortalama 46 yaşlarında belirir ve çoğunlukla üreter orifislerinin yakınında bulunurlar (Eble vd 2004, Montironi ve Lopez-Beltran 2005). Ürotelyal papillomun histolojik görüntüsü Şekil 2.2'de gösterilmiştir.



Şekil 2.2 Ürotelyal papillomun histolojik görüntüsü (Yörükoğlu 2006)

2.4.1.2. İverted tip ürotelyal papillom

İverted papillom, genç hastalarda mesanenin trigon bölgesinde ortaya çıkan farklı klinopatolojik özellik gösteren benign papiller ürotelyal neoplazidir (Montironi vd 2008). Hücreler, normal ila minimal sitolojik atipi ile inverted büyüme paterni gösterir (Lopez-Beltran vd 2008). Vakaların çoğunda, 3 cm'den küçük soliter nodüler ya da sapsız lezyonlar şeklinde görülür ve çoğunlukla mesanenin trigonunda ortaya çıkar, aynı zamanda idrar yolu boyunca üreter, renal pelvis ve üretrada gözlenebilir (Eble vd 2004, Montironi ve Lopez-Beltran 2005). Histopatolojik olarak, normal ürotelyum ve lamina propriaya doğru invajinasyon gösteren, mesanenin kas tabakasına geçmeyen ürotelyal hücrelerin endofitik kordonları ile kaplı pürüzsüz bir yüzeye sahiptir (Lopez-Beltran vd 2008). İverted papillomların histolojik olarak trabeküler ve glandüler diferansiyasyon paternleri mevcuttur (Eble vd 2004, Montironi vd 2008). Nükleer pleomorfizm yoktur (Montironi vd 2008). Fokal minor sitolojik atipi mevcuttur ancak mitoz nadirdir veya görülmez. Tamamen eksize edildikleri takdirde nüks riski çok düşüktür (Montironi ve Lopez-Beltran 2005, Lopez-Beltran vd 2008, Montironi vd 2008). İverted papillomlar, 10-94 yaşları arasında ve erkeklerde kadınlara göre 4-5:1 oranında görülmektedir. Hematüri ve obstrüktif semptomlar yaygın belirtilerdir. Olguların % 1'den daha azında nüks gözlenmektedir (Eble vd 2004, Montironi ve Lopez-Beltran 2005). Glandüler tip inverted ürotelyal papillomun histolojik görüntüsü Şekil 2.3'de gösterilmiştir.

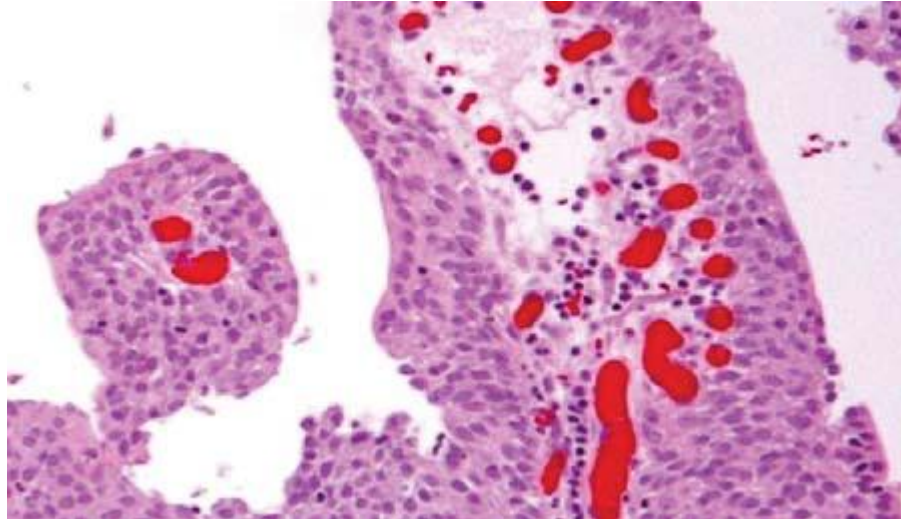


Şekil 2.3 Glandüler tip inverted ürotelyal papillomun histolojik görüntüsü (Neşe 2011)

2.4.1.3. Düşük malignite potansiyelli papiller ürotelyal neoplazi (DMPPÜN)

Sitolojik düzeyde malignite bulguları göstermemekle birlikte normal ürotelyal hücre kalınlığında sıralanma artışı olan ekzofitik ürotelyal papilloma benzeyen non-invaziv papiller ürotelyal neoplazidir. Sistoskopide, çoğu durumda soliter, 1-2 cm çapındadır ve üreter orifislerinin yakınında yan ya da arka duvarda lokalizedir (Eble vd 2004, Montironi ve Lopez-Beltran 2005).

DMPPÜN'leri papillomdan ayıran en önemli özellik ürotelyumdaki kalınlaşma, aynı zamanda önemli ölçüde nükleuslarda irileşme ve sayıca artış bulunmasıdır (Eble vd 2004, Lopez-Beltran vd 2008). Nükleuslarda önemli ölçüde hiperkromazi veya pleomorfizm eksikliği görülür. Nükleoluslar seçilemez ve kromatin dağılımı üniformdur (Montironi vd 2008). Polarite korunmuştur, ürotelyal papillomun tersine yapısal değişiklik yoktur ya da minimaldir aynı zamanda sitolojik atipi vardır (Montironi ve Lopez-Beltran 2005). Mitoz nadirdir ve sadece bazal tabaka ile sınırlıdır (Eble vd 2004, Montironi vd 2008). Bu lezyon nadir durumlar dışında invazyon ya da metastaz ile ilişkili değildir. Gros veya mikroskopik hematüri sık görülür. Erkek kadın oranı 5:1'dir ve tanı anında ortalama yaş 65'dir (29-94 yaş aralığı) (Montironi ve Lopez-Beltran 2005). Güncel prognostik bilgiler, DMPPÜN'nin düşük ya da yüksek dereceli papiller karsinomlardan daha düşük nüks oranına ve çok düşük derece ve evre progresyon oranlarına sahip olduğunu göstermektedir (Montironi vd 2008). Tümör nüksü, evre ilerlemesi ve tümör ile ilişkili mortalite sırasıyla yaklaşık olarak hastaların % 35'i, % 4'ü ve % 2'den daha azında görülür (Lopez-Beltran vd 2008). DMPPÜN'nin histolojik görüntüsü Şekil 2.4'de gösterilmiştir.



Şekil 2.4 DMPPÜN'nin histolojik görüntüsü (Sexton vd 2010)

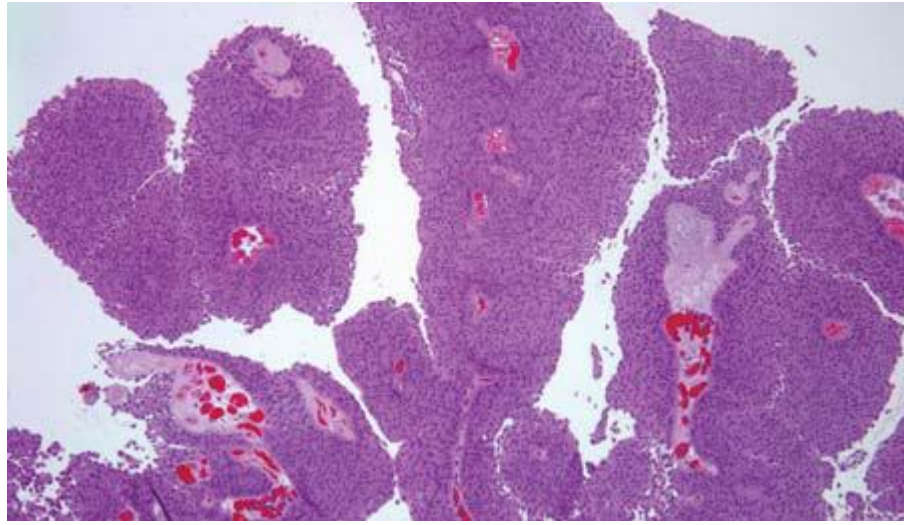
ÜK'lar, Tablo 2.2'de görüldüğü gibi sınıflandırılmakta olup bizim olgularımız non-invaziv ürotelyal neoplazilerin düşük ve yüksek dereceli papiller ürotelyal karsinom grubuna girmektedir.

2.4.1.4. Non-invaziv düşük dereceli papiller ürotelyal karsinom (DDPÜK)

Genel olarak düzenli bir görünüme sahip ürotelyum ile dōşeli papiller neoplazidir, ancak DMPPÜN ile karşılaştırıldığında küçük büyütmelerde bile rahatlıkla tanınabilen yapısal ve sitolojik farklılıklar görülür (Eble vd 2004, Montironi ve Lopez-Beltran 2005).

Non-invaziv düşük dereceli papiller ürotelyal karsinomlarda gözlenen sitolojik atipi bulguları, polaritede düzensizlik, nükleer şekil ve boyut farklılıkları, kromatin dağılımında düzensizlik şeklinde görülür. Nükleolus belirginliği olabilir. Mitotik figürler az görülür ve genellikle ürotelyumun alt yarısında lokalizedir (Eble vd 2004, Lopez-Beltran vd 2008), ancak ürotelyumun herhangi bir seviyesinde de mitoz mevcuttur. Ürotelyumun yapısal özellikleri hakkında doğru bir karar verilebilmesi için histolojik değerlendirmenin papiller yapıların uzun eksenine dikey gelen kesitlerde yapılması uygundur. Özellikle papiller uzantıların tabanına yakın bölgelerden geçen teyet kesitlerin görünümü hatalı değerlendirmelere neden olabilir (Eble vd 2004). Erkek

kadın oranı 2,9:1'dir. Ortalama 70'li yaşlarda görülür. Çoğu hastada hematüri mevcuttur, posterior ya da lateral duvarda tek bir tümör bulunur (Montironi ve Lopez-Beltran 2005). Bu tümörler, DMPPÜN ve yüksek dereceli papiller karsinomlara benzeyen daha yüksek nüks oranına, aynı zamanda DMPPÜN'den daha yüksek, yüksek dereceli papiller karsinomdan daha düşük evre progresyonuna sahiptirler (Montironi vd 2008). Tümör nüksü, evre ilerlemesi ve tümörle ilişkili mortalite oranları sırasıyla % 50, % 10 ve % 5'dir (Lopez-Beltran vd 2008). DDPÜK'un histolojik görüntüsü Şekil 2.5'de gösterilmiştir.

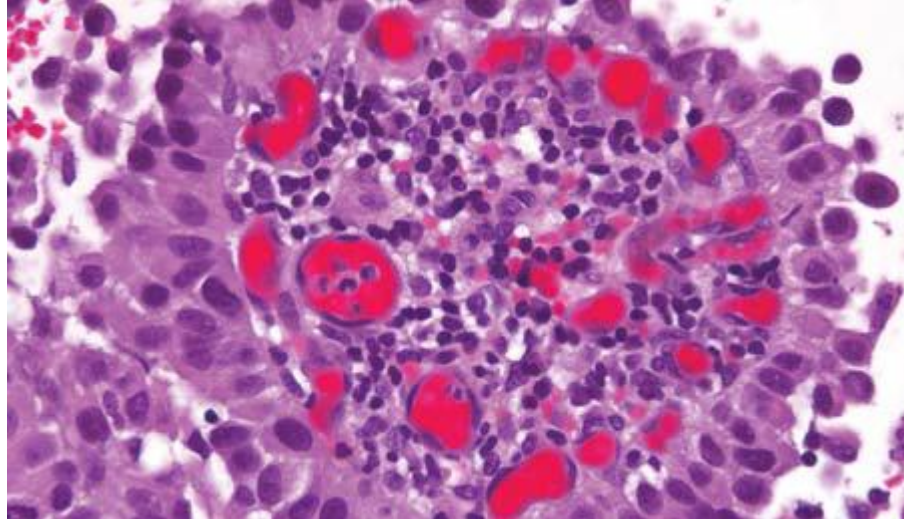


Şekil 2.5 DDPÜK'un histolojik görüntüsü (Sexton vd 2010)

2.4.1.5. Non-invaziv yüksek dereceli papiller ürotelyal karsinom (YDPÜK)

En iyi şekilde küçük büyütmede bile kolaylıkla görülebilen, belirgin yapısal ve sitolojik anormalliklerle karakterize tümörlerdir (Eble vd 2004, Montironi ve Lopez-Beltran 2005, Lopez-Beltran vd 2008). Papiller yapılar birleşme eğilimindedir. Nükleuslarda polarite kaybı gözlenir (Eble vd 2004). Nükleus, hiperkromatik ve pleomorfiktir (Montironi vd 2008). Kromatin yoğun ve düzensiz olarak dağılmıştır. Nükleolus tek veya birden fazla olabilir ve genellikle belirgindir (Montironi ve Lopez-Beltran 2005, Montironi vd 2008). Mitotik figürler atipik formda olup ürotelyumun her seviyesinde izlenir (Eble vd 2004, Lopez-Beltran vd 2008, Montironi vd 2008). Farklı derecede diferansiyasyon alanları bulunan tümörlerde, derecelendirme en yüksek dereceli alan baz alınarak yapılmalıdır (Eble vd 2004). Hematüri yaygın görülür

(Montironi ve Lopez-Beltran 2005). YDPÜK'lar sadece invazyon riskine sahip değildir aynı zamanda önemli ölçüde nüks ve progresyon riskine sahiptirler (Montironi vd 2008). YDPÜK'larda progresyon riski DDPÜK'lara göre yüksektir %15-40 arasında değişir (Eble vd 2004, Lopez-Beltran vd 2008, Montironi vd 2008). Ayrıca tanı anında invaziv olma oranı yüksektir (Eble vd 2004, Lopez-Beltran vd 2008). YDPÜK'un histolojik görüntüsü Şekil 2.6'da gösterilmiştir.



Şekil 2.6 YDPÜK'un histolojik görüntüsü (Sexton vd 2010)

Papiller ürotelyal neoplazilerde derece tayini, 2004 Dünya Sağlık Örgütü'nün ÜK evreleme kriterlerine uygun olarak, neoplazmin sitolojik ve yapısal özellikleri göz önüne alınarak yapılmakta olup, Tablo 2.3'de gösterilmiştir.

Tablo 2.3 Ürotelyal papiller lezyonların histolojik özellikleri (Montironi vd 2008)

Y		Papillom	DMPPÜN	DDPÜK	YDPÜK
A	Papiller yapı	İnce	İnce, bazen birleşik	Birleşik, dallanmış ve ince	Birleşmiş, dallanmış ve ince
P					
I	Hücrelerin	Normalle aynı	Polarite normalle aynı, herhangi bir	Baskın patern düzenli, minimal	Baskın patern düzensizliği ile yaygın
S	organizasyonu		kalınlıkta, koheziv	kalabalasma ve polaritede minimal	polarite kaybı, herhangi bir kalınlıkta,
A				kayıp, herhangi bir kalınlıkta,	genellikle diskoheziv
L				koheziv	
S	Nükleus	Normalle aynı	Uniform olarak genişlemiş olabilir	Çeşitli büyüklüklerde genişlemiş	Çeşitli büyüklüklerde genişlemiş nükleus
İ	Büyüklüğü			nükleus	
T	Nükleer Şekil	Normalle aynı	Uzamış, yuvarlak-oval,	Yuvarlak-oval, şekil ve konturda	Orta-şiddetli pleomorfizm
O			uniform	küçük değişiklikler	
L	Nükleer	Normal	Normal	Hücrelerde ve arasında hafif	Hiperkromazi ile hücreler ve hücreler
O	Kromatin			değişiklikler	arasında orta-belirgin değişiklikler
J	Nükleolus	Yok	Yok ya da belli belirsiz	Genellikle belli belirsiz*	Çok sayıda belirgin nükleolus görülür
İ	Mitoz	Yok	Nadir, bazalde yerleşir	Bazen; herhangi bir seviyede olabilir	Genellikle sıktır, herhangi bir seviyede
K					olabilir
	Şemsiye	Uniform olarak	Görülür	Genellikle görülür	Görülmeyebilir
	Hücreleri	görülür			

* Görünüm küçük ve düzenli ve YDPÜK'un diğer özellikleri eşlik etmiyorsa

Ürotelyal papiller lezyonların tiplerine göre prognoz ile ilişkisi Tablo 2.4'de verilmiştir.

Tablo 2.4 Ürotelyal papiller lezyonların prognozu (Lopez-Beltran vd 2008)

	Papillom	DMPPÜN	DDPÜK	YDPÜK
Rekürrens (nüks)	% 0-8	% 27-47	% 48-71	% 55-58
Dereceye göre progresyon	% 2	% 11	% 7	Bilinmiyor
Evreye göre progresyon	% 0	% 0-4	% 2-12	% 27-61
Sağ kalım	% 100	% 93-100	% 82-96	% 74-90

ÜK'ların büyük bir kısmı non-invaziv ürotelyal neoplaziler grubuna girmekle birlikte, invazyon ilerledikçe invaziv ürotelyal neoplaziler evrelemede önem kazanmakta olup çeşitleri aşağıda verilmiştir.

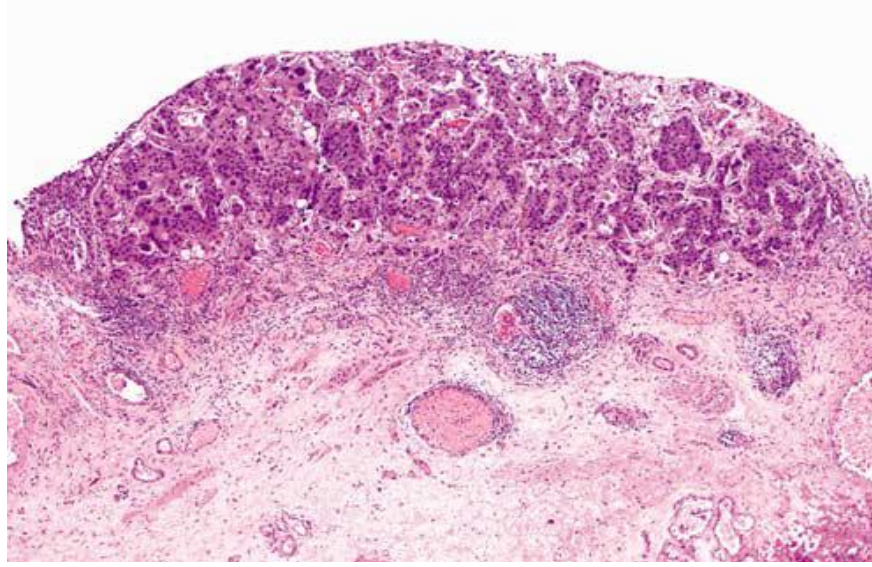
2.4.2. İnvaziv ürotelyal neoplaziler

WHO 2004'de önerilen invaziv ürotelyal karsinomlar, bulunduğu bölgeye göre düşük ya da yüksek dereceli olarak sınıflandırılır (Lopez-Beltran vd 2008). Lamina propria invazyonu gösteren tümörler (pT1) genelde papiller özellik göstermekte olup düşük derecelidir. Muskularis propria veya daha derine invazyon gösteren tümörler (pT2-pT4) yüksek dereceli tümörlerdir (Eble vd 2004).

2.4.2.1. Lamina propria invazyonu

Lamina propria invazyonu neoplastik ürotelyal hücrelerin tek tek, adalar ve kümeler halinde lamina propria içerisinde gözlenmesi ile karakterizedir. İnfiltratif adaların kenarlarında kanser hücreleri bol eozinofilik sitoplazmalıdır. İnvaziv tümörlerde her zaman desmoplastik veya inflamatuvar stromal cevap belirgin değildir. Lamina propria invazyonu olan tümörlerde belirgin retraksiyon artefaktı, yanlılıkla vasküler invazyon olarak değerlendirilebilir. Lamina propria invazyonlu vakalarda vasküler invazyon

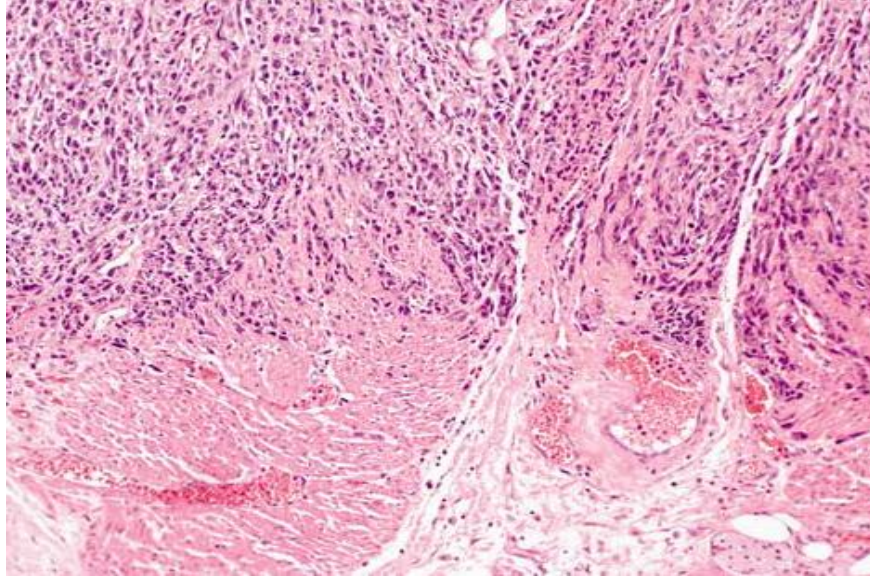
nadirdir. İmmünohistokimya ile doğrulanmalıdır (Reuter 2006). Lamina propria içine invazyon yapan pT1 ürotelyal karsinomun histolojik görüntüsü Şekil 2.7’de gösterilmiştir.



Şekil 2.7 Lamina propria içine invazyon yapan pT1 ürotelyal karsinomun histolojik görüntüsü (Cheng vd 2009)

2.4.2.2. Muskularis propria (detrusor kası) invazyonu

Tümör hücreleri kalın düz kas demetlerine infiltre olduğunda muskularis propria tanısı konur. TUR materyalinde, muskularis propria ve lamina propria invazyonu ayırt etmek zordur. Muskularis propria invazyonu değerlendirmesi çok önemlidir. Özellikle, geniş infiltrasyon gösteren tümörlerde dağınık düz kas demetleri lamina propriaya ya da parçalanmış muskularis propriaya ait olabilir. Muskularis propria invazyonu varlığının bellirsiz olduğu bu durumlarda, ürologlara bilgi vermek önemlidir yani ürologlarla bu bilgiyi paylaşmak gerekir (Reuter 2006). Muskularis propria içine invazyon yapan pT2 ürotelyal karsinomun histolojik görüntüsü Şekil 2.8’de gösterilmiştir.



Şekil 2.8 Muskularis propria içine invazyon yapan pT2 ürotelyal karsinomun histolojik görüntüsü (Cheng vd 2009)

ÜK'ların tanı, tedavi ve prognozunda karşılaşılan komplikasyonlarda histolojik varyantların önemi dikkat çekmektedir (Amin 2009).

2.5. Ürotelyal Karsinomun Histolojik Varyantları

Varyant terimi tümörün belirli bir türünü ayırt edici olarak farklı bir histomorfolojik fenotipini tanımlamak için kullanılır. Son yıllarda, ürotelyal karsinomalar ile artan deneyimin sonucu olarak ürotelyal karsinomun mikroskopik formlarının spektrumu çeşitli sıradışı histolojik varyantlarını içerecek şekilde genişletilmiştir. Ürotelyal tümörlerin histolojik varyantlarının tanınması önemlidir. Çünkü, bazı türleri farklı klinik sonuçlarla ilişkili olabilir, bazılarında farklı tedavi yaklaşımları görülür ve sıradışı paternlerinin bilinci yanlış tanıyı önlemekte kritik rol oynar (Amin 2009). Aşağıdaki tabloda ÜK'un histolojik varyantları gösterilmektedir.

Tablo 2.5 Ürotelyal karsinomun histolojik varyantları (Lopez-Beltran ve Cheng 2006, Amin 2009)

1. Skuamöz diferansiyasyon gösteren ürotelyal karsinom
2. Glandüler diferansiyasyon gösteren ürotelyal karsinom
3. Nest oluşturan varyant
4. Tübüler varyant
5. Mikrokistik patern
6. İverted papillom benzeri ürotelyal karsinom
7. Mikropapiller varyant
8. Lenfoepitelyoma benzeri karsinom
9. Sarkomatoid karsinom
10. Küçük hücreli karsinom
11. Büyük hücreli nöroendokrin karsinom
12. Trofoblastik diferansiyasyon gösteren ürotelyal karsinom
13. Plazmasitoid varyant
14. Rabdoid özellikler gösteren ürotelyal karsinom
15. Berrak hücreler gösteren ürotelyal karsinom
16. Lipoid bakımından zengin varyant
17. Osteoklast bakımından zengin farklılaşmamış karsinom
18. Dev hücreli karsinom

Tüm kanserlerde olduğu gibi ÜK'larda da tümör derecesi, mesane tümörlerinde progresyonu belirleyen en önemli prognostik faktördür (Korgalı ve Gültekin 2010).

2.6. Ürotelyal Karsinomun Derecelenmesi

Tarihsel süreçte, mesane tümörlerinin derecelendirilmesi değişiklik göstermektedir (Korgalı ve Gültekin 2010). Papiller ürotelyal neoplaziler için ilk yaygın olarak kabul edilen derecelendirme sistemi, Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) 1973 sınıflama sistemidir (Montironi vd 2008). Bu sisteme göre ürotelyal papiller neoplaziler dört sınıfa ayrılmıştır: papillom, grade 1 karsinom, grade 2 karsinom ve grade 3 karsinom

(Montironi vd 2008). Aralık 1998’de, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Uluslararası Ürolojik Pataloji Derneği (ISUP) üyeleri tarafından mesane kanserinin, invaziv olmayan flat lezyonlarının ve ürotelyal (transizyonel hücreli) neoplazilerinin WHO/ISUP konsensus sınıflaması yayınlanmıştır (Kirkali vd 2005, Montironi vd 2008, Keleş vd 2011). 1998 WHO/ISUP sınıflama sistemine göre papiller ürotelyal neoplaziler ; DMPPÜN (Düşük Malignite Potansiyelli Papiller Ürotelyal Neoplazi), DDPÜK (Düşük Dereceli Papiller Ürotelyal Karsinom) ve YDPÜK (Yüksek Dereceli Papiller Ürotelyal Karsinom) olmak üzere üç kategoriye bölünmüştür (Keleş vd 2011). 1998 WHO/ISUP sınıflama sistemi, 1999’da WHO tarafından (WHO 1999) revize edilmiştir (Yörükoğlu 2006, Petraki ve Sfikas 2008). 2004’te WHO, 1998 ISUP konsensus sınıflama sistemini kabul etmiştir ve 2004 WHO/ISUP sınıflaması ortaya çıkmıştır (Miyamoto vd 2010). Bu sisteme göre daha önce papillom, grade 1 karsinom, grade 2 karsinom ve grade 3 karsinom olarak sınıflandırılan non-invaziv papiller ürotelyal neoplazmlar sırasıyla; papillom, düşük malignite potansiyelli papiller ürotelyal neoplazi, düşük dereceli papiller ürotelyal karsinom ve yüksek dereceli papiller ürotelyal karsinom olarak sınıflandırılmaktadır (Montironi vd 2008, Korgalı ve Gültekin 2010, Miyamoto vd 2010).

Sistemlerin adaptasyonu yapılırken ürotelyal papiller neoplazilerin sınıflandırılmasında bazı değişiklikler yapılmıştır. 1973 WHO sınıflamasında G1 tümörler, 2004 WHO/ISUP sınıflamasında düşük malignite potansiyelli papiller ürotelyal neoplaziler ve düşük dereceli papiller ürotelyal karsinom kategorilerinde, 1973 WHO sınıflamasında G2 tümörler, 2004 WHO/ISUP sınıflamasında düşük dereceli papiller ürotelyal karsinom ve yüksek dereceli papiller ürotelyal karsinom kategorilerinde, 1973 WHO sınıflamasında G3 tümörlerin tümü, 2004 WHO/ISUP sınıflamasında yüksek dereceli papiller ürotelyal ürotelyal karsinom kategorisinde değerlendirilmeye başlanmıştır. Tümör derecesinin tümör nüksü, progresyonu ve mortalitesi üzerine olan etkileriyle ilgili yapılan çalışmalarda, tümör derecesinin nüksten çok progresyon ve mortaliteyi belirleyen önemli bir prognostik faktör olduğu tespit edilmiştir (Korgalı ve Gültekin 2010).

Diğer kanserlerde olduğu gibi mesane karsinomlarında da, patolojik evreleme prognoz ve tedavinin belirlenmesinde önemli bir belirteçdir (Reuter 2006, Cheng vd 2009).

2.7. Ürotelyal Karsinomun TNM (Primer tümör/ Lenf Nodu/ Uzak Metastaz)

Evrelemesi

İdeal evreleme sistemi kanserin doğal hikayesini doğru olarak yansıtmalıdır. Tanı anındaki yayılım sahası ile beraber total kanser yükü tanımlanmalıdır ve hastalar tedavi planı için prognostik gruplara ayrılabilir (Tablo 2.6). Yüzeysel mesane kanseri terimi, muskularis propriaya invaze olmamış tümörleri tanımlamak için kullanılmaktadır. Bu tanımlama non-invaziv papiller ürotelyal karsinom (pTa), karsinoma *in situ* (KİS) ve lamina propria içine invaze tümörlerini (pT1) kapsar. American Joint Committee on Cancer (AJCC) ve International Union Against Cancer (UICC) tarafından ortaklaşa geliştirilmiş TNM sistemi yaygın olarak kullanılan evreleme sistemidir (Cheng vd 2009).

AJCC/UICC TNM sistemi kullanılarak, ürotelyal karsinomun invazyon derinliğine dayalı evrelendirilmesi yapılmaktadır (Reuter 2006) (Tablo 2.6). Evre pT0 karsinom, biyopsi ya da TUR örneklerinde kanser tanısı konduktan sonra sistektomi örneğinde rezidüel karsinom bulunmayan bir durum olarak tanımlanır. Evre pT0 mesane karsinom insidansı yaklaşık olarak % 10'dur. Evre pTa karsinom, non-invaziv papiller karsinom olarak belirtilmektedir. Lamina propria invazyonu olan pT1 kanserlerden ayrılmalıdır. Evre pT1 karsinom, lamina propria içine invazyon yapan, ancak muskularis propria invazyonu yapmayan olarak tanımlanmaktadır. Evre pT2 karsinom, muskularis propria içine tümör invazyonu yapan olarak belirtilmektedir. pT2 karsinom, 2 alt kategoriye ayrılır. pT2a karsinom'da, muskularis propria'ya invazyon derinliği yarıdan daha azdır, pT2b karsinom'da ise, kas duvarının yarısından fazlasında invazyon görülür. Evre pT3 karsinom, perivezikal yumuşak doku içine tümör invazyonu ile tanımlanır. pT3a, mikroskopik ekstrevezikal uzantılı tümörler ve pT3b, makroskopik ekstrevezikal uzantılı tümörler olarak pT3 karsinom'un 2 alt sınıfını oluştururlar. Evre pT4 karsinom, uterus, vajina, prostat, pelvik veya karın duvarı dahil olmak üzere bir komşu organ içine tümör invazyonu olarak tanımlanır. pT4a, prostat, uterus ya da vajina invazyonu içerirken, pT4b, pelvik veya karın duvarına invazyonu göstermektedir (Cheng vd 2009)

(Şekil 2.9). AJCC/UICC TNM sınıflandırmasına göre, derin invaziv tümörlerde (T2-T3b arası) sağkalımın büyük ölçüde azaldığı ve yüzeysel tümörlerin (Ta, T1) prognozunun derin invaziv tümörlere göre daha iyi prognoza sahip oldukları bildirilmektedir. Doğru patolojik evreleme yapabilmek için organın temel histolojisini iyi bilmek gerekmektedir. Mesanede ürotelyum, bağ dokusu ve vasküler ve nöral yapılardan oluşan bazal membran ve lamina propria ile örtülüdür (Reuter 2006). Non-invaziv tümörlerde, bazal membran sınırları düzenlidir ve bazal membrana paralel proliferatif damar yapıları mevcuttur. İnvaziv tümörlerde, bazal membranın bu özellikleri gözlenmez. Non-invaziv tümörlerin stromasında miksoid değişiklikler, fibroblastik stromal proliferasyon, stromal sellülaritede ve fibroblastlarda proliferasyon izlenirken, invaziv tümörlerde tümörün çevresinde inflamatuvar ve kollojen içeren dezmozoplastik reaksiyonlar görülebilir (Sternberg vd 2004).

