

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**MESANE KANSERİNİN TANISINDA *TWIST1* VE *NID2*
GENLERİNİN METİLASYONLARININ BELİRTEÇ
OLARAK KULLANILABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Zeynep YEĞİN

**Samsun
Haziran-2012**

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**MESANE KANSERİNİN TANISINDA *TWIST1* VE *NID2*
GENLERİNİN METİLASYONLARININ BELİRTEÇ
OLARAK KULLANILABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Zeynep YEĞİN

Danışman: Doç. Dr. Sezgin GÜNEŞ

**Samsun
Haziran-2012**

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji Programında doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Ahmet KARAGÜZEL



Üye : Prof. Dr. Recep BÜYÜKALPELLİ



Üye : Prof. Dr. Hasan BAĞCI



Üye : Prof. Dr. Gönül OĞUR



Üye : Doç. Dr. Sezgin GÜNEŞ

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurul'unca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

Prof. Dr. Süleyman Kaplan
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Öncelikle doktora eğitimime Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda devam etme kararı almamda en belirleyici kişilerden biri olan Prof. Dr. Hasan Bağcı'ya bilimsel duruşuma olan inancı, her zaman koşulsuz sunduğu bilimsel destek ve özgür çalışma ortamı için çok teşekkür ederim.

Değerli danışmanım Doç Dr. Sezgin Özgür Güneş'e doktora başladığım ilk günden itibaren her zaman özveriyle yanımda olduğu için, yenilikçi bakış açısıyla bana projelerinde sorumluluklar vermesi ve farklı bilimsel metotları denememde her zaman teşvik edici davranarak bilimsel duruşumu güçlendirmemde çok önemli rol oynadığı için, bana güvenerek özgür çalışma ortamı sağlamakla birlikte her zaman ve koşulda fikir alışverişi yapmamıza fırsat tanıdığı için, örnek teşkil eden güçlü bilimsel desteğinin yanı sıra başka herhangi bir sorunumda da yine aynı özveriyle asla yalnız olmadığımı hissettirdiği için çok teşekkür ederim.

Üroloji Ana Bilim Dalı'ndan Prof. Dr. Recep Büyükalpelli'ye sunduğu bilimsel desteği, değerli önerileriyle çalışmalarımızı zenginleştirdiği ve uyum ve özveriyle yanımda olduğu için çok teşekkür ederim. Patoloji Ana Bilim Dalı'ndan Yrd. Doç. Dr. Yurdanur Süllü'ye, sitoloji sonuçlarını sağlamasındaki katkısı ve ihtiyaç duyduğum her zaman sunduğu bilimsel desteği için çok teşekkür ederim. Biyoistatistik Ana Bilim Dalı'ndan Prof. Dr. Yüksel Kesim'e istatistik konusunda sağladığı yardımdan dolayı çok teşekkür ederim. Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı'nın öğretim üyeleri Prof. Dr. Gülşen Ökten'e, Prof. Dr. Mehmet Elbistan'a ve Doç. Dr. Nurten Kara'ya dersleriyle bilimsel duruşumu güçlendirdikleri için çok teşekkür ederim.

Tezimizi destekleyen Ondokuz Mayıs Üniversitesi Lisansüstü Tezleri Destekleme Programına (PYO.TIP.1904.08.003), Proje Yönetim Ofisine ve tüm çalışanlarına teşekkür ederim.

Aileme sadece bu tez süresince değil hayatımın her evresinde maddi-manevi çok büyük özverilerle yanımda olmaları ve sonsuz sevgileri için kelimelerle ifade edilemeyecek şekilde şükran borçlu olduğumu bildirmek istiyorum. Bu tez, YEĞİN ailesinin fertlerine ithaf edilmiştir.

ÖZET

MESANE KANSERİNİN TANISINDA *TWIST1* VE *NID2* GENLERİNİN METİLASYONLARININ BELİRTEÇ OLARAK KULLANILABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Mesane kanseri diğer kanserler gibi proto-onkogenlerin aktivasyonuna veya tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonuna yol açan birçok genetik ve epigenetik değişikliklerin birikiminden kaynaklanmaktadır. Epigenetik değişikliklerden biri olan promoter hipermetilasyonu, tümör baskılayıcı gen inaktivasyonu için Knudson'ın çift vuruş hipotezine alternatif bir mekanizma olarak kabul edilmektedir.

Mesane kanserinin tanısında sistoskopik muayene altın standart olmakla birlikte pahalıdır, hastada önemli ölçüde rahatsızlığa sebep olmakta ve değişken duyarlılık göstermektedir. İdrarın sitolojik analizi kanser tanısı için standart ve invaziv olmayan bir metot olmakla birlikte duyarlılığı özellikle düşük grade transisyonel hücre karsinomalarında düşüktür. Bu çalışmada *TWIST1* ve *NID2* genlerinin metilasyon profillerinin mesane kanserinin erken tanısındaki etkinliğinin ve bunun idrar sitolojisine üstünlüğünün belirlenmesi hedeflenmiştir.

Çalışma grubunu, 56 histolojik olarak doğrulanmış mesane tümörü örneği ve eşleniği olan 24 idrar örneği oluşturdu. Ayrıca, sigara kullanmayan, hastaların cinsiyet ve yaş eşleniği (± 5) olan ve kanser öyküsü olmayan 15 gönüllü de kontrol grubu olarak çalışmaya dahil edildi. Tümör ve idrar örneklerinden saflaştırılan DNA'ya bisülfid modifikasyonu uygulanarak metilasyona-spesifik PCR (MSP) ile test edildi.

Düşük grade tümörlerde kanser hücrelerini belirlemek için hipermetilasyon analizinin duyarlılığının konvansiyonel idrar sitolojisinden üstün olduğu belirlendi. Sadece düşük grade olgular dikkate alındığında, iki genden birinin hipermetilasyon gösterme oranı %88,8 (8/9)'dir. Oysa idrar sitolojisinin duyarlılığı %33,3 olarak bulundu.

Mesane kanserinin erken tanısında kullanılmak üzere *TWIST1* ve *NID2* genlerinin kombine metilasyon analizi; idrarda kanser hücrelerini belirlemek için basit, invaziv olmayan, duyarlı ve özgül bir metottur.

Zeynep YEĞİN, Doktora Tezi

Ondokuz Mayıs üniversitesi Samsun, Haziran-2012

ABSTRACT
**INVESTIGATION OF THE USABILITY OF METHYLATION OF *TWIST1* AND
NID2 GENES AS BIOMARKERS IN THE DIAGNOSIS OF BLADDER
CANCER**

Bladder cancer like other cancers arise from the accumulation of many genetic and epigenetic changes that lead to the activation of proto-oncogenes or inactivation of tumor supressor genes. One of the epigenetic changes, promoter hypermethylation is accepted as an alternative mechanism to Knudson's double-hit hypothesis for tumor supressor gene inactivation.

Though cystoscopic monitoring is the gold standart in the diagnosis of bladder cancer, it is expensive, it causes substantial patient discomfort and exhibits variable sensitivity. On the other hand, urine cytology analysis is standart noninvasive method for cancer detection but its sensitivity is low, especially for low-grade transitional cell carcinomas. In this study, determination of efficiency of the methylation profiles of *TWIST1* and *NID2* genes in the early diagnosis of bladder cancer and its superiority to urine cytology was aimed.

Fifty six histologically confirmed bladder tumor samples and paired 24 urine samples constitute the study group. Besides, nonsmoker, sex- and age-matched (± 5) to patients and cancer free 15 volunteers were included as the control group in the study. DNA was purified from tumor and urine samples, these samples were exposed to bisulfite modification and tested with methylation-specific PCR (MSP).

In terms of detecting cancer cells in low grade tumors, the sensitivity of hypermethylation analysis is superior to conventional urine cytology. When only low grade cases were taken into consideration, the hypermethylation rate of any of the two genes was 88.8 % (8/9). Whereas the sensitivity of the urine cytology was found as 33.3%.

To be used in the early diagnosis of bladder cancer the combined methylation analysis of *TWIST1* and *NID2* genes is a simple, noninvasive, sensitive and spesific method for detecting cancer cells in urine.

Zeynep YEĞİN, PhD Thesis

Ondokuz Mayıs University, Samsun, June-2012

SİMGELER VE KISALTMALAR

TCC	: Transisyonel Hücre Karsinoması
LOH	: Heterozigotluk Kaybı
EGFR	: Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
FGFR3	: Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü 3
RB	: Retinoblastoma
mdm2	: Mouse Double Minute 2 Homolog
MMP-2	: Matriks Metalloproteinaz-2
TIMP-2	: Matriks Metalloproteinaz-2'nin Doku İnhibitörü
mRNA	: Mesajcı RNA
DNMT	: DNA Metiltransferaz
SAMCH3	: S-adenozil Metiyonin
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
HDAC	: Histon Deasetilaz
HDACI	: Histon Deasetilaz İnhibitörü
MeCP2	: Metil-CpG Bağlayıcı Protein
LINEs	: Uzun Serpiştirilmiş Nükleer Element Dizileri
HPSE	: Heparanaz
FDA	: Birleşik Devletler Gıda ve İlaç İdaresi
MSP	: Metilasyona-Özgül PCR
AZA	: 5-aza-2'-deoksisitidin
RT-PCR	: Ters Transkriptaz PCR
bHLH	: Bazik Heliks-İlmek-Heliks
EMT	: Epitelyal-Mezenkimal Değişim
MET	: Mezenkimal-Epitelyal Değişim
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
TGF-β	: Transforme Edici Büyüme Faktörü-β
FGFR2	: Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü 2
IGF-1	: İnsülin-Benzeri Büyüme Faktörü 1
IDC	: İnvaziv Duktal Karsinoma
DCIS	: Duktal Karsinoma In Situ

AAH	: Atipik Adenomatöz Hiperplazi
AIS	: Adenokarsinoma In Situ
BPH	: Benign Prostat Hiperplazi
BM	: Bazal Membran
3D	: Üç Boyutlu
Nd	: Nidogen
perl	: Perlekan
Ag	: Agrin
DG	: Distroglikan
Lu	: Lutheran Glikoproteini
SGL	: Sülfatlanmış Glikolipidler
GF	: Büyüme Faktörleri
RTK	: Reseptör Tirozin Kinaz
DEJ	: Dermal-Epidermal Bağlantı
OA	: Osteoartrit
SS	: Sjögren Sendromu
MMP-9	: Matriks Metalloproteinaz-9
OSCC	: Oral Skuamöz Hücre Karsinoması
IVD	: <i>In Vitro</i> Metile DNA
μ l	: Mikrolitre
dNTP	: Deoksiribonükleotit trifosfat
ddH ₂ O	: Bidistile Su
MSP	: Metilasyona Spesifik Primer
USP	: Metilasyona Spesifik Olmayan Primer
TBE	: Tris-Borik Asit-EDTA
κ	: Kappa
cdkn2a	: Siklin bağımlı kinaz inhibitörü 2A
c-myc	: V-MYC Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog

İÇİNDEKİLER

Özet	iv
Abstract	v
Simgeler ve Kısaltmalar	vi
İçindekiler	viii
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	3
A. Mesane Kanseri Patolojisi	3
B. Mesane Kanseri Genetiği	3
B.1. Kromozomal Aberasyonlar	4
B.2. Proto-onkogenler/Onkogenler	4
B.3. Tümör Baskılayıcı Genler	5
B.4. Hücre Döngüsü Düzenleyicileri	6
B.5. Hücre Adhezyon Molekülleri	6
B.6. MikroRNA'ların Ekspresyon Değişiklikleri	10
C. Epigenetik	12
C.1. Epigenetiğin Evrimsel Açıdan Önemi	12
C.2. Kanserde Epigenetik Yaklaşımlar	18
D. Mesane Kanseri ve Epigenetik	22
D.1. Mesane Kanserinde Hipometilasyon	22
D.2. Mesane Kanserinde Hipermetilasyon	23
D.3. Mesane Kanseri Biyomarkerları Olarak Metilasyon Değişikliklerinin Önemi	27
E. <i>TWIST1</i> Geni	31
E.1. Genel Bilgiler ve <i>TWIST1</i> 'in Etki Mekanizmaları	31
E.2. <i>TWIST1</i> 'in Kanser Yolaklarıyla İlişkisi	38
E.3. <i>TWIST1</i> 'in mikroRNA'larla İlişkisi	41
E.4. <i>TWIST1</i> Geninin Metilasyonu İlgili Çalışmalar	41
F. <i>NID2</i> Geni	44
F.1. Genel Bilgiler ve <i>NID2</i> 'nin Etki Mekanizmaları	44
F.2. <i>NID2</i> 'nin Hastalıklarla İlişkisi	49
F.3. <i>NID2</i> Geninin Metilasyonu İlgili Çalışmalar	52
GEREÇ ve YÖNTEM	54

A. Hasta ve Kontrol Grubunun Özellikleri	54
B. Mesane Tümörü Örneklerinden DNA Saflaştırılması	54
C. İdrar Örneklerinden DNA Saflaştırma	56
D. DNA'ların Bisülfid Modifikasyonu	57
E. Metilasyona-spesifik PCR	59
F. Agaroz Jel Elektrofözezi	63
G. İstatiksel Analiz	63
BULGULAR	64
A. Tümör Dokularında Metilasyon Sıklığının Değerlendirilmesi	64
B. İdrar Örneklerinde Metilasyonun Değerlendirilmesi	65
C. İdrar Sitolojisi	69
D. İdrar Sitolojisi ve MSP'nin Duyarlılıklarının Karşılaştırılması	72
TARTIŞMA	74
SONUÇ ve ÖNERİLER	85
KAYNAKLAR	86
EKLER	96
A. Etik Kurul Raporu	96
B. Hasta Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu	97
ÖZGEÇMİŞ	102

GİRİŞ

Mesane kanseri ürogenital kanserler arasında en sık ikinci ölüm nedenidir. Mesane tümörlerinin yaklaşık %70-80'ni invaziv değildir ancak yaklaşık %70'i nüksetmektedir (Enokida ve Nakagawa, 2008).

Mesane kanserinin tanısında sistoskopik muayene altın standart olmakla birlikte pahalı bir yöntemdir, hastada rahatsızlığa sebep olmakta ve değişken duyarlılık göstermektedir (Zhang ve ark., 2001; Kim ve Kim, 2009). İdrarın sitolojik analizi ise kanser tanısı için standart invaziv olmayan bir metot olmakla birlikte özellikle düşük grade transisyonel hücre karsinomalarında zayıf duyarlılık sergilemektedir (Zhang ve ark., 2001; Kim ve Kim, 2009; Lin ve ark., 2009). Geliştirilen çeşitli hücre-tabanlı metotların çoğu ise geniş çapta kullanım için duyarlılık ve özgüllükten yoksundur (Phé ve ark., 2009).

Mesane kanseri de diğer kanserler gibi çeşitli genetik ve epigenetik değişikliklerin birikimi sonucu oluşmaktadır. Genetik, gen dizisi temelinde kalıtılan bilginin araştırmasını incelerken, epigenetik DNA dizisinde herhangi bir değişiklik olmaksızın gen işlevlerinde veya diğer hücre fenotiplerinde kalıtılabilen geri dönüşümlü değişikliklerin araştırmasıdır (Kim ve ark., 2007). Epigenetik değişiklikler arasında yer alan atipik DNA metilasyonu da kansere yol açan önemli faktörler arasındadır. Tümör baskılayıcı genlerin promoterlarında lokalize olan CpG adacıkları normalde metillenmemiştir. Bu bölgelerin atipik metilasyonu gen ekspresyonunda azalmaya yol açarak normal hücre sel büyüme özelliklerini değiştirebilir (Gonzalzo ve ark., 2007). Metilasyon, karsinogenezin erken sürecinde yer almaktadır ve vücut sıvılarında invaziv olmayan metotlarla belirlenebilir. Birçok çalışma idrarda atipik promoter metilasyonunun belirlenebildiğini ve idrar sitolojisinden daha duyarlı olduğunu açığa çıkarmıştır.

Çalışmamızda mesane kanserli hastaların tümör dokularında ve eşlenikleri olan idrar örneklerinde, twist homolog 1 (Drosophila) (*TWIST1*) ve nidogen 2 (*NID2*) genlerinin metilasyon profillerini tespit etmeyi amaçladık. Gelişimsel süreçlerde anahtar roller oynayan bazik heliks-ilmek-heliks (bHLH) transkripsiyon faktörlerinden biri olan *TWIST1*, epitelyal-mezenkimal değişimi (EMT) indüklemektedir. EMT'yi ve metastazi uyarmadaki ve apoptozisi baskılamadaki rolü *TWIST1*'in bir onkogen işlevine sahip

olduğunu göstermektedir (Gort ve ark., 2008; Okada ve ark., 2010). NID2 ise bazal membranların bir üyesi olarak bazal membran bileşenlerinden olan kollajen IV ve laminin ağları arasında bağlayıcı element olarak rol oynar. Bazal membran moleküllerinin kaybıyla indüklenen değişikliklerin çoğu mekanik stabilitede kayıpla ilişkilendirilmiştir (Bader ve ark., 2005). *TWIST1* ve *NID2* genlerinin metilasyonları çeşitli kanser türlerinde kısmen çalışılmış olsa da, Renard ve arkadaşlarının çalışmasına (Renard ve ark., 2010) kadar olan süreçte mesane kanserinde test edilmemiştir. Şu ana kadar ki bilğimiz doğrultusunda literatürde ikinci olan bu çalışmada, farklı bir populasyon grubunda ve ilkinden farklı bir metotla metilasyon belirteçleri olarak *TWIST1* ve *NID2* genlerinin kombine analizinin mesane kanserinin erken tanısındaki potansiyel etkinliğini değerlendirmeyi ve duyarlılık düzeyini idrar sitolojisi sonuçlarıyla karşılaştırmayı hedefledik.

GENEL BİLGİLER

A. Mesane Kanseri Patolojisi

Mesane kanseri, dünyadaki malignansilerin en yaygın beşinci, ürogenital yolun en yaygın ikinci tümörü ve ürogenital kanserler arasında en sık ikinci ölüm nedenidir. Histopatolojisi ve klinik özelliklerine göre invaziv veya invaziv olmayan mesane kanseri olarak sınıflandırılabilir. Bu tümörlerin yaklaşık %70-80'ni invaziv değildir (kas invazyonu yok; <T2) ancak yaklaşık %70'i nüksetmektedir. Rekürent tümörlerin %10-15'i kas invazyonu ve metastaz yapmaktadır. Ayrıca, kas invazyonu yapan tümörlerin %20'si hızlıca ilerleme eğilimindedir ve prognozları olumsuzdur (Enokida ve Nakagawa, 2008).

Mesane kanserlerinin yaklaşık %98'i transisyonel hücre karsinomaları (transitional cell carcinomas: TCC) olan epitelyal malignansilerdir. Diğer nadir rastlanan histolojik tipler ise skuamoz hücre karsinomaları, adenokarsinomalar ve epitelyal olmayan kanserlerdir (Volanis ve ark., 2010).

Mesane kanseri her yaşta görülmekle birlikte genellikle orta yaş veya ileri yaş hastalığıdır. Tanıdaki yaş ortalaması erkeklerde 69 ve kadınlarda 71'dir. Erkeklerde kadınlara nazaran yaklaşık 3 kat daha siktir (Volanis ve ark., 2010).

B. Mesane Kanseri Genetiği

Mesane kanseri de diğer kanserler gibi proto-onkogenlerin aktivasyonuna veya tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonuna yol açan birçok genetik ve epigenetik değişikliklerin birikiminden kaynaklanmaktadır. Çevrenin rolü de dikkate alındığında kanser etiolojisinin çevre, genom ve epigenom arasındaki etkileşimleri kapsadığı söylenebilir.

Çevresel risk faktörleri arasında en önemli ekzojen risk faktörü olarak sigara kullanımı yer almakla birlikte mesleki maruziyet de tüm mesane kanseri olgularının yaklaşık olarak %20'sine neden olur. Anilin boyalarında mevcut olan aromatik aminler ve diğer birçok endüstriyel kimyasalın nedensel olarak mesane kanseriyle ilişkili olduğu bildirilmiştir. Dikkat çekici bir gözlem, çevresel karsinojenlere eşit derecede maruz kalan bireylerin kanser geliştirme risklerinin büyük ölçüde değişebilmesidir. Bu durum

karsinojenik detoksifikasyon sisteminin ve DNA tamir kapasitesinin değiştiği gerçeğine bağlanabilir (Volanis ve ark., 2010).

Mesane kanserine yol açan başlıca genetik ve epigenetik değişiklikler kromozomal belirteçler, genetik belirteçler (proto-onkogenler/onkogenler, tümör baskılayıcı genler, hücre döngüsü düzenleyicileri, hücre adhezyon molekülleri), epigenetik belirteçler ve gen ekspresyon profilleridir (Kim ve ark., 2007).

B.1. Kromozomal Aberasyonlar

Papiller ve solid TCC'lerin tüm grade ve stagelerinde en sık rastlanan kromozomal aberasyon; kromozom 9'daki heterozigotluk kaybıdır (Loss of Heterozygosity: LOH). Kromozom 9 delesyonları histolojik olarak normal, hiperplastik ve displastik retelde belirlenmiştir ve bu bulgular kromozom 9 aberasyonlarının mesane karsinogenezinde erken veya ilkin bir olayı temsil ettiği hipotezini desteklemektedir. Olguların çoğunda kromozomun uzun kolu etkilenmekle (9q22, 9q32-33, 9q34) beraber kromozom 9'un kısa kolunun delesyonları da bulunmuştur. alışmalar 9p21'de, sıklıkla homozigot delesyon tarafından inaktive edilen bir tümör baskılayıcı olan siklin bağımlı kinaz inhibitörü 2A (Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A: *cdkn2a*) zerinde odaklanmıştır. *Cdkn2a* lokusu anahtar hücre döngüsü düzenleyicileri olarak düşünülen p16 ve p14^{ARF} isimli iki proteini kodlamaktadır. Erken evredeki tümörlerde bulunan diğer kromozomal aberasyonlar 8p ve 11p'nin delesyonları ve 1q ve 17q'nun artışlarıdır. İnvaziv tümörlerde yaygın olarak bulunan kromozomal aberasyonlar; 6q, 11p, 18q'nun delesyonları ve 1q, 8q ve 17q'nun artışlarıdır. Bu aberasyonların bazıları bilinen genlerdeki (17p13 ve 13q14'n delesyonları sırasıyla p53 ve Rb1'in inaktivasyonu ile sonuçlanır) değişimleri yansıtırken diğerlerinin önemi tanımlanmamıştır (Volanis ve ark., 2010).

B.2. Proto-onkogenler/Onkogenler

Birçok araştırmacı epidermal büyüme faktörü reseptörünün (epidermal growth factor receptor: EGFR) aşırı ekspresyonuyla yüksek grade ve stage mesane kanseri arasında pozitif korelasyon olduğunu göstermiştir. *HER-2/neu (c-erbB2)* onkogeninin protein ürününün de mesane kanserinde sıklıkla fazla derecede ifade edildiği bulunmuştur. Ayrıca tümör grade'inde artma, sağkalımda azalma ve metastaz

insidansında artışla ilişkilendirilmiştir. Mesane kanserlerinde *Fibroblast Growth Factor Receptor 3 (Fibroblast büyüme faktörü reseptörü 3: FGFR3)* nokta mutasyonları da sıklıkla oluşmaktadır ve bunların özellikle düşük grade ve stagedeki mesane tümörlerinde oluşması prognostik değere sahip olabileceklerini göstermektedir. Yüksek grade mesane kanserlerinde sıklıkla fazla derecede ifade edilen bir diğer proto-onkogen *V-MYC Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog (c-myc)*'dir. Ancak c-myc ekspresyonundaki değişiklikler rekürens, progresyon veya sağkalımla ilişkili olmadığından mesane kanseri için prognostik önemi az olabilir (Kim ve ark., 2007).

B.3. Tümör Baskılayıcı Genler

Hem P53 hem de retinoblastoma (RB) yolları mesane karsinogenezinde önemli bir rol oynamaktadır. Kromozom 17p13.1'de lokalize olan *p53* geni tarafından kodlanan P53 tümör baskılayıcı proteini, apoptozisi başlatarak veya p21waf1/cip1'nin indüksiyonuyla DNA hasarına yanıt olarak G1/S fazında hücre tutuklanmasını indükleyerek tümör baskılanmasında merkezi rol oynar. Mesane tümörlerinin çoğu tek bir 17p allelinin kaybını sergilerken, ikinci vuruş, yabancı tip alleldeki ilave bir mutasyon p53'ü inaktive edebilir ve proteinin çekirdek içinde birikimine ve tümör baskılayıcı fonksiyonunun kaybına yol açabilir. *TP53* geninin inaktivasyonu için diğer bir mekanizma *murine double minutes (mdm2)* onkogeninin aşırı ekspresyonudur. MDM2 proteini, P53'ün proteozomal degradasyonu kadar transkripsiyonel inaktivasyonuna da neden olmaktadır. MDM2'nin aşırı ifadesi TCC'nin artan stage ve gradeleriyle ilişkili bulunmuştur. Rb yolağındaki değişimler de invaziv mesane kanserinin gelişiminde sıklıkla bulunur. *Rb* geni, kromozom 13q14'de lokalize olmakta ve ürünü olan nükleer fosfoprotein gelişim, farklılaşma, hücre döngüsünün sınırlanması, senesans ve apoptozisi içeren ürotelyal karsinogenezde yer alan çeşitli yollarda kritik rol oynamaktadır. RB proteininin aktif formu (defosforile) transkripsiyon faktörü E2F'ye bağlanarak aktivasyonunu engellemektedir. RB tamamen fosforlandığında E2F'yi serbest hale geçirir, E2F de hedef genlerine bağlanabilir ve hücre döngüsü ilerlemesini sağlayabilir. RB kaybıyla tümör stage ve grade'i arasında önemli ilişki bulunmuştur. E2f3'ün amplifikasyon ve ekspresyon artışı da mesane kanserinde stage, grade ve proliferasyon indeksiyle ilişkili bulunmuştur. Son zamanlarda yapılan bir çalışma mesane tümörlerinde Rb inaktivasyonunu ve E2f3 izoformları olan E2f3a ve

E2f3b'nin fazla ifadesini 6p22 bölgesinin amplifikasyonu ile ilişkilendirmiştir. Bu genomik bölge 4 gen (*prl*, *sox4*, *E2f3* ve *cdk11*) içermekte ve tümör gelişiminde kritik role sahip görünmektedir (Volanis ve ark., 2010).

B.4. Hücre Döngüsü Düzenleyicileri

p21, *p27* ve *siklin D1* mesane kanserinde rol oynayan genlerdendir. Değişken p53 ekspresyon seviyelerine sahip mesane kanserli hastalar arasında bazıları negatif p21 ekspresyonu göstermektedir. Bu hastalar (p21 negatif ve anormal p53 ekspresyonu gösterenler) p21-pozitif olanlarla kıyaslandıklarında önemli derecede yüksek rekürens oranı ve azalan sağkalım sergilemişlerdir. İnvaziv tümöre sahip hastalarla yapılan analizde, azalmış p27 ekspresyonu ise genelde ve iyileşme sonrasında kötü sağkalımla ilişkilendirilmiştir. Siklin D1'in ekspresyon seviyesindeki değişikliklerin ise hastalık progresyonuyla ilişkili olmasa da tümör rekürensini bağımsız bir öngörücüsü olabileceği gösterilmiştir (Kim ve ark., 2007).

B.5. Hücre Adhezyon Molekülleri

Matriks metalloproteinaz-2 (MMP-2), matriks metalloproteinaz-2'nin doku inhibitörleri (TIMP-2) ve membran-tipi MMP-1 ekspresyonunun yüksek seviyeleri ve azalmış sağkalım arasında güçlü ilişki bulunmuştur. Azalmış E-kaderin ekspresyonu ise yüksek patolojik grade ve stajeler kadar genellikle kas invazyonu ve uzak metastazla ilişkilendirilmiştir. Yüksek E-kaderin ekspresyonu aynı zamanda genel sağkalım ve rekürensiz sağkalımla ilişkilendirilmiştir. Potansiyel bir diğer prognostik marker olarak hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimlerinde yer alan, geniş çaplı eksprese olan hücre yüzey adhezyon molekülü CD44'ün olabileceği bildirilmiştir. CD44'ün fazla ekspresyonunun mesane kanseri progresyonuyla yakından ilişkili olduğu gösterilmiştir (Kim ve ark., 2007).

Yüksek grade invaziv tümörlerde p53 ve RB gibi hücre döngüsü regülörlerinin inaktivasyonu daha yaygınken, düşük grade invaziv olmayan tümörler MAP kinaz yolağının aktivasyonu ile karakterize edilmektedir (Jarmalaite ve ark., 2008).

Mesane tümörlerinde bulunan genetik değişimleri gösteren tablo aşağıda yer almaktadır (Tablo 1).

Tablo 1: Mesane tümörlerinde bulunan genetik değişimler
(Gunes ve ark.,'dan uyarlanarak, 2010)

Gen	Değişim	Ta mesane tümörleri	İnvaziv ≥T2 mesane tümörleri	İşlevi
Onkogenler				
<i>HRAS/NRAS</i> <i>KRAS2</i>	Aktive edici mutasyonlar	+	+	Raf ve PI3K'yı aktive eder
<i>FGFR3</i>	Aktive edici mutasyonlar	+	+	Büyüme sinyalini iletir
<i>ERBB2</i>	Amplifikasyon/Aşırı ekspresyon	-	+	Büyüme sinyalini iletir
<i>CCND1</i>	Amplifikasyon/Aşırı ekspresyon	+	+	G1-S ilerlemesini kolaylaştırır
<i>MDM2</i>	Amplifikasyon/Aşırı ekspresyon	+	+	p53'ün proteozomal parçalanmasına aracılık eder
<i>E2F3</i>	Amplifikasyon/Aşırı ekspresyon	-	+	Hücre döngüsünü düzenler
<i>PIK3CA</i>	Aktive edici mutasyonlar	+	-	PtdIn'ları fosforiller
Tümör baskılayıcı genler				
<i>RASSF1A</i>	Metilasyon	-	+	Mitotik siklinlerin stabilitesini ve mitotik ilerlemenin zamanlamasını düzenler

Tablo 1 (devam): Mesane tümörlerinde bulunan genetik değişimler
(Gunes ve ark.,’dan uyarlanarak, 2010)

<i>FHIT</i>	Delesyon/metilasyon	-	+	Apoptozisi indükler
<i>CDKN2A</i>	Homozigot delesyon/ metilasyon/mutasyon	+	+	Hücre döngüsünü düzenler
<i>PTCH</i>	Delesyon/mutasyon	+	+	DNA bakımı, tamiri ve/veya replikasyon
<i>DBC1</i>	Delesyon/metilasyon	+	+	G1/S değişiminin negatif düzenlenmesiyle hücre proliferasyonunu inhibe eder
<i>TSC1</i>	Delesyon/mutasyon	+	+	Bir büyüme inhibitör proteini kodlar
<i>PTEN</i>	Homozigot delesyon/mutasyon	-	+	<i>PIP₃</i> ‘ü defosforile eder, <i>PI3K</i> sinyalini antagonize eder
<i>RBI</i>	Delesyon/mutasyon	-	+	E2F’yi tecrit eder, hücre döngüsü ilerlemesini inhibe eder
<i>TP53</i>	Delesyon/mutasyon	-	+	G1-S ilerlemesini inhibe eder
DNA kopya sayısı değişiklikleri				
2q	Delesyon	+	+	
5q	Delesyon	-	+	
6q	Delesyon	-	+	

Tablo 1 (devam): Mesane tümörlerinde bulunan genetik değişimler
(Gunes ve ark.,'dan uyarlanarak, 2010)

8p	Delesyon	+	+	
9p	Delesyon	+	+	
9q	Delesyon	+	+	
10p	Delesyon	+	-	
10q	Delesyon	+	+	
11p	Delesyon	+	+	
11q	Delesyon	-	+	
13q	Delesyon/LOH	+	+	
15q	Delesyon	-	+	
16q	Delesyon	-	+	
17p	Delesyon	+	+	
18q	Delesyon	+	+	
Y	Delesyon	+	+	
1q	Artış	+	+	
3q	Artış	-	+	
5q	Artış	-	+	
8q	Artış	-	+	
10p	Artış	-	+	
17q	Artış	+	+	
20p	Artış	-	+	
20q	Artış	+	+	
1q22	Amplifikasyon	-	+	
3p24	Amplifikasyon	-	+	
6p22	Amplifikasyon	-	+	

Tablo 1 (devam): Mesane tümörlerinde bulunan genetik değişimler
(Gunes ve ark.,’dan uyarlanarak, 2010)

8p12	Amplifikasyon	+	+	
8q21-22 ve q24	Amplifikasyon	-	+	
10p13-14	Amplifikasyon	-	+	
12q15	Amplifikasyon	-	+	
17q21	Amplifikasyon	-	+	
20q13	Amplifikasyon	-	+	
11q13	Amplifikasyon	+	-	

B.6. MikroRNA’ların Ekspresyon Değişiklikleri

MikroRNA’ların (miRNA) değişmiş ekspresyonları da mesane kanserinde rol oynamaktadır. MiRNA’lar yaklaşık 22 nükleotit uzunluğunda protein kodlamayan RNA’lar olup mesajcı RNA (mRNA)’larla etkileşimde bulunup hedef mRNA’nın kırılmasını ve translasyonel baskılanmasını indükleyerek gen ekspresyonunu düzenlerler. Atipik miRNA ekspresyonları (artış veya azalış) onkogenез süreciyle ilişkilendirilmiştir. Yakın zamanlı çalışmalarda özgül miRNA’ların TCC gelişimi ve progresyonunda kritik rol oynadığı rapor edilmiştir. MiRNA’lar tümör baskılayıcı (miR-17-5p, miR-21, miR-126, miR-221) veya onkogen (miR-26a, miR-29c, miR-30c, miR-30e-5p) olarak davranabilirler. Mesane kanserinde miRNA’ların ekspresyon değişimleri Tablo 2’de gösterilmektedir.

Epigenetik değişiklikler arasında yer alan atipik DNA metilasyonu da kansere yol açan önemli faktörler arasındadır. Metilasyon, karsinogenезin erken sürecinde yer almakta olup hem serum hem de idrar örneklerinde invaziv olmayan metotlarla belirlenebilir. DNA metilasyonunun karsinogenезdeki etkileri ve araştırılan genler ayrıntılı olarak bundan sonraki sayfalarda açıklanmaktadır.

