



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**UROTELYAL MESANE KANSERLİ HASTALARDA
E-KADERİN VE *P14* GENLERİNİN PROMOTOR
METİLASYON ANALİZİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bayram BAYRAMOV

Samsun

Ekim-2015



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**UROTELYAL MESANE KANSERLİ HASTALARDA
E-KADERİN VE *P14* GENLERİNİN PROMOTOR
METİLASYON ANALİZİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bayram BAYRAMOV

Danışmanlar

Doç. Dr. Sezgin GÜNEŞ

Yrd. Doç. Dr. M. Alper ARSLAN

Samsun

Ekim-2015

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Bayram BAYRAMOV tarafından Doç. Dr. Sezgin GÜNEŞ ve Yrd. Doç. Dr. M. Alper ARSLAN Danışmanlığında hazırlanan '**Urotelyal Mesane Kanserli Hastalarda E-kaderin ve p14 Genlerinin Promotor Metilasyon Analizi**' başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından 2/10/2015 tarihinde yapılan sınav ile Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Recep BÜYÜKALPELLİ, Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Üye: Doç. Dr. Sezgin GÜNEŞ, Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Üye: Yrd. Doç. Dr. Ertan ALTAYLI, Gülhane Askeri Tıp Akademisi

ONAY:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

2/10/2015

Doç. Dr. Aydın HİM
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim boyunca göstermiş olduğu büyük ilgi, alaka, destek ve bilimsel katkılarından dolayı değerli bölüm başkanım ve hocam Sayın Prof. Dr. Hasan BAĞCI'ya çok teşekkür ederim.

Eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini paylaşarak akademik kariyer temelimin oluşmasında ve Moleküler Genetik laboratuvarında çalışmama imkan sağlayarak deneyim kazanmamda emeği geçen, destek ve yardımlarını daima hissettiğim, yüksek lisans öğrencisi olmaktan onur duyduğum değerli hocam Doç. Dr. Sezgin GÜNEŞ'e çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi, tecrübe ve yardımlarını esirgemeyen ikinci danışman Hocam Yrd. Doç. Dr. M. Alper ARSLAN'a teşekkür ederim.

Hasta ve kontrol grubunun oluşturulmasında büyük emeği geçen Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Recep BÜYÜKALPELLİ'ye çok teşekkür ederim.

Rutin patoloji ve idrar sitoloji sonuçlarının teminindeki katkıları Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Oğuz AYDIN'a çok teşekkür ederim.

Tezime sağladığı maddi destekten dolayı Proje Yönetim Ofisi'ne (PYO.TIP.1904.14.017) teşekkür ederim.

İstatistik konusundaki yardımlarından dolayı Halk Sağlığı Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Tevfik SÜNTER'e teşekkür ederim.

Tez çalışması süresince motivasyon gücümü arttıran ve yardımlarını esirgemeyen Araştırma Görevlileri Melek YÜCE, Aslı METİN MAHMUTOĞLU ve G. Neslihan TAŞKURT HEKİM'e çok teşekkür ederim.

Ayrıca, Türkiye'de Yüksek Lisans eğitimi almamı destekleyen, bana güven duyup her zaman başaracağıma inanan, maddi ve manevi açıdan yardımlarını esirgemeyen aileme ve tüm sevdiklerime çok teşekkür ederim.

ÖZET

UROTELYAL MESANE KANSERLİ HASTALARDA *E-KADERİN* VE *P14* GENLERİNİN PROMOTOR METİLASYON ANALİZİ

Amaç: Bu çalışmada, tümöre özgül olan *E-kaderin* ve *p14* genlerinin metilasyon değişimlerinin, mesane kanserinin erken tanısındaki duyarlılık ve özgüllüğünün diğer tanı yöntemi ile kıyaslanarak incelenmesi amaçlandı.

Materyal ve Metot: Bu tez çalışmasına klinik ve patolojik olarak mesane kanseri tanısı konan 65 hasta (55 erkek, 10 kadın) ve kanser öyküsü olmayan 35 birey (32 erkek, 3 kadın) kontrol grubu olarak dahil edildi. Metilasyona spesifik PCR (MSP) yöntemi, tümör ve idrar örneklerinden *E-kaderin* ve *p14* genlerinin promotor metilasyon profilini belirlemek için kullanıldı.

Bulgular: Çalışmaya dahil edilen 65 hastadan 62'sinin (%95,4) tümör dokusu örneklerinde *E-kaderin* geninin promotorunun metillendiği belirlendi. *p14* geni promotor metilasyonu ise 51 (%78,5) örnekte gözlendi. İdrarda *E-kaderin* geni metilasyon sıklığı hasta grubu için %68,8 (33/48), kontrol grubunda %5,7 (2/35); *p14* geni metilasyon sıklığı hasta grubunda %72,9 (35/48), kontrol grubunda ise %37,1 (13/35) olarak bulundu. Tanısal olmayan ve idrar sitoloji sonucuna ulaşılmayan olgular dışındaki örnekler için *E-kaderin*, *p14* ve idrar sitolojisi duyarlılığı sırasıyla %67,4 %72,1 ve %34,9; aynı parametrelerin özgüllüğü ise sırasıyla %93,9, %63,6 ve %93,9 olarak bulundu. Düşük grade tümörlerde *E-kaderin*, *p14* ve bu iki genden birinin metilasyon duyarlılığı sırasıyla %66,7 (8/12), %75 (9/12) ve %83,3 (10/12) olarak bulundu. İdrar sitolojisinde ise duyarlılık sıfır olarak bulunurken, %41,7 oranda ise şüpheli sonuç verdi.

Sonuç: *E-kaderin* ve *p14* genlerinin atipik metilasyonu ürotelyal mesane kanserinin erken tanısında kullanılabilir bir yöntemdir. Bu genlerde yaşa bağlı olarak meydana gelen metilasyon değişimleri ürotelyal mesane kanserine neden olabilmektedir. Düşük grade olgularda *E-kaderin* ve *p14* genlerinin kombine metilasyon analizi idrar sitolojisi ile karşılaştırıldığında, idrarda kanser hücrelerini belirlemek için maliyeti düşük, kolay uygulanabilen, özgül ve duyarlı bir yöntemdir.

Anahtar Kelimeler: Biyobelirteç; DNA Metilasyonu; *E-kaderin*; İdrar; *p14*; Ürotelyal Mesane Kanseri

Bayram BAYRAMOV, Yüksek Lisans Tezi

Ondokuz Mayıs Üniversitesi - Samsun, Ekim-2015

ABSTRACT

PROMOTOR METHYLATION ANALYSIS OF *E-CADHERIN* AND *P14* GENES IN UROTHELIAL BLADDER CANCER PATIENTS

Aim: In this study, we aim to investigate the specificity and sensitivity of tumor-specific methylation of *p14* and *E-cadherin* genes in early diagnosis of bladder cancer and compare it with other diagnostic methods.

Material and Method: In this study 65 (55 men, 10 women) patients with clinical and pathological diagnosis of bladder cancer and 35 (32 men, 3 women) controls without any history of cancer were enrolled. Methylation profiles of promoter regions of *E-cadherin* and *p14* genes from tumor and urine samples were determined by methylation-specific PCR (MSP) method.

Results: Out of 65 patients enrolled, tumor samples of 62 patients (95.4%) displayed promoter methylation of *E-cadherin* gene. Methylation of *p14* gene promoter was observed in 51 samples (78.5%). In urines of patients analyzed, methylation frequencies were found to be 68.8% (33/48) for *E-cadherin* and 72.9% (35/48) for *p14* gene. In the control group, methylation frequencies were 5.7% (2/35) for *E-cadherin* and 37.1% (13/35) for *p14* gene. Sensitivities of *E-cadherin*, *p14* and urine cytology were found to be 67.4%, 72.1% and 34.9% respectively, while specificities of the same parameters were 93.9%, 63.6% and 93.9%, respectively. In low-grade tumors, methylation sensitivities of *E-cadherin*, *p14* and one of these two genes were found to be 66.7% (8/12), 75% (9/12) and 83.3% (10/12), respectively. Sensitivity in urine cytology was found to be zero, and in 41.7% of urine samples results were suspicious.

Conclusion: Atypical methylation of *E-cadherin* and *p14* genes can be used as a diagnostic tool in urethral bladder cancer. Age-related alterations in the methylation statuses of these genes may result in urethral bladder cancer. In low-grade tumors, when compared to urine cytology, combined methylation analysis of *E-cadherin* and *p14* genes is a low-cost, easily applicable, sensitive and specific method to identify cancer cells in urine.

Keywords: Biomarker; DNA Methylation; *E-cadherin*; *p14*, Urothelial Bladder Cancer; Urine

Bayram BAYRAMOV, Master Thesis

Ondokuz Mayıs University - Samsun, October-2015

SİMGELER VE KISALTMALAR

AJ:	Adherens bağlantı
ARF:	Alternatif okuma çerçevesi
CBD:	Katenin bağlanma bölgesi
CDH:	Kaderin
CDK:	Siklin bağımlı kinaz
CDKN2A:	Siklin bağımlı kinaz inhibitör 2a
ddH₂O:	Deiyonize su
DNMT:	DNA metiltransferaz
EGF:	Epidermal büyüme faktörü
EGFR:	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
EMT:	Epitelyal mezenkimal geçişi
FGF:	Fibroblast büyüme faktörü
FGFR3:	Fibroblast büyüme faktörü reseptörü 3
FISH:	Floresan <i>in situ</i> hibridizasyon
HAT:	Histon asetiltransferaz
HDAC:	Histon Deasetilaz
HMT:	Histon metiltransferaz
IVD:	<i>İn vitro</i> metile DNA
JMD:	Jukstamembran bölgesi
KAEK:	Klinik araştırmalar etik kurulu
kb:	Kilobaz
LEF:	Lenfoid güçlendirici faktör
LINE:	Uzun serpiştirilmiş nükleer eleman
LTR:	Uzun terminal tekrar retrotranspozon

MBD:	Metil bağlanma bölgesi
MDM2:	Murine Double Minute 2
MeCP2:	Metil CpG bağlanma proteini 2
MET:	Mezenkimal epitelyal geçişi
miRNA:	Mikro RNA
MSP:	Metilasyona spesifik PCR
OMÜ:	Ondokuz Mayıs Üniversitesi
ORF:	Açık okuma çerçevesi
PcG:	Polikomp grubu
PCR:	Polimeraz zincir reaksiyonu
PRC:	Polikomp baskılayıcı kompleksi
RB:	Retinoblastom
SAM:	S-adenozilmetiyonin
SINE:	Kısa serpiştirilmiş nükleer eleman
siRNA:	Küçük müdahaleci RNA
TBE:	Tris-Borik Asit-EDTA
TCC:	Tranzisyonel hücreli karsinoma
TCF:	T-hücre faktörü
TJ:	Sıkı bağlantılar
USP:	Metilasyona spesifik olmayan PCR
µl:	Mikrolitre

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
İÇİNDEKİLER	viii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Mesane Kanseri Patolojisi	3
2.2. Mesane Kanseri Genetiği	3
2.2.1. Kromozomal Değişimler	3
2.2.2. Proto-Onkogenler ve Onkogenler	4
2.2.3. Tümör Baskılayıcı Genler	5
2.2.4. Hücre Döngüsü Düzenleyici Proteinleri.....	6
2.4.5.Hücre Adezyon Molekülleri.....	6
2.3. Çevresel Risk Faktörleri	7
2.4. Epigenetik.....	9
2.4.1. Epigenetik değişimler	9
2.4.2. DNA metilasyonu	9
2.4.3. Mesane Kanseri ve DNA Metilasyonu	11
2.4.4. DNA Hipometilasyonu ve Mesane kanseri	11
2.4.5. Histon Modifikasyonları.....	12
2.4.6. Histon Metilasyonu ve Mesane Kanseri.....	12
2.4.7. Histon Asetilasyonu	13
2.4.8. Histon Asetilasyonu ve Masane Kanseri	13
2.4.9. Kodlamayan RNA'lar ve Mesane Kanseri	13
2.5. Hücre-Hücre Bağlantıları	15
2.5.1. Kaderinler	15
2.5.2. Kateninler	16
2.5.3. E-kaderin, Yapı ve Fonksiyonu	16
2.5.4. Kaderin-Katenin Düzenlenmesi	17
2.5.5. Epitelyal-Mezenkimal Geçiş	18
2.5.6. Gelişim sırasında EMT	19

2.5.7. Kanser ve EMT.....	19
2.5.8. Kanser Gelişiminde E-Kaderin Düzenleme Mekanizmaları	20
2.6. Hücre Döngüsü Düzenleyicileri.....	23
2.6.1. p16INK4A ve Retinoblastom (RB) Aktivitesinin Düzenlenmesi	24
2.6.2. <i>p14</i> geni ve Etki Mekanizmaları.....	25
2.6.3. ARF Ekspresyonu ve Degradasyonu.....	26
2.6.4. ARF Proteinlerinin Tümör Baskılanmasındaki Rollerini.....	27
2.6.5. p53 Ubikütinasyonu.....	28
2.6.6. Kanser ve p14 ^{ARF} Genetik Değişimleri	28
2.6.7. ARF Lokusunun Düzenlenmesi	29
3. MATERYAL VE METOT	30
3.1. İdrardan DNA İzolasyon Yöntemi	30
3.2. Mesane Tümör Örneklerinden DNA İzolasyonu	31
3.3. Bisulfit Modifikasyon Yöntemi	32
3.4. Metilasyona-Spesifik PSR (MSP).....	34
3.5. Agaroz Jel Elektroforezi	36
3.6. İstatiksel Analiz.....	36
4. BULGULAR	37
4.1. İdrar Örneklerinde <i>E-kaderin</i> ve <i>p14</i> Genlerinin Metilasyon Durumu.....	39
4.2. Tümör Dokularında <i>E-Kaderin</i> ve <i>p14</i> Genlerinin Metilasyon Durumu	39
4.3. İdrar Sitolojisi Sonuçlarının Değerlendirilmesi	44
4.3.1 İdrar Sitolojisi ve Metilasyon Duyarlılığının Karşılaştırılması	47
5. TARTIŞMA	49
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	55
KAYNAKLAR.....	56
EKLER.....	64
EK 1. Etik Kurul Onayı.....	64
EK 2. Hasta Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu.....	65
ÖZGEÇMİŞ.....	69

1. GİRİŞ

Mesane kanseri, üriner sistemin en sık görülen malignitesidir ve erkeklerde 7. ve kadınlarda ise 17. en sık görülen kanserdir. Mesane kanseri, prostat kanserinden sonra ürogenital sistemin ikinci en sık görülen malignansisidir (Li ve ark., 2013).

Mesane kanserli hastalarda hastalığın ilerlemesi ve nüks etmesi düzenli olarak sistoskopi tanı yöntemiyle takip edilmektedir (Kim ve Kim, 2009). Mesane kanseri şüphesi varsa (örneğin hematuri gibi), mesane altın standart tanı yöntemi olan sistoskopiyle değerlendirilmeye alınır (Ye ve ark., 2014). Sistoskopi invaziv bir işlemdir ve hastaya anestezi altında biyopsi yapılarak histopatolojik tanı konur (Urquidi ve ark., 2012). Ayrıca optik koherens tomografi ve konfokal lazer endomikroskopi gibi yeni teknolojiler mesane tümörü tanısında duyarlı ve özgün yöntemler olmasına rağmen invaziv, zaman alıcı, rahatsızlık veren ve pahalı yöntemlerdir (Ye ve ark., 2014).

İdrar sitolojisi, mesane kanseri tanısı için invaziv olmayan bir yöntemdir ve anormal hücrelerin idrarda veya mesane yıkama sıvısında belirlenmesi esasına dayanır. İdrar sitolojisinin özgülüğü yüksektir, fakat özellikle iyi diferansiye düşük dereceli mesane tümörlerinde düşük duyarlılığa sahiptir. Bunların dışında mesane kanserinin tanısında histopatoloji, sitoloji ve immunofloresan yöntemlerin kombine edildiği (*floresan in situ hibridizasyon*, FISH) ve idrarda protein belirteçlerin belirlenmesi (tümör bağlantılı antijenler, onkogenler, peptid büyüme faktörleri ve reseptörleri, hücre adezyon molekülleri vb.) gibi yöntemler de kullanılmaktadır. Fakat bu yöntemlerin karmaşıklığı, yüksek maliyeti, düşük duyarlılığı ve özgülüğü gibi birçok sınırlamaları bulunmaktadır. Bu nedenle, tanıda duyarlılığı ve özgülüğü arttıran daha iyi biyobelirteçlerin geliştirilmesi ve tanımlanması gerekmektedir (Ye ve ark., 2014).

Tümör oluşumu sırasında tümör baskılayıcı genlerin promotorlerinde yer alan CpG adacıklarının hipermetilasyonu bu genlerin susturulmasıyla sonuçlanmaktadır. *E-kaderin* epitelyal hücrelerde ifade edilmekte ve hücre-hücre bağlantılarında rol oynamaktadır. Kanser hücrelerinde bu bağlantıların bozulması epitelyal mezenkimal geçişi indükleyerek invaziv tümörlere neden olmaktadır. *p14* geni ise bir tümör baskılayıcı gendir ve hücre döngüsünü p53 yolağı aracılığı ile negatif düzenleyen protein kodlamaktadır. *E-kaderin* ve *p14* genlerinin promotor bölgelerinin epigenetik inaktivasyonu ve kanser arasındaki ilişkileri araştıran çeşitli çalışmalar mevcuttur.

Çalışmamız kapsamında mesane kanserli hastalarda *E-kaderin* ve *p14* genlerinin promotor bölgelerinin metilasyonunu analiz etmeyi planladık. Ayrıca biyopsi sonucu alınan tümör dokularında ve yine aynı hastalara ait idrar örneklerinde ürotelyal mesane kanserinin erken tanısında *E-kaderin* ve *p14* genlerinin metilasyon profillerinin günümüzde kullanılan tanı yöntemleriyle duyarlılık ve özgüllük açısından karşılaştırmayı amaçladık.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mesane Kanseri Patolojisi

Patolojik evrelendirme prognoz için önemli bir faktör olup mesane duvarı invazyon derinliğine dayanmaktadır (Ibragimova ve ark., 2014). Mesane kanseri olgularının büyük çoğunluğu (%90) transizyonel hücreli karsinomalardır (transitional cell carcinomas, TCC). İnvaziv olmayan tümörlerin %75-85'i TCC'dir (Besaratiniave ark., 2013). Mesane kanserleri klinik ve histopatolojik olarak invaziv-olmayan ürotelyal kanserler (pTa-pT1) ve invaziv ürotelyal kanserler (pT2-pT4) olarak sınıflandırılabilirler. İnvaziv-olmayan ürotelyal kanserler yeni tanı konulmuş mesane kanseri olgularının yaklaşık %80'ini kapsamaktadır ve transüretal rezeksiyon ile tedavi edilmektedir. Tedavi edilen olguların %70'i tekrarlayabilir ve %25 invaziv özellik kazanabilir (Poyet ve ark., 2014).

2.2. Mesane Kanseri Genetiği

Mesane kanseri çevresel ve genetik faktörlerden kaynaklanan, proto-onkogenlerin aktivasyonu ve tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu sonucunda gelişen multifaktöriyel bir hastalıktır (Chen ve ark., 2011; Li ve ark., 2013). Mesane kanserinde çok sayıda allel kayıpları veya delesyonları, gen amplifikasyonları ve mikrosatellit kararsızlıkları gibi çeşitli mutasyonlar tanımlanmıştır (Negraes ve ark., 2008). Çok sayıda genetik belirtecin mesane kanserinin gelişimi ve ilerlemesindeki biyolojik rolleri incelenmiştir. Bunlara örnek proto-onkogenler/onkogenler, tümör baskılayıcı genler, hücre döngüsü düzenleyicileri ve hücre adezyon molekülleri verilebilir (Kim ve ark., 2007).

2.2.1. Kromozomal Değişimler

Kromozom kararsızlığı, tümör hücrelerinin ortak özelliklerindedir ve mesane kanseriyle de ilişkilendirilmektedir. Onkogen içeren DNA bölgelerinin amplifikasyonu veya tümör baskılayıcı genlerin kaybı yapısal kromozomal kararsızlığa yol açmaktadır (Bonberg ve ark., 2014). Çeşitli çalışmalarda mesane kanserinin gelişimi ile ilişkili kromozomal değişiklikler araştırılmıştır. Dokuz numaralı kromozomda meydana gelen genetik materyal kaybı, TCC'de en sık görülen değişikliklerinden biridir, genellikle 9p ve 9q kısmen ya da tamamen delesyona uğrar. 9p21'de Siklin-bağımlı kinaz inhibitörü 2A (*CDKN2A*), 9q33'de *DBCCR1* ve 9q34'de *TSC1* genleri lokalizedir (Conconi ve ark.,

2014). Delesyon 10q *PTEN*, 13q delesyonu *RBI* ve 17p delesyonu *TP53* lokusları ile ilişkilendirilmiştir. Yaygın DNA amplifikasyonları 6p22'de *E2F3*, 8q24'de *MYC*, 11q13'de siklin D1 (*CCND1*), 12q14'de *MDM2* ve 17q21'de *ERBB2* içermektedir. Ayrıca, 1q, 3p, 3q, 8p, 8q ve 12q'de nükseden amplifikasyonlar bulunmuştur (Scaravilli ve ark., 2014).

2.2.2. Proto-Onkogenler ve Onkogenler

Onkogenler malign fenotip gösteren hücresel seviyede dominant genlerdir. Onkogenlerin ürünleri çoğunlukla kinaz reseptörleri veya büyüme faktörleri ve onların reseptörleridir. Bu ürünler hücre çoğalması ve normal hücre sinyal iletiminde önemli rol oynamaktadır. Proto-onkogenler mutasyonlar veya diğer değişiklikler sonucunda onkogene dönüştüğünde, gen ürünlerinin aşırı ekspresyonu veya protein ekspresyonuyla kanserojen etki göstermektedir (Kangve ark., 2014).

Bazı araştırmacılar, yüksek grade ve stage mesane kanseri ile epidermal büyüme faktörü reseptörünün (EGFR) aşırı ifadesi arasında pozitif bir korelasyon olduğunu göstermiştir (Kim ve ark., 2007). İnsan EGFR çeşitli kanserlerin patogenezinde önemli rol oynar. Bunlar, çoklu sinyal transdüksiyon geçiş yolları aracılığıyla hücre büyümesi, sağkalım ve hücre farklılaşmasını düzenlemektedir (Iqbal ve ark., 2014). EGFR mesane kanseri olgularında sıklıkla aşırı ifade edilir ve mesane kanseri patogenezinde önemli bir rol oynamaktadır. Epidermal büyüme faktörü (EGF), EGFR ligandıdır ve *in vitro* yapılan çalışmalar EGF'nin mesane kanseri hücrelerinde hücre bölünmesini artırdığı ortaya konulmuştur. İnsanlarda EGFR normal urotelyumda nadiren eksprese olurken, mesane kanseri hücrelerinde aşırı eksprese edilmektedir (Yang ve ark., 2013).

Epidermal büyüme faktörü reseptörlerinin bir diğer türü olan *HER-/neu*, (*c-erb-B2*) sıklıkla mesane kanserinde aşırı eksprese edilmektedir. Yüksek grade tümör, sağkalımın azalması ve yüksek metastaz insidansı ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Gunes ve ark., 2013).

Sıklıkla yüksek grade mesane kanserlerinde aşırı eksprese olan bir diğer proto-onkogenin *c-myc* olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte, *c-myc* ekspresyonunun artışı kanserin nüks etmesi, progresyonu ya da sağkalım ile ilişkili olmadığı görülmektedir. Bu nedenle, mesane kanserinde, *c-myc*'in aşırı ekspresyonu düşük prognostik öneme sahiptir (Kim ve ark., 2007).

Fibroblast büyüme faktörü (FGF) reseptörü 3 (FGFR3), tirozin kinaz reseptörü ailesindedir ve dört farklı gen (*FGFR1-4*) tarafından kodlanmaktadır. Bu reseptörler glikoproteinlerdir ve iki veya üç hücre dışı, immüoglobulin benzeri, bir transmembran ve bir tirozin kinaz bölümüne sahiptir. FGF *FGFR*'lerin ligandı olup hücre proliferasyonunu, farklılaşmasını, göçünü ve apoptozisi kontrol eder. *FGFR3* mesane kanserinde en sık mutasyona uğrayan onkogenlerden biridir. *FGFR3* mutasyonları, invaziv olmayan mesane tümörlerinin %70'den fazlasında görülürken invaziv tümörlerin ise %10-20'sinde tespit edilmiştir. Yapılan çalışmaların büyük bir bölümü *FGFR3* mutasyonlarının önemli ölçüde düşük grade ve stage ile ilişkili olduğunun bildirilmesine rağmen, bazı çalışmalar ilişki olmadığını göstermiştir. Bu nedenle, *FGFR3*'ün biyobelirteç olarak prognostik değeri kesinlik kazanmamıştır (Liu ve ark., 2014).