Tablo 2.6 Ürotelyal karsinomun TNM sınıflaması ve evre grupları (Eble vd 2004)

<p><u>T-Primer tümör</u></p> <p>TX: Primer tümör değerlendirilemedi</p> <p>T0: Primer tümör bulgusu yok</p> <p>Ta: Noninvaziv papiller karsinom</p> <p>Tis: Karsinoma <i>in situ</i>: ‘flat tümör’</p> <p>T1: Subepitelyal bağ dokuda tümör var</p> <p>T2: Kas invazyonu var</p> <p style="padding-left: 20px;">T2a: Yüzeysel kas invazyonu (iç yarı)</p> <p style="padding-left: 20px;">T2b: Derin kas invazyonu (dış yarı)</p> <p>T3: Perivezikal yağ doku invazyonu var</p> <p style="padding-left: 20px;">T3a: Mikroskopik</p> <p style="padding-left: 20px;">T3b: Makroskopik</p> <p>T4: Prostat, uterus, vajina, pelvik duvar, abdominal duvar yapılarından herhangi birine invazyon</p> <p style="padding-left: 20px;">T4a: Prostat, uterus ya da vajina invazyonu</p> <p style="padding-left: 20px;">T4b: Pelvik duvar ya da abdominal duvar invazyonu</p>
<p><u>N-Bölgesel lenf nodları</u></p>

Devamı arkada

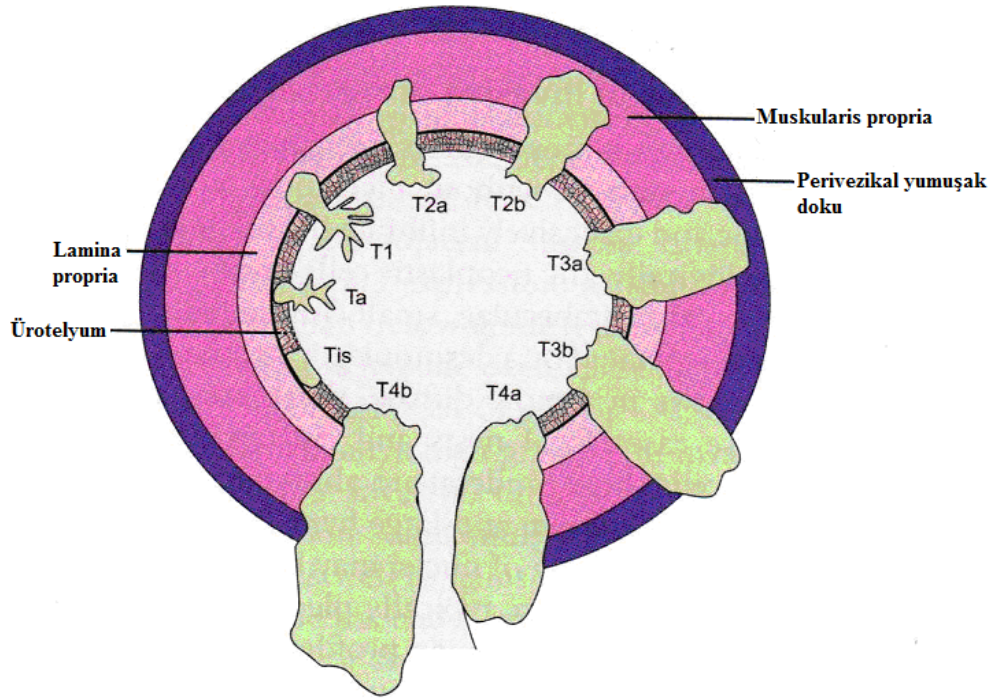
Nx: Bölgesel lenf nodu değerlendirilemedi
 N0: Bölgesel lenf nodu metastazı yok
 N1: 2 cm ya da daha küçük tek lenf nodu metastazı var
 N2: 2-5 cm arası boyutlarda tek lenf nodu ya da 5 cm'den küçük multipl metastaz var
 N3: Boyutu 5 cm'den büyük lenf nodu metastazları var

M-Uzak metastaz

Mx: Uzak metastaz değerlendirilemedi
 M0: Uzak metastaz yok
 M1: Uzak metastaz var.

Evre Grupları

EVRE 0a	Ta	N0	M0
EVRE 0is	Tis	N0	M0
EVRE I	T1	N0	M0
EVRE II	T2a, b	N0	M0
EVRE III	T3a, b	N0	M0
	T4a	N0	M0
EVRE IV	T4b	N0	M0
	Herhangi bir T	N1, N2, N3	M0
	Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1



Şekil 2.9 Mesane kanserinde TNM evreleme sistemi (Bostwick ve Cheng 2008)

Kanser genetiğinde, tümör gelişmesiyle ilgili en azından iki temel genetik değişiklik bilinmektedir. Bunlardan biri hücrel onkogenlerin aktivasyonu, diğeri ise tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonudur (Cooper ve Hausman 2006). Tez konumuzla ilgili olarak tümör baskılayıcı genlerle ilgili genel bilgiler aşağıda verilmiştir.

2.8. Mesane Kanseri Tumor Baskılayıcı Genler

Tümör baskılayıcı genlerin kodladığı proteinler, protoonkogen ve onkogen proteinlerinin aksine, hücrenin çoğalmasını ve sağ kalımını baskılar. Tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu ile negatif düzenleyici olarak görev yapan bu proteinlerin ortadan kaldırılması tümör oluşumunu sağlar. Tümör baskılayıcı proteinler, çoğunlukla onkogenler ile uyarılan aynı sinyal yollarını baskılar (Cooper ve Hausman 2006).

Kromozom 9 delesyonları, mesane kanseriyle ilişkilendirilen en yaygın kromozomal anomalliktir ve hem yüzeysel hem de kasa invaziv mesane kanserlerinde gözlenmektedir. Ayrıca bu değişiklikler, TCC'nin moleküler patogeneziinde erken gerçekleşen bir olaydır. Diğer kromozomal delesyonlar, kromozom 13 (*RB*, Retinoblastoma geni) ve

kromozom 17'de (*p53* geni) tespit edilmiştir. En yaygın kromozom 9 delesyonları, *p16INK4A*, *p14ARF* ve *p15INK4B* gibi üç farklı proteini kodlayan 9p21 lokusunu içerir. Bu proteinlerin her biri negatif hücre döngüsü düzenleyici olarak görev yapar ve bu yüzden potansiyel tümör baskılayıcı genler olarak kabul edilir. Kromozom 9 kayıpları, mesane onkogenezinde ve *p53* değişikliklerinden önce erken ortaya çıkar (Buscarini vd 2005).

13. kromozom üzerinde, *RB* gen mutasyonları mesane kanserlerinin % 25-30'unda bulunmaktadır. *RB* lokusunda (13q14) heterozigot kaybı, immünohistokimyasal teknikler tarafından belirlenen protein ekspresyon yokluğu ile ilişkilidir. 17. kromozomda, en iyi bilinen kromozomal değişiklik 17p13'deki (*p53*) tümör baskılayıcı gende gerçekleşir (Buscarini vd 2005).

Bir çok kanserde olduğu gibi genetik faktörlerin yanında epigenetik değişikliklerinde tanı, tedavi ve prognozda önem taşıdığı vurgulanmaktadır.

2.9. Mesane Kanserinde Epigenetik Mekanizmalar

Epigenetik, mutasyonların aksine DNA'nın nükleotid dizisinde herhangi bir değişim olmaksızın gen ekspresyonundaki kalıtsal değişiklikler olarak tanımlanır (Hamilton 2011). Epigenetik mekanizmalar, DNA metilasyonu, histon modifikasyonları, kromatinin yeniden düzenlenmesi, genomik imprinting ve kodlamayan RNA'lardaki değişimlerdir. Bunlardan ürolojik kanserlerde en etkin görülen epigenetik mekanizmalar, DNA metilasyonu, histon modifikasyonları, kromatinin yeniden düzenlenmesi ve mikroRNA'lardır (Erol vd 2010, Hamilton 2011). Epigenetik değişiklikler arasında DNA metilasyonu kanserde en yaygın görülen epigenetik mekanizmadır (Agundez vd 2011).

Kanser gelişiminde ve ilerlemesinde epigenetik mekanizmalar önemlidir. CpG adalarının hipermetilasyonu, tümör baskılayıcı genlerin (TSG) transkripsiyonel susturulmasında kritik rol oynar (Sanchez-Carbayo 2012). Sıklıkla metillenmiş genler, hücre döngüsü kontrolü, DNA onarımı, apoptoz ve invazyon gibi farklı biyolojik yollarda yer alırlar (Kim ve Quan 2005, Jarmalaite vd 2008, Sanchez-Carbayo 2012).

Karsinogenezde erken evrede ortaya çıkan TSG'lerin metilasyon durumunun belirlenmesi yalnızca tanı için değil, aynı zamanda prognoz ve değerlendirme için de önemlidir (Agundez vd 2011).

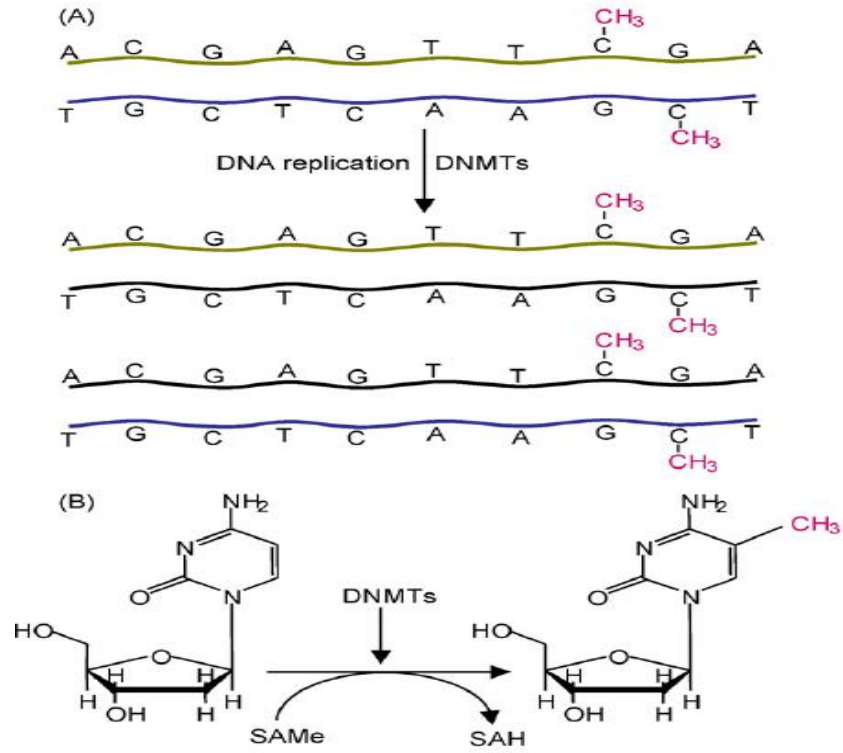
2.9.1. DNA metilasyonu

DNA metilasyonu, insan kanserlerinde en yaygın çalışılan epigenetik mekanizmadır (Marsit vd 2007, Sharma vd 2010, Cabello vd 2011, Hoffman ve Cairns 2011, Jeronimo ve Henrique 2011) ve DNA dizisinde sitozin nükleotidinde bir metil grubunun kovalent olarak eklenmesidir (Hamilton 2011). Metilasyon, DNA metiltransferazlar (DNMTs) olarak bilinen spesifik bir enzim ailesi tarafından kontrol edilir (Enokida ve Nakagawa 2008, Hamilton 2011, Jeronimo ve Henrique 2011, Majumdar vd 2011). Metilasyon, çoğunlukla insan genlerinin 5' ucunda bulunan CpG adaları olarak adlandırılan CpG dinükleotidlerindeki guanin nükleotidini takip eden sitozin bazlarında oluşur (Enokida ve Nakagawa 2008, Bogdanovic ve Veenstra 2009, Sharma vd 2010, Hamilton 2011, Hoffman ve Cairns 2011, Jeronimo ve Henrique 2011, Kosova vd 2011, Sanchez-Carbayo 2012). Sitozinin 5. karbonuna metil donörü S-adenozilmetioninden (SAM) bir metil grubunun transferiyle, 5-metilsitozin (5-meC) meydana gelir (Jeronimo ve Henrique 2011, Kosova vd 2011, Majumdar vd 2011, Sanchez-Carbayo 2012) (Şekil 2.10). DNA metilasyonu, çeşitli mekanizmalarla gen ekspresyonunu inhibe eder (Sanchez-Carbayo 2012). Bunlardan biri, DNA metilasyonu doğrudan hedef bölgelerden DNA'ya bağlanan proteinlerin toplanmasını engelleyerek mRNA transkripsiyonunu baskılar (Kosova vd 2011, Sanchez-Carbayo 2012). Buna karşılık, metillenmemiş CpG adaları, gen ekspresyonu için uygun kromatin yapısını oluşturur (Sanchez-Carbayo 2012). Bir diğeri ise, dolaylı yoldan metillenmiş DNA, histon modifikasyonuna ve kromatinin yeniden düzenlenmesine yol açan DNA metiltransferazlar ve histon deasetilazların dahil olduğu büyük bir protein kompleksi olan metil-CpG'ye bağlanan proteinlerin (MBP) bir araya gelmesini sağlayarak transkripsiyonu inhibe eder (Jeronimo ve Henrique 2011, Sanchez-Carbayo 2012). CpG adaları olarak bilinen ve CG dinükleotidleri bakımından zengin genom bölgeleri bir çok genin promoter bölgelerinde, 5' UTR bölgelerinde ve ekson 1'lerinde bulunur (Cabello vd 2011, Hamilton 2011, Jeronimo ve Henrique 2011, Kosova vd 2011). Tüm CpG adalarının % 60-90'ı memelilerde metile durumdadır (Bogdanovic ve Veenstra 2009, Sharma vd 2010). İnsanlarda, genlerin promoter bölgelerindeki çoğu CpG adası

normalde metile değildir (Lin vd 2011, Majumdar vd 2011). Normalde metile olmayan CpG adaları, kadınlarda inaktif X kromozomu üzerinde yerleşmiş genlerde, belirli imprintlenmiş genlerde, embriyonik gelişime özgül genlerde ve dokuya özgül genlerde fizyolojik hipermetilasyon gösterir (Sharma vd 2010, Jeronimo ve Henrique 2011, Kosova vd 2011, Lin vd 2011).

İnsan tümörlerinde, anormal DNA metilasyonunun üç türü görülür. Bunlar; hipometilasyon, hipermetilasyon ve imprinting kaybıdır (Enokida ve Nakagawa 2008, Majumdar vd 2011). Kanser hücrelerinde hipometilasyon çoğunlukla SINEs (kısa dağılmış nükleer elemanlar) ve LINEs (uzun dağılmış nükleer elemanlar) gibi tekrarlayan DNA dizilerinde, hipermetilasyon ise CpG adalarında görülmektedir (Kosova vd 2011). Tümör baskılayıcı genlerin promoter bölgelerindeki anormal hipermetilasyonu transkripsiyonal sessizleşme ile (Hoffman ve Cairns 2011), DNA hipometilasyonu (demetilasyon) ise proto-onkogenlerin aktivasyonu ile ilişkilidir (Hamilton 2011, Jeronimo ve Henrique 2011, Sanchez-Carbayo 2012). Her iki form, kromozomal instabiliteye ve sonuçta transkripsiyonal gen susturulmasına neden olur (Enokida ve Nakagawa 2008, Sharma vd 2010, Hamilton 2011, Jeronimo ve Henrique 2011, Majumdar vd 2011, Pavicic vd 2011, Sanchez-Carbayo 2012). Parental diferansiyel ekspresyon kaybı anlamına gelen imprinting kaybı, çocukluk çağı tümörlerinde sık görülür (Majumdar vd 2011).

Uygun DNA metilasyonu, normal gelişim için önemlidir ve aynı zamanda gen ifadesinin baskılanması, embriyonik gelişim, transkripsiyon, kromatin yoğunlaşması, X kromozomu inaktivasyonu, imprinting, kromatin kararlılığının korunması, tekrarlayan genomik elemanların baskılanması, histon deasetilasyonu, genom güvenliği ve yapısal bütünlüğünün korunması ve karsinogenez gibi çeşitli süreçlerde fonksiyon gösterir (Bora ve Erdem-Yurter 2007, Bogdanovic ve Veenstra 2009, Kosova vd 2011, Majumdar vd 2011).



Şekil 2.10 DNA metilasyonu (Espada ve Esteller 2010)

Mesane kanserinde yaygın olarak tanımlanmış hipermetile genler hücre döngüsü kontrolü, DNA hasarı tamiri, apoptoz, hücre invazyonu, hücre farklılaşması ve hücre adezyonu gibi bir çok önemli biyolojik yolakta görev yapmaktadırlar (Enokida ve Nakagawa 2008, Sanchez-Carbayo 2012). Bu yollardaki genler aşağıda gruplandırılarak Tablo 2.7’de, ayrıca literatür çalışmalarında mesane kanserindeki bazı tümör baskılayıcı genlerin metilasyon yüzdelerinin yıllara göre dağılımı Tablo 2. 8’de gösterilmiştir.

Tablo 2.7 Mesane kanserleri ile ilgili literatür taramasında hipermetile olan genler (Kim ve Quan 2005, Enokida ve Nakagawa 2008, Phe vd 2009, Sanchez-Carbayo 2012)

Gen Sembolü	Alternatif Adı	Metilasyon %
<u>Hücre döngüsü kontrol genleri:</u>		
<i>p16INK4A/ CDKN2A</i>	CDKN2A (Siklin-bağımlı kinaz inhibitörü 2A)	0-73
<i>p14ARF</i>	CDKN2A (Siklin-bağımlı kinaz inhibitörü 2A) izoform 4	0-61,8
<i>CCND2</i>	Siklin D2	21,1-72
<i>RB1</i>	Retinoblastoma 1	3,2-28,1
<i>p15INK4B/ CDKN2B</i>	CDKN2B (Siklin-bağımlı kinaz inhibitörü 2B)	7,1-24
<i>PAX5A</i>	Box 5	12,9-68,2
<i>PAX6</i>	Box 6	0-23
<i>CHFR</i>	Checkpoint with forkhead and ring finger domains	0-18,7
<i>SOCS1</i>	Sitokin sinyali baskılayıcı 1	33
<i>STAT1</i>	Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü 1	11
<u>DNA hasarı tamir genleri:</u>		
<i>MGMT</i>	O6-metilguanin DNA metiltransferaz	0-69
<i>GSTP1</i>	Glutasyon S-transferaz pi	0-59,2
<i>MLH1</i>	Mut L homolog 1, kolon kanseri, nonpolipozis tip 2	0-79,2
<i>APC</i>	Adenomatöz polipozis koli	17,6-73
		Devamı arkada

Tablo 2.7'nin devamı

Gen Sembolü	Alternatif Adı	Metilasyon %
<u>DNA hasarı tamir genleri:</u>		
<i>ATM</i>	Ataksi telanjiektazi mutasyonu	0-40,7
<i>MSH6</i>	Mut S homolog 6	29-81,3
<i>COX2</i>	Siklooksijenaz 2; PTGS2 (prostaglandin endoperoksid sentaz)	3,6-75,2
<i>BRCA1</i>	Meme kanseri 1	71-72,5
<i>BRCA2</i>	Meme kanseri 2	3,2-56
<i>TP53</i>	Tümör proteini 53	12,9-46,2
<u>Apoptoz ile ilişkili genler:</u>		
<i>DAPK1</i>	Ölümlle ilişkili protein kinaz 1	0-100
<i>CASP8</i>	Kaspaz 8, apoptoz ile ilişkili sistein peptidaz	3,6-19,4
<i>DR3</i>	Ölüm reseptörü 3	98,1
<i>DR6</i>	Ölüm reseptörü 6	6,7
<i>DRC1</i>	Antiapoptotik yıkım reseptörü 1	22
<i>DRC2</i>	Antiapoptotik yıkım reseptörü 2	27
<i>APAF1</i>	Apoptotik peptidaz aktive edici faktör 1	70,8-100
<i>BCL2</i>	B-hücreli lenfoma 2	38,2-62,3
<i>PYCARD</i>	Apoptoz ile ilişkili leke benzeri protein (ASC)	0-28,6
Devamı arkada		

Tablo 2.7'nin devamı

Gen Sembolü	Alternatif Adı	Metilasyon %
<u>Apoptoz ile ilişkili genler:</u>		
<i>RASSF1A</i>	Ras ilişkili domain aile üyesi 1 A	22,5-67
<i>EDNRB</i>	Endotelin reseptör tip B	57-69
<i>TERT</i>	Telomeraz ters transkriptaz	20,8-24
<i>TNFRSF21</i>	Tümör nekroz faktörü reseptörü süper aile üyesi 21	6-7
<i>TNFRSF25</i>	Tümör nekroz faktörü reseptörü süper aile üyesi 25	75-98
<u>Hücre invazyonu genleri:</u>		
<i>CDH1</i>	E-kaderin	2,9-100
<i>CDH4</i>	Kaderin 4	14,6
<i>CDH13</i>	Kaderin 13, H-kaderin	18,1-62,6
<i>LAMA3</i>	Laminin alfa 3	45
<i>LAMB3</i>	Laminin beta 3	21
<i>LAMC2</i>	Laminin gama 2	11,8-23
<i>COL1A2</i>	Tip 1 kollajen alfa 2	62,7
<i>VIM</i>	Vimentin	96
<i>CD44</i>	CD44	9,7-38,5
<i>CD99</i>	CD99	31,7
Devamı arkada		

Tablo 2.7'nin devamı

Gen Sembolü	Alternatif Adı	Metilasyon %
<u>Hücre invazyonu genleri:</u>		
<i>KISS1</i>	Metastaz baskılayıcı gen 1	83,1
<u>Wnt antagonist genleri:</u>		
<i>SFRP1</i>	Secreted frizzled-related protein 1	17-75,9
<i>SFRP2</i>	Secreted frizzled-related protein 2	32,4-63
<i>SFRP4</i>	Secreted frizzled-related protein 4	3-38,9
<i>SFRP5</i>	Secreted frizzled-related protein 5	20-87
<i>WIF1</i>	WNT inhibitör faktörü 1	1-66,7
<i>DKK3</i>	Dickkopf homolog 3	N/A
<u>Olası tümör baskılayıcı genler:</u>		
<i>RUNX3</i>	Runt-ilişkili transkripsiyon faktörü 3	3,6-73
<i>MYO</i>	Myoglianin	68,7-86,9
<i>PTEN</i>	Fosfataz ve tensin homologu	0-31,9
<i>HIC1</i>	Hipermetile kanser 1	21,9-100
<i>VHL</i>	von Hippel-Lindau tümör baskılayıcı	4-31,9
<i>WT1</i>	Wilms tümörü 1	38,7-58,2
<i>DBCCR1</i>	Mesane kanserinde delesyon olmuş aday kromozom 1 bölgesi	52
Devamı arkada		

Tablo 2.7'nin devamı

Gen Sembolü	Alternatif Adı	Metilasyon %
<u>Olası tümör baskılayıcı genler:</u>		
<i>IGSF4 (CADM1)</i>	İmmünglobülin süperaile üyesi 4, Hücre adezyon molekülü 1	0-61,5
<i>DBC1</i>	Mesane kanserinde delesyon 1	12-69
<i>IGFBP3</i>	İnsülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein 3	42,7-66
<i>FHIT</i>	Frajil histidin triad proteini	16-40
<i>PRSS3</i>	Proteaz serin 3	33-33,5
<u>Hücre farklılaşması ile ilişkili genler:</u>		
<i>S100A</i>	S-100 ailesi	N/A
<i>SOX9</i>	Cinsiyet belirleyen bölge Y box 9	56,4-70
<i>PMF1</i>	Poliamin ile modüle edilmiş faktör 1	77,6-88,1
<i>CAGE1</i>	Kanser antijeni 1	52,7-81,1
<i>ESR1</i>	Östrojen reseptörü 1	16,1-79,4
<i>RARβ</i>	Retinoik asit reseptörü beta	2,1-93
<i>TIG1</i>	Tazaroten kaynaklı 1; RARRES1 (Retinoik asit reseptörüne cevap 1)	32
<u>Hücre adezyonu ile ilişkili genler:</u>		
<i>ICAM1</i>	Hücreler arası adezyon molekülü 1	89,5
<i>TIMP3</i>	Metalloproteinaz doku inhibitörü 3	2,9-93

Tablo 2.8 Literatür çalışmalarında mesane kanserindeki bazı tümör baskılayıcı genlerin metilasyon yüzdelerinin yıllara göre dağılımı

	<i>BRCA1</i> %	<i>BRCA2</i> %	<i>ATM</i> %	<i>TP53</i> %	<i>PTEN</i> %	<i>MGMT</i> %	<i>PAX5</i> %	<i>CDH13</i> %	<i>TP73</i> %	<i>WT1</i> %	<i>VHL</i> %	<i>GSTP1</i> %	<i>CHFR</i> %
Chung vd 2001						0					8	38.5	
Maruyama vd 2001						2		29				11	
Chan vd 2002						5.1						5.1	
Tada vd 2002						17					4	13	
Gutierrez vd 2004						23			7			3	
Catto vd 2005						10						0	
Dhawan vd 2006												6.9	
Hoque vd 2006						53						47	
Kunze vd 2006				28.6									
Marsit vd 2007						7		18.1					
Yates vd 2007						37.5							
Yu vd 2007	12.1							16.7				2.3	
Abbosh vd 2008						69							
Ellinger vd 2008												59	
Hellwinkel vd 2008												5	
Jarmalaite vd 2008						7							
Jarmalaite vd 2010						0							
Agundez vd 2011	72.5	56	40.7	46.2	31.9	67	68.1	62.6	37.4	58.2	31.9	40.7	18.7
Cabello vd 2011	71	3.2	0	12.9	0	16.1	12.9	25.8	6.5	38.7	12.9	0	0
Lin vd 2011								30.7					
Lin vd 2012								35.3					
Zuiverloon vd 2012					2.9			26.5					
Zhong vd 2013						12.2							
Tez çalışmamız 2013	0	0	0	7.5	1.25	0	3.75	21.25	6.25	33.75	0	0	0

Devamı arkada

Tablo 2.8'in devamı

	<i>ESRI</i> %	<i>RBI</i> %	<i>MSH6</i> %	<i>THBS1</i> %	<i>CADMI</i> %	<i>STK11</i> %	<i>PYCARD</i> %	<i>PAX6</i> %	<i>CDKN2A</i> %	<i>GATA5</i> %	<i>RARβ</i> %	<i>CD44</i> %
Salem vd 2000								63				
Maruyama vd 2001									7		15	
Chan vd 2002									26.5		87.8	
Dominguez vd 2002									18			
Tada vd 2002									11			
Valenzuela vd 2002									26			
Chang vd 2003									60			
Dominguez vd 2003									18			
Dulaimi vd 2004									7			
Gutierrez vd 2004									26		30	
Catto vd 2005									9		24	
Chapman vd 2005									6			
Dhawan vd 2006									16		16	
Hoque vd 2006									73		93	
Kawamoto vd 2006									17.8			
Marsit vd 2006									30.8			
Neuhausen vd 2006									2		% 19	
Yurakh vd 2006									6			
Marsit vd 2007							3.6		31.7		15.1	
Yates vd 2007									1		2.1	
Hellwinkel vd 2008								23				
Jarmalaite vd 2008									14		40	
Negraes vd 2008											81.6	
Khin vd 2009									43.2			
Malekzadeh vd 2009		28.2										
Jarmalaite vd 2010									19		38	
Lin vd 2010									56			
Serizawa vd 2010									2		17	
Agundez vd 2011	49.5	27.5	81.3	25.3	61.5	94.5	28.6	20.9	24.2	55	59.3	38.5

Devamı arkada

Tablo 2.8'in devamı

	<i>ESR1</i> %	<i>RBI</i> %	<i>MSH6</i> %	<i>THBS1</i> %	<i>CADMI</i> %	<i>STK11</i> %	<i>PYCARD</i> %	<i>PAX6</i> %	<i>CDKN2A</i> %	<i>GATA5</i> %	<i>RARβ</i> %	<i>CD44</i> %
Cabello vd 2011	16.1	3.2	29	35.5	29	0	0	0	0	25.8	38.7	9.7
Eissa vd 2011											62.8	
Jablonowski vd 2011									40.5			
Serizawa vd 2011									1		57	
Berrada 2012											75	
Eissa vd 2012											89.7	
Lin vd 2012									64			
Zuiverloon vd 2012	79.4								2.9		14.7	
Zhong vd 2013									0		0	
Tez çalışmamız 2013	1.25	27.5	36.25	0	2.5	0	0	0	0	2.5	3.75	2.5

Mesane kanserlerinde, epigenetik mekanizmalar içinde en sık gözlenen DNA metilasyon değişimleri olmakla birlikte aşağıda belirtilen histon modifikasyonları ve kromatinin yeniden düzenlenmesi de önem taşımaktadır.

2.9.2. Histon modifikasyonları ve kromatinin yeniden düzenlenmesi

Kromatin, histonlar ve DNA'dan oluşur. Histonlar, kromatinin protein bileşenidir (Hamilton 2011). Kromatinin temel birimi nükleozomdur (Enokida ve Nakagawa 2008). Nükleozom, bir oktameri oluşturan iki alt birimin herbiri H2A, H2B, H3 ve H4 histon proteinlerinden oluşan bir kor etrafına sarılmış 146 bp uzunluğunda DNA içerir (Jeronimo ve Henrique 2011, Hoffman ve Cairns 2011). Histon proteinleri, bir globüler C- terminal domaini ve yapılanmamış bir N- terminal kuyruk içeren, nükleozom öz kısmından oluşurlar (Sharma vd 2010). Histon koru alt birimleri, post-translasyon modifikasyonların gerçekleştiği uzun bir kuyruk içerir (Hoffman ve Cairns 2011). Histon proteinlerinin amino ucunda (N-terminal kuyrukları) metilasyon, asetilasyon, fosforilasyon, ubikütinasyon, glikolizasyon, sumolasyon ve farklı amino asitlerin ribozilasyonu gibi histon kuyruklarını etkileyebilen post-translasyonel modifikasyonlar gerçekleşmektedir (Enokida ve Nakagawa 2008, Sharma vd 2010, Hamilton 2011, Hoffman ve Cairns 2011, Jeronimo ve Henrique 2011, Majumdar vd 2011). Bir başka ifade ile histonlar, gen ekspresyonunun hem aktivasyonu hem de baskılanmasına neden olan bu post-translasyonel mekanizmalar ile modifiye edilirler (Majumdar vd 2011). Bu modifikasyonlar, histon-DNA ve histon-histon ilişkisini etkilemekte, böylelikle DNA paketlenmesi, gen transkripsiyonu, DNA tamiri, DNA replikasyonu ve kromozom organizasyonu değişiklikleri gibi birçok biyolojik olayı kontrol edilebilmektedir (Bora ve Erdem-Yurter 2007, Sharma 2010, Hamilton 2011, Jeronimo ve Henrique 2011).

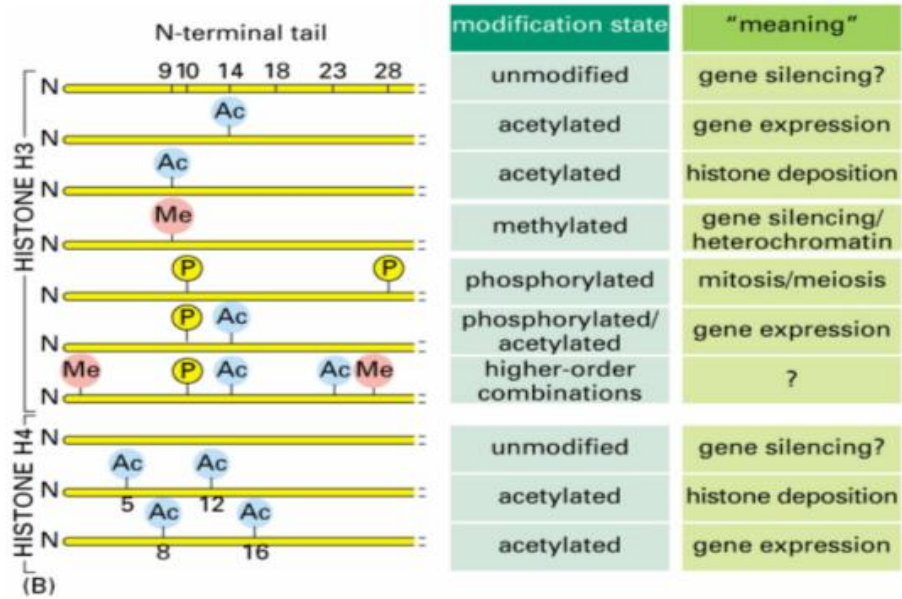
Histon modifikasyonlarının, kromozom fonksiyonunu etkilediğine dair iki ana hipotez vardır. Modifikasyonların, 1. hipotez göre histonların elektrostatik yükünü etkileyerek kromatin yapısını değiştirdiği, 2. hipoteze göre protein kompleksleri için tanıma bölgesi oluşturduğu düşünülmektedir (Bora ve Erdem-Yurter 2007, Majumdar vd 2011).