Tablo 2: Mesane kanserinde miRNA'ların ekspresyon değişimleri
(Volanis ve ark.,'dan uyarlanarak, 2010)

miRNA	Hedef gen	Kaynak
(a) Artış		
miR-10a	<i>FGFR3</i>	Veerla ve ark., (2009)
miR-17-5p	<i>c-Myc</i>	Gottardo ve ark., (2007)
miR-21	<i>PTEN</i>	Dyrskjøt ve ark., (2009)
miR-23a		Gottardo ve ark., (2007)
miR-23b		Gottardo ve ark., (2007)
miR-26b		Gottardo ve ark., (2007)
miR-30-3p	<i>KRT7</i>	Ichimi ve ark., (2009)
miR-103-1	<i>HOX</i>	Gottardo ve ark., (2007)
miR-125b		Veerla ve ark., (2009)
miR-126	<i>EGFL7</i>	Saito ve ark., (2009)
miR-129	<i>GALNT1 ve SOX4</i>	Dyrskjøt ve ark., (2009)
miR-133a	<i>KRT7</i>	Ichimi ve ark., (2009)
miR-143	<i>Ras</i>	Lin ve ark., (2009)
miR-182		Hanke ve ark., (baskıda)
miR-185		Gottardo ve ark., (2007)
miR-199a*	<i>KRT7</i>	Ichimi ve ark., (2009)
miR-203		Gottardo ve ark., (2007)
miR-205		Gottardo ve ark., (2007)
miR-221	<i>p27^{kip}</i>	Gottardo ve ark., (2007)
miR-222	<i>p27^{kip}</i>	Veerla ve ark., (2009)
miR-223		Gottardo ve ark., (2007)
miR-452		Veerla ve ark., (2009)
(b) Azalış		
miR-7	<i>FGFR3</i>	Veerla ve ark., (2009)
miR-26a		Wang ve ark., (baskıda)
miR-29c		Wang ve ark., (baskıda)
miR-30c		Wang ve ark., (baskıda)
miR-30e-5p		Wang ve ark., (baskıda)
miR-31		Veerla ve ark., (2009)
miR-145		Dyrskjøt ve ark., (2009)

C. Epigenetik

C.1. Epigenetiğin Evrimsel Açıdan Önemi

DNA metilasyonunun kuruluşu ve devam ettirilmesi DNA metiltransferazlar olarak bilinen spesifik enzimler tarafından gerçekleştirilir. Organizmaya bağlı olarak farklı DNA metiltransferazların kullanımıyla metil grubu, adeninin N6 pozisyonuna veya sitozinin moleküler yapısındaki farklı pozisyonlara (N4 veya C5) dahil edilebilir. Adenin metilasyonu Öbakteriler ve Arkea'da bulunur fakat ökaryotlarda bazı tek hücreli organizmalarla (örneğin, Tetrahymena) ve kara bitkilerinin kloroplastik genomuyla sınırlıdır. Ancak, sitozinin C5 pozisyonunun metilasyonu tüm yaşam formlarında ortaktır ve çok hücreli ökaryotlarda bildirilen tek DNA modifikasyonudur. DNA metilasyonunu gösteren organizmalarda metillenen diziler farklılık göstermektedir. Örneğin, omurgalılarda metilasyon temel olarak CpG dinükleotitinde oluşurken bitkilerde CpNpG dizilerinde ve bitkilerde ve mantarlarda CpNpN (N; A, C, G veya T olabilir) dizilerinde de olabilmektedir. En yüksek metilasyon seviyeleri bazı türlerde sitozinlerin %50'ye kadar metillendiği bitkilerde gözlenmektedir. Örneğin, mısırdaki bu yüksek seviyelerdeki metilasyon, genomda mevcut olan çok sayıda transpozonlarla ilişkilidir (Angers ve ark., 2010).

Bakterilerde DNA metilasyonu, bakteriyal genomu ekstraselüler DNA tarafından invazyondan korumak amacıyla bulunmaktadır. Bakteriyal restriksiyon endonükleazları yabancı DNA'yı keserken bakteriyal genomun metillenmiş dizilerini tanımamakta dolayısıyla kesmemektedir (Angers ve ark., 2010). Beklendiği üzere, maya, yuvarlak solucan ve meyve sineği gibi bazı ökaryotlarda DNA metilasyonunun yokluğu ise DNA metiltransferaz homologlarının evrimsel kaybıyla ilişkilidir (Lee ve ark., 2010). DNA metilasyonu için en sık önerilen rollerden biri transpozonlar gibi genomik parazitlerin kontrolüdür. Memelilerde bu hipotezin kanıtı, DNA metilasyonunun mobil element transkripsiyonunu bloke eder görünmesinden köken almaktadır. Ayrıca, memeli genomlarında birçok metillenmiş sitozin mobil elementler içinde bulunur ve DNA metiltransferazlar inaktive edildiğinde, bazı endojen retrovirüsler demetile olma eğilimi gösterir. Ancak, bu 'genom-savunması' hipotezi için diğer hayvan taksonlarında istisnalar bulunmaktadır. Örneğin, *C. intestinalis*'de mobil elementler metillenmemiştir (Yi ve Goodisman, 2009).

DNA metilasyonunu gerçekleştiren DNA metiltransferazların (DNMTs) tümü ortak ve atasal bir kökeni önerecek şekilde korunmuş bir katalitik domaini paylaşmaktadır. Farklı genomlardaki DNMT sayıları önemli derecede varyasyon göstermektedir. Memelilerde yapılan çalışmalar farklı DNMT'lerin farklı fonksiyonlara sahip olduğunu göstermektedir. Örneğin, insan ve fare genomları bir DNMT1, bir DNMT2 ve üç DNMT3 (DNMT3a/b ve DNMT3L) içermektedir (Yi ve Goodisman, 2009). DNMT1, DNA replikasyonları arasında DNA metilasyon motifini devam ettirmekten sorumludur ve bakım metiltransferazı olarak adlandırılmaktadır. DNMT3'ler önceden metillenmemiş sitozinlerin *de novo* metilasyonuna aracılık etmektedir. DNMT2'nin rolü tam olarak çözülmemekle birlikte tRNA metiltransferazı olarak etki edebileceği önerilmektedir (Yi ve Goodisman, 2009; Miklos ve Maleszka, 2011). Karşılaştırmalı analizler fonksiyonel genom çapında bir metilasyon sistemi için en az bir DNMT1, DNMT2 ve DNMT3 mevcudiyetinin gerekliliğini önermektedir. Ayrıca farklı DNMT'lerin sayısı genomik DNA metilasyonunun farklı motiflerine yol açacak şekilde değişebilir. Örneğin, son derece düşük DNA metilasyonu gösteren *D. melanogaster*'in genomu, sadece tek bir DNA metiltransferazı, DNMT2'yi kodlamaktadır. *C. elegans*'in genomu DNA metilasyonundan ve konvansiyonel DNA metiltransferazlardan tamamen yoksundur. Karşılaştırmalı olarak, bir ilkel omurgalı olan *C. intestinalis*'in genomu üç *dnmt* geninin her birinden bir tane kodlamaktadır ve önemli derecede DNA metilasyonu barındırdığı bilinmektedir. Benzer şekilde, bal arısı *A. mellifera*'nın genomu *dnmt1*'in iki homoloğu, bir *dnmt2* ve bir *dnmt3*'ü içeren tüm üç DNA metiltransferaz genini kodlamaktadır. Beklenildiği gibi fonksiyonel çalışmalarla bal arılarında etkin bir metilasyon sisteminin varlığı doğrulanmıştır (Yi ve Goodisman, 2009). Bal arısının öne çıkmasındaki nedenler çok çeşitlidir. İlki, bal arısı genomu dizilenmiş (Honey Bee Genome Consortium, 2006) ve kraliçelerin ve işçilerin beyinlerinin DNA metilasyon motifleri belirlenmiştir. İkincisi, kraliçe ve işçi kastları aynı genomdan köken almaktadır ve bunların farklı morfoloji ve davranışları tamamen hem gelişim süresince hem de yetişkinler olarak farklı besinsel diyetlere bağlıdır. İşçiler polen ve nektar alırken kraliçenin yiyeceği tamamen arı sütünden oluşmaktadır. Üçüncüsü, davranışları dikkat çekici biçimde farklıdır. Bal arısı özellikle beyin gelişimi ve sinaptik plastisite gibi diğer sinir sistemlerinde de gözlenebilen genel nörobiyolojik prensipler açısından zengin bir kaynaktır. Diyetlerine bağlı olarak üç yol, yetişkin

kraliçe, işçi ve erkek arının oluşumuna yol açmaktadır. Ancak diyet, gelişimsel yolların tek modülatörü olmayıp DNA metiltransferaz sisteminin bileşenlerinin sessizleştirilmesi de gelişimsel yolları değiştirmektedir. DNMT3 DNA metiltransferaz transkripti, larvalara küçük araya giren RNA'nın injeksiyonuyla aşağı regüle edildiğinde, pupa evresinden çıkan işlem görmüş bireylerin kraliçeler olduğu gözlenmiştir. Böylece, larval gelişim süresince DNA metiltransferaz sisteminin bir kısmına yapılan ve aşağı regülasyonuna etki edecek basit bir müdahale, arı sütü diyetinde olduğu gibi aynı gelişimsel yörüngeye yol açmaktadır. Ayrıca, DNA metilasyon seviyeleri, arı kovanında büyütülen işçi ve kraliçe larvalarının özgül genlerindeki CpG dinükleotitlerinde ölçüldüğü zaman, DNA metilasyonunun kraliçe larvalarının başlarında azaldığı bulunmuştur. Benzer şekilde, DNMT3'ün RNAi sessizleştirilmesi aracılığıyla kraliçeler oluşturulduğunda, bu RNAi-indüklenmiş kraliçeler de test edilen aynı genlerde azalmış seviyelerde metilasyon göstermiştir. Bu iki sonuç uyumludur; arı sütü diyeti aracılığıyla doğal olarak oluşan kraliçeler, RNAi sessizleştirilmesi aracılığıyla oluşanlara benzerdir. Tüm bu nedenlerden dolayı bal arısı, hangi metabolik genlerin eksprese edileceğini işaretleme yolu olarak tercihen DNA metilasyonundan yararlanabilir (Miklos ve Maleszka, 2011).

Feng ve arkadaşları shotgun genomik bisüfit dizilemeyle sekiz farklı bitki ve hayvan genomlarındaki DNA metilasyonunu karşılaştırmıştır. Çeşitli bitki ve hayvan türlerinde metilasyonun ekzonlardan yana olan tercihi, ekzon metilasyonunun atasal bir durum olabileceğini önermektedir (Feng ve ark., 2010).

Karşılaştırılmalı araçlarla genom dizilerinden farklı dnmt'lerin varlığını araştırmak, türlerde fonksiyonel bir metilasyon sisteminin olup olmadığını belirlemede önemli bir ipucu sağlayabilir ve kökene spesifik DNA metilasyonunun deneysel tanımlanmasına rehberlik edebilir. DNMT'ler tarafından sunulan DNA metilasyon sinyali, yüksek derecede korunmuş bir metil-bağlayıcı-domain (MBD) içeren ve bu nedenle 'MBD ailesi' olarak adlandırılan bir protein ailesini de içeren diğer proteinler tarafından okunabilir. MBD proteinleri filogenetik olarak yaygın dağılım göstermektedir. Ayrıca DNMT proteinlerinde olduğu gibi, MBD proteinlerinin sayısı da türler arasında büyük çapta değişiklik göstermektedir. Yüksek metilasyon sergileyen genomlar, kısmi genomik DNA metilasyonu olanlardan daha fazla mbd kodlamaya eğilimlidirler. DNMT ve MBD protein dizilerinin analizleri, bazı metilasyon

proteinlerinin yeni fonksiyonlarla ilişkili hızlı evrimleşmeye maruz kalıp kalmadığını açığa çıkaracaktır. Genomik bir bölgedeki CpG dinükleotitlerinin azalması genellikle CpG O/E olarak adlandırılan, gözlenen CpG sıklığının beklenen CpG sıklığı tarafından normalize edildiği bir metrikle ölçülür. Farklı genomların CpG O/E değerlerini karşılaştırmak DNA metilasyon seviyelerini belirlemek için basit ve güçlü bir araçtır. *D. melanogaster* genomundaki genlerin CpG O/E değerleri, DNA metilasyonu olmayan bir sistemde bekleneceği gibi, 1 civarındaki bir ortalamaya sahip Gauss dağılımı gösterir. Tersine, *C. intestinalis* ve *A. mellifera* genomlarındaki genler, muhtemelen genomdaki genlerin hiper- ve hipo-metillenmiş sınıflara bölünmesinden kaynaklanan farklı çift tepeli dağılımlar sergilerler. İnsan genlerindeki CpG O/E değerleri, 'yoğun' genomik DNA metilasyonu ile açıklanan CpG dinükleotitlerinin önemli derecede azalmasını ispatlayacak şekilde 0.2 civarındadır (Yi ve Goodisman, 2009).

Evrimsel yenilik için kaynak oluşturan olaylardan biri, genom dinamiğinde sıklıkla oluşan gen duplikasyonudur. Ancak gen duplikasyonları, bir organizmanın uyumunu azaltıcı şekilde proteinlerin stokiyometrik dengesizliğine de yol açabilir. Böyle zararlı mutasyonların çoğu saflaştırıcı seçim tarafından uzaklaştırılmakla birlikte, zararlı mutasyonların sıklığı genetik sürüklenme mekanizmasıyla genellikle artabilir ve sonradan yararlı mutasyonlarla telafi edilebilir. Chang ve Liao, insan ve fare homolog dokularının (beyin, karaciğer ve kas) transkriptomlarını araştırmış ve sürüngen-primat farklılaşmasından köken alan yakın zamanlı duplikatlar üzerinde yoğunlaşarak homolog genlerin ekspresyon seviyelerini karşılaştırmışlardır. Memeli evrimi boyunca DNA metilasyonunun duplike genlerin transkripsiyon başlamasını inhibe ederek gen duplikasyonundan sonra dozaj dengesini sağlamada metilasyonun temel rol oynadığı sonucuna varmışlardır. MiRNA'lar da potansiyel olarak duplike genlerin ekspresyonunu değiştirebilmekle birlikte memeli gen duplikasyonundan sonra protein dozaj dengesini yeniden sağlamada ihmal edilebilir rol oynamaktadırlar. Cis-bölgelerindeki farklılaşma da duplike genlerdeki ekspresyon azalmasıyla ilişkili bulunmamıştır. Diferansiyel DNA metilasyonu ve epigenetik değişiklikler gen duplikasyonu tarafından tetiklenen evrimsel süreçte önemli rol oynayabilir ve duplike genleri psödo-gen oluşumu sürecinden koruyabilir (Chang ve Liao, 2012).

Şebekler (Hylobatidae) küçük, ağaçlarda yaşayan maymunlardır. Şebekler, evrim süresince kromozomal yeniden düzenlenme mekanizmalarını çalışmak için harika

bir modeldir çünkü kromozomları diğer maymunlara nazaran hızlandırılmış bir oranda değişiklikler biriktirmektedir. Bu kararsızlığın bir sonucu olarak, şebek ailesinin dört cinsi dört farklı karyotipe (2n: 38'den 52'ye) sahiptir. Şebeklerin dört cinsi insanlarla olan ortak hominoid atalarından 15-20 milyon yıl önce ayrılmıştır. Şebekler, perisentrik ve parasentrik inversiyonları, füzyonları ve Robertsonian ve resiprokal translokasyonları içeren yaygın kromozomal yeniden düzenlenme taşıdıkları için bu nesli tükenmekte olan memeliler, primatlar içinde karyotipik olarak en farklı olanlar arasındadır. Şebeklerde gözlenen bu genom karılma (shuffling), diğer hominoidlerde bulunan yüksek derecedeki karyotip korunumuyla çarpıcı bir karşıtlık içindedir: İnsanları büyük maymunlardan ayıran sadece tek bir inter-kromozomal yeniden düzenleme vardır fakat şebek hattında bu şekilde 40'dan fazla yeniden düzenlenme vardır. Bu türlerdeki kromozomal yeniden düzenlenme oranı diğer primatlardakinden 20 kat daha yüksektir. Şebekteki kırılma noktalarının çoğunlukla normalde primat genomlarında bol miktarda bulunan, Alu olarak adlandırılan endojen retrotranspozonlarla ilişkili olduğu gözlenmiştir. Ayrıca, şebekteki Alu'lar insandaki ortolog Alu'larla karşılaştırıldığı zaman daha az sayıda metillenmiş CpG'ye sahiptir. Memelilerde CpG metilasyonunun retrotranspozonları baskılanmış bir durumda tutarak genom integritesini koruduğu bilinmektedir. Bu nedenle, metilasyon düzeneğindeki bir bozukluğun, şebeklerdeki daha yüksek genom rekombinasyonunu yönlendirdiği önerilmektedir (Brown ve O'Neill, 2009; Carbone ve ark., 2009).

Pai ve arkadaşları da, insan ve şempanzelerden alınan doku örneklerinde genom çapındaki gen ekspresyon seviyelerini ve DNA metilasyon verilerini karşılaştırmışlardır. Beklenildiği gibi, doku ve tür dikkate alınmaksızın her bireyde, metilasyon ve gen ekspresyon seviyeleri arasında negatif bir korelasyon bulunmuştur. Düşük derecede eksprese olan genlerin promoterleri sıklıkla yüksek derecede metillenirken, yüksek derecede eksprese olan genler zayıf şekilde metillenmeye eğilimlidir. İnsanda damgalamaya (imprinting) uğradığı bilinen genler, genlerin imprinting durumunun iki tür arasında korunduğunu önerecek şekilde şempanzelerde de benzer bir hemimetilasyon motifi göstermeye eğilimlidirler. Toplamda, analiz edilen promoter CpG bölgelerinin ortalama %8,6'sı (dokuya bağlı, %3,4-13,5) insanlar ve şempanzeler arasında farklı şekilde metilasyon sergilerken, CpG bölgelerinin ortalama %14,5'i bir tür içindeki dokular arasında farklı şekilde metillenmiştir. Bu motifler, insan

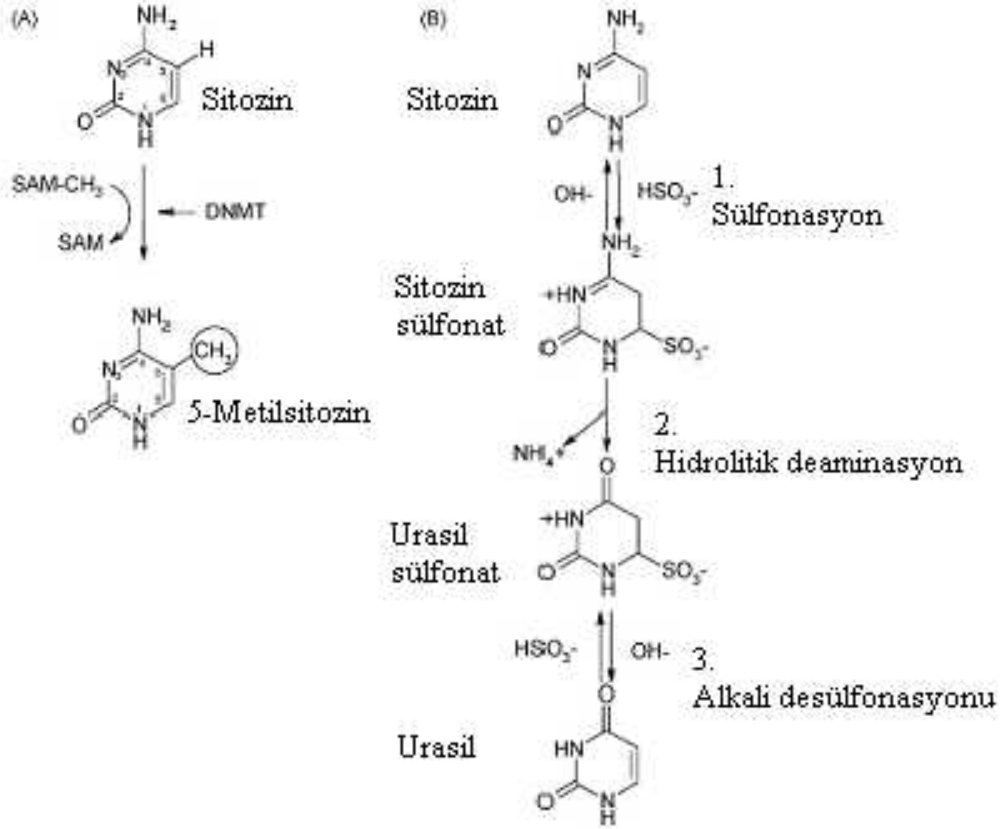
ve faredeki önceki gözlemleri özetlemektedir. İnsanlar ve şempanzeler arasında gen ekspresyon seviyelerindeki %12-18 kadar çok farklılıklar muhtemelen DNA metilasyonundaki türler-arası değişikliklerle açıklanabilir (Pai ve ark., 2011). Bununla beraber belli genlerde sitozin metilasyon motiflerinin korunduğu birçok durum vardır. Meagher, sitozin metilasyon motiflerinin ortak bir atadan 35 milyon yıl önce farklılaşan insan plazminojen dizileri arasında korunmuş görüldüğünü belirtmektedir (Meagher, 2010).

Gen regülasyonundaki rolü ve fenotipik varyasyon oluşturmamasından dolayı epigenetik varyasyon, bireysel uyum üzerinde etkili olabilen ve bu nedenle doğal seçim tarafından etkilenebilecek fenotipik farklılıklar yaratmaktadır. Genetik modifikasyonlardan farklı olarak DNA metilasyonu, çevresel değişikliklere yanıt olarak hızlıca oluşabilir ve bu nedenle, muhtemelen bir bireyin yaşam süresi boyunca bile olan kısa zaman ölçeğinde çevresel stresle başetmede potansiyel bir rol sunabilir. Bireylere çevresel değişikliğe yanıt olarak alternatif fenotipler üretmelerine izin verdiğinden dolayı DNA metilasyonu, kalıtımın yokluğunda bile yararlı bir işlem olabilir. DNA metilasyonu yoluyla fenotipik varyantların üretimi alternatif çevreleri keşfetmede ve sonuç olarak daha geniş bir niş sağlamada yardımcı olabilir. Geri dönüşümlülüğü ve kararsız doğasından dolayı DNA metilasyonunun devamlılığının uzun zaman periyodunda DNA mutasyonları kadar stabil olması beklenmemektedir. Genetik asimilasyon süreci boyunca çevresel olarak indüklenen fenotip genetik olarak asimile olunca, epigenetik işaretler gibi onu üreten çevresel sinyale de daha fazla ihtiyaç duyulmaz. Bu nedenle DNA metilasyonunun rolü geçici olabilmekle beraber yeni çevresel koşullara yanıt olarak fenotipik varyasyonu indükleme yoluyla adaptif bir görüntü oluşumunu başlatması nedeniyle kritiktir (Angers ve ark., 2010). Bu anlatılanlar kapsamında ve Handel ve Ramagopalan'ın da makalelerinde vurguladığı üzere evrimin potansiyel bir Lamarkçı mekanizmasını sağladığından dolayı epigenetik, Darwinci ve Lamarkçı evrimin barışçıl beraberliğine izin vermektedir (Handel ve Ramagopalan, 2010).

C.2. Kanserde Epigenetik Yaklaşımlar

Genetik, gen dizisi temelinde kalıtılan bilginin araştırmasına işaret ederken, epigenetik DNA dizisinde herhangi bir değişiklik olmadan gen işlevlerinde veya diğer hücre fenotiplerinde kalıtılabilen geri dönüşümlü değişikliklerin araştırmasıdır (Kim ve ark., 2007).

Epigenetik aberasyonun bir çeşidi DNA metiltransferazlar tarafından katalizlenen DNA metilasyonu (CpG dizisindeki sitozinin 5'-karbonuna bir metil grubu eklenmesi) dur. CpG adacıkları insan genlerinin yarısında mevcuttur ve tipik olarak genlerin promoterleriyle ve birinci ekzonlarıyla çakışmaktadır (Aleman ve ark., 2008; Cebrian ve ark., 2008). İmprintinge uğramış belirli genler ve dişilerdeki inaktif X kromozomları üzerindeki genler haricinde CpG adacıklarının çoğu metillenmemiştir (Enokida ve Nakagawa, 2008). DNA metilasyonu en iyi memelilerde karakterize edilmiştir. Metil vericisi olarak S-adenozil metiyoninle üç DNA metil transferazdan biri (DNMT1, DNMT3a, DNMT3b) tarafından kataliz edilir. Parental hücrelerdeki DNA metilasyon biçimi doğrulukla duplike edilebilir ve yavru hücrelere dağıtılabilir. CpG adacıklarındaki sitozin metilasyonu ve C-T transisyonu Şekil 1'de gösterilmektedir. A seçeneğinde DNA metiltransferaz 1, 3a veya 3b'nin S-adenozil metiyonini (SAMCH3) bir metil vericisi olarak kullanarak sitozin nükleotidinin pirimidin halkasının 5. karbonuna bir metil grubu eklenmesinin katalizi gösterilmektedir. B seçeneğinde ise C-T transisyonu gösterilmektedir. C-T transisyonu sitozinin sülfonasyonu ile başlatılır (sitozin, sitozin sülfonata dönüşür), sonra hidrolitik deaminasyon oluşur (sitozin sülfonat, urasil sülfonata dönüşür) ve işlem alkali desülfonasyon ile (urasil sülfonat, urasile dönüşür) sonuçlandırılır. Metillenmiş sitozin bu kimyasal işleme dirençli olduğu için metillenmiş ve metillenmemiş CpG metilasyona-spesifik polimeraz zincir reaksiyonu ile (MSP) belirlenebilir (Zhu ve Yao, 2009).



Şekil 1: CpG adacıklarındaki sitozin metilasyonu ve C-T transisyonu
(Zhu ve Yao'dan uyarlanarak, 2009)

DNA metiltransferaz, sitozinin kovalent modifikasyonunu 5-metilsitozin oluşumuyla sonuçlandırır. Sitozin metilasyonunun ilk kez bakterilerde mutajenik olduğu gösterilmiştir ve bu DNA'daki spontan baz yer değişimleri için sıcak noktalar. CpG dinükleotitlerindeki sitozinlerin metilasyonu, C→T transisyon mutasyonları olasılığını 12-42 kat artırmıştır. Genom boyunca bu dizilerin yaklaşık 5-kat azalmasıyla sonuçlanmıştır. Hücre döngüsünü etkileyen önemli genlerin kodlayıcı bölgeleri sıklıkla CpG dinükleotitlerinde metillenir ve mutasyona açık bölgelerin oluşumuna yol açar. 5-metilsitozinin timine deaminasyonu işlevi olmayan proteinin üretimiyle sonuçlanabilir. İnsan kanserlerinde gözlenen *p53* genindeki nokta mutasyonlarının yaklaşık %24'ü CpG dinükleotitlerinde yer alan C→T transisyonlarıdır. *p53* genindeki CpG dinükleotitlerinin tüm mutasyon sıcak noktalarının metillenmiş olması 5-metilsitozini endojen bir mutajen olarak sunmaktadır. Tümör baskılayıcı genlerin promoterlerinde lokalize olan CpG adacıkları normalde metillenmemiştir. Bu bölgelerin anormal

metilasyonu gen ekspresyonunda ilerleyici azalmaya yol açarak normal hücrel büyüme özelliklerini değiştirebilir (Gonzalzo ve ark., 2007). Bu özellikler, kanserin sadece bir genetik hastalık olmadığına işaret etmektedir. Kolorektal kanserde, promoterde yer alan CpG adacıklarındaki DNA hipermetilasyonu sonucu etkilenen genleri ve transkripsiyonel sessizleşmeyi belirlemek için yeni bir transkriptom-çaplı yaklaşım kullanılarak bir tümörde bilinen tüm genlerin yaklaşık %5'inin metillenmiş bir promoter içerdiği tahmin edilmektedir (Zhu ve Yao, 2009).

DNA metilasyon aberasyonları hipo- veya hipermetilasyon şeklinde olabilir. Her iki form da kromozomal instabilite ve transkripsiyonel gen sessizleşmesine yol açabilir ve her ikisi de insanda çeşitli kanserlerle ilişkilendirilmiştir.

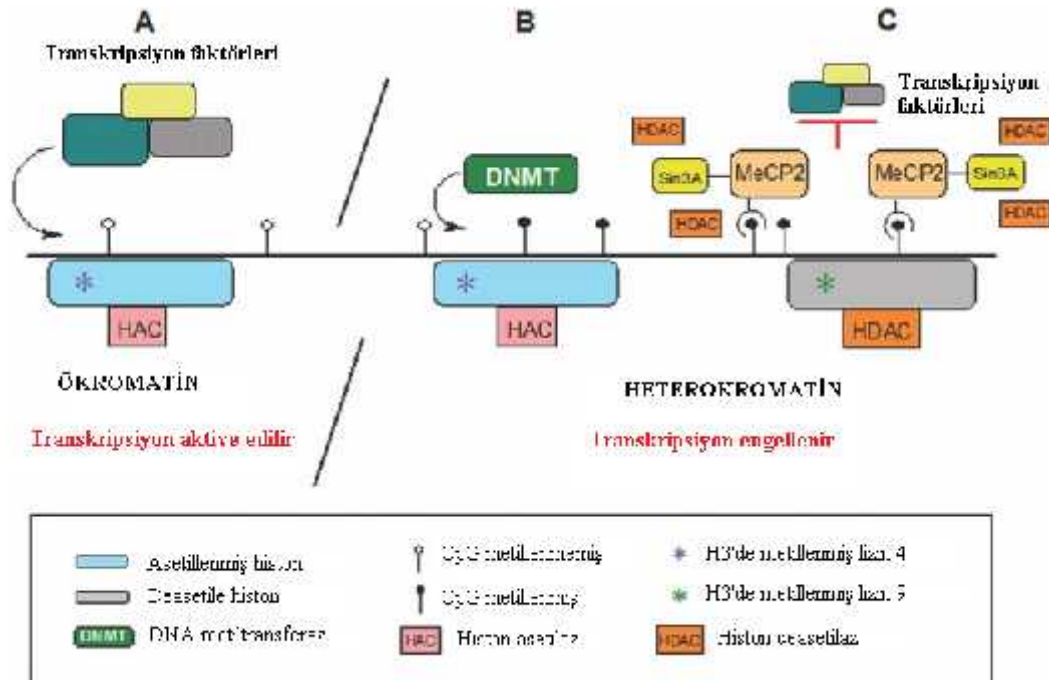
Epigenetik aberasyonun bir diğer çeşidi kromatin yapısını içermektedir. Temel kromatin ünitesi nükleozomdur ve nükleozom çekirdeğine periferal yerleşimdeki histonların N-terminal kuyrukları, özgül kromatin modifiye edici enzimler tarafından katalizlenen asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon ve ubikinyasyon gibi çeşitli kovalent modifikasyonlara maruz kalmaktadır. Histon kuyruklarının asetilasyon ve deasetilasyonu sırasıyla histon asetiltransferazlar ve deasetilazlar (Histone deacetylases: HDACs) tarafından katalizlenmektedir. Histon asetiltransferazlar, transkripsiyonel mekanizmaya promoterin erişimini kolaylaştıran histon asetilasyonunu indükleyerek çeşitli transkripsiyon faktörlerinin aktivitesini artırmaktadır. Tam tersine, HDAC'lar histon asetilasyon seviyelerini redüklemekte olup transkripsiyonel baskılamayla ilişkilendirilmiştir (Enokida ve Nakagawa, 2008). HDAC inhibitörleri (HDACI) tarafından HDAC'ların inhibisyonu farklılaşma, büyümenin engellenmesi ve apoptozisin indüklenmesiyle sonuçlanır. Ayrıca, metil-CpG bağlayıcı protein (MeCP2) metillenmiş DNA'ya bağlanabilir, sonrasında HDAC kompleksinin aktivitesiyle gen ekspresyonunu önleyebilir. DNA çip analizleri, DNA metiltransferaz (DNMT) inhibitörleri ve HDAC inhibitörlerinin kullanımının global gen ekspresyonunu etkilemesi kadar tümör baskılayıcı genlerin sinerjik aktivasyonu da sonuçlandığını göstermektedir. Yan etkileri önlemek ve tümör büyümesinin sinerjik inhibisyonunu sağlamak için DNMT inhibitörleri ve HDAC inhibitörlerinin düşük dozları kombine edilebilir (Karam ve ark., 2007).

Bu iki epigenetik düzenleyici mekanizma, DNA metilasyonu ve histon modifikasyonu, gen ekspresyonunda birbiriyle sıkı şekilde ilişkilidir. Gen

ekspresyonunun başarılı epigenetik kontrolü sıklıkla her iki mekanizmanın kooperasyon ve etkileşimine ihtiyaç duyar. Bu mekanizmalardan birinin bozulması insanda çoğu kanser türünde görüldüğü gibi anormal gen ekspresyonuna yol açar (Enokida ve Nakagawa, 2008).

Çoğu kanser türü bazı promoter dizilerinde bulunan bölgesel hipermetilasyonun yanısıra global hipometilasyon göstermektedir (Kim ve Kim, 2009).

DNA metilasyonu tarafından transkripsiyonun sessizleştirilme mekanizması Şekil 2’de gösterilmektedir. Şekilde: (A) Transkripsiyonel olarak aktif bir durumdaki genin promoteri gösterilmektedir. Bu fazdaki kromatin ökromatini konfigüre eden, bölgeyi transkripsiyon düzeneğinin bileşenlerine ulaşılabilir hale getiren, asetillenmiş histon kompleksleri ve lizin 4’de metillenmiş H3 histonunun kuyruklarından oluşan ayrılmış nükleozomlar tarafından işgal edilir. (B) DNA metiltransferaz CpG adacıklarındaki sitozine metil grubu ekler. (C) Metillenmiş CpG bölgeleri; MeCP2 gibi metil-bağlayıcı proteinleri ve sonra sırasıyla Sin3A ve HDAC’ı bölgeye çeker. Heterokromatini yapılandıran deasetile histon ve lizin 9’da metillenmiş H3 histonuyla kromatin yapısı modifiye edilir. Bir kez bu değişiklikler oluştuğundan sonra, transkripsiyon faktörleri uzaklaştırılır ve transkripsiyon bloke edilir.



Şekil 2: DNA metilasyonu ile transkripsiyonun sessizleştirilme mekanizması

(Daniel ve ark.,'dan uyarlanarak, 2011)

D. Mesane Kanseri ve Epigenetik

D.1. Mesane Kanserinde Hipometilasyon

Memeli genomlarındaki DNA metilasyonu tekrarlayıcı DNA'nın (genom içeriğinin en az %50'sine karşılık gelen) çoğalmasını önlemek için transkripsiyonel olarak sessizleştirildiği bir savunma mekanizmasıdır. Hipometilasyon olarak bilinen normalde metillenmiş DNA'nın demetilasyonu böyle bir savunma mekanizmasını bozabilir ve genomda yapısal ve işlevsel değişikliklere yol açabilir (Enokida ve Nakagawa, 2008).