Murine double minute 2 (MDM2) geni, 12 numaralı kromozomun 12q13-14 bölgesinde yer almakta ve 9 kDa'lık bir nükleer protein olan MDM2'yi (p90) kodlamaktadır. MDM2'nin p53'e bağlanması, p53'ün transkripsiyon aktivitesini negatif olarak düzenler. Bu negatif feedback p53'ün aktivasyonu ve p53 kaynaklı apoptozu engeller. Ürotelyal kanserlerde, *MDM2*'nin kopya sayısı %4-6 artış göstermektedir. Ürotelyal mesane kanserinde, bu genin aşırı ekspresyonu p53'ün aktivasyonunu engelleyebilir. *MDM2*'nin aşırı ekspresyonu, yüksek diferansiyasyon ve erken stage mesane kanseriyle ilişkilidir, ancak yüksek malign mesane kanserinde *MDM2* ekspresyonu düşüktür (Kang ve ark., 2014).

2.2.3. Tümör Baskılayıcı Genler

Onkogenler ve tümör baskılayıcı genler, hücre büyümesi ve çoğalmasını kontrol etmektedir. Onkogenler aktivasyon mekanizmasıyla kansere neden olurken, tümör baskılayıcı genler kanser oluşumuna neden olan bu genlerin inaktivasyonundan sorumludur. Tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu, onkogenler tarafından kontrol edilen kontrolsüz hücre çoğalmasına neden olur. Tümör baskılayıcı genlere örnek *p53* ve *Rb* genleri örnek olarak verilebilir (Kang ve ark., 2014).

p53 geni, 17p13.1'de yer almakta ve 53 kD'luk bir fosfoprotein kodlamaktadır. *p53* proteini tetramer yapıya sahiptir. Kanser olgularında *p53* mutasyonları en yaygın genetik değişikliklerdir. Bu genin en önemli işlevi hücrede DNA hasarını tespit etmektir. Stres sinyallerine yanıt olarak hücrelerde DNA hasarı oluşmuşsa *p53* hücre döngüsünü

G1 fazından S fazına geçişini engellemektedir. Bu işlem sırasında p53 çekirdek içi p21 transkripsiyonu başlatarak, DNA onarım sistemi enzimleriyle DNA hasarını onarmaktadır. Hasar tamir edilmezse p53 apoptoz enzimlerini tetikleyerek hücrelerin programlı ölümünü gerçekleştirmektedir. *p53* mutasyonu çoğunlukla invaziv ürotelyal mesane kanserlerinde oluşmasına rağmen, invaziv olmayan mesane kanserlerinde de nadiren görülmektedir. İnvaziv ürotelyal mesane kanserlerinde hem *p53* hem de *Rb* etkin olduğu sinyal yolları inaktif olabilmektedir. Ürotelyal mesane kanserli hücre hatlarında yapılan çalışmalar, her iki sinyal yolunun farklı derecelerde örneğin, *p53* mutasyonu, *p14* homozigot delesyonu, *RB* geni hipermetilasyonu ve *p16* homozigot delesyonu şeklinde değişikliğe uğradığını göstermiştir. p53 proteini mutasyona uğrarsa hücre döngüsündeki düzenleyici işlevini yerine getiremez (Kang ve ark., 2014).

Rb geni 13q14 bölgesinde lokalizedir ve 110 kD'lik bir nükleer fosfoprotein kodlar. RB proteini yaygın olarak normal dokularda ifade edilmektedir, erken G1 fazında fosforillenmemiş olup geç G1 fazından sonra fosforile edilmektedir. Tümör dokularında, RB inaktivasyonu ya da delesyonu tümör hücrelerinin G1 kontrol noktasından kaçışını sağlar. RB gen mutasyonu mesane kanserinde yaygın değildir. Ancak, invaziv ürotelyal mesane kanserlerinde RB homozigot delesyonu veya RB proteinin aşağı-regülasyonu görülmüştür (Kang ve ark., 2014).

2.2.4. Hücre Döngüsü Düzenleyici Proteinleri

Tümör hücrelerinin en önemli özellikleri arasında kontrolsüz hücre bölünmesi ve hücre döngüsü kontrolünün bozulması verilebilir. Hücre döngüsü siklinler, siklin bağımlı kinazlar, siklin bağımlı kinaz inhibitörleri (cyclin-dependent kinases (CDK) inhibitors, CDKIs) (Enokida ve Nakagawa, 2008) ve *p53*, *Rb*, *p14^{ARF}* ve *p16^{INK4a}* gibi tümör baskılayıcı genler tarafından kontrol edilmektedir (Dumache ve ark., 2010).

2.2.5. Hücre Adezyon Molekülleri

Hücreler birbirleriyle ve hücre dışı ortamlarla etkileşim içindedir. Tüm bu etkileşimler adezyon molekülleriyle sağlanmaktadır. Adezyon molekülleri ailesinin en önemli üyeleri kaderinler, integrinler, immünoglobülin süper ailesi elemanları ve selektinlerdir. Bu adezyon molekülleri hücre farklılaşması, çoğalma, invazyon ve kolonizasyon gibi çeşitli hücresel işlemlerin kontrolünde görev yapmaktadır. Kaderinler en önemli adezyon moleküllerindendir (Dumache ve ark., 2010). Hücre adezyon

moleküllerinin özellikle E-kaderinin (E-cadherin, *CDH1*) düşük ekspresyonu çeşitli kanser türlerinde prognostik öneme sahiptir. Mesane kanserinde, *CDH1* ekspresyonu önemli derecede azalır ve *CDH1* promotor hipermetilasyonu tümör stage, grade ve prognozuyla ilişkilendirilmiştir (Enokida ve Nakagawa, 2008).

2.3. Çevresel Risk Faktörleri

Mesane kanseri insanlarda kimyasal karsinogeneze iyi bir örnek oluşturmaktadır.

Tütün dumanı, mesane kanseri için en önemli ekzojen risk faktörü olarak kabul edilmektedir. TCC'lerin %50'sinin tütün dumanıyla doğrudan ilişkili olduğu tahmin edilmektedir. Tütün dumanında bulunan arilaminler ve sayısının 60'dan fazla olduğu düşünülen diğer karsinojenler tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonda değişiklikler yaparak DNA'da eklenti oluşumuyla ilişkilendirilmiştir. Mesane kanserli hastalar arasında sigara içenler ve içmeyenlerin patoloji sonuçları karşılaştırıldığında, sigara kullananların patoloji sonuçlarının daha yüksek grade ve stage gösterdikleri, ayrıca sigara içicisi hastalarının mortalite riskinin daha yüksek olduğu bilinmektedir. Sigaranın bırakılması, bir yıl içinde mesane kanseri riskini %40'a kadar azaltmaktadır. Mesleki faktörler tüm mesane kanseri olgularının yaklaşık %20'si için risk oluşturmaktadır. Anilin boyalarında bulunan aromatik aminlerin (örneğin, benzidin, naftilamin, 4-aminobifenil) ve birçok endüstriyel kimyasalların mesane kanserine neden olduğu bilinmektedir. Yapılan epidemiyolojik çalışmalar içme suyundaki yüksek klor seviyesi ve arsenik bileşenlerinin mesane kanseri riskini artırdıkları göstermiştir. Arseniğin, onkogenezdeki rolünün DNA metilasyon değişiklikleri, anormal gen ifadesi, hücre metabolizması değişiklikleri ve oksidatif stres artışı olduğu tahmin edilmektedir (Volanis ve ark., 2010).

Nitekim, mesleki mesane kanseri ressam, kaplamacılar, kuaför, tekstil, plastik ve deri sanayi işçilerinde daha çok gözlenmektedir (Volanis ve ark., 2010). Mesane kanseri ile ilişkili en önemli çevresel faktörlerin listesi Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Mesane kanseri gelişiminde çevresel risk faktörleri (Volanis 2010'dan uyarlanmıştır)

Çevresel Faktörler	Açıklama	Referanslar
Sigara	Olguların yaklaşık %50'si sigara içicileridir. Kansere bağlı yüksek ölüm oranı	Stewart ve ark., 2008 Wallerand ve ark., 2005
Aromatik aminler	Anilin boyalar ve diğer endüstriyel kimyasallar	Rouissi ve ark., 2009 Golka ve ark., 2004
İyonize radyasyon	Pelvik radyoterapi. Radyoaktif kontamine olmuş alanlar	Romaneko ve ark., 2009 Kaldor ve ark., 1995
Arsenik	Su kontaminasyonu	Huang ve ark., 2004 Chiou ve ark., 2001
Beslenme yoluyla alınan nitratlar	Gübreler ve pestisitler	Chiu ve ark., 2007 Zeegers ve ark., 2006
Klorid	Klorlanmış su	Villanueva ve ark., 2003
Klorlanmış hidrokarbonlar	Kuru temizleme çözücüleri Toprak kontaminasyonu	Mundt ve ark., 2003
Polisiklik aromatik hidrokarbonlar	Alüminyum üretimi, kömür gazlaştırma, katran ve katran-ilişkili ürünler	Bosetti ve ark., 2007
Alkilleyici ajanlar	Siklofosamid. Kanserojen metabolit (akrolein)	Knight ve ark., 2004 Tanguay ve ark., 2003
Kömür	Kömür madencileri	Lopez-Abente ve ark., 2006
Şistozomiazis	Schistosoma haematobium. Afrika, Asya ve Güney Amerika'da endemiktir. Yassı epitel hücreli karsinom	Gouda ve ark., 2007 Fedewa ve ark., 2009

2.4. Epigenetik

'Epigenetik' terimi ilk kez 1942 yılında Conrad Waddington tarafında dile getirilmiş ve genlerle ürünleri arasındaki rastgele etkileşimin, gelişim boyunca fenotipik değişiklikleri kontrol ettiği belirtilmiştir (Wright ve Saul, 2013; Zhang ve Pradhan, 2014). Epigenetik, günümüzde DNA diziliminde değişiklik olmaksızın, mitotik ve mayotik yollarla sonraki kuşaklara aktarılabilen ve gen işlevini değiştiren mekanizmaları inceleyen bilim dalı olarak tanımlanmaktadır (Haig, 2004; Dupont ve ark., 2009).

2.4.1. Epigenetik Değişimler

Gen ekspresyonunu önemli ölçüde etkileyen epigenetik mekanizmalar arasında, DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve kodlamayan RNA'lar yer almaktadır (Moskalev ve ark., 2014). DNA metilasyonu transkripsiyonu düzenleyen önemli bir mekanizmadır. Gen promotor metilasyonu, normal memeli gelişiminde önemli rol oynamaktadır, ancak anormal promotor metilasyonu insan kanserlerinde sıklıkla gözlenmektedir (Chen ve ark., 2011). Özellikle tümör baskılayıcı genlerin promotor bölgelerinde yer alan CpG adacıklarında oluşan DNA metilasyonu kanser olgularında sıklıkla meydana gelir (Casadio ve ark., 2013; Wright ve Saul, 2013; Zhang ve Pradhan, 2014).

2.4.2. DNA Metilasyonu

DNA metilasyonu en iyi tanımlanan epigenetik modifikasyondur (Muñoz-Najar ve Sedivy, 2011; Yi ve ark., 2014). DNA metilasyonu kovalent bir biyokimyasal modifikasyonu olup CpG adacıklarında yer alan sitosinin 5' karbonuna bir metil grubunun eklenmesiyle gerçekleşir (D'Aquila ve ark., 2013). DNA metilasyonu transkripsiyonel baskılanmayı doğrudan veya dolaylı olarak gerçekleştirir. Doğrudan transkripsiyonun baskılanması promotor bölgelerde yer alan CpG adacıklarının metillenmesi ve transkripsiyon faktörlerinin bu bölgelere bağlanmasının engellenmesiyle oluşur (Vaissiere ve ark., 2008). En az 200 bp uzunlukta olan (Kim ve ark., 2009) ve tüm memeli genomunu kapsayan CpG adacıklarının %60-90'ı metillenmiştir (Huidobro ve ark., 2013; Kim ve ark., 2014).

Memeli genlerinin promotorlerinin yaklaşık %40'ı CpG adacıkları içermektedir (Gravina ve Vijg, 2010). Promotor bölgelerinde yer alan CpG dinükleotidleri genellikle gelişim sırasında ve normal dokularda metillenmemiştir (Kim ve ark., 2009). Promotor

bölgelerinin metillenmesi transkripsiyonu baskılayarak, gen ekspresyonunu düzenlemektedir (Calvanese ve ark., 2009; Winnefeld ve Lyko, 2012). Genomun metillenmiş CpG bölgeleri çoğunlukla transpozonlarda yer almaktadır. Transpozon elemanları metillendiğinde transkripsiyona uğramaz (Lu ve ark., 2006).

DNA metilasyonu, DNA metiltransferazlar (DNMTs) tarafından gerçekleştirilir. DNMT'lar DNMT1, DNMT2 ve DNMT3 olmak üzere üç grupta incelenir. Bu enzimler, metil donörü olan S-adenosil-L metioninden (SAM) sitozinin 5' karbonuna bir metil grubunu ekler (Golbabapour ve ark., 2011). DNMT1, DNA replikasyonu sırasında yavru hücrelere metilasyon profilinin aktarılmasından sorumludur ve 'bakım metiltransferazı' olarak adlandırılmaktadır (Muñoz-Najar ve Sedivy, 2011). DNMT2'nin rolü tam olarak bilinmemekle birlikte DNA ve RNA metiltransferazı olarak görülmektedir. DNMT3a ve DNMT3b daha önce metillenmemiş sitozinlerin *de novo* metilasyonunu gerçekleştirir (Golbabapour ve ark., 2011). Her iki DNMT'nin embriyonik kök hücrelerinde yüksek derecede ifade edildiği bulunmuştur (Miceli ve ark., 2014).

Dolaylı yolla transkripsiyonel baskılanma metillenmiş DNA'ya bir metil-CpG-bağlama bölgesine (methyl binding domain, MBD) sahip proteinlerin bağlanmasıyla gerçekleşir (Vaissiere ve ark., 2008). Metil CpG bağlanma protein 2 (methyl CpG binding protein 2, MeCP2) MBD1, MBD2, MBD3 ve MBD4 gibi MBD proteinleri tanımlanmıştır (Kar ve ark., 2014). Her bir MBD proteini transkripsiyonun baskılanmasıyla ilişkilidir. MeCP2 en iyi karakterize edilmiş MBD proteindir (Johnson ve ark., 2012). Metil-CpG bağlanma bölgesi proteinlerinin üyesi olan MeCP2 bir metil CpG-bağlama ve bir transkripsiyon baskılanma bölgesi içerir (Fuks ve ark., 2003).

MeCP2, *Sin 3*, *c-ski* ve *N-CoR* gibi ko-represörlere doğrudan bağlanarak kompleks oluşturur. Daha sonra histon deasetilaz enzimleriyle etkileşime geçerek metillenmiş CpG adacıklarına bağlanır ve transkripsiyonun baskılanmasını gerçekleştirir (Johnson ve ark., 2012; Thambirajah ve ark., 2012; Vaissiere ve ark., 2008).

DNA metilasyonu gelişim ve farklılaşma, genomik imprinting, X kromozomu inaktivasyonu, genomu transpozonlardan koruma gibi farklı biyolojik fonksiyonlara aracılık etmektedir (Cencioni ve ark., 2013; D'Aquila ve ark., 2013; Liyanage ve ark., 2014).

2.4.3. Mesane Kanseri ve DNA Metilasyonu

DNA metilasyonu değişimleri, insan kanserinin hemen hemen her türünde tanımlanmıştır. DNA metilasyonu değişimleri, global DNA hipometilasyonu, lokusa özgü DNA hipometilasyonu ve/veya hipermetilasyon ile karakterize edilir. DNA hipermetilasyonu gen ekspresyonu değiştirerek ve tümör baskılayıcı genlerin transkripsiyonu baskılayarak onkogeneze olanak sağladığı düşünölmektedir (Besaratina ve ark., 2013). Promotor metilasyonu normal dokuyla kıyaslandığında invaziv ürotelyal karsinomalarda, hem belirli lokus/lokuslarda hem de genomda artış göstermektedir (Ghafouri-Fard ve ark., 2014). Promotor bölgelerinde yer alan CpG adacıklarının hipermetilasyonu mesane kanserinde yaygın olarak çalışılmış epigenetik bir modifikasyondur (Li ve ark., 2013).

Yapılan çalışmalar, mesane kanserinin erken tanısında promotor metilasyonu biyolojik belirteç olarak kullanılabileceğini göstermektedir (Ghafouri-Fard ve ark., 2014).

2.4.4. DNA Hipometilasyonu ve Mesane kanseri

DNA hipometilasyonu da mesane kanserinde yaygın olarak görölmektedir ve gen spesifik hipometilasyonu tetikleyerek kansere yol açar (Phe ve ark., 2009). Ayrıca, DNA hipometilasyonu genomik kararsızlık, kromatin gevşemesi, retrotranspozonların aktivasyonu ve proto-onkogenlerin aktivitesini indüklemektedir (Reinert, 2012; Besaratina ve ark., 2013). Global DNA hipometilasyonu sıklıkla uzun- ve kısa serpiştirilmiş nükleer eleman dizilerinde (long- and short interspersed nuclear elements: LINE, SINE) ve uzun terminal tekrar retrotranspozonlarında (long terminal repeat retrotransposons, LTR) görülür (Besaratina ve ark., 2013). Memeli genomunda en iyi tanımlanan ve en çok bulunan retrotranspozon LINE-1'dir (Patchsung ve ark., 2012). LINE-1 yüksek düzeyde tekrarlanan (6000-8000 bp) bir retrotranspozondur ve global DNA metilasyon düzeyini değerlendirmek için CpG adacıklarına alternatif olabileceği düşünölmektedir. İnsan genomu 500.000 'den fazla LINE-1 kopyası içermektedir ve bunların yaklaşık 3000'i aktif transpozonlardır. DNA metilasyonu retrotranspozon ekspresyonunu inhibe ederek genom hasarını önleyen ana mekanizmadır. LINE-1 başta çeşitli kanser türleri olmak üzere çeşitli hastalıklarla ilişkilidir. Lökositlerdeki LINE-1 dizilerindeki 5-metilsitozinin (5mC) hem düşük hem de yüksek düzeyde bulunması ürotelyal mesane kanseri riskinde artış ile ilişkilendirilmiştir (Salas ve ark., 2014).

2.4.5. Histon Modifikasyonları

Ökaryotlarda kromatinin temel alt birimi olan nükleozom yaklaşık 147 bp uzunluğundaki DNA ipliğinin histon proteinlerinin, histon 2A (H2A), histon 2B (H2B), histon 3 (H3) ve histon 4 (H4) oluşturduğu oktameri iki kez sarmasıyla oluşur (D'Aquila ve ark., 2013; Tammen ve ark., 2013). Beşinci histon H1 proteini veya bağlayıcı histon H1 iki nükleozomu bir birine bağlamaktadır. Histonlar, DNA paketlenmesinin düzenlemesi ve transkripsiyonun baskılanmasıyla da ilişkilidir (Kanherkar ve ark., 2014).

Histon modifikasyonları, translyasyon sonrası histon kuyruklarında oluşan değişikliklerdir. Histon modifikasyonları asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon, ubikütinasyon, sumolasyon ve ADP ribozilasyonudur (Bollati ve Baccarelli, 2010).

2.4.6. Histon Metilasyonu ve Mesane Kanseri

Histon metilasyonu, histon metiltransferaz (HMT) ve histon demetilaz enzimleri tarafından kontrol edilmektedir (Choi ve Friso, 2010). Histon metilasyonu heterokromatin oluşumunu, X kromozomunun inaktivasyonunu, genomik imprinting, transkripsiyon ve DNA onarımını düzenler. Metil grupları lizin (K) amino asitlerine monometil, dimetil ve trimetil şeklinde aktarılırken, arginin amino asitleri monometil, simetrik veya asimetrik olarak metillenmektedir. Arginin metilasyonu genellikle transkripsiyonun aktivasyonu ile ilişkilirken, lizin metilasyonu, transkripsiyonun aktivasyonu veya baskılanmayla ilişkilidir. Histon proteinlerinin lizin ve arginin amino asitlerine S-adenozil metiyoninden metil gruplarının transferi, son derece spesifik modifiye enzimlerden olan HMT'ler tarafından kataliz edilmektedir (Muñoz-Najar ve Sedivy, 2011).

Histon kuyruklarının lizin metilasyonunun en iyi tanımlanmış bölgeleri H3K4, H3K9, H3K27, H3K36, H3K79 ve H4K20'dir. H3K4, H3K36 ve H3K79 metilasyonu transkripsiyonun aktivitesiyle ilişkili olmasına karşın H3K9, H3K27 ve H4K20 transkripsiyonun baskılanmasıyla ilişkilidir (Ellis ve ark., 2009; Fong ve ark., 2014).

Çeşitli çalışmalarda global histon modifikasyon düzeyinin kanser olguları için belirteç olduğu gösterilmiştir. İlk olarak, Seligson ve arkadaşları rekürens prostat kanserlerinde H3K4me2 ve H3K18Ac'nun düşük düzeylerde olduğunu göstermiştir (Seligson ve ark., 2005). Schneider ve arkadaşlarının mesane kanserli hastalarda invaziv ve invaziv olmayan mesane tümörlerinde ve normal ürotelyal dokularda H3K4 ve H4K20 düzeyinin farklı olduğunu, fakat H4K20me3 düzeyinin radikal sistektomi geçiren

hastalarda arttığını göstermiştir (Schneider ve ark., 2011). H3K9 ve H3K27 metilasyon düzeyi normal dokularda ve çeşitli ürolojik örneğin prostat kanseri, renal hücreli karsinomalarda farklılaşma göstermektedir (H3K9me1 ve H3K27me). Ayrıca invaziv olmayan mesane kanserinde artan H3K9me1, H3K9me2, H3K9me3, H3K27me1, H3K27me3 düzeyi ile tümör stage ve H3K9me2, H3K9me3, H3K27me1 düzeyi ile tümör grade arasında pozitif korelasyon görülmüştür (Ellinger ve ark., 2014).

2.4.7. Histon Asetilasyonu

Histon asetilasyonu kromatin yapısının kontrolü ve gen düzenlenmesi için önemlidir (Calvanese ve ark., 2009). Histon asetilasyonu en çok çalışılan histon modifikasyonlarından biridir (Choi ve Friso, 2010). H3 ve H4 histonların hiperasetilasyonu gen aktivasyonu ile ilişkilirken, hipoasetilasyonu ise kromatin inaktivasyonu ile ilişkilidir (Marti ve Ordovas, 2011). H3 proteinlerinin amino (N) terminalinde bulunan 9, 14, 18, 23 pozisyonlu lizinlerin ve H4 histon proteinlerin 5, 8, 12, 16 lizinlerinin asetilasyonu nükleozom yapısının yoğunluğunun azaltılması, DNA ve histon proteinleri arasındaki etkileşimlerin bozulmasına neden olur (Choi ve Friso, 2010).

2.4.8. Histon Asetilasyonu ve Mesane Kanseri

Histon asetilasyonu, histon asetiltransferazlar (HAT) tarafından deasetilasyonu ise histon deasetilazlar (HDAC'ler) tarafından gerçekleştirilir. HDAC'lar dört grupta sınıflandırılır. İlk sınıf HDAC'ların dört farklı izoformu vardır (HDAC-1, -2, -3 ve -8) ve onların aşırı ekspresyonu farklı kanser türlerinde örneğin kolon ve prostat kanserleriyle bağlantılı olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalar HDAC-1, -2 ve -3 çeşitlerinin normal urotelyumla kıyaslandığında invaziv olmayan mesane tümörlerinde (pTa ve pT1) yüksek ekspresyon seviyelerine sahip olduğunu göstermektedir (Poyet ve ark., 2014).