Kovalent histon modifikasyonları, histon asetiltransferazlar (HATs), histon deasetilazlar (HDACs), histon metiltransferazlar (HMTs) ve histon demetilazları

(HDMTs) içeren değişken substrat özgülüğü olan enzimler kümesi tarafından gerçekleştirilir (Bora ve Erdem-Yurter 2007, Enokida ve Nakagawa 2008, Sharma vd 2010, Jeronimo ve Henrique 2011, Majumdar vd 2011). Bu histon modifiye edici enzimler birbirleriyle ve diğer DNA düzenleyici mekanizmalarla birlikte, kromatin durumu ve transkripsiyon ile sıkı ilişki içerisinde dirler (Sharma vd 2010). Bu enzimler kromatin konfigürasyonunu değiştirir ve gen ekspresyonunu düzenlerler (Majumdar vd 2011).

En iyi incelenmiş olan histon modifikasyonlarından biri DNA'ya histonların afinitesini azaltan lizin kalıntısının asetilasyonudur (Hamilton 2011, Jeronimo ve Henrique 2011). Genel olarak, histon asetilasyonu transkripsiyonal aktivasyonla (Bora ve Erdem-Yurter 2007, Sharma vd 2010, Hamilton 2011), deasetilasyon ise transkripsiyonal baskılanma ile ilişkilidir (Bora ve Erdem-Yurter 2007, Hamilton 2011). Histon asetiltransferazlar (HATs) tarafından gerçekleştirilen asetilasyon, histon kuyrukları ve DNA arasındaki bağın gücünü azaltarak negatif yüklü asetil grubunun histon proteininin amino ucuna takılmasıyla pozitif yüklü lizin kalıntısını nötralize eder, DNA/histon kompleksinde (açık bir kromatin konformasyonu) gevşeme meydana gelir, transkripsiyon faktörlerinin genlerin promotör bölgelerine erişmeleri kolaylaşır ve böylelikle gen transkripsiyonu sağlanmış olur (Bora ve Erdem-Yurter 2007, Hamilton 2011, Jeronimo ve Henrique 2011, Majumdar vd 2011). Asetilasyon geri dönüşümlü olarak gerçekleşen bir olaydır. Kromatini paketleyen histon deasetilazlar (HDACs) tarafından lizin aminoasitinden asetil grubunun çıkartılmasıyla kromatin tekrar kondense olur ve gen transkripsiyonu baskılanır (Bora ve Erdem-Yurter 2007, Majumdar vd 2011). Histonların metilasyonu, transkripsiyonu pozitif veya negatif olarak etkiler yani transkripsiyonu aktive eder ya da baskılar. DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları arasında işbirliği gerçekleşmektedir (Hamilton 2011, Jeronimo ve Henrique 2011).

Histon modifikasyonları aynı zamanda genomik imprinting, X kromozomu inaktivasyonu, embriyonik kök hücre gelişimi ve farklılaşmadan sorumlu tutulmuştur. Aynı zamanda histon modüle eden enzimlerin ekspresyonundaki değişiklikler de, kanser gelişimi ve ilerlemesi ile ilişkilendirilmiştir (Jeronimo ve Henrique 2011). Histon modifikasyonlarının genel bir şekli aşağıda görölmektedir (şekil 2.11).



Şekil 2.11 Histon modifikasyonları (Alberts vd 2002)

Mesane kanserlerinde, epigenetik değişiklikler arasında kodlamayan RNA'ların bir sınıfı olan mikroRNA'lar da önem taşımaktadır.

2.9.3. MikroRNA'lar

DNA metilasyonu ve histon proteinlerinin kovalent modifikasyonlarına ek olarak mikroRNA'lar (miRNA'lar) kendi DNA dizisini değiştirmeden gen ekspresyonunu kontrol eden önemli epigenetik düzenleyiciler olarak tanımlanmaktadır (Pavicic vd 2011). miRNA'lar, uzun kodlamayan RNA'lar ya da genlerin intronları tarafından kodlanan, yaklaşık 22 nükleotidlik uzunluğunda kodlamayan RNA'ların bir sınıfıdır (Sharma 2010, Hamilton 2011, Jeronimo ve Henrique 2011, Sato vd 2011, Sana vd 2012). miRNA'lar nükleusda transkribe edilir ve olgunlaşma öncesinde bir kaç modifikasyon geçirirler. miRNA tarafından mRNA translasyonu iki şekilde inhibe edilir: 1) miRNA ile mRNA arasında tam komplementer eşleşme varsa, miRNA mRNA'ya bağlanır ve RNA ile indüklenen susturma kompleksinin (RISC) etkisiyle hedef mRNA degrade olur (Sharma 2010, Hamilton 2011, Hoffman ve Cairns 2011, Pavicic vd 2011, Sana vd 2012). 2) miRNA ile mRNA arasında tam bir eşleşme yoksa, miRNA kısmen mRNA'nın 3' ucuna bağlanır ve transfer RNA'nın hareketlerini önler

böylece translasyonun baskılanmasına neden olur (Bodur ve Demirpençe 2010, Sharma 2010, Hamilton 2011, Pavicic vd 2011, Sana vd 2012). Tek bir miRNA, bir çok mRNA'nın ekspresyonunu post-transkripsiyonel olarak düzenleyebilir (Hoffman ve Cairns 2011, Jeronimo ve Henrique 2011, Sharma 2010) ve tersine tek bir mRNA'nın ekspresyonu birden fazla miRNA tarafından post-transkripsiyonel olarak düzenlenebilir (Jeronimo ve Henrique 2011).

Yüzlerce miRNA insan hücrelerinde tespit edilmiştir (Hoffman ve Cairns 2011). İnsan genlerinin % 30-70'inin ekspresyonunun, belirli dokularda ve zamana bağlı olarak miRNA'lar tarafından düzenlendiği tahmin edilmektedir (Jeronimo ve Henrique 2011). miRNA ekspresyonu, sıklıkla onkogenler (aşırı ekspresyon) ya da tümör baskılayıcılar (baskılanma yoluyla) olarak kanserde etki gösterir (Jeronimo ve Henrique 2011, Pavicic vd 2011). Ayrıca miRNA'lar, büyümeyi teşvik edici ya da büyümeyi önleyici olarak da fonksiyon görürler (Hoffman ve Cairns 2011). miRNA'lar, dokuya özgü olarak eksprese edilir ve apoptoz, hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması dahil olmak üzere biyolojik süreçlerin geniş bir dizisini kontrol ederler (Sharma 2010, Sana vd 2012).

Ürotelyal karsinomlarla ilişkilendirilmiş tümör baskılayıcı genlerin metilasyon paternlerinin incelenmesi amaçlandığı için Metilasyon spesifik-Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MS-MLPA) Yöntemi ile ilgili bilgiler aşağıda belirtilmiştir.

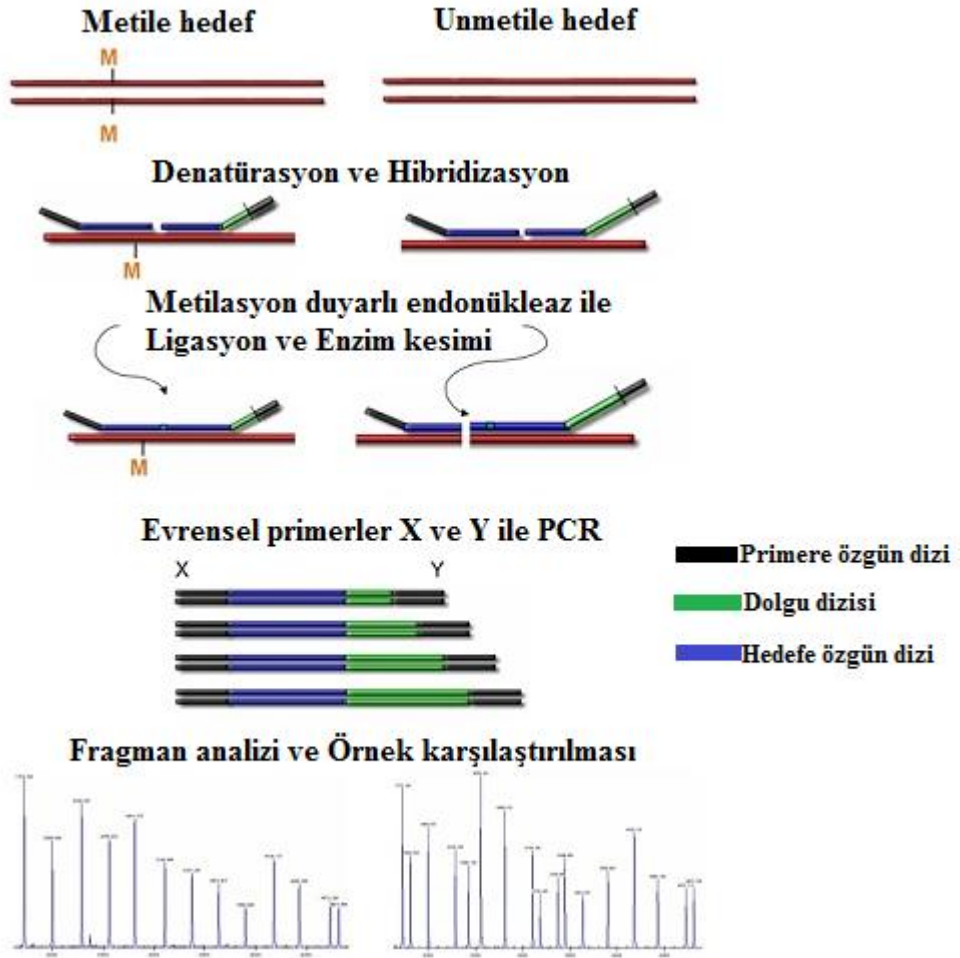
2.10. Metilasyon spesifik-Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MS-MLPA) Yöntemi

Son zamanlarda tümör gelişimiyle ilgili çeşitli genlerin hem metilasyon paternlerinin hem de kopya sayı değişikliklerinin önem taşımakta olduğu belirtilmiştir ve tanıda MLPA yöntemi rutin laboratuvarlarda gen kopya sayı değişikliklerinin multipleks gösterimi için kullanılan metod iken, şimdi daha çok anlam taşıyan metod olan Metilasyon spesifik-MLPA kullanılmaya başlanmıştır. Çünkü, tek bir reaksiyonda yaklaşık 40 kromozomal sekansın aynı anda hem CpG metilasyonunu hem de kopya sayısındaki değişiklikleri gösterebilmektedir (Nygren vd 2005).

MS-MLPA yöntemi tek bir deneyde birden fazla genin promoter metilasyonundaki değişikliklerin yarı kantitatif tespitine izin veren polimeraz zincir reaksiyonuna dayalı bir tekniktir. Metillenmiş ve metillenmemiş genler arasındaki ayırım, metilasyon-duyarlı restriksiyon enzimi *HhaI* için bir tanıma bölgesi (GCG[^]C) içeren problemlerin belirlenmesine dayanmaktadır. MS-MLPA yöntemi, kanser dahil olmak üzere çeşitli hastalıklarda uygulanmaktadır (Agundez vd 2011, Cabello vd 2011).

MS-MLPA, epigenetik değişikliklerin tespiti için yaygın olarak kullanılır. Prader Willi/Angelman ve Beckwith Wiedemann/RSS sendromu gibi başlıca imprinting hastalıklarda metilasyon tespiti için uygulanır. MS-MLPA, aynı zamanda tümör ilerlemesine ya da kemoterapötik ajanlara direnç yol açan tümör baskılayıcı genlerin transkripsiyonel inaktivasyonunu incelemek için tümör analizlerinde de kullanılır. Böylece, anormal metilasyon paternlerinin tespiti tümör tipinin daha yakından incelenmesine olanak sağlar (WEB_2, 2013).

MS-MLPA protokolü, her MS-MLPA reaksiyonu için iki örnekten oluşması dışında standart MLPA'ya çok benzerdir. Bu iki örnek şu şekildedir; kopya sayısı tespiti için bir endonükleaz enzimsiz örnek ve metilasyon tespiti için bir endonükleaz enzimli örnek. MS-MLPA prosedürü 5 aşamaya ayrılabilir (Şekil 2.12): 1. DNA denatürasyonu ve MLPA problemlerinin hibridizasyonu, 2. Ligasyon ve enzim kesimi, 3. PCR, 4. Kapiller elektroforez ile amplifikasyon ürünlerinin ayrıştırılması, 5. Veri analizi. Metilasyon tespiti için MS-MLPA problemleri, hedef dizinin metilasyon-duyarlı endonükleaz *HhaI*'ın restriksiyon bölgesi içeriği dışında, diğer MLPA problemlere benzerdir (Şekil 2.12'de gösterilmemiştir). Diğerleri, hibridize edilmiş problemler ligasyona uğrarken (Şekil 2.12, Aşama 2) *HhaI* endonükleaz ile inkübe edilir. Problemlerin hibridleri ve metillenmemiş DNA örneği *HhaI* enzimi ile parçalanır. Parçalanan problemler PCR sırasında katlanarak amplifiye edilemez (Şekil 2.12, Aşama 3) ve bu yüzden kapiller elektroforez sırasında bir sinyal üretmezler (Şekil 2.12, Aşama 4). Aksine, örnek DNA metillenirse DNA-problem hibridleri *HhaI* parçalanmasına karşı korunur ve bağlanmış problemler bir pik oluşturur (WEB_2, 2013).



Şekil 2.12 MS-MLPA reaksiyonunun aşamaları (WEB_2, 2013)

3. MATERYAL VE METOT

Araştırmamız, 5 temel basamakta gerçekleştirilmiştir:

1. Materyallerin toplanması,
2. Formalinle fikse edilmiş parafine gömülü (FFPE) mesane doku örneklerinden genomik DNA izolasyonu,
3. İzole edilen genomik DNA örneklerinin konsantrasyonu ve saflık değerlerinin belirlenmesi,
4. İzole edilen DNA örneklerinin MS-MLPA yöntemiyle analizi,
5. İstatistiksel analiz.

3.1. Materyallerin Toplanması

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda, histopatolojik olarak incelenen "Ürotelyal karsinom" tanısı almış 80 olgu çalışmaya dahil edildi. Çalışmada, olgulara ait % 10 formaldehit solüsyonu ile tespit edilmiş, parafin bloklara gömülü (FFPE) doku örnekleri kullanıldı. Tüm olgulardan tümör dokusunu en iyi yansıtan, içinde nekroz, kanama, inflamatuvar hücre ve stromal elemanların en az olduğu alanları içeren kesitler belirlenerek, bu kesitlere ait parafin bloklardan genomik DNA izolasyonu için 10 mikron kalınlığında ardışık seri kesitler alındı. Doku örneklerinin elde edildiği vakalara ait yaş, cinsiyet, TNM evre ve histolojik tümör derecesi dahil tüm klinikopatolojik parametreler patoloji raporları incelenerek kaydedildi.

3.2. FFPE Mesane Dokularından Genomik DNA İzolasyonu

Çalışmaya dahil edilen 80 olguya ait FFPE mesane doku örneklerinden genomik DNA izolasyonu, ticari kit (QIAamp DNA Mini Kit-Qiagen, Germany) yardımı ile gerçekleştirilmiştir. Kitin içeriği ve kimyasal miktarları aşağıdaki Tablo 3.1’de gösterilmiştir:

Tablo 3.1 DNA izolasyon kiti (QIAamp DNA Mini Kit) içeriği

Kit İçerisindeki Bileşenler	Miktarlar (50 örnek için)
QIAamp Mini Spin Kolonlar	50 adet
Toplama Tüpleri (2ml’lik)	150 adet
AL Tamponu	12 ml
ATL Tamponu	10 ml
AW1 Tamponu (konsantre)	19 ml
AW2 Tamponu (konsantre)	13 ml
AE tamponu	22 ml
Proteinaz K	1.25 ml

DNA izolasyonuna başlamadan, kit de yer alan AW1 ve AW2 tamponlarının hazırlanma süreci protokolde belirttiği şekilde ayrı ayrı 35 ml % 100 etanol ilave edilerek hazır hale getirildi.

Üretici firmanın belirttiği şekilde, FFPE mesane dokularından DNA izolasyonu için aşağıdaki basamaklar sırayla uygulandı:

3.2.1. DNA izolasyon protokolü

- 1) FFPE mesane doku örneklerinden 10 mikron kalınlığında ardışık seri kesitler alındı.
- 2) Arşiv doku kesitlerinin etrafındaki fazla parafin, steril bistüri ve pens yardımı ile uzaklaştırıldı.

- 3) Fazla parafinden mekanik olarak arındırılan doku örnekleri yeni steril mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı.
- 4) Örneklere deparafinizasyon için 1200 µl ksilen (Sigma-Aldrich) ilave edildi ve 2200 rpm'de kuvvetlice vortekslendi (10 kez pulse-vorteks).
- 5) Örnekler 56 °C'ye ayarlı etüvde (Nüve) 16-18 saat gece boyu inkübasyona bırakıldı.
- 6) İnkübasyon sonrasında doku örnekleri oda ısısında (15-25 °C), 14.000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi.
- 7) Süpernatant mikropipet ile uzaklaştırıldı (Peletin dağılmamasına dikkat edildi).
- 8) Pelete tekrar 1200 µl ksilen ilave edildi.
- 9) Örnekler oda ısısında (15-25 °C), 14.000 rpm'de, 5 dk santrifüj edildi.
- 10) Pelet kısmına dokunulmadan süpernatant mikropipetle uzaklaştırıldı.
- 11) Doku örneklerinde artık kalan ksileni uzaklaştırmak için peletlere 1200 µl etanol (Merck) (% 96-100) eklendi ve örnekler birkaç kez pulse-vorteks edildi.
- 12) Örnekler oda ısısında (15-25 °C), 14.000 rpm'de, 5 dk santrifüj edildi.
- 13) Süpernatant mikropipetle uzaklaştırıldı (Peletin dağılmamasına dikkat edildi).
- 14) 10, 11 ve 12. basamaklar tekrar edildi.
- 15) Örneklerin bulunduğu mikrosantrifüj tüplerinin kapakları açılarak 37 °C'ye ayarlı etüvde, 15 dk inkübasyona bırakılarak, kalan etanolün tamamen uzaklaştırılması sağlanmıştır.

- 16) Etanol tamamen uzaklaştırıldıktan sonra peletler, kitle birlikte sağlanan 180 µl doku lizis tamponunda (Buffer ATL) süspanse edildi.
- 17) Örneklere, kitle birlikte sağlanan 20 µl proteinaz K eklendi ve vortekslenerek karıştırıldı. Daha sonra örneklere kısa bir santrifüj işlemi (short-spin) yapıldı.
- 18) Tüplerin kapakları parafilmle sarılarak, dokunun lizise olması için 56 °C'ye ayarlı su banyosunda 16-18 saat (gece boyunca) inkübasyona bırakıldı.
- 19) İnkübasyon sonrası tüpler santrifüjde kısa bir short-spin edildi.
- 20) Örneklere, 200 µl "AL Tamponu" eklendi ve 15 sn pulse-vorteks edilerek karıştırıldıktan sonra 70 °C'ye ayarlı su banyosunda 10 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında tüpler kısa bir santrifüj işlemi short-spin yapıldı.
- 21) Örneklere, 200 µl "Etanol" eklendi, 15 sn pulse-vorteks edilerek karıştırıldı ve sonra tüplere kısa bir short-spin yapıldı.
- 22) Kitle birlikte temin edilen, 2 ml'lik toplama tüpüne yerleştirilmiş "QIAmp Mini spin kolon" hazırlandı ve bir önceki basamakta elde edilen karışım bu kolonlara mikropipet aracılığıyla aktarıldı.
- 23) Kolonların kapakları kapatılarak, 8.000 rpm'de, 1 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası kolonlar yeni 2 ml'lik toplama tüplerine yerleştirildi. Süzüntü bulunan toplama tüpü atıldı.
- 24) Kolonların kapakları açılarak, kolonlara kitle birlikte sağlanan 500 µl yıkama tamponu (AW1 Tamponu) eklendi. Kolonların kapakları kapatılarak 8.000 rpm'de, 1 dk santrifüj edildi. Santrifüjden sonra kolonlar, kitle birlikte temin edilen temiz 2 ml'lik toplama tüpüne yerleştirildi ve süzüntü içeren toplama tüpleri atıldı.

- 25) Kolonların kapakları açılarak, içerilerine kitle birlikte sağlanan 500 µl yıkama tamponu (AW2 Tamponu) eklendi. Kolonların kapakları kapatılarak 14.000 rpm'de 3 dk santrifüj edildi.
- 26) Protokole göre; temiz toplama tüplerine yerleştirilen kolonlar, 14000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.
- 27) Santrifüj işleminden sonra kolonlar steril 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine yerleştirildi. Kolon kapakları açılarak içerilerine kitle birlikte sağlanan 100 µl elusyon tamponu (AE Tamponu) eklendi ve oda sıcaklığında (15-25 °C), 5 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra kolonlar 8.000 rpm'de, 1 dk santrifüj edilerek mesane doku örneklerinden genomik DNA izolasyonu tamamlanmış oldu.
- 28) İzole edilen DNA örnekleri çalışmanın diğer aşamalarına kadar -20 °C'de saklandı.

3.3. İzole Edilen Genomik DNA Örneklerinin Konsantrasyon ve Safılık Değerlerinin Belirlenmesi

Toplam 80 adet 'Ürotelyal karsinom' tanısı almış mesane doku örneklerinden izole edilen genomik DNA örneklerinin konsantrasyon ve safılıkları, spektrofotometrik yöntemle belirlendi (Thermo Scientific, Nanodrop 2000c). Başlangıçta, 2 µl dH₂O ile cihazın çalışması kontrol edildi. Ölçüme başlamadan önce DNA'nın çözüldüğü elusyon tamponla cihaz sıfıra ayarlandı ve 2 µl DNA örneği ile ölçüm yapıldı.

Nanodrop ile otomatik olarak ölçülen 80 örneğe ait "Konsantrasyon, A260, A280, A260/280 değerleri" kaydedildi.

3.4. İzole Edilen DNA Örneklerinin MS-MLPA Yöntemiyle Analizi

İzole edilen DNA örneklerinde standart MLPA reaksiyonları gibi DNA denatürasyonu ve MLPA problemleri ile spesifik hedef DNA'ların bir gecelik hibridizasyonu aşamaları gerçekleştirildi.

3.4.1. DNA denatürasyonu (1. gün)

- Örneklerden elde edilen DNA'dan her tüp için 5 µl (50-250 ng) alındı.
- Örnekler 200 µl'lik (0.2 ml) PCR strip tüplerine aktarıldı.
- Tüpler Thermal Cycler (TECHNE TC-412) cihazına yerleştirildi ve MS-MLPA thermal cycler programı başlatıldı.
- Örnekler, 98 °C'de 5 dk. thermal cycler cihazında bekletilerek DNA'nın denatürasyonu sağlandı.
- Tüpler, thermal cycler cihazından çıkarmadan önce 25 °C'ye getirilip örnekler soğutuldu (bu bekleme sırasında probemix hazırlandı) ve tüpler cihazdan çıkarıldı.

3.4.2. Hibridizasyon (1. gün)

Çalışmamızda kullanılan "SALSA MS-MLPA ME002-B1 tumor suppressor Probemix, MRC, Hollanda" içinde mevcut olan kontrol problemleri ve incelenecek genlere ait problemlerinin listesi Tablo 3.2'de verilmiştir.

Tablo 3.2 "SALSA MS-MLPA ME002-B1 tumor suppressor probemix, MRC, Hollanda" içinde mevcut olan kontrol problemleri ve incelenecek genlere ait problemlerin listesi (WEB_2, 2013)

Uzunluk (nt)	SALSA MLPA Prob	HhaI Bölgesi	Kromozomal pozisyon
64-70- 76-82	Q-fragmentleri: DNA miktarı; en az 100 ng örnek DNA ile sadece görünür		
88-92-96	D-fragmentleri: 88 ya da 96 nt fragmentin düşük sinyali eksik denatürasyon gösterir		
100	X-fragmenti için spesifik		
105	Y-fragmenti için spesifik		
136	Reference (CREM) probe 00981-L00566	-	10p11.21
140	BRCA1 probe 03296-L01269	+	17q21.3
148	BRCA2 probe 02285-L01776	+	13q13.1
154	Reference (CFTR) probe 02944-L02376	-	7q31.2
160	ATM probe 03023-L02413	+	11q22.3
168	TP53 probe 02374-L02530	+	17p13.1
175	Reference (PTCH1) probe 03708-L03162	-	9q22.3
183	PTEN probe 03808-L02169	+	10q23.3
191	MGMT probe 05670-L05146	+	10q26.3
202	Reference (MLH3) probe 01245-L00793	-	14q24.3
208	PAX5 probe 03750-L03210	+	9p13.2
219	CDH13 probe 02257-L01742	+	16q23.3
229	Reference (PAH) probe 02334-L01820	-	12q23
238	TP73 probe 1684-L1264	+	1p36.3
247	WT1 probe 02755-L02204	+	11p13
256	Reference (PMP22) probe 01462-L00927	-	17p12
265	VHL probe 03818-L03850	+	3p25.3
273	GSTP1 probe 02747-L02174	+	11q13.2
281	Reference (TSC2) probe 01832-L01397	-	16p13.3
292	CHFR probe 02737-L02164	+	12q24.3
Devamı arkada			

301	ESR1 probe 02746-L02173	+	6q25.1
310	Reference (CDK6) probe 03184-L02523	-	7q21.3
319	RB1 probe 02734-L02161	+	13q14.2
328	MSH6 probe 01250-L00798	+	2p16.3
337	Reference (APC) probe 01700-L01341	-	5q22.2
346	MGMT probe 13716-L15582	+	10q26.3
355	THBS1 probe 01678-L17140	+	15q14
364	CADM1 probe 03638-L17141	+	11q23
373	Reference (PTEN) probe 03638-L17142	-	10q23.3
382	STK11 probe 06783-L17143	+	19p13.3
390	Reference (KLK3) probe 00713-L00108	-	19q13.3
398	PYCARD probe 02252-L01737	+	16p11.2
409	PAX6 probe 03749-L03209	+	11p13
418	Reference (ATM) probe 02670-L02137	-	11q23
427	CDKN2A probe 01530-L00955	+	9p21.3
434	GATA5 probe 03752-L06199	+	20q13.3
445	Reference (IL2) probe 00627-L00183	-	4q27
453	RARβ probe 04046-L02172	+	3p24.2
462	CD44 probe 04500-L02761	+	11p13
472	RB1 probe 04502-L02199	+	13q14.2
483	Reference (CASR) probe 02683-L02148	-	3q21

- MLPA buffer ve "SALSA MS-MLPA ME002-B1 tumor suppressor probemix, MRC, Hollanda" kullanılmadan önce vortekslendi.

- Hibridizasyon karışımının hazırlanışı; her reaksiyon için: 1.5 μ l MLPA buffer (sarı kapak) ve 1.5 μ l "SALSA MS-MLPA ME002-B1 tumor suppressor probemix, MRC, Hollanda" (siyah kapak) (Çalışılacak örnek sayısında bir fazla olacak şekilde hibridizasyon karışımı hazırlandı) mikropipetle eppendorf tüpüne aktarılıp karıştırıldı.

Tablo 3.3 Hibridizasyon karışımının içeriği

	1 ÖRNEK	80 ÖRNEK
SALSA PROBEMİX (Siyah Kapak)	1.5 µl	120 µl
MLPA BUFFER (Sarı Kapak)	1.5 µl	120 µl

- DNA denatürasyonu sonrası, 25 °C’deki her tüpdeki DNA örneklerinin üzerine 3 µl hibridizasyon karışımı ilave edilip yavaşça pipetaj ile homojenize edildi.

- Örnekler 95 °C’de 1 dk. inkübe edildi, daha sonra 60 °C’de 16 saat hibridizasyona bırakıldı (İnkübasyon süresi 16 saatten az 20 saatten fazla olmamalıdır).

3.4.3. Ligasyon ve enzim kesim reaksiyonu (2. gün)

- Ligaz buffer A ve Ligaz buffer B kullanılmadan önce vortekslendi.

- Ligaz-65 karışımının hazırlanışı, her reaksiyon için, karışım: 8.25 µl dH₂O, 1.5 µl Ligaz buffer B (beyaz kapak) eklenip karıştırıldı. Daha sonra, 0.25 µl Ligaz-65 enzimi (yeşil kapak) ilave edildi ve yukarı aşağı yavaşça pipetle karıştırılıp homojenize hale getirildi.

- Ligaz-kesim karışımı: Her örnek için, 7.75 µl dH₂O, 1.5 µl Ligaz buffer B (beyaz kapaklı) ekledik, daha sonra 0.25 µl Ligaz-65 enzimi (yeşil kapaklı) ve 0.5 µl *HhaI* enzimi (10 ünite/µl) eklenerek pipetle yukarı aşağı yavaşça karıştırıldı (Tablo 3.3).

- Thermal cycler cihazı 20 °C’ye getirildi ve 20 °C’deki tüpler cihazdan çıkarıldı.

- Hibridizasyon ürününe her tüp için, 3µl Ligaz buffer A ve 10µl dH₂O ilave edildi ve pipetajla karıştırıldı.

- Bu karışımın 10µl’si ikinci bir tüpe aktarıldı.

- Her iki tüp thermal cycler cihazında 48 °C’de durduruldu.

- İlk tüpe 48 °C’de 10 µl Ligaz-65 karışımı ilave edildi (kopya sayısı testi) ve pipetle yavaşça yukarı aşağı karıştırıldı.

- İkinci tüpe, yine 48 °C’de 10 µl içinde *HhaI* enziminin de olduğu Ligaz-Kesim karışımı ilave edildi (metilasyon testi) ve yine pipetle yavaşça yukarı aşağı karıştırıldı.

- Her iki tüp, ligasyon ve *HhaI* kesimi için, 48 °C’de 30 dk. inkübasyona bırakıldı.

- Daha sonra 98 °C’de 5 dk. bekletilerek enzimin inaktivasyonu sağlandı.

- En son, thermal cycler cihazı 20 °C'ye getirildi ve bu sıcaklıkta tüpler cihazdan çıkarıldı.

Tablo 3.4 Ligaz-65 karışımının içeriği

	1 ÖRNEK	80 ÖRNEK
dH2O	8.25 µl	660 µl
Ligaz buffer B (Beyaz Kapaklı)	1.5 µl	120 µl
Ligaz-65 enzimi (Yeşil Kapaklı)	0.25 µl	20µl

Tablo 3.5 Ligaz-kesim karışımının içeriği

	1 ÖRNEK	80 ÖRNEK
dH2O	7.75 µl	620 ml
Ligaz buffer B (Beyaz Kapaklı)	1.5 µl	120 µl
Ligaz-65 enzimi (Yeşil Kapaklı)	0.25 µl	20 µl
<i>HhaI</i> enzimi	0.5 µl	40 µl

3.4.4. PCR reaksiyonu (2. gün)

- SALSA PCR primer mix vortekslendi.

- Polimeraz kaşımının hazırlanışı, her reaksiyon için: 3.75 µl dH2O, 1 µl SALSA PCR primer mix (kahverengi kapak), 0.25 µl SALSA Polimeraz (turuncu kapak) eklendi ve pipetle yukarı aşağı iyice karıştırıldı. Kullanılana kadar karışım buz üzerinde muhafaza edildi.

- Oda sıcaklığında, her tüpe 5 µl polimeraz karışımı ilave edilerek pipetle yavaşça yukarı aşağı karıştırıldı.

- Thermal cycler cihazında ayarlanan programda tüpler amplifikasyon, 35 döngü için;

- * Denatürasyon 95 °C’de 30 saniye
- * Eşleşme (Annealing) 60 °C’de 30 saniye
- * Uzama (Extension) 72 °C’de 60 saniye bekletildi.

- Daha sonra örnekler, (Son Extension/ Uzama) 72 °C’de 20 dakika inkübe edildi.

- Son olarak thermal cycler cihazı 15 °C’de beklemeye alındı.