Hipometilasyon, kromatin yapısındaki değişiklikler, tekrarlayıcı elementler arasındaki rekombinasyon veya retrotranspozonların yeniden ekspresyonuyla genomik kararsızlığı kolaylaştırabilir. Uzun serpiştirilmiş nükleer element dizilerinin (Long Interspersed Nuclear Element Sequences: LINEs) metilasyonu, normal mesane mukozası ile karşılaştırıldığında mesane kanseri hücre hatlarında ve primer tümörlerde azalmıştır. DNA metiltransferaz 1 ekspresyonunun azalması mesane kanserinde tekrarlayıcı elementlerin hipometilasyonundan kısmen sorumlu olabilir. *De novo* metiltransferaz aktivitesindeki küçük artışlar DNA metiltransferaz 1 ekspresyon azalışını telafi etmek için yetersiz olabilir (Gonzalvo ve ark., 2007).

Hipometilasyon mekanizmasıyla düzenlenen genlere örnek olarak heparanaz (HPSE) verilebilir. Matriks metalloproteazlar ve ürokinaz-tipi plazminojen aktivatörleri, ekstraselüler matriksi kaldırmada önemli bir rol oynamaktadır ve tümörlerde sıklıkla ekspresyon artışı göstermektedir. Normal mesane epiteline kıyasla mesane kanseri örneklerinde HPSE geninin oldukça zengin hipometilasyonu ve promoter hipometilasyonu nedeniyle artmış heparanaz ekspresyonu bildirilmiştir (Enokida ve Nakagawa, 2008).

Moore ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, lökosit DNA'sında %5-mC olarak ölçülen medyan global metilasyon seviyesinin mesane kanseri olgularında kontrollerden önemli ölçüde düşük olduğu belirlenmiş ve bağımsız olarak kanser riskiyle ilişkilendirilmiştir. Bu çalışma, lökosit DNA hipometilasyonunun, sigara kullanımı ve araştırılan diğer risk faktörlerinden bağımsız olarak mesane kanseri riskinde güçlü artış sunduğunu gösteren ilk çalışmadır (Moore ve ark., 2008).

D.2. Mesane Kanserinde Hipermetilasyon

Hipermetilasyon hücre döngüsünü kontrol eden genlerde, hücre invazyonu ve hücre mimarisi genlerinde, DNA onarım genlerinde, tümör baskılayıcı genlerde, apoptozisle ilişkili genlerde ve diğer bazı genlerde de gösterilmiştir. Metillenmiş genler çoğu kanserde oluşanlar (örneğin, *E-kaderin* ve *RASSF1a*), birkaç kanserde oluşanlar (örneğin, mesane ve kolon kanserinde *APC*) ve çoğunlukla tek bir organa spesifik olanlar (örneğin, prostat kanserinde *GSTP1* veya böbrek kanserinde *VHL*) olmak üzere üçe ayrılabilir (Phé ve ark., 2009).

Promoter hipermetilasyonu, tümör baskılayıcı gen inaktivasyonu için Knudson'ın çift vuruş hipotezine alternatif bir mekanizma olarak tanınmaktadır (Chan ve ark., 2003).

Mesane kanserinin metilasyon-tabanlı belirlenmesi kapsamında yapılmış önemli çalışmalar inceleme kolaylığı sunması açısından Tablo 3'de özetlenmiştir.

Tablo 3: Metilasyon-tabanlı çalışmaların kısmi literatür özeti

Örnek	Genler	Duyarlılık	Özgüllük	Metot	Referans
Doku	<i>RASSF1A</i>	%60 (33/55)	%100	MSP, COBRA	Lee ve ark., 2001
Doku	<i>DBCCR1</i>	%52 (36/69)	–	Bisülfid dizileme	Habuchi ve ark., 2001
Doku	<i>p14ARF</i>	%56 (15/27)	–	MSP	Dominguez ve ark., 2002
Doku	<i>p16INK4a</i>	%18 (5/27)	–	MSP	Dominguez ve ark., 2002
Doku	<i>E-cad</i>	%84 (43/51)	–	MSP, bisülfid dizileme	Ribeiro-Filho ve ark., 2002
Doku	<i>RASSF1A</i>	%47,5 (19/40)	%100	MSP	Chan ve ark., 2003
Doku	<i>RUNX3</i>	%73 (90/124)	%100	MSP, bisülfid dizileme	Wun-Jae Kim ve ark., 2005
Doku	<i>sFRP-1, sFRP-2, sFRP-4, sFRP-5, Wif-1, Dkk-3</i>	%77,2	%66,7	MSP, ROC curve	Urakami ve ark., 2006
Doku	<i>APAF-1</i>	%100 (110/110)	%85 (17/20)	QMSP	Christoph ve ark., 2006
Doku	<i>CASP-8</i>	%3,6 (4/110)	%100 (20/20)	QMSP	Christoph ve ark., 2006
Doku	<i>DAPK-1</i>	%74 (81/110)	%80 (16/20)	QMSP	Christoph ve ark., 2006
Doku	<i>IGFBP-3</i>	%66 (73/110)	%90 (18/20)	QMSP	Christoph ve ark., 2006
Doku	<i>p16INK4a</i>	%18 (8/45)	–	MSP	Kawamoto ve ark., 2006

Tablo 3 (devam): Metilasyon-tabanlı çalışmaların kısmi literatür özeti

Doku	<i>p14ARF</i>	%31 (14/45)	–	MSP	Kawamoto ve ark., 2006
Doku	<i>E-kaderin,</i> <i>TNFRSF25, EDNRB,</i> <i>RASSF1a, APC</i>	%97	%38	QMSP panel analizi	Yates ve ark., 2007
Doku	<i>TU3A</i>	%46,7 (21/45)	–	MSP, COBRA	Awakura ve ark., 2008
Doku	<i>SOX9</i>	%56,4 (57/101)	–	MSP, bisülfid dizileme	Aleman ve ark., 2008
Doku	<i>Casp-8</i>	%19,4 (20/103)	%97,9 (47/48)	MSP	Malekzadeh ve ark., 2009
Doku	<i>Rb1</i>	%28,2 (29/103)	%95,8 (46/48)	MSP	Malekzadeh ve ark., 2009
Doku	<i>DAP-kinaz</i>	%37,8 (39/103)	%91,7 (44/48)	MSP	Sobti ve ark., 2010
Doku	<i>p14ARF</i>	%22,5 (18/80)	–	MSP	Hosseini ve ark., 2010
Doku	<i>p16INK4a</i>	%40 (32/80)	–	MSP	Hosseini ve ark., 2010
Serum	<i>p16INK4a</i>	%22 (19/86)	%98	MSP	Valenzuela ve ark., 2002
Serum	<i>p14ARF</i>	%48,1 (13/27)	%100	MSP	Dominguez ve ark., 2002
Serum	<i>p16INK4a</i>	%7,4 (2/27)	%100	MSP	Dominguez ve ark., 2002
Serum	<i>p14ARF</i>	%10 (8/80)	%100	MSP	Hosseini ve ark., 2010
Serum	<i>p16INK4a</i>	%15 (12/80)	%100	MSP	Hosseini ve ark., 2010

Tablo 3 (devam): Metilasyon-tabanlı çalışmaların kısmi literatür özeti

İdrar	<i>RASSF1a</i>	%50 (7/14)	%100	MSP	Chan ve ark., 2003
İdrar	<i>DAPK, TERT, BCL2</i>	%78,4 (29/37)	%100 (20/20)	QMSP, panel analizi	Friedrich ve ark., 2004
İdrar	<i>CDKN2A, p14ARF, MGMT, GSTP1</i>	%82	%96	QMSP, ROC curve	Hoque ve ark., 2006
İdrar	<i>SALL3, CFTR, ABCC6, HPRI, RASSF1A, MT1A, ALX4, CDH13, RPRM, MINT1, BRCA1</i>	%91,7 (121/132)	%87,6	MSP, panel analizi	Yu ve ark., 2007
İdrar	<i>Myopodin</i>	%65 (25/40)	%79,8 (99/124)	MSP, bisülfid dizileme	Cebrian ve ark., 2008
İdrar	<i>RASSF1A, p14, E-kaderin</i>	%83	%100	MSP, panel analizi	Lin ve ark., 2009

Metilasyon analizinde kombine marker yaklaşımı, test panelindeki marker sayısının artırılmasının duyarlılığı da artırmasının yanısıra maliyeti de artırdığını ve testin özgüllüğünü azalttığını göstermektedir (Hoque ve ark., 2006; Kim ve Kim, 2009).

Bazı durumlarda normal dokularda da hipermetilasyon olgusu gözlenebilmektedir. Negraes ve arkadaşları, mesane tümör dokusuna bitişik normal dokularda da *CDH1*, *SFN* ve *RARB* genlerinin hipermetilasyonunu gözlemişlerdir. Normal dokulardaki atipik metilasyon biçimleri kronik inflamasyon, viral infeksiyon ve yaşlanmayla ilişkilendirilmiştir (Negraes ve ark., 2008). Epigenomda metilasyon değişiklikleri yaşam süreci boyunca da birikmektedir. Örneğin, kolondaki normal epitel,

sonradan kolon kanserinde hipermetile olan genlerde yaşa bağlı olarak metilasyon kazanmaktadır. Bu nedenle, DNA metilasyon biçimlerinin bir moleküler saat oluşturduğu ve normal dokuların yaşını (hücrelerin bölünme sayısını) belirlemek için kullanılabileceği önerilmiştir. Bir tümörün yaşı hakkındaki bilgi, onkogenезin başlama zamanı hakkında fikir verebilir ve erken tanıda önemli uygulamalar sağlayabilir (Wolff ve ark., 2008). Mesane epitelinde yaşla ilişkili metilasyon *e-kaderin* geni için belirlenmiştir. Bornman ve arkadaşları çalışmalarında normal kontrol örneklerinde *e-kaderin* metilasyonunun belirlendiğini ve bu beklenmedik bulgunun test edilen en yaşlı 3 bireyde (71, 82, 92 yaşlarında) gözlendiğini belirtmişlerdir (Bornman ve ark., 2001). Diğer yandan, Friedrich ve arkadaşları ise *RASSF1A* ve *TNFRSF25* genlerindeki gibi bazı metilasyon değişikliklerinin tanımlama için sınırlı kullanıma sahip olabileceğini çünkü bunların normal mesane dokularında da metillendiğini belirtmişlerdir (Friedrich ve ark., 2004).

D.3. Mesane Kanseri Biyomarkerları Olarak Metilasyon Değişikliklerinin Önemi

Mesane kanserinin tanısında sistoskopik muayene altın standart olmakla birlikte pahalıdır, hastada önemli ölçüde rahatsızlığa sebep olmaktadır ve değişken duyarlılık gösterir (Zhang ve ark., 2001; Kim ve Kim, 2009). Ayrıca *in situ* bazı mesane tümörü olgularında, sistoskopik muayeneyle mesane tümörünü sistitten ayırt etmek güçtür (Urakami ve ark., 2006). Dolayısıyla, mesane kanserinin tanısı için yüksek derecede güvenilir, invaziv olmayan yöntemlerin geliştirilmesi erken tanıyı kolaylaştırabilir.

İdrar yolundaki ürotelyal hücre, protein ve metabolitlerin tümü invaziv olmayan şekilde idrardan izole edilebilir ve idrar yolundaki hastalığı belirlemek için analiz edilebilir. Boşaltımla atılan idrarın sitolojik analizi kanser tanısı için standart invaziv olmayan bir metot olmakla birlikte duyarlılığı özellikle düşük grade transisyonel hücre karsinomalarında zayıftır (Zhang ve ark., 2001; Kim ve Kim, 2009; Lin ve ark., 2009).

Mesane kanserinin tanısında ImmunoCytTM (Scimedx Corp., Denville, NJ, USA) ve UroVysionTM (Abbott Molecular Inc., Des Plaines, IL, USA) ve diğer tanısal markerları içeren çeşitli hücre-tabanlı metotlar geliştirilmiştir. Ancak, bunların çoğu

geniş alanda kullanım için duyarlılık ve özgüllükten yoksundur ve rutin klinik kullanımlarına engel teşkil eden yoğun genetik analize ihtiyaç duymaktadır (Phé ve ark., 2009). UroVysion, mesane kanserinin ilk tanısına yardımcı olmak amacıyla floresan in situ hibridizasyon tabanlı olarak kromozomal anomalileri belirlemektedir ve Birleşik Devletler Gıda ve İlaç İdaresi (United States Food and Drug Administration: FDA) tarafından onaylanmıştır. Duyarlılığı %68,6 ve özgüllüğü %77,7'dir. ImmunoCyt ve UroVysion'a ilaveten mesane kanseri için nükleer matriks proteini 22, mesane tümörü antijeni ve telomerazı içeren çeşitli potansiyel markerlar tanımlanmıştır. Mesane kanserinin belirlenmesinde bu markerlar idrar sitolojisinden daha duyarlı olmakla beraber kullanımları düşük özgüllükleri nedeniyle sınırlıdır (Hoque ve ark., 2006).

Yakın zamanda, kanser biyomarkerları olarak mikroRNA'lar daha iyi alternatif olarak düşünülmektedir. Ancak biyokimyasal olarak hem RNA hem de protein DNA'ya nazaran daha az stabildir. Bu durum da onların vücut sıvılarından izole edilmesini imkansız değilse de güç hale getirmektedir. Ayrıca, kanser dokularında her iki molekülün ekspresyonu kanserle ilişkisi olmayan değişkenler tarafından (sirkadiyen ritim, değişken hormon seviyeleri) da etkilenilmektedir (Zhu ve Yao, 2009).

Hastalıklarda epigenetik olayların erken oluşum süreci göz önüne alındığında, semptomatik veya belirgin radyografik belirtiler oluşmadan moleküler tanıdan potansiyel yararlanım imkanı, prognostik bir marker olarak metilasyonun klinik önemini belirtmektedir. Epigenetik değişikliklerin serum, balgam ve idrar gibi vücut sıvılarında da belirlenebilmesi bu yaklaşımın doğruluğunu artırmaktadır. Ürolojik tümürlü hastalarda, plazma ve serum dolaşımındaki tümör DNA'sının varlığı ilk kez 1998 yılında Goessl ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır (Goessl ve ark., 2002). Bununla beraber kansere özgü metilasyon değişiklikleri genellikle tümör dokularında belirlenmektedir ve invaziv evrede olmadığı müddetçe nadiren kan dolaşımında gözlenir. Mesane kanserinde *p16INK4a* ve *p14ARF* genlerinin metilasyon sıklığını araştırdıkları çalışmalarında Hosseini ve arkadaşları, sadece metastatik kanser olgularının kan örneklerinde DNA metilasyonunu belirlemişlerdir. Bu nedenle, mesane kanserinin erken tanısı için idrar sediment DNA'sı kandan izole edilen DNA'dan daha yararlıdır. Ancak, kandan saflaştırılan DNA hasta sağkalımını ve invaziv olmayan evreden invaziv evreye tümör progresyonunu öngörmeye kullanılabılır (Hosseini ve ark., 2010).

Birçok çalışma idrarda atipik promotör metilasyonunun belirlenebilmesinin uygulanabilir olduğunu ve konvansiyonel sitolojiden daha duyarlı olduğunu açığa çıkarmıştır. İdrardan örnek toplanması invaziv olmayan bir tekniktir. Ayrıca idrardan DNA izolasyonu, idrarın düşük protein içeriği nedeniyle teknik olarak serum veya plazmadan da daha kolaydır (Su ve ark., 2004).

Chan ve arkadaşları, 22 mesane kanseri hastasından ve 17 kişilik kontrol grubundan alınan idrar örneklerinden 7 genin (*RARβ*, *DAPK*, *E-kaderin*, *p16*, *p15*, *GSTP1* ve *MGMT*) metilasyon değişimini araştırmışlardır. Metilasyon sıklığı *DAPK* için %45,5, *RARβ* için %68,2, *E-kaderin* için %59,1 ve *p16* için %13,6 olarak bulunmuştur. Bu dört genden herhangi birinin metilasyonu idrar örneklerinin %90,9'unda belirlenmiştir, idrar sitolojisi ise kanser hücrelerini örneklerin sadece %45,5'inde belirleyebilmiştir. İdrar sitolojisinin düşük duyarlılığa sahip olduğu bilinmektedir ve düşük grade olgulardaki fark daha da çarpıcıdır (%100'e karşı %11,1). İdrar örneklerinde metilasyon sadece tümör dokusunda da gözlenen hastalarda belirlenmiş olup yanlış pozitiflik saptanmamıştır. *E-kaderin*, *DAPK* veya *p16* metilasyonu normal idrarda bulunmamış ve %100 özgüllük belirlenmiştir (Kim ve Kim, 2009).

Dulaimi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da üç tümör baskılayıcı genin (*APC*, *RASSF1A* ve *p14^{ARF}*) metilasyonunun değişimi araştırılmıştır. İdrar DNA'sında hipermetilasyon oranı %91 iken sitolojinin pozitiflik oranı %50 olarak belirlenmiştir (Kim ve Kim, 2009).

Tümör biyomarkerının klinik uygulanabilirliği olması için minimal invaziv yöntemlerle elde edilmiş klinik örneklerde kolayca belirlenebilmesi gerekmektedir. DNA hipermetilasyonu bu ihtiyacı karşılayabilecek potansiyel gösterir ve çeşitli nedenlerden dolayı umut verici bir biyomarker olarak değerlendirilebilir. Bu nedenlerin ilki, mutasyonlardan farklı olarak, metilasyon daima belirli bölgelerde (CpG adacıkları) oluşmaktadır ve metilasyona-özgül PCR gibi yüksek duyarlılığa ve bisülfid genomik dizileme gibi yüksek rezolüsyona sahip tekniklerle belirlenebilir. İkincisi, hipermetile DNA hemen hemen her tümör tipiyle ilişkili olabilmektedir ve görünüşte her tümör tipi kendi metillenmiş gen imzasına sahiptir: Prostat kanserinde *GSTP1* geninin, böbrek kanserinde *VHL* geninin, kolon kanserinde yanlış eşleşme tamir geni *MLH1*'in ve özofagus kanserinde *APC*'nin metilasyonu gibi. Ancak, mesane kanserine özgül promotör hipermetilasyonu gösteren böyle bir gen tanımlanmamıştır ve bu nedenle

biyomarker çalışmalarında üç veya daha fazla hipermetile genin kombinasyonları kullanılmıştır (Enokida ve Nakagawa, 2008).

Tanıdaki önemlerinin yanı sıra metilasyon profilleri moleküler klasifikasyon açısından da önem taşımaktadır. Çoğu araştırmacı CpG adacıklarındaki promoter hipermetilasyonunu mesane kanserinde tümör gelişimi, stage, rekürens, progresyon ve sağkalımla da ilişkilendirmişlerdir (Kim ve Kim, 2009). Örneğin *DAPK* hipermetilasyonu yüksek oranda hastalık rekürensiyle ilişkilendirilmiştir (Friedrich ve ark., 2005). Jarmalaite ve arkadaşları da özellikle *DAPK*, *p16* ve *RARβ* genlerinde promoter hipermetilasyonu gösteren tümörlerin sıklıkla nüksettiğini gözlemişlerdir (Jarmalaite ve ark., 2008). Dhawan ve arkadaşları, gen metilasyonunun sıklığının, tümör progresyonu ve mortalitenin güçlü bir göstergesi olduğunu bildirmişlerdir (Dhawan ve ark., 2006). *TIMP-3* geni ise bir istisna teşkil etmektedir. Kas invazyonu olmayan mesane karsinomasında *TIMP-3*'ün metillendiği hastalar metillenmemiş hastalardan daha iyi ve sağlıklı sağkalım süreci sergilemiştir. Bu hastalar düşük tümör rekürensi açısından risk taşımaları nedeniyle daha az agresif bir tedaviye alınabilirler (Friedrich ve ark., 2005).

Benzer klasifikasyonların uygulanabilmesi durumunda, hızlı ve doğru tanının yanı sıra mesane kanserli hastalarda risk değerlendirilmesi de yapılabilir. Metilasyonun var olduğu tümörler, metilasyon olmayan tümörlerle karşılaştırıldığı zaman ileri stage, tümör gelişim oranının yüksekliği ve ölüm oranlarında artışla önemli ölçüde ilişkili olduğu bulunmuştur. Örneğin, *RUNX3* metilasyonu mesane kanseri geliştirme riskini 100 kattan fazla artırmaktadır (Odds Ratio [OR], 107.55) ve aynı zamanda kanser stage, rekürens ve progresyonuyla da ilişkilidir (Kim ve Kim, 2009).

Çoklu hipermetile gene sahip düşük stage ve gradedeki tümörler yüksek-risk olguları olarak göz önünde tutulmalıdır (Neuhausen ve ark., 2006).

İdrarda epigenetik markerların test edilmesi tüm bu nedenlerden dolayı mesane kanserinin erken evrede belirlenmesi için ümit vericidir ve gelecekte daha fazla bireyselleştirilmiş tıropatik stratejilerin geliştirilmesine katkı sağlama potansiyeline sahiptir.

E. *TWIST1* Geni

E.1. Genel Bilgiler ve *TWIST1*'in Etki Mekanizmaları

Gelişimsel süreçlerde anahtar roller oynayan bazik heliks-ilmek-heliks (bHLH) transkripsiyon faktörlerinden biri olan *TWIST1* kökene-spesifik hücrel farklılaşma ve sağkalımla ilişkilidir. Omurgalılarda *TWIST1* erken mezodermal biçimlendirmeyi ve osteogenezi yönetir (Gort ve ark., 2008).

Twist orjinal olarak dorso-ventral kutupluluğu oluşturmayla ilişkili bir protein olarak *Drosophila*'da tanımlanmıştır. Evrimsel olarak yüksek derecede korunumlu bir üye olan *Twist1*, bir diğer bHLH transkripsiyon faktörü olan *Twist2* (*Dermo-1*) ile yoğun homoloji paylaşmaktadır (Miraoui ve Marie, 2010). *Twist* ve *Dermo1* bHLH ve karboksi-terminal domainlerinde oldukça benzerdir (>%90 benzerlik). Amino uçları ise daha az benzerlikle ilişkilidir ve *Dermo1* *Twist*'de mevcut olan glisince zengin bölgeden yoksundur. *Twist* ve *dermo1*, onkogen ürünlerinin bir özelliği olan destekten bağımsız büyümeyi teşvik etme yeteneğine sahiptir (Maestro ve ark., 1999; Puisieux ve ark., 2006). *Drosophila* *Twist* (*DTwist*), bHLH proteinlerinin bir alt ailesinin kurucu üyesidir. *Twist* ailesinin üyeleri insanda (*HTwist*), farede (*MTwist*), kurbağada (*XTwist*), batrakta (*BbTwist*), nematotta (*CeTwist*), sülükte (*HroTwist*), zebrabalığında (*DrTwist*), denizanasında (*PcTwist*) ve tavukta (*Ctwist*) tanımlanmıştır. Bu proteinler *DTwist* proteiniyle karşılaştırıldığı zaman bHLH bölgesinde %59-85 arasında benzerlik paylaşmaktadırlar. Ancak bHLH domainleri omurgalılarda daha yüksek derecede benzerlik gösterirler. İnsan, fare, kurbağa, zebrabalığı ve hatta tüm omurgalıların atası kabul edilen batrak, bHLH domainleri üzerinde %84-100 arasında benzerliği paylaşmaktadır. Bu domainin fonksiyonel önemi bHLH domaininde nokta mutasyonları taşıyan insanların Saethre-Chotzen sendromu sergilemeleridir. İkinci bir domain olan WR motifi omurgalılar ve denizanası arasında yüksek derecede korunmuştur fakat batraklarda ve sineklerde daha az korunumludur ve nematotlarda neredeyse farkedilememektedir. Sülüklerde hiçbir WR motifi tanımlanmamıştır. WR motifi bHLH bölgesinin C-terminalinde 20-55. aminoasitler arasında lokalizedir ve bu bölgenin fonksiyonu belirgin değildir. Ancak, *Htwist* geninde WR motifinden hemen önceki bir anlamsız mutasyonun da hafif bir Saethre-Chotzen sendromu sunması, C-terminal domaininin ya *Twist* aktivitesi ya mRNA'sının stabilitesi veya normal protein katlanması için gerekli olduğunu önermektedir. Bu iki domainin dışında, *Twist* ailesi

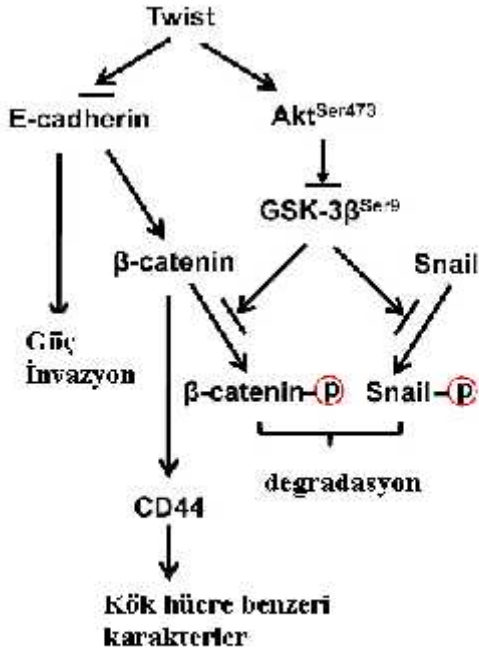
evrimsel manzara bakımından önemli derecede farklılık gösterir. Örneğin, tüm protein üzerinde MTwist ve HTwist gibi Twist'in omurgalı formları %95 benzerlik paylaşırlar DTwist ve MTwist sadece %35 benzerliği paylaşmaktadırlar (Castanon ve Baylies, 2002). *H-twist* geni insan genomunun 7p21 bandında haritalanmıştır. İnsandaki bu kromozomal bölge murinde kromozom 12'nin bir bölümüne karşılık gelmektedir (Bourgeois ve ark., 1996).

Twist-1 null fareler E10.5 de kranial nöral tüp kapanmasında başarısızlıkla sonuçlanan anormal baş mezenşim gelişimi nedeniyle embriyonik letaldir. Twist-2'nin yokluğu doğuma kadar normal gelişimle sonuçlanır fakat şiddetli zafiyet, büyüme geriliği ve glikojen ve yağ depolarının azalmasına yol açan proinflamatuvar sitokinlerin aşırı ekspresyonu nedeniyle perinatal ölüme yol açar (Puisieux ve ark., 2006; Cheng ve ark., 2008).

TWIST1 epitelyal-mezenkimal değişimi (EMT: epithelial to mesenchymal transition) indüklemektedir. Epitelyal-mezenkimal değişim (EMT); erken embriyonik gelişimde gastrulasyon hareketleri ve nöral krest oluşumu süresince hücrelerin hücre-hücre ve hücre-bazal membran kontaktlarını kaybetmeleridir. Hücre-hücre ve hücre-ekstraselüler matriks etkileşimlerinde değişimlerle karakterize edilen olaylar serisini içeren EMT; hücrelerin salınımına, hücre iskeletinin yeniden organize olmasına ve mezenkimal fenotipin devam ettirilmesini sağlamak için yeni bir transkripsiyonel programın indüklenmesine yol açmaktadır. EMT'nin ayırıcı özelliği; epitelyal markerların (E-kaderin, katenin) ekspresyon kaybı ve mezenkimal markerların (N-kaderin, vimentin, SMS-aktin) yeniden ekspresyonudur. *E-kaderin (CDH1)* geninin sessizleştirilmesinde TWIST'in mekanizması Snail'e benzer; DNA bağlayıcı bir faktör olduğu için CDH1 promoterindeki E-kutusu motiflerini tanımaktadır. Embriyogenez süresince EMT ile ilişkili moleküler ve fenotipik değişiklikler metastatik hücrelerin de özelliğidir. Üstelik EMT'ye uğrayan hücreler, tümör hücreleri metastatik bölgelere ulaştıktan sonra mezenkimal-epitelyal değişim (MET) aracılığıyla orijinal epitelyal fenotiplerine geri dönebilirler. Zira MET oluşumunu önerecek şekilde metastazların E-kaderini yeniden eksprese ettiği gösterilmiştir. EMT sürecinde ise çoğu zaman E-kaderin ekspresyon kaybı tümör stage ve grade ile pozitif olarak ilişkilidir (Wallerand ve ark., 2010). Bununla beraber Twist'i aşırı derecede eksprese eden epitelyal hücrelerde ekzojen E-kaderin ekspresyonunun EMT'yi tersine döndürmek için tek

başına yeterli olmadığı, Twist'in EMT-ilişkili başka genlerin ekspresyonunu da düzenlediği belirtilmiştir (Karreth ve Tuveson, 2004). Zhang ve arkadaşları, mesane kanserinde TWIST ekspresyonu ve E-kaderin'le ilişkisini araştırdıkları çalışmalarında mesane kanseri örneklerindeki anormal TWIST ve E-kaderin ekspresyonunun transkripsiyonel seviyede düzenlenebileceğini belirtmişlerdir (Zhang ve ark., 2007).

EMT ayrıca tümör hücrelerine kök hücre-benzeri özellikler de kazandırmaktadır. Li ve Zhou'nun yaptıkları çalışmada; Twist ekspresyonunun HeLa ve MCF7 hücrelerinde EMT'yi indüklediği ve kök hücre-benzeri özelliklerin ve CD44 upregülasyonunun artmasının buna eşlik ettiği gösterilmiştir. Bu hücrelerde CD44'ün upregülasyonuna β -katenin ve Akt yollarının aktivasyonu ile aracılık edilir; her iki yolağın da inhibisyonu sinerjik olarak CD44'ün upregülasyonunu baskılar (Li ve Zhou, 2011). Twist'in EMT ile ilişkili CD44 ekspresyonunu ve kök-hücre benzeri özellikleri sürdürmek için β -katenin ve Akt yollarını nasıl aktive ettiği Şekil 3'de gösterilmektedir.



Şekil 3: Twist'in kök-hücre benzeri özellikleri sürdürmek için ilişki kurduğu yollar (Li ve Zhou'dan uyarlanarak, 2011)

E-kaderin'in β -katenin'i sabitleyip membrandan soyutladığı ve aktivasyonuna engel olduğu bilinmektedir. EMT, β -katenin aktivasyonunu başlatır ve bu aktivasyon tümör mikroçevresindeki Wnt ligandı tarafından sağlanır. Twist ekspresyonu göç ve invazyonu sağlamak için Akt yolağını da aktive etmektedir. Akt'nin aktivasyonu β -katenin ve Snail'in fosforilasyonu için major kinaz olan GSK-3 β 'yı fosforile eder ve baskılar. Bu moleküllerin GSK-3 β tarafından fosforilasyonu β -katenin ve Snail'in E3 ligaz β -Trcp tarafından degradasyonu ile sonuçlanır. EMT'de E-kaderin downregüle edildiği zaman, salınan sitoplazmik β -katenin hala GSK-3 β aracılıklı fosforilasyona ve degradasyona maruz kalabilir. Bundan dolayı, bu işlemi önlemek ve β -katenin aktivasyonunu ve nüklear translokasyonu kolaylaştırmak için ek olarak Akt yolağının aktivasyonu gereklidir. Bu varsayım EMT'nin aynı zamanda çekirdekteki β -katenin mevcudiyetiyle ilişkili olduğu gerçeğiyle uyumludur. Bu yüzden β -katenin ve Akt yollarının aktivasyonu EMT'de sinerjik bir olaydır ve kök hücre-benzeri özelliklere sahip yüksek grade invaziv hücrelerin oluşumu için kritiktir. β -katenin ekspresyonunun veya Akt yolağının wortmannin tarafından baskılanması CD44 ekspresyonunu inhibe etmiştir. Dahası, hem kimyasal baskılama hem de siRNA inaktivasyonu EMT ile ilişkili kök hücre-benzeri özelliklerin devam ettirilmesinde bu 2 yolağın sinerjik etkisini gösterecek şekilde CD44 ekspresyonunu önemli derecede baskılamıştır (Li ve Zhou, 2011).

EMT, epitelyal hücrelerin mezenkimal hücre kaderine maruz kalmasına olanak tanıyan gelişimsel bir programdır ve E-kaderin, N-kaderin, vimentin, α -smooth kas aktini ve β -katenin gibi çeşitli epitelyal ve mezenkimal marker genlerin farklılaşmasının düzenlenmesiyle karakterizedir. E-kaderin kaybı EMT'nin önemli bir özelliğidir ve çeşitli kanser türlerinde olumsuz prognozun öngörücüsüdür. EMT; SNAI1, SNAI2, ZEB1A, ZEB1B ve TWIST1'i içeren bir grup transkripsiyon faktörünün transkripsiyonunun aktivasyonu ve baskılanmasıyla düzenlenir (Gort ve ark., 2008).

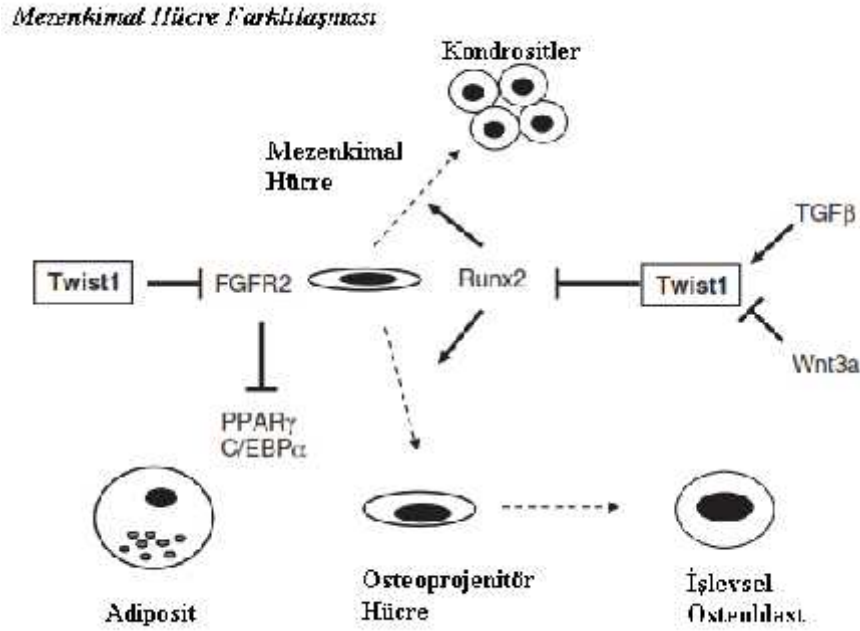
EMT süresince TWIST'in aşırı ekspresyonu tarafından indüklenen E-kaderin ekspresyon kaybı kritik bir olay olarak kabul edilmektedir. TWIST ekspresyonu aynı zamanda N-kaderin, vimentin ve fibronektin gibi mezenkimal belirteçlerin yeniden ekspresyonunu da indüklemektedir. Ayrıca TWIST'in kompleks aşamalardan oluşan metastazdaki özel rolü, kanser hücrelerinin sistemik dolaşıma girişini kolaylaştırır. TWIST'in aşırı ekspresyonu, prostat kanseri tedavisinde kullanılan taxol'a ve mesane

kanserindeki cisplatin'de olduğu gibi kanser hücrelerinde kazanılmış ilaç direnciyle ilişkilidir. TWIST dolaylı yoldan pro-anjiyogenik etki de göstermektedir. Tümör anjiyogenezinin temel faktörü, vasküler endotelial büyüme faktörü (vascular endothelial growth factor: VEGF)dür. TWIST'i aşırı derecede eksprese eden meme kanseri hücre hattında (MCF-7/TWIST), TWIST ekspresyonu göstermeyen meme kanseri kontrol hücre hattıyla (MCF-7) karşılaştırıldığı zaman VEGF'nin 4-kat arttığı gösterilmiştir (Wallerand ve ark., 2010).