2.4.9. Kodlamayan RNA'lar ve Mesane Kanseri

Genel olarak, RNA'lar kodlanan ve kodlamayan olmak üzere ikiye ayrılır. Kodlayan RNA'lar açık okuma çerçevesine (open reading frame, ORF) sahiptir ve protein sentezi için kalıp oluşturmaktadır. Kodlamayan RNA'lar (non coding RNA, ncRNAs) bir ORF'ye sahip değildir ve proteinler kodlamazlar. RNA'ların sadece %2-5'nin yapısal ya da enzimatik proteinleri kodladığı bilinmektedir. Geriye kalan, RNA'ların %95'i kodlamayan RNA'lardır (Williams ve ark., 2014). ncRNA'ların stres ve çevresel uyarıcılara yanıt olarak gen ifadesini düzenleyen mikro RNA (miRNA), küçük

müdahaleci RNA'lar (small interfering RNA, siRNA), Piwi-etkileşim RNA (piwi-interacting RNA, piRNA), uzun kodlanmayan RNA (long noncoding RNA, lncRNA) gibi çeşitli türleri vardır (Mensaert ve ark., 2014).

İnsan genomunda genlerin yaklaşık %50'den fazlasını hedefleyen 1000'den fazla miRNA mevcuttur (Ribaric, 2012). Bazı araştırmacılar miRNA genlerinin %50'den fazlasının tümörlerle ilişkili bölgelerde yer aldığını göstermiştir. Buna ek olarak, farklı tümör türlerinde onkogenik ve anti-onogenik gibi fonksiyonlara sahip olabilen ve tümör gelişiminde rol oynayan özgül miRNA'lar eksprese edilmektedir (Chen ve ark., 2014). Örneğin, miR-17-5p, miR-21, miR-126, miR-221 tümör baskılayıcı, miR-26a, miR-29c, miR-30c, miR-30e-5p ise onkogen gibi görev yapabilmektedir. Yapılan çalışmalar, özgül miRNA'ların TCC'lerin gelişimi ve ilerlemesinde önemli rolü olduğunu göstermektedir. Ayrıca, miRNA ekspresyon profil analizleri hastalığın evresi ile ilgili ip uçları verebileceği, kanserin ilerlemesi ve prognozu için belirteç olabileceği bildirilmektedir (Volanis ve ark., 2010).

2.5. Hücre-Hücre Bağlantıları

Hücrelerin birbirine bağlanma yeteneği, çok hücreli organizmaların gelişimi, büyümesi ve doku homeostazı için temel koşullardandır. Hücre-hücre bağlantıları, çevresel stres yanıtlarına karşı direnç sağlamakta, gelişim sırasında doku yeniden şekillenmesinde ve aynı zamanda rejeneratif süreçlerde rol almaktadır. Epitelyal dokularda yapısal ve sinyal fonksiyonlarına sahip hücre-hücre bağlantıları sıkı bağlantılar (tight junctions, TJs), adherens bağlantılar (adherens junctions, AJs) ve desmozomlar tarafından yapılmaktadır (Schneider ve Kolligs, 2014).

2.5.1. Kaderinler

Adherens bağlantı moleküllerinin, en büyük elemanları kaderinlerdir ve ilk tespit edilen bağlantı molekülü olması nedeniyle klasik kaderinler olarak adlandırılırlar (Schneider ve Kolligs, 2014). Kaderinler, Ca^{2+} bağımlı homofilik hücre-hücre bağlantısını oluşturan tek zincirli zar glikoproteinleridir. Moleküler yapısına göre tip I ve tip II kaderinler olarak ikiye ayrılır. İlk sınıf klasik kaderinler epitelyal (E) E-kaderin/kaderin-1 (*Cdh1*), N-kaderin/kaderin-2 (*Cdh2*), plasental (P) P-kaderin/kaderin-3 (*Cdh3*), R-kaderin/kaderin-4 (*Cdh4*) proteinlerini içerir (Marie ve ark., 2014). E-kaderin, 120 kDa'luk glikoprotein olup klasik kaderin ailesinin ilk tespit edilen üyesidir ve hemen hemen tüm epitelyal dokularda bulunur. P-kaderin, fare plasentasında gebelik süresince yüksek oranda eksprese olunduğu bulunmuştur. Nöral (N) N-kaderin, yetişkin ve embriyonal dönemde nöron ve kas hücreleri tarafından eksprese edilmektedir (Gama ve Schmitt, 2012). Epitelyal ve nöral kaderinlerin gen dizilimi ve yapılarının çok benzer olmasına rağmen, her biri spesifik adezyon özelliklerine sahiptir. Aynı zamanda tümör oluşumu sırasında ve invaziv metastaz hücrelerinde ters rollere sahip olduğu varsayılmaktadır (Schneider ve Kolligs, 2014). Tip II kaderinlerden olan ve osteoblast kaderin olarak da bilinen Kaderin-11 (*Cdh11*) ise mezodermal dokularda eksprese edilir.

Kaderinler lateral kümeler halinde birleşerek homodimerler oluştururlar. Sis-dimerler adı verilen bu yapılar diğer komşu hücrenin kaderinlerine bağlanarak trans-dimer oluşturmakta ve bu şekilde hücre-hücre bağlantısı kurmaktadır (Marie ve ark., 2014). Kaderin molekülleri karboksil (C) ve amino (N)-terminal bölgelere sahiptir. Komşu hücrelerin yüzeylerinde bulunan kaderinlerin N-terminali bağlantıyı sağlarken, C-terminali sitoplazmik proteinlerle ilişki kurmaktadır (Niessen ve ark., 2011). Kaderinler

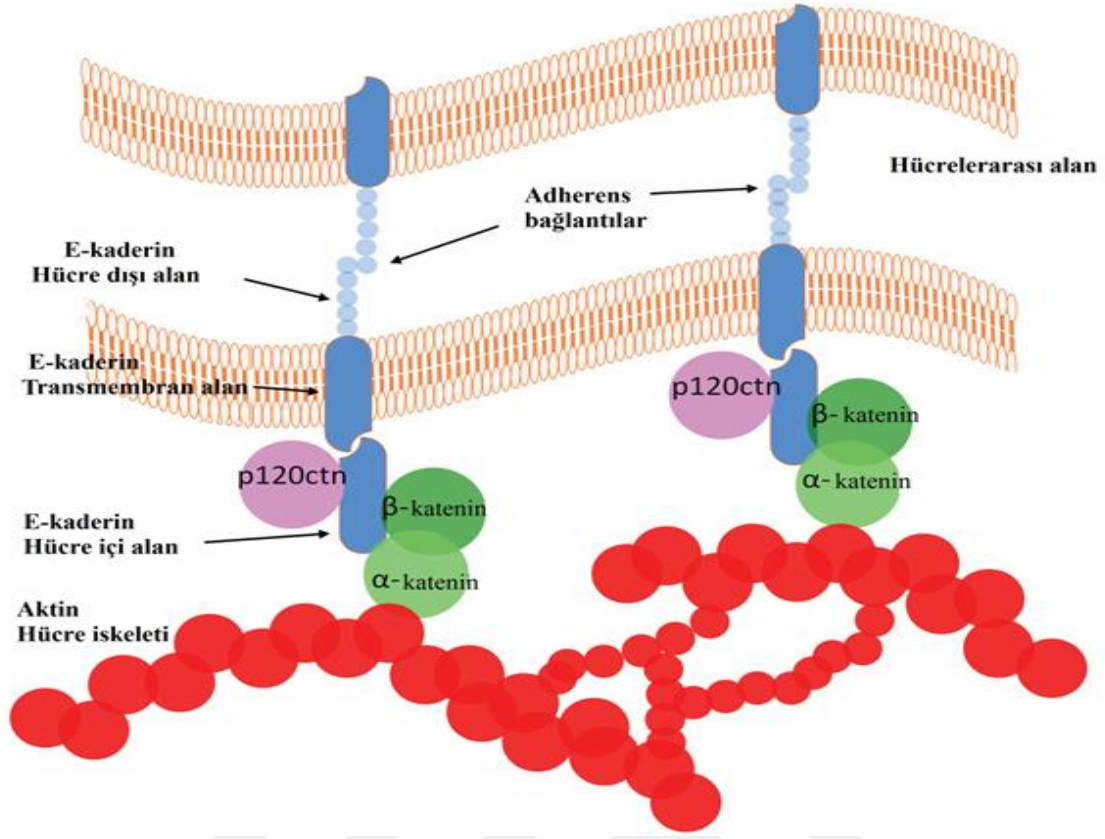
adherens bağlantı moleküllerinden olan α -, β - ve γ -kateninlerle hücre iskeleti elemanlarına sabitlenmektedir (Marie ve ark., 2014).

2.5.2. Kateninler

En iyi tanımlanmış sitoplazmik bağlantı molekülleri α -katenin, β -katenin ve p120-katenindir (p120-ctn). α -katenin ve β -katenin, E-kaderinle birlikte immonopresipitasyonu yapılarak tanımlanmıştır. p120-ctn, ilk olarak Src protein tirozin kinaz substratlarının tanımlanması sırasında tespit edilmiş ve daha sonra klasik kaderinlerin immonopresipitasyonu ile tanımlanmıştır. β -katenin, ~76 amino asit içeren kaderinlerin sitoplazmik alanına doğrudan bağlanır ve aynı zamanda doğrudan kaderin molekülüne bağlanmayan α -katenin için sabitlenme bölgesi olarak görev yapmaktadır. p120-ctn kaderinlerin sitoplazmik alanının membrana yakın bölgesine bağlanır. Bu katenin moleküllerinin her birinin kaderinlerden bağımsız hücresel fonksiyonları vardır. β -katenin Wnt sinyal yolağında işlev yaparken, α -katenin aktinlerin regülasyonunu düzenler (Niessen ve ark., 2011). Tirozin kinazlar tarafından düzenlenen p120-katenin kaderinlerin sitoplazmik kısmının jukstamembran alanıyla (JMD) direkt olarak bağlanır ve hücre içi trafiği, stabiliteyi, bağlanma kapasitesi ve hücre hareketini düzenlemektedir (Gama ve Schmitt, 2012).

2.5.3. E-kaderin, Yapı ve Fonksiyonu

Yaklaşık 100 kb'lik bir bölge kapsayan *E-kaderin* geni kromozom 16q22.1 lokalizedir. *CDH1* geni 16 ekzon ve 15 intron içermektedir ve türler arasında yüksek oranda korunmuştur. E-kaderin hücre dışı, transmembran ve hücre içi alana sahiptir (Gall ve Frampton, 2013). Hücre dışı alan beş ardışık diziden (EC1-EC5) oluşmaktadır (Hirohashi ve Kanai, 2003). E-kaderin moleküllerinin kendi aralarında tanınma ve birleşmesine özellikle ilk alan (EC1) aracılık etmektedir. EC2-EC5 alanları hücre-hücre bağlanmasına katkı sağladığı tahmin edilmektedir (Schneider ve Kolligs, 2014). Ca^{2+} iyonları için bağlanma bölgesi olan hücre dışı alan, lateral dimerizasyon oluşturarak komşu hücrelerin kaderinlerinin hücre dışı alanlarına bağlanır. Bu kaderin-kaderin ara yüzünün oluşumunu sağlar ve böylece hücre-hücre yapışması gerçekleşir. Hücre içi alan jukstamembran denilen alan (JMD) ve katenin bağlayıcı alanından (catenin-binding domain, CBD) oluşur (Gall ve Frampton, 2013).



Şekil 1. E-kaderin ve hücre-hücre bağlantısı (Gall ve Frampton 2013'den uyarlanmıştır). Hücreler E-kaderin proteininin hücre dışı alanlarının dimerizasyonu yoluyla bağlantı kurmuştur

JMD kaderinlerin kümelenmesini sağlar ve p120-katenin üzerinden kaderinlerin yapıştırıcı gücüne katkıda bulunmaktadır. CBD, β-katenin ve γ-katenin ile etkileşime girer. α-katenin (vinkülin homologdur) ise β-katenin hücre iskelet elemanlarından olan aktine bağlanmasını sağlar. Bu bağlantı, protein kümeleşmesini tetikler ve hücre-hücre bağlantıları daha da kuvvetlenir. Böylece E-kaderin normal yetişkin epitelyal dokularda hücre-hüce adezyonunu gerçekleştirmektedir. Ayrıca, kaderin-katenin kompleksi bazı sinyal kaskad yollarını aktive edebilir ve epitelyal-mezenkimal geçişte (epithelial-to-mesenchymal transition, EMT) aktif bir role sahiptir (Gall ve Frampton, 2013).

2.5.4. Kaderin-Katenin Düzenlenmesi

Hücre adezyonu transkripsiyon, protein stabilitesi, β-katenin ve p120-kateninin translasyon sonrası modifikasyonu ve fosforilasyonu olmak üzere çeşitli seviyelerde düzenlenmektedir. Kaderin-aracılı adezyonda aynı zamanda Wnt, TGF-β, MAPK gibi hücre içi sinyal yolları da rol alabilmektedir. Kaderin-katenin kompleksi embriyogenez ve doku onarımı, tümör gelişimi ve ilerlemesinde büyük öneme sahiptir (Gama ve Schmitt, 2012).

Wnt sinyal yolağı embriyonik gelişim, hücre göçü, çoğalması ve hücre-hücre bağlantılarının kurulması gibi süreçlerde önemli role sahiptir. Wnt ve kaderin yolakları, β -katenin aktivitesiyle bağlantılı olup gen ekspresyonu ve hücre adezyonunu düzenler. β -katenin, Wnt sinyal yolağının düzenleyicilerinden biridir ve Wnt proteinlerinin hücre-yüzey reseptörlerine (Frizzled ailesi) bağlanmasını sağlamaktadır. Bu bağlanma gerçekleşikten sonra β -katenin sitoplazmadan nükleusa doğru geçişi sağlar. Burada β -katenin, hedef genin transkripsiyonuyla sonuçlanan T-Hücre Faktörü (T-cell factor: TCF)/Lenfoid Enhanser Faktör (lymphoid enhancer factor, LEF) kompleksini aktive eder. Örneğin c-MYC onkogeni aktive olursa bu hücre göçünü, hücre çoğalmasını, hücre büyümesini uyarırken aynı zamanda apoptozu da indükler. Sitoplazmik β -katenin düzeyi adherens özellikle E-kaderinlerle kontrol edilmektedir. E-kaderinle, β -katenin bağlantısının bozulması β -katenin düzeyini değiştirmekte ve aynı zamanda Wnt sinyal yolağının hasar görmesine yol açmaktadır. Adherens bağlantıların ve E-kaderin/ β -katenin kompleksinin stabilitesi, serin/treonin fosforilasyonu ile düzenlenmektedir. β -katenin veya E-kaderin serin/treonin fosforilasyonu kaderin-katenin kompleksinin stabilizasyonu artırırken, β -katenin tirozin fosforilasyonu bu kompleksi bozarak, hücre-hücre adezyonunun kaybına, sitoplazmik β -katenin serbest bırakılmasına, Wnt sinyal ve tümör invazyonun artmasına yol açmaktadır (Gall ve Frampton, 2013).

2.5.5. Epitelyal-Mezenkimal Geçiş

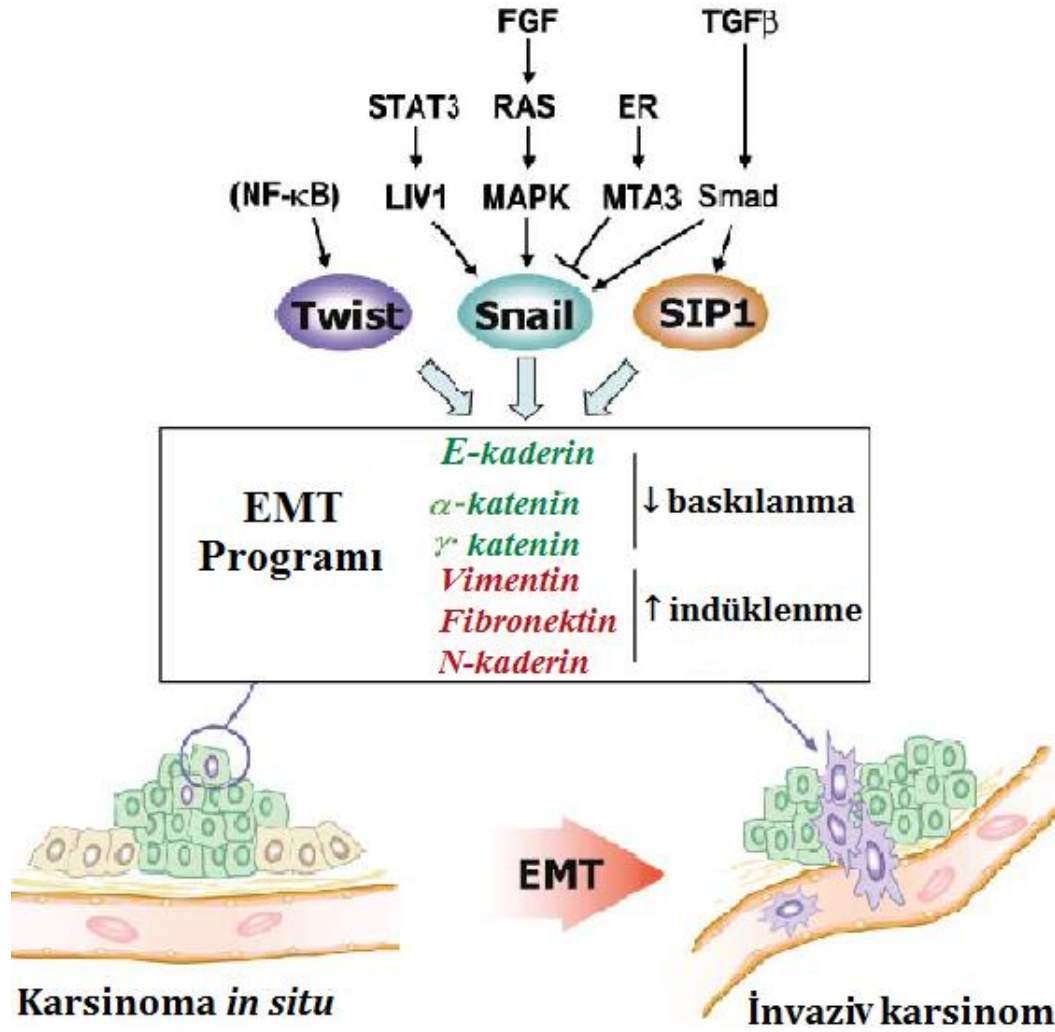
Epitelyal-mezenkimal geçiş (epithelial-mesenchymal transition, EMT) geri dönüşümlü ve dinamik bir süreç olup, doku gelişimi ve onarımı sırasında epitelyal ve mezenkimal fenotipler arasındaki geçiş sağlar (Schneider ve Kolligs, 2014). EMT, histogenez ve organogenezi kapsayan, organizmanın gelişimi için gerekli olan normal bir süreçtir. Embriyonik dönemde özellikle nöral krest oluşumu, kalp kapaklarının oluşması ve gastrulasyon sırasında büyük öneme sahiptir. Mezenkimal hücreler farklılaşarak epitel hücre fenotipi sergileyebilir. Mezenkimal-epitelyal geçiş ise (mesenchymal-epithelial transition, MET) farklı organlarda makroskopik metastaz oluşumunda önemli bir rol oynar. Fibronektin, vitronektin gibi farklı hücre dışı belirteçler ve hücrede lokalize olan vimentin, E-kaderin belirteçleri EMT/MET farklılaşma durumunu belirlemede yardımcı olur (Barriere ve ark., 2015).

2.5.6. Gelişim Sırasında EMT

İnsan gelişiminin erken safhasında, EMT morfogenez, implantasyon, gastrulasyon ve organogenezde rol alır. Yaşlı bireylerde EMT/MET doku onarımı, özellikle dejeneratif değişiklikler veya enflamasyon sonrası hücre homeostazının korunması için gereklidir. Epitelial hücre-hücre bağlantısından sorumlu olan *E-kaderin* geninin Snail, Twist ve ZEB gibi transkripsiyon faktörleri tarafından baskılanması, normal embriyonik gelişim sırasında EMT'nin altında yatan temel moleküler mekanizmadır. Normal embriyonik gelişim sırasında hücre polaritesinin ve hücre-hücre bağlantısının kaybı, hücre şeklinin değişmesi, hücre motilitesi ve invazyonunun artması organ matürasyonu için çok önemlidir (Kiesslich ve ark., 2013).

2.5.7. Kanser ve EMT

EMT önemli bir normal embriyonik bir süreç olmasına rağmen kontrolsüz şekilde malign tümörlerde de görülmektedir. Tümör dokularında epitelial hücreler çok sayıda biyokimyasal değişiklikler geçirerek mezenkimal hücre fenotipi kazanmaktadırlar. Bu değişikliklerden en önemlisi epitelial hücre proteinlerinin özellikle de E-kaderinler arasında olan bağlantıların kaybolmasıdır. Mezenkimal özellik kazanan bu hücreler polarite yeteneği olmayan, son derece hareketli ve invaziv özellik kazanırlar. Epitel hücreler, bu geri dönüşümlü değişikliği yaparak uzak bölgelere hareket edebilir ve yeni bir yapı oluşturmak için yeniden farklılaşma geçirebilir. Tüm bunların gerçekleşebilmesi için epitel hücrelerin bir birleriyle olan adheziv bağlantılarını kırması gerekir. Kanseri hücreleri, EMT geçirerek kendini yenileme, yeni tümör oluşumunu tetikleme ve aynı zamanda kemoterapiye karşı direnç kazanma gibi kök hücre özellikleri kazanmaktadır. Bu nedenle kontrolsüz EMT, tümör invazyonu ve metastaza neden olur. E-kaderin mezenkimal hücrelerde ekspres edilmemektedir. Bu durum, Wnt sinyal artışı ve hücre-hücre adezyon kaybıyla sonuçlanmaktadır (Gall ve Frampton, 2013). Wnt, Hedgehog, TGF- β , FGF ve EGF insan karsinogenezinde görev alan klasik EMT indükleyici yolaklarıdır (Kiesslich ve ark., 2013).



Şekil 2. EMT düzenlenmesi (Kang ve Massague, 2004'dan uyarlanmıştır)

E-kaderin ekspresyon kaybı epitelial kanserlerin ilerlemesi sırasında EMT'nin sıkça rastlanan özelliklerinden biridir. E-kaderin ekspresyon kaybının altında yatan mekanizmalar, kromozom 16'nın uzun kolunda lokalize *CDH1* geninin heterozigotluk kaybı, somatik genlerde yer alan mutasyonlar, CpG adacıklarının hipermetilasyonu, *E-kaderin* geninin promotor bölgesinin epigenetik susturulması ve *SNAI1* ve *SNAI2*, *Twist* (şekil 2) ve *ZEB1/ZEB2* gibi transkripsiyonel baskılayıcıların aşırı ekspresyonudur (Schneider ve Kolligs, 2014).