3.4.5. Örnekleri Beckman Coulter CEQ™ 8000 Genetic Analysis System cihazına yükleme

- İlk önce, Beckman Coulter CEQ™ 8000 genetik analiz sistem cihazının yükleme tüplerinin her birine 0.2 µl CEQ-size standart 600 ve 32 µl HiDi formamid konularak pipetajla homojenize edildi.

- Daha sonra üzerlerine, PCR bitiminde elde edilen ürünlerden 0.7 µl eklendi ve pipetle karıştırıldı.

- Buharlaşmayı önlemek için tüplerin üzerine bir damla yüksek kaliteli mineral yağ damlatıldı.

- Daha sonrasında örnekler Beckman Coulter CEQ™ 8000 genetik analiz sistem cihazına yüklenilerek, MAP ezersoftware programında okutulmaya başlandı.

- Her örneğe ait pik görüntüleri elde edildi.

3.4.6. Değerlendirme

MS-MLPA yönteminde hasta değerlendirme şekli diğer MLPA problemlerine göre farklılıklar göstermektedir: Normal MLPA çalışmalarının değerlendirmesinde, hastalara ait DNA’lardan elde edilen pik alanlarının diğer sağlıklı kontrollere ait pik alanlarıyla karşılaştırılması büyük önem taşır. MS-MLPA’da ise pik alan ve büyüklüğü değil, pikin varlığı ya da yokluğunun belirlenmesi yeterli olmaktadır. MS-MLPA çalışmasında örnekler iki gruba ayrıldı. Bir grupta normal MLPA reaksiyonu gerçekleştirilirken diğerinde metilasyona duyarlı enzim reaksiyonu gerçekleştirildi. Çalışmanın sonucunda bir örneğe ait iki ayrı reaksiyondan elde edilen ürünlere ait pik görüntüsü elde edildi. Çalışmamızda metilasyon değerlendirilmesi hedeflendiği için enzim ile kesimi yapılmış örneklerle ait pikler analiz edildi. Ancak yöntemin kendi içinde oluşturduğu internal

kontrol basamağı olarak ilk etapda enzim ile kesime tabi tutulmamış örneklere ait pikler incelenerek, araştırılacak genlerin, prob bölgelerinin varlığı kontrol edildi. Bu kontrol sonrasında herhangi bir pik kaybı olmayan örnekler ile ikinci aşamaya geçildi.

Değerlendirmenin ikinci aşamasında enzim kesimine tabi tutulmuş örneklerden elde edilen pik görüntüleri incelendi. Kullanılan kit içerisinde kontrol prob bölgeleri bulunmaktadır. Normal koşullarda sadece kontrol bölgelerine ilişkin pikler elde edilir. Prob bölgelerinde metilasyona spesifik endonükleazlara özgü tanıma bölgeleri bulunmadığından enzim ile kesim olmamakta, ligasyona bağlı olarak pikler elde edilmektedir. Bu kontrol bölgelerine ait piklerden başka pik olup olmadığı MAP ezersoftware programı ile değerlendirildi. Çalışmamızda kullandığımız metilasyon spesifik bir restriksiyon enzimi olan *HhaI*, tanıdığı bölgelerin metile olmaması durumunda diziyi keserek, ligasyon oluşmasını engeller. Böylece bu prob bölgesi PCR ile çoğaltılamaz ve pik elde edilemez. Eğer incelenen prob bölgesi metillenmiş ise *HhaI* enzimi bu prob dizisini kesemez. Kesilmeyen prob bölgesinde ligasyon işlemi gerçekleşir ve ligasyon ile birleştirilen problemler PCR ile amplifiye olur. Amplifiye olan problemlerden da pik elde edilir. Sonuç olarak *HhaI* enzimi ile kesim işlemine tabi tutulan örnekler incelendiğinde, *HhaI* enzim kesim bölgesi içermeyen kontrol pikleri dışında saptanan ekstra pikler, karşılık gelen prob bölgesinin dolayısıyla bu proba spesifik gen bölgesinin metile olduğunu ifade etmektedir. Bu kriterler doğrultusunda çalışmamızda örnekler MAP ezersoftware programı ile tek tek incelenerek metile olan prob bölgeleri tespit edildi.

3.5. İstatistiksel Analiz

Ürotelyal karsinomlar ile ilişkilendirilmiş tümör baskılayıcı genlerin metilasyon paternleri ile yaş, cinsiyet, histolojik tümörün gradesi, TNM evresi ve kas invazyonu olmak üzere klinikopatolojik özellikler arasındaki ilişkinin belirlenmesi için SPSS programı (version 17.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) kullanıldı ve tüm analizler için ki-kare testi yapıldı. Elde edilen sonuçlar için $p < 0.05$ değeri anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. DNA Örneklerinin Konsantrasyon ve Saflık Değerleri

Toplam 80 adet Ürotelyal karsinom tanısı almış mesane dokularından izole edilen DNA örneklerinin konsantrasyon ve saflık değerleri Tablo 4.1’de verilmiştir.

Tablo 4.1 DNA örneklerinin konsantrasyon ve saflık değerleri

Örnek No	Konsantrasyon (µg/ml)	A260	A280	A260/280
1	177.1	3.543	1.68	2.11
2	7.2	0.144	0.076	1.9
3	213.8	4.276	1.944	2.2
4	251.4	5.028	2.426	2.07
5	35.7	0.714	0.321	2.22
6	100.5	2.009	0.94	2.14
7	261.9	5.237	2.516	2.08
8	84.5	1.691	0.828	2.04
9	75.2	1.504	0.764	1.97
10	761.1	15.222	7.482	2.03
11	163.6	3.271	1.636	2
12	391.6	7.833	3.746	2.09
13	26.1	0.521	0.271	1.92
14	245	4.9	2.458	1.99
15	507.2	10.144	4.923	2.06
Devamı arkada				

16	109.2	2.183	1.049	2.08
17	134.6	2.692	1.337	2.01
18	176.3	3.527	1.69	2.09
19	327.1	6.542	3.176	2.06
20	187.9	3.758	2.749	1.37
21	365.6	7.312	3.506	2.09
22	242.9	4.858	2.383	2.04
23	134.4	2.688	1.3	2.07
24	362.6	7.252	3.553	2.04
25	207.6	4.152	2.034	2.04
26	129.8	2.596	1.172	2.22
27	6	0.12	0.06	2
28	327.2	6.544	3.161	2.07
29	38.2	0.764	0.342	2.23
30	501	10.021	5.368	1.87
31	280.3	5.606	2.715	2.07
32	56.1	1.122	0.542	2.07
33	439.5	8.79	4.244	2.07
34	907.6	18.152	8.792	2.07
35	405.5	8.111	3.912	2.07
36	202.5	4.049	1.997	2.03
37	36.3	0.726	0.368	1.97
38	496.1	9.922	4.777	2.08
39	57.4	1.147	0.533	2.15
40	368.2	7.364	3.542	2.08
41	134.6	2.692	1.337	2.01
42	149.3	2.986	1.467	2.03
43	68.9	1.379	0.622	2.22
44	301.1	6.022	3.08	1.96
45	708.7	14.174	6.905	2.05
46	75.6	1.512	1.199	1.26
47	104.9	2.097	0.983	2.13
Devamı arkada				

48	218.4	4.367	2.11	2.07
49	165.5	3.31	1.583	2.09
50	178.6	3.571	1.715	2.08
51	30.1	0.601	0.333	1.8
52	236.7	4.734	2.39	1.98
53	241.3	4.826	2.305	2.09
54	233.1	4.662	2.242	2.08
55	621.6	12.431	6.207	2
56	147.7	2.954	1.391	2.12
57	363.9	7.278	3.481	2.09
58	323.7	6.474	3.105	2.09
59	446.5	8.931	4.277	2.09
60	613.1	12.263	5.936	2.07
61	78.3	1.567	0.75	2.09
62	265	5.299	2.547	2.08
63	322.5	6.449	3.15	2.05
64	119.5	2.389	1.138	2.1
65	74.5	1.49	0.748	1.99
66	222.2	4.445	2.186	2.03
67	522.6	10.451	5.135	2.04
68	125.8	2.517	1.234	2.04
69	572	11.44	5.517	2.07
70	196.1	3.922	1.909	2.06
71	229.4	4.587	2.204	2.08
72	257.4	5.149	2.474	2.08
73	304.6	6.092	2.947	2.07
74	316	6.321	3.034	2.08
75	58.2	1.163	0.567	2.05
76	306.9	6.138	3.031	2.02
77	178.6	3.571	1.715	2.08
78	193.8	3.877	1.962	1.98
79	224.1	4.482	2.179	2.06
80	111.5	2.23	1.081	2.06

4.2. Ürotelyal Karsinom'lu Olgulara Ait Klinikopatolojik Parametreler

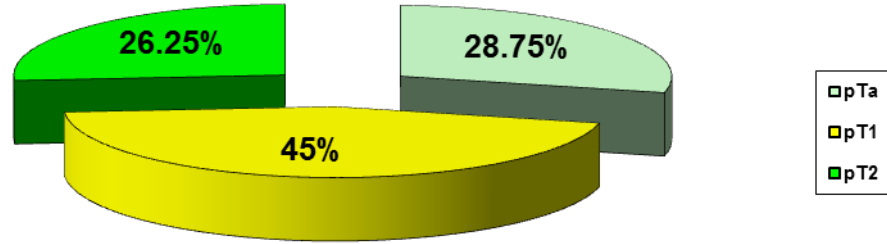
Tablo 4.2 Ürotelyal karsinom tanısı almış 80 hastanın klinikopatolojik özellikleri

Parametre	Hasta sayısı (%)
<u>Yaş</u>	
≥50	70 (% 87,5)
<50	10 (% 12,5)
<u>Cinsiyet</u>	
Kadın	10 (% 12,5)
Erkek	70 (% 87,5)
<u>TNM sınıflaması</u>	
<u>T sınıflaması</u>	
pTa	23 (% 28,75)
pT1	36 (% 45)
pT2	21 (% 26,25)
<u>N sınıflaması</u>	
N0	80 (% 100)
<u>M sınıflaması</u>	
M0	80 (% 100)
<u>Grade</u>	
Düşük dereceli papiller ürotelyal karsinom	30 (% 37,5)
Yüksek dereceli papiller ürotelyal karsinom	50 (% 62,5)
<u>Kas İnvazyonu</u>	
Var	49 (% 61,25)
Yok	31 (% 38,75)

Hastaların yaşlarına bakıldığında, 70'inin (% 87,5) 50 yaş ve üstünde, 10'unun (% 12,5) 50 yaşından küçük olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.2).

Cinsiyetlerine bakıldığında, 10'u (% 12,5) kadın, 70'i (% 87,5) erkekti (Tablo 4.2).

Patolojik evre, patolog tarafından tümörün mikroskop yardımı ile değerlendirildiği evredir ve pTa, pTis, pT1, pT2a, pT2b, pT3a, pT3b, pT4a ve pT4b olmak üzere belirlenmiştir. Yapmış olduğumuz çalışmada, patolojik evreye göre hastalarımızın sayı ve yüzdesi; pTa'da 23 (% 28,75), pT1'de 36 (% 45) ve pT2'de 21 (% 26,25) olarak saptanmıştır (Tablo 4.2, Şekil 4.1).



Şekil 4.1 Patolojik evreye göre alt grupların yüzdeler dağılımı

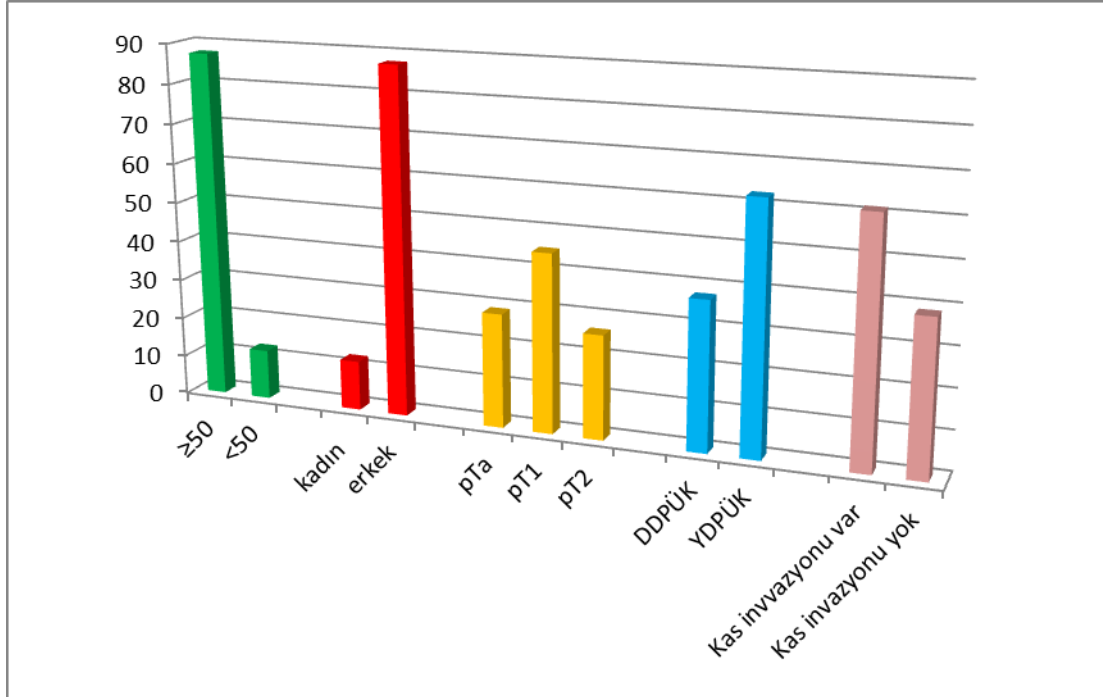
Araştırmalarda Tümörlerin N-evre sınıflaması önem taşımaktadır bu evreleme sistemi bölgesel lenf nodu metastazına dayanmaktadır. Buna göre;

- Nx (Bölgesel lenf nodu değerlendirilemedi),
- N0 (Bölgesel lenf nodu metastazı yok),
- N1 (2 cm ya da daha küçük tek lenf nodu metastazı var),
- N2 (2-5 cm arası boyutlarda tek lenf nodu / 5 cm'den küçük multipl metastaz var)
- N3 (Boyutu 5 cm'den büyük lenf nodu metastazları var) olmak üzere gruplandırılmıştır.

Bu gruplandırmaya göre, çalıştığımız hastaların hepsi N0 (80, % 100) evresinde olduğu belirlenmiştir ve tüm bu olgularda uzak metastaz olmadığı tespit edilmiş ve M0 (80, % 100) olarak değerlendirilmiştir (Tablo 4.2).

Histolojik tümörün derecesine göre, 80 hastanın 30 (% 37,5) tanesinin düşük dereceli papiller ürotelyal karsinom, 50 (% 62,5) tanesinin yüksek dereceli papiller ürotelyal karsinom olduğu tespit edildi (Tablo 4.2).

Histolojik tümörün kas invazyonuna göre, 80 hastanın 49 (% 61,25) tanesinde kas invazyonu mevcutken, 31 (% 38,75) tanesinde kas invazyonu bulunmamaktadır (Tablo 4.2).



Şekil 4.2 Klinikopatolojik özelliklerin hasta sayısına göre yüzdelik dağılımı

Şekil 4.2'ye bakıldığında, hasta grupları arasında yaş grubuna göre 50 yaşında/50 yaştan büyük olanların sayısının fazla olduğu, cinsiyete göre erkek sayısının fazla olduğu, patolojik tümör sınıflamasına göre pT1 grubunun en fazla olduğu, histolojik tümörün gradesine göre yüksek dereceli papiller ürotelyal karsinomun fazla olduğu, kasa invazyon durumunda kas invazyonu varlığının fazla olduğu gözlenmektedir.

4.3. Metilasyon Profili

Ürotelyal karsinom tanısı almış 80 olgunun FFPE mesane dokusundan elde edilen DNA'lardan MS-MLPA prob seti kullanılarak, *BRCA1*, *BRCA2*, *ATM*, *TP53*, *PTEN*, *MGMT*, *PAX5*, *CDH13*, *TP73*, *WT1*, *VHL*, *GSTP1*, *CHFR*, *ESR1*, *RB1*, *MSH6*, *THBS1*, *CADM1*, *STK11*, *PYCARD*, *PAX6*, *CDKN2A*, *GATA5*, *RARβ* ve *CD44* olmak üzere toplam 25 tümör baskılayıcı genin promoter CpG dinükleotidlerindeki metilasyon

paternleri eş zamanlı olarak Metilasyon spesifik-Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MS-MLPA) yöntemi ile belirlenmiştir.

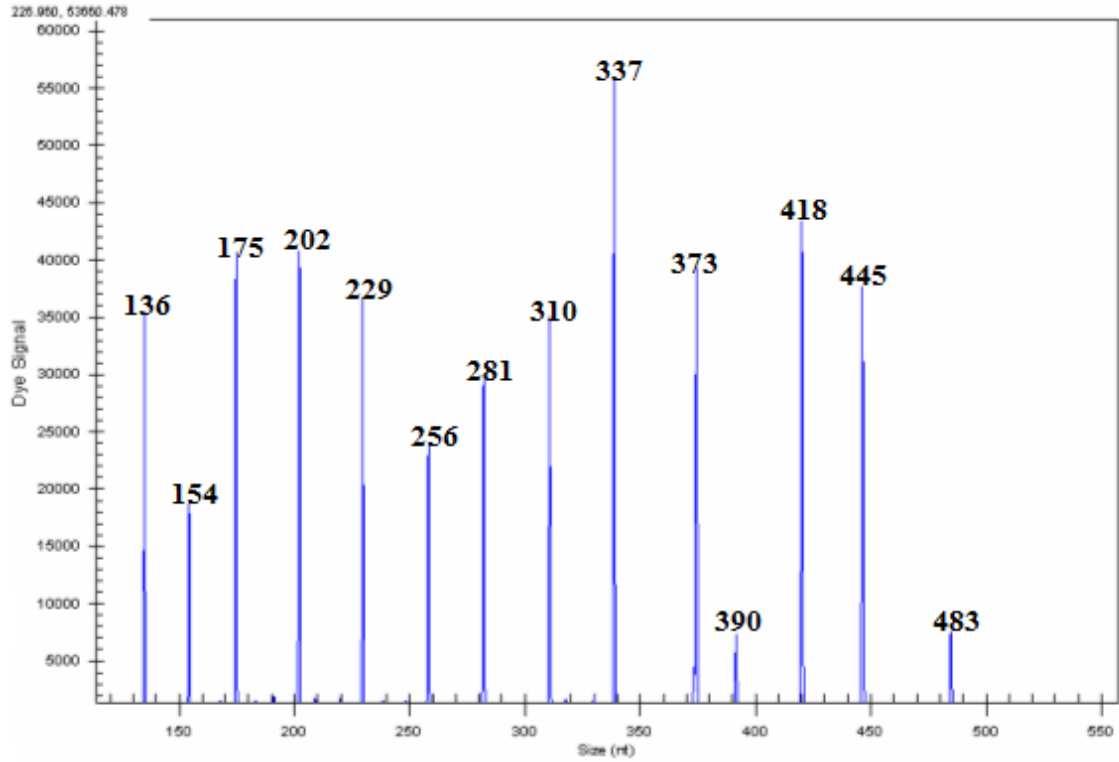
Ürotelyal karsinom tanısı almış 80 hastada 25 tümör baskılayıcı gen için belirlenen metilasyon yüzdeleri Tablo 4.3’de gösterilmektedir.

Tablo 4.3 Ürotelyal karsinom tanısı almış 80 hastada kullanılan "SALSA MS-MLPA ME002-B1 tumor suppressor probemix, MRC, Hollanda" yer alan genlerin açılımı ve belirlenen metilasyon yüzdeleri

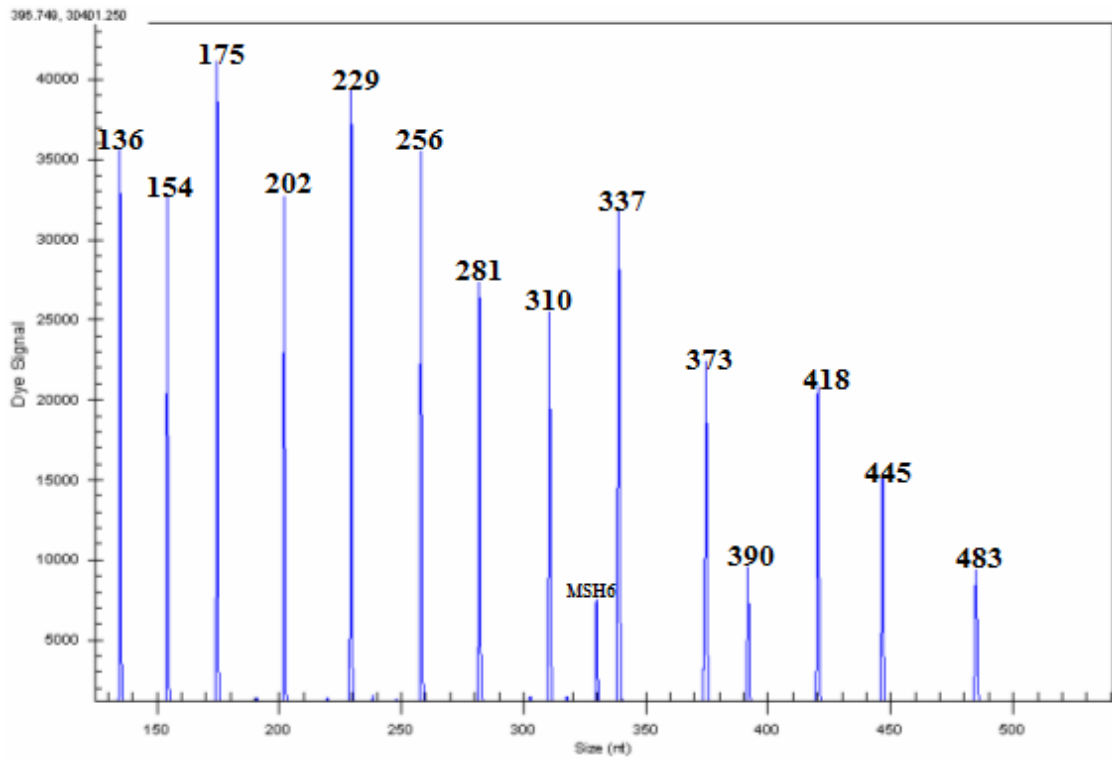
Gen	Genin açık ismi	Metilasyon yüzdesi (%)
<i>BRCA1</i>	Meme kanseri yatkınlığı 1	0
<i>BRCA2</i>	Meme kanseri yatkınlığı 2	0
<i>ATM</i>	Ataksi telanjiektazi mutasyonu	0
<i>TP53</i>	Tümör proteini <i>p53</i>	7,5
<i>PTEN</i>	Fosfataz ve tensin homologu	1,25
<i>MGMT</i>	O6- metilguanin DNA metil transferaz	0
<i>PAX5</i>	Box 5 geni	3,75
<i>CDH13</i>	Kaderin 13, H-kaderin	21,25
<i>TP73</i>	Tümör proteini <i>p73</i>	6,25
<i>WT1</i>	Wilms tümörü 1	33,75
<i>VHL</i>	Von Hippel-Lindau	0
<i>GSTP1</i>	Glutasyon S- transferaz P1	0
<i>CHFR</i>	Checkpoint with forkhead and ring finger domains	0
Devamı arkada		

<i>ESR1</i>	Östrojen reseptörü 1	1,25
<i>RBI</i>	Retinoblastoma 1	27,5
<i>MSH6</i>	Mut S homolog 6	36,25
<i>THBS1</i>	Thrombospondin 1	0
<i>CADMI</i>	Hücre adezyon molekülü 1	2,5
<i>STK11</i>	Serin/treonin kinaz 11	0
<i>PYCARD</i> (ASC)	Apoptoz ile ilişkili leke benzeri protein	0
<i>PAX6</i>	Box 6 geni	0
<i>CDKN2A</i>	Siklin-bağımlı kinaz inhibitör 2A	0
<i>GATA5</i>	<i>GATA</i> 'ya bağlanan protein 5	2,5
<i>RARβ</i>	Retinoik asit reseptörü β	3,75
<i>CD44</i>	<i>CD44</i>	2,5

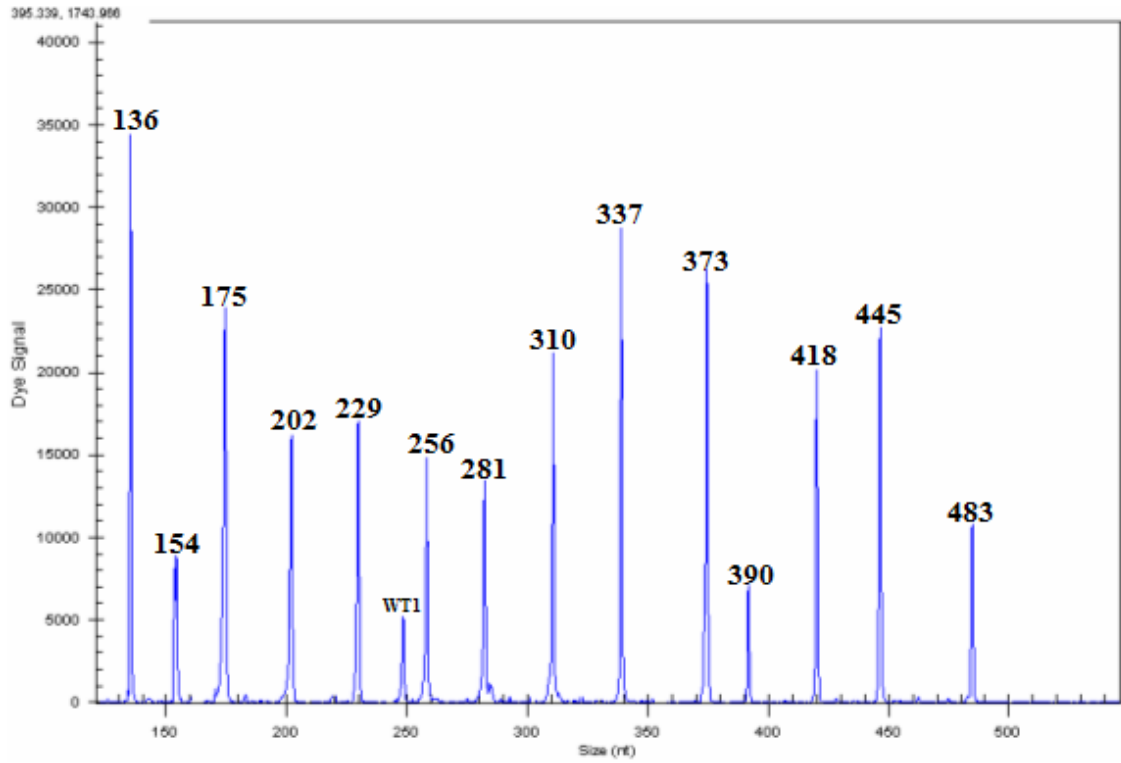
Ürotelyal karsinom tanısı almış 80 olguda MS-MLPA yöntemiyle saptanan metilasyona uğramış genlerin pik görüntüleri Şekil 4.4'den Şekil 4.8'e kadar gösterilmektedir. Şekil 4.3'ten Şekil 4.8'e kadar gösterilen hasta piklerinde sayısal olarak verilen değerler bizim kullandığımız "SALSA MS-MLPA ME002-B1 tumor suppressor probemix, MRC, Hollanda"nın kontrol problemleridir.



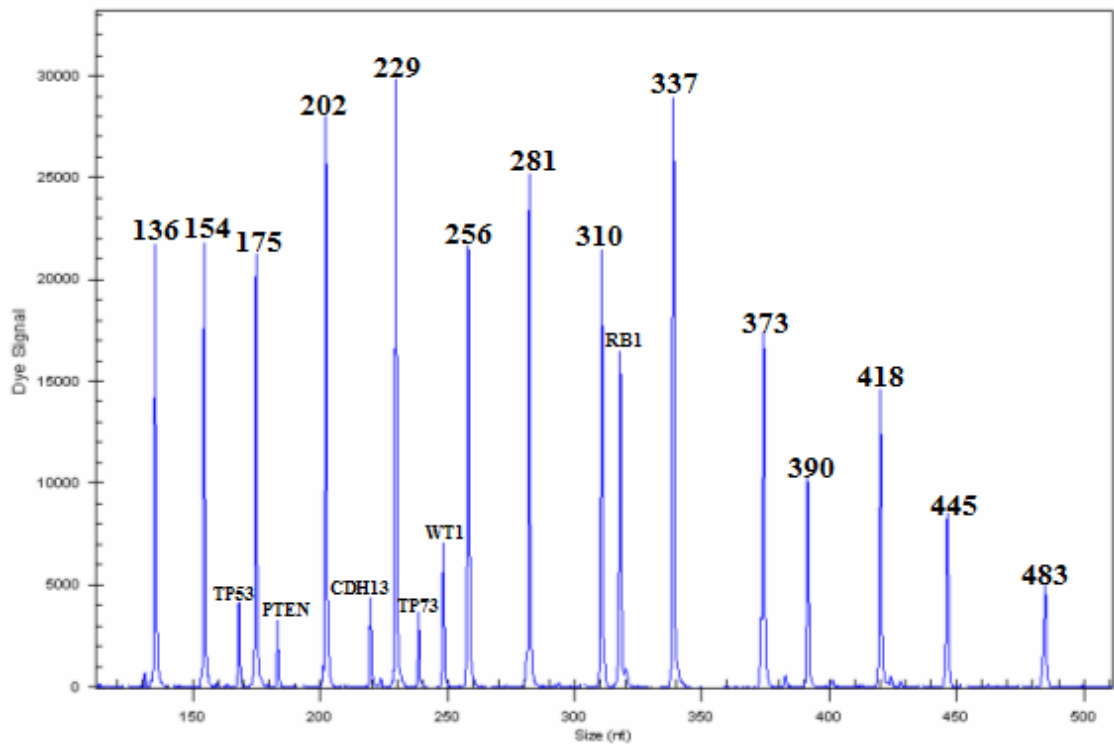
Şekil 4.3 Normal metilasyon profiline sahip bir hastanın ürotelyal karsinom dokusuna ait enzim kesimi yapılmış MS-MLPA pik görüntüsü (3 nolu hasta)



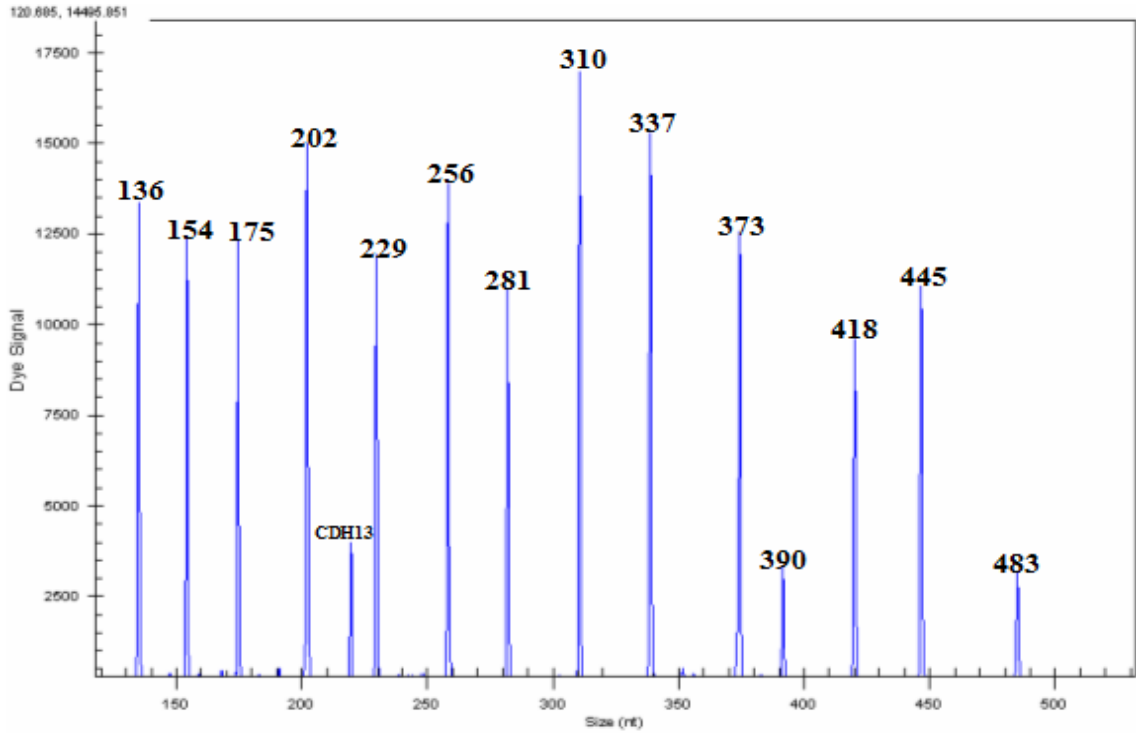
Şekil 4.4 Ürotelyal karsinom dokusunda *MSH6* geninde metilasyon saptanan bir hastanın pik görüntüsü (47 nolu hasta)



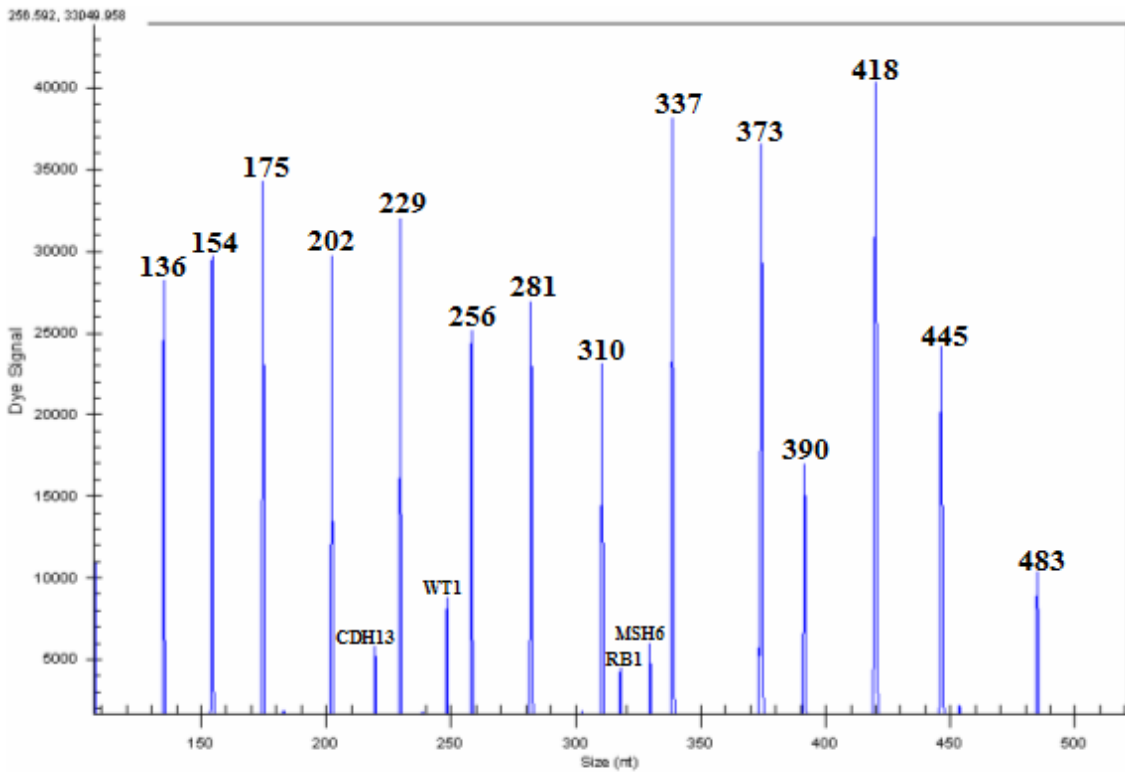
Şekil 4.5 Ürotelyal karsinom dokusunda *WT1* geninde metilasyon saptanan bir hastanın pik görüntüsü (23 nolu hasta)



Şekil 4.6 Ürotelyal karsinom dokusunda *TP53*, *PTEN*, *CDH13*, *TP73*, *WT1* ve *RBI* genlerinde metilasyon saptanan bir hastanın pik görüntüsü (14 nolu hasta)



Şekil 4.7 Ürotelyal karsinom dokusunda *CDH13* geninde metilasyon saptanan bir hastanın pik görüntüsü (70 nolu hasta)



Şekil 4.8 Ürotelyal karsinom'lu 80 olguda en yüksek oranlarda metilasyon gözlenen *CDH13*, *WT1*, *RB1* ve *MSH6* genlerinde metilasyon saptanan bir hastanın pik görüntüsü (30 nolu hasta)

Ürotelyal karsinom tanısı almış 80 olgumuzun metilasyon durumu ile klinikopatolojik parametreler arasındaki ilişki aşağıda Tablo 4.4’de verilmiştir.