Antiapoptotik ve prometastatik fonksiyonuna ek olarak TWIST1'in aşırı ekspresyonu anjiyogenezi ve kromozomal kararsızlığı indüklemektedir (Gort ve ark., 2008).

Twist1, kondrojenik ve adipojenik farklılaşmada ve osteoblastogenezde de rol oynamaktadır. Mezenkimal kök hücrelerin kondrosit, osteoblast veya adipositlere farklılaşmasının anahtar transkripsiyon faktörleri tarafından kontrol edildiği bilinmektedir. Osteoblast farklılaşması esasen Runx2 ve osterix ile kontrol edilirken kondrosit farklılaşması temelde Sox9 tarafından yönetilmektedir. Bu transkripsiyon faktörleri de sırasıyla hücre farklılaşmasını dolaylı olarak kontrol eden çeşitli faktörler tarafından kontrol edilmektedir. Birçok çalışma mezenkimal hücrelerin kıkırdağa farklılaşmasını Twist1'in kontrol ettiğini göstermiştir. *In vitro* olarak Twist1'in aşırı ekspresyonu kondrosit farklılaşmasını inhibe etmektedir. Tam tersine Twist1 sessizleşmesi *in vitro* ve *in vivo* olarak kondrosit fenotipinin ekspresyonunu artırmaktadır. Kondrojenezde Twist1 kondrositlerde sıkıca düzenlenmektedir. Transforme edici büyüme faktörü- β (TGF- β), Twist1 ekspresyonunu indüklemekte ve Runx2 ekspresyonunu azaltmaktayken Wnt3a zıt etkilere sahiptir ve kondrosit gen ekspresyonunu inhibe etmektedir. Twist1 aynı zamanda mezenkimal kök hücre farklılaşmasının adipositlere dönüşümünün erken evrelerini de kontrol edebilir. Kültüre edilmiş murin mezenkimal kök hücrelerinde Twist1 sessizleşmesinin dolaylı mekanizmalarla adiposit gen ekspresyonunu ve farklılaşmasını azalttığı gösterilmiştir. Twist1 sessizleşmesi FGF Reseptör 2 (FGFR2) sinyalini artırmakta ve FGFR2 adiposit farklılaşmasını negatif yönde kontrol etmesi nedeniyle adiposit farklılaşmasında azalmaya yol açmaktadır. Ancak, adiposit gen ekspresyonunun azalması mezenkimal kök hücre farklılaşmasının osteoblastlara doğru yöneliminde Twist1 sessizleşmesinin dolaylı bir sonucu da olabilir. Son zamanlardaki veriler, farelerde enerji

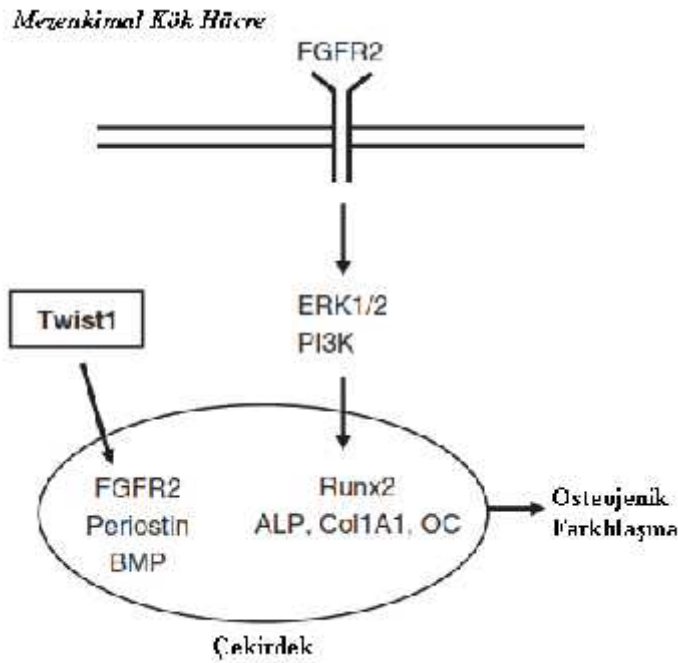
homeostazisinin sürdürülmesinde Twist1 için fizyolojik bir rol önerecek şekilde adipoz dokudaki Twist-1 ekspresyonunun kahverengi yağda PGC-1 α 'nın PPAR γ -indüklenebilir düzenleyicisi olduğunu göstermektedir. Böylece, Twist1 tarafından adiposit fonksiyonunun kontrolünde çeşitli mekanizmaların yer aldığı görünmektedir (Miraoui ve Marie, 2010) (Şekil 4).



Şekil 4: Mezenkimal hücre neslinin dağıtımında Twist'in rolü
(Miraoui ve Marie'den uyarlanarak, 2010)

Twist1 ekspresyonu, osteoblast farklılaşmasını negatif olarak düzenlemekte ve osteoblastik hücrelerin osteoprojenitör-benzeri durumda kalmasını sağlamaktadır. Bununla uyumla olarak, Twist1'in aşırı ekspresyonunun *in vitro* ve *in vivo* osteoblast farklılaşmasını inhibe ettiği bulunmuştur. Osteoblast farklılaşmasında Twist1'in katkısı önemli çıkarımlara neden olabilir. Nitekim Hwang ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, TWIST1, menapoz sonrası kadınlardaki osteoporozla ilişkilendirilmiştir. TWIST1'le ilişkili sinyal yolları kemik mineral yoğunluğunu etkileyebilir. +1871A>G varyantının ve ht2 haplotipinin menapoz sonrası popülasyonda osteoporoz riskinde koruyucu etkilere sahip olduğu belirtilmiştir (Hwang ve ark., 2010). Twist1 ve FGF sinyali arasındaki etkileşim FGF/FGFR sinyalinin osteoblastogenez ve kemik oluşumundaki önemli rolü gözönüne alındığında dikkate değerdir. Twist1 sessizleşmesi,

FGFR2/ERK1/2'yi içeren sinyal kaskadı ve PI3K ve Runx2 aktivitesi aracılığıyla kültüre edilmiş mezenkimal kök hücrelerde osteoblast farklılaşma programını ve osteojenik kapasiteyi artırır. Ancak, FGFR2 sinyaline ek olarak Twist1 tarafından mezenkimal kök hücrelerin osteojenik farklılaşmasında başka sinyal yolları da ilişkili olabilir. Örneğin, Twist1'in in vitro olarak osteoblast farklılaşmasının potansiyel aktivatörleri olan periostin ekspresyonunu ve BMP sinyalini modüle ettiği bulunmuştur. Bu veri, Twist1'in osteoblast farklılaşmasını hem direkt hem de dolaylı mekanizmalarla kontrol ettiği kavramını desteklemektedir (Miraoui ve Marie, 2010) (Şekil 5).



Şekil 5: Mezenkimal hücrelerde osteojenik farklılaşmanın Twist1 tarafından kontrol mekanizmaları (Miraoui ve Marie'den uyarlanarak, 2010)

Mezenkimal hücre kaderinde Twist1'in önemli rolü dikkate alındığında Twist1 ekspresyonundaki değişimlerin iskelet hastalıklarına yol açabilmesi şaşırtıcı değildir. Aynı zamanda akrosefalosindaktili III (ACS III) olarak adlandırılan Saethre-Chotzen sendromu (SCS); yüz dismorfizmi, parmak defektleri ve koronal süturların erken füzyonuyla karakterize edilen bir otozomal dominant kalıtsal hastalıktır. Twist haploinsufficiency nedeniyle artmış osteojenik hücre popülasyonu Saethre-Chotzen sendromunda kraniyosinostoza yol açan mekanizmadır (Miraoui ve Marie, 2010). Esas

olarak çocukları etkileyen malign tümörlerin heterojen bir grubu olan rhabdomyosarkomalarda da uygun olmayan Twist ekspresyonunun bu tümörlerin oluşumunda çeşitli rollere sahip olabileceği bulunmuştur. Rhabdomyosarkomalar farklılaşmamış mezenkimal hücrelerden köken almaktadır. Rhabdomyosarkoma hücrelerinde, myoD ve myogenin gibi miyogenik belirteçlerin ekspresyonuna rağmen iskelet kası farklılaşması erken bir evrede tutuklanır. Gelişmekte olan myotomdan Twist'in çıkarıldığı ve farklılaşmış iskelet kasında eksprese olmadığı belirlenmiştir (Maestro ve ark., 1999).

E.2. TWIST1'in Kanser Yolaklarıyla İlişkisi

Kanser gelişiminde TWIST1 prometastatik bir onkogen olarak fonksiyon görmektedir. TWIST1 proteininin ekspresyonu, p19^{ARF}'nin baskılanmasıyla N-MYC'nin proapoptotik etkilerini etkisiz hale getirir ve böylece Tp53 fonksiyonunu engeller. EMT'yi ve metastazı uyarma ve apoptozisi baskılamadaki rolü TWIST1'in bir onkogen olarak işlev yaptığını gösterir (Gort ve ark., 2008; Okada ve ark., 2010).

TWIST1 ekspresyonu, 3'-enhancer diziler aracılığıyla solid kanserin temel bir özelliği olan hipoksi ile HIF-1 α - ve HIF-2 α -bağımlı şekilde düzenlenmektedir (Gort ve ark., 2008; Okada ve ark., 2010). Tek bir tümör hücresi veya tümör hücresi popülasyonları hipoksinin neden olduğu değişikliklere adapte olmaya zorlanırlar. Hipoksi direkt olarak HIF-1'in upregülasyonunu indükleyebilir. HIF daha sonra Twist1 ekspresyonunu uyarır ve sonrasında EMT oluşumunu indüklemek için Twist1 promoteriyle birleşebilir. Twist1'in upregülasyonu hipoksiden sonraki 24 saatte tepe seviyesine yükselmekte, devam eden hipoksiye bağlı olarak hücrelerin çoğu öldüğü için de 24 saatten sonra Twist1 ekspresyonu azalmaktadır. İlginç şekilde, aynı periyotta (24 saat) antiapoptotik protein Bcl-2 de Twist1'e benzer bir ekspresyon tepe noktasına ulaşır. Bu sonuç aynı hücrede stres fazı boyunca Bcl-2 ve Twist1'in olası rol oynadığını ve benzer kinetiği takip ettiğini belirtmektedir. Bcl-2 uzun zaman bir mitokondriyal membran proteini olarak düşünüldüğü için Bcl-2'nin Twist1 ile transkripsiyonu stimüle etmek için protein kompleksi oluşturması beklenmedik bir bulgudur. Bcl-2 ve Twist1'deki özgül aminoasitler iki proteinin bağlanmasıyla ilişkilidir (Bcl-2 başlangıçta nüklear membran por yapısıyla ilişkili olabilir ve Twist1'in çekirdeğe girmesine yardımcı olduğu varsayımı geçerli olabilir) ve yeni bir fonksiyonel kompleks

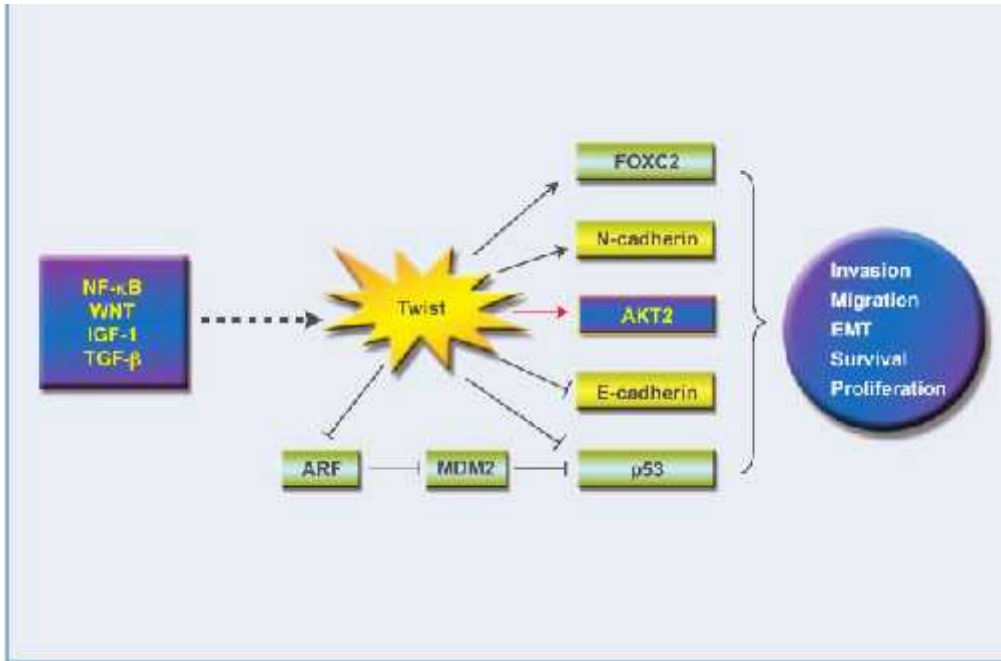
oluşturarak birlikte çekirdeğe girerler ve birçok aşağı hedef gende değişikliklere yol açarlar. Bcl-2 ve Twist arasındaki etkileşim, Twist1'in tek başına gösterdiğiyle karşılaştırıldığı zaman dikkat çekici bir sinerjik biyolojik etki sergilemektedir (Sun ve ark., 2011).

TWIST1; rabdomyosarkomlar, mide karsinomaları, meme kanseri, nöroblastomlar, gliomalar, özofajiyal kanser, pankreas kanseri ve kolorektal kanseri de içeren çeşitli tümörlerde aşırı derecede eksprese olmaktadır. TWIST1'in seviyesindeki artışlar; hepatoselüler, prostat, baş ve boyun karsinomalarında olduğu kadar meme kanserinde de azalmış sağkalım ve/veya metastaz oluşumuyla ilişkilidir (Okada ve ark., 2010).

TWIST, p53 yolağının pozitif düzenleyicisi olan tümör baskılayıcı ARF'nin (insanda p14^{ARF} ve farede p19^{ARF}) negatif düzenleyicisidir. p14ARF; MDM2 ile fiziksel etkileşimde bulunarak p53 yolağını pozitif olarak düzenler. p14ARF'nin MDM2'ye bağlanması p53 stabilizasyonuna ve sonraki büyümenin tutuklanması veya apoptozise yol açarak p53 üzerindeki ubiquitin ligaz aktivitesinin inhibisyonuna neden olur. Bu mekanizma kontrolsüz hücre bölünmesini engellemeye yönelik önemli bir bariyer sağlar. ARF/p53'ün kaybı veya serbestleşmesi hücre proliferasyonu ve onkogenin uyarılmasına yol açar. Kwok ve arkadaşlarının prostat epitelyal hücrelerinde yaptıkları çalışmada da, malign olmayan hücrelerde TWIST'in aşırı ekspresyonu, DNA hasarının birikimiyle sonuç verecek şekilde p14^{ARF}-aracılıklı MDM2/p53 ve Chk1/2 DNA hasarı yanıt yollarının inhibisyonuna yol açmıştır. TWIST'in düşük seviyelerini barındıran hücrelerde gözlenen büyüme tutuklanması yerine, TWIST'i aşırı derecede eksprese eden hücreler TWIST'in genomik kararsızlığı teşvik etmede pozitif bir rol oynadığını önerecek şekilde proliferasyona devam etmiştir (Kwok ve ark., 2007). Twist-1, transkripsiyonun kontrolünde ve translasyon sonrası modifikasyonları da içeren p-53 regülasyonunun farklı basamaklarında rol oynayabilir. Aktivitesini düzenlemek için p53 promoterinin potansiyel bir transaktivatörü olan HOXA5 ile fiziksel olarak etkileşimde bulunabilir. Twist-1 aynı zamanda p53 aktivitesinin kontrolüyle ilişkili bir post-translasyonel işlem olan p300-aracılıklı asetilasyonu inhibe etme yeteneğiyle p-53 aracılıklı transkripsiyonu inhibe edebilir. Twist-1'in aşağı regülasyonunun her ikisi de işlevsel p53'den yoksun olan PC3 ve DU145 prostat kanseri hücrelerinde hücre ölümü duyarlılığını artırması, Twist-1'in apoptozisi hem p53-bağımlı hem de p53-bağımsız

yolaklarla düzenleyebileceğini önermektedir (Puisieux ve ark., 2006). Notch sinyal yolağı da yakın zamanda EMT'nin indüksiyonunu düzenleyen anahtar yollardan biri olarak gösterilmiştir. Notch aktivasyon kompleksinin temel koaktivatörü olan MAML1 de p53'ün transkripsiyonel koaktivatörüdür. MAML1 ve Twist1'in mRNA seviyesindeki ekspresyonlarının klinikle ilişkisi ilk defa özofajeal skuamöz hücre karsinomasında gösterilmiştir (Forghanifard ve ark., 2011).

Twist'in transkripsiyonel regülatör hedeflerinden biri olan AKT2 de kanser hücresinin sağkalımını, göçü ve invazyonu teşvik etmek için Twist'in downstream yönünde hareket etmektedir. Twist ekspresyonunun Wnt-1, insülin-benzeri büyüme faktörü I (IGF-1) ve nükleer faktör- κ B sinyallerine duyarlı olduğu belirtilmiştir. Hiç şüphesiz, kanser tipine ve doku ve hücrelerin içeriğine bağılı olarak Twist'in ilave yukarı düzenleyicileri de mevcuttur. Twist, hedef genler için direkt bir pozitif veya negatif transkripsiyonel düzenleyici olmasının yanı sıra, Twist'in aktif çok az sayıda AKT2, FOXC2 ve CbI gibi aşağı mediyatörlerinin de bulunduğu bilinmektedir (Cheng ve ark., 2008) (Şekil 6)



Şekil 6: Twist'in sinyal ağı ve fonksiyonel etkisi (Cheng ve ark.,'dan, 2008)

E.3. TWIST1'in mikroRNA'larla İlişkisi

Lee ve arkadaşları, normal fizyolojik koşullar altında Twist-1'in miR-199a/214 kümesinin ekspresyonunu yürütebileceğini belirtmişlerdir. Twist-1, *Dynamin-3* geni intronu içindeki E-kutusu aracılığıyla 7.9-kb'lık antisens transkriptin ekspresyonunu yürütmekte ve bu transkript *miR-199a* ve *miR-214* genlerini kodlamaktadır. Twist-1 ekspresyonunun inhibe edilmesi, miR-199a ve miR-214 seviyelerinin azalmasıyla sonuçlanmıştır. Twist-1'in ekspresyonunu yürüttüğü bilinen transkripsiyon faktörü HIF1'in, Twist-1'in, miR-199a'nın ve miR-214'ün ekspresyonları gelişim süresince çakışmaktadır (Lee ve ark., 2008). Wiklund ve arkadaşları, mesane kanseri örneklerinde miR-200 ve miR-205 ailesinin ekspresyonunu ve DNA metilasyonunu değerlendirmişlerdir. miR-200 ve miR-205 direkt olarak E-kaderin (CDH1)'in transkripsiyon düzenleyicisi olan ZEB1 ve ZEB2'yi hedef aldıkları için epitelyal fenotipin temel belirleyicileridir. Bu nedenle miR-200'ün ekspresyon kaybı CDH1'i sessizleştirmeye yeterli olan ZEB1 ve ZEB2'nin birikimine yol açarak EMT'yi ve tümör invazyonunu uyarır. Farklı kanser türlerinde atipik DNA metilasyonu çeşitli miRNA'ların deregülasyonu ile ilişkilendirilmiştir. Kapsamlı bir biyoinformatik analizi, çok sayıda miRNA'nın DNA metilasyon düzeneğinin adayları olabileceğini önermiştir. MiRNA genlerinin yaklaşık %50'sinin CpG adacıklarıyla ilişkili olduğu verisi sunulmuştur. Çalışmada yüzeysel Ta mesane tümörleri ve normal mesane, kas invaziv T2-4 mesane tümörleriyle karşılaştırıldığında miR-200 kümelerinin ve miR-205'in eş zamanlı olarak sessizleştiği ve DNA'nın hipermetile olduğu gösterilmiştir (Wiklund ve ark., 2010).

E.4. TWIST1 Geninin Metilasyonuyla İlgili Çalışmalar

İnsanda meme karsinomalarının %16-77 değişen sıklıkta *TWIST1* promoter hipermetilasyonu sergilediği belirtilmiştir (Gort ve ark., 2008; Okada ve ark., 2010). Gort ve arkadaşları 76 invaziv meme kanseri olgusunun parafine gömülü örneklerinde *TWIST1* promoterinin ortalama metilasyon yüzdesini %34 olarak bulmuşlardır. Ayrıca mRNA ve protein düzeyinde de *TWIST1* ekspresyonu değerlendirilmiş ve *TWIST1* mRNA seviyelerinin normal ve malign dokular arasında fark göstermediği belirtilmiştir. Bu nedenle *TWIST1* protein ekspresyonundaki farklılığın *TWIST1*'in transkripsiyon sonrası düzenlenmesiyle açıklanabileceğine değinmişlerdir (Gort ve ark., 2008). Huang

ve arkadaşları, filloides ve fibroadenom meme tümörleriyle ilgili yaptıkları çalışmada, benign filloides tümörlerde ve fibroadenomlarda metilasyona rastlamazken, sınırdaki ve malign filloides tümörlerde *TWIST1* promoter metilasyonunun arttığını ve bunun filloides ve fibroadenom tümörleri ayırtmede faydalı bir moleküler belirteç olabileceğini belirtmişlerdir (Huang ve ark., 2010). Mehrotra ve arkadaşlarının primer meme karsinomalarıyla karşılaştırmalı olarak yaptıkları çalışmada, *TWIST*, yüksek metilasyon sıklığı gösteren, kemik, beyin ve akciğer metastazıyla ilişkili bulunan genlerden biridir (Mehrotra ve ark., 2004). Kim ve arkadaşları, Koreli kadınlarda meme karsinomasının tanımlanmasında tanısal bir araç olarak serumda dört genin (*HIN-1*, *RASSF1A*, *RAR-β* ve *Twist*) promoter hipermetilasyonunu değerlendirdikleri bir çalışma yapmıştır. Kontrollere nazaran invazif duktal karsinom (invasive ductal carcinoma: IDC) ve in situ duktal karsinom (ductal carcinoma in situ: DCIS)da dört genin metilasyon seviyelerinin daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Üç-gen paneli (*RAR-β/RASSF1A/Twist*) DCIS/IDC için %96,7 duyarlılığa ve %81,6 özgüllüğe sahiptir (Kim ve ark., 2010).

TWIST1 geninin promoter hipermetilasyonu mide kanseri için risk taşıyan hastalardaki gastrik biyopsilerde çalışılmıştır. *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) mide kanseri için başlıca çevresel risk faktörüdür. Ancak, dünya popülasyonunun neredeyse yarısı infekte olduğu için, *H. pylori* infeksiyonunun tek başına bir risk faktörü olarak tanımlanması mide kanserinin önlenmesi problemini kolaylaştırmamaktadır. Çünkü, bu kişiler yalnızca gastrite sahip olacak, %1'den azı kanser geliştirecektir. Yakın zamanlı çalışmalar, *H. pylori* ile infeksiyonun atipik DNA metilasyon seviyelerindeki artışla ilişkili olduğunu göstermektedir. Düşük risk bölgesinde yaşayanlarla karşılaştırıldığı zaman, Kolombiya'daki yüksek risk bölgesinin sakinlerinden alınan gastrik biyopsilerde *RPRM* ile birlikte *TWIST1* geninin promoter DNA metilasyonunda da artış olduğu bulunmuştur (Schneider ve ark., 2010).

Tsou ve arkadaşları, akciğer adenokarsinomasında *TWIST1*'in yüksek derecede önemli hipermetilasyon gösterdiğini belirtmişlerdir (Tsou ve ark., 2007). Selamat ve arkadaşlarının akciğer adenokarsinomasıyla ilgili çalışmalarında da, atipik adenomatöz hiperplazi (atypical adenomatous hyperplasia: AAH) veya in situ adenokarsinom (adenocarcinoma in situ: AIS)da *CDH13*, *CDX2*, *OPCML*, *SFRP1* ile birlikte

TWIST1'in önemli hipermetilasyon göstermediği ancak invaziv adenokarsinomada bu genlerin önemli derecede hipermetile olduğu belirtilmiştir (Selamat ve ark., 2011).

Okada ve arkadaşları, normal kolorektal mukozaya kıyasla, kolorektal adenoma ve kanserde *TWIST1* metilasyon seviyesinin daha yüksek olduğunu belirtmiştir. Hücre hatlarının aksine primer kolorektal karsinomalarda *TWIST1* metilasyonu ile *TWIST1* ekspresyonu arasında ilişki bulunmasa da, *TWIST1* mRNA ekspresyonundaki artış olumsuz sonuçlarla ilişkilendirilmiştir. Ayrıca normal kolorektal mukozadaki *TWIST1* metilasyonu kısmen yaşla ilişkili bulunurken, adenoma ve kanser örneklerinde ilişkilendirilememiştir. Bu veri, *TWIST1* metilasyonunun normal mukozada yaşa-spesifik metilasyon olan metilasyon tip A (age-specific methylation in normal mucosa) olarak sınıflandırılabileceğini önermektedir (Okada ve ark., 2010). Ruppenthal ve arkadaşlarının kolorektal karsinomada yaptıkları çalışmada, *TWIST1* hipermetilasyonu değerlendirilmiş ve daha ileri stage tümörlerle kıyaslandığında TNM stage I olarak sınıflandırılan tümörlerde hipermetilasyonun daha az gözlemlendiği vurgulanmıştır (Ruppenthal ve ark., 2011). Øster ve arkadaşlarının kolorektal adenoma ve karsinomadaki CpG adacıklarının hipermetilasyonunu tanımlama çalışmalarında *TWIST* genini de içeren dört genin (*MLH1*, *AOX1*, *EYA4*, *TWIST1*) kolorektal kanserdeki hipermetilasyonunun daha önce de rapor edildiğine değinilmiş ve çalışmalarındaki üç gen (*EYA4*, *DSC3* ve *TWIST1*) yaşlanmayla ilişkili hipermetile genler listesinde yer almıştır (Øster ve ark., 2011).

Vasiljević ve arkadaşlarının prostat kanserindeki çalışmalarında, *TWIST1*'in metilasyonu, hem benign prostat hiperplazisi (BPH) hem de prostat kanserinde %10'un altında bulunarak BPH ile kanser arasında farklılık yansıtmadığı belirtilmiştir (Vasiljević ve ark., 2011).

Missaoui ve arkadaşları, rahim ağzı neoplazilerinin belirlenmesinde uygulanabilir bir epigenetik marker olarak *TWIST1* metilasyonunu önermişlerdir. Normal dokularda ve benign lezyonlarda promoter hipermetilasyonu belirlenmezken üç genin (*CDH13*, *DAPK1* ve *TWIST1*) promoter hipermetilasyonu, kanser öncesi lezyonlardan kansere doğru progresif artış göstermiştir. Ayrıca, bu genlerin hipermetilasyonu ile *p16^{INK4a}* ekspresyonu arasında istatistik olarak önemli bir ilişki gözlemlenmiştir (Missaoui ve ark., 2011).

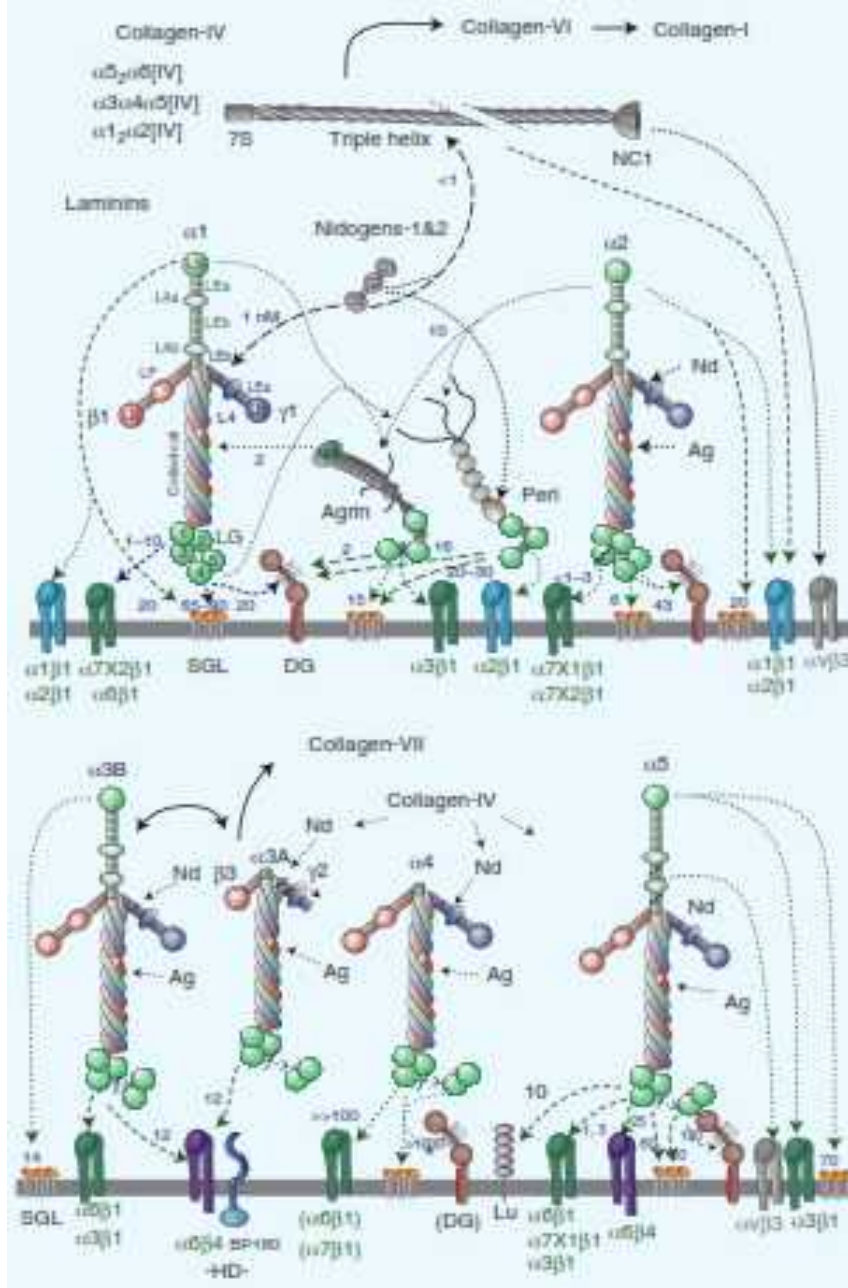
F. *NID2* Geni

F.1. Genel Bilgiler ve *NID2*'nin Etki Mekanizmaları

Bazal membranlar (BM), tüm epitel ve endotellerin altında yatan ve çoğu mezenkimal hücreyi, özellikle miyositleri ve Schwann hücrelerini çevreleyen özelleşmiş ekstraselüler matrislerdir. Bazal membranlar; farklılaşma, proliferasyon, sağkalım ve embriyonik gelişim süresinde hücre göçünde temel roller oynamakla birlikte aynı zamanda seçici bariyerler ve yapısal iskeleler olarak da görev yapmaktadır. Ayrıca bazal membranlar, sitokinler ve büyüme faktörleri için rezervuar olarak da rol oynamaktadırlar. Tüm bazal membranlar; laminin, nidogen, kollajen tip IV ve proteoglikan ailelerinin (perlekanı içeren) her birinden en az bir temsilci içermektedirler (Bader ve ark., 2005; Nischt ve ark., 2006; Mokkapati ve ark., 2008). Bazal lamina bileşenlerinin dört ailesi de sinapsa özgül izoformlara ve fonksiyonlara sahiptir. Nidogen-1, sinaptik bazal lamina, ekstrasinaptik bazal lamina ve Schwann hücresi bazal laminasının üçünde de bulunurken nidogen-2, sinaptik ve Schwann hücresinin bazal laminalarında bulunur, ekstrasinaptik bazal laminada yoktur. Asıl önemli olan, nidogen-2'nin sinaptik fonksiyonlarının nidogen-1 tarafından tamamen telafi edilememesidir, bu nedenle bu etkiye aracılık eden reseptör veya ligandların nidogen-2'ye seçici olarak bağlanmaları olasıdır (Fox ve ark., 2008). Farelerdeki gen delesyonu çalışmaları kollajen tip IV'ün bazal membranın stabilitesi için gerekli olarak lamininin varlığına bağlı olan bazal membran oluşumunun çok erken evreleri için gerekli olmadığını göstermiştir (Bader ve ark., 2005). 3D (üç boyutlu) birlikte kültür modelinde perlekan-antisense HaCaT hücreleri ve perlekan-null embriyonik fibroblastlarla yapılan transfeksiyon çalışmaları, BM oluşumu için perlekanın mutlak surette gerekmediğini açığa çıkarmıştır. Ancak, apoptozisi bloke etme suretiyle epidermal sağkalım için perlekanın yok denecek kadar az seviyelerine ihtiyaç duyulur (Nischt ve ark., 2006).