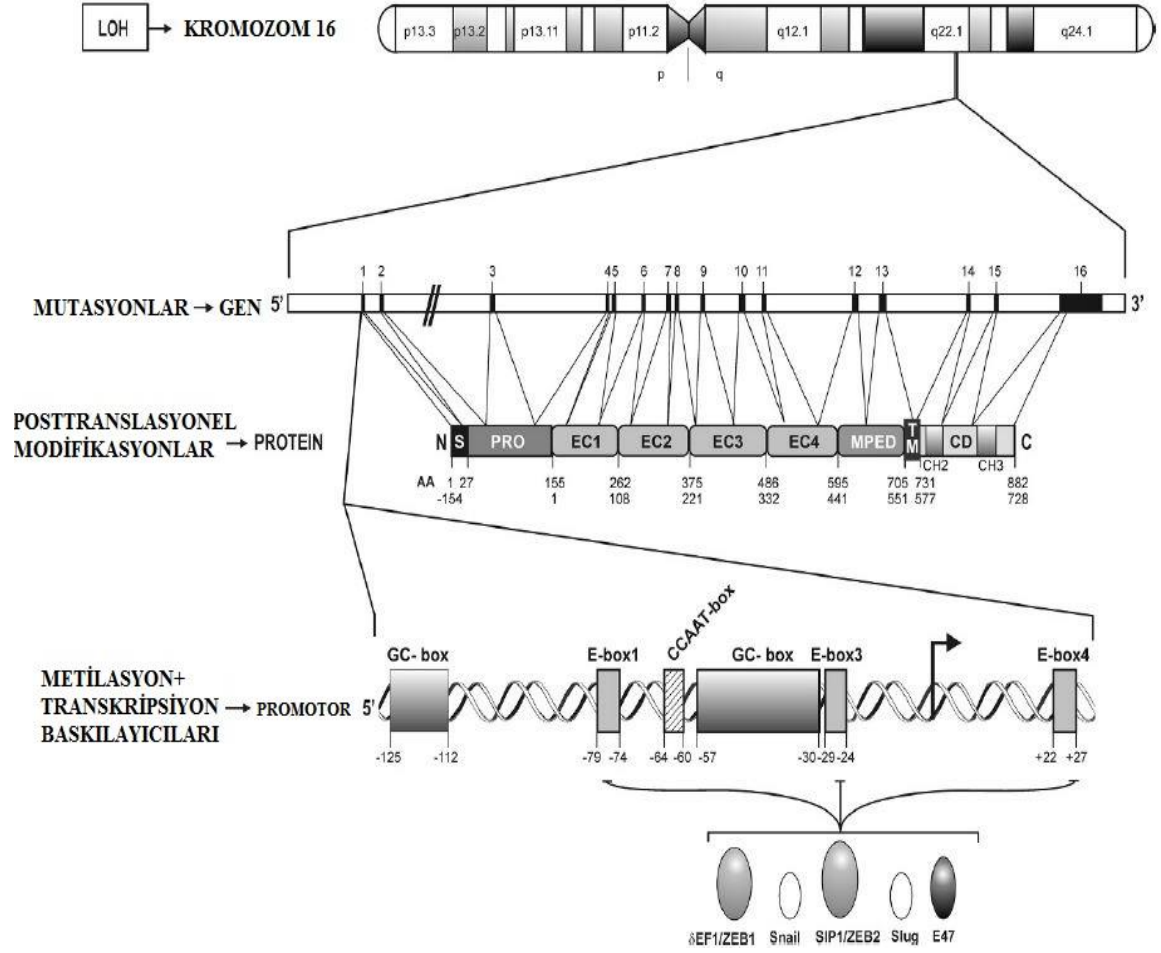
2.5.8. Kanser Gelişiminde E-Kaderin Düzenleme Mekanizmaları

Tümör gelişimi sırasında, E-kaderin fonksiyonu farklı mekanizmalarla örneğin, somatik mutasyonlar, promotor metilasyonu ve transkripsiyonel baskılanma yoluyla inaktive olabilmektedir (Peinado ve ark., 2004). E-kaderinin fonksiyon kaybına neden

CDHI geninin genomik değişiklikleri çeşitli tümörlerde tanımlanmıştır. Lobüler meme kanserinin sporadik alt tipinin karsinogenezinde, somatik *E-kaderin* mutasyonları rapor edilmiştir (Li ve ark., 2013).

Ayrıca, *CHDI* geninin somatik mutasyonları rahim ve yumurtalık tümörlerinde, mide kanseri ve mide kanseri hücre hatlarında tanımlanmıştır (Li ve ark., 2013). DNA metilasyonu kanser gelişiminde genomik DNA hipometilasyonu veya CpG adacıklarının hipermetilasyonu olarak görülür. CpG adacıklarının hipermetilasyonu tümör baskılayıcı genlerin baskılanmasında önemli rol oynamaktadır (Peinado ve ark., 2004). Tümör hücrelerinde düşük *E-kaderin* ekspresyonunun nedenleri arasında *CDHI* genin promotor bölgesindeki CpG adacıklarının hipermetilasyonu da gösterilmektedir. Nitekim, *CDHI* promotor bölgesindeki 5' CpG adalarının bozulmuş metilasyonu tiroid, hepatosellüler, gırtlak kanseri, kolorektal kanser ve prostat kanserler gibi çeşitli kanserlerde tanımlanmıştır (Schmalhofer ve ark., 2009). Aynı zamanda deneysel çalışmalar *E-kaderin* geninin hipermetilasyonu ile mesane kanseri yatkınlığı ve prognozu ile ilişkili olduğunu göstermektedir (Li ve ark., 2013).

Çeşitli kanser hücre hatlarıyla (örneğin, kolorektal kanser) yapılan çalışmalar, *E-kaderin* geni promotoru ile MeCP2, MBD1 ve MBD2 gibi çeşitli MBD'ler arasındaki ilişki olduğu bildirilmiştir. MBD proteinleri histon deasetilasyonunu tetikleyerek *E-kaderin* gen ekspresyonunu düzenlemektedir (Peinado ve ark., 2004).



Şekil 3. Kromozom 16q22.1 lokalize olan *CDH1* geni, promotor bölgesinin yapısı ve kodlanmış E-kaderin proteini (Roy ve Berx, 2008'den uyarlanmıştır)

E-kaderin transkripsiyonel baskılayıcıları ilk olarak Cano ve ekibi tarafından açıklanmıştır. Çeşitli baskılayıcılar farklı kanser türlerinde E-kaderin transkripsiyonuyla ilişkilendirilmiştir (Şekil 3). Snail, Slug, SIP1/ZEB2, EF1/ZEB1, E12/E47 gibi represörlerin E-kaderin transkripsiyonunu doğrudan baskıladığı bildirilmiştir (Roy ve Berx, 2008).

2.6. Hücre Döngüsü Düzenleyicileri

Ökaryotlarda hücre döngüsü periyodik olarak siklinler ve siklin bağımlı kinazlar tarafından kontrol edilir. CDK'ler siklin/CDK kompleksini farklı düzeylerde düzenlemektedir (Dante ve ark., 2014; Sanchez-Martinez ve ark., 2015).

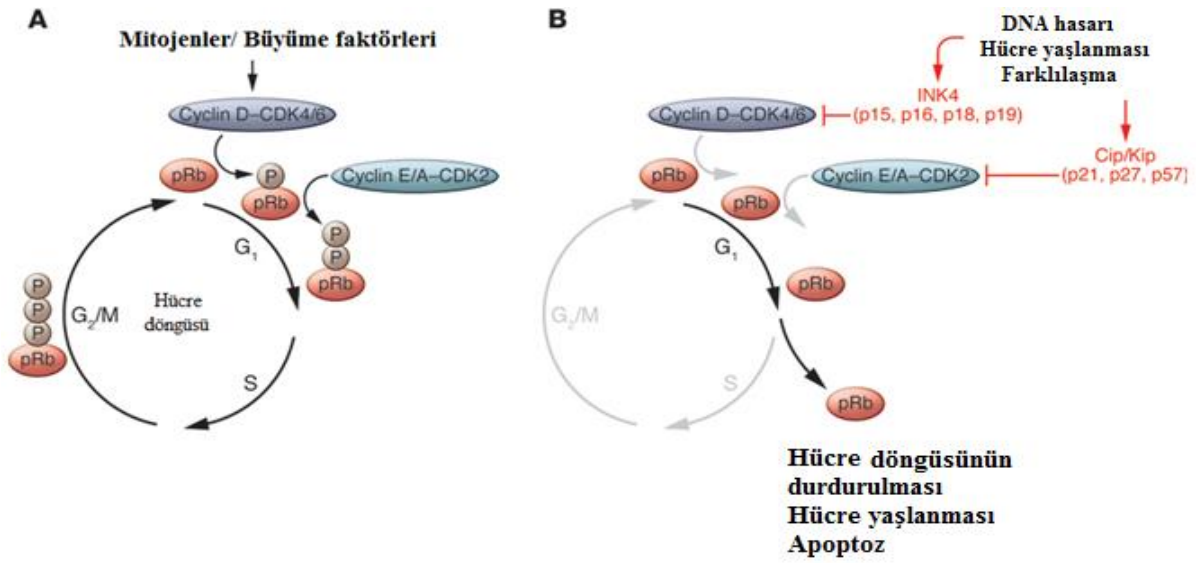
Siklin bağımlı kinaz inhibitörlerinden olan $p14^{ARF}$ ve $p16^{INK4a}$ hücre döngüsünün negatif inhibitörleridir ve bu nedenle potansiyel tümör baskılayıcı genler olarak kabul edilirler. Bu genlerin promotor bölgelerinin hipermetilasyonu sonucu oluşan inaktivasyon, malignitelerin ilerlemesine ve patogenezinin katkı sağlar. Mesane kanseri dokularında, $p14^{ARF}$ ve $p16^{INK4A}$ promotor hipermetilasyonu yaygın olarak incelenmiştir. Bazı çalışmalar, $p14^{ARF}/p16^{INK4a}$ genlerinde olan genetik değişiklikler sırasında heterozigotluk kaybı, homozigot delesyonlar ve nokta mutasyonları olduğunu göstermektedir. $p14^{ARF}/p16^{INK4a}$ metilasyonu frekansları ve patolojik stage ile mesane kanseri hastaların prognozu arasında önemli derecede korelasyon bulunmaktadır (Enokida ve Nakagawa, 2008).

Kanser olgularında kromozom 9p21'de yer alan *INK4/ARF* (alternative reading frame, ARF) lokusunun delesyonu sık görülmektedir. Glioblastom, melanom, pankreatik adenokarsinom, akciğer kanseri, mesane kanseri ve orofarengeal kanserin de dahil olduğu çeşitli malignitelerde bu lokusun delesyonu yüksek sıklıkta görülür (Sharpless, 2005). Otuz beş kilobaz (kb) büyüklüğündeki *INK4/ARF* lokusunda bulunan *ARF* ($p19^{ARF}$ ve $p14^{ARF}$), $p15^{INK4b}$ ve $p16^{INK4A}$ genleri farklı tümör baskılayıcı proteinleri kodlamaktadır. $p15^{INK4b}$ kendi açık okuma çerçevesine sahipken, $p16^{INK4A}$ ve *ARF* genlerinin ilk ekzonları farklı olup, iki ve üçüncü ekzonları ortaktır. Alternatif okuma çerçevesi sonucunda $p16^{INK4a}$ ve *ARF* genlerinin protein ürünleri izoformlar değildir ve herhangi bir amino asit homolojisine sahip değildir (Kim ve Sharpless, 2006).

2.6.1. p16^{INK4A} ve Retinoblastom (RB) Aktivitesinin Düzenlenmesi

Memelilerde, CDKİ sınıfı olan *INK4*, neredeyse tamamen 4-6 ankirin tekrarlarından oluşan p15^{INK4b}, p16^{INK4a}, p18^{INK4c} ve p19^{INK4d} içermektedir. p18^{INK4c} ve p19^{INK4d} gelişim sırasında yüksek derecede eksprese edilmektedir. p15^{INK4b} ve p16^{INK4a} tümör baskılanmasıyla daha çok ilişkilendirilmiştir. p18^{INK4c} ve p19^{INK4d} genlerinden yoksun farelerde çeşitli somatik anomamiler görülürken, p15^{INK4b} ve p16^{INK4a} kaybı tümör gelişimi ile ileri derecede ilişkili olduğu görülmüştür (Sharpless, 2005).

Şekil 3. pRb tarafından hücre döngüsünün düzenlenmesi (Sachdeva ve O'Brien, 2012'den uyarlanmıştır)



A: Mitotik sinyale yanıt olarak pRb siklin D-CDK4/6 tarafından fosforillenir. İkinci fosforillenme geç G1 döneminde siklin E/A-CDK2 gerçekleştirir. Fosforillenerek inaktif olan pRb, G2/M evresinde yeniden fosforillenir. Hücre döngüsü tamamlandıktan sonra defosforillenen pRb yeniden aktif hale gelir. **B:** Antiproliferatif sinyallere yanıt olarak aktifleşen siklin-bağımlı kinaz inhibitörleri pRb'yi aktifleyerek hücre döngüsünü durdurmaktadır

Retinoblastom protein (pRb) aktivitesi, hücre döngüsü boyunca fosforilasyon düzeyi ile kontrolü edilir. pRb hipofosforillenmişse bir transkripsiyon faktörü olan E2F'e bağlanarak kompleks yapı oluşturmakla hücrelerin proliferasyonunu hücre döngüsünün G1 evresinde durdura bilmektedir. Ayrıca, pRb büyüme sinyallerine yanıt olarak CDK'lar tarafından fosforillenebilmektedir. Fosforillenmiş durumda olan pRb, E2F'i serbest bırakır ve E2F hedef genlerin ekspresyonunu sağlayarak hücrelerin S fazına geçmesine, böylece hücre döngüsünün ilerlemesini sağlar (Sachdeva ve O'Brien, 2012).

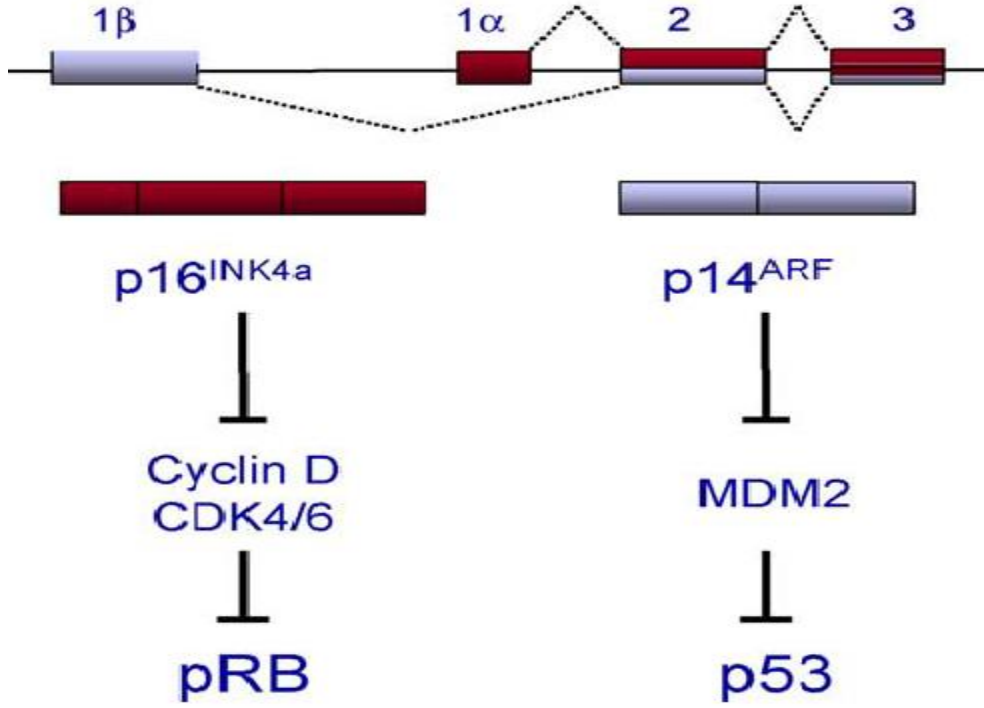
Rb işlevi için önemli olan *INK4* proteinleri CDK4 ve CDK6'ya bağlanarak kinaz aktivitelerini inhibe etmektedir. *INK4* bağlanması, CDK'ların aktivite kazanması için

gerekli olan D-tipi siklinlerle etkileşimini önler. Bu nedenle $p16^{INK4a}$ veya diğer *INK* üyelerinin ekspresyonu, CDK4/6 kinaz aktivitesinin azalması, Rb'nin hipofosforilasyonu ve bu durumda E2F'in baskılanması hücre döngüsünün G1'de durdurulmasına yol açar (Sharpless, 2005). pRb defosforilasyonu ve aktivasyonu siklin bağımlı kinaz inhibitörleri (p15, p16, p18, p19) yanı sıra fosfatazlar ve Cip/Kip (p21, p27 ve p57) tarafından da kontrol edilmektedir. CDKİ'leri DNA hasarı, hücre yaşlanması ve farklılaşma sinyalleri de dahil olmak üzere çeşitli antiproliferatif sinyallere yanıt olarak ifade edilir (Sachdeva ve O'Brien, 2012).

2.6.2. *p14* Geni ve Etki Mekanizmaları

Tümör baskılayıcı bir protein olan ARF (insanlarda $p14^{ARF}$, farelerde $p19^{ARF}$), *INK4a/ARF* lokusunun alternatif transkripti olarak tanımlanmıştır. *ARF* lokusu insanlarda 9p21 üzerinde yerleşiktir, farelerde kromozom 4'de yer alır. İnsan ve farelerde ARF proteinleri arginine zengin, hidrofobik proteinlerdir. İnsanda bulunan ARF proteini 13902 Da molekül ağırlığında olup, 132 amino asitten oluşmaktadır. Fare homologu ise 169 amino asitli, 19238 Da'lık bir moleküler ağırlığa sahiptir (Gallagher ve ark., 2006). $p14^{ARF}$ tümör baskılayıcı geni kendine özgün tek ekzon içerirken, ekzon 2 ve ekzon 3 $p16^{INK4a}$ geninin içinde farklı okuma çerçevesine sahiptir (Sailasree ve ark., 2008).

INK4a/ARF Lokusu



Şekil 4. INK4a/ARF lokusu. $p14^{ARF}$ (farede $p19^{ARF}$) ve $p16$ için açık okuma çerçevesi gösterilmiştir (Sharpless, 2005'den uyarlanmıştır) İlk ekzon her iki gen için özgündür, fakat ikinci ve üçüncü ekzon ortaktır. $p16^{ARF}$ RB fosforilasyonunu gerçekleştiren CDK4/6 aktivitesini inhibe ederek hücre döngüsü durmaktadır. $p14^{ARF}$, MDM2-aracılı p53 parçalanmasını inhibe ediyor

Ekzon 1β $p14^{ARF}$ 'nin antiproliferatif fonksiyonunda önemli bir rol oynar. Özellikle bu ekzonun delesyonu $p14^{ARF}$ proteininin hücre döngüsünü durdurmak ve Mdm2'ye bağlanmasını engeller (Ozenne ve ark., 2010).

2.6.3. ARF Ekspresyonu ve Degradasyonu

Çeşitli onkogenler (*Ras*, *c-myc*, *E1A* ve *E2F1*) $p19^{ARF}$ ekspresyonunu artırarak hücre döngüsünün ilerlemesini sınırlamaktadır. $p14^{ARF}$ düzenlenme mekanizması iyi bilinmemekle birlikte, radyasyon ve genotoksik ilaçlar $p14^{ARF}$ ekspresyonunu artırdığı ve aynı zamanda DNA hasarına sahip hücrelerin elimine edilmesine katkı sağladığı bilinmektedir. Bunlara ek olarak viral enfeksiyonlar ve *c-myc* gibi onkogenik strese yanıt olarak ARF ubiquitinasyonu ve degradasyonu da ARF'nin düzenlenmesinde yer almaktadır. Ekzon 1β özellikle $p14^{ARF}$ stabilitesi için çok önemlidir. Bazı çalışmalar, ARF proteinlerinin parçalanmasının kısmen proteazomlara bağlı olduğunu ve bunun yanı

sıra ARF proteinlerinin N-terminal kısmının p53 ve MDM2'den bağımsız ubiquitinasyona maruz kaldığını göstermiştir (Ozenne ve ark., 2010).

2.6.4. ARF Proteinlerinin Tümör Baskılanmasındaki Roller

ARF'nin çok iyi tanımlanmış fonksiyonlarından biri onkogen aktivasyonuna yanıt olarak anormal hücre büyümesini engellemektir. Transkripsiyon faktörü olan p53 çok sayıda apoptozu başlatıcı faktörlerin ve hücre döngüsünü inhibe genlerin ekspresyonu arttırarak bu işlemi sağlamaktadır. Hedef genlerin transkripsiyonun düzenlenmesinde görev yapan p53, stres sinyali olmadığı zaman hücrelerde proteazom enzimleriyle parçalanması nedeniyle düşük düzeylerde bulunur. E3 ubiquitin ligaz olan MDM2, p53 proteinin en önemli negatif düzenleyicisidir (Ozenne ve ark., 2010). MDM2 çeşitli yollarla p53'ün negatif düzenlemesini gerçekleştirmektedir. Örneğin, p53'ün hedef genlere bağlanıp transkripsiyonunu sağlamak yeteneğini engeller. Aynı zamanda MDM2 ubiquitin ligaz aktivitesine sahip olup p53'ün parçalanmasına katkı sağlar (Sherr ve Weber, 2000).

DNA hasarı, ribonükleotid azalması, beslenme yetersizliği, hipoksi ve onkogen aktivasyonu da dahil olmak üzere çok sayıda stres sinyallerine yanıt olarak p53, çeşitli enzimler (kinaz, fosfataz, asetiltransferazlar, deasetilazların, ubiquitin, ligazlar) tarafından post-translasyonel modifikasyon yoluyla stabilize edilmektedir. Aktif hale geçtikten sonra özgül DNA dizisine bağlanan p53, hedef genlerin ekspresyonunu düzenleyerek genom bütünlüğünü korur ve hücre döngüsünün durdurulması, apoptozis, hücre yaşlanması, enerji metabolizması, otofaji yollarıyla tümör oluşumunu önlemektedir (Liu ve ark., 2014). ARF ubiquitin ligazların MDM2 ve ARF-BP1/Mule (ARF-binding protein1/Mcl1-ubiquitin ligase E3) inhibitör etkilerini nötralize ederek p53 aktivitesini düzenlediği ve stimüle ettiği düşünülmektedir. Her iki protein p53 için spesifik ubiquitin ligazdır ve onun tümör baskılayıcı fonksiyonunu inhibe edebilmektedir. ARF proteinleri aşırı ifade edildiğinde, MDM2 ile etkileşime geçer ve MDM2 aracılı ubiquitinasyonu, p53'ün proteazomlar tarafından parçalanması ve nükleer transportunu bloke eder (Ozenne ve ark., 2010). MDM2 onkoproteini tarafından p53 proteolizi engellendikten sonra serbest kalan p53 hücre döngüsünü G1 ve G2'de durdura bilmektedir (Kawamoto ve ark., 2006; Williams ve ark., 2014). ARF aynı zamanda ARF-BP1 ubiquitin ligaz üzerinden de p53 yolağını uyarabilmektedir. Anormal onkogen aktivasyonu sonucu uyarılan ARF, ARF-

BP1 tarafından nükleer p53 proteazomal parçalanmasını önleyerek p53'ün hücre döngüsünü durdurmasını veya apoptozun başlatmasını sağlar (Ozenne ve ark., 2010).

2.6.5. p53 Ubikütinasyonu

Post-translasyonel modifikasyonlar p53 protein işlevini kontrol altında tutmaktadır. Asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon, sumolasyon ve ubikütinasyon gibi histon modifikasyon mekanizmaları, p53'ün transkripsiyonel fonksiyonunu ve dayanıklılığını olumsuz etkilemektedir. Ubikütin yolağı, geridönüşümlü mekanizması sayesinde sinyalizasyon, protein yıkımı, DNA onarım ve apoptozu kapsayan çeşitli hücresel fonksiyonları kontrol etmektedir. Ubikütinasyon işlemi E1 aktive edici, E2 konjüge edici ve E3 ubikütin ligaz enzimleriyle yönetilir. Bu enzimler ubikütin molekülüne bağlanarak işlev yapmaktadır. Ubikütin molekülü hedef substratın lizin amino asitleriyle (monoubikütinasyon) veya diğer ubikütin proteinleriyle (poliubikütinasyon) etkileşime geçebilir. E3 ubikütin ligaz aktivitesine sahip MDM2, p53 ubikütinasyonunu hayata geçirerek p53 proteiniyle negatif düzenlenme oluşturmaktadır (Brooks ve Gu, 2011).

2.6.6. Kanser ve p14^{ARF} Genetik Değişimleri

Promotor metilasyonu ve yanlış anlamlı mutasyonlar, p14^{ARF} delesyonu ve ona eşlik eden p16^{INK4a} kaybı kanser vakalarında sıklıkla görülmektedir. Bununla birlikte, ekzon 1β'de oluşan lezyonlar yalnızca p14^{ARF} fonksiyonunu etkilemektedir (Sharpless, 2005). Germ hücre hattı p14^{ARF}'ye özgü ekzon olan 1β mutasyonu çeşitli melanom ve nöral hücre tümörlerine özgü bildirilmiştir (Domínguez ve ark., 2002). Örneğin, ailevi melanom ve astrositomda ekzon 1β mutasyonu p16^{INK4a} fonksiyonunu etkilememektedir (Sharpless, 2005). Karsinogenez süresince otozomal genlerin CpG adacıkları yaygın olarak metilasyona uğrar. CpG adacıkları p14^{ARF} geninin promotor bölgesinde, p16^{INK4a} genini ekzon 1'in kodlama dizisinin 5' ucunda yer almaktadır. p14^{ARF} promotor hipermetilasyonu kolorektal, mide, mesane, akciğer ve primer meme tümörlerinde görülmüştür (Domínguez ve ark., 2002).