Tablo 4.4 Ürotelyal karsinom tanısı almış 80 olgunun metilasyon profili ve klinikopatolojik parametrelerle ilişkisi

Klinikopatolojik parametreler	ÜK (n=80)		P değeri p<0,05
	Metile (n=60) (% 75)	Unmetile (n=20) (% 25)	
Yaş			
≥50	52 (% 74,3)	18 (% 25,7)	0,696
<50	8 (% 80)	2 (% 20)	
Cinsiyet			
Kadın	6 (% 60)	4 (% 40)	0,242
Erkek	54 (% 77,1)	16 (% 22,9)	
TNM sınıflaması			
T sınıflaması			
pTa	18 (% 78,3)	5 (% 21,7)	0,590
pT1	28 (% 77,8)	8 (% 22,2)	
PT2	14 (% 66,7)	7 (% 33,3)	
N sınıflaması			
N0	60 (% 75)	20 (% 25)	
M sınıflaması			
M0	60 (% 75)	20 (% 25)	
Grade			
Düşük dereceli papiller ürotelyal karsinom	22 (% 73,3)	8 (% 26,7)	0,790
Yüksek dereceli papiller ürotelyal karsinom	38 (% 76)	12 (% 24)	
Kas invazyonu			
Var	36 (% 73,5)	13 (% 26,5)	0,691
Yok	24 (% 77,4)	7 (% 22,6)	

Tablo 4.4’deki bulgular incelendiğinde, ÜK tanısı almış 80 olguda, *metile profile* sahip 60 (% 75) ve *unmetile profile* sahip 20 (% 25) hasta saptanmıştır. *Cinsiyete* göre bakıldığında kadınlardan 6 (% 60), erkeklerden 54 (% 77,1) hastada metile profil belirlenirken, kadınlardan 4 (% 40) ve erkeklerden 16 (% 22,9) hastada unmetile profil belirlenmiştir. *Patolojik tümör sınıflandırmasına* göre, T sınıflamasında pTa evresinde 18 (% 78,3), pT1 evresinde 28 (% 77,8), pT2 evresinde 14 (% 66,7) hastada metile profil belirlenmiştir. pTa evresinde 5 (% 21,7), pT1 evresinde 8 (% 22,2), pT2 evresinde

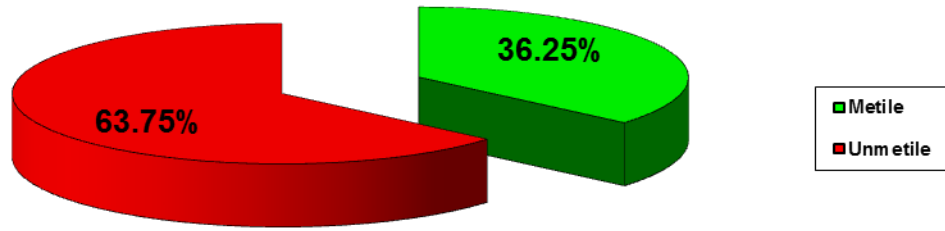
7 (% 33,3) hastada unmetile profil saptanmıştır. Histolojik tümörün derecesine göre, düşük dereceli papiller ürotelyal karsinomlu 22 (% 73,3), yüksek dereceli papiller ürotelyal karsinomlu 38 (% 76) hastada metile profil saptanırken, düşük dereceli papiller ürotelyal karsinomlu 8 (% 26,7), yüksek dereceli papiller ürotelyal karsinomlu 12 (% 24) hastada unmetile profil belirlenmiştir. Histolojik tümörün kas invazyonuna göre, kas invazyonu olan 36 (% 73,5), kas invazyonu olmayan 24 (% 77,4) hastada metile profil saptanmıştır. Kas invazyonu olan 13 (% 26,5), kas invazyonu olmayan 7 (% 22,6) hastada unmetile profil belirlenmiştir.

Ürotelyal karsinom tanısı almış 80 olguda, 13 tümör baskılayıcı gende (*TP53*, *PTEN*, *PAX5*, *CDH13*, *TP73*, *WT1*, *ESR1*, *RBI*, *MSH6*, *CADM1*, *GATA5*, *RARβ* ve *CD44*) promoter metilasyonu tespit edilmiştir. Bu tümör baskılayıcı genlerden, yüksek oranlarda metilasyon gösteren *MSH6*, *WT1*, *RBI* ve *CDH13* genlerinin promoter metilasyon durumları ile klinikopatolojik parametreler karşılaştırılmıştır. Aşağıda bu dört genin metilasyon durumlarıyla klinikopatolojik verilerin karşılaştırılmaları Tablo 4.6, Tablo 4.8, Tablo 4.10 ve Tablo 4.12’de gösterilmektedir.

Metilasyon spesifik-Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MS-MLPA) yöntemi ile *MSH6* geninin metilasyon profili değerlendirildiğinde 29 (% 36,25) hastada metilasyon gözlenirken, 51 (% 63,75) hastada metilasyon gözlenmemiştir (Tablo 4.5 ve Şekil 4.9).

Tablo 4.5 Ürotelyal karsinom tanısı almış 80 olguda *MSH6* metilasyon profili

<i>MSH6</i> metilasyon profili	Hasta sayısı (%)
Metile	29 (% 36,25)
Unmetile	51 (% 63,75)



Şekil 4.9 Ürotelyal karsinom tanısı almış tüm hastaların *MSH6* metilasyon profili

MSH6 geninin metilasyon profilinin klinikopatolojik özelliklerle karşılaştırılması Tablo 4.6'da gösterilmiştir.

Tablo 4.6 *MSH6* geninin metilasyon profili ve klinikopatolojik parametrelerle ilişkisi

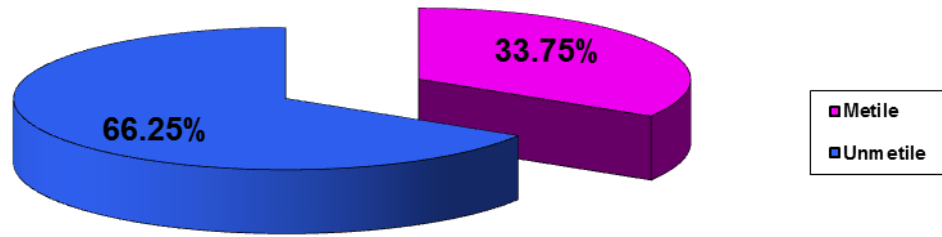
Klinikopatolojik parametreler	<i>MSH6</i> geni metilasyonu (n=80)		P değeri p<0,05
	Metile (n=29) (% 36,25)	Unmetile (n=51) (% 63,75)	
Yaş			
≥50	25 (% 35,7)	45 (% 64,3)	0,792
<50	4 (% 40)	6 (% 60)	
Cinsiyet			
Kadın	2 (% 20)	8 (% 80)	0,253
Erkek	27 (% 38,6)	43 (% 61,4)	
TNM sınıflaması			
T sınıflaması			
pTa	8 (% 34,8)	15 (% 65,2)	0,902
pT1	14 (% 38,9)	22 (% 61,1)	
PT2	7 (% 33,3)	14 (% 66,7)	
N sınıflaması			
N0	29 (% 36,25)	51 (% 63,75)	
M sınıflaması			
M0	29 (% 36,25)	51 (% 63,75)	
Grade			
Düşük dereceli papiller ürotelyal karsinom	10 (% 33,3)	20 (% 66,7)	0,674
Yüksek dereceli papiller ürotelyal karsinom	19 (% 38)	31 (% 62)	
Kas invazyonu			
Var	15 (% 30,6)	34 (% 69,4)	0,187
Yok	14 (% 45,2)	17 (% 54,8)	

Tablo 4.6'daki bulgular incelendiğinde, *MSH6* geninde, metile profile sahip 29 (% 36,25) ve unmetile profile sahip 51 (% 63,75) hasta saptanmıştır. Cinsiyete göre bakıldığında kadınlardan 2 (% 20), erkeklerden 27 (% 38,6) hastanın *MSH6* geninde metile profil belirlenirken, kadınlardan 8 (% 80) ve erkeklerden 43 (% 61,4) hastanın *MSH6* geninde unmetile profil belirlenmiştir. Patolojik tümör sınıflandırmasına göre, T sınıflamasında, pTa evresinde 8 (% 34,8), pT1 evresinde 14 (% 38,9), pT2 evresinde 7 (% 33,3) hastanın *MSH6* geninde metile profil belirlenmiştir. pTa evresinde 15 (% 65,2), pT1 evresinde 22 (% 61,1), pT2 evresinde 14 (% 66,7) hastanın *MSH6* geninde unmetile profil saptanmıştır. Histolojik tümörün derecesine göre, düşük dereceli papiller ürotelyal karsinomlu 10 (% 33,3), yüksek dereceli papiller ürotelyal karsinomlu 19 (% 38) hastanın *MSH6* geninde metile profil saptanırken, düşük dereceli papiller ürotelyal karsinomlu 20 (% 66,7), yüksek dereceli papiller ürotelyal karsinomlu 31 (% 62) hastanın *MSH6* geninde unmetile profil belirlenmiştir. Histolojik tümörün kas invazyonuna göre, kas invazyonu olan 15 (% 30,6), kas invazyonu olmayan 14 (% 45,2) hastanın *MSH6* geninde metile profil saptanmıştır. Kas invazyonu olan 34 (% 69,4), kas invazyonu olmayan 17 (% 54,8) hastanın *MSH6* geninde unmetile profil belirlenmiştir.

Metilasyon spesifik-Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MS-MLPA) yöntemi ile WT1 geninin metilasyon profili değerlendirildiğinde 27 (% 33,75) hastada metilasyon gözlenirken, 53 (% 66,25) hastada metilasyon gözlenmemiştir (Tablo 4.7 ve Şekil 4.10).

Tablo 4.7 Ürotelyal karsinom tanısı almış 80 olguda *WT1* metilasyon profili

<i>WT1</i> metilasyon profili	Hasta sayısı (%)
Metile	27 (% 33,75)
Unmetile	53 (% 66,25)



Şekil 4.10 Ürotelyal karsinom tanısı almış tüm hastaların *WT1* metilasyon profili

WT1 geninin metilasyon profilinin klinikopatolojik özelliklerle karşılaştırılması Tablo 4.8’de gösterilmiştir.

Tablo 4.8 *WT1* geninin metilasyon profili ve klinikopatolojik parametrelerle ilişkisi

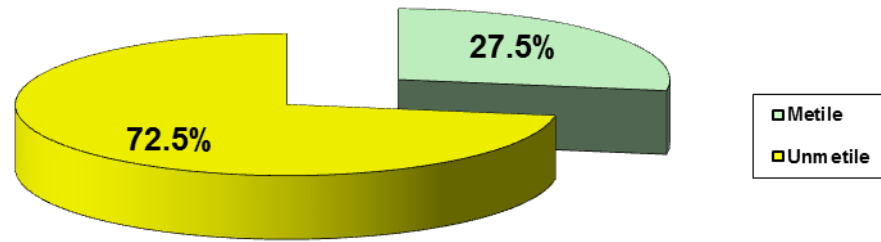
Klinikopatolojik parametreler	<i>WT1</i> geni metilasyonu (n=80)		P değeri p<0,05
	Metile (n=27) (% 33,75)	Unmetile (n=53) (% 66,25)	
Yaş			
≥50	23 (% 32,9)	47 (% 67,1)	0,655
<50	4 (% 40)	6 (% 60)	
Cinsiyet			
Kadın	3 (% 30)	7 (% 70)	0,789
Erkek	24 (% 34,3)	46 (% 65,7)	
TNM sınıflaması			
T sınıflaması			
pTa	9 (% 39,1)	14 (% 60,9)	0,088
pT1	15 (% 41,7)	21 (% 58,3)	
PT2	3 (% 14,3)	18 (% 85,7)	
N sınıflaması			
N0	27 (% 33,75)	53 (% 66,25)	
M sınıflaması			
M0	27 (% 33,75)	53 (% 66,25)	
Grade			
Düşük dereceli papiller ürotelyal karsinom	10 (% 33,3)	20 (% 66,7)	0,951
Yüksek dereceli papiller ürotelyal karsinom	17 (% 34)	33 (% 66)	
Kas invazyonu			
Var	16 (% 32,7)	33 (% 67,3)	0,794
Yok	11 (% 35,5)	20 (% 64,5)	

Tablo 4.8'deki bulgular incelendiğinde, *WT1* geninde, metile profile sahip 27 (% 33,75), unmetile profile sahip 53 (% 66,25) hasta saptanmıştır. Cinsiyete göre bakıldığında kadınlardan 3 (% 30), erkeklerden 24 (% 34,3) hastanın *WT1* geninde metile profil belirlenirken, kadınlardan 7 (% 70) ve erkeklerden 46 (% 65,7) hastanın *WT1* geninde unmetile profil belirlenmiştir. Patolojik tümör sınıflandırmasına göre, T sınıflamasında, pTa evresinde 9 (% 39,1), pT1 evresinde 15 (% 41,7), pT2 evresinde 3 (% 14,3) hastanın *WT1* geninde metile profil belirlenmiştir. pTa evresinde 14 (% 60,9), pT1 evresinde 21 (% 58,3), pT2 evresinde 18 (% 85,7) hastanın *WT1* geninde unmetile profil saptanmıştır. Histolojik tümörün derecesine göre, düşük dereceli papiller ürotelyal karsinomlu 10 (% 33,3), yüksek dereceli papiller ürotelyal karsinomlu 17 (% 34) hastanın *WT1* geninde metile profil saptanırken, düşük dereceli papiller ürotelyal karsinomlu 20 (% 66,7), yüksek dereceli papiller ürotelyal karsinomlu 33 (% 66) hastanın *WT1* geninde unmetile profil belirlenmiştir. Histolojik tümörün kas invazyonuna göre, kas invazyonu olan 16 (% 32,7), kas invazyonu olmayan 11 (% 35,5) hastanın *WT1* geninde metile profil saptanmıştır. Kas invazyonu olan 33 (% 67,3), kas invazyonu olmayan 20 (% 64,5) hastanın *WT1* geninde unmetile profil belirlenmiştir.

Metilasyon spesifik-Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MS-MLPA) yöntemi ile *RBI* geninin metilasyon profili değerlendirildiğinde 22 (% 27,5) hastada metilasyon gözlenirken, 58 (% 72,5) hastada metilasyon gözlenmemiştir (Tablo 4.9 ve Şekil 4.11).

Tablo 4.9 Ürotelyal karsinom tanısı almış 80 olguda *RBI* metilasyon profili

<i>RBI</i> metilasyon profili	Hasta sayısı (%)
Metile	22 (% 27,5)
Unmetile	58 (% 72,5)



Şekil 4.11 Ürotelyal karsinom tanısı almış tüm hastaların *RB1* metilasyon profili

RB1 geninin metilasyon profilinin klinikopatolojik özelliklerle karşılaştırılması Tablo 4.10'da gösterilmiştir.

Tablo 4.10 *RB1* geninin metilasyon profili ve klinikopatolojik parametrelerle ilişkisi

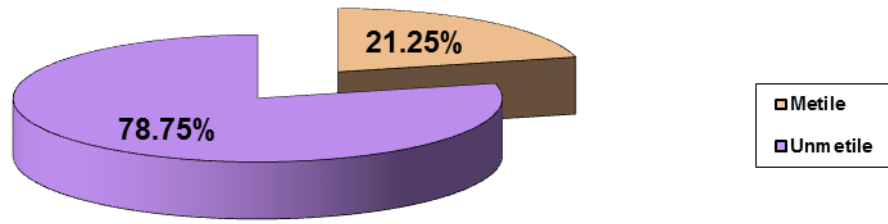
Klinikopatolojik parametreler	<i>RB1</i> geni metilasyonu (n=80)		P değeri p<0,05
	Metile (n=22) (% 27,5)	Unmetile (n=58) (% 72,5)	
Yaş			
≥50	20 (% 28,6)	50 (% 71,4)	0,570
<50	2 (% 20)	8 (% 80)	
Cinsiyet			
Kadın	3 (% 30)	7 (% 70)	0,850
Erkek	19 (27,1)	51 (% 72,9)	
TNM sınıflaması			
T sınıflaması			
pTa	5 (% 21,7)	18 (% 78,3)	0,432
pT1	9 (% 25)	27 (% 75)	
PT2	8 (% 38,1)	13 (% 61,9)	
N sınıflaması			
N0	22 (% 27,5)	58 (% 72,5)	
M sınıflaması			
M0	22 (% 27,5)	58 (% 72,5)	
Grade			
Düşük dereceli papiller ürotelyal karsinom	7 (% 23,3)	23 (% 76,7)	0,518
Yüksek dereceli papiller ürotelyal karsinom	15 (% 30)	35 (% 70)	
Kas invazyonu			
Var	15 (% 30,6)	34 (% 69,4)	0,433
Yok	7 (% 22,6)	24 (% 77,4)	

Tablo 4.10'daki bulgular incelendiğinde, *RBI* geninde, metile profile sahip 22 (% 27,5), unmetile profile sahip 58 (% 72,5) hasta saptanmıştır. Cinsiyete göre bakıldığında kadınlardan 3 (% 30), erkeklerden 19 (27,1) hastanın *RBI* geninde metile profil belirlenirken, kadınlardan 7 (% 70) ve erkeklerden 51 (% 72,9) hastanın *RBI* geninde unmetile profil belirlenmiştir. Patolojik tümör sınıflandırmasına göre, T sınıflamasında, pTa evresinde 5 (% 21,7), pT1 evresinde 9 (% 25), pT2 evresinde 8 (% 38,1) hastanın *RBI* geninde metile profil belirlenmiştir. pTa evresinde 18 (% 78,3), pT1 evresinde 27 (% 75), pT2 evresinde 13 (% 61,9) hastanın *RBI* geninde unmetile profil saptanmıştır. Histolojik tümörün derecesine göre, düşük dereceli papiller ürotelyal karsinomlu 7 (% 23,3), yüksek dereceli papiller ürotelyal karsinomlu 15 (% 30) hastanın *RBI* geninde metile profil saptanırken, düşük dereceli papiller ürotelyal karsinomlu 23 (% 76,7), yüksek dereceli papiller ürotelyal karsinomlu 35 (% 70) hastanın *RBI* geninde unmetile profil belirlenmiştir. Histolojik tümörün kas invazyonuna göre, kas invazyonu olan 15 (% 30,6), kas invazyonu olmayan 7 (% 22,6) hastanın *RBI* geninde metile profil saptanmıştır. Kas invazyonu olan 34 (% 69,4), kas invazyonu olmayan 24 (% 77,4) hastanın *RBI* geninde unmetile profil belirlenmiştir.

Metilasyon spesifik-Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MS-MLPA) yöntemi ile CDH13 geninin metilasyon profili değerlendirildiğinde 17 (% 21,25) hastada metilasyon gözlenirken, 63 (% 78,75) hastada metilasyon gözlenmemiştir (Tablo 4.11 ve Şekil 4.12).

Tablo 4.11 Ürotelyal karsinom tanısı almış 80 olguda *CDH13* metilasyon profili

<i>CDH13</i> metilasyon profili	Hasta sayısı (%)
Metile	17 (% 21,25)
Unmetile	63 (% 78,75)



Şekil 4.12 Ürotelyal karsinom tanısı almış tüm hastaların *CDH13* metilasyon profili

CDH13 geninin metilasyon profilinin klinikopatolojik özelliklerle karşılaştırılması Tablo 4.12’de gösterilmiştir.

Tablo 4.12 *CDH13* geninin metilasyon profili ve klinikopatolojik parametrelerle ilişkisi

Klinikopatolojik parametreler	<i>CDH13</i> geni metilasyonu (n=80)		P değeri p<0,05
	Metile (n=17) (% 21,25)	Unmetile (n=63) (% 78,75)	
Yaş			
≥50	15 (% 21,4)	55 (% 78,6)	0,918
<50	2 (% 20)	8 (% 80)	
Cinsiyet			
Kadın	0 (% 0)	10 (% 100)	0,079
Erkek	17 (% 24,3)	53 (% 75,7)	
TNM sınıflaması			
T sınıflaması			
pTa	6 (% 26,1)	17 (% 73,9)	0,622
pT1	8 (% 22,2)	28 (% 77,8)	
PT2	3 (% 14,3)	18 (% 85,7)	
N sınıflaması			
N0	17 (% 21,25)	63 (% 78,75)	
M sınıflaması			
M0	17 (% 21,25)	63 (% 78,75)	
Grade			
Düşük dereceli papiller ürotelyal karsinom	6 (% 20)	24 (% 80)	0,832
Yüksek dereceli papiller ürotelyal karsinom	11 (% 22)	39 (% 78)	
Kas invazyonu			
Var	13 (% 26,5)	36 (% 73,5)	0,147
Yok	4 (% 12,9)	27 (% 87,1)	

Tablo 4.12'deki bulgular incelendiğinde, *CDH13* geninde, metile profile sahip 17 (% 21,25), unmetile profile sahip 63 (% 78,75) hasta saptanmıştır. Cinsiyete göre bakıldığında kadınlardan 0 (% 0), erkeklerden 17 (% 24,3) hastanın *CDH13* geninde metile profil belirlenirken, kadınlardan 10 (% 100) ve erkeklerden 53 (% 75,7) hastanın *CDH13* geninde unmetile profil belirlenmiştir. Patolojik tümör sınıflandırmasına göre, T sınıflamasında, pTa evresinde 6 (% 26,1), pT1 evresinde 8 (% 22,2), pT2 evresinde 3 (% 14,3) hastanın *CDH13* geninde metile profil belirlenmiştir. pTa evresinde 17 (% 73,9), pT1 evresinde 28 (% 77,8), pT2 evresinde 18 (% 85,7) hastanın *CDH13* geninde unmetile profil saptanmıştır. Histolojik tümörün derecesine göre, düşük dereceli papiller ürotelyal karsinomlu 6 (% 20), yüksek dereceli papiller ürotelyal karsinomlu 11 (% 22) hastanın *CDH13* geninde metile profil saptanırken, düşük dereceli papiller ürotelyal karsinomlu 24 (% 80), yüksek dereceli papiller ürotelyal karsinomlu 39 (% 78) hastanın *CDH13* geninde unmetile profil belirlenmiştir. Histolojik tümörün kas invazyonuna göre, kas invazyonu olan 13 (% 26,5), kas invazyonu olmayan 4 (% 12,9) hastanın *CDH13* geninde metile profil saptanmıştır. Kas invazyonu olan 36 (% 73,5), kas invazyonu olmayan 27 (% 87,1) hastanın *CDH13* geninde unmetile profil belirlenmiştir.

5. TARTIŞMA

DNA metilasyonu, önemli bir epigenetik mekanizmadır (Bogdanovic ve Veenstra 2009) ve yüksek ökaryotların genomlarında transkripsiyonun düzenlenmesinde önemli bir role sahiptir (Bogdanovic ve Veenstra 2009, Chen vd 2011). Tümör baskılayıcı genlerin promoter bölgelerinde hipermetilasyon karsinogenez sırasında düzenleyici genlerin transkripsiyonal sessizleştirilmesi ile ilişkili erken ve sık görülen bir olaydır (Christoph 2007, Jarmalaite vd 2010). Gen sessizleşmesi ile ilişkili promoter bölgelerin anormal metilasyonu tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonuna neden olur (Kawamoto vd 2006). Hücre döngüsü, DNA onarımı, anjiyogenez, kanserojen metabolizması, apoptoz ve hücre-hücre etkileşiminde yer alan genlerin hipermetilasyonu karsinogenezde etkilidir. Hipermetilasyon aynı zamanda kadınlarda ikinci X kromozomunun inaktivasyonu gibi normal fizyolojik süreçlerde de rol oynar (Hamilton 2011). Normal memeli gelişimindeki önemli rollerine rağmen, anormal promoter hipermetilasyonu insan kanserlerinde sıklıkla gözlenen bir değişimdir ve tümöre özgün DNA hipermetilasyon paterni gösterir. Bu nedenle, DNA metilasyonundaki anormal değişimler sıklıkla kanserle ilişkilendirilmektedir (Chen vd 2011). DNA hipermetilasyonu, hem kasa invaziv olmayan hem de invaziv mesane kanserlerinde yüksek oranlarda görülür (Chung vd 2011). Mesane kanseri dahil olmak üzere kanserle ilişkili genlerin anormal promoter metilasyonu, özellikle tümör baskılayıcı genlerin metilasyonla susturumu, tanı, prognoz ve tümörlerin metastatik potansiyeli için biyolojik belirteç olarak kullanılabilir (Cabello vd 2011, Lin vd 2012).

Ürotelyal karsinom tanısı almış 80 olguya ait formalinle fikse edilmiş parafine gömülü mesane dokularından elde edilen DNA'lar MS-MLPA prob seti (ME002-B1 tumor suppressor probemix, MRC, Hollanda) kullanılarak, *BRCA1*, *BRCA2*, *ATM*, *TP53*, *PTEN*, *MGMT*, *PAX5*, *CDH13*, *TP73*, *WT1*, *VHL*, *GSTP1*, *CHFR*, *ESR1*, *RB1*, *MSH6*, *THBS1*, *CADM1*, *STK11*, *PYCARD*, *PAX6*, *CDKN2A*, *GATA5*, *RARβ* ve *CD44* olmak

üzere toplam 25 tümör baskılayıcı genin promoter metilasyonu Metilasyon spesifik-Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MS-MLPA) yöntemi ile analiz edilmiştir. Aynı zamanda, 25 tümör baskılayıcı genin promoter metilasyonu ile klinikopatolojik parametreler (yaş, cinsiyet, derece, evre, kas invazyonu) karşılaştırılmıştır. Metilasyon (sıklığı) yüzdeleri; *BRCA1* için % 0, *BRCA2* için % 0, *ATM* için % 0, *TP53* için % 7.5, *PTEN* için % 1.25, *MGMT* için % 0, *PAX5* için % 3.75, *CDH13* için % 21.25, *TP73* için % 6.25, *WT1* için % 33.75, *VHL* için % 0, *GSTP1* için % 0, *CHFR* için % 0, *ESR1* için % 1.25, *RBI* için % 27.5, *MSH6* için % 36.25, *THBS1* için % 0, *CADMI* için % 2.5, *STK11* için % 0, *PYCARD* için % 0, *PAX6* için % 0, *CDKN2A* için % 0, *GATA5* için % 2.5, *RARβ* için % 3.75 ve *CD44* için % 2.5 olarak tespit edilmiştir. *MSH6*, *WT1*, *RBI* ve *CDH13* en sık metillenen genler olarak saptanmıştır. Literatür çalışmalarındaki sonuçlar ile karşılaştırdığımızda *MSH6*, *WT1*, *RBI* ve *CDH13* genlerinin yüksek metilasyon oranları literatür ile uyumlu bulunmuştur.

DNA metilasyonu ile ilgili diğer çalışmalara baktığımızda, Chung ve arkadaşlarının (2001) yaptığı çalışmada, metilasyon-spesifik polimeraz zincir reaksiyonu (MSP) kullanılarak tümörle ilişkili 5 genin anormal DNA metilasyonu, 13 genitoüriner kanser (5 mesane, 5 böbrek ve 3 prostat) hücre hattında incelenmiştir. *GSTP1*'nin hipermetilasyonu 2 böbrek ve 3 prostat olmak üzere toplam 5 hücre hattında % 38.5, *E-kaderin*'in hipermetilasyonu 1 böbrek hücre hattında % 8, *VHL*'nin hipermetilasyonu 1 böbrek hücre hattında % 8 ve *MGMT* ve *MLH1* hipermetilasyonu % 0 olarak tespit edilmiştir.

Dominguez ve arkadaşlarının (2002) yaptığı çalışmada, 27 mesane kanseri hastasının mononükleer kan hücreleri, tümör ve plazma DNA örneklerinde 6 mikrosatellit markerde (D17S695, D17S654, D13S310, TH2, D9S747, ve D9S161) heterozigot kaybı, *p53* ve *K-ras* mutasyonları ve MSP metoduyla *p14ARF* ve *p16INK4A* genlerinin promoter metilasyon durumu araştırılmıştır. Mesane tümör örneklerinde, promoter hipermetilasyonu *p14ARF* için % 56 (15/27), *p16INK4A* için % 18 (5/27) olarak tespit edilmiştir. Plazma örneklerinde, *p14ARF* promoter hipermetilasyonu % 87 ve *p16INK4A* promoter hipermetilasyonu % 40 olarak belirlenmiştir. Normal kan hücre örneklerinde, *p14ARF* ve *p16INK4A* genlerinde promoter metilasyonu saptanamamıştır.