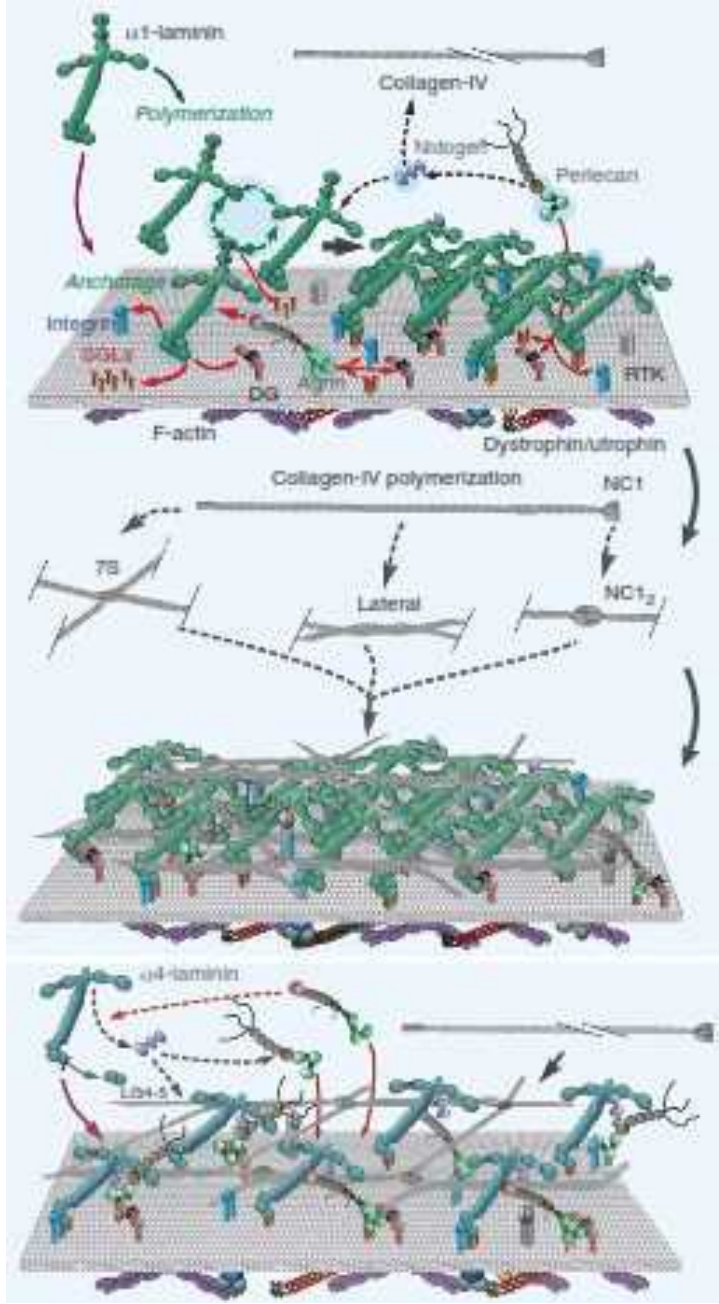
Bazal membran bileşenleri, reseptörleri ve moleküllerarası bağlanma Şekil 7'de gösterilmektedir. Bazal membranlar; lamininler, nidogenler (Nd), tip IV kollajenler, perlekan (perl) ve agrinleri (Ag) içermektedir. Reseptörler ve diğer hücre yüzey bağlayıcı moleküller; integrinler, distroglikan (DG), Lutheran glikoproteini (Lu) ve sülfatidler gibi sülfatlanmış glikolipidleri (SGL) içermektedir. Laminin-3A32; $\alpha6\beta4$ integrin ve BP180 ile etkileşerek hemidesmozom (HD) düzeneğine karışır. Lamininler; domainlerinin komplementlerine göre, polimerize etme yeteneği, proteolitik işleme,

reseptör-bağlayıcı repertuarı ve reseptör affiniteleri, farklılık gösterirler. Rölatif güçlü (koyu kesiksiz ve kesikli çizgiler) ve zayıf (ince kesikli çizgiler) etkileşimler, bilinen durumlarda gösterilen tahmini ayrışma sabitleriyle koyu ve ince çizgilerle belirtilmiştir (nM değerlerindeki küçük sayılar) (Yurchenco, 2012).



Şekil 7: Bazal membran bileşenleri, reseptörleri ve moleküllerarası bağlanma (Yurchenco'dan, 2012)

Bazal membran düzeneği ise Şekil 8'de gösterilmektedir.



Şekil 8: Bazal membran düzeneği (Yurchenco'dan, 2012)

Şekil 8 (A) Bazal membranın kurulmasındaki basamaklar polimerize edici bir laminin tarafından başlatılır. Lamininin LG domainleri; LN domainleri aracılığıyla laminin polimerizasyonunu kolaylaştıran sülfatlanmış glikolipidler (SGL), mevcut integrinler ve α -distroglukan vasıtasıyla kompetan bir hücre yüzeyine bağlanır. α -LN domaini; laminini kendi bölgesi üzerine zorlayarak ve integrinlerin yeni bir alt takımının aktivasyonuna olanak sağlayarak aynı zamanda sülfatidlere ve integrinlere de

bağlanır. Nidogenler; stabilize edici bir köprü oluşturarak lamininin çift kıvrımlı domainine ve tip IV kollajene (kollajen aynı zamanda yetersiz tanımlanmış etkileşimler yoluyla gelişmekte olan bazal membrana da bağlanmaktadır) bağlanırlar. Tip IV kollajen; kovalent olarak stabilize edilmiş ikinci bir ağ oluşturmak için polimerize olur. Agrin ve perlekan sırasıyla lamininin çift kıvrımına ve nidogene bağlanır ve aynı zamanda ekstra reseptörlere kolateral bağlantılar oluşturarak distroglikana (DG), integrinlere ve sülfatlanmış glikolipidlere de bağlanabilir. Heparin-bağlayıcı büyüme faktörleri (GF); integrin aktivasyonu ile uyum içinde sinyal yollarını aktive ederek heparan sülfat zincirlerine ve onların reseptör tirozin kinaz (RTK)'larına bağlanır. (B) Bazal membranın kuruluşundaki basamaklar polimerize edici olmayan bir laminin tarafından başlatılır. Zayıf LG etkileşimleri olan ve α -LN domaini olmayan α 4-laminin durumunda, bağlama ağırlıklı olarak agrin ve perlekan aracılığıyla kolateral bağlantıya bağlıdır. Laminin nidogen aracılığıyla tip IV kollajene bağlantılar oluşturur, ancak polimerizasyon yokluğunda, sonuçta oluşan yapı iskelesi daha az laminin yoğunluğuna sahiptir.

Memelilerde nidogen ailesi aynı zamanda entaktin 1 ve 2 olarak da bilinen, farklı kromozomlar üzerinde lokalize olmuş farklı genler tarafından eksprese edilen 2 üyeden, nidogen 1 ve nidogen 2'den oluşmaktadır. Farede nidogen-2 fare nidogen-1'ile karşılaştırıldığı zaman sadece %27 aminoasit benzerliğine sahiptir, oysaki insanda nidogen-2 insan nidogen-1'ile %46 oranında aminoasit benzerliği paylaşmaktadır (Erickson ve Couchman, 2000). Nidogenler uzamış segmentler tarafından bağlanmış üç globüler domain olan G1-G3'den oluşurlar. İnsandaki nidogen-2 ve faredeki nidogen-2 için benzer domain yapıları önerilmiştir. Bağlantı bölgesi dışında insanla fare arasında yüksek bir dizi benzerliği (%77-92) bulunmuştur (Miosge ve ark., 2002; Salmivirta ve ark., 2002). Nidogen-1'in G3 domaini lamininlere sıkıca bağlanır, oysaki G2, majör bazal membran proteinleri arasında üçlü komplekslerin etkin oluşumuna izin veren kollajen IV ve perlekan için yüksek affinitedeki bağlama bölgelerine sahiptir (Miosge ve ark., 2002). Her iki izoform da embriyonik gelişim süresinde çeşitli organlarda benzer dağılıma sahip ubikuitöz bazal membran bileşenleridir, ancak nidogen 2 için bu durum bazı yetişkin dokularında daha sınırlıdır, örneğin, çizgili kaslardaki kas bazal membranlarında sadece zayıf bir boyama belirlenebilir. Nidogenler; kollajen IV ve laminin ağları arasında bağlayıcı elementler

olarak rol oynar ve diğer bazal membran bileşenlerini, özellikle perlekanı bu özelleşmiş ekstraselüler matrikse dahil ederler. Bazal membran moleküllerinin kaybıyla indüklenen değişikliklerin çoğu mekanik stabilitede kayıpla ilişkilidir (Bader ve ark., 2005). Deride BM, epidermisi dermisten ayıran ve adhesiv ve dinamik bir ara yüzey sağlayan dermal-epidermal bağlantıyı (Dermal-Epidermal Junction: DEJ) oluşturur. Bu nedenle BM derinin yapısal ve fonksiyonel integritesi için elzemdir (Nischt ve ark., 2006). Cheng ve arkadaşları, nidogen-2'ye spesifik siRNA'dan kaynaklanan azalmış nidogen-2 ekspresyonunun, iyi bilinen tümör baskılayıcı gen olan *p53*'e tümör hücre büyümesini baskılamada aracılık eden hücre döngüsü inhibitörü p21 (p21/WAF1)'in ekspresyonunda azalmaya yol açacağını belirtmişlerdir. Bu nedenle, nidogen-2'nin p21/p53 yolağında hücre içi aracılık etme rolü gibi salt BM oluşumundan fazla fonksiyona sahip olması olasıdır (Cheng ve ark., 2012).

Nidogen 1 ve 2 nakavt fareler şaşkırtıcı şekilde hafif fenotipler göstermektedirler. Nidogen-1 eksikliği olan hayvanlarda bazal membranların çoğu ultrastrüktür olarak değişmemiş görünmektedir ve hücreSEL veya doku morfolojisinde çok az değişiklik vardır. Null hayvanlar genellikle sağlıklı görünmektedir, normal bir yaşam uzunluğuna sahip ve fertildir. Ancak, özellikle arka bacaklarda hafif bir ataksi ve spontan felç aktiviteleri şeklinde nörolojik fenotipler göstermektedirler. Nidogen 1 tüm bazal membranlarda bulunurken onun homoloğu nidogen 2'nin ekspresyonu daha sınırlıdır ve iskelet ve kardiyak kaslarının bazal membranlarında sadece eser miktarlarda bulunur. Nidogen 1 eksikliği olan hayvanlarda radioimmünoassay ile belirlendiği üzere bu dokularda nidogen 2 , 3-7 kat arasında artış göstermektedir ve bu iki izoformun komplementer fonksiyonlarını ve *in vivo* paylaşılan bağlayıcı ortakları önerecek şekilde boyanma paterninde yeniden dağılım göstermektedir. Diğer bazal membran proteinlerinin boyanma paterninde herhangi bir değişiklik yoktur. Nidogen 2 null hayvanlar nidogen 1'i de içeren diğer bazal membran moleküllerinin ekspresyon paterninde belirgin bir değişiklik ve fenotip göstermezler (Bader ve ark., 2005). Her iki nidogenden de yoksun olan fareler direkt olarak BM defektleriyle ilişkili akciğer ve kalp anomalilerinden dolayı doğumdan kısa süre sonra ölürlere (Bader ve ark., 2005; Nischt ve ark., 2006). Her iki nidogen izoformunun yokluğundaki tamamen penetrant sindaktilinin hem ön hem de arka bacaklarda oluştuğu bildirilmiştir. Alizarin kırmızısı boyaması ve histolojik kesitleme bu durumun genellikle yalnızca yumuşak dokuları

içerdiğini, kırıkta hücre topluluğunun ayrı olarak oluştuğunu ve genellikle böyle kaldığını göstermiştir. Bazı olgularda hafif füzyon gözlenmekle beraber tam füzyonun bazen oluştuğu laminin $\alpha 5$ alt ünitesinden yoksun farelerde görüldüğü kadar şiddetli değildir (Böse ve ark., 2006; Kruegel ve ark., 2008). Farede olduğu şekilde *Caenorhabditis elegans*'da bilinen tek nidogen geninin kaybı belirgin bazal membran defektlerine yol açmaz fakat bazı sınırlarda değişmiş akson rehberliği kaydedilmiştir. Ayrıca, kollajen XVIII ile beraber nidogen kırıkta sinaps organizasyonunda önemli rol oynar görünmektedir (Salmivirta ve ark., 2002; Bader ve ark., 2005).

Daha önceden benimsenen nidogenlerin laminin ve kollajen IV ağları arasında majör moleküler bağlantı olduğu ve bu nedenle bazal membran oluşumu için elzem olduğu teorisi yanlıştır. Nidogenler ne erken embriyogenez ne de organogenezdeki olayların çoğu için gerekli değildir, daha ziyade belirli bazal membranların oluşumunda ve devam ettirilmesinde spesifik rollere sahiptir (Bader ve ark., 2005).

Tomte ve arkadaşları, yetişkin karaciğerindeki stellat hücrelerin önemli bir nidogen kaynağı olduğunu belirtmişlerdir. Kemik ve kemik iliği gelişmeden önce, hematopoez karaciğer ve dalakta gerçekleşmekte ve belirli bir süre hem karaciğer hem de kemik iliği hematopoietik organlar olarak birlikte görev yapmaktadır. Bu değerlendirmeden hareketle ekstraselüler matriks bileşenlerinin bir şekilde karaciğer hematopoezinde rol alabileceği düşünülebilir. Tomte ve arkadaşları da, farede karaciğer gelişimi süresinde nidogenlerin karaciğer hücre topluluğu taslağında üretildiğini ve hematopoietik hücrelerin bu glikoproteinlerin kaynaklarına ait olduklarını göstermişlerdir (Tomte ve ark., 2006).

F.2. NID2'nin Hastalıklarla İlişkisi

Kruegel ve arkadaşları, insan kırıkta dokusunun bileşenleri arasında nidogen-1 ve nidogen-2'nin varlığını, her iki nidogenin sağlıklı ve osteoartritli (OA) kırıkta farklı dağılım ve ekspresyona sahip olup olmadığını ve her iki proteinin ileri evre osteoartritte kırıkta integritesini yenilemek için kondrosit-nidogen etkileşimleri aracılığıyla hücre davranışını etkileyip etkilemediğini araştırmışlardır. OA defektli hastalıklı kondrositlerle karşılaştırıldığı zaman sağlıklı kırıkta kondrositlerin etrafında 2-kat fazla periselüler nidogen-1 proteini bulunmuştur. Nidogen-2 için ise, fizyolojik olarak sağlıklı kırıkta bulunandan 5-kat fazla periselüler protein hastalıklı

kondrositlerin etrafında bulunmuştur. Bu durum osteoartritli dokuda, nidogen-1'den nidogen-2'ye periselüler bir değişimi belirtmektedir. Ayrıca, sağlıklı kondrositlerin etrafındaki söz konusu protein ekspresyonuyla karşılaştırıldığı zaman, OA defektli uzamış kondrositlerin etrafındaki nidogen-1 ve nidogen-2 proteinlerinin ekspresyonlarında sırasıyla 2-kat ve 8-kat artış bulunmuştur. Osteoartritli kıkırdakta nidogenlerin adhesiv fonksiyonlarını araştırmak için her iki nidogenle hücre adhezyon analizleri uygulanmıştır. Kaplanmamış petri kutularındaki kondrositlerle karşılaştırıldığı zaman, OA defektli kondrositlerin %30-40'ı nidogen-1'e bağlanmıştır. İlginç şekilde, makroskobik olarak intakt bölgedeki kondrositler nidogen-1'e herhangi bir adhezyon sergilememiştir. Aynı adhezyon paterni nidogen-2 için de geçerlidir. Bağlanmanın substrat spesifitesini araştırmak için, inhibisyon analizlerinde nidogenlere karşı antikorlar uygulanmıştır. OA defektli bölgedeki hücrelerin adhezyonu nidogen antikorları tarafından inhibe edilmiştir. Ancak, makroskobik olarak intakt bölgeden alınan hücrelerde herhangi bir inhibisyon gözlenmemiştir. Bu sonuçlar nidogenlerin, özellikle ileri evredeki osteoartritte kondrosit bağlanmasından sorumlu olduğunu belirtmektedir. OA defektinin ara zonunun üstündeki uzamış kondrositlerin nidogenler için en güçlü periselüler boyamayı sergilemesi, her iki molekülün OA'daki rejenerasyon aktivitesi için önemli olabileceğini önermektedir. Kıkırdak defekti olan bölgedeki güçlü fakat sağlıklı kıkırdaktaki zayıf ekspresyonundan dolayı nidogen-2, ileri evre OA için muhtemel bir tanısal marker olabilir (Kruegel ve ark., 2008).

Amann ve arkadaşları, nidogen-2^{-/-} farelerdeki renal fenotipi analiz etmişlerdir. Ya hafif (UNX) ya da şiddetli (UNX+DOCA) böbrek hasarında nidogen-2'den yoksun farelerin şiddetli glomerüler ve tubulointerstisyel hasara daha duyarlı olduğu gösterilmiştir. Patolojik koşullar altında nidogen-2'nin, renal yapıların yapısal ve fonksiyonel integritesini devam ettirmede elzem bir mediyatör olabileceği ve homoloğu nidogen-1'in nidogen-2'nin yerini alamayacağı belirtilmiştir (Amann ve ark., 2009).

Kwon ve arkadaşları, Sjögren sendromlu (SS) hastalarda bazal lamina moleküllerinin yeniden modellenmesinin değiştiği hipotezini test etmişlerdir. Sjögren sendromu (SS); tükürük ve gözyaşlarının yetersiz üretimine yol açan kronik bir hastalıktır. SS'li hastalardaki labiyal tükürük bezleri, morfolojik analizle belirlendiği üzere bireysel bileşenlerin ve yapısal disorganizasyonun kaybını içeren, asinus ve kanalların bazal laminasında çarpıcı değişiklikler gösterir. Lamininler; asimetrik

çaprazımsı bir yapı içinde disülfid bağlarıyla bağlanmış α , β ve γ zincirlerinden oluşan heterotrimerlerdir. Laminin ailesi sahip oldukları domain tiplerine göre üç gruba bölünen en az 15 üye içermektedir. Laminin γ 2-zincir işlenmesinin miktarı kadar işlenmemiş laminin γ 2-zinciri için de hem mRNA hem de protein seviyeleri, düşük seviyedeki interasiner fibrozisli hastalarda önemli derecede daha yüksektir, fakat yüksek seviyedeki interasiner fibrozisli hastalarda daha az bildirilmiştir. Laminin α 1 ve α 4 zincirleri için, düşük seviyedeki interasiner fibrozisli hastalarda, fakat yüksek seviyedeki interasiner fibrozislilerde değil, sadece protein seviyesinde değişiklikler belirlenmiştir. Nidogen 1 ve 2 için, SS hastalarında ve kontrol örneklerinde benzer seviyelerde mRNA ve protein belirlenmekle birlikte düşük seviyedeki interasiner fibrozisli hastalarda, yüksek seviyelerde nidogen degradasyon ürünleri gözlenmiştir. Bu sonuçlar, bu hastalarda en azından hastalığın erken evrelerinde bazal laminanın aktif yeniden yapılanmaya gittiğini belirtmektedir (Kwon ve ark., 2006).

Yumurtalık kanserinde yeni biyomarkerlar geliştirmek amacıyla yumurtalık kanseri olan kadınların serumlarında immunoassay ile nidogen-2 konsantrasyonları ölçülmüştür. Günümüzde tek kabul gören yumurtalık kanseri biyomarkerı CA125 olmakla birlikte CA125 yumurtalık kanserinin erken tanısını etkin bir biçimde koyamamaktadır. Erken evre hastalığıdaki düşük duyarlılığına ilaveten birçok benign jinekolojik hastalıkta da seviyesi yükseldiğinden dolayı CA125 düşük özgüllüğü nedeniyle de sıkıntılıdır. Normal kişilerde ve benign hastalıklara sahip olanlarda serum nidogen-2 konsantrasyonu farklı değilken yumurtalık kanserine sahip hastaların serumlarındaki nidogen-2 konsantrasyonunun yükseldiği bulunmuştur. Ayrıca nidogen-2 ve CA125 konsantrasyonları güçlü bir şekilde ilişkili bulunmuştur. Bu veri bu konudaki ilk rapor olma özelliğiyle yumurtalık kanseri için nidogen-2'nin yeni bir serolojik biyomarker olabileceği görüşünü desteklemektedir (Kuk ve ark., 2010).

Cheng ve arkadaşları, hepatoselüler karsinomalı hastaların tümör dokuları ve serumlarında immünohistokimya, immunoassay ve real-time PCR analizleriyle nidogen-2 ekspresyonunu araştırmışlardır. Nidogen-2 hastaların hem hepatoselüler dokularında hem de serumlarında önemli derecede azalma göstermiştir. Ayrıca, benign karaciğer hastalıklarına sahip hastalar ve normal gönüllülerle karşılaştırıldığı zaman, hepatoselüler karsinomalı hastalar en düşük serum nidogen-2 seviyelerine sahiptirler. Oysa yumurtalık kanserine sahip hastalarda, benign jinekolojik tümörler ve normal

kontrollerle karşılaştırıldığı zaman, serum nidogen-2 seviyelerinin yükseldiği belirtilmişti (Kuk ve ark., 2010). Hepatoselüler karsinomalı hastalarda da, nidogen-2 ve CA125 arasında yüksek bir korelasyon gösterilmekle beraber serum nidogen-2 seviyesindeki azalma bu durumun hepaselüler karsinomaya spesifik olabileceği olasılığına ve hepatoselüler ve yumurtalık kanser dokuları arasındaki farklı nidogen-2 ekspresyon biçimlerine bağlanabilir. Yine aynı çalışmada nidogen-2'nin matriks metalloproteinaz-9 (MMP-9)'a ilişkin tümör moleküler olaylarıyla ilişkili olabileceği belirtilmiştir. MMP ler, özellikle MMP-2 ve MMP-9, ekstraselüler matriks bileşenlerini degrade ederek tümör gelişiminde önemli rol oynayan bir proteolitik enzim ailesidir. Hem MMP-2 hem de MMP-9 hepatoselüler karsinoma dokularında yükselmekle beraber MMP-9'un aşırı ekspresyonu nidogen-2'nin downregüle olmasıyla negatif korelasyon içindedir. MMP-9'un aşırı ekspresyonu tümör invazyonu ve metastazla ilişkili birçok moleküler olayı artırabilir. Ayrıca, ekstraselüler BM'nin bir bileşeni olan nidogen-2, BM'deki özel bağlanma bölgesinden dolayı MMP-2'den ziyade MMP-9'un aşırı ekspresyonuyla degrade olabilir. Bu hipotezi test etmek için MMP-2 ve MMP-9'un ekspresyonunun inhibe edildiği hepatoselüler karsinoma hücrelerinde, MMP-2 inhibisyonunun nidogen-2'nin ekspresyonunu etkilemediği diğer yandan, MMP-9 inhibisyonunun nidogen-2'nin ekspresyonunu önemli derecede upregüle ettiği gösterilmiştir. Bu durum da, nidogen-2'nin MMP-9'un substratlarından biri olabileceğini ve hepatoselüler karsinomada nidogen-2'nin ekspresyonundaki azalma nedenini ispatlamaktadır. Bir BM proteini olarak nidogen-2'nin ekspresyonundaki azalma gastrointestinal tümörlerde de gösterilmiştir. Bu bulgular nidogen-2'nin ekspresyonundaki azalmanın hepatoselüler karsinoma gelişiminde potansiyel bir patojenik role ve aynı zamanda tanısal değere sahip olabileceğini önermektedir (Cheng ve ark., 2012).

F.3. *NID2* Geninin Metilasyonu İlgili Çalışmalar

Ulazzi ve arkadaşları *nidogen 1* ve *2* promoterlerinin metilasyonlarının bu genlerin ekspresyon kaybından sorumlu olduğunu ve insanda gastrointestinal tümörlerde sık rastlandığını belirtmişlerdir. Hem *NID1* hem de *NID2* genlerinin promoter bölgeleri birinci ekzonun etrafında yaklaşık 2 kb'lik alanı kapsayan yoğun bir CpG adacığı içermektedir. *NID2* geni için promoter metilasyonu; kolon karsinoma

örneklerinin %29 (14/48)'unda, gastrik karsinoma örneklerinin %95 (19/20)'inde belirlenmiştir. Neoplastik olmayan kolon ve gastrik mukoza örneklerinde *NID2* geni promoter metilasyonu belirlenmemiştir. Primer tümörlerde nidogen-2'nin immün boyamayla analizi sadece atipik metilasyon sergileyen tümör örneklerinin nidogen ekspresyonundan yoksun olduğunu doğrulamıştır (Ulazzi ve ark., 2007).

Guerrero-Preston ve arkadaşları, oral skuamöz hücre karsinomasının (oral squamous cell carcinoma: OSCC) erken tanısında ve önlenmesinde biyomarker olarak kullanılmak üzere karsinoma dokuları ve tükürükte *NID2* ve *HOXA9* genlerinin promoter hipermetilasyonunu araştırmışlardır. Tükürük örneklerinde *NID2*'nin duyarlılığı %87 ve özgüllüğü %21'dir. *NID2* ve *HOXA9* genlerinin promoter metilasyonları histolojik tanıyla orta dereceli bir uyuma sahiptir. OSCC'de nidogen ekspresyonunun kaybının bazal membranla hücre etkileşimini zayıflatarak tümör hücrelerinin invazyonunu ve metastazını destekleyebileceği belirtilmiştir. Hem baş ve boyun skuamöz hücre karsinoma dokularında hem de oral skuamöz hücre karsinomalı hastaların tükürüklerinde *HOXA9* ve *NID2* genlerinin klasifikasyon performansı yüksek derecede tatmin edici bulunmuştur (Guerrero-Preston ve ark., 2011).

GEREÇ VE YÖNTEM

A. Hasta ve Kontrol Grubunun Özellikleri

Bu tez çalışmasına Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı'na başvuran, klinik ve patolojik olarak mesane kanseri tanısı konan 56 hasta çalışma grubu ve 15 sağlıklı birey kontrol grubu olarak dahil edildi. Hastalar ve kontrol grubundakiler çalışma konusunda bilgilendirildikten sonra "Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu" imzalatılarak onayları alındı. Patolojik olarak tanı konulan 56 mesane tümörü ve eşleniği idrar örneği olan 24 örnek çalışma grubunu oluşturdu. Hastalardan operasyon öncesinde alınan idrar örneklerinden bekletilmeden DNA izolasyonu yapıldı. İdrar örneklerinden aynı zamanda rutin idrar sitolojisi testi yapıldı. Ameliyat sırasında alınan taze tümör dokusu örnekleri ise -80°C'ye kaldırıldı. Ayrıca benzer demografik özellikler gösteren ve kanser öyküsü bulunmayan 15 gönüllü (1'i benign prostat hipertrofi ve 1'i de sol böbrek kisti olmak üzere 2 benign hastalıklı ve 13 sağlıklı kişi) de kontrol grubu olarak çalışmaya dahil edildi ve temin edilen idrar örneklerinden yine bekletilmeden DNA izolasyonu işlemi gerçekleştirildi.

Tez çalışmasının etik açıdan uygunluğu, 236 sayılı raporda belirtildiği üzere Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıbbi Araştırma Etik Komisyonu'nun 30.09.2010 tarihli Etik Komisyonunda incelenmiş ve oy birliğiyle onaylanmıştır (Bkz: Ek A).

B. Mesane Tümörü Örneklerinden DNA Saflaştırılması

Tümör örneklerinden DNA izolasyonu PureLink™ Genomic DNA Kiti (Invitrogen, Carlsbad, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi. İzolasyona başlamadan ön hazırlık olarak kit içerisindeki **Genomik Yıkama Tamponu I**'e 15 ml ve **Genomik Yıkama Tamponu II**'ye ise 17,5 ml absolu etanol eklendi. DNA izolasyonu için sırasıyla aşağıdaki işlemler uygulandı:

1. -80°C'den alınan ependorf tüpü içerisindeki tümör dokuları steril bir havan veya petri kabına alınarak steril bir bistüriyle çok minik parçalara ayrıldı.
2. Parçalandıktan sonra ependorf tüpüne alınan yaklaşık 50-100 mg'lık doku üzerine 180 µl '**Genomik Parçalama Tamponu**' konuldu.
3. 20 µl 'proteinaz K' eklendi.
4. Ependorf tüpleri içindeki dokular 55°C'deki su banyosunda bekletildi.

5. Yaklaşık 3-4 saat süreyle ve yaklaşık her 15 dakikada bir vorteks yapılarak su banyosundaki inkübasyon sürecine tam lizis sağlanana kadar devam edildi.
6. Su banyosundan alınan ependorf tüplerindeki olası katı parçacıkları tamamen uzaklaştırmak için tüpler maksimum hızda 3 dakika süresince santrifüj edildi.
7. Süpernatantlar steril ependorf tüplerine aktarıldı.
8. Süpernatantlara 20 µl RNaz A eklendi, kısa bir vorteksle iyice karıştırıldı ve oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi.
9. Kısa süreli inkübasyonu takiben tüplere 200 µl **Genomik Lizis/Bağlama Tamponu** eklendi ve vorteksle iyice karıştırıldı.
10. Tüplere 200 µl %100'lük etanol eklendi ve 5 saniye süresince iyice vorteks yapıldı.
11. Bu işlemlerden sonra DNA bağlama aşamasına gelindi. Toplama tüpleri içine spin kolonlar yerleştirildi ve lizatlar spin kolonlara aktarıldı.
12. 10.000 g'de 1 dakika oda sıcaklığında santrifüj yapıldı.
13. Kullanılan toplama tüpleri atılarak spin kolonlar temiz toplama tüplerine yerleştirildiler.
14. Kolonlara 500 µl '**Yıkama Tamponu 1**' eklendi.
15. Oda sıcaklığında 10.000 g'de 1 dakika süresince santrifüj yapıldı.
16. Önceki toplama tüpleri atılarak spin kolonlar temiz toplama tüplerine alındılar.
17. Kolonlara 500 µl '**Yıkama Tamponu 2**' eklendi.
18. Tüpler maksimum hızda 3 dakika süresince oda sıcaklığında santrifüj edildiler.
19. Spin kolonlar steril 1,5 ml'lik ependorf tüplerine yerleştirildiler.
20. Kitin içeriğinde ihtiyaca göre 25-200 µl arasında değişen miktarlarda eklenilebileceği belirtilen '**Genomik Elüsyon Tamponu**'ndan 50 µl eklendi.
21. Oda sıcaklığında 1 dakika inkübasyon gerçekleştirildi.
22. Tüpler maksimum hızda oda sıcaklığında 1 dakika santrifüj edildi.

23. Spin kolondan tüp içerisine geçen purifiye DNA örnekleri daha sonraki işlemlerde kullanılmak üzere -20°C'ye kaldırıldı.

C. İdrar Örneklerinden DNA Saflaştırma

İnsanda idrardan izole edilen DNA büyüklüğüne göre 2'ye ayrılmaktadır: 1 kb'dan büyük olanlar baskın olarak hücre ile ilişkilidir ve büyüklüğü heterojendir, 150-250 bp'lik daha küçük olan çeşidi ise hücreyle ilişkili değildir, dolaşımdan kaynaklanmakta olup transrenal DNA'nın kaynağı apoptotik hücrelerdir. Total idrardan hem yüksek hem de düşük molekül ağırlığına sahip DNA elde edilebilir. Düşük moleküler ağırlıklı idrar DNA'sı çoğunlukla idrarın süpernatant kısmından elde edilmektedir. Yüksek moleküler ağırlıklı idrar DNA'sı ise hücre pelletinden elde edilmektedir. Düşük moleküler ağırlıklı idrar DNA'sı, hücresiz DNA açısından zengin yüksek moleküler ağırlıklı idrar DNA'sı çoğunlukla idrar yolundan dökülen hücrelerden köken almaktadır (Su ve ark., 2004).

İdrar örneklerinden DNA izolasyonu ZR Urine DNA Isolation KitTM (Zymo Research, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi. Optimal performans için, '**Genomik Lizis Tamponu**'na %0,5 (v/v) final dilüsyonda (250 µl/50 ml) beta-merkaptöetanol ilave edildi. Ayrıca bir filtreden geçirilecek her örnek için idrar hacminin standart olarak 30 ml olduğu belirtilmiş olmasına rağmen örnek hacminin gerektiğinde azaltılıp artırılabilceği (filtreden sıvı geçirilmesinin zorlandığı noktaya kadar, Zymo-Spin IC kolonunun DNA bağlama kapasitesi 5 µg'dır) belirtilmesi nedeniyle 30 ml'nin üzerinde ve her örnek için 2 filtre kullanılarak çalışıldı. Bu yolla elde edilen DNA konsantrasyonunun artırılması hedeflendi. Çalışılan idrar örneğinin yoğunluğuna ve filtreden geçirilme kapasitesine bağlı olarak yaklaşık 30-250 ml idrar örnekleri kullanıldı.

İdrardan DNA izolasyonu protokolü aşağıda belirtilen basamaklarla gerçekleştirildi:

1. İdrar örneği temiz atılabilir bir kaba boşaltılarak 50 ml'lik enjektöre alındı, 'ZRC GFTM Filtre'sinden geçirilerek atılabilir bir kaba boşaltıldı. Bu işlem filtrenin kapasitesine ve örnek hacmine bağlı olarak gerek görüldüğü takdirde birkaç kez daha yinelendi. Filtredeki idrar kalıntısı enjektöre hava çekilip boşaltılma yoluyla uzaklaştırıldı.

2. 1 ml '**Genomik Lizis Tamponu**' filtreden geçirildi ve akan sıvı 'Toplama tüpü' içindeki 'Zymo-SpinTM IC Kolon' içinde toplandı.
3. Tüpler birkaç kez nazikçe alt-üst edildi.
4. 13.000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapıldı.
5. Sıvı 'Toplama tüpü'nden uzaklaştırıldı.
6. 200 µl '**DNA Yıkama Öncesi Tamponu**' spin kolona eklendi.
7. 13.000 rpm'de santrifüj yapıp sıvı kısım uzaklaştırıldı.
8. 500 µl '**g-DNA Yıkama Tamponu**' kolona eklendi.
9. 13.000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapıldı.
10. Spin kolon 1,5 ml'lik ependorf tüpüne aktarıldı.
11. 20 µl (bir örnek için 2 filtre kullanılıp sonra birleştirilmesi nedeniyle 40 µl hacim) '**Elüsyon Tamponu**' direkt olarak kolon matriksine eklendi.
12. 1 dakikalık beklemeden sonra DNA'yı elüt etmek için 13.000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapıldı. DNA örneği sonraki işlemler için -20°C'ye kaldırıldı.

D. DNA'ların Bisülfite Modifikasyonu

DNA bisülfite modifikasyonu için EZ DNA Methylation-GoldTM Kit (Zymo Research, ABD) kullanıldı. Bisülfite modifikasyonu, metillenmemiş sitozinler urasile dönüşürken metillenmiş sitozinler değişmeden kalmaktadır. Dönüşüm gerçekleştirildikten sonra DNA'nın metilasyon profili metilasyona-özel PCR (MSP) veya DNA dizileme gibi tekniklerle belirlenebilir.

EZ DNA Methylation-GoldTM Kitinde kullanılan DNA miktarının 500 pg ile 2 µg arasında değişebileceği belirtilmekle beraber optimum sonuçlar için DNA miktarının 200-500 ng arasında kullanılması gerektiği belirtilmiştir. Çalışmada idrar DNA'larının bisülfite modifikasyonu için ~200 ng, tümör DNA'larının bisülfite modifikasyonu için ~500 ng DNA kullanıldı. *In vitro* Metile DNA (IVD)'nin modifikasyonu için kullanılan miktar 500 ng'dır.

Bisülfite modifikasyonu ön hazırlığı:

'**CT Dönüşüm Reaktifi'nin Hazırlanması:** 'CT Dönüşüm Reaktifi' kitle birlikte katı bir karışım olarak temin edilmektedir ve ilk kullanımdan önce aşağıdaki şekilde hazırlandı:

1. '**CT Dönüşüm Reaktifi**' tüpüne 900 µl su, 300 µl 'M-Dilüsyon Tamponu' ve 50 µl 'M-Çözücü Tampon' eklendi.
2. Oda sıcaklığında sürekli vortekslenerek 10-15 dakika karıştırıldı.