2.6.7. ARF Lokusunun Düzenlenmesi

Normal koşullarda ARF lokusu üyelerinin baskılanmış durumda olması çok önemlidir. Polikomb grubu (PcG) proteinleri ARF lokusunun baskılanmasında görev yapmaktadır. PcG aracılı gen susturulması Polycomb baskılayıcı kompleks 1 veya 2 (polycomb repressive complex 1 or 2, PRC1 veya PRC2) multiprotein komplekslerinin aktivitesi ile gerçekleşir. Polikomb grubu proteinlerinden BMI1 (B lymphoma Mo-MLV insertion region 1), CBX7, CBX8, Twist, JunD ve diğerleri ARF proteinlerinin gen ifadesini baskılamaktadır (Maggi ve ark., 2014). Bunların yanı sıra, E2F1, adenovirüs onkogeni E1A, *Ras*, Abelson onkogeni v-abl, c-myc, gibi onkogenik stresler ARF proteinlerinin ekspresyonunu indüklemektedir (Weber ve ark., 2002; Sharpless, 2005). ARF proteinlerinin transkripsiyonunu indükleyen E2F1 hücre döngüsünün ilerlemesinde önemli bir rol oynar. E2F1 tarafından p14^{ARF} uyarılması, biyokimyasal olarak pRb ve p53 yolakları arasında bir bağlantı kurmakta ve ARF indüksiyonu p53 aracılı apoptozu gerçekleştirmektedir (Gjerset, 2006).

3. MATERYAL VE METOT

Bu tez çalışmasına Ondokuz Mayıs Üniversitesi (OMÜ) Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı'na başvuran, klinik olarak mesane kanseri tanısı konan 65 hasta ve kontrol grubu olarak 35 sağlıklı birey dahil edildi. Tez çalışmamız OMÜ Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun (KAEK) 27.02.2014 tarihli ve 2014/548 nolu etik kurul kararıyla onaylanmıştır. Çalışmaya Karadeniz kıyısında yaşayan mesane kanserli hasta ve kontroller dahil edildi. Hastalar ve kontroller çalışma hakkında bilgilendirildikten sonra gönüllü onay formunu imzalayarak çalışmamıza dahil edildi. Hastalardan transüretal rezeksiyonu (TUR) ile mesane tümör dokusundan örnek alındı. Örneklerin bir bölümü patoloji sonucu belirlemek için kullanıldı, diğer bölümü ise OMÜ Patoloji Anabilim Dalında -80°C'de saklandı. Daha sonra biriktirilen örnekler dörtlü gruplar halinde çalışılarak DNA izolasyonu yapıldı. Ameliyat öncesi hastalardan alınan idrar örnekleri bekletilmeden aynı gün çalışıldı ve DNA izolasyonu yapıldı. Mesane yıkama sıvısı çalışmamızda değerlendirmeye alınmadı. Kontrol grubunu, Üroloji Polikliniğine başvuran sağlıklı ve/veya prostat transüretal rezeksiyonu yapılmış kişiler oluşturdu. Herhangi bir kanser öyküsü bulunan kişiler kontrol grubuna dahil edilmedi. Hasta ve kontrollerin aynı yaş grubundan seçilmesine özen gösterildi.

Araştırmamız OMÜ Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Komisyonu'nun 31.08.2014 tarih ve PYO.TIP.1904.14.017 numaralı kararıyla parasal destek gördü.

3.1. İdrardan DNA İzolasyon Yöntemi

İdrardan DNA izolasyonu, 'Zymo Research (ZR) İdrardan DNA İzolasyon Kiti™' (ZR Urine DNA Isolation Kit™, ABD) kullanılarak yapıldı. Bu kit, idrar örneklerinde yer alan hücrelerden DNA'nın güvenilir, hızlı ve kolay bir şekilde izole edilmesi için tasarlanmıştır. Optimal etkinlik için 'Genomik Lizis Tamponu'na %0,5 (v/v) beta-merkaptöetanol ilave edildi. Kit protokolünde filtreden geçirilecek idrar hacmi 30 ml olarak belirtilmesine rağmen çalışmamızda daha yüksek DNA konsantrasyonu elde etmek amacıyla idrar örneğine bağlı olarak bu hacim artırıldı. Yaklaşık 30-200 ml idrar filtre tıkanınca kadar filtre edildi.

İdrardan DNA izolasyon işlemi aşağıdaki gibi gerçekleştirildi:

1. İdrar örneği temiz bir kaba boşaltılarak 50 ml'lik enjektöre alındı ve ZRC GFT™ filtersinden geçirildi. Enjektöre hava çekilip filtrede kalan idrar boşaltılarak

uzaklaştırıldı.

2. Bir ml Genomik Lizis Tamponu filtreden geçirildi ve sıvı toplama tüpü içindeki Zymo-Spin™ IC Kolon içine aktarıldı.
3. Zymo-Spin™ IC Kolonu, 10.000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.
4. Toplama tüpündeki sıvı uzaklaştırıldı.
5. Spin kolona 200 µl 'DNA Pre-Wash Tamponu' ilave edildi.
6. 10.000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.
7. Toplama tüpündeki sıvı uzaklaştırıldı.
8. Spin kolona 500 µl 'g-DNA Wash Tamponu' ilave edildi.
9. 10.000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.
10. Spin Kolon 1,5 ml'lik ependorf tüpüne aktarıldı.
11. 30 µl DNA elüsyon tamponu kolon matriksine ilave edildi.
12. Örnekler 1 dakika oda ısısında inkübe edildi.
13. DNA'yı akıtmak için 10.000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.
14. DNA örneği sonraki işlemlere kadar -20°C'de saklandı.

3.2. Mesane Tümör Örneklerinden DNA İzolasyonu

Tümör örneklerinden DNA izolasyonu ZR Genomic DNA™ (Zymo Research Genomic DNA™ Tissue MiniPrep, ABD) kiti kullanılarak yapıldı. Kullanımdan önce her Proteinaz K tüpüne 260 µl Proteinaz K saklama tamponu eklendi. Proteinaz K saklama tamponu eklendikten sonra Proteinaz K'nın konsantrasyonu ~ 20 mg/ml oldu. Genomik lizis tamponuna %0,5 (v/v) beta-merkaptoetanol ilave edildi.

Kullanılan yöntem 25 mg'a kadar taze veya dondurulmuş dokudan DNA'nın saflaştırılması için uygundur. Verimlilik: İskelet, kalp ve beyin dokuları için 1-3 µg/mg DNA; karaciğer, böbrek ve akciğer dokuları için 3-5 µg/mg DNA.

Tümör dokusu örneklerinden DNA izolasyonu için aşağıdaki işlemler uygulandı:

1. Mikrosantrifüj tüpü içinde (≤ 25 mg) olan doku örneğine 95 µl H₂O, 95 µl 2X Digestion Tampon ve 10 µl Proteinaz K eklendi.
2. Karıştırıldı ve daha sonra 1-3 saat boyunca 55°C'de su banyosunda inkübe edildi.
3. Yedi yüz µl genomik lizis tamponu eklendi ve tüp vorteksle iyice karıştırıldı.
4. Bir dakika süre ile 10.000 g'de santrifüjlendi.
5. Süpernatant bir 'toplama tüpü' içinde olan 'Zymo-Spin™ IIC Kolonu'na

- aktarıldı.
6. Bir dakika süre ile 10.000 g'de santrifüjlendi.
 7. Spin kolonu yeni bir toplama tüpüne aktarıldı ve üzerine 200 µl DNA pre-wash tamponu eklendi.
 8. Bir dakika 10.000 g'de santrifüjlendi.
 9. Spin kolona 400 µl g-DNA yıkama tamponu ilave edildi.
 10. Bir dakika 10.000 g'de santrifüjlendi.
 11. Spin kolon temiz bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
 12. Üzerine ≥ 50 µl DNA elüsyon tamponu eklendi.
 13. Oda sıcaklığında 2-5 dakika inkübe edildi.
 14. Otuz saniye en yüksek hızda santrifüj edildi.
 15. Elde edilen DNA ileride kullanılmak üzere $\leq -20^{\circ}\text{C}$ saklandı.

3.3. Bisülfite Modifikasyon Yöntemi

DNA'nın bisülfite modifikasyonu EZ DNA Methylation™ Kiti kullanılarak yapıldı. Bu yöntem, DNA'nın bisülfite muamele edilmesi ve metillenmemiş sitozinlerin urasile dönüştürülmesi esasına dayanmaktadır. Metillenmiş sitozinler bu işlem esnasında değişmeden kalır.

Solüsyonların Hazırlanması:

Ön aşama

CT dönüşüm reaktifi hazırlama

1. CT Dönüşüm Reaktifi tüpü içine 750 µl su ve 210 µl 'M-dilution' tamponu ilave edildi.
2. Oda ısısında 10 dakika süreyle vorteksle karıştırıldı.

M-yıkama tamponu 24 ml M-yıkama tamponuna, 96 ml %100 etanolü, ilave edilerek hazırlandı.

Bisülfite modifikasyonu:

1. 4 µl DNA örneğine (10 µl idrar DNA) 5 µl M-dilüsyon tamponu eklendi ve suyla toplam hacim 50 µl'ye tamamlandı. Örnekler ters-düz edilerek veya pipetaj yapılarak karıştırıldı.
2. Örnekler 15 dakika boyunca 37°C'de inkübe edildi.

3. İnkübasyondan sonra her örneğe 100 µl CT dönüştürücü reaktifi ilave edilerek karıştırıldı.
4. Örnekler 12-16 saat boyunca 50°C'de inkübe edildi.
5. İnkübasyondan sonra örnekler 10 dakika 0-4°C'de bekletildi.
6. Toplama tüpüne yerleştirilen Zymo-Spin™ IC kolonlara 400 µl M-bağlanma tamponu eklendi.
7. M-bağlanma tamponu içeren Zymo-Spin™ IC kolonlara örnekler ilave edildi.
8. Ters-düz edilerek birkaç kez karıştırıldı.
9. 12.000 rpm'de 30 saniye santrifüj yapıldı ve sıvı uzaklaştırıldı.
10. Kolonlara 100 µl M-yıkama tamponu eklendi.
11. 12.000 rpm'de 30 saniye santrifüj edildi.
12. Kolonlara 200 µl M-desülfonasyon tamponu ilave edildi.
13. Örnekler oda sıcaklığında (20-30°C) 15-20 dakika inkübe edildi.
14. Daha sonra 12.000 rpm'de 30 saniye santrifüj edildi .
15. 200 µl M-yıkama tamponu eklendi.
16. 12.000 rpm'de 30 saniye santrifüj edildi.
17. Yıkama işlemi tekrar yapılarak örneklere 200 µl M-yıkama tamponu eklendi.
18. 12.000 rpm'de 30 saniye santrifüj edildi.
19. Kolonlar 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarılarak, doğrudan kolon matriksine 11 µl M-elüsyon tamponu eklendi.
20. 12.000 rpm'de 30 saniye santrifüj yapıldı.
21. Elde edilen DNA sonraki kullanım aşamaları için -20°C'de saklandı.

3.4. Metilasyona-Spesifik PSR (MSP)

Metilasyona-spesifik PCR, DNA'da CpG adacıklarının metillenme durumunu belirlemek için kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde DNA örnekleri sodyum bisulfitle muamele edilerek, metillenmemiş sitozinler urasile dönüştürülmektedir. CpG adacıklarında yer alan sitozinler metillenmiş ise urasile dönüştürülmemekte ve metillenmiş olarak korunmaktadır. Zymo TaqTM DNA polimeraz enzimi sodyum bisulfitle muamele edilmiş modifiye DNA'nın amplifikasyonunu gerçekleştirmektedir.

PCR karışımı (25 µl):

- 2X reaksiyon tamponu (1X) : 12,5 µl
- dNTP (25mM) : 0,25 µl
- Primer Forward (10 µM) : 0,2 µl
- Primer Reverse (10 µM) : 0,2 µl
- Modifiye DNA : 2 µl
- Taq DNA Polimeraz (U/25 µl) : 0,2 µl
- ddH₂O : 9,65 µl

E-kaderin ve *p14* genleri için PCR koşulları Tablo 2 ve Tablo 3'de verildi.

Tablo 2. *E-kaderin* geni için MSP koşulları (metile ve unmetile)

Reaksiyon Aşaması	Sıcaklık °C	Süre	Döngü Sayısı
Başlangıç denatürasyonu	95	10 dk	1
Denatürasyon	94	30 sn	
Primer bağlanması	57	30 sn	40
Zincir uzaması	72	30 sn	
Son uzama	72	7 dk	1

Tablo 3. *p14* geni için MSP koşulları (metile ve unmetile)

Reaksiyon Aşaması	Sıcaklık °C	Süre	Döngü Sayısı
Başlangıç denatürasyonu	95	10 dk	1
Denatürasyon	94	30 sn	
Primer bağlanması	60	30 sn	40
Zincir uzaması	72	30 sn	
Son uzama	72	7 dk	1

Çalışmamızda, pozitif kontrol olarak ‘Universal Methylated Human DNA Standard’ (Zymo Research, ABD), negatif kontrol olarak ise deiyonize su (ddH₂O) kullanıldı. Metile ve unmetile için reaksiyon karışımları iki farklı ependorf tüpünde hazırlandı ve PCR tüplerine dağıtıldı. *E-kaderin* ve *p14* genlerinin promotor bölgelerini çoğaltmak için kullanılan MSP ve metilasyona spesifik olmayan PCR (USP) primer dizileri ve ampikon uzunlukları Tablo 4’te gösterilmiştir.

Tablo 4. *E-kaderin* ve *p14* promotor bölgeleri için metilasyona spesifik ve spesifik olmayan PCR primer dizileri, PCR ürünü uzunlukları

Gen	Primer Forward	Primer Reverse	PCR ürünü	Ref.
<i>E-kaderin</i>	MSP:TTAGGTTAGAGGGTTA TCGCGT	TAACATAAAATTCACCTACCG AC	116 bp	Lin ve ark., 2010
	USP:TAATTTTAGGTTAGAG GGTTATTGT	CACAACCAATCAACAACACA	97 bp	
<i>p14</i>	MSP:GTGTTAAAGGGCGCG TAGC	AAAACCCTCACTCGCGACGA	122 bp	
	USP:TTTTTGGTGTTAAAGG GTGGTGTAGT	CACAAAAACCCTCACTCACAA CAA	132 bp	

3.5. Agaroz Jel Elektrofözezi

%2'lik agaroz jel elde etmek maksadıyla 130 ml 1X Tris-Borik asit-EDTA (TBE), ölçülerek erlenmayere aktarıldı ve üzerine 2,6 g agaroz ilave edildi. Daha sonra oluşan heterojen karışım mikrodalgada şeffaf görünüm elde edilene kadar 50-60 saniyelik aralıklarla çalkalanarak iyice kaynatıldı. Oluşan şeffaf solüsyon sıcaklığı yaklaşık 70-75°C'ye kadar soğutulduktan sonra konsantrasyonu 0,5 mg/ml olan etidyum bromürden 130 µl ilave edildi. Birkaç kez çalkalanarak etidyum bromürün homojen yayılması sağlandı. Sonra jel tarakları yerleştirilmiş yatay elektroförez setine döküldü ve polimerleşmesi için bırakıldı. Yaklaşık 45-50 dakikalık polimerizasyondan sonra taraklar çıkarıldı ve jel 1XTBE içeren elektroförez tankına yerleştirildi. DNA örnekleri, 1:5 oranında 6X yükleme boyası (New England BioLas, İngiltere) ilave edilerek jele yüklendi ve 130 voltluk elektrik akımında 25-30 dakika yürütüldü. Marker olarak 100 bp DNA Ladder (New England BioLas, İngiltere) kullanıldı. Elektroförez işlemi tamamlandıktan sonra sonuçlar UV transillüminatörü (Gel Imaging System Quantum ST5, Almanya) altında görüntülenerek incelendi.

10X TBE'nin hazırlanışı: 108 g Tris ve 55 g borik asit tartılarak bir erlenmayere aktarıldı, üzerine 40 ml 0,5 M EDTA (pH: 8) eklendi ve hacim 1 litreye tamamlandı. Solüsyon şeffaf görünüm oluşuncaya kadar ısıtılarak karıştırıldı.

1X TBE'nin (89mM tris, 89mM borik asit, 2mM EDTA) **hazırlanışı:** 100 ml 10X TBE üzerine 900 ml distile su ilave edilerek iyice karıştırıldı.

3.6. İstatiksel Analiz

Sonuçlar istatiksel yöntemlerle değerlendirilerek hipoteze uygunluk bakımından test edildi. Tüm istatiksel analiz istatiksel paket SPSS 17.0 versiyonuyla yapıldı. Parametreler arasındaki ilişki Fisher's exact ve ki-kare testleriyle değerlendirildi. MSP'nin duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla pozitif testlerin toplam katılımcı sayısına bölünmesi ve negatif testlerin toplam katılımcı sayısına bölünmesiyle elde edildi. κ aynı hastadan alınan tümör ve idrar örneklerinin uyumluluğunu değerlendirmek için kullanıldı. $P < 0,05$ değerleri istatiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışma grubunu oluşturan 65 mesane kanserli hastanın tümör dokusu ve karşılığı olan 48 idrar örneğinden DNA izole edildi. Ayrıca, kontrol grubuna dahil edilen 35 kişinin idrarlarında *E-kaderin* ve *p14* genlerinin promotor bölgelerinin metilasyon profili analiz edildi. Çalışma ve kontrol grubunun demografik özellikleri ve hastaların patoloji sonuçları Tablo 5’de sunulmaktadır.

Çalışma grubunu oluşturan mesane kanserli hastaların 55’i erkeklerden, 10’u ise kadınlardan oluştu. Yaş ortalamaları $65,6 \pm 12,6$ (41-89) idi. Otuz beş bireyden oluşan kontrol grubunun yaş ortalaması 61,2 (38-83) idi, 32’si erkeklerden ve 3’ü ise kadınlardan oluşmaktaydı. Hasta ve kontrol grublarıyla cinsiyet arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadı ($P > 0,05$). Erkek hastaların %67,3’ü (37/55), kadın hastaların ise %60’ı (6/10) yüksek grade idi. Biri kadın diğeri erkek olmak üzere toplam iki hastanın tümör gradelerine ulaşılmadı.

Tablo 5. Çalışma grubunun klinik ve patolojik özellikleri

	Hastalar (n=65)	Kontroller (n=35)
Cinsiyet		
Erkek	55 (%84,6)	32 (%91,4)
Kadın	10 (%15,4)	3 (%8,6)
Yaş		
Yaş aralığı	41-89	38-83
Ortalama yaş (\pm SD)	65,6 \pm 12,6	61,2 \pm 9,8
Tümör Grade		
Düşük	19 (%31,1)	
Yüksek	42 (%68,9)	
Tümör Stage		
Ta	12 (%20,0)	
T1	28 (%46,7)	
T2	17 (%28,3)	
T3	3 (%5,0)	
Rekürens		
Primer	35 (%64,8)	
Rekürens	19 (%35,2)	
Sigara kullanımı		
Var	16 (%35,6)	1 (%3,2)
Yok	18 (%40,0)	21 (%67,8)
Bırakmış	11 (%24,4)	9 (%29,0)

Toplam 65 hastanın 42'si yüksek grade, 19'u ise düşük grade olarak tespit edildi. İdrar karşılığı olan 48 olgunun ise 31'i yüksek grade 15'i düşük gradedir. Tümör stage açısından erkek hastaların %20,8'si Ta (11/53), %47,2'i T1 (25/53), %26,4'si T2 (14/53) ve %5,6'i T3'dür (3/53). Bir erkek hastanın patoloji sonucuna ulaşılmadı bir hastanın da patoloji sonucu adenokarsinomdu. Kadın hastaların %14,2'u Ta (1/7),

%42,8'u T1 (3/7) ve %42,8'u T2'dir (3/7). İki mesane kanserli kadın hastanın tümör stage'ine ulaşılmadı ve bir kadın hastada ise adenokarsinom bulundu. Hastaların 35'inde primer tümörler, 19'unda ise rekürens gözlemlendi. On bir hastanın ise primer ya da rekürensine bilgisine ulaşılamadı.

Çalışma grubunun %35,6'sı (16/45) sigara kullanan, %40,0'ı (18/45) sigara kullanmayan ve %24,4'ü (11/45) ise sigarayı bırakanlardan oluşmaktaydı. Hastalardan 20'sinin sigara kullanımıyla ilgili bilgilerine ulaşılmadı. Kontrol grubunu %67,8 sigara içmeyen (21/31), %29,0 sigarayı bırakmış (9/31) ve %3,2 sigara içen (1/31) bireyler oluşturdu.

Hasta yaşları ile genlerinin promotor metilasyon durumu arasında istatistik açısından anlamlı ilişki bulundu ($P<0,05$).

4.1. İdrar Örneklerinde *E-kaderin* ve *p14* Genlerinin Metilasyon Durumu

Toplam 48 mesane kanserli hastanın idrarında *E-kaderin* ve *p14* genlerinin promotor metilasyon analizi yapıldı. *E-kaderin* için metilasyon sıklığı %68,8 (33/48), *p14* geni için ise %72,9 (35/48) olarak bulundu. Kontrol grubunda metilasyon sıklığı *E-kaderin* geni için %5,7 (2/35), *p14* geni için ise %37,1 (13/35) saptandı. Hasta ve kontrol grubu idrar örneklerinde *E-kaderin* promotor metilasyon profilleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulundu ($P<0,001$). Benzer şekilde, hasta ve kontrol grubu idrar örnekleri *p14* promotor metilasyon profilleri karşılaştırıldığında anlamlı ilişki belirlendi ($P<0,001$).

4.2. Tümör Dokularında *E-Kaderin* ve *p14* Genlerinin Metilasyon Durumu

Çalışmaya dahil edilen 65 hastandan 62'sinin (%95,4) tümör dokusu örneklerinde *E-kaderin* geninin promotorunun metillendiği geriye kalan 3 (%4,6) hastanın örneğinde metillenmediği belirlendi. *p14* geni promotor metilasyonu 51 (%78,5) örnekte gözlemlendi, diğer 14 (%21,5) tümör örneğinde ise metillenmediği bulundu (Tablo 6 ve Tablo 7). Onyeddi hastanın idrar örneğinin eşleniğine ulaşılamadı. Hasta tümör dokuları *E-kaderin* ve *p14* genlerinin promotor metilasyonu ile tümör stage arasında anlamlı bir ilişki bulunamadı ($P>0,05$). Benzer şekilde, tümör dokuları *E-kaderin* ve *p14* genlerinin promotor metilasyonu ile tümör grade arasında anlamlı ilişki bulunamadı ($P>0,05$). Ayrıca, hasta tümör dokuları *E-kaderin* ve *p14* genlerinin promotor metilasyonu ile rekürens arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki bulunamadı ($P>0,05$).

Hasta ve kontrollerde sigara kullanımıyla her iki genin promotor metilasyon durumu arasında anlamlı ilişki bulundu ($P<0,001$).

Kırk sekiz hastanın tümör dokusu ve eşlenik idrarında gözlenen *E-kaderin* ve *p14* genlerinin promotor metilasyonları arasındaki uyumluluğu belirlemek için kapa (κ) testi uygulandı. Tümör dokularında ve karşılık idrarlarda gözlenen *E-kaderin* ve *p14* genlerinin promotor metilasyonu için κ ve P değerleri Tablo 8’de sunulmaktadır. Tümör dokusu ve idrar örneklerinde *E-kaderin* geni promotor metilasyonu için zayıf uyum, *p14* geni promotor metilasyonu için iyi düzeyde uyum gözlemlendi.