Tada ve arkadaşlarının (2002) yaptığı çalışmada, 55 yüzeysel mesane kanser dokusunda ve 5 normal ürotelyal epitelde MSP analizi ile *hMLH1*, *MGMT*, *p16*, *VHL*, *DAPK*, *GSTP1*, and *E-kaderin* genlerinin anormal promoter metilasyonları çalışılmıştır. Hipermetilasyon, 55 yüzeysel mesane kanserinde *MLH1* için % 13, *MGMT* için % 17, *p16* için % 11, *VHL* için % 4, *DAPK* için % 29, *GSTP1* için % 13 ve *E-Kaderin (CDH1)* için % 48 olarak tespit edilmiştir. *MLH1*, *MGMT*, *VHL* ve *DAPK* genlerinin promoter hipermetilasyonu nüks riskinin artmasıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca *MLH1*, *MGMT*, *p16*, *VHL*, *DAPK*, *GSTP1* ve *E-kaderin* genlerinin toplu metilasyonu nüks ile ilişkili olduğu belirtilmektedir.

Valenzuela ve arkadaşlarının (2002) yaptığı çalışmada, 86 mesane kanseri hastasında ve 31 sağlıklı birey ile benign ürolojik hastalığı olan 18 bireyin dahil olduğu toplam 49 kişilik kontrol grubunda MSP yöntemi kullanılarak *p16INK4A*'nın metilasyon durumu incelenmiştir. *p16INK4A*'nın metilasyonu serum örneklerinde % 22 (19/86) ve mesane tümör biyopsilerinde % 26 olarak bulunmuştur. *p16INK4A*'nın anormal metilasyonu benign ürolojiye sahip bir hastada gözlenmiştir.

Chang ve arkadaşlarının (2003) yaptığı çalışmada, 44 mesane kanseri olgusunda Transizyonel Hücreli Karsinom (TCC) örnekleri değerlendirilmiştir. Olguların % 60'ında *p16INK4A* geninde metilasyonu belirlenirken, *p14ARF* geninde metilasyon saptanmamıştır.

Gutierrez ve arkadaşlarının (2004) yaptığı çalışmada, 31 Skuamöz Hücreli Karsinom (SCC) ve 10 TCC'dan oluşmuş 41 mesane kanseri örneğinde MSP yöntemiyle 12 genin (*E-kaderin*, *DAPK*, *MGMT*, *p14*, *p15*, *p16*, *FHIT*, *APC*, *RASSF1A*, *GSTP1*, *RARβ* ve *p73*) metilasyon durumunu incelenmiştir. 8 genin sıklıkla SCC'larda metillendiği gözlenmiştir. Bu 8 gen için metilasyon yüzdeleri: *DAPK* için % 58, *FHIT* için % 40, *RARβ* için % 30, *E-kaderin*, *APC*, *p16*, *RASSF1A* için % 26 ve *MGMT* için % 23 olarak, geriye kalan nadir metillenen 4 genin metilasyon oranları: *p14* için % 13, *p15* için % 10, *p73* için % 7 ve *GSTP1* için % 3 olarak tespit edilmiştir.

Chapman ve arkadaşlarının (2005) yaptığı çalışmada, 50 ÜK dokusunda, *p16INK4A (CDKN2A)*'nın gen dozu (kantitatif gerçek-zamanlı PCR), allel durumu (mikrosatellit analizi), hipermetilasyonu (MSP), mutasyon durumu (yüksek performanslı sıvı

kromatografisi denatürasyonu ve sekanslama), protein ekspresyonu (immünohistokimyasal) ve klinikopatolojik değişkenlerle ilişkisi (evre, derece ve takip sırasında hastalık nüksü) değerlendirilmiştir. Homozigot delesyonu olmayan tümörlerde, *p16INK4A* (*CDKN2A*) promoter hipermetilasyonu % 6 (1/18) olarak saptanmıştır.

Dhawan ve arkadaşlarının (2006) yaptığı çalışmada, hem karsinoma *in situ* (KİS) hem de invaziv ÜK olan 104 hastadan alınan toplam 196 normal ürotelyum, KİS ve tümör örneğinde 6 genin (*p16*, *p14*, *E-kaderin*, *RARβ2*, *RASSF1A* ve *GSTP1*) metilasyon durumu, kantitatif metil-duyarlı polimeraz zincir reaksiyonu kullanılarak araştırılmıştır. Metilasyon yüzdeleri; Ürotelyal karsinom örneklerinde *p16* için % 16, *p14* için % 2.7, *E-kaderin* için % 82.7, *RARβ2* için % 16, *RASSF1A* için % 57.3 ve *GSTP1* için % 6.9, KİS örneklerinde *p16* için % 12.5, *p14* için % 1.6, *E-kaderin* için % 64.1, *RARβ2* için % 9.4, *RASSF1A* için % 59.4 ve *GSTP1* için % 6.3, normal ÜK örneklerinde *p16* için % 1.8, *p14* için % 0, *E-kaderin* için % 47.4, *RARβ2* için % 0, *RASSF1A* için % 38.6 ve *GSTP1* için % 12.3, normal kontrol örneklerinde *p16* için % 0, *p14* için % 0, *E-kaderin* için % 33.3, *RARβ2* için % 0, *RASSF1A* için % 13.3 ve *GSTP1* için % 6.7 olarak tespit edilmiştir.

Yurakh ve arkadaşlarının (2006) yaptığı çalışmada, 84 ürotelyal neoplazili hastanın klinik ve patolojik bulgularına bakılmıştır. *p14ARF*, *p15INK4B* ve *p16INK4A* genlerinin homozigot delesyonları ve promoter metilasyonları, lokus 9p21'in heterozigot kaybı, *p53* mutasyonları ve *p53*, *p16*, *p14*, *p21*, *p27*, *pRb*, *Ki67*, *MDM2* ve siklin D1 proteinlerinin immünohistokimyasal ekspresyonları genel sağkalım, nüksüz sağkalım ve progresyonsuz sağkalıma göre değerlendirilmiştir. *p14ARF*, *p15INK4B* ve *p16INK4A* genlerinin promoter metilasyonları MSP yöntemi kullanılarak 84 hastanın mesane tümör dokusunda araştırılmıştır. Promoter hipermetilasyon oranları; *p14ARF* için % 26.2 (22/84), *p15INK4B* için % 7.1 (6/84) ve *p16INK4A* için % 6 (5/84) olarak tespit edilmiştir.

Marsit ve arkadaşlarının (2007) yaptığı çalışmada, 25-74 yaşları arasında 331 mesane TCC tanısı konmuş hastada MSP yöntemi kullanılarak 16 genin (*p16INK4A* (*CDKN2A*), *RASSF1A*, *APC*, *PYCARD*, *LAMC2*, *SFRP1*, *SFRP2*, *SFRP4*, *SFRP5*, *MGMT*, *DAPK*, *RARβ*, *CDH1*, *CDH13*, *MLH1* ve *PRSS3*) metilasyon durumları tespit

edilmiştir. Metilasyon oranları; *MLH1* için % 3.1, *PYCARD* için % 3.6, *SFRP5* için % 39, *SFRP4* için % 8.8, *SFRP2* için % 51.4, *SFRP1* için % 18.4, *APC* için % 22, *p16INK4A (CDKN2A)* için % 31.7, *DAPK* için % 9.4, *RARβ* için % 15.1, *RASSF1A* için % 32.6, *CDH1 (E-kaderin)* için % 3.6, *CDH13 (H-kaderin)* için % 18.1, *LAMC2* için % 11.8, *PRSS3* için % 33.5 ve *MGMT* için % 7 olarak belirlenmiştir.

Yates ve arkadaşlarının (2007) yaptığı çalışmada, kantitatif metilasyon-spesifik PCR (QMSP) metoduyla 96 malign ve 30 normal ürotelyal örnekte tümör ilerlemesiyle ilişkili olduğu düşünülen 17 genin (*RASSF1A*, *E-kaderin*, *WIF1*, *TNFRSF25*, *EDNRB*, *CDH4*, *APC*, *p16*, *DAPK*, *RARβ*, *CYCLIND2*, *TIMP3*, *MGMT*, *BCL2*, *TERT*, *IGFBP3* ve *HIC1*) promoter metilasyonları incelenmiştir. Ürotelyal tümörlerde; *RASSF1A* için % 54.2, *E-kaderin* için % 40.6, *WIF1* için % 56.3, *TNFRSF25* için % 75, *EDNRB* için % 66.7, *CDH4* için % 14.6, *APC* için % 31.3, *p16* için % 1, *DAPK* için % 21.9, *RARβ* için % 2.1, *CYCLIND2* için % 21.9, *TIMP3* için % 22.9, *MGMT* için % 37.5, *BCL2* için % 44.8, *TERT* için % 20.8, *IGFBP3* için % 42.7 ve *HIC1* için % 21.9 olarak tespit edilmiştir. Normal ürotelyum da *RASSF1A* için % 46.7, *E-kaderin* için % 20, *WIF1* için % 13.3, *TNFRSF25* için % 16.7, *EDNRB* için % 10, *CDH4* için % 0, *APC* için % 3.3, *p16* için % 0, *DAPK* için % 3.3, *RARβ* için % 0, *CYCLIND2* için % 13.3, *TIMP3* için % 10, *MGMT* için % 0, *BCL2* için % 3.3, *hTERT* için % 0, *IGFBP3* için % 13.3 ve *HIC1* için % 16.7 olarak belirlenmiştir.

Yu ve arkadaşlarının (2007) yaptığı çalışmada, 132 mesane kanseri hastasından, 23 yaşla uyumlu kanser olmayan mesane lezyonları olan hastadan, 6 nörolojik rahatsızlığı olan hastadan ve 7 sağlıklı gönüllüden alınan idrar örneklerinde 21 genin metilasyonu MSP yöntemiyle incelenmiştir. 132 mesane kanseri hastasının idrar örneğinde, 21 genin metilasyon yüzdeleri; *SALL3* % 58.3 (77/132), *CFTR* % 55.3 (73/132), *ABCC6* % 36.4 (48/132), *HPPI* % 34.8 (46/132), *BCL2* % 27.3 (36/132), *ALX4* % 25 (33/132), *RUNX3* % 32.6 (43/132), *ITGA4* % 31.1 (41/132), *RASSF1A* % 35.6 (47/132), *MYOD1* % 22 (29/132), *MTIA* % 34.8 (46/132), *DRM* % 18.9 (25/132), *BMP3B* % 15.9 (21/132), *CCNA1* % 15.9 (21/132), *CDH13* % 16.7 (22/132), *RPRM* % 14.4 (19/132), *MINT1* % 12.9 (17/132), *BRCA1* % 12.1 (16/132), *PTCHD2* % 5.3 (7/132), *TMS1* % 3 (4/132) ve *GSTP1* % 2.3 (3/132) olarak tespit edilmiştir. Nörolojik rahatsızlığı olan hastaların ve sağlıklı gönüllülerin idrar örneklerinde çalışılan 21 gende metilasyon saptanmamıştır. Kanser olmayan mesane lezyonu olgularında, 21 genden sadece 4 gende metilasyon

gözlenmiştir. Bu genlerin metilasyon oranları; *RUNX3* % 4.3 (1/23), *ITGA4* % 4.3 (1/23), *RASSF1A* % 8.7 (2/23) ve *MT1A* % 8.7 (2/23) olarak belirlenmiştir.

Abbosh ve arkadaşları (2008) yaptığı çalışmada, QMSP yöntemi kullanılarak 13 TCC ve 13 SCBC dokularında *RASSF1*, *MLH1*, *DAPK1*, ve *MGMT* genlerinin metilasyon durumları incelenmiştir. *RASSF1* metilasyonu TCC dokularında % 46 (6/13) ve SCBC dokularında % 77 (10/13), *MGMT* metilasyonu TCC dokularında % 69 (9/13) ve SCBC dokularında % 62 (8/13) oranlarında gözlenmiştir. Ayrıca *MLH1* geninin sadece bir SCBC dokusunda metillendiği ve *DAPK1* geninin tümör dokularında metillenmediği belirtilmiştir.

Ellinger ve arkadaşlarının (2008) yaptığı çalışmada, sistektomi geçirmiş mesane kanseri olan 45 hastada ve kontroller için histolojik olarak benign prostat hiperplazisi olan 45 hastada *APC*, *DAPK*, *GSTP1*, *PTGS2*, *TIG1* ve *Reprimo* genlerinin hipermetilasyonları, metilasyona duyarlı restriksiyon endonükleaz tedavisi sonrasında gerçek-zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu kullanılarak analiz edilmiştir. Olgularda *TIG1* % 32, *PTGS2* % 24 ve *DAPK* % 2 olarak daha az sıklıkla hipermetilasyon gözlenirken, *APC* ve *GSTP1* promoter hipermetilasyonunun % 59 olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca *Reprimo*'nun çoğunlukla metile olmadığı belirtilmiştir. Hipermetilasyon önmeli ölçüde, pT evresinde olan *APC*, *GSTP1* ya da multifokal mesane kanseri olan *GSTP1* veya *TIG1* ve *APC* ya da cerrahi sınır pozitifliği olan *APC* veya *TIG1* genleri dahil olmak üzere prognostik olumsuz klinikopatolojik parametreler ile korelasyonlu bulunmuştur.

Hellwinkel ve arkadaşlarının (2008) yaptığı çalışmada, 39 hastadan (pT1 10, pTis 1, pTa 20, pT2 5) alınan primer papiller mesane kanseri örneklerinde kanserle ilişkili genler olan *GSTP1*, *DAPK*, *MDR1*, *TPEF*, *PAX6* ve *TSLC1*'in promoter bölgelerindeki CpG adalarının metilasyon durumunu analiz edilmiştir. DNA'lar da bisüfit uygulaması ve metilasyon-spesifik gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu kullanılmıştır. Sadece *TPEF* ve *PAX6* genlerinin CpG adalarında metilasyon yüzdeleri tespit edilmiştir. *TPEF* ve *PAX6* genlerinin promoterlerinin tümör dokularıyla tümöre komşu normal dokular karşılaştırıldığında daha yüksek metilasyon oranlarına sahip olduğu bulunmuştur. İlginç bir şekilde, *TPEF* ve *PAX6* promotörlerinin metilasyon oranları pT1'den sonra pTa olan mesane kanseri dokularına komşu normal dokularda daha

yüksek olduğu belirtilmiştir. *TPEF* için metilasyon oranı % 33 ve *PAX6* için metilasyon oranı % 23 olarak tespit edilmiştir. Ayrıca tümör dokularında metilasyon oranları *GSTP1* için % 5, *DAPK* için % 0, *MDR1* için % 7.5 ve *TSLC1* için % 0 olarak belirlenmiştir.

Khin ve arkadaşlarının (2009) yaptığı çalışmada, 74 primer mesane tümör örneğinde *p16*, *SFRP1*, *SFRP2*, *SFRP4*, *SFRP5* ve *BAMBI* genlerinin metilasyon durumları MSP ile analiz edilmiştir. Hipermetilasyon yüzdeleri; *p16* için % 43.2 (32/74), *SFRP1* için % 21.6 (16/74), *SFRP2* için % 32.4 (24/74), *SFRP4* için % 12.2 (9/74), *SFRP5* için % 50 (37/74) ve *BAMBI* için % 31.1 (23/74) olarak tespit edilmiştir.

Serizawa ve arkadaşlarının (2010) yaptığı çalışmada, çeşitli evrelerde 46 mesane tümör dokusunda ve bu tümör dokularına sahip 26 mesane kanseri hastasından alınan idrar örneklerinde 5 farklı promoter CpG adasının (*RARβ*, *APC*, *WIF1*, *SRFP1*, *p16INK4A* (*CDKN2A*)) metilasyon durumu metilasyon spesifik-multipleks ligasyon bağımlı prob amplifikasyonu (MS-MLPA) yöntemi ile analiz edilmiştir. Mesane tümör doku örneklerini ve idrar örneklerini kullanarak tamamladıkları bu çalışmalarında 5 farklı genin promoter bölgesindeki hipermetilasyon oranları; *RARβ* için % 17, *APC* için % 35, *WIF1* için % 33, *SRFP1* için % 39 ve *p16INK4A* (*CDKN2A*) için % 2 olarak tespit edilmiştir.

Agundez ve arkadaşlarının (2011) yaptığı çalışmada, primer kasa invaziv olmayan pT1-G3 91 parafine gömülü tümör örneğinde ve 10 normal epitel doku örneğinde 25 farklı tümör baskılayıcı genin metilasyon durumu metilasyon spesifik-multipleks ligasyon bağımlı prob amplifikasyonu (MS-MLPA) analizi ile değerlendirilmiştir ve en sık metillenen genlerin *STK11* (% 94.5), *MSH6* (% 81.3), *BRCA1* (% 72.5), *PAX5A* (% 68.1), *MGMT* (% 67), *CDH13* (% 62.6), ve *IGSF4* (*CADM1*) (% 61.5) olduğu belirlenmiştir. Diğer tümör baskılayıcı genlerin metilasyonu; *TP73* (% 37.4), *VHL* (% 31.9), *RARβ* (% 59.3), *ESR1* (% 49.5), *p16INK4A* (*CDKN2A*) (% 24.2), *PTEN* (% 31.9), *PAX6* (% 20.9), *WT1* (% 58.2), *CD44* (% 38.5), *GSTP1* (% 40.7), *ATM* (% 40.7), *CHFR* (% 18.7), *BRCA2* (% 56), *RBI* (% 27.5), *THBS1* (% 25.3), *PYCARD* (% 28.6), *TP53* (% 46.2) ve *GATA5* (% 55) olarak tespit edilmiştir. Metilasyon *TP73*, *MSH6*, *ESR1*, *PAX5A*, *WT1*, *CD44*, *ATM*, *IGSF4*, *CHFR*, *BRCA2*, *THBS1*, *PYCARD*, *STK11* ve *GATA5* için pT1-G3 tümörlerinde yeni bulunmuştur. 25 tümör baskılayıcı genin

metilasyon sıklıkları ile klinikopatolojik veriler (yaş, cinsiyet, büyüme paterni, KİS ile ilişki, tümör boyutu ve multifokal) karşılaştırılmıştır. Multifokal ile unifokal tümörlerin metilasyon oranları karşılaştırıldığında *WT1*, *ATM*, *RBI*, *PYCARD*, *CDH13* ve *GATA5* genlerinde önemli ölçüde tümör sayısı ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir, ayrıca *MSH6*, *VHL*, *RARβ*, *p16INK4A (CDKN2A)*, *PTEN*, *BRCA2* ve *TP53* genlerinin metilasyonu tümör boyutuyla ilişkili bulunmuştur. *WT1* metilasyonunun, TUR sonrası 3 ay içinde tekrarlayan hastalarda sık gözlemlendiği belirtilmektedir. Metilasyon durum analizi, mesane kanseri patogenezinde epigenetiklerin rolünü vurgulayan önemli biyolojik belirteçtir.

Cabello ve arkadaşlarının (2011) yaptığı çalışmada, 14 mesane kanseri hücre hattı ve 31 mesane kanseri olgusuna ait parafin blok örnekleri ile mesane kanserli olgulara ve sağlıklı bireylere ait 146 idrar örneğinde, 25 tümör baskılayıcı genin metilasyon durumu MS-MLPA analizi ile değerlendirilmiştir. Hem mesane kanseri doku örneklerinde hem de idrar örneklerinde en sık metillenen genlerin *BRCA1*, *WT1* ve *RARβ* olduğu belirlenmiştir. Mesane tümörlerinde en sık metillenen genlerin frekansı *BRCA1* için % 71, *WT1* için % 38.7 ve *RARβ* için % 38.7 olarak tespit edilmiştir. Diğer tümör baskılayıcı genlerin metilasyonu; *TP73* (% 6.5), *MSH6* (% 29), *VHL* (% 12.9), *ESR1* (% 16.1), *p16INK4A (CDKN2A)* (% 0), *PAX5A* (% 12.9), *PTEN* (% 0), *MGMT* (% 16.1), *PAX6* (% 0), *CD44* (% 9.7), *GSTP1* (% 0), *ATM* (% 0), *IGSF4 (CADM1)* (% 29), *CHFR* (% 0), *BRCA2* (% 3.2), *RBI* (% 3.2), *THBS1* (% 35.5), *PYCARD* (% 0), *CDH13* (% 25.8), *TP53* (% 12.9), *STK11* (% 0) ve *GATA5* (% 25.8) olarak belirlenmiştir. Tümör örneklerinde; *BRCA1*, *RARβ* ve *THBS1* genleri yaygın olarak kasa invaziv tümörlerde görülürken, *WT1* ve *BRCA1* genleri noninvaziv mesane lezyonlarında sıklıkla metile olduğu gözlenmektedir. *WT1* metilasyonunun önemli ölçüde tümör evresiyle, aynı zamanda *VHL*, *MGMT* ve *BRCA1* genlerinin metilasyonu önemli ölçüde tümör derecesiyle ilişkili olduğu belirtilmiştir. İdrar örneklerinde; *BRCA1*, *RARβ* ve *THBS1* genlerinin promoter metilasyonu kasa invaziv olmayan karsinomlarda, *BRCA1*, *CDH13*, *THBS1* ve *WT1* promoter metilasyonu invaziv tümörlerde daha sık tespit edilmiştir. *ATM* ve *MGMT* genlerinin metilasyon oranları ile tümör evresi arasında, *PAX6* geninin metilasyon oranı ile tümör derecesi arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur.

Jablonowski ve arkadaşlarının (2011) yaptığı çalışmada, 42 hasta (% 92.9'u erkek, % 73.8'i sigara kullanan, % 71.4'ü T1-G1, % 19.1'i T1-G2, % 9.5'i T1-G3) ve 36 sağlıklı birey kontrol grubu olarak çalışmaya alınmıştır. Kan serumundan genomik DNA izole

edilmiştir ve *p16INK4A (CDKN2A)* ve *DAPK* genlerinin promoter metilasyon durumları MSP yöntemiyle analiz edilmiştir. *DAPK* geninin metilasyon oranı % 64.3 (27/42) olarak görülürken, *p16INK4A (CDKN2A)* metilasyonu % 40.5 (17/42) olarak tespit edilmiştir.

Berrada ve arkadaşlarının (2012) yaptığı çalışmada, 32 mesane kanseri hastasından elde edilen tümör dokularında ve idrar örneklerinde 3 genin (*APC*, *RARβ* ve *Survivin*) promoter metilasyon durumu MSP yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir. Tümör dokularında metilasyon oranları; *APC* için % 100, *RARβ* için % 75 ve *Survivin* için % 84.4, idrar örneklerinde metilasyon oranları ise; *APC* için % 79.3, *RARβ* için % 70.8 ve *Survivin* için % 96.3 olarak belirlenmiştir.

Zuiverloon ve arkadaşlarının (2012) yaptığı çalışmada, idrar örneklerinde kasa invaze olmayan mesane kanseri (NMIBC) nüksünü tespit etmek için özel MS-MLPA analizi geliştirilmiştir. Mesane kanserine (BC) özgü MS-MLPA analizini geliştirmek için dört aşamalı bir süreç gerçekleştirilmiştir. 1. aşamada; BC MS-MLPA analizini yapılandırmak için, 37 nüklü NMIBC hastanın tümör dokusu, 46 mesane kanseri olmayan hastanın idrar örneği ve 29 mesane kanseri hastasının kan örneği, 2. aşamada; gen panelini seçmek için, 68 nüks tümörü olan hastanın TUR öncesi idrar örneği ve 91 BC olmayan hastaların idrar örneği, 3. aşamada; seçilen gen panelin doğrulamak için, takip sırasında toplanmış 109 mesane kanseri hastasının idrar örneği (49 hastada nüks mevcutken, 60 hastada nüks yoktur), 4. aşamada; tahmin modelini doğrulamak için, 65 TUR öncesi nüklü BC hastasının idrar örneği ve 29 nüksüz BC hastasının idrar örneği çalışmıştır. Seçilen problemleri doğrulamak için yeni geliştirilmiş BC MS-MLPA yöntemiyle, 34 aynı NMIBC tümör doku örneğinde ve 40 kontrol BC olmayan hastanın idrar örneğinde 23 prob bölgesinin metilasyon analizi yapılmıştır. Mesane kanseri olmayan hastaların idrar örneklerinde metilasyon frekansları; *BCL2_a* için % 12.5, *TNFRSF25* için % 87.5, *WIF1_b* için % 12.5 ve *RARβ_b* için % 2.5 olarak belirlenmiştir. NMIBC tümör doku örneklerinde metilasyon yüzdeleri (sıklığı); *BCL2_a* için % 38.2, *PTEN_a* için % 2.9, *TIMP3_a* için % 2.9, *APC_a* için % 17.6, *TERT_a* için % 17.6, *TERT_b* için % 29.4, *WIF1_a* için % 5.9, *RARβ_a* için % 14.7, *CDKN2A* için % 2.9, *BCL2_b* için % 2.9, *PTEN_b* için % 2.9, *ESR1_a* için % 79.4, *TIMP3_b* için % 2.9, *TNFRSF25* için % 91.2, *ESR1_b* için % 5.9, *TIMP3_c* için % 2.9, *EDNRB* için % 67.6, *TERT_c* için % 23.5, *CDH13* için % 26.5, *APC_b* için % 17.6, *WIF1_b* için %

41.2, *CDHI* için % 2.9 ve *RARβ_b* için % 8.6 olarak tespit edilmiştir. pT1-G3 ve KİS gibi yüksek dereceli tümörler en yüksek nüks riski ile ilişkili bulunmuştur.

Zhong ve arkadaşlarının (2013) yaptığı çalışmada, QMSP yöntemiyle endemik bir bölgeden mesane hasarı olan *S. haematobium* tarafından enfekte ve enfekte olmayan gönüllülerden elde edilen 57 (49 enfekte ve 8 enfekte olmayan kontrol) idrar örneğinde 7 genin (*RASSF1A*, *RARβ2*, *RUNX3*, *TIMP3*, *MGMT*, *p16INK4A (CDKN2A)*, *p14ARF*) metilasyon durumu incelenmiştir. Metilasyon oranları; *RASSF1A* için % 28.6 (14/49), *TIMP3* için % 14.3 (7/49), *MGMT* için % 12.2 (6/49) olarak tespit edilmiştir. *RUNX3*, *RARβ2*, *p16INK4A (CDKN2A)*, *p14ARF* genlerinin metilasyon durumu *S. haematobium* enfeksiyonu olan tüm hastalarda % 0 olarak belirlenmiştir.

Ürotelyal karsinom doku örneklerini değerlendirdiğimiz çalışmada elde ettiğimiz sonuçlar, metilasyonla ilgili yapılan benzer çalışmalarının verileriyle büyük oranda örtüşmektedir. Yapılan çalışmalarda farklı sonuçlarla karşılaşmanın bir çok nedeni vardır. Bunlardan bazıları, değişik örnek tiplerinin kullanılması, bisülfid uygulaması, MSP yöntemi ve diğer yöntemlerin kullanılması ayrıca bu yöntemde kullanılan primer dizilerindeki farklılıklar olarak özetlenebilir.

Çalışmamızdaki genel verilerin değerlendirilmesinden sonra, klinikopatolojik verilerden yaş göz attığımızda, incelenen olguların 50 yaş ve üstünde olanların % 87.5, 50 yaşın altında olanların ise % 12.5 oranında olduğu belirlenmiş ve yaş arttıkça metilasyon oranının da arttığı gözlenmiştir. Verilerimizde cinsiyete baktığımızda, olguların % 12.5'i kadın, % 87.5'i erkektir ve metilasyon durumlarına bakıldığında erkeklerde tümör baskılayıcı genlerde metilasyon oranı kadınlara oranla önemli ölçüde yüksek olarak belirlenmiştir. Yapılan diğer çalışmalara baktığımızda cinsiyete göre metilasyon yüzdeleri farklılık göstermektedir. Bazı tümör baskılayıcı genlerin metilasyon oranları erkeklerde, bazılarıda kadınlarda yüksek oranlarda saptanmıştır (Jarmalaite vd 2010, Agundez vd 2011). Yapılan bazı çalışmalarda ise erkeklerde metilasyon oranları daha yüksek bulunmuştur (Marsit vd 2006, Negraes vd 2008, Eissa vd 2011, Lin vd 2011).

Hoque ve arkadaşlarının (2006) yaptığı çalışmada, mesane kanserinin potansiyel biyobelirteçlerini tanımlamak için 15 mesane kanseri hastasının ve 25 kontrolün tümör

ve idrar örneklerinde 9 genin (*APC*, *p14ARF*, *CDH1*, *GSTP1*, *MGMT*, *p16INK4A* (*CDKN2A*), *RARβ2*, *RASSF1A* ve *TIMP3*) promoter hipermetilasyonu kantitatif florojenik gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemiyle analiz edilmiştir. Daha sonra çeşitli evre ve derecelerde mesane kanseri olan 160 hastanın ve 69 kişilik kontrol grubunun idrar DNA örneklerini incelemek için bu belirteçler kullanılmıştır. Mesane kanseri olan 15 hastanın tümör dokularında metilasyon durumu *p16INK4A* (*CDKN2A*) için % 73 (11/15), *p14ARF* için % 33 (5/15), *GSTP1* için % 47 (7/15), *MGMT* için % 53 (8/15), *RARβ2* için % 93 (14/15), *TIMP3* için % 93 (14/15), *CDH1* için % 87 (13/15), *RASSF1A* için % 67 (10/15) ve *APC* için % 73 (11/15) olarak belirlenmiştir. Toplamda 175 mesane kanseri hastasının idrar örneklerinde genlerin promoter bölgelerindeki anormal metilasyonlar; *p16INK4A* (*CDKN2A*) için 79 örnekte % 45, *p14ARF* için 49 örnekte % 28, *MGMT* için 61 örnekte % 35, *GSTP1* için 75 örnekte % 43 olarak tespit edilmiştir. Tek değişkenli bir analizde tümör derecesi, TNM evresi, metastaz varlığı, pozitif sitoloji ve invazivlik 9 genin promoterlerinin en az birinin metilasyonu ile ilişkili olduğu belirtilmektedir. Özellikle, *p14ARF* ve *MGMT* genleri istatistiksel olarak önemli ölçüde tümör evresiyle ilişkili olduğu, *p14ARF*, *MGMT*, *GSTP1* ve *TIMP3* genlerinin promoter metilasyonu istatistiksel olarak önemli ölçüde invaziv tümörler ile ilişkili olduğu ve *GSTP1* ve *RASSF1A* genlerinin promoter metilasyonu istatistiksel olarak önemli ölçüde pozitif sitoloji ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Mesane kanseri hastalarının idrar sediment DNA'sında araştırılan 9 genin herbirinin anormal metilasyonunun yaş, cinsiyet, tümörün histolojik alt tipi ve tümörün nüksü dahil olmak üzere diğer klinik ve demografik özellikler ile ilişkili olmadığı belirtilmiştir.

Negraes ve arkadaşlarının (2008) yaptığı çalışmada, 49 ÜK örneğinde ve sitolojik olarak kanser olmayan hasta sınıfında temizlenmiş mesaneden alınan 24 hücre sediment örneğinde MSP analizi ile *CDH1* (*E-kaderin*), *SFN* (*stratifin*), *RARβ* ve *RASSF1A* genlerinin metilasyon paternleri değerlendirilmiştir. *RARβ* ve *RASSF1A* genlerinin metilasyon paternleri ile klinik-histopatolojik parametreler (yaş, cinsiyet, büyüme paterni, farklılaşma derecesi, kas invazyonu ve ameliyat sonrası nüks) karşılaştırılmıştır. *RARβ* ve *RASSF1A* genlerinin hipermetilasyonu ÜK örneklerinde sırasıyla % 81.6 ve % 22.5 olarak tespit edilmiştir. 24 kişilik kontrol grubunda metilasyon oranları; *RARβ* için % 8.3 ve *RASSF1A* için % 50 olarak belirlenmiştir. Ek olarak, yüksek metilasyon frekansları *CDH1* (*E-kaderin*) için % 91.3 ve *SFN* (*stratifin*) için % 95.5 olarak

saptanmıştır. Mesane kanserinde, *RARβ* ve *RASSF1A* genlerinin metilasyonu ile klinik ve histopatolojik parametreler arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır.