Her '**CT Dönüşüm Reaktifi**' tüpü 10 ayrı DNA modifikasyonu için ayarlanmıştır. Optimum sonuçlar için '**CT Dönüşüm Reaktifi**'nin hazırlandıktan sonra kısa sürede tüketilmesi gerektiği tavsiye edilmekle beraber hemen kullanılmayacaksa solüsyonun oda sıcaklığında bir gece, 4°C'de 1 hafta, -20°C'de 1 ay kadar saklanabileceği ve kullanım öncesi 37°C'ye ısıtılarak vortekslenmesi gerektiği belirtilmiştir. '**CT Dönüşüm Reaktifi**' taze olarak hazırlanıp bekletilmeden kullanıldı.

'M-Yıkama Tamponu'nun Hazırlanması: 96 ml %100'lük etanol kullanımdan önce 24 ml'lik 'M-Yıkama Tamponu'na ilave edildi.

Bisülfid modifikasyon işlemi:

1. 130 µl'lik '**CT Dönüşüm Reaktifi**' PCR tüpü içindeki 20 µl'lik DNA örneğine ilave edildi. DNA hacminin 20 µl'den az olması durumunda aradaki hacim farkı su ile tamamlandı. Örnekler pipetajla iyice karıştırıldı ve sıvının tüpün tabanında yer alması için kısa süreli santrifüjlendi.
2. Örnekleri içeren tüpler ısı döngüleyiciye alınarak aşağıdaki program uygulandı:
98°C'de 10 dakika
64°C'de 2 saat 30 dakika
4°C'de saklama (20 saate kadar)
3. 'Toplama tüpü'ne yerleştirilen 'Zymo-Spin™ IC Kolon'lar içine 600 µl '**M-Bağlama Tamponu**' eklendi.
4. Isı döngüleyiciden çıkarılan örnekler 'M-Bağlama Tamponu' içeren 'Zymo-Spin™ IC Kolon'lar içine yüklendi.
5. 15.000 rpm'de 30 saniye santrifüj yapıldı ve sıvı kısımlar uzaklaştırıldı.
6. Kolonlara 100 µl '**M-Yıkama Tamponu**' eklendi.
7. 15.000 rpm'de 30 saniye santrifüj yapıldı.
8. Kolonlara 200 µl '**M-Desülfonasyon Tamponu**' eklendi.
9. Kolonlar oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edildi.

10. İnkübasyonu takiben 15.000 rpm'de 30 saniye santrifüj yapıldı.
11. Kolonlara 200 µl '**M-Yıkama Tamponu**' eklendi.
12. 15.000 rpm'de 30 saniye santrifüj yapıldı.
13. Yıkama işlemi tekrarlanarak kolonlara tekrar 200 µl '**M-Yıkama Tamponu**' eklenerek tekrar 30 saniye santrifüj yapıldı.
14. Kolonlar 1,5 ml'lik ependorf tüplerine yerleştirilerek 12-14 µl '**M-Elüsyon Tamponu**' direkt olarak kolon matrikslerine eklendi.
15. DNA'yi elüt etmek için 30 saniye santrifüj yapıldı.
16. Elde edilen DNA'lar sonraki kullanım aşamaları için $\leq -20^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

E. Metilasyona-spesifik PCR

Metilasyona-özümlü PCR analizi (Herman ve ark., 1996) DNA metilasyon çalışmalarında en önemli teknolojik ilerlemelerden biridir. Taşıyıcı olarak somon balığı sperm DNA'sıyla karıştırılan 1 ng kadar az insan DNA'sının MSP ile belirlenebildiği gösterilmiştir (Herman ve ark., 1996). Yöntem, sadece metillenmemiş sitozinlerin urasile dönüşümünde bisülfitin seçici dönüştürücü gücünden faydalanmaktadır. MSP, 10^4 metillenmemiş allel varlığında metillenmiş bir allelin belirlenmesine, ya da tam tersine izin vermektedir (Zhu ve Yao, 2009).

MSP işlemi için ZymoTaqTM DNA Polimeraz (Zymo Research, ABD) kullanıldı. Hot-start polimerazlar diğer polimerazlardan farklı olarak primer dimeri ve spesifik olmayan ürün oluşumunu en aza indirger. Metilasyonun belirlenmesi amacıyla bisülfitle muamele edilmiş DNA'nın amplifikasyonu için spesifik olarak üretilmişlerdir.

Reaksiyon karışımı (50 µl):

- 2X reaksiyon tamponu : 25,00 µl (1X)
- dNTP karışımı (25 mM) : 0,50 µl (0,25 mM)
- Forward primer (100 µM) : 0,25 µl (0,5 µM)
- Reverse primer (100 µM) : 0,25 µl (0,5 µM)
- Modifiye DNA : 2,00 µl
- ZymoTaq polimeraz (5U/µl) : 0,40 µl (2U/50µl)
- ddH₂O : 21,60 µl

TWIST1 ve *NID2* için PCR koşulları Tablo 4, Tablo 5 ve Tablo 6’da gösterilmektedir.

Tablo 4: *TWIST1*’in PCR koşulları (metile ve unmetile)

İlk denatürasyon	95°C	10 dk	
Denatürasyon	95°C	30 sn	
Bağlanma	56°C	45 sn	40
Uzama	72°C	60 sn	döngü
Son uzama	72°C	7 dk	

Tablo 5: *NID2*’nin PCR koşulları (metile)

İlk denatürasyon	95°C	10 dk	
Denatürasyon	95°C	30 sn	
Bağlanma	58°C	45 sn	40
Uzama	72°C	60 sn	döngü
Son uzama	72°C	7 dk	

Tablo 6: *NID2*’nin PCR koşulları (unmetile)

İlk denatürasyon	95°C	10 dk	
Denatürasyon	95°C	30 sn	
Bağlanma	51°C	45 sn	40
Uzama	72°C	60 sn	döngü
Son uzama	72°C	7 dk	

MSP oligonükleotit dizileri ve beklenen amplicon büyüklükleri ise Tablo 7’de gösterilmektedir. Metillenmiş ve metillenmemiş ürünün yanlış yorumlanmasını engellemek için, metillenmiş ve metillenmemiş primerlerle reaksiyon karışımları ayrı ayrı hazırlandı.

Universal olarak metillenmiş insan DNA standardı (Zymo Research, ABD) metilasyon için pozitif kontrol olarak kullanıldı. PCR’da negatif kontrol olarak su kullanıldı.

Tablo 7: MSP oligonükleotit dizileri ve beklenen ampikon büyüklükleri
(MSP: metilasyona spesifik primer, USP: metilasyona spesifik olmayan primer)

Gen	Forward primer	Reverse primer	PCR ürünü (bp)	Kaynak
<i>TWIST1</i>	MSP: TTTCGGATGGGGTTGTTATC USP: TTTGGATGGGGTTGTTATTGT	AAACGACCTAACCCGAACG CCTAACCCAAACAACCAACC	200 193	Evron ve ark., 2001
<i>NID2</i>	MSP: TAGTATTGGTAACGACGATAGTATC USP: TAGTATTGGTAATGATGATAGTATT	AAATTCGAAACTAACGCGACACG AAATTCAAACCTAACACAACACA	141 141	Ulazzi ve ark., 2007

F. Agaroz Jel Elektroforezi

%2,5'lik agaroz jel hazırlamak için, 130 ml 1X Tris-Borik Asit-EDTA (TBE) ölçülüp bir erlenmayere aktarıldı ve 3,25 gram agaroz tartılarak TBE solüsyonuna ilave edildi. Erlenmayer içindeki heterojen karışım mikrodalgada şeffaf görünüm elde edilene kadar 30-45 sn'lik aralıklarla çalkalanarak kaynatıldı. Solüsyon dökülebilecek dereceye (yaklaşık 70-80 °C) kadar soğutulduktan sonra 0,5 mg/ml konsantrasyondaki etidyum bromürden 130 µl eklendi. Etidyum bromürün homojen yayılması için karışım çalkalandı. Daha sonra içerisine jel tarakları yerleştirilmiş yatay elektroforez jel aparatına döküldü ve jel polimerizasyona bırakıldı. Polimerize olmuş jelden taraklar uzaklaştırılarak jel yeterli miktarda elektroforez tamponu (1X TBE) içeren elektroforez tankına yerleştirildi. DNA örnekleri 6X jel yükleme tamponuyla (New England BioLabs) jel kuyucuklarına yüklenerek 130 voltteki elektrik akımı altında yürütüldü. Marker olarak 50 bp DNA Ladder (New England BioLabs) kullanıldı. Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra bantlar UV transillüminatörü (Uvitec-BTX-26-M, İngiltere) altında görüntülenerek incelendi. Görüntü analiz sistemine (Biolab-UVIPhoto MW, İngiltere) kaydedildi.

1X TBE'nin Hazırlanışı: 10X TBE'den dilüsyon yapılarak kullanıldı. 10X TBE hazırlamak için, 108 gram Tris ve 55 gram borik asit tartılarak bir erlenmayere aktarıldı, üzerine 40 ml 0,5 M EDTA (pH: 8,0) eklendi ve hacim 1 litreye tamamlandı. Tam olarak çözününceye kadar birkaç saat ısıtılarak karıştırıldı.

G. İstatiksel Analiz

Tüm istatiksel analiz istatiksel paket SPSS 15.0 versiyonuyla uygulandı. Parametreler arasındaki ilişki Fisher's exact ve ki-kare testleriyle değerlendirildi.

$P < 0,05$ değerleri istatiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmamızda 56 mesane tümör dokusu ve karşılığı olan 24 idrardan izole edilen DNA örneklerinde *TWIST1* ve *NID2* genlerinin metilasyon durumları değerlendirildi.

A. Tümör Dokularında Metilasyon Sıklığının Değerlendirilmesi

Çalışmadaki 56 mesane tümürlü hasta ve 15 kişilik kontrol grubuna ait bireylerin demografik ve klinik özellikleri Tablo 8’de gösterilmektedir. Cinsiyet-grade arasındaki ilişkiler değerlendirildiğinde, erkeklerin %57,8’i (26/45), kadınların ise %83,3’ünün (5/6) yüksek grade olduğu belirlendi. Erkeklerin %20,5’i Ta, %47,7’si T1, %22,7’si T2 ve %9,1’i T3’dür. Kadınların ise %60’ı T1 ve %40’ı T2’dir.

Tablo 8: Çalışma grubunun klinik özellikleri

	Hastalar (n=56)	Kontroller (n=15)
Cinsiyet		
Erkek	49	13
Kadın	7	2
Yaş		
Ortalama (\pm SD)	65,9 (\pm 13,5)	55,9 (\pm 10,9)
Aralık	37-88	38-72
Tümör stage		
Ta	9	
T1	24	
T2	12	
T3	4	
Tümör grade		
Düşük	20	
Yüksek	31	
Rekürens		
Primer	28	
Rekürens	10	
Sigara		
Yok	14	14
Bırakmış	4	1
Var	19	0

Çalışmada toplam 56 mesane tümörü dokusundan izole edilen DNA'larda *TWIST1* ve *NID2* genlerinin metilasyon sıklıkları analiz edildi. *TWIST1*'in metilasyon sıklığı %98,2 (55/56) ve *NID2*'nin metilasyon sıklığı %96,4 (54/56) olarak bulundu. İki genden (*TWIST1*, *NID2*) birinin metilasyonu mesane tümörü olgularının %100 (56/56)'ünde bulundu (Tablo 9, 10).

Genlerin metilasyon durumuyla tümör grade'leri arasında istatistiksel olarak önemli bir ilişki bulunmadı (*TWIST1* için P=0,999, *NID2* için P=0,149). Ancak hipermetilasyon durumu pozitif olan tümörler içinde stage dağılımı incelendiğinde her iki gende de stage T1'de yoğunlaşma gözlemlendi.

Genlerin hipermetilasyon durumuyla rekürens arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadı (P=1). *TWIST1* geni açısından hipermetile olguların %73,7'si primer, %26,3'ü rekürens gösteren olgulardır. *NID2* geni açısından hipermetile olguların %72,2'si primer, %27,8'i rekürens gösteren olgulardır.

Genlerin hipermetilasyon durumuyla çalışma grubundaki bireylerin sigara kullanımı arasında bir ilişki bulunmadı (P=0,149). Hastaların tümör grade'leri ile sigara kullanımı arasında karşılaştırma yapıldığında da istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki belirlenmedi. Sigara kullanmayan bireylerin %61,5'i, sigara kullanıp bırakmış bireylerin %50'si, sigara kullanan bireylerin ise %63,2'si yüksek grade'dir (P=0,886).

Cinsiyete bağlı olarak rekürens dağılımları incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki belirlenmedi. Erkeklerin %27,3'ü (9/33), kadınların ise %20'si (1/5) rekürens göstermektedir (P=1).

B. İdrar Örneklerinde Metilasyonun Değerlendirilmesi

TWIST1 ve *NID2* genlerinin metilasyon sıklığı 24 hastanın idrarından izole edilen DNA'da belirlendi. Hastaların ortalama yaşı 65,9 (41-87)dur. Kontrol grubuna dahil edilen hastaların cinsiyet ve yaş eşleniği (± 5) olan 15 kişide (1'i benign prostat hipertrofisi, 1'inde sol böbrek kisti olan 2'si benign hastalık gösteren kişi ve 13 sağlıklı kişi) de ilgili genlerin metilasyon durumu belirlendi. Kontrollerin ortalama yaşı 55,9 (38-72)dur (Tablo 8). Metilasyon sıklığı *TWIST1* için %87,5 (21/24) ve *NID2* için %95,8 (23/24) olarak bulundu (Tablo 9, 10). Bu iki genden birinin metilasyonu olguların idrar örneklerinin %95,8 (23/24)'inde bulundu.

İdrar örneklerinden izole edilen DNA'daki metilasyon sadece tümör dokularında da metilasyon gösteren hastalarda bulundu. Diğer bir ifadeyle, yanlış pozitif sonuç saptanmadı.

TWIST1 ve *NID2* genlerinin metilasyon sıklıklarını gösteren tablolar aşağıda gösterilmektedir (Tablo 9 ve 10).

Tablo 9: *TWIST1* geninin atipik metilasyonu

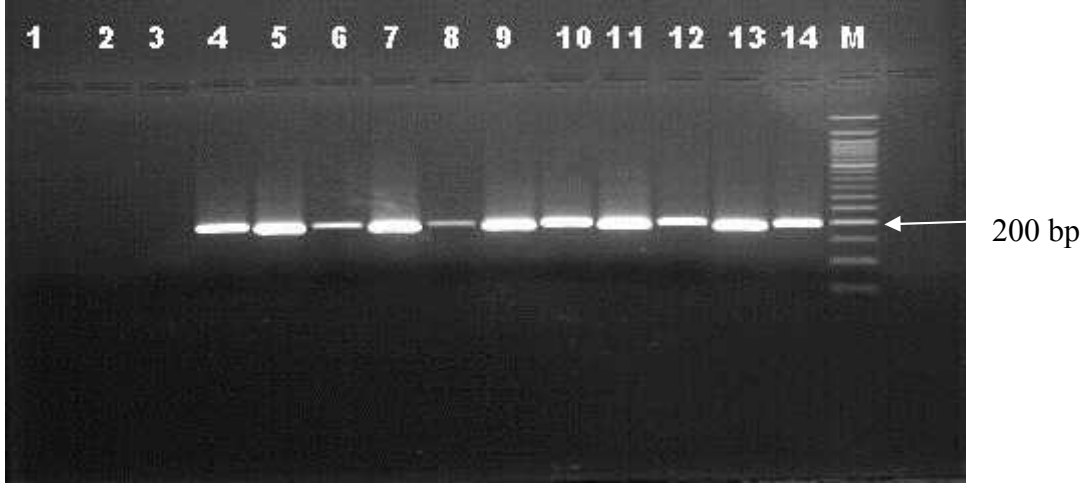
Örnek	Metillenmiş <i>TWIST1</i>	Metillenmemiş <i>TWIST1</i>
Kontrol grubu (n=15)		
İdrar (15)	1 (%6,7)	14 (%93,3)
Mesane kanserli hasta grubu (n=56)		
İdrar (24)	21 (%87,5)	3 (%12,5)
Tümör (56)	55 (%98,2)	1 (%1,8)

Tablo 10: *NID2* geninin atipik metilasyonu

Örnek	Metillenmiş <i>NID2</i>	Metillenmemiş <i>NID2</i>
Kontrol grubu (n=15)		
İdrar (15)	0 (%0)	15 (%100)
Mesane kanserli hasta grubu (n=56)		
İdrar (24)	23 (%95,8)	1 (%4,2)
Tümör (56)	54 (%96,4)	2 (%3,6)

Kontrol grubu idrar örneklerinden sadece birinde *TWIST1* metilasyonu pozitifken (%6,7) normal idrar kontrollerinin diğerlerinde *TWIST1* ve *NID2* genlerinin metilasyon durumu negatiftir.

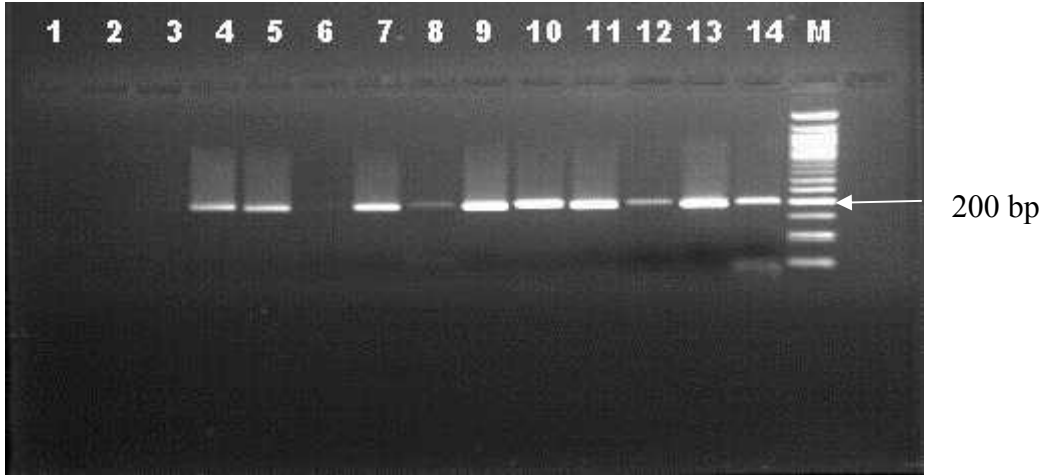
Tümör dokularındaki ve idrar örneklerindeki metilasyon durumlarını gösteren jel görüntüleri aşağıda sunulmaktadır (Şekil 9-14).



Şekil 9: 16-20 no'lu olguların tümör dokularından izole edilen DNA'da *TWIST1*'in metilasyon profili

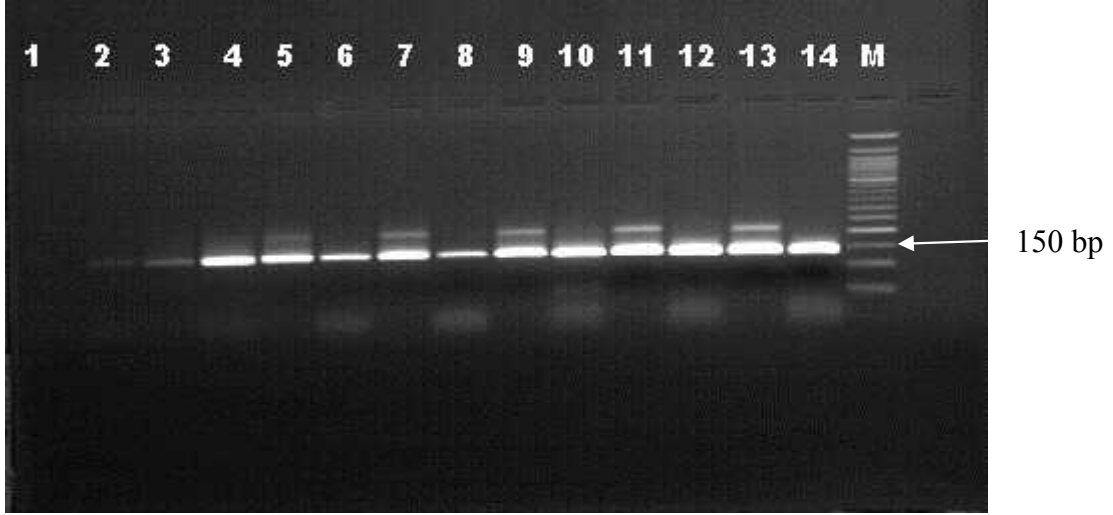
1) negatif kontrol-U, 2) negatif kontrol-M, 3) IVD-U, 4) IVD-M, 5) 16-U, 6) 16-M, 7) 17-U, 8) 17-M, 9) 18-U, 10) 18-M, 11) 19-U, 12) 19-M, 13) 20-U, 14) 20-M ve marker (50 bp)

U: Metile olmamış (Unmetile); M: Metile



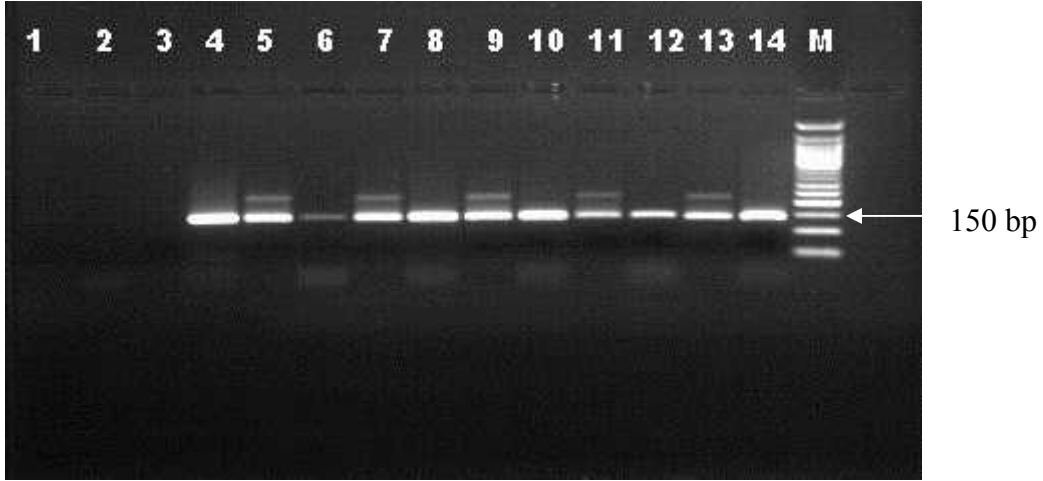
Şekil 10: 16-20 no'lu olguların idrarından izole edilen DNA'da *TWIST1*'in metilasyon profili

1) negatif kontrol-U, 2) negatif kontrol-M, 3) IVD-U, 4) IVD-M, 5) 16-U, 6) 16-M, 7) 17-U, 8) 17-M, 9) 18-U, 10) 18-M, 11) 19-U, 12) 19-M, 13) 20-U, 14) 20-M ve marker (50 bp)



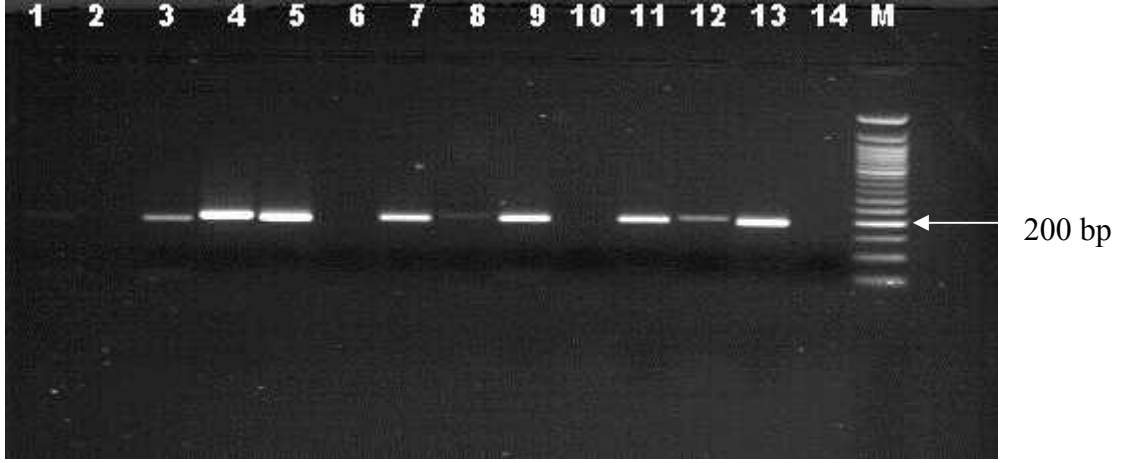
Şekil 11: 16-20 no'lu olguların tümör dokusundan izole edilen DNA'da *NID2*'nin metilasyon profili

- 1) negatif kontrol-U, 2) negatif kontrol-M, 3) IVD-U, 4) IVD-M, 5) 16-U, 6) 16-M, 7) 17-U, 8) 17-M, 9) 18-U, 10) 18-M, 11) 19-U, 12) 19-M, 13) 20-U, 14) 20-M ve marker (50 bp)



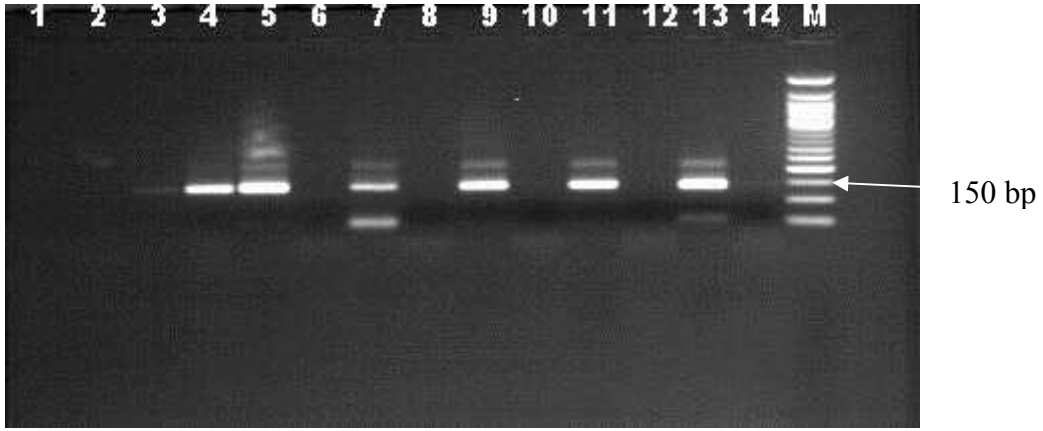
Şekil 12: 16-20 no'lu olguların idrarından izole edilen DNA'da *NID2*'nin metilasyon profili

- 1) negatif kontrol-U, 2) negatif kontrol-M, 3) IVD-U, 4) IVD-M, 5) 16-U, 6) 16-M, 7) 17-U, 8) 17-M, 9) 18-U, 10) 18-M, 11) 19-U, 12) 19-M, 13) 20-U, 14) 20-M ve marker (50 bp)



Şekil 13: 1-5 no'lu kontrollerin idrarından izole edilen DNA'da *TWIST1*'in metilasyon profili

1) negatif kontrol-U, 2) negatif kontrol-M, 3) IVD-U, 4) IVD-M, 5) 1-U, 6) 1-M, 7) 2-U, 8) 2-M, 9) 3-U, 10) 3-M, 11) 4-U, 12) 4-M, 13) 5-U, 14) 5-M, ve marker (50 bp)



Şekil 14: 1-5 no'lu kontrollerin idrarından izole edilen DNA'da *NID2*'nin metilasyon profili

1) negatif kontrol-U, 2) negatif kontrol-M, 3) IVD-U, 4) IVD-M, 5) 1-U, 6) 1-M, 7) 2-U, 8) 2-M, 9) 3-U, 10) 3-M, 11) 4-U, 12) 4-M, 13) 5-U, 14) 5-M, ve marker (50 bp)

C. İdrar Sitolojisi

Mesane tümörlü 24 hastadan ve kanser öyküsüne sahip olmayan 15 kişiden oluşan kontrol grubundan idrar sitolojisi sonuçları alındı. İdrar sitolojisi sonuçları,

metilasyon bulguları ve patolojik parametrelerin birlikte gösterildiği tablolar aşağıda gösterilmektedir (Tablo 11 ve 12).

Tablo 11: İdrar ve tümör dokusu çalışılan hasta grubunun metilasyon ve sitoloji sonuçları

Olgu no	Cinsiyet	Yaş	Grade	Tümör/İdrar <i>TWIST1</i>	DNA'sı <i>NID2</i>	Sitoloji
1	E	81	yüksek	M/M	M/M	şüpheli
2	E	75	yüksek	M/M	M/M	negatif
3	E	74	yüksek	M/M	M/M	pozitif
4	E	58	düşük	M/M	M/M	şüpheli
5	E	55	düşük	M/M	M/M	negatif
6	E	68	yüksek	M/M	M/M	pozitif
7	E	82	düşük	M/M	M/M	şüpheli
8	E	55	yüksek	M/M	M/M	pozitif
9	E	77	yüksek	M/M	M/M	pozitif
10	E	73	yüksek	M/M	M/M	şüpheli
11	E	53	düşük	M/M	M/M	tanısal değil
12	E	41	yüksek	M/M	M/M	atipik
13	K	44	yüksek	U/U	M/M	şüpheli
14	E	49	düşük	M/M	M/M	negatif
15	E	71	düşük	M/M	M/M	şüpheli
16	E	66	düşük	M/U	M/M	negatif
17	K	41	düşük	M/M	M/M	negatif
18	E	73	yüksek	M/M	M/M	atipik
19	E	60	yüksek	M/M	M/M	şüpheli
20	E	77	yüksek	M/M	M/M	şüpheli
21	E	76	düşük	M/U	M/U	negatif
22	E	73	yüksek	M/M	M/M	pozitif
23	E	55	yüksek	M/M	M/M	pozitif
24	K	87	yüksek	M/M	M/M	pozitif

Tablo 12: Kontrol grubunun metilasyon ve sitoloji sonuçları

Kontrol no	Cinsiyet	Yaş	İdrar DNA'sı		Sitoloji
			<i>TWIST1</i>	<i>NID2</i>	
1	K	41	U	U	negatif
2	K	42	U	U	negatif
3	E	43	U	U	negatif
4	E	62	M	U	negatif
5	E	72	U	U	negatif
6	E	38	U	U	negatif
7	E	67	U	U	şüpheli
8	E	58	U	U	negatif
9	E	51	U	U	negatif
10	E	57	U	U	negatif
11	E	61	U	U	atipik
12	E	62	U	U	negatif
13	E	52	U	U	negatif
14	E	66	U	U	negatif
15	E	67	U	U	negatif

Tablo 11’de görüldüğü gibi 15 olgunun (%62,5) idrar sitolojisi kanser açısından pozitif veya şüpheli bulundu. Düşük grade tümörlü olgularda duyarlılığın daha düşük olduğu belirlendi. Dokuz düşük grade tümörlü olgudan sadece 3’ünün (%33,3) idrar sitolojisi sonucu pozitif.

Kontrol grubuna dahil edilen 15 kişinin idrar sitolojisi sonuçları da Tablo 12’de gösterilmektedir. Benign hastalıklı bireyler de dahil olmak üzere 13 kişinin sitoloji sonucu negatiftir. Sağlıklı kontrollerden birinin sitoloji sonucu kategorize edilemezken sağlıklı kontrol grubu bireylerinden biri malignite bakımından şüpheli sonuç verdi. Bu olgu Üroloji Polikliniğinde detaylı incelemeye alındı ancak malignite bulgusuna rastlanmadı.

D. İdrar Sitolojisi ve MSP'nin Duyarlılıklarının Karşılaştırılması

İdrar sitolojisi ve MSP'nin mesane tümörlerini belirleyebilmedeki duyarlılıkları Tablo 13a ve 13b'de gösterilmektedir. İdrar sitolojisinin duyarlılığı değerlendirildiğinde tüm olguların 15'i (%62,5) kanser veya şüpheli sitoloji tanısı alırken, düşük grade tümörlü olgularda duyarlılık daha düşüktür. Dokuz düşük grade tümörlü olgudan sadece 3'ü (%33,3) pozitifdir. Aynı 24 idrar örneğinde hipermetilasyon değerlendirildiğinde ise *TWIST1* ve *NID2* genlerinin metilasyonu sırasıyla olguların %87,5 (21/24)'inde ve %95,8 (23/24)'inde belirlendi. İdrarda iki genden birinin hipermetilasyon göstermesini pozitif bir belirteç olarak alırsak, idrarda mesane tümörünü belirleyebilmede, metilasyon kullanımının belirteç olarak duyarlılığı %95,8'dir. Sadece düşük grade olgular (9 olgu) dikkate alındığında, iki genden birinin hipermetilasyon gösterme oranı %88,8 (8/9)'dir. Oysa yukarıda da bahsedildiği gibi, düşük grade olgularda idrar sitolojisinin duyarlılığı %33,3 olarak bulundu.


Kontrol grubunun idrar örneklerinde ise *TWIST1* metilasyonu sadece bireylerin birinde gözlenirken (%93,3 özgüllük), *NID2* metilasyonuna hiçbirinde rastlanmadı (%100 özgüllük). İdrar sitolojisi kapsamında ise kontrol grubundaki 2 bireyin idrar örneği (biri malignite açısından şüpheli, diğeri de kategorize edilemeyen olarak tanımlandı) dışında diğeri 13 bireyin idrar örneklerinin sitoloji sonucu negatiftir. Bu bağlamda, idrar sitolojisinin özgüllüğü %86,7 (13/15)'dir.


Tablo 13a: İdrar sitolojisi ve MSP'nin karşılaştırmalı duyarlılık analizi (*TWIST1* için)


<i>T</i> <i>W</i> <i>I</i> <i>S</i> <i>T</i> <i>I</i>	Olgular		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
	Örnekler																										
	MSP (doku)																										
	MSP (idrar)																										
	Sitolojik analiz																										


Tablo 13b: İdrar sitolojisi ve MSP'nin karşılaştırmalı duyarlılık analizi (*NID2* için)

<i>N</i> <i>I</i> <i>D</i> <i>2</i>	Olgular		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
	Örnekler																										
	MSP (doku)																										
	MSP (idrar)																										
	Sitolojik analiz																										

 Dokudaki hipermetilasyon

 Eşleniği olan idrardaki hipermetilasyon

 Sitoloji pozitif/şüpheli

 Hipermetilasyon yokluğu/sitoloji negatif

TARTIŞMA

Mesane kanseri, dünyadaki malignansilerin en yaygın 5.si, ürogenital yolun en yaygın 2. tümörü ve ürogenital kanserler arasında en sık ikinci ölüm nedenidir (Enokida ve Nakagawa, 2008). Mesane kanseri rekürens (%50–80) ve progresyon oranına (%5–50) göre heterojen bir hastalıktır (Aslan ve Mammadov, 2010). Mesane kanseri kadınlara nazaran erkeklerde daha yaygındır (10:3 erkek:dişi oranıyla). Sobti ve arkadaşları, çalışmalarındaki örneklerin yaklaşık %12'sinin kadın bireyler olduğuna değinmiştir (Sobti ve ark., 2010). Bizim çalışmamızda da benzer şekilde 56 mesane kanserli hastadan 7'si (%12,5) kadındır. Erkeklerde daha sık görülmekle birlikte kadınlarda prognozunun daha kötü olduğu bildirilmektedir (Aslan ve Mammadov, 2010).