Tablo 6. Hasta ve kontrol grubunda *E-kaderin* geni promotor metilasyonu

Örnek	Metillenmiş <i>E-kaderin</i> (%)	Metillenmemiş <i>E-kaderin</i> (%)
Kontrol grubu (n=35)		
İdrar (35)	2 (5,7)	33 (94,3)
Hasta grubu (n=65)		
İdrar (48)	33 (68,8)	15 (31,2)
Tümör dokusu (65)	62 (95,4)	3 (4,6)

Tablo 7. Hasta ve kontrol grubunda *p14* geni promotor metilasyonu

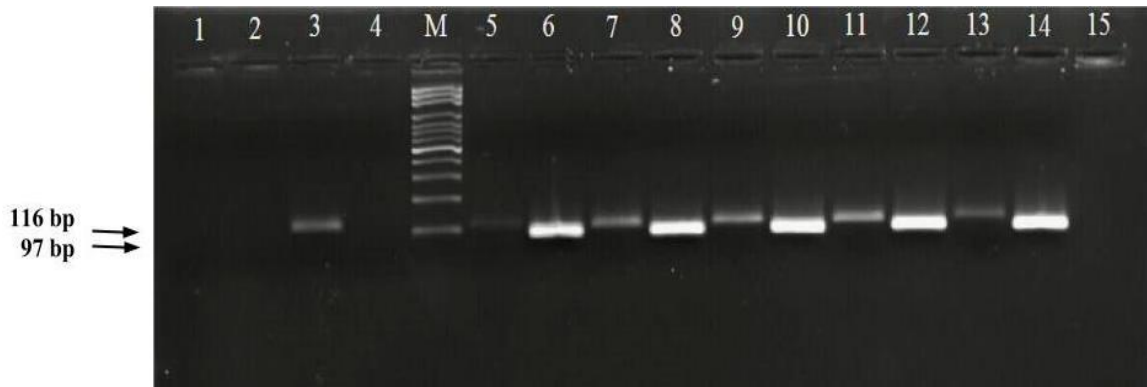
Örnek	Metillenmiş <i>p14</i> (%)	Metillenmemiş <i>p14</i> (%)
Kontrol grubu (n=35)		
İdrar (35)	13 (37,1)	22 (62,9)
Hasta grubu (n=65)		
İdrar (48)	35 (72,9)	13 (27,1)
Tümör dokusu (65)	51 (78,5)	14 (21,5)

Tablo 8. Tümör dokusu ve eşlenik idrar örneklerinin metilasyon profilleri arasında uyum

	<i>E-kaderin</i>	<i>p14</i>
Tümör Dokusu (48)	45 (%93,8)	40 (%83,3)
İdrar (48)	33 (%68,8)	35 (%72,9)
κ	0,256	0,700
P*	0,008	0,000

0,0–0,20= zayıf uyum; 0,21–0,40= ortanın altında uyum 0,41–0,60= orta düzeyde uyum; 0,61–0,80= iyi düzeyde uyum; 0,81–1,00=çok iyi düzeyde uyum. P<0,05 istatistiksel olarak anlamlı.

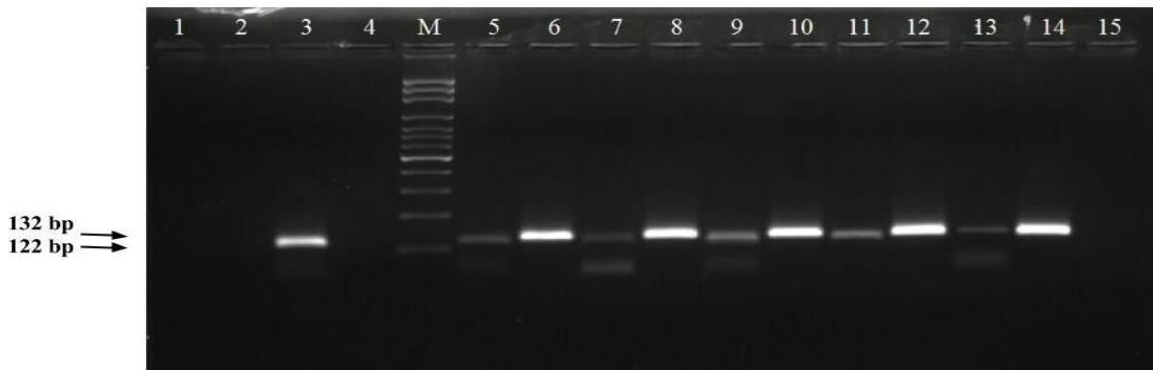
Aşağıdaki agaroz jel resimlerinde tümör dokusu ve eşleniği olan idrar örneklerinde *E-kaderin* ve *p14* genlerinin MSP sonuçları gösterilmektedir (Şekil 5-10).



Şekil 5. 23, 37-40 numaralı tümör dokularından izole edilen DNA'da *E-kaderin* geninin promotor metilasyonu

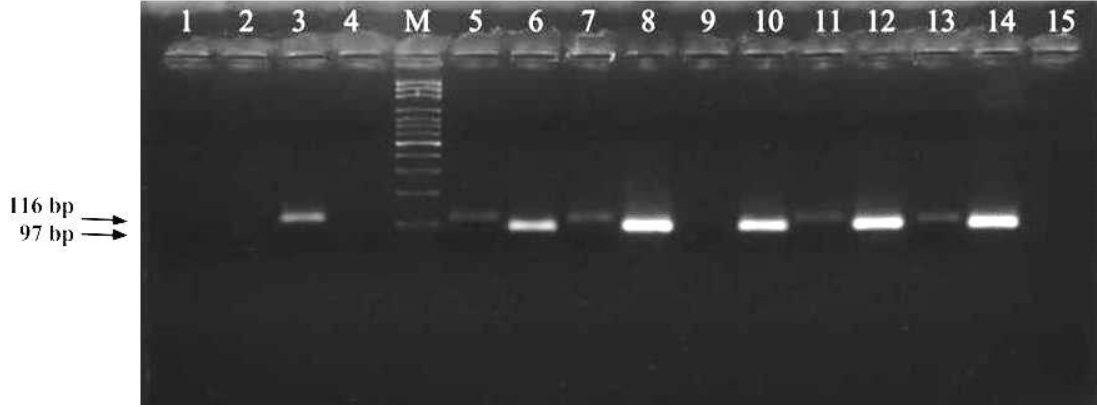
- 1) negatif kontrol-M 2) negatif kontrol-U 3) IVD-M 4) IVD-U 5) 23-M 6) 23-U 7) 37-M 8) 37-U 9) 38-M 10) 38-U 11) 39-M 12) 39-U 13) 40-M 14) 40-U 15) örnek yüklenmedi

Marker 100bp, M-metile, U-unmetile



Şekil 6. 23, 37-40 numaralı tümör dokularından izole edilen DNA'larda *p14* geninin promotor metilasyonu

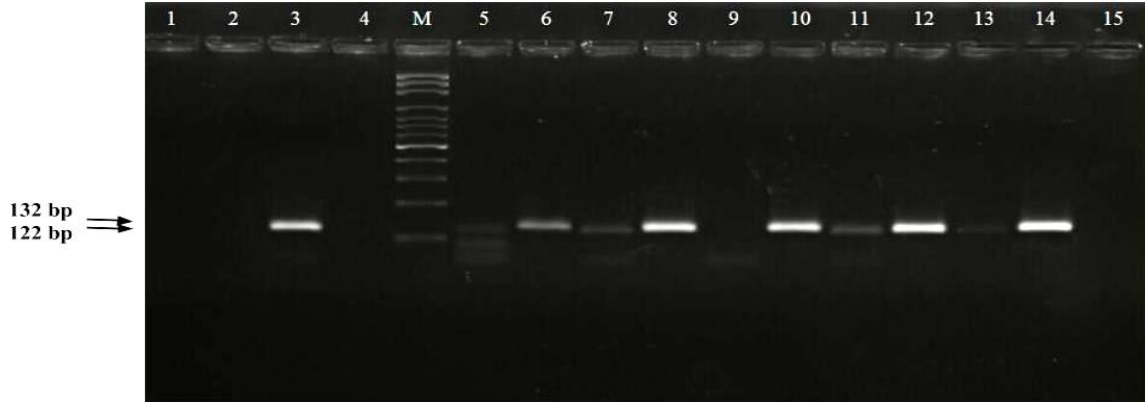
- 1) negatif kontrol-M 2) negatif kontrol-U 3) IVD-M 4) IVD-U 5) 23-M 6) 23-U 7) 37-M 8) 37-U 9) 38-M 10) 38-U 11) 39-M 12) 39-U 13) 40-M 14) 40-U 15) örnek yüklenmedi



Şekil 7. 23, 37-40 numaralı hastaların idrar DNA'larında *E-kadherin* geninin promotor metilasyonu

- 1) negatif kontrol-M 2) negatif kontrol-U 3) IVD-M 4) IVD-U 5) 23-M 6) 23-U 7) 37-M 8) 37-U
9) 38-M 10) 38-U 11) 39-M 12) 39-U 13) 40-M 14) 40-U 15) örnek yüklenmedi

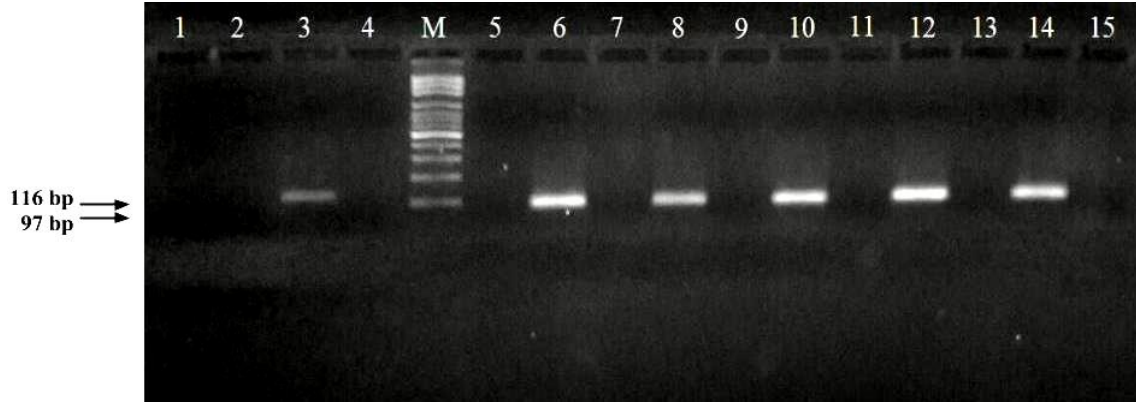
Marker 100bp, M-metile,U-unmetile



Şekil 8. 23, 37-40 numaralı hastaların idrar DNA'larında *p14* geninin promotor metilasyonu

- 1)negatif kontrol-M 2) negatif kontrol-U 3) IVD-M 4) IVD-U 5) 23-M 6) 23-U 7) 37-M 8) 37-U
9) 38-M 10) 38-U 11) 39-M 12) 39-U 13) 40-M 14) 40-U 15) örnek yüklenmedi

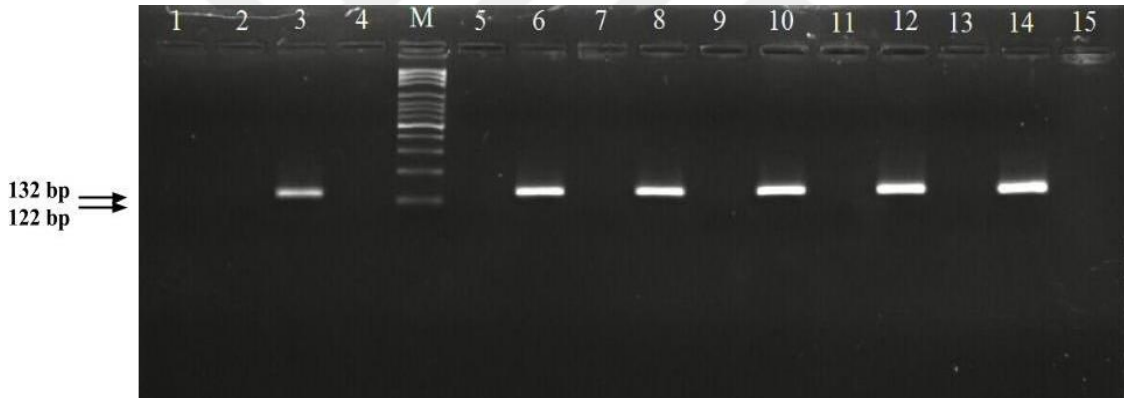
Marker 100bp, M-metile,U-unmetile



Şekil 9. 31-35 numaralı kontrollerin idrar DNA'larında *E-kaderin* geninin promotor metilasyonu

- 1) negatif kontrol-M 2) negatif kontrol-U 3) IVD-M 4) IVD-U 5) 31-M 6) 34-1 7) 32-M 8) 32-U
9) 33-M 10) 33-U 11) 34-M 12) 34-U 13) 35-M 14) 35-U 15) örnek yüklenmedi

Marker 100bp, M-metile, U-unmetile



Şekil 10. 31-35 numaralı kontrollerin idrar DNA'larında *p14* geninin promotor metilasyonu

- 1) negatif kontrol-M 2) negatif kontrol-U 3) IVD-M 4) IVD-U 5) 31-M 6) 31-U 7) 32-M 8) 32-U
9) 33-M 10) 33-U 11) 34-M 12) 34-U 13) 35-M 14) 35-U 15) örnek yüklenmedi

Marker 100bp, M-metile, U-unmetile

4.3. İdrar Sitolojisi Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Tablo 9’de 48 mesane kanserli olgunun idrar sitoloji sonucu gösterilmiştir. İdrar sitolojisi 25 hastada (%52,1) pozitif veya şüpheli sonuç vermiştir. Düşük grade olgularında pozitif idrar sonucuna rastlanmadı. Yalnız şüpheli durumlar düşük grade tümörler için %33,3 (5/15) bulundu. Ayrıca, hasta idrarlarından 3’ü tanısal değildir, 2 hastanın da idrar sitolojisi sonucuna ulaşılmadı.

Tablo 9. Tümör dokusu ve idrarı çalışılan mesane kanserli olguların metilasyon ve sitoloji sonuçları

Olgu no	Cinsiyet	Yaş	Sigara kullanımı	Tümör grade	Tümör stage	<u>E-kaderin metilasyon durumu</u> Doku/İdrar	<u>p14 metilasyon durumu</u> Doku/İdrar	İdrar Sitolojisi
1	E	75	var	Yüksek	T2	M/U	M/M	Negatif
2	E	74	yok	Yüksek	T1	M/M	M/M	Pozitif
3	E	58	yok	Düşük	Ta	M/U	U/U	Şüpheli
4	E	55	yok	Düşük	Ta	U/U	U/U	Negatif
5	E	68	yok	Yüksek	T1	U/U	U/U	Pozitif
6	E	82	var	Düşük	T1	M/M	U/U	Şüpheli
7	E	55	var	Yüksek	T1	M/M	U/U	Pozitif
8	E	77	yok	Yüksek	T1	M/M	M/U	Pozitif
9	E	73	yok	Yüksek	T3	M/M	M/U	Şüpheli
10	E	53	var	Düşük	T1	M/M	M/U	Tanısal değil
11	E	41	var	Yüksek	T3	M/U	M/M	Atipik
12	K	44	yok	Yüksek	-	U/U	M/M	Şüpheli
13	E	49	yok	Düşük	T1	M/M	M/M	Negatif
14	E	71	yok	Düşük	Ta	M/U	M/M	Şüpheli
15	E	66	var	Düşük	T1	M/U	M/M	Negatif
16	K	41	yok	Düşük	T1	M/M	M/M	Negatif
17	E	73	var	Yüksek	T1	M/U	M/M	Atipik
18	E	60	var	Yüksek	Ta	M/U	M/M	Şüpheli
19	E	77	var	Yüksek	T3	M/M	M/M	Şüpheli
20	E	76	var	Düşük	T1	M/M	M/M	Negatif
21	E	73	bırakmış	Yüksek	T2	M/M	M/M	Pozitif
22	E	55	var	Yüksek	T2	M/M	M/M	Pozitif
23	K	87	bırakmış	Yüksek	T2	M/M	M/M	Pozitif
24	E	64	bırakmış	Yüksek	Ta	M/U	M/M	Negatif
25	E	74	-	Yüksek	T2	M/M	M/M	Pozitif

Tablo 9. (Devamı)

26	E	73	yok	Düşük	Ta	M/M	M/M	Negatif
27	E	54	var	Yüksek	T1	M/U	U/U	Negatif
28	E	89	-	Yüksek	T2	M/M	M/M	Negatif
29	E	73	-	Yüksek	T1	M/M	U/U	Pozitif
30	E	66	bırakmış	Yüksek	T1	M/M	M/M	Pozitif
31	K	80	-	Düşük	Ta	M/M	M/M	-
32	E	64	-	Düşük	Ta	M/M	M/M	Negatif
33	E	43	bırakmış	Düşük	Ta	M/M	M/M	Tanısal değil
34	K	86	-	Yüksek	T2	M/U	M/M	Tanısal değil
35	E	67	bırakmış	Yüksek	T1	M/U	M/U	Şüpheli
36	E	75	-	Yüksek	T1	M/M	M/M	Negatif
37	E	80	bırakmış	Yüksek	T2	M/M	M/M	Negatif
38	E	80	yok	Yüksek	Ta	M/M	U/U	Negatif
39	E	73	bırakmış	Düşük	Ta	M/M	M/M	Şüpheli
40	E	70	var	Düşük	Ta	M/M	M/M	Şüpheli
41	E	57	bırakmış	Yüksek	T1	M/M	M/M	Pozitif
42	E	81	-	Yüksek	T1	M/M	M/M	Pozitif
43	E	71	bırakmış	Yüksek	T1	M/M	M/M	Pozitif
44	E	62	-	Yüksek	T1	M/M	M/M	-
45	E	87	yok	Yüksek	T2	M/M	M/M	Pozitif
46	E	70	bırakmış	Yüksek	T2	M/U	M/U	Pozitif
47	K	62	yok	-	T2	M/M	M/M	Negatif
48	K	64	yok	Yüksek	T1	M/M	M/M	Negatif

Kontrol grubunun idrar sitoloji sonuçları Tablo 10’da gösterilmiştir. Kontrollerin birinin idrar sitolojisi sonucu tanısal değildir, birinin idrar sitolojisi sonucuna ulaşılmadı, ikisi şüpheli de olarak değerlendirildi. Şüpheli olarak değerlendirilen 7 no’lu kontrolde malignite saptanmadı, 31 no’lu kontrolde nodüler hiperplazi ve prostatik enfraktüs tespit edildi.

Tablo 10. Kontrol grubunun metilasyon ve idrar sitoloji sonuçları

Olgu No	Cinsiyet	Yaş	Sigara kullanımı	<i>E- kaderin</i>	<i>p14</i>	İdrar Sitolojisi
1	K	41	yok	M	M	Negatif
2	K	42	yok	U	U	Negatif
3	E	43	yok	U	M	Negatif
4	E	62	yok	U	U	Negatif
5	E	72	yok	U	M	Negatif
6	E	38	yok	U	M	Negatif
7	E	67	yok	U	M	Şüpheli
8	E	58	yok	M	U	Negatif
9	E	51	yok	U	U	Negatif
10	E	57	yok	U	U	Negatif
11	E	61	yok	U	U	Negatif
12	E	62	yok	U	M	Negatif
13	E	52	yok	U	M	-
14	E	66	yok	U	U	Negatif
15	E	67	bırakmış	U	U	Negatif
16	E	46	var	U	U	Negatif
17	E	60	yok	U	U	Negatif
18	E	54	bırakmış	U	M	Negatif
19	E	66	yok	U	M	Negatif
20	E	69	bırakmış	U	M	Negatif
21	E	83	-	U	U	Negatif
22	E	69	bırakmış	U	M	Negatif
23	E	73	bırakmış	U	U	Negatif
24	E	66	yok	U	U	Negatif
25	E	65	-	U	M	Negatif
26	E	71	yok	U	U	Tanısal değil
27	K	69	yok	U	M	Negatif
28	E	64	bırakmış	U	U	Negatif
29	E	62	bırakmış	U	U	Negatif
30	E	60	-	U	U	Negatif
31	E	64	-	U	U	Şüpheli
32	E	65	bırakmış	U	U	Negatif
33	E	66	bırakmış	U	U	Negatif
34	E	69	yok	U	U	Negatif
35	E	58	yok	U	U	Negatif

E-kaderin geni için özgüllük %94,3 (33/35), *p14* geni için ise %62,9 (22/35) olarak hesaplandı.

4.3.1. İdrar Sitolojisi ve Metilasyon Duyarlılığının Karşılaştırılması

Tablo 9’da gösterilen 48 olgudan 43’nün idrar sitolojisi pozitif, negatif, şüpheli ve atipik olarak değerlendirildi. Tablo 9’da belirtildiği gibi 31 ve 44 no’lu hastaların idrar sitolojisi sonuçlarına ulaşılmadı ve ayrıca 10, 33 ve 34 no’lu hastaların idrar sitoloji sonuçları tanısal değildir. Bu olguların (toplam 5) metilasyon profili çalışılmasına rağmen idrar sitolojisi ve metilasyon duyarlılığının karşılaştırılmasına dahil edilmedi.

İdrar sitolojisi %34,9 (15/43) oranda pozitif, %23,3 (10/43) şüpheli sonuç verdi. Düşük grade olgularda pozitif idrar sitoloji sonucu tespit edilmedi. Tablo 9’da 15 düşük grade olgudan 10, 31 ve 33 No’lu (idrar sitolojisi sonuçları tanısal değildir veya ulaşılmadı) olgular dışlandı için geriye kalan toplam 12 düşük grade olgudan sadece 5’nin (%41,7) idrar sitolojisi sonuçları malignite açısından şüpheli bulundu.

Yine aynı 43 olgunun idrarında *E-kaderin* ve *p14* genlerinin promotor metilasyonu sırasıyla %67,4 (29/43) ve %72,1 (31/43) bulundu (Tablo 9). İdrar örneklerinin %32,6’sının (14/43) *E-kaderin* geninde, %27,9’unun (12/43) *p14* geninde metilasyon gözlenmedi. Hasta idrar örneklerinde, iki genden birinin promotor metilasyonu biyobelirteç olarak varsayılması durumunda duyarlılık %86 (37/43) olarak hesaplandı.

Düşük grade olgulardan 10 ve 33 No’lu olguların idrar sitolojisi tanısal değildir ve 31 No’lu olgunun sonucuna ulaşılmadığı için karşılaştırmaya dahil edilmedi. Geriye kalan 12 düşük grade olgunun idrar örneklerinin *E-Kaderin* için duyarlılığı %66,7 (8/12), *p14* geni için ise %75 (9/12) olduğu görüldü. İki genden birinin idrardaki duyarlılığı ise %83,3 (10/12) olarak bulundu.

Tablo 10’da görüldüğü gibi kontrol grubunda 13 no’lu olgunun idrar sitoloji sonucuna ulaşılmadı, 26 no’lu olgunun idrar sitolojisi tanısal değil olarak rapor edildi. Bu olguların metilasyon profili çalışılmasına rağmen idrar sitolojisi ve MSP duyarlılığının karşılaştırılmasında değerlendirmeye dahil edilmedi.

Kontrol grubunda *E-kaderin* promotor metilasyonu %6,1 (2/33) bulundu. Diğer yandan, kontrollerin 31’ünde (%93,9) *E-kaderin* promotor bölgesi metillenmemiştir. *p14* promotor metilasyonu %36,4 (12/33), metillenmeme oranı ise %63,6 (21/33) olarak

tespit edildi. Kontrol grubu idrar sitolojisi ise %6,1 (2/33) oranda şüpheli, %93,9 (31/33) negatif sonuç verdi. Tablo 11’de *E-kaderin* ve *p14* genleri, idrar sitolojisi için duyarlılık ve özgüllük değerleri gösterilmiştir.

Tablo 11. İdrar sitolojisi, *E-kaderin* ve *p14* genlerinin duyarlılık ve özgüllük değerleri

	Duyarlılık, % a	Özgüllük, % b
<i>E-kaderin</i>	67,4 (29/43)	93,9 (31/33)
<i>p14</i>	72,1 (31/43)	63,6 (21/33)
İki genden birinin biyobelirteç olması durumu	%86,0 (37/43)	%97,0 (32/33)
İdrar sitolojisi	34,9 (15/43)	93,9 (31/33)

a Pozitif/Total; b Negatif/Total

5. TARTIŞMA

Sistoskopi ve idrar sitolojisi mesane kanseri tanısında kullanılmaktadır. Ancak bu iki yöntemden ilki invaziv, hastaya rahatsızlık veren ve pahalı bir yöntemdir. İkincisi ise düşük dereceli tümörleri tespit etmek için düşük duyarlılığa sahiptir. Bu nedenle mesane kanseri hastalarının teşhisi için güvenilir ve invaziv olmayan erken tanı amaçlı belirteçlerin geliştirilmesi önemlidir (Chihara ve ark., 2013).