Diğer bir klinikopatolojik parametre olan histolojik tümörün derecesine göre verilerimiz değerlendirildiğinde, 25 tümör baskılayıcı genden 13'ünde (*TP53*, *PTEN*, *PAX5*, *CDH13*, *TP73*, *WT*, *ESR1*, *RBI*, *MSH6*, *CADMI*, *GATA5*, *RARβ*, *CD44*) metilasyon gözlenmiştir. 13 tümör baskılayıcı genden sadece dört tanesi (*MSH6*, *WT1*, *RBI*, *CDH13*) diğerlerine göre daha yüksek oranlarda metilasyon sergilemiştir. Yüksek dereceli papiller ürotelyal karsinomlu olgularda; *MSH6* için % 23.75, *WT1* için % 21.25, *RBI* için % 18.75 ve *CDH13* için % 13.75 metile profil saptanırken, *MSH6* için % 38.75, *WT1* için % 41.25, *RBI* için % 43.75 ve *CDH13* için % 48.75 unmetile profil belirlenmiştir. Bulgularımızda, *MSH6*, *WT1*, *RBI* ve *CDH13* genlerinin promoter metilasyonu ile tümör derecesi arasında anlamlı bir ilişki olmamasına rağmen, metilasyon, düşük dereceli papiller ürotelyal karsinoma göre yüksek dereceli papiller ürotelyal karsinoma daha yüksek oranda gözlenmiştir.

Yapılan diğer çalışmalara göz attığımızda, Maruyama ve arkadaşlarının (2001) yaptığı çalışmada, mesane kanserinin anormal promoter metilasyon profili ve klinikopatolojik verilerle korelasyonu araştırılmıştır. 10 genin metilasyon durumu, 98 cerrahi rezeksiyonla alınmış mesane kanserinde tespit edilmiştir ve ortalama metilasyon indeksi (MI) hesaplanmıştır. Mesane kanserlerinde test edilen genlerin metilasyon frekansları *CDH1* için % 36 (35/98), *RASSF1A* ve *APC* için % 35 (34/98), *CDH13* için % 29 (28/98), *FHIT* için % 16 (16/98), *RARβ* için % 15 (15/98), *GSTP1* için % 11 (11/98), *p16INK4A* için % 7 (7/98), *DAPK* için % 4 (4/98) ve *MGMT* için % 2 (2/98) olarak bulunmuştur. *CDH13* metilasyonunun yüksek tümör derecesi ve nonpapiller büyüme paterni ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. *RARβ*, *GSTP1*, *p16INK4A* ve *MGMT* genlerinin promoter metilasyonunun kötü prognoz parametreleri (yüksek derece, nonpapiller büyüme paterni, kas invazyonu, yüksek tümör evresi ve anöploidi) ile ilişkili olmadığı belirlenmiştir.

Dulaimi ve arkadaşlarının (2004) yaptığı çalışmada, 45 mesane kanserinde (2 pTis, 16 pTa, 10 pT1 ve 17 pT2-4) bisülfid sekanslamasıyla *Rb* tümör baskılayıcı geninin ve MSP yöntemiyle *p16INK4A*, *p14ARF*, *APC* ve *RASSF1A* tümör baskılayıcı genlerinin

hipermetilasyon sıklığı belirlenmiştir. *APC*, *RASSF1A* ve *p14ARF* tümör baskılayıcı genlerinin en az birinde hipermetilasyon 45 mesane kanserinde tespit edilmiştir. MSP ile *p16INK4A*'nın hipermetilasyonu % 7 (3/45) oranında ve *p14ARF*'nin hipermetilasyonu % 35 (16/45) oranında görülmüştür. *APC*'nin promotör hipermetilasyon sıklığı MSP ile % 69 (31/45) ve *RASSF1A*'nın % 51 (23/45) olarak belirlenmiştir. Hipermetilasyon, 16 pTa ve 2 pTis dahil olmak üzere mesane kanserinin tüm patolojik derece ve evrelerinde tespit edilmiştir. Hipermetilasyon her yaştaki hastalarda belirlenmiştir. Hipermetilasyonla 45 tümörün derece veya evresi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.

Kawamoto ve arkadaşlarının (2006) yaptığı çalışmada, MSP kullanılarak, 34 erkek ve 11 kadın toplam da 45 mesane kanseri hastasından alınan 64 örnekte *p16INK4A* ve *p14ARF* genlerinin metilasyon durumu incelenmiştir. 45 hastada metilasyon oranları *p16INK4A* için % 17.8 ve *p14ARF* için % 31.1 olarak tespit edilmiştir. *p16INK4A* ve *p14ARF* genlerinin metilasyon oranlarının invaziv mesane kanseri (\geq pT2) hastalarında yüzeysel mesane kanseri (\leq pT1) olanlara göre önemli ölçüde daha yüksek olduğu belirtilmiştir. *p16INK4A* ve *p14ARF* genlerinin metilasyon durumlarıyla tümör dereceleri arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. *p16INK4A* ve *p14ARF* genlerinin metilasyon durumlarıyla tedavi sonuçları arasında anlamlı bir ilişki olduğu belirlenmiştir. *p14ARF* metilasyonunun prognoz üzerinde önemli olumsuz bir etkisi olduğu tespit edilmiştir. Benzer şekilde, *p16INK4A* metilasyonu olan hastalarda istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmesine de kötü prognoz eğiliminde olduğu gösterilmektedir. *p16INK4A* ve *p14ARF* genlerinin MSP analizinin mesane kanseri olan hastaların patolojik evreleri, klinik sonuçları ve prognozu için yararlı bir biyobelirteç olduğu belirtilmektedir.

Jarmalaite ve arkadaşlarının (2010) yaptığı çalışmada, 6 tümör baskılayıcı genin (*p16*, *p14*, *RAR β* , *RASSF1A*, *DAPK* ve *MGMT*) promotör hipermetilasyonu, takip sırasında toplanan 21 primer mesane kanseri örneğinde MSP yöntemiyle değerlendirilmiştir. Hipermetilasyon prevalansı; *RASSF1A* için % 43, *RAR β* için % 38, *p16* için % 19 ve *DAPK* için % 19 olarak tespit edilmiştir. Epigenetik olmayan değişiklikler *p14* ve *MGMT* genleri için tespit edilememiştir. *p16*, *p14*, *RAR β* , *RASSF1A*, *DAPK* ve *MGMT* genlerinin promotör hipermetilasyon sıklıkları ile IL-2 tedavisi sonrası mesane tümörlerinin klinik ve demografik parametreleri (evre, derece,

yaş, cinsiyet ve nüks) karşılaştırılmıştır. *p16* gen hipermetilasyonu olan mesane kanseri hastalarının IL-2 ile tedavi sonrası daha düşük nüks oranı sahip olduğu belirlenmiştir ayrıca *RARβ* genin hipermetilasyonu ile tümör derecesi arasında önemli ölçüde anlamlı bir ilişki bulunmuştur.

Lin ve arkadaşlarının (2010) yaptığı çalışmada, MSP yöntemi, 57 mesane kanseri hastasından elde edilen tümör ve idrar DNA'sında mesane kanseri teşhisi için güvenilir biyobelirteçleri tanımlamak amaçlı 4 genin (*E-kaderin*, *p16*, *p14* ve *RASSF1A*) promoter hipermetilasyonunu tespit etmek için kullanılmıştır. Bu dört genin metilasyon durumuyla klinikopatolojik parametreler (yaş, cinsiyet, evre, derece ve sitoloji) karşılaştırılmıştır. 57 tümör doku örneğinde hipermetilasyon oranları; *E-kaderin* için % 53, *p16* için % 56, *p14* için % 42 ve *RASSF1A* için % 74 olarak belirlenirken, 57 idrar örneğinde hipermetilasyon oranları; *E-kaderin* için % 35, *p16* için % 35, *p14* için % 33 ve *RASSF1A* için % 65 olarak saptanmıştır. Mesane tümör dokularındaki *p14* hipermetilasyonu, düşük dereceli tümörler arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur. Ancak, *E-kaderin*, *p16* ve *RASSF1A* genlerinin hipermetilasyonu ile klinikopatolojik parametreler arasında anlamlı bir ilişki belirlenmemiştir.

Eissa ve arkadaşlarının (2011) yaptığı çalışmada, 210 mesane kanseri, 61 benign ürolojik rahatsızlığı olan hastanın ve 49 sağlıklı gönüllünün idrar örneklerinde MSP yöntemi kullanılarak *RARβ2* ve *APC* genlerinin metilasyon durumları analiz edilmiştir. *RARβ2* ve *APC* genlerinin metilasyon oranları sağlıklı gönüllülerde % 0, benign ürolojik rahatsızlığı olan hastalarda sırasıyla % 16.4, % 5 ve mesane kanseri hastalarında sırasıyla % 62.8, % 59.5 olarak belirlenmiştir. *RARβ2* ve *APC* genlerinin metilasyonları ile klinikopatolojik veriler (yaş, cinsiyet, bilharziasis, sigara kullanımı, patolojik tip, histolojik derece, klinik evre) arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır, ancak her iki genin hipermetilasyonu tüm derece ve evrelerde tespit edilmiştir.

Lin ve arkadaşlarının (2011) yaptığı çalışmada, bir tümör baskılayıcı olarak işlev gören H-kaderin (*CDH13*), sıklıkla mesane TCC dahil insan kanserlerinde promoter metilasyonu tarafından susturulur. Mesane TCC hastalarında serum örneklerinde *CDH13* geninin promoter metilasyonunun klinik önemi araştırılmıştır. 127 primer mesane TCC hastadan ve 41 sağlıklı gönüllüden (kontrol) alınan serum örneklerinde *CDH13*'ün metilasyon durumu MSP ile çalışılmıştır. *CDH13* metilasyonu mesane TCC

olan 39 hastada % 30.7 oranında bulunmuştur, ancak kontrollerde tespit edilmemiştir. *CDH13*'ün metilasyon durumu ile klinikopatolojik veriler (yaş, cinsiyet, tümör sayısı, tümör boyutu, tümör şekli, tümör nüksü, tümör derecesi ve tümör evresi) karşılaştırılmıştır. *CDH13* metilasyonu önemli ölçüde ileri tümör evresi, yüksek dereceli tümör, büyük tümör boyutu, tümör nüksü ve kötü prognoz ile ilişkili bulunmuştur.

Eissa ve arkadaşlarının (2012) yaptığı çalışmada, mesane kanseri tanısı koyulan 100 hastanın (77 TCC ve 23 SCC), benign ürolojik rahatsızlığı olan 65 hastanın ve 51 sağlıklı gönüllünün idrar örneklerinde *RARβ2* geninin promoter metilasyonu MSP yöntemiyle analiz edilmiştir. *RARβ2* geninin metilasyon durumu ile klinikopatolojik parametreler (sigara kullanımı, schistosomiasis, patolojik tür, evre, derece ve idrar sitolojisi) karşılaştırılmıştır. *RARβ2* geninin promoter metilasyon oranları: 77 TCC doku örneğinde % 64.9, 23 SCC'de % 65.2, 65 benign ürolojik rahatsızlığı olanlarda % 85.7 ve 51 kontrolde % 73.2 olarak tespit edilmiştir. *RARβ2* geninin hipermetilasyonu önemli ölçüde yüksek tümör derecesi ile ilişkili bulunmuştur.

Klinikopatolojik parametrelerden olan patolojik tümör sınıflandırmasına (TNM) göre, bulgularımızda 13 tümör baskılayıcı gen pTa, pT1 ve pT2 gibi farklı evrelerde metilasyon göstermiştir. Ancak en çok metilasyon pT1 evresinde gözlenmiştir. pT1 evresindeki olgularda; en sık metillenen dört gene baktığımızda: *MSH6* için % 17.5, *WT1* için % 18.75, *RBI* için % 11.25 ve *CDH13* için % 10 metilasyon saptanırken, *MSH6* için % 27.5, *WT1* için % 26.25, *RBI* için % 33.75 ve *CDH13* için % 35 metilasyon belirlenmiştir. Verilerimizde, genlerin metilasyon durumuyla tümörün evresi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. *MSH6*, *WT1*, *RBI* ve *CDH13* genlerinin promoter metilasyonu ile tümör evresi arasında anlamlı bir ilişki olmamasına rağmen, diğer evrelere göre pT1 evresinde daha yüksek oranda metilasyon tespit edilmiştir.

Bu konuyla ilgili diğer çalışmalara baktığımızda, Catto ve arkadaşlarının (2005) yaptığı çalışmada, 116 mesane ve 164 üst üriner sistem tümöründen (UTT) oluşan toplam 280 hastadan elde edilen TCC dokuda, metilasyon-duyarlı polimeraz zincir reaksiyonu ve bisülfid sekanslaması kullanılarak 11 CpG adasının (*GSTP1*, *hMLH1*, *hMSH2*, *RARβ*, *DAPK*, *p16*, *p14*, *E-kaderin*, *MGMT*, *RASSF1A*, *MINT31*) hipermetilasyonu analiz edilmiştir ve hipermetilasyon tümörlerin klinikopatolojik

verileri, mikrosatellit istikrarsızlık durumu ve daha sonraki davranışları ile karşılaştırılmıştır. Mesane TCC dokularında; *GSTP1* için % 0, *hMLH1* için % 1, *hMSH2* için % 0, *RARβ* için % 24, *DAPK* için % 8, *p16* için % 9, *p14* için % 8, *E-kaderin* için % 60, *MGMT* için % 10, *RASSF1A* için % 54, *MINT31* için % 1 olarak belirlenmiştir. UTT TCC dokularında; *GSTP1* için % 0, *hMLH1* için % 12, *hMSH2* için % 0, *RARβ* için % 37, *DAPK* için % 5, *p16* için % 22, *p14* için % 12, *E-kaderin* için % 79, *MGMT* için % 8, *RASSF1A* için % 63, *MINT31* için % 15 olarak tespit edilmiştir. Metilasyon durumu, metilasyon gözlenmeyen tümörler ile karşılaştırıldığında ileri tümör evresi, yüksek tümör progresyonu ve yüksek mortalite oranları ile ilişkili bulunmuştur. *RARβ* CpG hipermetilasyonunun artan tümör evresiyle ilişkili olduğu belirlenmiştir.

Kunze ve arkadaşlarının (2006) yaptığı çalışmada, 14 yüzeysel düşük dereceli (grade 1), düşük evreli (pTa) papiller ve 11 kasa invaze nonpapiller (solid) yüksek dereceli (grade 3), yüksek evreli (pT2b) TCC'da *caveolin-1*, *hDAB2IP* ve *p53* tümör baskılayıcı genlerin promoter metilasyonu MSP yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir. Ek olarak 27 kasa invaze SCC ve 8 kasa invaze olmayan küçük hücreli karsinom (SCBC) çalışmaya dahil edilmiştir. 14 yüzeysel düşük dereceli (grade 1), düşük evreli (pTa) papiller TCC'de *caveolin-1* için metilasyon tespit edilememiştir ancak *hDAB2IP* için metilasyon frekansı % 50 olarak belirlenmiştir. *p53* geninin promoter metilasyonu düşük dereceli, düşük evreli TCC'de % 28.6 olarak tespit edilmiştir. 11 kasa invaze nonpapiller (solid) yüksek dereceli (grade 3), yüksek evreli (pT2b) TCC'da metilasyon oranları *caveolin-1* için % 0, *hDAB2IP* için % 72.7 ve *p53* için % 0 olarak belirlenmiştir. 27 kasa invaze SCC'da metilasyon oranları *caveolin-1* için % 25.9, *hDAB2IP* için % 48.1 ve *p53* için % 7.4 olarak ve 8 kasa invaze olmayan SCBC'da metilasyon oranları *caveolin-1* için % 50, *hDAB2IP* için % 50 ve *p53* için % 25 olarak tespit edilmiştir.

Marsit ve arkadaşlarının (2006) yaptığı çalışmada, mesane kanseri tanısı konmuş yaşları 25-74 aralığında olan hastalardan alınan toplamda 351 tümör dokusunda MSP yöntemi kullanılarak *p16INK4A*, *RASSF1A* ve *PRSS3* genlerinin metilasyon durumları tespit edilmiştir ve aynı zamanda mesane kanseri hastalarında hem sigara hem de arsenik maruziyetiyle *p16INK4A*, *RASSF1A* ve *PRSS3* genleri arasındaki ilişki araştırılmıştır. *p16INK4A*'nın promotör hipermetilasyon oranı % 30.8 (108/351), *RASSF1A* için % 32.2 (113/351) ve *PRSS3* için % 33 (116/351) olarak belirlenmiştir.

p16INK4A, *RASSF1A* ve *PRSS3* genlerinin metilasyon durumları ile klinikopatolojik özellikler (yaş, cinsiyet, histoloji, tümör evresi gibi) karşılaştırılmış ve *p16INK4A* promotör metilasyonunun, tümör evresiyle istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkisi bulunmamasına rağmen, sıklıkla invaziv evre tümörlerde ortaya çıkma eğiliminde olduğu belirtilmiştir.

Neuhausen ve arkadaşlarının (2006) yaptığı çalışmada, 96 mesane karsinom dokusunda MSP ile 6 genin (*SFRP1*, *APC*, *RASSF1A*, *DAPK1*, *RARβ* ve *p16INK4A* (*CDKN2A*)) hipermetilasyonu ve Southern blot ile *LINE-1* hipometilasyonu analiz edilmiştir. Hipermetilasyon sıklıkları: *SFRP1* için % 55 (53/96), *APC* için % 45 (43/96), *RASSF1A* için % 35 (34/96), *DAPK1* için % 29 (28/96), *RARβ* için % 19 (18/96) ve *p16INK4A* (*CDKN2A*) için % 2 (2/96) olarak belirlenmiştir. *LINE-1* hipometilasyonu, hipermetilasyondan büyük ölçüde bağımsız ve % 90 olarak tespit edilmiştir. Hipermetilasyon, özellikle invaziv kanserlere geçiş de tümör evresi ile artmıştır ve *RARβ* hipermetilasyonu önemli ölçüde tümör evresi ve lenf nodu tutulumu ile ilişkili bulunmuştur.

Malekzadeh ve arkadaşlarının (2009) yaptığı çalışmada, MSP ve yarı kantitatif ters transkriptaz-PCR (SQR-PCR) yöntemleri kullanılarak 103 mesane tümör dokusunda ve 48 kontrol parafine gömülü dokuda tümörle ilişkili olan *Casp8* ve *RBI* genlerinin metilasyon durumu ve bu durumun ekspresyonlar üzerinde etkisi belirlenmeye çalışılmıştır. *Casp8* için % 19.4 ve *RBI* için % 28.2 oranında mesane kanserinde metilasyon tespit edilmiştir. *RBI* ve *Casp8* genlerinin metilasyonu hastalar ve sağlıklı kontroller arasında önemli ölçüde farklılıklar göstermiştir. *RBI* metilasyonuna 60 yaş altı ve 60 yaş üstü hastalarda gözlenirken, *Casp8* metilasyonu sıklıkla 60 yaş üstü hastalarda belirlenmiştir. pT2 ve pT3 evrelerindeki mesane kanseri olan hastalarda *RBI* ve *Casp8* genlerinin metilasyonunda artış gözlenmiştir. *RBI* metilasyonu, mesane kanserinin ilerlemesi ve gelişimi için prognoz göstergesi olarak kabul edilmektedir.

Serizawa ve arkadaşlarının (2011) yaptığı çalışmada, 118 (116 TCC, 1 adenokarsinom ve 1 SCBC) mesane kanseri olan hastadan alınan 105 tümör biyopsisinde ve 113 idrar örneğinde sistematik olarak mutasyonlar için *FGFR3*, *PIK3CA*, *TP53*, *HRAS*, *NRAS* ve *KRAS* genleri taranmıştır ve gerçek-zamanlı PCR yöntemi olan, bir kantitatif floresan bazlı MethyLight yöntemi kullanılarak 11 genin

(*APC*, *p14ARF*, *DBC1*, *p16INK4A (CDKN2A)*, *RAR β* , *RASSF1A*, *SFRP1*, *SFRP2*, *SFRP4*, *SFRP5* ve *WIF1*) metilasyon durumları değerlendirilmiştir. Metilasyon frekansları; *ARF* için % 0, *p16INK4A (CDKN2A)* ve *WIF1* için % 1 olarak ve diğer genlerin metilasyon oranları *APC* için % 77, *DBC1* için % 38, *RAR β* için % 57, *RASSF1A* için % 58, *SFRP1* için % 41, *SFRP2* için % 58, *SFRP4* için % 50 ve *SFRP5* için % 62 olarak tespit edilmiştir. *APC*, *p14ARF*, *DBC1*, *p16INK4A (CDKN2A)*, *RAR β* , *RASSF1A*, *SFRP1*, *SFRP2*, *SFRP4*, *SFRP5* ve *WIF1* metilasyon durumları ile klinikopatolojik parametreler (evre, derece, tümör boyutu, tümör sayısı, sigara kullanımı ve sitoloji) karşılaştırılmıştır. *RASSF1A*, *SFRP1* ve *RAR β* genlerinin hipermetilasyonu yüksek evre ile ve *RASSF1A*, *SFRP5* and *RAR β* genlerinin hipermetilasyonu yüksek derece ile ilişkili bulunmuştur.

Lin ve arkadaşlarının (2012) yaptığı çalışmada, MSP kullanılarak 133 primer mesane TCC örneğinde ve 43 normal mesane epitel dokularında H-kaderin'in (*CDH13*) metilasyon durumu incelenmiştir ve daha sonra H-kaderin'in metilasyon durumu ile hastaların klinikopatolojik özellikleri (yaş, cinsiyet, tümör sayısı, tümör boyutu, tümör şekli, tümör nüksü, derece, evre ve sigara kullanma durumu) arasındaki ilişki analiz edilmiştir. H-kaderin'in metilasyonu mesane TCC örneklerinin 47'sinde % 35.3 oranında tespit edilirken, kontrollerde % 0 olarak belirlenmiştir. H-kaderin metilasyonu önemli ölçüde ileri evre, yüksek derece, tümör boyutu büyüklüğü, tümör nüksü ve kötü prognoz ile ilişkili bulunmuştur.

Son olarak bir diğer klinikopatolojik parametre olan *kas invazyonuna* göre, ÜK olgularında 13 tümör baskılayıcı gende kasa invazyonu değerlendirdiğimizde en fazla metilasyon kasa invaze olan olgularda gözlenmiştir. Kasa invazyon varlığında; en sık metillenen dört gene baktığımızda: *MSH6* için % 18.75, *WT1* için % 20, *RBI* için % 18.75 ve *CDH13* için % 16.25 olarak metilasyon tespit edilirken, *MSH6* için % 42.25, *WT1* için % 41.25, *RBI* için % 42.5 ve *CDH13* için % 45 olarak metilasyon saptanmamıştır. *MSH6*, *WT1*, *RBI* ve *CDH13* genlerinin promoter metilasyonu ile kas invazyonu arasında anlamlı bir ilişki olmamasına rağmen, kas invazyonu varlığında daha yüksek oranda metilasyon belirlenmiştir.

Yapılan diğer çalışmalara göz attığımızda, Chan ve arkadaşlarının (2002) yaptığı çalışmada, 98 TCC (transizyonel hücreli karsinom) ve 4 karsinoma in situ olgusunda 7

genin metilasyon durumu (*RARβ*, *DAPK*, *E-kaderin*, *p16*, *p15*, *GSTP1* ve *MGMT*) MSP yöntemiyle analiz edilmiştir. Ayrıca 22 TCC hastasının idrarı örneği de analiz edilmiştir. Transizyonel hücreli karsinomun tümör dokularında *p15* için % 13.3, *GSTP1* için % 5.1 ve *MGMT* için % 5.1 oranlarında anormal metilasyon yaygın değilken, *RARβ* için % 87.8, *DAPK* için % 58.2, *E-kaderin* için % 63.3 ve *p16* için % 26.5 oranlarında daha sık gözlenmiştir. Metilasyon durumu ile derecelendirme veya kasa invaze olma arasında bir ilişki görülmemiştir. 22 TCC hastasının idrar örneğinde metilasyon oranları; *DAPK* için % 45.5, *RARβ* için % 68.2, *E-kaderin* için % 59.1, *p16* için % 13.6 olarak belirlenmiştir. Karsinoma in situ dokularında metilasyon oranları; *RARβ* için % 50, *DAPK* için % 75 ve *E-kaderin* için % 50 oranlarında ve diğer genlerin metilasyon oranları % 0 olarak tespit edilmiştir. 7 normal ürotelyum örneğinde ve 17 normal idrar kontrollerinde *RARβ* dışındaki genlerde metilasyon gözlenmemiştir. *RARβ* metilasyonu 3 normal ürotelyum örneğinde % 42.9 oranında ve 4 normal idrar örneğinde % 23.5 olarak belirlenmiştir.

Dominguez ve arkadaşlarının (2003) yaptığı çalışmada, 100 meme, 95 kolon ve 27 mesane kanserinde MSP ile *p16INK4A* ve *p14ARF* genlerinin metilasyon durumları her tümör örneğinde ve normal dokuda eş zamanlı olarak analiz edilmiştir. *p14ARF*, üç tümör tipinin tümünde *p16INK4A*'dan daha yüksek oranda hipermetilasyon göstermiştir. Hipermetilasyon frekansları: 100 meme kanseri örneğinde, *p14ARF* için % 24, *p16INK4A* için % 19; 95 kolon kanseri örneğinde, *p14ARF* için % 33, *p16INK4A* için % 20; 27 mesane kanseri örneğinde, *p14ARF* için % 56, *p16INK4A* için % 18 olarak belirlenmiştir. *p16INK4A* ve *p14ARF*'nin anormal metilasyonu önemli ölçüde üç tümör tipinin kötü prognozu klinikopatolojik parametrelerle korelasyonlu olduğu tespit edilmiştir. Mesane kanserlerindeki *p16INK4A* ve *p14ARF* genlerinin metilasyon durumları ile klinikopatolojik parametreler karşılaştırıldığında, *p16INK4A* promotör hipermetilasyonu önemli ölçüde pozitif nodlar, kas invazyonu, tedavi, tümörlerin nüksü ve evre ile ilişkili bulunmuştur. *p16INK4A* ve *p14ARF*'nin hipermetilasyonunun hem meme, kolon ve mesane karsinogenezinde rol oynadığı hem de bu iki genin anormal metilasyonunun tümörlerin kötü prognozu ile ilişkili olduğu bulunmuştur.

Jarmalaite ve arkadaşlarının (2008) yaptığı çalışmada, *p16*, *RARβ*, *RASSF1A*, *DAPK* ve *MGMT* genlerinin promotör hipermetilasyonu MSP kullanılarak yüzeysel mesane kanseri olan 58 ve benign ürolojik rahatsızlığı bulunan 2 hastada analiz edilmiştir. 58

mesane kanserinin mevcut serisinde hipermetilasyon prevalansı *RARβ* için % 40, *RASSF1A* için % 29, *DAPK* için % 28, *p16* için % 14 ve *MGMT* için % 7 olarak belirlenmiştir. *p16*, *RARβ*, *RASSF1A*, *DAPK* ve *MGMT* genlerinin hipermetilasyon sıklığı klinikopatolojik verilerle (evre, derece, kasa invazivlik ve takip sırasında nüks) karşılaştırılmıştır. Hipermetilasyon sıklığı ve genlerin sayısı tümör evresi, derecesi ve kasa invazivlik ile artış gösterdiği belirtilmiştir. *RASSF1A* geninin anormal metilasyonu kasa invaze tümörlerde ve *RARβ* geninin anormal metilasyonu yüksek dereceli tümörlerde baskın olarak gözlenmiştir. *RARβ* geninin anormal metilasyonu tümör derecesiyle ilişkili olduğu bulunmuştur.

Lin ve arkadaşlarının (2012) yaptığı çalışmada, mesane tümörü ve patolojik olarak normal ürotelyumla eşleştirilmiş doku örnekleri 50 mesane kanseri hastasından elde edilmiştir. *E-kaderin*, *p16*, *p14* ve *RASSF1A* genlerinin promoter metilasyonları MSP ile araştırılmıştır. Bu hastaların klinikopatolojik verileri de mesane kanseri nüksünde anormal metilasyonun klinik duruma etkisini değerlendirmek için analiz edilmiştir. Patolojik olarak normal ürotelyum örneklerinde *E-kaderin* hipermetilasyonu % 30, *p16*'nın % 16, *p14*'ün % 14 ve *RASSF1A*'nın % 36 olarak belirlenmiştir. Mesane tümörü örneklerinde ise hipermetilasyon frekansları; *E-kaderin* için % 48, *p16* için % 64, *p14* için % 36 ve *RASSF1A* için % 62 olarak tespit edilmiştir. Promoter hipermetilasyonu patolojik olarak hem normal ürotelyumda hem de mesane kanseri hastalarının tümör örneklerinde sık görülmektedir. *p14* hariç herhangi bir gendeki hipermetilasyon ile kas/organ invazyonu ve evre/derece arasında anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir.

DNA metilasyonu aracılığı ile gen ekspresyonunun baskılanması, karsinogenezin tüm evrelerinde gözlemlenebilen önemli bir değişimdir. Birçok genin ilk ekzonuna yerleşik CpG'den zengin bölgelerin metilasyonu, bu bölgeye metil-CpG'ye bağlanan proteinlerle birlikte histon deasetilazlar, metiltransferazlar ve ATP-bağımlı kromatin-remodeling enzimler gibi transkripsiyonal sessizleşme ile ilişkili proteinlerin toplanmasına neden olur (Abbosh 2008). Önemli tümör baskılayıcı proteinleri, ilaç metabolize edici enzimleri ve DNA tamir proteinleri gibi önemli anahtar proteinleri kodlayan genlerin transkripsiyonal sessizleşmesi karsinogenez sürecinde, invazivlik ve metastatik yeteneğin kazanılmasında, anjiogenezde ve tedavi direncinin oluşmasında önemli rol oynamaktadır. Bu nedenle, birçok çalışmada DNA metilasyonu hem

biyomarker olma hem de tedavi stratejilerinin belirlenmesinde önemli bir hedef olarak yer almaktadır. Özellikle klinik örneklerle yapılan çalışmalar, kanserin patofizyolojisinin aydınlatılmasında çok daha yararlı ve yeni bilgilerin elde edilmesine yardımcı olmaktadır (Abbosh 2008, Rodriguez-Paredes ve Esteller 2011, Taberlay ve Jones 2011). DNA metilasyon tespiti, malign ve malign olmayan hastalıklar arasındaki ayrımı yapmada da önemli bir marker olarak tanımlanmaktadır (Hellwinkel vd 2008).

Yaptığımız çalışmada saptadığımız *TP53*, *PTEN*, *PAX5*, *CDH13*, *TP73*, *WT1*, *ESR*, *RBI*, *MSH6*, *CADMI*, *GATA5*, *RARβ* ve *CD44* olmak üzere toplam 13 tümör baskılayıcı genin promoter metilasyonları arasında yüksek oranlarda metillenen *CDH13*, *WT1*, *RBI* ve *MSH6* genlerinin metilasyon durumları ile klinikopatolojik parametreleri karşılaştırdığımızda, genel olarak çalıştığımız olguların % 75'i metile, % 25'i unmetile profile sahipken alt grupların sayısal değerlerinin az olmasından dolayı metilasyon ile klinikopatolojik parametreler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Doğru, anlamlı istatistiksel bir sonuç elde etmek için böyle çalışmalarda incelenen vaka sayısını artırmak gereklidir.

Yukarıdaki literatür taramasındaki sonuçları da dikkate aldığımızda hem çalışılan olguların hem de yöntemlerin farklı olması nedeni ile bizim sunduğumuz çalışmada dahil olmak üzere mesane kanserlerinin tanı, tedavi ve prognozda kullanılabilecek net bir biyobelirteç önerilememektedir. Dolayısıyla multi disiplinler çalışmaların planlandığı fazla örnek sayılı araştırmalara ihtiyaç duyulduğu vurgulanmaktadır.

6. SONUÇ

Kanser gelişiminde ve ilerlemesinde epigenetik mekanizmalar önemlidir. CpG adalarının hipermetilasyonu, tümör baskılayıcı genlerin transkripsiyonel sessizleşmesinde kritik rol oynar. DNA metilasyonu insan kanserlerinde en çok çalışılan epigenetik mekanizmadır. Tümörle ilişkili genlerin promoteründeki CpG adalarının DNA hipermetilasyonu ve bunların sonucu susturulması kanserlerde yaygın görülen epigenetik bir anormalliktir.

Kanserle ilişkili genlerin anormal promoter metilasyonunun belirlenmesi, kanserin tanısı, prognozu veya tümörlerin metastatik potansiyelinin tespiti için gerekli olabilir. Kanser gelişiminde, özellikle tümör baskılayıcı genlerin metilasyonunun erken evrede gözlenmesi, hipermetilasyonun kanserin erken tanısı için önemli bir marker olduğunu gösterebilir.

Bu amaçla gerçekleştirilen araştırmanın sonuçları aşağıda özetlenmiştir.