Mesane kanserinin invaziv olmayan bir yöntemle belirlenmesi için idrar ve tümör örneklerinde *TWIST1* ve *NID2* genlerinin metilasyonu ilk defa Renard ve arkadaşları tarafından incelenmiştir (Renard ve ark., 2010). Çalışmalarında, mesane kanserinin belirlenmesinde metillenmiş gen belirteçlerini değerlendirmeye alırken 3-basamaklı bir strateji kullanmışlardır. İlk basamakta, dört mesane kanseri hücre hattında (HUC-1, HTB3, HTB4 ve 1749) epigenetik olarak hedeflenmiş genlerin yeniden ekspresyon analizi için farmakolojik açığa çıkarma stratejisi uygulamışlardır. Metiltransferaz inhibitörü 5-aza-2'-deoksisitidin ve/veya histon deasetilaz inhibitörü Trichostatin A ile muamele edilen hücre hatlarının ekspresyon profilleri yeniden eksprese olan genler için filtrelenmiştir. Ekspresyon çipinde mevcut 12652 probtan 1482 tanesi seçilmiş ve aday gen listesini azaltmak için metilasyon üzerinde odaklanan biyoinformatik analiz uygulanmıştır. İkinci basamakta, metillenmiş gen adayları tümoral olan ve olmayan mesane dokusu örneklerinde MSP analiziyle test edilmiş ve %100 özgüllük baz alındığında en iyi performans gösteren 10 gen belirtecinin duyarlılık oranları belirlenmiştir. Duyarlılık oranları %73-34 arasında değişmekle beraber en yüksek duyarlılık *NID2* ve *TWIST1* genleri için bulunmuştur. Üçüncü basamakta ise öncelikle en iyi performans gösteren 10 doku metilasyon belirtecinin MSP testi kanser olan ve olmayan hastalarda uygulanmış ve mesane kanserli hastaları tanımlayan en duyarlı ve özgül 5 idrar metilasyon belirteci (*TWIST1*, *NID2*, *RUNX3*, *CCNA1* ve *BMP7*) tanımlanmıştır (idrara belirteci seçim testi). Bu 5 en duyarlı ve özgül idrar

metilasyon belirteci daha ileri değerlendirilmeye alınmış ve ilkinden bağımsız bir sette mesane kanserli olguların ve kontrol bireylerinin idrar örneklerinde analiz edilmiştir (idrara deneme testi). Test edilen olası farklı gen kombinasyonları arasında mesane kanserli bireyleri kontrol grubundakilerden ayırmak için duyarlılık ve özgüllük bakımından en iyi performans gösteren iki gen metilasyon belirteci; *NID2* ve *TWIST1* olmuştur. Bu iki metilasyon gen belirteci bağımsız bir idrar örneği setinde değerlendirilerek geçerliliği denetlenmiştir (idrara doğrulama testi). Bu çok aşamalı değerlendirmeler sonucunda *TWIST1* ve *NID2* genlerinin mesane kanserini belirlemedeki potansiyel gücüne işaret eden çalışma bu nedenle bizi bu iki gen üzerinde yoğunlaşmaya sevketti. Renard ve arkadaşları yöntem olarak real-time MSP analizini kullanmışlardır, bizim çalışmamızda ise MS-PCR yöntemiyle bu iki gen panelinin etkinliği test edildi. Renard ve arkadaşları, mesane kanserinin tanısı için *TWIST1* ve *NID2* genlerini kullanarak idrar deneme ve doğrulama setlerinde sırasıyla %88 ve %94 duyarlılık ve %94 ve %91 özgüllük oranları belirtmişlerdir. İki örnek seti birleştirildiğinde, %93 özgüllükle duyarlılık %90'a ulaşmıştır. Yine aynı iki sette sitoloji sonuçları da değerlendirilmiştir. İdrara deneme ve doğrulama setlerinde her iki test (metilasyon analizi ve sitoloji) de sırasıyla %91-94 ve %95-97 olacak şekilde yüksek özgüllük oranlarıyla ilişkiliyken ikili-gen hipermetilasyon paneli için duyarlılık (%88-94) sitolojiden (%48-49) çok daha yüksek bulunmuştur. Bizim çalışmamızdaki 24 idrar örneğinde hipermetilasyon oranları değerlendirildiğinde, *TWIST1* ve *NID2* genlerinin metilasyon oranları sırasıyla %87,5 (21/24) ve %95,8 (23/24) olarak bulundu. İdrarda iki genden birinin hipermetilasyon göstermesini pozitif bir belirteç olarak kabul edersek, idrarda mesane tümörünün tanısında metilasyon kullanımının belirteç olarak duyarlılığı %95,8'dir. Sadece düşük grade tümürlü olgular (9 olgu) dikkate alındığında, iki genden birinin hipermetilasyon gösterme oranı %88,8 (8/9)'dir. Aynı örnek grubunda idrar sitolojisinin duyarlılığı değerlendirildiğinde yüksek ve düşük grade olguların tümünde 15 olgu (%62,5) kanser veya şüpheli sitoloji tanısı alırken, düşük grade olgularda duyarlılık daha düşüktür. Dokuz düşük grade olgudan sadece 3'ü (%33,3) pozitiftir. Dolayısıyla bizim daha az sayıdaki çalışma grubumuzda idrar sitolojisinin duyarlılığı değişim göstermekle beraber hipermetilasyon analizi kapsamında değerlendirildiğinde MS-PCR yöntemiyle Renard ve arkadaşlarının çalışmasına benzer sonuçlar elde edilmiştir. Renard ve arkadaşlarından sonra *TWIST1*

ve *NID2* genlerinin hipermetilasyonunun mesane kanserinin tanısındaki rolünü güçlendirmesi açısından elde ettiğimiz sonuçlar değerlidir.

Çeşitli genlerin metilasyon durumuyla tümör stage ve grade'i gibi patolojik parametreler arasındaki ilişkiler birçok çalışmada araştırılmıştır. Bazı çalışmalarda metilasyonla bu parametreler arasında ilişki bulunurken diğerlerinde böylesi bir ilişki bulunmamıştır. Cebrian ve arkadaşları *myopodin* metilasyonunun tümör stage ve grade'indeki artışla önemli derecede ilişkili olduğunu belirtmiştir (Cebrian ve ark., 2008). Kim ve arkadaşları mesane tümörü gelişimindeki riski 100 kat artıran *RUNX3* metilasyonunun tümör stage, rekürens ve progresyonuyla ilişkili olduğunu belirtmiştir (Kim ve ark., 2005). Chen ve arkadaşlarının çalışmalarında, *DAPK* metilasyonu mesane kanserinde rekürensle ilişkili bulunmuş ancak *DAPK* geninin metilasyon durumuyla cinsiyet, yaş, lokasyon, tümör invazivliği ve histolojik grade'i içeren patolojik parametreler arasında önemli bir ilişki bulunmamıştır (Chen ve ark., 2007). Friedrich ve arkadaşlarının çalışmalarında, *DAPK* promoter metilasyonu ile tümör rekürensi arasındaki ilişki doğrulanmıştır. Ayrıca *TIMP-3* metilasyonuna sahip hastaların bu bölgede metilasyon taşımayan hastalardan önemli derecede daha uzun rekürens olmaksızın sağkalım sergilediği belirtilmiştir (Friedrich ve ark., 2005). Jarmalaite ve arkadaşları, *RARβ*, *RASSF1A* ve *DAPK* genlerindeki hipermetilasyonun tümör stage, grade ve kas invazyonuyla önemli derecede ilişkili olduğunu belirtmiştir. Ayrıca yine aynı çalışmada özellikle *DAPK*, *p16* ve *RARβ* genlerinden birinde promoter hipermetilasyonu olan tümörlerin sıklıkla rekürens gösterdiği belirtilmiştir (Jarmalaite ve ark., 2008). Lin ve arkadaşlarının çalışmalarında, *RASSF1A*, *E-kaderin* ve *p16* hipermetilasyonu ile tümör stage/grade arasında herhangi bir ilişki bulunmamıştır (Lin ve ark., 2009). Chan ve arkadaşlarının çalışmalarında da, *RARβ*, *DAPK*, *E-kaderin*, *p15*, *p16*, *MGMT* ve *GSTP1*'in metilasyon durumuyla hastalık grade veya stage'i arasında ilişki bulunmamıştır (Chan ve ark., 2002). Mehrotra ve arkadaşlarının çalışmalarında meme kanseri metastazında hipermetilasyonu değerlendirilen 5 genin (*Cyclin D2*, *RARβ*, *TWIST*, *RASSF1A* ve *HIN-1*) tümör grade ve stage ile ilişkisi bulunmamıştır (Mehrotra ve ark., 2004). Missaoui ve arkadaşlarının rahim ağzı kanserinde yaptıkları çalışmada *TWIST1*, *DAPK1* ve *CDH13* histolojik grade ile ilişkili bulunmuştur (Missaoui ve ark., 2011). Ruppenthal ve arkadaşlarının kolorektal karsinomada yaptıkları çalışmalarında, daha ileri stage tümörlerle karşılaştırıldığı zaman TNM stage I

olarak sınıflandırılan tümörlerdeki *TWIST1* hipermetilasyonu daha düşük prevalansta bulunmuş ancak metilasyonla diğer prognostik parametreler arasında net bir ilişki bulunmamıştır (Ruppenthal ve ark., 2011). Kim ve arkadaşlarının meme karsinomalı Koreli kadınların serumlarında hipermetilasyonunu değerlendirdikleri *HIN-1*, *RASSF1A*, *RAR-β* ve *TWIST* genleriyle stage ve lenf nodu metastazı gibi patolojik parametreler arasında herhangi bir ilişki tanımlanmamıştır (Kim ve ark., 2010). *NID2* geninin hipermetilasyonunun değerlendirildiği sınırlı sayıdaki çalışmada ise grade/stage ilişkisi değerlendirilmemiştir. Dolayısıyla genlerin hipermetilasyonu ile grade/stage gibi parametreler arasındaki ilişkiler çelişkilidir. Bizim çalışmamızda ilgili genlerin hipermetilasyon durumu ile grade ve rekürrens gibi patolojik parametreler arasında ilişki bulunmadı.

Çalışmamızda tümör DNA'larında heterojen metilasyon profili görüldü. Yorumu açık olan bu durum literatürde daha önce de çeşitli araştırmacılar tarafından irdelenmiştir. Toyota ve arkadaşları, COBRA analiziyle kolorektal tümörlerde *Cyclooxygenase 2* metilasyonunu araştırmışlardır. Hem adenomalarda hem de karsinomalarda metillenmiş allellerin metillenmemiş allellerle birlikte mevcut olduğunu belirtmişlerdir. Mikrodiseksiyon uygulamaksızın tümör örneklerini kullanmaları nedeniyle bu durumun neoplastik olmayan hücrelerin infiltrasyonundan kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir. Alternatif olarak, bu durumun tümör içindeki heterojeniteden (bazı alleller metillenirken diğerleri metillenmemiştir) veya kısmi heterojen metilasyondan (Tüm alleller kısmen metillenmiştir) kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir. *COX2* metilasyonunu daha detaylı analiz etmek amacıyla üç metillenmiş ve üç metillenmemiş tümörde bisülfid dizileme uygulanmıştır. Her durumda yoğun olarak metillenmiş allellerin metillenmemiş allellerle birlikte varlığı gösterilmiştir (Toyota ve ark., 2000). Salvesen ve arkadaşlarının MSP yöntemiyle endometriyal karsinomalarda *hMLH1* metilasyonunu değerlendirdikleri çalışmada, tüm tümörler için metillenmemiş dizinin amplifikasyonunun da görülmesi, tümörlerin normal hücreleri de içerebileceğini düşündürmüştür (Salvesen ve ark., 2000). Tan ve arkadaşlarının çalışmalarında, tümör gelişiminin çeşitli aşamalarında örneklenen hücrelerin veya klonal evrim geçiren hücrelerin heterojen metilasyon motiflerine yol açabileceği belirtilmiştir (Tan ve ark., 2002). Katzenellenbogen ve arkadaşları MSP yöntemiyle Burkitt lenfoma örneklerinde *DAP-Kinaz* geninin metilasyonunu değerlendirmişlerdir.

Her örnekte metillenmemiş allellerin de amplifikasyonunun olması, mikrodiseksiyon uygulanmamasından kaynaklanan tümör örneklerinin içinde bulunabilecek normal doku veya tümör örneğinin atipik metilasyonunun heterojenitesiyle açıklanmıştır (Katzenellenbogen ve ark., 1999). Lind ve arkadaşlarının MSP yöntemiyle kolorektal karsinomalarda yaptıkları hipermetilasyon analizinde, monoallelik metilasyon (hem metillenmiş hem de metillenmemiş MSP jel bantlarının belirlenmesi) olgusuna değinilmiştir. Değerlendirilen metillenmiş tüm primer tümörlerin metillenmiş olanın yanısıra metillenmemiş bir bant da gösterdiği belirtilmiştir. Lind ve arkadaşları primer tümörlerin yanısıra kolon kanser hücre hatlarında da hipermetilasyon değerlendirmesi yaptıkları ve çalışmaya dahil ettikleri hücre hatlarının yarısında bir veya daha fazla gen için hem metillenmiş hem de metillenmemiş allelleri belirledikleri için daha ayrıntılı yorum geliştirmişlerdir. Kültüre edilmiş kanser hücre hatlarında neoplastik olmayan hücreler bulunmaması nedeniyle bu durumun normal hücrelerin varlığından ziyade çeşitli biyolojik ve teknik açıklamaları olabilmekle birlikte allel spesifik metilasyonun en olası yorum olduğuna değinilmiştir. Tersine, primer tümörlerde metillenmemiş ve metillenmiş bantların bir arada varlığının ise normal hücrelerin karışımı, tümör heterojenitesi ve/veya monoallelik metilasyonla açıklanabileceğinden bahsedilmiştir (Lind ve ark., 2004). Rastetter ve arkadaşları, melanomalarda MSP analiziyle 5 tümör baskılayıcı genin (*RASSF1A*, *p16*, *DAPK*, *MGMT* ve *Rb*) promoter metilasyonunu değerlendirdiklerinde, tümör örneklerinde 3 farklı model bulunduğundan bahsetmişlerdir. Bu modeller tamamen metillenmemiş promoterler, tamamen metillenmiş promoterler veya aynı örnekte hem metillenmemiş hem de metillenmiş promoterlerdir. İkinci ve üçüncü modeller (total veya kısmi metilasyon) hipermetile olarak değerlendirilmiştir. Araştırmacılar, atipik metilasyonun çeşitli tümör örneklerinde sıklıkla heterojen olduğunu belirtmişlerdir (Rastetter ve ark., 2007). Çalışmamızda *TWIST1* için 56 tümör DNA'sından 55'inde heterojen metilasyon profili gözlemlendi. Heterojen metilasyon profili gösteren 55 örneğin 11 tanesinde metillenmiş bant metillenmemiş banttan çok zayıf veya kısmen zayıftır. Diğerlerinde metillenmiş ve metillenmemiş bantlar eşit yoğunlukta görülmektedir. Metillenmiş bantların daha zayıf olduğu bu 11 örnekten 7 tanesi (%63,6) düşük grade olgulardır. Metillenmemiş tek tümör örneği ise yüksek gradedir. Elli altı tümör DNA'sının 54'ünde *NID2* hipermetilasyonu gözlemlendi ve homojen metilasyon sergileyen bir tümör örneği (sadece

metillenmiş bant görüldü) hariç heterojen metilasyon profili görüldü. Homojen metilasyon profili gösteren tümör örneği yüksek gradedir. Heterojen metilasyon profili gösteren örneklerden 7 tanesinde metillenmiş bant metillenmemiş banttan çok zayıf veya kısmen zayıftır. Diğerlerinde metillenmiş ve metillenmemiş bantlar eşit yoğunlukta görülmektedir. Metillenmiş bantların daha zayıf olduğu bu 7 örnekten 6 tanesi (%85,7) düşük grade olgulardır. Metillenmemiş 2 tümör örneği de düşük grade olgulardır.

Çalışmamızda *TWIST1* ve *NID2* genlerinin hipermetilasyonunun ekspresyonu nasıl etkilediğini araştırma kapsamında değerlendirmedik. Abbaszadegan ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada MSP yöntemiyle *p16* promoter hipermetilasyonu ve immünohistokimyasal boyamayla protein ekspresyonu analiz edilmiştir. Ekspresyon açısından p16-negatif tümörler arasında, %62,5'inin promoter bölgelerinde metillendiği bulunarak gastrik kanserdeki azalmış p16 protein ekspresyonu için temel mekanizmanın promoter bölgesinin hipermetilasyonu olduğu sonucuna varılmıştır. İlginç şekilde, promoter hipermetilasyonu olmasına rağmen üç hasta normal protein ekspresyonu göstermiş ve bu tümörlerin hepsinin tümör heterojenitesi gösterdiği (bir veya her iki allele kısmi metilasyon diğer olası neden olabilmekle birlikte) vurgulanmıştır. Ayrıca normal metilasyon profili olmasına rağmen p16 ekspresyonu açısından negatif 12 hasta bulunmuş ve azalmış protein ekspresyonunun nokta mutasyonu veya homozigot delesyon gibi alternatif mekanizmalardan kaynaklanabileceği açıklanmıştır (Abbaszadegan ve ark., 2008). Dolayısıyla genlerin hipermetilasyonu ile ekspresyonlardaki değişim arasında her durumda bir ilişki olması beklenemeyeceği gibi heterojen metilasyon profili sergileyen olguların kısmen de olsa hala işlevsel olan ekspresyon durumlarına sahip olabildiği yorumunda da bulunulabilir. Bununla beraber genlerin hipermetilasyonu protein seviyesinde olmaksızın mRNA seviyesinde ekspresyon değişimlerine yol açabilir. Wali ve arkadaşlarının akciğer kanserli hastaların tümör biyopsilerinde *FHIT* geninin metilasyonunu değerlendirdikleri çalışmada, çalışılan 30 olgunun %37'sinin tam metilasyon, %47'sinin kısmi metilasyon gösterdiği, geri kalanının metillenmediği belirtilmiştir. Ters transkripsiyon PCR'la belirlendiği üzere *FHIT* geni promoter metilasyonu *FHIT* transkriptinin yokluğuyla önemli derecede ilişkili bulunmuştur. Buna karşılık, promoter metillenmemiş veya kısmen metillenmişse

FHIT transkripti mevcuttur. *FHIT* geninin ekspresyonundaki azalma sadece transkript seviyesinde gözlenmiştir (Wali ve ark., 2006).

İdrar örneklerinden izole edilen DNA'daki metilasyon sadece tümör dokularında metilasyon gösteren hastalarda bulundu. Diğer bir ifadeyle, yanlış pozitif sonuç saptanmadı. Çalışma grubundaki bazı hastalar primer tümörde belirlenebilen metilasyona sahip olmasına rağmen idrarlarında belirlenebilen metillenmiş DNA bulunmamaktadır. Bu durum örneklerin toplanma zamanında kanser hücrelerinin belirlenebilen miktarlarının idrara dökülmemiş olması nedeniyle oluşabilir. Nitekim *TWIST1* metilasyonu araştırılan idrar örneklerinden 3'ünde (13, 16 ve 21 no'lu örneklerde) metilasyon gözlenmedi. Onüç numaralı örnekte *TWIST1* için tümör dokusunda da metilasyon belirlenmemekle birlikte (aynı örnekte *NID2* metilasyonu hem tümör dokusunda hem de idrarda gözlendi), diğer iki örnekte (16 ve 21 no'lu örnekler) ise tümör dokularında *TWIST1* metilasyonu belirlenirken idrarda metilasyon görülmedi. Diğer yandan, *NID2* geninin metilasyonu araştırılırken 16 numaralı örneğin idrar DNA'sında metilasyon belirlendi. Bu nedenle 16 numaralı olgu için yeterli miktarda idrara dökülmemiş kanser hücresi olabileceği olasılığını dışlayabiliriz. Yirmibir numaralı örnekte hem *TWIST1* hem de *NID2* genlerinin metilasyonu tümör dokusunda gözlenirken idrarda gözlenmemesi yeterli miktarda kanser hücresinin idrara dökülmemiş olması gerçeğini de yansıtabilir.

Tartışılan konulardan bir diğeri epigenetik değişikliklerin de populasyon bazında değişimlere açık olup olmadığı üzerinde yoğunlaşmakta ve bu nedenle çalışmanın farklı bir populasyon grubunda değerlendirilmesi de önem taşımaktadır. Sun ve arkadaşları Batı ülkelerinde daha önceden önerilen hedef genlerin hastalığın başlangıcını belirlemede kendi çalışmaları için yetersiz olduğuna değinerek iki populasyon arasında mesane kanserinde DNA metilasyon seviyesinde olası bir farklılığa işaret etmişlerdir. Test ettikleri 7 gen (*BCL2*, *HTERT*, *DAPK1*, *CDKN2A (p16INK4)*, *ARF (p14ARF)*, *MGMT* ve *GSTP1*) arasında *BCL2*, Batı ülkelerindeki hasta grubu için belirtilen orana nazaran 2 kat azalmış olarak olguların %27,3'ünde belirlenmiş, geri kalanlar ise ya çok düşük bir oranda metillenmiş ya da metillenmemiştir (Sun ve ark., 2009). Yu ve arkadaşları yaptıkları metilasyon çalışmasında Birleşmiş Milletler'de mesane kanserini belirleyebilme potansiyeli açısından anlamlı olduğu belirtilen genleri de çalışmışlardır. DNA metilasyonu gibi epigenetik değişikliklerin değişen çevrelere

diğer genetik faktörlerden daha kolayca yanıt verebileceğini açıklamışlar ve iki popülasyon arasında bilgi verici gen paneli bakımından epigenetik bir farklılık olma olasılığına işaret etmişlerdir (Yu ve ark., 2007). Zhang ve arkadaşlarının idrar sedimentlerinde yaptıkları mikrosatellit analizi mesane kanserinin saptanmasında yüksek derecede duyarlı ve özgül bir teknik olarak umut verici olmakla birlikte yazarlar farklı mikrosatellit belirteçlerinin Çinli ve Batılı hasta gruplarında etnik ve etiyolojik farklılıklara işaret edebileceğini belirtmişlerdir. Bu durumun çevresel karsinojenlere maruz kalmayı, diyet alışkanlıklarındaki ve sosyal davranışlarındaki farklılıkları yansıtabileceğini, mikrosatellitlerden başka genetik belirteçlerde de farklılıkların varolabileceğini, bu gözlemlerinin farklı etnik popülasyonlarda genetik analizler için belirteç seçiminde dikkate alınması gerektiğini ifade ederek yukarıda bahsedilen diğer çalışmaların yorumlanmasını yönlendirmişlerdir (Zhang ve ark., 2001). Bu nedenlerden dolayı henüz klinik etkinliği değerlendirme aşamasında olan farklı gen panellerinin farklı popülasyonlardaki hasta gruplarında değerlendirilmesi bu alandaki literatür bilgisini zenginleştirerek sonuçların standardizasyonuna zemin hazırlayacak ve klinik kullanıma geçiş sürecini hızlandırabilecektir. Çalışmamızda *TWIST1* ve *NID2* genleri dikkate alındığında iki popülasyon arasında böyle bir epigenetik farklılığın olmadığı söylenebilir.

Metilasyon belirteçlerinin seçiminde duyarlılık kadar özgüllük de dikkate alınan kriterlerden biri olmalıdır. Friedrich ve arkadaşları, *EDNRB*, *RASSF1A* ve *TNFRSF25* gibi bazı metilasyon belirteçlerinin mesane kanserinin tanısında kullanımının olmayacağını çünkü bu genlerin kanser olmayan bireylerde de metillendiğini belirtmiştir (Friedrich ve ark., 2004). Bizim çalışmamızdaki özgüllük değerlendirilmesinde *TWIST1* metilasyonu %93,3, *NID2* metilasyonu ise %100 özgüllüğe sahip olması nedeniyle bu genlerin tanısal kullanımdaki önemlerine işaret etmektedir.

Epigenetik yaklaşım gelecekte üstlenebileceği potansiyel rol açısından son derece umut vaat edicidir. Mutasyonlar gibi genetik değişikliklerden farklı olarak DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları geri dönüşümlüdür (Enokida ve Nakagawa, 2008; Kim ve Kim 2009). Bu özellik epigenetik değişiklikleri kanser tedavisi için çekici bir aday haline getirmektedir. Demetile edici ajanlar kullanılarak kanser hücre hatlarında DNA'sı metillenmiş genleri yeniden eksprese etmek ve genleri işlevsel hale

getirmek mümkündür (Kim ve Kim, 2009). İyi bilinen bir DNMT inhibitörü olan 5-aza-deoksisitidin (decitabine) hedef gen ekspresyonunun promoter hipermetilasyonu tarafından düzenlendiğini göstermek için metilasyon çalışmalarında yaygın kullanılan bir demetile edici ajandır. DNMT'lerin nükleozid analog inhibitörleri prokainamid ve hidralazin, anormal DNA hipermetilasyonunun geri dönüşümünü ve sessizleşmiş gen ekspresyonunu yeniden sağlamak için *in vitro* hücre kültürü sistemlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Yeni bir demetile edici ajan olan zebularine de mesane kanseri hücrelerinde test edilmiştir ve metillenmiş *p16INK4a* gibi tümör baskılayıcı genleri; *APAF-1* ve *DAPK-1* gibi apoptozisle ilişkili genleri yeniden aktive etmektedir. Decitabine, Birleşik Devletler Gıda ve İlaç İdaresi (United States Food and Drug Administration) tarafından akut miyeloid lösemi, kronik miyeloid lösemi ve myelodisplastik sendrom gibi hematopoietik malignansilerin tedavisinde kullanılmak için onaylanmıştır. Ancak, henüz mesane kanseri gibi solid tümörlerin tedavisi için bu ajanın kullanımıyla ilgili bir klinik deneme bulunmamaktadır. İdeal tedaviler, genomun geri kalanında arzu edilmeyen bir demetilasyonu indüklemeyen metile olmuş gen grubunu seçici olarak aktive edebilenlerdir. Epigenetik inaktivasyonda DNA metilasyonu ve histon deasetilasyonu arasındaki sıkı ilişki dikkate alındığında, DNMT inhibitörlerinin ve histon deasetilasyon inhibitörlerinin kombinasyonu mesane kanseri hastalarını tedavi etmek için çekici bir strateji olabilir (Enokida ve Nakagawa, 2008). Ürotelyal karsinomada hipermetilasyon-ekspresyon arasındaki ilişkiyi araştıran birçok çalışma mevcuttur. *SFRP1* hipermetilasyonu ekspresyon kaybıyla uyumlu bulunmuştur. 5-Aza-deoksisitidin bazı hücre hatlarında yeniden ekspresyonu doğrudan indüklemiş, bazılarında ise bir histon deasetilaz inhibitörüyle ilave bir muameleye ihtiyaç duyulmuştur (Neuhausen ve ark., 2006). Mesane tümörlerinde Wnt-antagonistlerinin metilasyon seviyeleri mesane mukozasından önemli derecede yüksek ve mRNA seviyeleri önemli derecede düşük bulunmuştur. Metilasyon seviyesi karşılık gelen mRNA seviyesiyle ters orantılıdır (Urakami ve ark., 2006). Mesane kanseri hücre hatları EJ138 ve UMUC3'ün metilasyon gösterdiği durumlarda demetile edici ilaç 5-aza-2'-deoksisitidine (AZA) maruz kalması transkript seviyesinde myopodin ekspresyonunu artırmıştır. Bu durumla uyumlu olarak, immünohistokimyasal olarak myopodin metilasyonu ile düşük nükleer protein ekspresyonu arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur, ancak sitoplazmik ekspresyon myopodin metilasyon durumundan

etkilenmeden kalmıştır (Cebrian ve ark., 2008). *SOX9* hipermetilasyonu gözlenen mesane kanseri hücre hatlarında düşük transkript ve protein ekspresyonu seviyeleri ters transkriptaz PCR ve western blot analizleriyle gösterilmiştir. Metillenmiş mesane kanseri hücre hatlarının demetile edici ilaç AZA'ya maruz bırakılması J82 hücre hattında transkript seviyesinde *SOX9*'un ekspresyonunu geri kazandırmıştır. Western blot ve immüno Floresans analizleriyle AZA'ya maruz bırakılmadan sonra protein ekspresyonunun da geri kazanıldığı gösterilmiştir (Aleman ve ark., 2008). Metilasyon-ekspresyon arasındaki ilişki *E-cad* geni için de gösterilmiştir. Demetile edici ajan 5-AZAC ile muamele edilen T24 ve J82 mesane kanseri hücre hatları *E-cad* geninin sessizleşme sürecinde atipik CpG metilasyonunun rolünü doğrulayacak şekilde *E-cad* mRNA'sını geri kazanmıştır (Ribeiro-Filho ve ark., 2002). Chen ve arkadaşları, *DAPK* metilasyonu ile *DAPK*'nın immünohistokimyasal ekspresyonu arasında yakın bir ilişki belirtmişlerdir (Chen ve ark., 2007), yine *DAPK* genini çalışın Sobti ve arkadaşları ise metillenmiş *DAP-kinaz* promoterine sahip hastalarda, metillenmemiş *DAP-kinaz* barındıran hastalara kıyasla RNA ekspresyonunun önemli ölçüde azaldığını belirtmişlerdir (Sobti ve ark., 2010). *Casp8* ve *Rb1* promoterlerinin metillendiği hastalarda metillenmemiş hastalara kıyasla RNA ekspresyonunun önemli derecede azaldığı belirtilmiştir (Malekzadeh ve ark., 2009). 5'-aza-2'-deoksisitidin ile muamele edilen mesane kanseri hücre hatları T24 ve UMUC3'de *RASSF1A* promoter metilasyonu ve ekspresyon kaybı arasındaki ilişki çalışılmıştır. Her iki hücre hattında da gen ekspresyonunun geri kazanımı gösterilmiş, ayrıca promoter bölgesinin demetilasyonu MSP ile de belirlenmiştir (Chan ve ark., 2003). Yukarıda tartışılan sonuçlara rağmen transkripsiyon başlangıç bölgesinin aşağısında kalan CpG bölgelerinin metilasyonunun ekspresyonu bloke etmediğini vurgulamak önemlidir. Bu nedenle, anormal olarak metillenmiş bir CpG adacığı gen sessizleşmesiyle mutlaka ilişkili olmayabilir, ancak bir tümör belirteci olarak kullanılabilir (Friedrich ve ark., 2004). Bu ilaçlar yalnız olarak veya kemoterapi, immünoterapi veya radyoterapi gibi başka terapötik yaklaşımlarla birlikte kullanılabilir ve özgül moleküler bozukluklara yönelik hedeflenmiş tedaviyle tedavinin bireyselleştirilmesinde de önemli rol oynayabilir.

Mesane kanserinin erken tanısında epigenetik belirteçlerden yararlanmak amacıyla çoklu gen panelleriyle çalışılmış, daha sonra kısmen panellerdeki sayı

azaltılmıştır. Gen panelindeki marker sayısını artırmak, duyarlılığı artırmakla birlikte özgüllüğü azaltmakta ve maliyeti yükseltmektedir (Hoque ve ark., 2006). Maliyet kapsamında da düşünüldüğünde, bizim çalışmamızda olduğu gibi ikili gen paneliyle literatür bilgilerine yakın tatminkar sonuçlar alınması daha tercih edilebilir bir durumdur.

Özer, ülkemizde sağlıklı istatistiksel verilere ulaşmanın güçlüğü dolayısıyla mesane tümörlerine dair ABD verilerini kullanarak ABD’de en sık görülen beş kanser arasında olan mesane kanserinde tanı anından ölüm anına kadar sistemden yapılan harcamanın 57,629 dolarla tüm kanser çeşitleri arasında en yüksek maliyeti oluşturduğuna ve radikal sistektomi sonrası 5 yılda hastaların %30’unda, 10 yılda %40’ından daha fazlasında rekürens izlendiğine değinmiştir. Ayrıca yine ABD’de 1985-2000 yılları arasında mesane tümör insidansında %33’lük bir artış saptandığı belirtilmiştir (Özer, 2006). Mesane kanserinin tedavisi için harcanan maliyetle birlikte maliyetten çok daha önemli olan birey ve hasta psikolojisi göz önüne alındığında hastalığın erken aşamalarda yakalabilmesi için yeni yöntemlerin geliştirilmesi son derece önem taşımaktadır. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar mesane kanseri ve rekürenslerinin erken dönemde invaziv olmayan ve daha düşük maliyetle tanısı için yararlı olabileceğini göstermesi açısından önemlidir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda mesane kanserli hastaların tümör dokularında ve idrar örneklerinde *TWIST1* ve *NID2* genlerinin metilasyon sıklıklarının değerlendirilmesi amaçlandı. Tümör dokularında *TWIST1*'in metilasyon sıklığı %98,2 (55/56) ve *NID2*'nin metilasyon sıklığı %96,4 (54/56) bulundu. İki genden birinin metilasyonu mesane tümörü olgularının %100 (56/56)'ünde belirlendi. İdrar örneklerinde ise metilasyon sıklığı *TWIST1* için %87,5 (21/24) ve *NID2* için %95,8 (23/24) bulundu. Bu iki genden birinin metilasyonu olguların idrar örneklerinin %95,8 (23/24)'inde belirlendi. Bu bulgular, mesane kanserinde bu iki gene dair epigenetik değişimlerin çok sık olduğunu göstermektedir. Düşük grade tümörlü olgular dikkate alındığında hipermetilasyon analizinin sitolojik analize üstünlüğü ispatlandı.

Bizim amacımızın mesane kanserinin erken tanısında kullanılabilecek epigenetik belirteçler üzerinde yoğunlaşma olması nedeniyle kandan izole edilen DNA'da metilasyon profilleri araştırılmadı. Bununla beraber, çalışılan iki genin tümör progresyonundaki etkisini değerlendirmeyi amaçlayan diğer çalışmalarda tümör dokuları ve idrar örneklerinden izole edilen DNA'ların yanı sıra kandan izole edilen DNA'daki metilasyon profilleri de araştırılabilir. Ayrıca çalışma grubunun sayısının artırılarak duyarlılık ve özgüllük oranlarının belirlenmesi ve benzer sonuçlar alınmasıyla klinik kullanıma geçiş süreci hızlandırılabilir.

DNA metilasyon belirteçleri olarak *TWIST1* ve *NID2* genlerinin kombine analizi; idrarda kanser hücrelerini belirlemek için basit, invaziv olmayan, duyarlı ve özgül bir metottur. Düşük grade tümörlerde kanser hücrelerini belirleme açısından hipermetilasyon analizinin duyarlılığı konvansiyonel idrar sitolojisinden üstündür. Bununla beraber, hipermetilasyon analizi ve idrar sitolojisinin birleştirilerek kullanıldığı durumlarda erken tanının kolaylaşmasına imkan verilerek doğru takiple hastalığa bağlı ölüm oranı azaltılabilir.