Çalışmamızda, MSP yöntemiyle mesane tümörü dokularında ve aynı hastadan alınan idrar örneklerinde *E-kaderin* ve *p14* genlerinin promotor bölgelerinin metilasyonunu inceledik. Altmış beş mesane kanserli hastanın tümör dokularında *E-kaderin* geni için %95,4 (62/65), *p14* geni için ise %78,5 (51/65) oranda promotor bölgelerinde metilasyon bulunduğunu belirledik. Metilasyonun, örneklerin tamamında görülmemesinin nedeni tümör dokularının heterojen yapısı ile açıklanabilir. Literatürde benzer çalışmalar da bulunmaktadır. Lin ve arkadaşları mesane kanseri tanısında güvenilir, invaziv olmayan biyobelirteçler geliştirmek amacıyla düşük grade ve yüzeysel mesane kanserli hücreleri idrarda belirleyen bir çalışma geliştirmişlerdir. Araştırmacılar bu çalışmada *E-kaderin*, *p14*, *p16* ve *RASSF1A* genlerinin mesane tümörü örneklerinde ve hasta idrarlarından izole edilen DNA'nın metilasyon profilini değerlendirmişler. Bu çalışma kapsamında toplam 57 hasta ve 20 sağlıklı kontrol grubu değerlendirilmiştir. Araştırmacılar MSP yöntemi kullanarak bu 4 genden *E-kaderin* ve *p14* genleri için 51 mesane tümörü örneğinde sırasıyla %53 ve %42 metilasyon oranı bulmuşlardır (Lin ve ark., 2010). Bizim çalışmamızın Lin ve arkadaşlarından farkı örnek sayısının daha yüksek olması ve kıyaslama yapıldığında her iki gen için daha yüksek metilasyon oranı bulunmasıdır. Çalışmamızda, iki olgunun hem tümör hem de idrar örneklerinden elde edilen DNA'larda *E-kaderin* ve *p14* genlerinin her ikisinin de metilasyonu rastlanmadı. Ayrıca, biri düşük ikisi yüksek grade, primer, invaziv olmayan (pTa-pT1) toplam 3 olgunun hem tümör dokusu hem de idrar DNA'sında *E-kaderin* geninin metillenmemiş olduğu bulundu. Benzer şekilde 3'ü düşük, 5'i yüksek grade ve invaziv olmayan (pTa-pT1) 8 olgunun hem tümör dokusu hem de idrar DNA'da *p14* geninin metilasyonu gözlenmedi. Lin ve arkadaşları, çalışmamızdan farklı olarak 6 olgunun hem tümör dokusu hem idrarında *E-kaderin*, *p16*, *p14* ve *RASSF1A* genlerinin her biri için promotor metilasyonu bulmamıştır. Bu durumu bu örneklerde metillenmiş alel sayısının düşük olmasıyla açıklayabiliriz. Diğer yandan, tümör dokularında metilasyon oranı idrar

örnekleriyle kıyaslandığında daha yüksek bulundu. Ayrıca, *p14* ve *RASSF1A* genlerinin hipermetilasyonu ile mesane tümör örneklerinde ve karşılığı olan idrar örneklerinde önemli derecede ilişki olduğu göstermişler.

E-kaderin geninin promotor bölgesindeki CpG adacıklarının hipermetilasyonunu belirlemek için bizim kullandığımız yöntem dışında immünohistokimyasal yöntem ve bisülfid genom dizileme teknikleri de kullanmıştır. Ribeiro-Filho ve arkadaşları, transüretal rezeksiyon esnasında aynı hastaya ait mesane tümör dokusu ve normal doku örnekleri almış ve metilasyon sonuçlarını karşılaştırmışlardır. İmmünohistokimyasal sonuçlar kanser dokusunun normal mesane dokusuyla kıyaslandığında yüksek orada *E-kaderin* immünoaktivitesine sahip olduğu saptanmıştır. Çalışma grubunu oluşturan 51 TCC mesane tümörü dokusunun %63'ü (32/51) tamamen metillenmiş, %22'si kısmen (11/51) metillenmiş ve %15'inin de *E-kaderin* geninde hiç metilasyon saptanmamıştır. Çalışmamızda, Ribeiro-Filho ve arkadaşlarından farklı olarak mesane tümör dokularında tamamen metillenmiş *E-kaderin* promotor metilasyonu bulunmadı ancak kısmi *E-kaderin* metilasyonu daha yüksek bulundu. Araştırmacılar kısmi metilasyonu tümör dokusunun heterojen yapısıyla ilgili olduğunu belirtmişler. Ayrıca Ribeiro-Filho ve arkadaşları tümör dokularının %84'ünde (43/51) hipermetilasyon, eşleniği olan normal mesane dokulardaysa %76 (39/51) oranında unmetilasyon saptanmıştır. Nitekim bizim çalışmamız kapsamında normal mesane dokusunda metilasyon profili incelenmemiştir. Bu da bizim çalışmamızın sınırlılığdır. Yine aynı çalışmada *E-kaderin* metilasyonu düşük grade ve erken stage tümörlerde daha belirgin bulunsada *E-kaderin* metilasyonu ile tümör grade ve stage arasında istatistiksel bir anlamlılık bulunmamıştır. Benzer şekilde biz de bulmadık. Bisülfid genom dizilemeyle *E-kaderin* geninde yer alan genomik pozisyonları farklı olan 10 CpG adacığı (genomik pozisyon: 863, 865, 873, 879, 887, 892, 901, 918, 920 ve 940) dizilenmiş ve bunlardan yalnız 892. nt ve 940. nt tamamen metillenmiştir (%100). Diğer CpG bölgelerinin metilasyon oranı ise %52-90 arası değişiklik göstermiştir. Bu bulgu tamamen metillenmiş CpG adacıklarının metillenmeye daha yatkın olduğunu göstermiştir (Ribeiro-Filho ve ark., 2002). Bizim yöntemimizde metilasyon pozisyonunu ve oranını belirleme şansına sahip değiliz.

Bir diğer çalışmada, düşük-dereceli papiller neoplazi ve invaziv mesane kanserli hastalarda *E-kaderin* geninin CpG adacıklarının metilasyonu ve *E-kaderin* protein ekspresyonunu araştırılmıştır. *E-kaderin* metilasyonu %43 (20/47) oranda görülmüştür.

Bu oran bizim çalışmamız ile karşılaştırıldığında çok daha düşük bulunmuştur. Mesane neoplazisi heterojenite göstererek *E-kaderin* metilasyonu görülen tüm örneklerde metile ve unmetile allellere rastlanmıştır. Araştırmacılar bu duruma, mikrodiseksiyon sırasında tümör dokusunda normal doku hücrelerinin olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Bazı tümör dokusu örneklerinde metilasyon gözükmemesi bununla ilişkilendirilerek, *E-kaderin* promotor metilasyonunun mesane neoplazisinde heterojenite gösterdiği kabul edilmiştir (Bornman ve ark., 2001).

Çalışmamızda idrar örneklerinin metilasyon profili ile idrar sitolojisi sonuçlarını karşılaştırdık. İdrar sitolojisi düşük grade olgular için pozitif sonuç vermezken, bu hastaların idrar örneklerinde *E-kaderin* ve *p14* genlerinin yüksek oranda metilasyon gösterdiğini bulduk. Genel olarak idrar sitolojisi sonuçları, idrar MSP sonuçlarından daha düşük duyarlılık gösterdi. Tümör dokularının eşleniği olan toplam 48 hasta idrarından izole edilen DNA örneklerinde *E-kaderin* geni için %68,8 (33/48), *p14* geni için ise %72,9 (35/48) oranında metilasyon sıklığı bulduk. İdrar sitolojisi kanser malignitesi için %34,9 (15/43) oranında pozitif sonuç gösterirken, %23,3 (10/43) oranında da şüpheli sonuçlar gösterdi. Düşük grade olgularda pozitif idrar sitoloji sonucu tespit etmedik. On iki düşük grade olgunun sadece 5'inin (%41,7) idrar sitoloji sonucu malignite için şüpheli olarak bulundu. Düşük grade tümörlerde *E-kaderin* ve *p14* genlerinden birinin promotor metilasyon duyarlılığını %83,3 (10/12) olarak bulduk. Kırk üç hasta idrarı için MSP yöntemiyle idrar DNA örneklerinde *E-kaderin* ve *p14* genleri için sırasıyla metilasyon oranı %67,4 (29/43) ve %72,1 (31/43) olarak bulduk. İki genden birinin promotor metilasyonu biyobelirteç olarak kabul edildiğinde 43 hasta idrarı için %86 (37/43) oranında oldukça yüksek metilasyon sıklığı bulundu. Lin ve arkadaşları idrar örneklerinde *E-kaderin* ve *p14* genleri için daha düşük, sırasıyla %35 ve %33 duyarlılık tespit etmişler. Aynı zamanda çalışmamızdan farklı olarak düşük grade tümörler %7,7 oranında pozitif idrar sitoloji sonucu vermiştir (Lin ve ark., 2010).

Kırk sekiz hastanın tümör dokusu ve idrarlarında *E-kaderin* ve *p14* genlerinin promotor metilasyonunun uyumluluk gösterdiğini (*E-kaderin* için ortanın altında uyum, *p14* için iyi düzeyde uyum) bulduk. Hasta idrarlarında her iki genin metilasyon durumu mesane kanseri için invaziv olmayan biyobelirteçler geliştirilmesi açısından önem kazandırmaktadır. Lin ve arkadaşları eşlenik idrarı olan örnek sayılarını, bizim çalışmamıza kıyasta daha yüksek tutarak *E-kaderin* için iyi düzeyde uyumluluk, *p14* için

ise çok iyi düzeyde uyumluluk bulmuş ve bu genleri mesane kanseri tanısında iyi bir biyobelirteç olabileceğini önermişler.

Çalışmamızda toplam 12 olguda tümör dokularında *E-kaderin* geninde metilasyon görülürken eşleniği olan idrar örneklerinde metilasyon görülmedi. Benzer şekilde, *p14* geninde toplam 5 olgunun tümör dokusunda metilasyon görülürken, bu hastaların idrarlarında metilasyon görülmedi. Bu durum, tümör dokusundan idrara az miktarda kanser hücresinin döküldüğü ve idrara dökülen kanser hücrelerinde metillenmiş allel sayısının MSP ile tespit edilmeyecek derecede çok düşük olması gibi yorumlanabilir. Hoque ve arkadaşları mesane tümörü dokusu ve eşleniği olan idrarlarda kantitatif MSP yöntemi kullanarak bizim sonuçlarımıza benzer sonuçlar bulmuşlardır ve idrara dökülen düşük miktarda kanser hücrelerinde metilasyonu belirlemek için bu yöntemin yetersiz kaldığını belirtmişlerdir (Hoque ve ark., 2006).

Ayrıca çalışmamızda 3 olgunun hem tümör dokusu ve hem de idrar DNA'sı *E-kaderin* geni açısından unmetile bulundu. Bunlara ek olarak, 8 olgunun hem tümör dokusu ve hem de idrar DNA'sında *p14* geninde metilasyon gözlenmedi. Bir diğer benzer, çalışmada mesane kanserli hastaların tümör dokularında ve eşleniği olan hasta idrarında MSP yöntemiyle *APC*, *RASSF1A* ve *p14* tümör baskılayıcı genlerin hipermetilasyon panelini araştırılmıştır. İdrar MSP sonuçları (%91) idrar sitoloji sonuçlarından (%50) daha yüksek bulunmuştur. Aynı hastaya ait tümör dokularında metilasyon gözlemlendiği halde eşleniği olan idrar örneklerinde metilasyon bulunmamıştır. Araştırmacılar bu durumu hasta idrarından elde edilen DNA'nın düşük konsantrasyonda olduğu ve MSP ile çoğalmadığı gibi yorumlamışlar (Dulaimi ve ark., 2004).

Çalışmamızda hasta yaşları ile *E-kaderin* ve *p14* genlerinin promotor bölgelerinin hipermetilasyonu arasında anlamlı ilişki bulundu. Araştırmalar kanser olguları dışında *E-kaderin* geninin promotor bölgesinin yaşlanmaya bağlı olarak da metillenebileceğini göstermektedir (Fraga ve ark., 2007). Kolon kanseriyle ilgili yapılan bir çalışmada *p14* geninin hem tümör dokusunda hem de normal dokuda metillenebildiğini gösterilmiştir (Issa, 2003).

Ayrıca, yapılan bazı çalışmalar *E-kaderin* metilasyonu ile yaşlanma arasındaki ilişkiyi bulurken, böyle bir ilişkinin olmadığını gösteren çalışmalar da mevcuttur. Chan

ve arkadaşları mesane kanseri ile ilişkisi olabilecek *RAR*, *DAPK*, *E-kaderin*, *p16*, *p15*, *GSTP1* ve *MGMT* genlerinin metilasyonunu MSP yöntemini kullanarak 98'i mesane TCC ve 4'ü karsinoma *in situ* olan hastalarda analiz etmişlerdir. TCC hastalarının %63,3'ünde *E-kaderin* metilasyonu görülmüş. *E-kaderin* metilasyonunun yaşlanma ile ilişkili olduğu bildirilmiştir fakat istatistiksel anlamlılık bulunmamıştır. Kontrol grubunu oluşturan idrar ve normal mesane dokularında *E-kaderin* geninin metilasyonu gözlenmemiştir (Chan ve ark., 2002). Bornman ve arkadaşları 9 normal mesane dokusunu çalışmaları kapsamında incelenmiş, yaşları 71, 82 ve 92 olan üç olguda *E-kaderin* geni promotor metilasyonu tesbit edilmiştir. Araştırmacılar sağlıklı kontrollerde görülen metilasyonun, normal mesane epitelyumunda *E-kaderin* geninin yaşlanmaya bağlı olarak metillenebileceği şeklinde yorumlamışlar (Bornman ve ark., 2001).

Bir diğer çalışmada, mide kardiyak adenokarsinomunda *E-kaderin* geninin hipermetilasyonu araştırılırken, normal mide dokusunda da metillenme olduğu tespit edilmiştir. Araştırmacılar bu epigenetik inaktivasyonu erken onkogenin bir özelliği olabileceğini belirtmişlerdir (Guo ve ark., 2009).

Yates ve arkadaşları üç grup oluşturarak, kantitatif florometrik real-time MSP (QMSP) yöntemiyle idrar örneklerinde *RASSF1A*, *E-kaderin*, *APC*, *p16*, *p14*, *GSTP*, *DAPK* ve *RARB* genlerinin hipermetilasyonunu araştırmışlardır. İlk grubu 54-92 yaşlarında olan, sigara içen, içmeyen ve bırakmış, mesane kanseri tanılı 35 erkek oluşturmuştur. İkinci grup yaşları 70'in üzeri olan, sigara içen, içmeyen ve bırakmış, urotelyal kanser öyküsü olmayan 32 erkek, üçüncü grup ise yaşları 40'ın altında olan ve urotelyal kanseri olmayan, sigara içen, içmeyen ve bırakmış bireylerce oluşturulmuştur. Her üç grup tarafından temin edilen idrar örneklerinden izole edilen DNA'da *E-kaderin* promotor metilasyonu bulunmuştur. Özellikle yaşlı kişiler tarafından oluşturulan ikinci grupta yüksek *E-kaderin* promotor metilasyonu bulunmuş, *p14* genin ise her üç grupta metilasyona uğramadığı bulunmuştur (Yates ve ark., 2006).

Biz kontrol grubu olarak normal tümör dokularında bir değerlendirme yapmadık. İnvaziv olmayan bir yol izleyerek kontrol grubunu sağlıklı kişilerden alınan idrar örneklerinden oluşturduk. Kontrol grubumuzu yaşlı bireyler ağırlıklı olarak belirledik. Yaş aralıkları 38-83 olan kontrollerin ortalama yaşları 61,2'dir. Yaşları 41 ve 58 olan olgularda *E-kaderin* geninin promotor bölgesinin metilasyonun %5,7 olduğunu bulduk.

Kontrol grubumuzda *p14* geni promotor bölgesi 13 olguda (%37,1) metillenme gösterdi. Bu bulgular yaşlanmanın mesane kanseri için risk faktörü olabileceğini göstermektedir. Bu hipotezimizi güçlendiren çalışmalar bulunmaktadır. Lin ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 22-31 yaşları arasında ve yaş ortalaması 26 olan genç bireylerden oluşan 20 kişilik sağlıklı kontrol grubundan alınan idrar örneklerinde *E-kaderin* ve *p14* genlerinde metilasyon bulunmamıştır (Lin ve ark., 2010).

Çalışmamızda sigara içen ve bırakan hasta ve kontrol gruplarıyla *E-kaderin* ve *p14* genlerinin promotor metilasyonu arasında anlamlı ilişki bulduk. Yapılan çalışmalar da aktif ve pasif sigara kullanımının hem erkeklerde hem de kadınlarda mesane kanseri için risk faktörü olduğu yönündedir (Castelao ve ark., 200; Di Pierro ve ark., 2012).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yaşlı nüfusun ve karsinojenlerin artması, mesane kanserinin özellikle yaşlı bireyleri ilgilendirmesi maliyeti düşük, hızlı, duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek tanı ve takip yöntemlerinin geliştirilmesi gereğini ortaya koymaktadır.

Sonuçlarımız, *E-kaderin* ve *p14* genlerinin atipik metilasyonun ürotelyal mesane kanserinin erken tanısında kullanılabilir bir yöntem olduğunu göstermektedir. Bu genlerde yaşa bağlı olarak meydana gelen metilasyon değişimleri ürotelyal mesane kanserine neden olabilmektedir. Ayrıca, düşük grade olgularda *E-kaderin* ve *p14* genlerinin kombine metilasyon analizi idrar sitolojisi ile karşılaştırıldığında, idrarda kanser hücrelerini belirlemek için maliyeti düşük, kolay uygulanabilen ve duyarlı bir yöntem olduğu görülmektedir.

Sonuç olarak, mesane kanserinin tanısında rutin kullanılan idrar sitolojisinin, düşük grade ürotelyal mesane kanserinin tanısında kullandığımız yöntem nazaran duyarlılığının daha düşük olduğu görülmektedir. Çalışmamız ürotelyal mesane kanserinin erken tanısında epigenetik değişikliklerin biyolojik belirteçler olarak kullanılabilirliğini ve bu konudaki araştırmalarının artırılması gereğini ortaya koymaktadır. Bu konuyla ilgili çalışmalar örnek sayısı artırılarak, yeni teknolojiler yardımıyla tüm promotör bölgesi ve tüm genom taranarak artırılmalıdır.

KAYNAKLAR

- Barriere G, Fici P, Gallerani G, Fabbri F, Rigaud M. Epithelial mesenchymal transition: a double-edged sword. *Clin Transl Med*. 2015;14(4):14.
- Besaratinia A, Cockburn M, Tommasi S. Alterations of DNA methylome in human bladder cancer. *Epigenetics*. 2013;8(10):1013-1022.
- Bollati V, Baccarelli A. Environmental epigenetics. *Heredity (Edinb)*. 2010;105(1):105-112.
- Bonberg N, Pesch B, Behrens T, Johnen G, Taeger D, Gawrych K, Bruning T. Chromosomal alterations in exfoliated urothelial cells from bladder cancer cases and healthy men: a prospective screening study. *BMC Cancer*. 2014;20(14):854.
- Bornman DM, Mathew S, Alsrue J, Herman G, Gabrielson E. Methylation of the e-cadherin gene in bladder neoplasia and in normal urothelial epithelium from elderly individuals. *Am J Pathol*. 2001;159(3):831-835.
- Brooks CL, Gu W. p53 regulation by ubiquitin. *FEBS Lett*. 2011;585(18):2803-2809.
- Calvanese V, Lara E, Kahn A, Fraga MF. The role of epigenetics in aging and age-related diseases. *Ageing Res Rev*. 2009;8(4):268-276.
- Casadio V, Molinari C, Calistri D, Tebaldi M, Gunelli R, Serra L, Amadori D. DNA methylation profiles as predictors of recurrence in non muscle invasive bladder cancer: an MS-MLPA approach. *J Exp Clin Cancer Res*. 2013;19(32):94.
- Castelao JE, Yuan JM, Skipper PL, Tannenbaum SR, Gago-Dominguez M, Crowder JS, Ross RK, Yu MC. Gender- and smoking-related bladder cancer risk. *J Natl Cancer Inst*. 2001;4;93(7):538-45
- Cencioni C, Spallotta F, Martelli F, Valente S, Mai A, Zeiher AM, Gaetano C. Oxidative stress and epigenetic regulation in ageing and age-related diseases. *Int J Mol Sci*. 2013;14(9):17643-17663.
- Chan MW, Chan LW, Tang NL, Tong JH, Lo KW, Lee TL, Lai FM. Hypermethylation of multiple genes in tumor tissues and voided urine in urinary bladder cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2002;8(2):464-470.
- Chen PC, Tsai MH, Yip SK, Jou YC, Ng CF, Chen Y, Chan MW. Distinct DNA methylation epigenotypes in bladder cancer from different Chinese sub-populations and its implication in cancer detection using voided urine. *BMC Med Genomics*. 2011;20(4):45.
- Chihara Y, Kanai Y, Fujimoto H, Sugano K, Kawashima K, Liang G, Hirao Y. Diagnostic markers of urothelial cancer based on DNA methylation analysis. *BMC Cancer*. 2013;4(13):275.

- Choi SW, Friso S. Epigenetics: a new bridge between nutrition and health. *Adv Nutr.* 2010;1(1):8-16.
- Conconi D, Panzeri E, Redaelli S, Bovo G, Vigano P, Strada G, Bentivegna A. Chromosomal imbalances in human bladder urothelial carcinoma: similarities and differences between biopsy samples and cancer stem-like cells. *BMC Cancer.* 2014;14(1):646.
- Dante RA, Larkins BA, Sabelli PA. Cell cycle control and seed development. *Front Plant Sci.* 2014;5:493.
- D'Aquila P, Rose G, Bellizzi D, Passarino G. Epigenetics and aging. *Maturitas.* 2013;74(2):130-136.
- Dipierro GB, Gulia C, Cristini C, Fraietta G, Marini L, Grande P, Piergentili R. Bladder cancer: a simple model becomes complex. *Curr Genomics.* 2012;13(5):395-415.
- Domínguez G, Carballido J, Silva J, Silva JM, García JM, Menéndez J, Bonilla F. p14ARF promoter hypermethylation in plasma DNA as an indicator of disease recurrence in bladder cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2002;8(4):980-985.
- Dulaimi E, Uzzo RG, Greenberg RE, Al-Saleem T, Cairns P. Detection of bladder cancer in urine by a tumor suppressor gene hypermethylation panel. *Clin Cancer Res.* 2004;10(6):1887-1893.
- Dumache R, Puiu M, David D, Popovici M, Kaycsa A, Negru S, Miclea F. The importance of clinical application of molecular biomarkers in bladder cancer detection. *Maedica (Buchar).* 2010;5(2):124-127.
- Dupont C, Armant DR, Brenner CA. Epigenetics: definition, mechanisms and clinical perspective. *Semin Reprod Med.* 2009;27(5):351-357.
- Ellinger J, Bachmann A, Goke F, Behbahani TE, Baumann C, Heukamp LC, Muller SC. Alterations of global histone H3K9 and H3K27 methylation levels in bladder cancer. *Urol Int.* 2014;93(1):113-118.
- Ellis L, Atadja PW, Johnstone RW. Epigenetics in cancer: targeting chromatin modifications. *Mol Cancer Ther.* 2009;8(6):1409-1420.
- Enokida H, Nakagawa M. Epigenetics in bladder cancer. *Int J Clin Oncol.* 2008;13(4):298-307.
- Fong CY, Morison J, Dawson MA. Epigenetics in the hematologic malignancies. *Haematologica.* 2014;99(12):1772-1783.
- Fuks F, Hurd PJ, Wolf D, Nan X, Bird AP, Kouzarides T. The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation. *J Biol Chem.*

2003;278(6):4035-4040.