Yaptığımız çalışmada, Ürotelyal karsinom tanısı almış 80 mesane kanseri dokusuna ait parafin blok örnekleri ile 25 tümör baskılayıcı genin metilasyon durumu Metilasyon spesifik-Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MS-MLPA) yöntemi ile değerlendirilmiştir. Tüm olgularımızda, % 75 (60/80) oranında metilasyon, % 25 (20/80) oranında unmetilasyon saptanmıştır. Mesane kanseri doku örneklerinde en sık metillenen genlerin *MSH6*, *WT1*, *RBI* ve *CDH13* olduğu belirlenmiştir. Ürotelyal karsinomlarda en sık metillenen genlerin yüzdeleri; *MSH6* (% 36.25), *WT1* (% 33.75), *RBI* (% 27.5) ve *CDH13* (% 21.25) olarak tespit edilmiştir. Diğer tümör baskılayıcı genlerin metilasyonları; *BRCA1* (% 0), *BRCA2* (% 0), *ATM* (% 0), *TP53* (% 7.5), *PTEN* (% 1.25), *MGMT* (% 0), *PAX5* (% 3.75), *TP73* (% 6.25), *VHL* (% 0), *GSTP1* (% 0), *CHFR* (% 0), *ESR1* (% 1.25), *THBS1* (% 0), *CADM1* (% 2.5), *STK11* (% 0), *PYCARD*

(% 0), *PAX6* (% 0), *CDKN2A* (% 0), *GATA5* (% 2.5), *RAR β* (% 3.75) ve *CD44* (% 2.5) olarak belirlenmiştir.

* Ürotelyal karsinom tanısı almış 80 olgunun % 87.5'inin 50 yaş üzerinde olduğu ve bunların % 65'inde metilasyon saptanırken, % 22.5'inde metilasyon gözlenmemiştir.

* Olguların % 87.5'inin erkek olduğu ve bunların % 67.5'i metile profile sahipken, % 20'sinin unmetile olduğu saptanmıştır.

* Olguların TNM sınıflandırılmasına göre, % 45 oranında pT1 evresinde olduğu ve bunların % 35'inin metile, % 10'unun unmetile olduğu belirlenmiştir.

* Tüm olgularda lenf nodu metastazına ve uzak bölgelere metastaz saptanmamıştır.

* Histolojik tümörün derecesine göre, olguların en yüksek oranda % 62.5'inin yüksek dereceli papiller ürotelyal karsinom olduğu ve bunların % 47.5'i metile profile sahipken, % 15'inin unmetile profile sahip olduğu tespit edilmiştir.

* Histolojik tümörün kas invazyonuna göre, olguların % 61.25'inde kas invazyonunun olduğu ve bunların % 45'inin metile, % 16.25'inin unmetile olduğu saptanmıştır.

* Ürotelyal karsinom tanısı almış 80 olguda tümör baskılayıcı genlerin metilasyon yüzdeleri yüksek oranlarda gözlenmesine rağmen, metilasyon ile klinikopatolojik parametreler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki belirlenememiştir.

* ÜK'lu 80 olguda 25 tümör baskılayıcı genden 13'ünde (*TP53*, *PTEN*, *PAX5*, *CDH13*, *TP73*, *WT*, *ESR1*, *RBI*, *MSH6*, *CADMI*, *GATA5*, *RAR β* ve *CD44*) hipermetilasyon gözlenmiştir. 13 tümör baskılayıcı genden sadece dört tanesi (*MSH6*, *WT1*, *RBI*, ve *CDH13*) diğerlerine göre daha yüksek oranlarda metilasyon sergilemiştir. *MSH6*, *WT1*, *RBI* ve *CDH13* genlerinin promoter metilasyon durumları ile klinikopatolojik parametreler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.

* MS-MLPA analizi, birçok genin aynı anda metilasyon profilini inceleyebilen, etkin, kolay ve hızlı bir yöntemdir.

Sonuç olarak; mesane kanserinin patogenezinde, tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen DNA metilasyon profillerindeki değişimler önemli rol oynamaktadır ve MS-MLPA yöntemi, tek bir reaksiyonda birden fazla hedef tümör baskılayıcı gende meydana gelen DNA metilasyon profillerindeki değişimleri başarılı bir biçimde analiz etmemize olanak sağlamıştır.

7. KAYNAKLAR

- Abosh, P. H., Wang, M., Eble, J. N., Lopez-Beltran, A., MacLennan, G. T., Montironi, R., Zheng, S., Pan, C. X., Zhou, H. and Cheng, L. (2008) Hypermethylation of tumor-suppressor gene CpG islands in small-cell carcinoma of the urinary bladder. *Modern Pathology*, 21(3): 355-62.
- Agundez, M., Grau, L., Palou, J., Algaba, F., Villavicencio, H., and Sanchez-Carbayo, M. (2011) Evaluation of the methylation status of tumour suppressor genes for predicting bacillus Calmette-Guerin response in patients with T1G3 high-risk bladder tumours. *European Urology*, 60(1): 131-40.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2002) Molecular Biology of the Cell, 4. baskı, 4. kısım. *Garland Science*, New York, s. 215.
- Altunoluk, B., Efe, E., Şahinkanat, T., Resim, S., ve Taşçı, A. İ. (2011) Kliniğimizdeki mesane tümürlü hastaların geriye dönük analizi. *Yeni Üroloji Dergisi*, 6(2) 22-5.
- Amin, M. B. (2009) Histological variants of urothelial carcinoma: diagnostic, therapeutic and prognostic implications. *Modern Pathology*, 22(2): 96-118.
- Aslan, G. ve Mammadov, E. (2010) Mesane kanserinde yaş ve cinsiyetin klinik-patolojik sonuçlar üzerindeki belirleyici rolü. *Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 24(3): 119-23.
- Bachir, B. G., and Kassouf, W. (2012) Cause-effect? Understanding the risk factors associated with bladder cancer. *Expert Rev. Anticancer Ther.*, 12(12): 1499-502.
- Bedük, Y. (2007) Mesane tümörleri, Editörler; Anafarta, K., Göğüş, O., Bedük, Y., ve Arıkan, N., Temel üroloji, *Güneş Kitapevi*, Ankara, s. 707-26.
- Berrada, N., Amzazi, S., Ameziane El Hassani, R., Benbacer, L., El Mzibri, M., Khyatti, M., Chafiki, J., Abbar, M., Al Bouzidi, A., Ameer, A., and Attaleb, M. (2012) Epigenetic alterations of adenomatous polyposis coli (APC), retinoic acid receptor beta (RAR β) and survivin genes in tumor tissues and voided urine of bladder cancer patients. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 58: OL1744-5
- Bodur, E., ve Demirpençe, E. (2010) Kodlamayan RNA'lar ve gen susturumu. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 41: 82-9.

- Bogdanovic, O., and Veenstra, G. J. (2009) DNA methylation and methyl-CpG binding proteins: developmental requirements and function. *Chromosoma*, 118(5): 549–65.
- Bora, G., ve Erdem-Yurter, H. (2007) Epigenetik Hastalıklar ve Tedavi Yaklaşımları. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 38: 48-54.
- Bostwick, G.D., and Cheng, L. (2008) Urologic Surgical Pathology 2 nd Ed. Chapter 6, *Mosby Elsevier*, China. s. 274-75.
- Brait, M., Munari, E., LeBron, C., Noordhuis, M. G., Begum, S., Michailidi, C., Gonzalez- Roibon, N., Maldonado, L., Sen, T., Guerrero-Preston, R., Cope, L., Parrella, P., Fazio, V. M., Ha, P. K., Netto, G. J., Sidransky, D., and Hoque, M. O. (2013) Genome-wide methylation profiling and the PI3K-AKT pathway analysis associated with smoking in urothelial cell carcinoma. *Cell Cycle*, 12(7): 1058-70.
- Buscarini, M., Quek, M. L., Gill, P., Xia, G., Quinn, D. I., and Stein, J. P. (2005) Molecular prognostic factors in bladder cancer. *BJU International*, 95(6): 739-42.
- Cabello, M. J., Grau, L., Franco, N., Orenes, E., Alvarez, M., Blanca, A., Heredero, O., Palacios, A., Urrutia, M., Fernandez, J. M., Lopez-Beltran, A., and Sanchez-Carbayo, M. (2011) Multiplexed methylation profiles of tumor suppressor genes in bladder cancer. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 13(1): 29-40.
- Catto, J. W., Azzouzi, A. R., Rehman, I., Feeley, K. M., Cross, S. S., Amira, N., Fromont, G., Sibony, M., Cussenot, O., Meuth, M., and Hamdy, F. C. (2005) Promoter hypermethylation is associated with tumor location, stage, and subsequent progression in transitional cell carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*, 23(13): 2903-10.
- Chan, M. W., Chan, L. W., Tang, N. L., Tong, J. H., Lo, K. W., Lee, T. L., Cheung, H. Y., Wong, W. S., Chan, P. S., Lai, F. M., and To, K. F. (2002) Hypermethylation of multiple genes in tumor tissues and voided urine in urinary bladder cancer patients. *Clinical Cancer Research*, 8(2): 464-70.
- Chang, L. L., Yeh, W. T., Yang, S. Y., Wu, W.J., and Huang, C. H. (2003) Genetic alterations of p16INK4a and p14ARF genes in human bladder cancer. *The Journal of Urology*, 170(2 Pt 1): 595-600.
- Chapman, E. J., Harnden, P., Chambers, P., Johnston, C., and Knowles, M. A. (2005) Comprehensive analysis of CDKN2A status in microdissected urothelial cell carcinoma reveals potential haploinsufficiency, a high frequency of homozygous co-deletion and associations with clinical phenotype. *Clinical Cancer Research*, 11(16): 5740-7.
- Chen, P. C., Tsai, M. H., Yip, S. K., Jou, Y. C., Ng, C. F., Chen, Y., Wang, X., Huang, W., Tung, C. L., Chen, G. C., Huang, M. M., Tong, J. H., Song, E. J., Chang, D. C., Hsu, C. D., To, K. F., Shen, C. H., and Chan, M. W. (2011) Distinct DNA methylation epigenotypes in bladder cancer from different Chinese sub-populations and its implication in cancer detection using voided urine. *BMC Med Genomics*, 4: 45.

- Cheng, L., Montironi, R., Davidson, D. D., and Lopez-Beltran, A. (2009) Staging and reporting of urothelial carcinoma of the urinary bladder. *Modern Pathology*, 22(2): 70-95.
- Christoph, F., Hinz, S., Kempkensteffen, C., Weikert, S., Krause, H., Schostak, M., Schrader, M., and Miller, K. (2007) A gene expression profile of tumor suppressor genes commonly methylated in bladder cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.*, 133(6): 343-49.
- Chung, W., Bondaruk, J., Jelinek, J., Lotan, Y., Liang, S., Czerniak, B., and Issa, J. P. (2011) Detection of bladder cancer using novel DNA methylation biomarkers in urine sediments. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, 20(7): 1483-91.
- Chung, W. B., Hong, S. H., Kim, J. A., Sohn, Y. K., Kim, B. W., and Kim, J. W. (2001) Hypermethylation of tumor-related genes in genitourinary cancer cell lines. *J Korean Med Sci.*, 16(6): 756-61.
- Cooper, G. M., and Hausman, R. E. (2006) Hücre: Moleküler Yaklaşım, Çev. Edi.: Sakızlı, M., Atabey, N., *İzmir Tıp Kitabevi*, İzmir, s. 631-5, 657-64.
- Dhawan, D., Hamdy, F. C., Rehman, I., Patterson, J., Cross, S. S., Feeley, K. M., Stephenson, Y., Meuth, M., and Catto, J. W. (2006) Evidence for the early onset of aberrant promoter methylation in urothelial carcinoma. *Journal of Pathology*, 209(3): 336-43.
- Dominguez, G., Carballido, J., Silva, J., Silva, J. M., Garcia, J. M., Menendez, J., Provencio, M., Espana, P., and Bonilla, F. (2002) p14ARF promoter hypermethylation in plasma DNA as an indicator of disease recurrence in bladder cancer patients. *Clinical Cancer Research*, 8(4): 980-5.
- Dominguez, G., Silva, J., Garcia, J. M., Silva, J. M., Rodriguez, R., Munoz, C., Chacon, I., Sanchez, R., Carballido, J., Colas, A., Espana, P., and Bonilla, F. (2003) Prevalence of aberrant methylation of p14ARF over p16INK4a in some human primary tumors. *Mutat Res.* 530(1-2): 9-17.
- Dudzic, E., Goepel, J. R., and Catto, J. W. (2011) Global epigenetic profiling in bladder cancer. *Epigenomics*, 3(1): 35-45.
- Dulaimi, E., Uzzo, R. G., Greenberg, R. E., Al-Saleem, T., and Cairns, P. (2004) Detection of bladder cancer in urine by a tumor suppressor gene hypermethylation panel. *Clinical Cancer Research*, 10(6): 1887-93.
- Eble, J. N., Sauter, G., Epstein, J. I., and Sesterhenn I. A. (2004) World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics. Tumours of the urinary system and male genital organs. Tumors of the urinary system. *IARC Press*, Lyon, France, s. 89-157.
- Eissa, S., Swellam, M., El-Khouly, I. M., Kassim, S. K., Shehata, H., Mansour, A., Esmat, M., Nossier, A. I., Hamdy, M. A., Awad, N. M., and El-Ahmady, O. (2011) Aberrant methylation of RARbeta2 and APC genes in voided urine as molecular

- markers for early detection of bilharzial and nonbilharzial bladder cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention*, 20(8): 1657-64.
- Eissa, S., Zohny, S. F., Shehata, H. H., Hegazy, M. G., Salem, A. M., and Esmat, M. (2012) Urinary retinoic acid receptor- β 2 gene promoter methylation and hyaluronidase activity as noninvasive tests for diagnosis of bladder cancer. *Clin Biochem.*, 45(6): 402-7.
- Ellinger, J., El Kassem, N., Heukamp, L. C., Matthews, S., Cubukluoz, F., Kahl, P., Perabo, F. G., Müller, S. C., von Ruecker, A., and Bastian, P. J. (2008) Hypermethylation of cell-free serum DNA indicates worse outcome in patients with bladder cancer. *The Journal of Urology*, 179(1): 346-52.
- Enokida, H., and Nakagawa, M. (2008) Epigenetics in bladder cancer. *Int J Clin Oncol.*, 13: 298-307.
- Erol, D., Elyas, Z., ve Ünal, S. (2010) Psikiyatrik Hastalıkların Gelişiminde Epigenetik Mekanizmalar. *Klinik Psikiyatrik Hastalıkların Gelişiminde Epigenetik Mekanizmalar. Klinik Psikiyatrik Hastalıkların Gelişiminde Epigenetik Mekanizmalar*, 20: 109-14.
- Espada J, and Esteller M. (2010) DNA methylation and the functional organization of the nuclear compartment. *Semin Cell Dev Biol.*, 21(2):238-46.
- Gao, T., Wang, S., He, B., Pan, Y., Song, G., Gu, L., Chen, L., Nie, Z., Xu, Y., and Li, R. (2012) The association of RAS association domain family Protein1A (RASSF1A) methylation states and bladder cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*, 7(11): e48300.
- Gutierrez, M. I., Siraj, A. K., Khaled, H., Koon, N., El-Rifai, W., and Bhatia, K. (2004) CpG island methylation in Schistosoma- and non-Schistosoma-associated bladder cancer. *Modern Pathology*, 17(10): 1268-74.
- Hamilton, J. P. (2011) Epigenetics: Principles and Practice. *Digestive Diseases*, 29(2): 130-5.
- Hellwinkel, O. J., Kedia, M., Isbarn, H., Budaus, L., and Friedrich, M. G. (2008) Methylation of the TPEF- and PAX6-promoters is increased in early bladder cancer and in normal mucosa adjacent to pTa tumours. *BJU International*, 101(6): 753-7.
- Hoffman, A. M., and Cairns, P. (2011) The Epigenetics of kidney cancer and bladder cancer. *Epigenomics*, 3(1): 19-34.
- Hoque, M. O., Begum, S., Topaloglu, O., Chatterjee, A., Rosenbaum, E., Van Criekinge, W., Westra, W. H., Schoenberg, M., Zahurak, M., Goodman, S. N., and Sidransky, D. (2006) Quantitation of promoter methylation of multiple genes in urine DNA and bladder cancer detection. *Journal of National Cancer Institute*, 98(14): 996-1004.
- Jablonowski, Z., Reszka, E., Gromadzinska, J., Wąsowicz, W., and Sosnowski, M. (2011) Hypermethylation of p16 and DAPK promoter gene regions in patients with non-invasive urinary bladder cancer. *Arch Med Sci.*, 7(3): 512-6.

- Jankovic, S., and Radosavljevic, V. (2007) Risk factors for bladder cancer. *Tumori*, 93(1): 4-12.
- Jarmalaite, S., Andrekute, R., Scesnaite, A., Suziedelis, K., Husgafvel-Pursiainen K., and Jankevicius, F. (2010) Promoter hypermethylation in tumour suppressor genes and response to interleukin-2 treatment in bladder cancer: a pilot study. *J Cancer Res Clin Oncol.*, 136(6): 847-54.
- Jarmalaite, S., Jankevicius, F., Kurgonaite, K., Suziedelis, K., Mutanen, P., and Husgafvel-Pursiainen K. (2008) Promoter hypermethylation in tumour suppressor genes shows association with stage, grade and invasiveness of bladder cancer. *Oncology*, 75(3-4): 145-51.
- Jeronimo, C., and Henrique, R. (2011) Epigenetic biomarkers in urological tumors: A systematic review. *Cancer Letters*.
- Kawamoto, K., Enokida, H., Gotanda, T., Kubo, H., Nishiyama, K., Kawahara, M., and Nakagawa, M. (2006) p16INK4a and p14ARF methylation as a potential biomarker for human bladder cancer. *Biochemical Biophysical Research Communications*, 339(3): 790-6.
- Kaya, C., Koca, O., Keleş, M. O., Yılmaz, G., Öztürk, M., Kanberoğlu, H., ve Karaman, M. İ. (2009) 6 yıllık radikal sistektomi deneyimimiz. *Marmara Medical Journal*, 22(1): 1-7.
- Keleş, A., Gönül, İ. I., Fırat, U., ve Küçüköner, M. (2011) Mesanenin ürotelyal karsinomları üzerine epidemiyolojik bir çalışma. *Dicle Tıp Dergisi*, 38(3): 329-34.
- Khin, S. S., Kitazawa, R., Win, N., Aye, T. T., Mori, K., Kondo, T., and Kitazawa, S. (2009) BAMBI gene is epigenetically silenced in subset of high-grade bladder cancer. *International Journal of Cancer*, 125(2): 328-38.
- Kim, W. J., and Quan, C. (2005) Genetic and epigenetic aspects of bladder cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*, 95(1): 24-33.
- Korgalı, E., ve Gültekin, E. Y. (2010) Yüksek dereceli pTa mesane kanserleri ne kadar tehlikelidir? *Üroonkoloji Bülteni*, 1: 25-29.
- Kosova, B., Özel, R., ve Aktan, Ç. (2011) Prostat kanseri tanısında DNA metilasyonunun yeri var mı?. *Üroonkoloji Bülteni*, 2: 33-40.
- Kunze, E., Von Bonin, F., Werner, C., Wendt, M., and Schlott, T. (2006) Transitional cell carcinomas and nonurothelial carcinomas of the urinary bladder differ in the promoter methylation status of the caveolin-1, hDAB2IP and p53 genes, but not in the global methylation of Alu elements. *International Journal of Molecular Medicine*, 17(1): 3-13.
- Lin, H. H., Ke, H. L., Huang, S. P., Wu, W. J., Chen, Y. K., and Chang, L. L. (2010) Increase sensitivity in detecting superficial, low grade bladder cancer by

- combination analysis of hypermethylation of E-cadherin, p16, p14, RASSF1A genes in urine. *Urol Oncology*, 28(6): 597-602.
- Lin, H. H., Ke, H. L., Wu, W. J., Lee, Y. H., and Chang, L. L. (2012) Hypermethylation of E-cadherin, p16, p14, and RASSF1A genes in pathologically normal urothelium predict bladder recurrence of bladder cancer after transurethral resection. *Urol Oncology*, 30(2): 177-81.
- Lin, Y. L., Liu, X. Q., Li, W. P., Sun, G., and Zhang, C. T. (2012) Promoter methylation of H-cadherin is a potential biomarker in patients with bladder transitional cell carcinoma. *Int Urol Nephrol.*, 44(1): 111-7.
- Lin, Y. L., Li, Z. G., He, Z. K., Guan, T. Y., and Ma, J. G. (2012) Clinical and prognostic significance of protocadherin-10 (PCDH10) promoter methylation in bladder cancer. *The Journal of International Medical Research*, 40(6): 2117-23.
- Lin, Y. L., Sun, G., Liu, X. Q., Li, W. P., and Ma, J. G. (2011) Clinical significance of CDH13 promoter methylation in serum samples from patients with bladder transitional cell carcinoma. *The Journal of International Medical Research*, 39(1): 179-86.
- Lopez-Beltran, A., and Cheng, L. (2006) Histologic variants of urothelial carcinoma: differential diagnosis and clinical implications. *Human Pathology*, 37(11): 1371-88.
- Lopez-Beltran, A., Cheng, L., Mazzucchelli, R., Bianconi, M, Blanca, A., Scarpelli, M., and Montironi, R. (2008) Morphological and molecular profiles and pathways in bladder neoplasms. *Anticancer Research*, 28(5B): 2893-900.
- Majumdar, S., Buckles, E., Estrada, J., ve Koochekpour, S. (2011) Aberrant DNA Methylation and Prostate Cancer. *Current Genomics*, 12(7): 486–505.
- Malekzadeh, K., Sobti, R. C., Nikbakht, M., Shekari, M., Hosseini, S. A., Tamandani, D. K., and Singh, S. K. (2009) Methylation patterns of Rb1 and Casp-8 promoters and their impact on their expression in bladder cancer. *Cancer Investigation*, 27(1): 70-80.
- Marsit, C. J., Karagas, M. R., Danaee, H., Liu, M., Andrew, A., Schned, A., Nelson, H. H., and Kelsey, K. T. (2006) Carcinogen exposure and gene promoter hypermethylation in bladder cancer. *Carcinogenesis*, 27(1): 112-6.
- Marsit, C. J., Houseman, E. A., Schned, A. R., Karagas, M. R., and Kelsey, K. T. (2007) Promoter hypermethylation is associated with current smoking, age, gender and survival in bladder cancer. *Carcinogenesis*, 28(8): 1745-51.
- Maruyama, R., Toyooka, S., Toyooka, K. O., Harada, K., Virmani, A. K., Zöchbauer-Müller, S., Farinas, A. J., Vakar-Lopez, F., Minna, J. D., Sagalowsky, A., Czerniak, B., and Gazdar, A. F. (2001) Aberrant promoter methylation profile of bladder cancer and its relationship to clinicopathological features. *Cancer Research*, 61(24): 8659-63.

- Miyamoto, H., Brimo, F., Schultz, L., Ye, H., Miller, J. S., Fajardo, D. A., Lee, T. K., Epstein, J. I., and Netto, G. J. (2010) Low-grade papillary urothelial carcinoma of the urinary bladder: a clinicopathologic analysis of a post-World Health Organization/International Society of Urological Pathology classification cohort from a single academic center. *Arch Pathol Lab Med.*, 134(8): 1160-3.
- Montironi, R., and Lopez-Beltran, A. (2005) The 2004 WHO classification of bladder tumors: a summary and commentary. *International Journal of Surgical Pathology*, 13(2): 143-53.
- Montironi, R., Lopez-Beltran, A., Scarpelli, M., Mazzucchelli, R., and Cheng, L. (2008) Morphological classification and definition of benign preneoplastic and non-invasive neoplastic lesions of the urinary bladder. *Histopathology*, 53(6): 621-33.
- Negraes, P. D., Favaro, F. P., Camargo, J. L., Oliveira, M. L., Goldberg, J., Rainho, C. A., and Salvadori, D. M. (2008) DNA methylation patterns in bladder cancer and washing cell sediments: a perspective for tumor recurrence detection. *BMC Cancer*, 8: 238.
- Neşe, N. (2011) Mesanenin "Inverted" (Devrik) Papillomu. *Üroonkoloji Bülteni*, 1: 55-7.
- Neuhausen, A., Florl, A. R., Grimm, M. O., and Schulz, W. A. (2006) DNA methylation alterations in urothelial carcinoma. *Cancer Biology & Therapy*, 5(8): 993-1001.
- Nygren, A. O., Ameziane, N., Duarte, H. M., Vijzelaar, R. N., Waisfisz, Q., Hess, C. J., Schouten, J. P., and Errami, A. (2005) Methylation-specific MLPA (MS-MLPA): simultaneous detection of CpG methylation and copy number changes of up to 40 sequences. *Nucleic Acids Research*, 33(14): e128.
- Oğuztüzün, S., Kılıç, M., Atay, M., Güçlütürk, Ü., Öztürk, L., Yazıcı Gökbulut, Z., Özhavzalı, M., ve Yırtıcı, Ü. (2009) Üriner şikayeti olan hastalarda idrar sitopatolojisi ile mesane kanseri araştırılması. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 66(4): 169-176.
- Pavicic, W., Perkio, E., Kaur, S., and Peltomaki, P. (2011) Altered methylation at microRNA-associated CpG islands in hereditary and sporadic carcinomas: a methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification (MS-MLPA)-based approach. *Mol Med.*, 17(7-8): 726-35.
- Petraki, C. D., and Sfikas, C. P. (2008) Review. Non-papillary urothelial lesions of the urinary bladder: morphological classification and immunohistochemical markers. *In Vivo*, 22(4): 493-501.
- Phe, V., Cussenot, O., and Roupret, M. (2009) Interest of methylated genes as biomarkers in urothelial cell carcinomas of the urinary tract. *BJU International*, 104(7): 896-901.

- Prat, E., del Rey, J. D., Ponsa, I., Nadal, M., Camps, J., Plaja, A., Campillo, M., Algaba, F., Gelabert, A., and Miro, R. (2010) Comparative genomic hybridization analysis reveals new different subgroups in early-stage bladder tumors. *Urology*, 75(2): 347-55.
- Reuter, V. E. (2006) The pathology of bladder cancer. *Urology*, 67: 11-7.
- Rodriguez-Paredes, M., and Esteller, M. (2011) Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. *Nat Med.*, 17(3): 330-9.
- Salem C. E., Markl I. D., Bender C. M., Gonzales F. A., Jones P. A., and Liang G. (2000) PAX6 methylation and ectopic expression in human tumor cells. *International Journal of Cancer*, 87(2): 179-85.
- Sana, J., Faltejskova, P., Svoboda, M., and Slaby, O. (2012) Novel classes of non-coding RNAs and cancer. *Journal of Translational Medicine*, 10: 103.
- Sanchez-Carbayo M. (2012) Hypermethylation in bladder cancer: biological pathways and translational applications. *Tumor Biol.*, 33(2): 347-61.
- Sato, F., Tsuchiya, S., Meltzer, S. J., and Shimizu, K. (2011) MicroRNAs and epigenetics. *FEBS Journal*, 278(10): 1598-609.
- Serizawa, R. R., Ralfkiaer, U., Dahl, C., Lam, G. W., Hansen, A. B., Steven, K., Horn, T., and Guldberg, P. (2010) Custom-designed MLPA using multiple short synthetic probes: application to methylation analysis of five promoter CpG islands in tumor and urine specimens from patients with bladder cancer. *Journal of Molecular Diagnostics*, 12(4): 402-8.
- Serizawa, R. R., Ralfkiaer, U., Steven, K., Lam, G. W., Schmiedel S., Schüz J., Hansen, A. B., Horn, T., and Guldberg, P. (2011) Integrated genetic and epigenetic analysis of bladder cancer reveals an additive diagnostic value of FGFR3 mutations and hypermethylation events. *International Journal of Cancer*, 129(1): 78-87.
- Sertçelik, A. (2007) Alt Üriner Sistem Patolojisi, Temel Patoloji, Edi. Mocan, G., Özdamar, O. Ş., ve Zergeroğlu, S., *Güneş kitabevi*, Ankara, s. 604-614.
- Sexton, W. J., Wiegand, L. R., Correa, J. J., Politis, C., Dickinson, S. I., and Kang, L. C. (2010) Bladder cancer: a review of non-muscle invasive disease. *Cancer Control.*, 17(4): 256-68.
- Sharma, S., Kelly, T. K., and Jones, P. A. (2010) Epigenetics in cancer. *Carsinogenesis*, 31(1): 27-36.
- Siegel, R., Naishadham, D., and Jemal, A. (2012) Cancer Statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.*, 62: 10-29.
- Sternberg, S. S., Mills, S. E., Carter, D., Greenson, J. K., Reuter, V. E., and Stoler, M. H. (2004) Sternberg's Diagnostic Surgical Pathology, volum 2, 4. Baskı, Bölüm 14, Philadelphia, s. 2035-2066.

- Taberlay, P. C., and Jones, P. A. (2011) DNA methylation and cancer. *Prog Drug Res.*, 67: 1-23.
- Tada, Y., Wada, M., Taguchi, K., Mochida, Y., Kinugawa, N., Tsuneyoshi, M., Naito, S., and Kuwano, M. (2002) The association of death-associated protein kinase hypermethylation with early recurrence in superficial bladder cancers. *Cancer Research*, 62(14): 4048-53.
- Tanaka, T., Miyazawa, K., Tsukamoto, T., Kuno, T., and Suzuki, K. (2011) Pathobiology and Chemoprevention of Bladder Cancer. *Journal of Oncology*, 2011: 528353.
- Valenzuela, M. T., Galisteo, R., Zuluaga, A., Villalobos, M., Nunez, M. I., Oliver, F.J., and Ruiz de Almodovar, J. M. (2002) Assessing the use of p16 (INK4a) promoter gene methylation in serum for detection of bladder cancer. *European Urology*, 42(6): 622-8. discussion 628-30.
- Yates, D. R., Rehman, I., Abbod, M. F., Meuth, M., Cross, S. S., Linkens, D. A., Hamdy, F. C., and Catto, J. W. (2007) Promoter hypermethylation identifies progression risk in bladder cancer. *Clinical Cancer Research*, 13(7): 2046-53.
- Yörükoğlu, K. (2006) Mesane tümörü patolojisi. *Üroonkoloji Bülteni*, 3: 3-9.
- Yu, J., Zhu, T., Wang, Z., Zhang, H., Qian, Z., Xu, H., Gao, B., Wang, W., Gu, L., Meng, J., Wang, J., Feng, X., Li, Y., Yao, X., and Zhu, J. (2007) A novel set of DNA methylation markers in urine sediments for sensitive/specific detection of bladder cancer. *Clinical Cancer Research*, 13(24): 7296-304.
- Yurakh, A. O., Ramos D., Calabuig-Farinas, S., Lopez-Guerrero, J. A., Rubio, J., Solsona, E., Romanenko, A. M., Vozianov, A. F., Pellin, A., and Llombart-Bosch, A. (2006) Molecular and immunohistochemical analysis of the prognostic value of cell-cycle regulators in urothelial neoplasms of the bladder. *European Urology*, 50(3): 506-15.
- Zhong, X., Isharwal, S., Naples, J. M., Shiff, C., Veltri, R. W., Shao, C., Bosompem, K. M., Sidransky, D., and Hoque, M. O. (2013) Hypermethylation of genes detected in urine from Ghanaian adults with bladder pathology associated with *Schistosoma haematobium* infection. *PLoS One*, 8(3): e59089.
- Zuiverloon, T. C., Beukers, W., van der Keur, K. A., Munoz, J. R., Bangma, C. H., Lingsma, H. F., Eijkemans, M. J., Schouten, J. P., and Zwarthoff, E.C. (2012) A methylation assay for the detection of non-muscle-invasive bladder cancer (NMIBC) recurrences in voided urine. *BJU International*, 109(6): 941-8.
- WEB_1. (2013) T. C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu 2013. www.kanser.gov.tr/daire-faaliyetleri/kanser-istatistikleri.html
- WEB_2. (2013) MRC-Holland. www.mlpa.com

8. ÖZGEÇMİŞ

Sıddıka BOZTAŞ 1980 yılında Denizli’de doğdu. İlkokulu, ortaokulu ve liseyi Denizli’de okuduktan sonra, üniversiteyi 1997-2001 yılları arasında Pamukkale Üniversitesi Denizli Sağlık Yüksekokulu Hemşirelik Bölümü’nde, yine üniversiteyi 2001-2008 yılları arasında Pamukkale Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nde okudu. 2011 yılında Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimine başladı.