KAYNAKLAR

- Abbaszadegan MR, Moaven O, Sima HR, Ghafarzadegan K, A'rabi A, Forghani MN, Raziee HR, Mashhadinejad A, Jafarzadeh M, Esmaili-Shandiz E, Dadkhah E. p16 promoter hypermethylation: a useful serum marker for early detection of gastric cancer. *World J Gastroenterol.* 2008;14(13):2055-2060.
- Aleman A, Adrien L, Lopez-Serra L, Cordon-Cardo C, Esteller M, Belbin TJ, Sanchez-Carbayo M. Identification of DNA hypermethylation of SOX9 in association with bladder cancer progression using CpG microarrays. *Br J Cancer.* 2008;98(2):466-473.
- Ali Hosseini S, Sobti RC, Malekzadeh K, Singh SK, Joshi K. Frequency of P16INK4a and P14ARF genes methylation and its impact on bladder cancer cases in north Indian population. *Dis Markers.* 2010;28(6):361-368.
- Amann K, Haas CS, Zeiler GA, Benz K, Bader BL, Hartner A, Hilgers KF. Lack of nidogen-2 increases blood pressure, glomerular and tubulointerstitial damage in DOCA-salt hypertension. *Eur J Clin Invest.* 2009;39(2):116-125.
- Angers B, Castonguay E, Massicotte R. Environmentally induced phenotypes and DNA methylation: how to deal with unpredictable conditions until the next generation and after. *Mol Ecol.* 2010;19(7):1283-1295.
- Aslan G, Mammadov E. Mesane Kanserinde Yaş ve Cinsiyetin Klinik-Patolojik Sonuçlar Üzerindeki Belirleyici Rolü. *DEÜ Tıp Fakültesi Dergisi.* 2010;24(3):119-123.
- Awakura Y, Nakamura E, Ito N, Kamoto T, Ogawa O. Methylation-associated silencing of TU3A in human cancers. *Int J Oncol.* 2008;33(4):893-899.
- Bader BL, Smyth N, Nedbal S, Miosge N, Baranowsky A, Mokkapati S, Murshed M, Nischt R. Compound genetic ablation of nidogen 1 and 2 causes basement membrane defects and perinatal lethality in mice. *Mol Cell Biol.* 2005;25(15):6846-6856.
- Bornman DM, Mathew S, Alsrue J, Herman JG, 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.
- Bourgeois P, Stoetzel C, Bolcato-Bellemin AL, Mattei MG, Perrin-Schmitt F. The human H-twist gene is located at 7p21 and encodes a B-HLH protein that is 96% similar to its murine M-twist counterpart. *Mamm Genome.* 1996;7(12):915-917.
- Böse K, Nischt R, Page A, Bader BL, Paulsson M, Smyth N. Loss of nidogen-1 and -2 results in syndactyly and changes in limb development. *J Biol Chem.* 2006;281(51):39620-39629.

- Brown JD, O'Neill RJ. The Mysteries of Chromosome Evolution in Gibbons: Methylation Is a Prime Suspect. *PLoS Genet.* 2009;5(6):e1000501.
- Carbone L, Harris RA, Vessere GM, Mootnick AR, Humphray S, Rogers J, Kim SK, Wall JD, Martin D, Jurka J, Milosavljevic A, de Jong PJ. Evolutionary breakpoints in the gibbon suggest association between cytosine methylation and karyotype evolution. *PLoS Genet.* 2009;5(6):e1000538.
- Castanon I, Baylies MK. A Twist in fate: evolutionary comparison of Twist structure and function. *Gene.* 2002;287(1-2):11-22.
- Cebrian V, Alvarez M, Aleman A, Palou J, Bellmunt J, Gonzalez-Peramato P, Cerdón-Cardo C, García J, Piulats JM, Sánchez-Carbayo M. Discovery of myopodin methylation in bladder cancer. *J Pathol.* 2008;216(1):111-119.
- Chan MW, Chan LW, Tang NL, Lo KW, Tong JH, Chan AW, Cheung HY, Wong WS, Chan PS, Lai FM, To KF. Frequent hypermethylation of promoter region of RASSF1A in tumor tissues and voided urine of urinary bladder cancer patients. *Int J Cancer.* 2003;104(5):611-616.
- Chang AY, Liao BY. DNA methylation rebalances gene dosage after mammalian gene duplications. *Mol. Biol. Evol.* 2012;29(1):133-44.
- Chen WT, Hung WC, Kang WY, Huang YC, Chai CY. Urothelial carcinomas arising in arsenic-contaminated areas are associated with hypermethylation of the gene promoter of the death-associated protein kinase. *Histopathology.* 2007;51(6):785-792.
- Cheng GZ, Zhang W, Wang LH. Regulation of cancer cell survival, migration, and invasion by Twist: AKT2 comes to interplay. *Cancer Res.* 2008;68(4):957-960.
- Cheng ZX, Huang XH, Wang Q, Chen JS, Zhang LJ, Chen XL. Clinical significance of decreased nidogen-2 expression in the tumor tissue and serum of patients with hepatocellular carcinoma. *J Surg Oncol.* 2012;105(1):71-80.
- Christoph F, Kempkensteffen C, Weikert S, Köllermann J, Krause H, Miller K, Schostak M, Schrader M. Methylation of tumour suppressor genes APAF-1 and DAPK-1 and in vitro effects of demethylating agents in bladder and kidney cancer. *Br J Cancer.* 2006;95(12):1701-1707.
- Christoph F, Weikert S, Kempkensteffen C, Krause H, Schostak M, Miller K, Schrader M. Regularly methylated novel pro-apoptotic genes associated with recurrence in transitional cell carcinoma of the bladder. *Int J Cancer.* 2006;119(6):1396-1402.
- Daniel FI, Cherubini K, Yurgel LS, de Figueiredo MA, Salum FG. The role of epigenetic transcription repression and DNA methyltransferases in cancer. *Cancer.* 2011;117(4):677-87.

- Dhawan D, Hamdy FC, Rehman I, Patterson J, Cross SS, Feeley KM, Stephenson Y, Meuth M, Catto JWF. Evidence for the early onset of aberrant promoter methylation in urothelial carcinoma. *J Pathol.* 2006;209:336-343.
- Domínguez G, Carballido J, Silva J, Silva JM, García JM, Menéndez J, Provencio M, España P, 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.
- Enokida H, Nakagawa M. Epigenetics in bladder cancer. *Int J Clin Oncol.* 2008;13(4):298-307.
- Erickson AC, Couchman JR. Still more complexity in mammalian basement membranes. *J Histochem Cytochem.* 2000;48(10):1291-1306.
- Evron E, Dooley WC, Umbricht CB, Rosenthal D, Sacchi N, Gabrielson E, Soito AB, Hung DT, Ljung B, Davidson NE, Sukumar S. Detection of breast cancer cells in ductal lavage fluid by methylation-specific PCR. *Lancet.* 2001;357(9265):1335-1336.
- Feng S, Cokus SJ, Zhang X, Chen PY, Bostick M, Goll MG, Hetzel J, Jain J, Strauss SH, Halpern ME, Ukomadu C, Sadler KC, Pradhan S, Pellegrini M, Jacobsen SE. Conservation and divergence of methylation patterning in plants and animals. *PNAS.* 2010;107(19):8689-8694.
- Forghanifard MM, Moaven O, Farshchian M, Montazer M, Raeisossadati R, Abdollahi A, Moghbeli M, Nejadstattari T, Parivar K, Abbaszadegan MR. Expression analysis elucidates the roles of MAML1 and Twist1 in esophageal squamous cell carcinoma aggressiveness and metastasis. *Ann Surg Oncol.* 2012;19(3):743-9.
- Fox MA, Ho MS, Smyth N, Sanes JR. A synaptic nidogen: Developmental regulation and role of nidogen-2 at the neuromuscular junction. *Neural Develop.* 2008;3:24.
- Friedrich MG, Chandrasoma S, Siegmund KD, Weisenberger DJ, Cheng JC, Toma MI, Huland H, Jones PA, Liang G. Prognostic relevance of methylation markers in patients with non-muscle invasive bladder carcinoma. *Eur J Cancer.* 2005;41(17):2769-2778.
- Friedrich MG, Weisenberger DJ, Cheng JC, Chandrasoma S, Siegmund KD, Gonzalgo ML, Toma MI, Huland H, Yoo C, Tsai YC, Nichols PW, Bochner BH, Jones PA, Liang G. Detection of methylated apoptosis-associated genes in urine sediments of bladder cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2004;10(22):7457-7465.
- Gabor Miklos GL, Maleszka R. Epigenomic communication systems in humans and honey bees: from molecules to behavior. *Horm Behav.* 2011;59(3):399-406.
- Goessl C, Müller M, Straub B, Miller K. DNA alterations in body fluids as molecular tumor markers for urological malignancies. *Eur Urol.* 2002;41(6):668-676.

- Gonzalvo ML, Datar RH, Schoenberg MP, Cote RJ. The role of deoxyribonucleic acid methylation in development, diagnosis, and prognosis of bladder cancer. *Urol Oncol*. 2007;25(3):228-235.
- Gort EH, Suijkerbuijk KP, Roothaan SM, Raman V, Vooijs M, van der Wall E, van Diest PJ. Methylation of the TWIST1 promoter, TWIST1 mRNA levels, and immunohistochemical expression of TWIST1 in breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008;17(12):3325-3330.
- Guerrero-Preston R, Soudry E, Acero J, Orera M, Moreno-López L, Macía-Colón G, Jaffe A, Berdasco M, Ili-Gangas C, Brebi-Mieville P, Fu Y, Engstrom C, Irizarry RA, Esteller M, Westra W, Koch W, Califano J, Sidransky D. NID2 and HOXA9 promoter hypermethylation as biomarkers for prevention and early detection in oral cavity squamous cell carcinoma tissues and saliva. *Cancer Prev Res*. 2011;4(7):1061-1072.
- Gunes S, Buyukalpelli R, Yegin Z. Genetic and Molecular Mechanisms in Bladder Cancer Development. In: Nilsson WE, editor. *Bladder Cancer Etymology, Diagnosis and Treatments*. 1st Ed., Nova Science Publishers Inc. 2010;119-135.
- Habuchi T, Takahashi T, Kakinuma H, Wang L, Tsuchiya N, Satoh S, Akao T, Sato K, Ogawa O, Knowles MA, Kato T. Hypermethylation at 9q32-33 tumour suppressor region is age-related in normal urothelium and an early and frequent alteration in bladder cancer. *Oncogene*. 2001;20(4):531-537.
- Handel AE, Ramagopalan SV. Is Lamarckian evolution relevant to medicine? *BMC Med Genet*. 2010;11:73.
- Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93(18):9821-9826.
- Hoque MO, Begum S, Topaloglu O, Chatterjee A, Rosenbaum E, Van Criekinge W, Westra WH, Schoenberg M, Zahurak M, Goodman SN, 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.
- Huang KT, Dobrovic A, Yan M, Karim RZ, Lee CS, Lakhani SR, Fox SB. DNA methylation profiling of phyllodes and fibroadenoma tumours of the breast. *Breast Cancer Res Treat*. 2010;124(2):555-565.
- Hwang JY, Kim SY, Lee SH, Kim GS, Go MJ, Kim SE, Kim HC, Shin HD, Park BL, Kim TH, Hong JM, Park EK, Kim HL, Lee JY, Koh JM. Association of TWIST1 gene polymorphisms with bone mineral density in postmenopausal women. *Osteoporos Int*. 2010;21(5):757-764.
- Jarmalaite S, Jankevicius F, Kurgonaite K, Suziedelis K, Mutanen P, Husgafvel-Pursiainen K. Promoter hypermethylation in tumour suppressor genes shows association with stage, grade and invasiveness of bladder cancer. *Oncology*. 2008;75(3-4):145-151.

- Karam JA, Fan J, Stanfield J, Richer E, Benaim EA, Frenkel E, Antich P, Sagalowsky AI, Mason RP, Hsieh JT. The use of histone deacetylase inhibitor FK228 and DNA hypomethylation agent 5-azacytidine in human bladder cancer therapy. *Int J Cancer*. 2007;120(8):1795-1802.
- Karreth F, Tuveson DA. Twist induces an epithelial-mesenchymal transition to facilitate tumor metastasis. *Cancer Biol Ther*. 2004;3(11):1058-1059.
- Katzenellenbogen RA, Baylin SB, Herman JG. Hypermethylation of the DAP-kinase CpG island is a common alteration in B-cell malignancies. *Blood*. 1999;93(12):4347-4353.
- 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.
- Kim JH, Shin MH, Kweon SS, Park MH, Yoon JH, Lee JS, Choi C, Fackler MJ, Sukumar S. Evaluation of promoter hypermethylation detection in serum as a diagnostic tool for breast carcinoma in Korean women. *Gynecol Oncol*. 2010;118(2):176-181.
- Kim WJ, Kim EJ, Jeong P, Quan C, Kim J, Li QL, Yang JO, Ito Y, Bae SC. RUNX3 inactivation by point mutations and aberrant DNA methylation in bladder tumors. *Cancer Res*. 2005;65(20):9347-54.
- Kim WJ, Park S, Kim YJ. Biomarkers in Bladder Cancer: Present Status and Perspectives. *Biomark Insights*. 2007;2:95-105.
- Kim YK, Kim WJ. Epigenetic markers as promising prognosticators for bladder cancer. *Int J Urol*. 2009;16(1):17-22.
- Kruegel J, Sadowski B, Miosge N. Nidogen-1 and nidogen-2 in healthy human cartilage and in late-stage osteoarthritis cartilage. *Arthritis Rheum*. 2008;58(5):1422-1432.
- Kuk C, Gunawardana CG, Soosaipillai A, Kobayashi H, Li L, Zheng Y, Diamandis EP. Nidogen-2: a new serum biomarker for ovarian cancer. *Clin Biochem*. 2010;43(4-5):355-361.
- Kwok WK, Ling MT, Yuen HF, Wong YC, Wang X. Role of p14ARF in TWIST-mediated senescence in prostate epithelial cells. *Carcinogenesis*. 2007;28(12):2467-2475.
- Kwon YJ, Pérez P, Aguilera S, Molina C, Leyton L, Alliende C, Leyton C, Brito M, Romo R, González MJ. Involvement of specific laminins and nidogens in the active remodeling of the basal lamina of labial salivary glands from patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum*. 2006;54(11):3465-3475.
- Lee MG, Kim HY, Byun DS, Lee SJ, Lee CH, Kim JI, Chang SG, Chi SG. Frequent epigenetic inactivation of RASSF1A in human bladder carcinoma. *Cancer Res*. 2001;61(18):6688-6692.

- Lee TF, Zhai J, Meyers BC. Conservation and divergence in eukaryotic DNA methylation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107(20):9027-9028.
- Lee YB, Bantounas I, Lee DY, Phylactou L, Caldwell MA, Uney JB. Twist-1 regulates the miR-199a/214 cluster during development. *Nucleic Acids Res*. 2009;37(1):123-128.
- Li J, Zhou BP. Activation of β -catenin and Akt pathways by Twist are critical for the maintenance of EMT associated cancer stem cell-like characters. *BMC Cancer*. 2011;11:49.
- 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.
- Lind GE, Thorstensen L, Løvig T, Meling GI, Hamelin R, Rognum TO, Esteller M, Lothe RA. A CpG island hypermethylation profile of primary colorectal carcinomas and colon cancer cell lines. *Mol Cancer*. 2004;3:28.
- Maestro R, Dei Tos AP, Hamamori Y, Krasnokutsky S, Sartorelli V, Kedes L, Doglioni C, Beach DH, Hannon GJ. Twist is a potential oncogene that inhibits apoptosis. *Genes Dev*. 1999;13(17):2207-2217.
- Malekzadeh K, Sobti RC, Nikbakht M, Shekari M, Hosseini SA, Tamandani DK, Singh SK. Methylation patterns of Rb1 and Casp-8 promoters and their impact on their expression in bladder cancer. *Cancer Invest*. 2009;27(1):70-80.
- Meagher RB. The Evolution of Epitype. *Plant Cell*. 2010;22(6):1658-1666.
- Mehrotra J, Vali M, McVeigh M, Kominsky SL, Fackler MJ, Lahti-Domenici J, Polyak K, Sacchi N, Garrett-Mayer E, Argani P, Sukumar S. Very high frequency of hypermethylated genes in breast cancer metastasis to the bone, brain, and lung. *Clin Cancer Res*. 2004;10(9):3104-3109.
- Miosge N, Sasaki T, Timpl R. Evidence of nidogen-2 compensation for nidogen-1 deficiency in transgenic mice. *Matrix Biology*. 2002;21(7):611-621.
- Miraoui H, Marie PJ. Pivotal role of Twist in skeletal biology and pathology. *Gene*. 2010;468(1-2):1-7.
- Missaoui N, Hmissa S, Trabelsi A, Traoré C, Mokni M, Dante R, Frappart L. Promoter hypermethylation of CDH13, DAPK1 and TWIST1 genes in precancerous and cancerous lesions of the uterine cervix. *Pathol Res Pract*. 2011;207(1):37-42.
- Mokkapati S, Baranowsky A, Mirancea N, Smyth N, Breikreutz D, Nischt R. Basement membranes in skin are differently affected by lack of nidogen 1 and 2. *J Invest Dermatol*. 2008;128(9):2259-2267.
- Moore LE, Pfeiffer RM, Poscablo C, Real FX, Kogevinas M, Silverman D, García-Closas R, Chanock S, Tardón A, Serra C, Carrato A, Dosemeci M, García-

- Closas M, Esteller M, Fraga M, Rothman N, Malats N. Genomic DNA hypomethylation as a biomarker for bladder cancer susceptibility in the Spanish Bladder Cancer Study: a case-control study. *Lancet Oncol.* 2008;9(4):359-366.
- 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.
- Neuhausen A, Florl AR, Grimm MO, Schulz WA. DNA methylation alterations in urothelial carcinoma. *Cancer Biol Ther.* 2006;5(8):993-1001.
- Nischt R, Schmidt C, Mirancea N, Baranowsky A, Mokkaapati S, Smyth N, Woenne EC, Stark HJ, Boukamp P, Breitkreutz D. Lack of nidogen-1 and -2 prevents basement membrane assembly in skin-organotypic coculture. *J Invest Dermatol.* 2007;127(3):545-554.
- Okada T, Suehiro Y, Ueno K, Mitomori S, Kaneko S, Nishioka M, Okayama N, Sakai K, Higaki S, Hazama S, Hirata H, Sakaida I, Oka M, Hinoda Y. TWIST1 hypermethylation is observed frequently in colorectal tumors and its overexpression is associated with unfavorable outcomes in patients with colorectal cancer. *Genes Chromosomes Cancer.* 2010;49(5):452-462.
- Oster B, Thorsen K, Lamy P, Wojdacz TK, Hansen LL, Birkenkamp-Demtröder K, Sørensen KD, Laurberg S, Orntoft TF, Andersen CL. Identification and validation of highly frequent CpG island hypermethylation in colorectal adenomas and carcinomas. *Int J Cancer.* 2011;129(12):2855-2866.
- Özer MG. Mesane tümörlerinde radikal sistektomi sonrası patolojik evrelemede yüzeysel (pT2a) ve derin (pT2b) kas invazyonu. *Üroonkoloji Bülteni.* 2006;4:17-18.
- Pai AA, Bell JT, Marioni JC, Pritchard JK, Gilad Y. A genome-wide study of DNA methylation patterns and gene expression levels in multiple human and chimpanzee tissues. *PloS Genet.* 2011;7(2):e1001316.
- Phé V, Cussenot O, Rouprêt M. Interest of methylated genes as biomarkers in urothelial cell carcinomas of the urinary tract. *BJU Int.* 2009;104(7):896-901.
- Puisieux A, Valsesia-Wittmann S, Ansieau S. A twist for survival and cancer progression. *Br J Cancer.* 2006;94(1):13-17.
- Rastetter M, Schagdarsurengin U, Lahtz C, Fiedler E, Marsch WCh, Dammann R, Helmbold P. Frequent intra-tumoural heterogeneity of promoter hypermethylation in malignant melanoma. *Histol Histopathol.* 2007;22(9):1005-1015.
- Renard I, Joniau S, van Cleynenbreugel B, Collette C, Naômé C, Vlassenbroeck I, Nicolas H, de Leval J, Straub J, Van Criekinge W, Hamida W, Hellel M, Thomas A, de Leval L, Bierau K, Waltregny D. Identification and validation of the methylated TWIST1 and NID2 genes through real-time methylation-

- specific polymerase chain reaction assays for the noninvasive detection of primary bladder cancer in urine samples. *Eur Urol.* 2010;58(1):96-104.
- Ribeiro-Filho LA, Franks J, Sasaki M, Shiina H, Li LC, Nojima D, Arap S, Carroll P, Enokida H, Nakagawa M, Yonezawa S, Dahiya R. CpG hypermethylation of promoter region and inactivation of E-cadherin gene in human bladder cancer. *Mol Carcinog.* 2002;34(4):187-198.
- Ruppenthal RD, Nicolini C, Filho AF, Meurer R, Damin AP, Rohe A, Alexandre CO, Damin DC. TWIST1 promoter methylation in primary colorectal carcinoma. *Pathol Oncol Res.* 2011;17(4):867-872.
- Salmivirta K, Talts JF, Olsson M, Sasaki T, Timpl R, Ekblom P. Binding of mouse nidogen-2 to basement membrane components and cells and its expression in embryonic and adult tissues suggest complementary functions of the two nidogens. *Exp Cell Res.* 2002;279(2):188-201.
- Salvesen HB, MacDonald N, Ryan A, Iversen OE, Jacobs IJ, Akslen LA, Das S. Methylation of hMLH1 in a population-based series of endometrial carcinomas. *Clin Cancer Res.* 2000;6(9):3607-3613.
- Schneider BG, Peng DF, Camargo MC, Piazuolo MB, Sicinschi LA, Mera R, Romero-Gallo J, Delgado AG, Bravo LE, Wilson KT, Peek RM Jr, Correa P, El-Rifai W. Promoter DNA hypermethylation in gastric biopsies from subjects at high and low risk for gastric cancer. *Int J Cancer.* 2010;127(11):2588-2597.
- Selamat SA, Galler JS, Joshi AD, Fyfe MN, Campan M, Siegmund KD, Kerr KM, Laird-Offringa IA. DNA methylation changes in atypical adenomatous hyperplasia, adenocarcinoma in situ, and lung adenocarcinoma. *PLoS One.* 2011;6(6):e21443.
- Sobti RC, MalekZadeh K, Nikbakht M, Sadeghi IA, Shekari M, Singh SK. Hypermethylation-mediated partial transcriptional silencing of DAP-kinase gene in bladder cancer. *Biomarkers.* 2010;15(2):167-174.
- Su YH, Wang M, Brenner DE, Ng A, Melkonyan H, Umansky S, Syngal S, Block TM. Human Urine Contains Small, 150 to 250 Nucleotide-Sized, Soluble DNA Derived from the Circulation and May Be Useful in the Detection of Colorectal Cancer. *J Mol Diagn.* 2004;6(2):101-107.
- Sun J, Chen Z, Zhu T, Yu J, Ma K, Zhang H, He Y, Luo X, Zhu J. Hypermethylated SFRP1, but none of other nine genes "informative" for western countries, is valuable for bladder cancer detection in Mainland China. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2009;135(12):1717-1727.
- Sun T, Sun BC, Zhao XL, Zhao N, Dong XY, Che N, Yao Z, Ma YM, Gu Q, Zong WK, Liu ZY. Promotion of tumor cell metastasis and vasculogenic mimicry by way of transcription coactivation by Bcl-2 and Twist1: a study of hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2011;54(5):1690-1706.

- Tan LW, Bianco T, Dobrovic A. Variable promoter region CpG island methylation of the putative tumor suppressor gene Connexin 26 in breast cancer. *Carcinogenesis*. 2002;23(2):231-236.
- Tomte LT, Annatshah Y, Schlüter NK, Miosge N, Herken R, Quondamatteo F. Hematopoietic Cells Are a Source of Nidogen-1 and Nidogen-2 during Mouse Liver Development. *J Histochem Cytochem*. 2006;54:593-604.
- Toyota M, Shen L, Ohe-Toyota M, Hamilton SR, Sinicrope FA, Issa JP. Aberrant methylation of the Cyclooxygenase 2 CpG island in colorectal tumors. *Cancer Res*. 2000;60(15):4044-4048.
- Tsou JA, Galler JS, Siegmund KD, Laird PW, Turla S, Cozen W, Hagen JA, Koss MN, Laird-Offringa IA. Identification of a panel of sensitive and specific DNA methylation markers for lung adenocarcinoma. *Mol Cancer*. 2007;6:70.
- Ulazzi L, Sabbioni S, Miotto E, Veronese A, Angusti A, Gafà R, Manfredini S, Farinati F, Sasaki T, Lanza G, Negrini M. Nidogen 1 and 2 gene promoters are aberrantly methylated in human gastrointestinal cancer. *Mol Cancer*. 2007;6:17.
- Urakami S, Shiina H, Enokida H, Kawakami T, Kawamoto K, Hirata H, Tanaka Y, Kikuno N, Nakagawa M, Igawa M, Dahiya R. Combination analysis of hypermethylated Wnt-antagonist family genes as a novel epigenetic biomarker panel for bladder cancer detection. *Clin Cancer Res*. 2006;12(7):2109-2116.
- Valenzuela MT, Galisteo R, Zuluaga A, Villalobos M, Núñez MI, Oliver FJ, Ruiz de Almodóvar JM. Assessing the use of p16(INK4a) promoter gene methylation in serum for detection of bladder cancer. *Eur Urol*. 2002;42(6):622-630.
- Vasiljević N, Wu K, Brentnall AR, Kim DC, Thorat MA, Kudahetti SC, Mao X, Xue L, Yu Y, Shaw GL, Beltran L, Lu YJ, Berney DM, Cuzick J, Lorincz AT. Absolute quantitation of DNA methylation of 28 candidate genes in prostate cancer using pyrosequencing. *Dis Markers*. 2011;30(4):151-161.
- Volanis D, Kadiyska T, Galanis A, Delakas D, Logotheti S, Zoumpourlis V. Environmental factors and genetic susceptibility promote urinary bladder cancer. *Toxicology Letters*. 2010;193(2):131-137.
- Wali A, Srinivasan R, Shabnam MS, Majumdar S, Joshi K, Behera D. Loss of fragile histidine triad gene expression in advanced lung cancer is consequent to allelic loss at 3p14 locus and promoter methylation. *Mol Cancer Res*. 2006;4(2):93-99.
- Wallerand H, Robert G, Pasticier G, Ravaud A, Ballanger P, Reiter RE, Ferrière JM. The epithelial-mesenchymal transition-inducing factor TWIST is an attractive target in advanced and/or metastatic bladder and prostate cancers. *Urol Oncol*. 2010;28(5):473-479.
- Wiklund ED, Bramsen JB, Hulf T, Dyrskjøt L, Ramanathan R, Hansen TB, Villadsen SB, Gao S, Ostensfeld MS, Borre M, Peter ME, Ørntoft TF, Kjems J, Clark SJ.

- Coordinated epigenetic repression of the miR-200 family and miR-205 in invasive bladder cancer. *Int J Cancer*. 2011;128(6):1327-1334.
- Wolff EM, Liang G, Cortez CC, Tsai YC, Castelao JE, Cortessis VK, Tsao-Wei DD, Groshen S, Jones PA. RUNX3 methylation reveals that bladder tumors are older in patients with a history of smoking. *Cancer Res*. 2008;68(15):6208-6214.
- Yates DR, Rehman I, Abbod MF, Meuth M, Cross SS, Linkens DA, Hamdy FC, Catto JW. Promoter hypermethylation identifies progression risk in bladder cancer. *Clin Cancer Res*. 2007;13(7):2046-2053.
- Yi SV, Goodisman MA. Computational approaches for understanding the evolution of DNA methylation in animals. *Epigenetics*. 2009;4(8):551-556.
- Yu J, Zhu T, Wang Z, Zhang H, Qian Z, Xu H, Gao B, Wang W, Gu L, Meng J, Wang J, Feng X, Li Y, Yao X, Zhu J. A novel set of DNA methylation markers in urine sediments for sensitive/specific detection of bladder cancer. *Clin Cancer Res*. 2007;13(24):7296-7304.
- Yurchenco PD. Basement membranes: cell scaffoldings and signaling platforms. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2011;3(2):1-28.
- Zhang J, Fan Z, Gao Y, Xiao Z, Li C, An Q, Cheng S. Detecting bladder cancer in the Chinese by microsatellite analysis: ethnic and etiologic considerations. *J Natl Cancer Inst*. 2001;93(1):45-50.
- Zhang Z, Xie D, Li X, Wong YC, Xin D, Guan XY, Chua CW, Leung SC, Na Y, Wang X. Significance of TWIST expression and its association with E-cadherin in bladder cancer. *Hum Pathol*. 2007;38(4):598-606.
- Zhu J, Yao X. Use of DNA methylation for cancer detection: promises and challenges. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009;41(1):147-154.

EKLER

A. Etik Kurul Raporu

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
TIBBİ ARAŞTIRMA ETİK KOMİSYONU

Sayı: 236-

01.10.2010

Sayın: Prof. Dr. Recep BÜYÜKALPELLİ

Etik komisyonumuza sunmuş olduğunuz “**Mesane Kanserinin Saptanmasında DNA Metilasyon GİRTEÇLERİNİN KULLANIMININ DEĞERLENDİRİLMESİ**” başlıklı Tıbbi Araştırma Etik Komisyonu 2010/129 Karar nolu **GENETİK ÇALIŞMA** nitelikli araştırma projeniz , amaç, gerekeçe, yaklaşım ve yöntemle ilgili açıklamaları, OMÜ-TAEK yönergesine göre 30.09.2010 tarihli Etik Komisyonumuzda 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.


Ecz. Güler KÖSEDAĞ

Tıbbi Araştırma Etik Komisyonu
Başkan Yardımcısı

B. Hasta Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

HASTA BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

ARAŞTIRMANIN ADI (ÇALIŞMANIN AÇIK ADI):

“Mesane Tümörlerinin Saptanmasında DNA Metilasyon Belirteçlerinin Kullanımının Değerlendirilmesi”

Gönüllünün Baş Harfleri << >>

Bir araştırma çalışmasına katılmanız istenmektedir. Katılmak isteyip istemediğinize karar vermeden önce araştırmanın neden yapıldığını, bilgilerinizin nasıl kullanılacağını, 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.

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 aldığınız tedavinin standardını etkilemeyecektir. Eğer isterseniz, bu genetik çalışmaya katılımınızla ilgili olarak hekiminiz sizi bilgilendirilecektir.

ÇALIŞMANIN KONUSU VE AMACI NEDİR?

Mesane tümörlerinin erken tanısında metilasyon değişimlerinin belirteç olarak önerilip önerilemeyeceğini belirlemek

ÇALIŞMA İŞLEMLERİ:

Mesane tümörlerinin 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. Bu araştırma sizin tedavinizi ve tedavinizde kullanılacak ilaçları hiçbir şekilde yönlendirmeyecektir. Araştırmaya katılıp katılmama hakkına sahiptir. Araştırma başladıktan sonra istediğiniz taktirde araştırmadan ayrılabilirsiniz.

BENİM NE YAPMAM GEREKİYOR?

Çalışma doktorunuzun talimatlarına uymaya, randevu ve vizitelere katılmaya ve yukarıda anlatılan çalışmayla ilgili tüm işlemlere uymaya istekli olmalısınız. Çalışma prosedürüne uygun olarak istenilen zamanda belirtilen miktarda idrar örneği vermeniz dışında herhangi bir şey yapmanız gerekmemektedir.

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

Çalışmanın herhangi bir yan etkisi, riski yoktur.

ÇALIŞMAYA KATILMANIN OLASI YARARLARI NELERDİR?

Mesane tümörlerinin erken tanısında bazı genlerdeki metilasyon değişimlerinin belirteç olarak kullanımının araştırılacağı genetik çalışmaya ve dolayısı ile bilimin gelişmesine destek sağlamış olacaksınız.

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.

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.

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 hakkına sahiptir. Aynı zamanda bu verilerdeki herhangi bir hatanın düzeltilmesini isteme hakkına da sahiptir. Eğer bu konuda bir isteğiniz olursa lütfen gerekirse sizin çalışma destekleyicisi firma ile temasa geçmenize yardımcı olabilecek doktorunuzla görüşünüz.

Eğer onayınızdan vazgeçerseniz, doktorunuz çalışma verilerinizi artık kullanamayacak ya da diğer kişilerle paylaşamayacaktır. Çalışma destekleyicisi 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
Prof. Dr. Recep Büyükalpelli
Tel: 0-532-4251434

ÇALIŞMADAN AYRILMAMI GEREKTİRECEK DURUMLAR: Varsa açıklayınız

Yoktur.

YENİ BİLGİLER ÇALIŞMADAKİ ROLÜMÜ NASIL ETKİLEYEBİLİR?

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

Çalışmaya Katılma Onayı

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

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

Gerekiyorsa Yasal Temsilcinin Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

Hastanın adı soyadı	
Araştırma Hasta No	
Dosya No	
Mesleği	
Adresi	
Tel	
Yaşı	
Annenin memleketi	
Babanın memleketi	
Ailesi ve kendisindeki kanser hikayesi	
Ailede mesane tümörü öyküsü	
Hastalığın ilk kez görüldüğü yaş	
Daha önce radyoterapi/kemoterapi alıp almadığı	
Hastalık tekrarlıyorsa tekrarlama süreleri	
Patoloji sonucu, tümör derecesi	
Sitoloji sonucu	
Alkol, sigara (paket/günde) kullanımı, kaç yıl	
Yaşamı süresince kanserojen maddelere maruz kalma durumu (mesleki vb.)	

ÖZGEÇMİŞ

07.09.1979 tarihinde Samsun'da doğdu. 1993-1997 yılları arasında Samsun Tülay Başaran Lisesi'nde okudu. 1998-2002 yılları arasında Akdeniz Üniversitesi Biyoloji bölümünde lisans, 2003-2006 yılları arasında ise İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Moleküler Biyoloji bölümünde yüksek lisans eğitimini tamamladı. Yüksek lisans tez çalışması 'Toksik Bir Genin HIV-1 Regülatör Genine Bağlı Ekspresyonu'dur. 2007-2008 yılları arasında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi bilimsel hazırlık programından sonra 2008 yılında Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında doktora eğitimine başladı. Uzmanlık alanları; rekombinant DNA teknolojisi (DNA manipulasyon teknikleri, gen klonlama, bakteriyel transformasyon, hücre kültürü ve transfeksiyon), gen ekspresyonu analizleri (Real-time PCR, Western blotting, SDS-PAGE), genotipleme yöntemleri (PCR-RFLP) ve epigenetiktir. Yabancı dili İngilizcedir.