- Gall TM, Frampton AE. Gene of the month: E-cadherin (CDH1). *J Clin Pathol*. 2013;66(11):928-932.
- Gallagher SJ, Kefford RF, Rizos H. The ARF tumour suppressor. *Int J Biochem Cell Biol*. 2006;38(10):1637-1641.
- Gama A, Schmitt F. Cadherin cell adhesion system in canine mammary cancer: a review. *Vet Med Int*. 2012;2012:357187
- Ghafouri-Fard S, Nekoohesh L, Motevaseli E. Bladder cancer biomarkers: review and update. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014;15(6):2395-2403.
- Golbabapour S, Abdulla MA, Hajrezaei M. A concise review on epigenetic regulation: insight into molecular mechanisms. *Int J Mol Sci*. 2011;12(12):8661-8694.
- Gravina S, Vijg J. Epigenetic factors in aging and longevity. *Pflugers Arch*. 2010;459(2):247-258.
- Gunes S, Sullu Y, Yegin Z, Buyukalpelli R, Tomak L, Bagci H. ErbB receptor tyrosine kinase family expression levels in urothelial bladder carcinoma. *Pathol Res Pract*. 2013;209(2):99-104.
- Guo W, Dong Z, Guo Y, Kuang G, Yang Z, Chen Z. Detection of promoter hypermethylation of the CpG island of E-cadherin in gastric cardiac adenocarcinoma. *Eur J Med Res*. 2009;14(10):453-458.
- Haig D. The (dual) origin of epigenetics. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2004;69:67-70.
- Hirohashi S, Kanai Y. Cell adhesion system and human cancer morphogenesis. *Cancer Sci*. 2003;94(7):575-581.
- Hoque MO, Begum S, Topaloglu O, Chatterjee A, Rosenbaum E, Van Criekinge W, Sidransky D. Quantitation of promoter methylation of multiple genes in urine DNA and bladder cancer detection. *J Natl Cancer Inst*. 2006;98(14):996-1004.
- Huidobro C, Fernandez AF, Fraga MF. Aging epigenetics: causes and consequences. *Mol Aspects Med*. 2013;34(4):765-781.
- Ibragimova I, Dulaimi E, Slifker MJ, Chen DY, Uzzo RG, Cairns P. A global profile of gene promoter methylation in treatment-naive urothelial cancer. *Epigenetics*. 2014;9(5):760-773.
- Iqbal N, Iqbal N. Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) in cancers: overexpression and therapeutic implications. *Mol Biol Int*. 2014;2014:852748.

- Issa JP. Age-related epigenetic changes and the immune system. *Clin Immunol.* 2003;109(1):103-108.
- Johnson AA, Akman K, Calimport SR, Wuttke D, Stolzing A, Magalhaes JP. The role of DNA methylation in aging, rejuvenation, and age-related disease. *Rejuvenation Res.* 2012;15(5):483-494.
- Kang Y, Massague J. Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis. *Cell.* 2004;118(3):277-279.
- Kang Z, Li Y, Yu Y, Guo Z. Research progress on bladder cancer molecular genetics. *J Cancer Res Ther.* 2014;89(1):94.
- Kanherkar RR, Bhatia-Dey N, Csoka AB. Epigenetics across the human lifespan. *Front Cell Dev Biol.* 2014;9(2):49.
- Kar S, Sengupta D, Deb M, Shilpi A, Parbin S, Rath SK, Patra SK. Expression profiling of DNA methylation-mediated epigenetic gene-silencing factors in breast cancer. *Clin Epigenetics.* 2014;6(1):20.
- Kawamoto K, Enokida H, Gotanda T, Kubo H, Nishiyama K, Kawahara M, Nakagawa M. p16INK4a and p14ARF methylation as a potential biomarker for human bladder cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;339(3):790-796.
- Kiesslich T, Pichler M, Neureiter D. Epigenetic control of epithelial-mesenchymal-transition in human cancer. *Mol Clin Oncol.* 2013;1(1):3-11.
- Kim JK, Samaranayake M, Pradhan S. Epigenetic mechanisms in mammals. *Cell Mol Life Sci.* 2009;66(4):596-612.
- Kim J, Kim K, Kim H, Yoon G, Lee K. Characterization of age signatures of DNA methylation in normal and cancer tissues from multiple studies. *BMC Genomics.* 2014;15:997.
- Kim WJ, Park S, Kim YJ. Biomarkers in bladder cancer: present status and perspectives. *Biomark Insights.* 2007;2:95-105.
- Kim WY, Sharpless NE. The regulation of INK4/ARF in cancer and aging. *Cell.* 2006;127(2):265-275.
- Kim YK, Kim WJ. Epigenetic markers as promising prognosticators for bladder cancer. *Int J Urol.* 2009;16(1):17-22.
- Li G, Liu Y, Yin H, Zhang X, Mo X, Tang J, Chen W. E-cadherin gene promoter hypermethylation may contribute to the risk of bladder cancer among Asian populations. *Gene.* 2013;534(1):48-53.
- Lin HH, Ke HL, Huang SP, Wu WJ, Chen YK, Chang LL. Increase sensitivity in

- detecting superficial, low grade bladder cancer by combination analysis of hypermethylation of E-cadherin, p16, p14, RASSF1A genes in urine. *Urol Oncol*. 2010;28(6):597-602.
- Liu J, Zhang C, Feng Z. Tumor suppressor p53 and its gain-of-function mutants in cancer. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2014;46(3):170-179.
- Liu X, Zhang W, Geng D, He J, Zhao Y, Yu L. Clinical significance of fibroblast growth factor receptor-3 mutations in bladder cancer: a systematic review and meta-analysis. *Genet Mol Res*. 2014;13(1):1109-1120.
- Liyanage VR, Jarmasz JS, Murugesan N, Bigio MR, Rastegar M, Davie JR. DNA modifications: function and applications in normal and disease States. *Biology (Basel)*. 2014;3(4):670-723.
- Lu Q, Qiu X, Hu N, Wen H, Su Y, Richardson BC. Epigenetics, disease, and therapeutic interventions. *Ageing Res Rev*. 2006;5(4):449-467.
- Maggi LB, Winkeler CL, Miceli AP, Apicelli AJ, Brady SN, Kuchenreuther MJ, Weber JD. ARF tumor suppression in the nucleolus. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1842(6):831-839.
- Marie PJ, Hay E, Modrowski D, Revollo L, Mbalaviele G, Civitelli R. Cadherin-mediated cell-cell adhesion and signaling in the skeleton. *Calcif Tissue Int*. 2014;94(1):46-54.
- Miceli M, Bontempo P, Nebbioso A, Altucci L. Natural compounds in epigenetics: a current view. *Food Chem Toxicol*. 2014;73:71-83.
- Moskalev AA, Aliper AM, Smit-McBride Z, Buzdin A, Zhavoronkov A. Genetics and epigenetics of aging and longevity. *Cell Cycle*. 2014;13(7):1063-1077.
- Muñoz-Najar U, Sedivy JM. Epigenetic control of aging. *Antioxid Redox Signal*. 2011;14(2):241-259.
- Negraes PD, Favaro FP, Camargo JL, Oliveira ML, Goldberg J, Rainho CA, Salvadori DM. DNA methylation patterns in bladder cancer and washing cell sediments: a perspective for tumor recurrence detection. *BMC Cancer*. 2008;8:238.
- Niessen CM, Leckband D, Yap AS. Tissue organization by cadherin adhesion molecules: dynamic molecular and cellular mechanisms of morphogenetic regulation. *Physiol Rev*. 2011;91(2):691-731.
- Ozenne P, Eymin B, Brambilla E, Gazeri S. The ARF tumor suppressor: structure, functions and status in cancer. *Int J Cancer*. 2010;127(10):2239-2247.
- Patchsung M, Boonla C, Amnatrakul P, Dissayabutra T, Mutirangura A, Tosukhowong P. Long interspersed nuclear element-1 hypomethylation and oxidative stress:

- correlation and bladder cancer diagnostic potential. *PLoS One*. 2012;7(5):37009.
- Peinado H, Portillo F, Cano A. Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *Int J Dev Biol*. 2004;48(5-6):365-375.
- Phe V, Cussenot O, Roupret M. Interest of methylated genes as biomarkers in urothelial cell carcinomas of the urinary tract. *BJU Int*. 2009;104(7):896-901.
- Poyet C, Jentsch B, Hermanns T, Schweckendiek D, Seifert HH, Schmidtpeter M, Kristiansen G. Expression of histone deacetylases 1, 2 and 3 in urothelial bladder cancer. *BMC Clin Pathol*. 2014;14(1):10.
- Reinert T. Methylation markers for urine-based detection of bladder cancer: the next generation of urinary markers for diagnosis and surveillance of bladder cancer. *Adv Urol*. 2012;2012:503271.
- Ribeiro-Filho LA, Franks J, Sasaki M, Shiina H, Li LC, Nojima D, Dahiya R. CpG hypermethylation of promoter region and inactivation of E-cadherin gene in human bladder cancer. *Mol Carcinog*. 2002;34(4):187-198.
- Roy F, Berx G. The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65(23):3756-3788.
- Sachdeva UM, O'Brien JM. Understanding pRb: toward the necessary development of targeted treatments for retinoblastoma. *J Clin Invest*. 2012;122(2):425-434.
- Sailasree R, Abhilash A, Sathyan KM, Nalinakumari KR, Thomas S, Kannan S. Differential roles of p16INK4A and p14ARF genes in prognosis of oral carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008;17(2):414-420.
- Salas LA, Villanueva CM, Tajuddin SM, Amaral AF, Fernandez AF, Moore LE, Malats N. LINE-1 methylation in granulocyte DNA and trihalomethane exposure is associated with bladder cancer risk. *Epigenetics*. 2014;9(11):1532-1539.
- Sanchez-Martinez C, Gelbert LM, Lallena MJ, Dios A. Cyclin dependent kinase (CDK) inhibitors as anticancer drugs. *Bioorg Med Chem Lett*. 2015;25(17):3420-3435.
- Scaravilli M, Asero P, Tammela TL, Visakorpi T, Saramaki OR. Mapping of the chromosomal amplification 1p21-22 in bladder cancer. *BMC Res Notes*. 2014;7:547.
- Schmalhofer O, Brabletz S, Brabletz T. E-cadherin, beta-catenin, and ZEB1 in malignant progression of cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2009;28(1-2):151-166.
- Schneider MR, Kolligs FT. E-cadherin's role in development, tissue homeostasis and disease: insights from mouse models. *Bioessays*. 2014;37(3):294-304.
- Schneider AC, Heukamp LC, Rogenhofer S, Fechner G, Bastian PJ, Ruecker A, Müller

- SC, Ellinger J. Global histone H4K20 trimethylation predicts cancer-specific survival in patients with muscle-invasive bladder cancer. *BJU Int.* 2011;108(8):290-296.
- Seligson DB, Horvath S, Shi T, Yu H, Tze S, Grunstein M, Kurdistani SK. Global histone modification patterns predict risk of prostate cancer recurrence. *Nature.* 2005;435(7046):1262-1266.
- Sharpless NE. INK4a/ARF: a multifunctional tumor suppressor locus. *Mutat Res.* 2005;576(1-2):22-38.
- Sherr CJ, Weber JD. The ARF/p53 pathway. *Curr Opin Genet Dev.* 2000;10(1):94-99.
- Subramaniam D, Thombre R, Dhar A, AnantnS. DNA methyltransferases: a novel target for prevention and therapy. *Front Oncol.* 2014;4:80.
- Tammen SA, Friso S, Choi SW. Epigenetics: the link between nature and nurture. *Mol Aspects Med.* 2013;34(4):753-764.
- Thambirajah AA, Ng MK, Frehlick L, Li A, Serpa JJ, Petrotchenko EV, Ausio J. MeCP2 binds to nucleosome free (linker DNA) regions and to H3K9/H3K27 methylated nucleosomes in the brain. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(7):2884-2897.
- Urquidi V, Rosser CJ, Goodison S. Molecular diagnostic trends in urological cancer: biomarkers for non-invasive diagnosis. *Curr Med Chem.* 2012;19(22):3653-3663.
- Vaissiere T, Sawan C, Herceg Z. Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing. *Mutat Res.* 2008;659(1-2):40-48.
- Volanis D, Kadiyska T, Galanis A, Delakas D, Logotheti S, Zoumpourlis V. Environmental factors and genetic susceptibility promote urinary bladder cancer. *Toxicol Lett.* 2010;193(2):131-137.
- Weber HO, Samuel T, Rauch P, Funk JO. Human p14ARF-mediated cell cycle arrest strictly depends on intact p53 signaling pathways. *Oncogene.* 2002;21(20):3207-3212.
- Williams SD, Hughes TE, Adler CJ, Brook AH, Townsend GC. Epigenetics: a new frontier in dentistry. *Aust Dent J.* 2014;59(1):23-33.
- Winnefeld M, Lyko F. The aging epigenome: DNA methylation from the cradle to the grave. *Genome Biol.* 2012;13(7):165.
- Wright R, Saul RA. Epigenetics and primary care. *Pediatrics.* 2013;132(3):216-223.
- Yang X, Kessler E, Su LJ, Thorburn A, Frankel AE, Li Y, Flaig TW. Diphtheria toxin-epidermal growth factor fusion protein DAB389EGF for the treatment of bladder cancer. *Clin Cancer Res.* 2013;19(1):148-157.

- Yates DR, Rehman I, Meuth M, Cross SS, Hamdy FC, Catto JW. Methylation analysis: a prospective study of bladder cancer patients and age stratified benign controls. *Oncogene*. 2006;25(13):1984-1988.
- Ye F, Wang L, Castillo-Martin M, McBride R, Galsky MD, Zhu J, Cordon-Cardo C. Biomarkers for bladder cancer management: present and future. *Am J Clin Exp Urol*. 2014;2(1):1-14.
- Yi SH, Xu LC, Mei K, Yang RZ, Huang DX. Isolation and identification of age-related DNA methylation markers for forensic age-prediction. *Forensic Sci Int Genet*. 2014;11:117-125.
- Yi SV, Goodisman MA. Computational approaches for understanding the evolution of DNA methylation in animals. *Epigenetics*. 2009;4(8):551-556.
- Zhang G, Pradhan S. Mammalian epigenetic mechanisms. *IUBMB Life*. 2014;66(4):240-256.

EKLER

EK 1. Etik Kurul Raporu



T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Sayı: B.30.2.ODM.0.20.08/ 361

28.03.2014

Sayın : Doç. Dr. Sezgin GÜNEŞ

Etik Kurulumuza sunmuş olduğunuz **Urotelyal Mesane Kanseri Hastalarda E-cadherin ve p14 Genlerinin Promotor Metilasyon Analizi** başlıklı OMÜ KAEK 2014/548 Genetik çalışma+ Patoloji çalışması Karar nolu nitelikli araştırma projeniz: Amaç, gerekçe, yaklaşım ve yöntemle ilgili açıklamaları, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu yönergesine göre 27.02.2014 tarihli Etik Kurulumuzda incelenmiş etik açıdan uygun bulunmuştur. Ancak araştırma bütçesinin maddi desteği henüz sağlanamadığından projeye bütçe desteği sağlanıp, tarafımıza bildirilmesinden sonra *başlanmasına* oy birliği ile karar verilmiştir

Bilgilerinize arz/rica ederim.

Prof.Dr.Abdülkerim BEDİR
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
Başkanı

EK 2. Hasta Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

HASTA BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

ARAŞTIRMANIN ADI (ÇALIŞMANIN AÇIK ADI):

“Ürotelyal Mesane Kanseri Hastalarda *E-cadherin* ve *p14* Genlerinin Promotor Metilasyon Analizi”

Gönüllünün Baş Harfleri << >>

Bir araştırma çalışmasına katılmanız istenmektedir. Katılmak isteyip istemediğinize karar vermeden önce araştırmanın neden yapıldığını bilgilerinizin nasıl kullanılacağına çalışmanın neleri içerdiğini ve olası yararlarını risklerini ve rahatsızlık verebilecek konuları anlamanız önemlidir Lütfen aşağıdaki bilgileri dikkatlice okumak için zaman ayırınız ve eğer istiyorsanız özel veya aile doktorunuzla konuyu değerlendiriniz. Eğer bir başka çalışmada da yer alıyorsanız bu çalışmada yer alamazsınız.

BU ÇALIŞMAYA KATILMAK ZORUNDAMIYIM?

Çalışmaya katılıp katılmama kararı tamamen size aittir. Eğer çalışmaya katılmaya karar verirsiniz imzalamanız için size bu Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu verilecektir. Katılmaya karar verirsiniz, çalışmadan herhangi bir zamanda ayrılmakta özgürsünüz. Bu durum sizin aldığımız tedavinin standardını etkilemeyecektir. Eğer isterseniz, bu klinik çalışmaya katılımınızla ilgili olarak hekiminiz/ ile doktorunuz bilgilendirilecektir. Ayrıca destekleyici firma çalışmayı sonlandırmaya karar verirse bu durumda da çalışmadan çıkartılacaksınız.

ÇALIŞMANIN KONUSU VE AMACI NEDİR?

Mesane kanserinin erken tanısında metilasyon değişimlerinin belirteç olarak önerilip önerilemeyeceğini belirlemek

ÇALIŞMA İŞLEMLERİ:

Mesane kanserinin erken aşamalarda belirlenebilmesinde rol aldığı düşünülen genlerin araştırılması amacıyla ameliyatınız sırasında yaklaşık 30 mg tümör dokusu alınacaktır. Ameliyat öncesi ve sonrası sizden sadece 100-150 ml idrar istenecektir. Hasta değilseniz, kontrol grubundaysanız sadece 100-150 ml idrar vermeniz yeterli olacaktır. Tümör dokusundan ve/veya idrardan DNA izole edilecek, DNA modifiye edilerek metilasyon değişimleri incelenecektir. Çalışmaya yaklaşık 20 mesane kanseri hastası ve 10 sağlıklı bireyin katılmasını planlamaktayız. Bu araştırma sizin tedavinizi ve tedavinizde kullanılacak ilaçları hiçbir şekilde yönlendirmeyecektir. Araştırmaya katılıp katılmama hakkına sahipsiniz. Araştırma başladıktan sonra istediğiniz taktirde araştırmadan ayrılabilirsiniz. Araştırmanın gidişine göre rızanıza bakılmaksızın araştırma dışında bırakılabilirsiniz.

EK 2. (Devamı)

BENİM NE YAPMAM GEREKİYOR?

ÇALIŞMAYA KATILMAMIN NE GİBİ OLASI YAN ETKİLERİ, RİSKLERİ VE RAHATSIZLIKLARI VARDIR?

Çalışmanın her hangi bir yan etkisi yoktur.

GEBELİK VE DOĞUM KONTROLÜ

Gebelik ve doğum kontrolüne etkisi yoktur.

ÇALIŞMAYA KATILMANIN OLASI YARARLARI NELERDİR?

Mesane kanserinin erken tanısında metilasyon değişimlerinin belirteç olarak belirlenebilmesine katkıda bulunulacaktır.

GÖNÜLLÜ KATILIM

Bu araştırmaya katılma kararımı tamamen gönüllü olarak veriyorum. Bu çalışmaya katılmayı reddedebileceğim veya katıldıktan sonra istediğim zaman, bu tedavi kurumunda göreceğim bakım ve tedaviler etkilenmeksizin ve hiçbir sorumluluk almadan ayrılabilirim bilincindeyim. Çalışmadan her hangi bir zamanda ayrılırsam, ayrılma nedenlerimi, ayrılışımın sonuçlarını ve izleyen dönemde alacağım tedavileri doktorumla tartışacağım.

ÇALIŞMAYA KATILMAMIN MALİYETİ NEDİR?

Çalışma doktoru ziyaretleri ve çalışmayla ilgili olan tüm laboratuvar testleri çalışma destekleyici tarafından karşılanacak ve size veya bağlı bulunduğunuz özel sigorta veya resmi sosyal güvenlik kurumuna ödetilmeyecektir. Ayrıca çalışmaya bağlı makul miktardaki yol gideriniz makbuzları gösterildiği takdirde karşılanacaktır.

Herhangi bir yan etki veya fiziksel zarar gelişirse hemen çalışma doktorunuzu gereken tıbbi tedavinin uygulanabilmesi için bilgilendiriniz.

KİŞİSEL BİLGİLERİM NASIL KULLANILACAK?

Bu formu imzalayarak doktorunuzun ve onun kadrosunun çalışma için sizin kişisel bilgilerinizi (“Çalışma Verileri”) toplamalarına ve kullanmalarına onay vermiş olacaksınız. Bu durum doğum tarihiniz, cinsiyetiniz, etnik kökeniniz ayrıca Çalışma verilerinizin kullanımı ile ilgili verdiğiniz onayın herhangi bir belirlenmiş birim tarihi yoktur, ancak doktorunuzu haberdar ederek bu onayınızdan herhangi bir zamanda vazgeçebilirsiniz.

EK 2. (Devamı)

Çalışma destekleyicisi firma ile paylaşılan çalışma verileri size özel bir numara olan bir kod ("Kod") numarası kullanımıyla korunacaktır. Sizin çalışma verilerinize ulaşmak için gerekli olan kod anahtarı çalışma doktorunuzun denetimindedir. Çalışma destekleyicisi firma düzenleyici otorite veya diğer denetim kurumları tarafından atanmış kişiler doktorunuz tarafından tutulan çalışma verilerinizi inceleyebilirler.

Doktorunuz çalışma verilerinizi çalışma için kullanacaktır. Çalışma destekleyicisi firma; çalışmanın yürütülmesi, teşhis ve tıbbi yardım gereçlerinin geliştirilmesi için çalışma verilerinizi kullanabilir. Doktorunuzun çalıştığı kurum ve çalışma destekleyicisi firmanın her ikisi de yürürlükte olan veri koruma kanunları ile uyumlu olarak çalışma verilerinizin yönetiminden sorumludurlar.

Çalışma destekleyicisi firma çalışma verilerinizi, sadece yukarıda belirtilen amaçlarda kullanacak olan kendi grubundaki diğer şirketler, hizmet alınan kurumlar, anlaşmalı firmalar ve diğer araştırma kuruluşları ile paylaşabilir. Çalışmanın sonuçları tıbbi yayınlarda yayınlanabilir, ancak sizin kimlik bilgileriniz bu yayınlarda açıklanmayacaktır.

Doktorunuz ya da çalışma destekleyicisi firmadan, toplanan çalışma verileriniz hakkında bilgi isteme hakkında sahipsizsiniz. Aynı zamanda bu verilerdeki herhangi bir hatanın düzeltilmesini isteme hakkında da sahipsizsiniz. Eğer bu konuda bir isteğiniz olursa lütfen gerekirse sizin çalışma destekleyicisi firma ile temasa geçmenize yardımcı olabilecek doktorunuzla görüşünüz.

Eğer onayınızda vazgeçerseniz, doktorunuz çalışma verilerinizi artık kullanamayacak ya da diğer kişilerle paylaşamayacaktır. Çalışma destekleyici firma onayınızdan vazgeçmeden önceki çalışma verilerinizi kullanmaya devam edebilir.

Bu formu imzalayarak, çalışma verilerinizin bu formda tanımlandığı şekilde kullanımına onay vermekteyim.

ARAŞTIRMA SÜRESİNCE 24 SAAT ULAŞILABİLECEK KİŞİLER:

Ad, Soyadı ve telefon numaraları

Dr. Recep Büyükalpelli

Tel: 362-3121919/2508

ÇALIŞMADAN AYRILMAMI GEREKTİRECEK DURUMLAR:

Yoktur.

YENİ BİLGİLER ÇALIŞMADAKİ ROLÜMÜ NASIL ETKİLEYEBİLİR

Çalışma sürerken ortaya çıkmış olan bütün yeni bilgiler bana derhal iletilecektir.

Çalışmaya Katılma Onayı

EK 2. (Devamı)

Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formundaki tüm açıklamaları okudum. Bana, yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen hekim tarafından yapıldı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabilceğimi ve kendi isteğime bakılmaksızın araştırmacı tarafından araştırma dışı bırakılabileceğimi biliyorum. Söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum. Doktorum saklamam için bu belgenin bir kopyasını çalışma sırasında dikkat edeceğim noktaları da içerecek şekilde bana teslim etmiştir.

Gönüllünün Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

Açıklamaları Yapan Kişinin Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

Gerekliyse Olur İşlemine Tanık Olan Kişinin Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

Gerekliyse Yasal Temsilcinin Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Bayram BAYRAMOV

Doğum Yeri: Azerbaycan/Masallı

Doğum Tarihi: 30.09.1990

Medeni Hali: Bekar

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl):

Yüksek Lisans: Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıbbi Biyoloji AD (2013-2015)

Lisans: Azerbaycan Tıp Üniversitesi, Tıbbi Biyoloji Fakültesi (2008-2013)

Lise: Masallı Merkez Okulu (1996-2007)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl: Yok

E-posta: bayram-bayramov-90@mail.ru

