

**T.C.
HALIÇ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK PROGRAMI**

**MESANE KANSERİNDE RAF1 GENİ c.*266C>T
POLİMORFİZMİNİN ROLÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Hazırlayan
Fulya KÖKSALAR**

**Tez Danışmanı
Yrd. Doç. Dr. Nagehan ERSOY TUNALI**

**EYLÜL, 2013
İSTANBUL**

T.C.
HALIÇ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

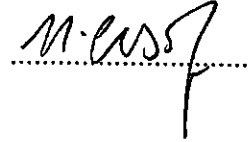
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı Tezli Yüksek Lisans öğrencisi **Fulya KÖKSALAR** tarafından hazırlanan “Mesane Kanserinde Raf1 Geni c.*266C>T Polimorfizminin Rolü” adlı bu çalışma jürimizce Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Sınav Tarihi: 18.09.2013

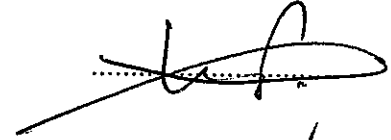
(Jüri Üyesinin Ünvanı, Adı, Soyadı ve Kurumu):

İmzası:

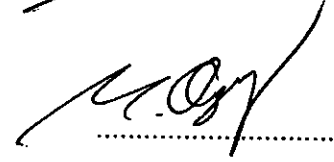
Jüri Üyesi : Yrd.Doç.Dr. Nagehan E.TUNALI
Danışman- HAL. Üniv. Mol. Biy ve Gen. ABD Öğr. Üyesi



Jüri Üyesi : Prof. Dr. Sadrettin PENÇE
İstanbul Üniv.Öğr.Üyesi



Jüri Üyesi : Yrd.Doç.Dr.Mehmet OZANSOY
Medipol Üniv. Öğr. Üyesi



Jüri Üyesi : Yrd.Doç.Dr.M.Baki YOKEŞ
HAL.ÜNİV. Mol.Biy. ve Gen.ABD Öğr.Üyesi (Yedek)

.....

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Hatice YORULMAZ
HAL.Üniv. Hemşirelik ABD Öğr. Üyesi (Yedek)

.....

ÖNSÖZ

Bu tez çalışması 2010-2013 yılları arasında T.C. Haliç Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nın bilimsel araştırma ve uygulama çalışmalarına verdiği destek ile hazırlanmıştır.

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam boyunca yol göstericiliği, sabrı ve arkadaşlığı için danışmanım Yrd. Doç. Dr. Nagehan Ersoy Tunalı'ya, yine lisans eğitimimden bugüne kadar tanıma ve eğitim alabilme şansını yakalamış olduğum Yrd. Doç. Dr. Mehmet Baki Yokeş'e, tez uygulama ve değerlendirme aşamalarında yardımını esirgemeyen Arş. Gör. Ozan Tiryakioğlu, Arş. Gör. Deniz Kanca ve Arş. Gör. Anıl Cebeci'ye teşekkür ederim.

Son olarak eğitimimde karşıma çıkabilen her pürüze karşı yanımda olmuş ve olacak ailem, Buket ve Turgay Köksalar'a, tez sürecinde beni ağırlamaktan çekinmemiş Nazlı Moripek, Merve Çetinkaya, Yağmur Bozkurt, Zeynep Doğru, en büyük moral kaynağım olan müziği üretmekte bu kadar ısrarcı olmama sebep olan büyüklerim ve arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Fulya Köksalar

Eylül, 2013

İÇİNDEKİLER

Sayfa No.

KISALTMALAR	II
ŞEKİLLER	V
TABLolar	VI
ÖZET	VII
ABSTRACT	VIII
1. GİRİŞ	1
1.1. Mesane Kanseri	1
1.2. Mesane Kanseri Moleküler Patolojisi	4
1.2.1. Mesane Kanseri ve FGFR3, RAS ve TP53 Genleri	5
1.2.2. Mesane Kanseri ve RAF1 Geni	8
1.3. Mesane Kanseri ve Sigara Kullanımı	12
1.4. MikroRNA ve Mesane Kanseri	13
1.4.1. miRNA'lar, Biyogenezi ve 3'UTR SNP'leri	14
2. AMAÇ	18
3. GEREÇLER	19
3.1. Deneydeki Örnekler	19
3.2. Kimyasallar	19
3.3. Tamponlar, Solüsyonlar ve Enzimler	20
3.3.1. PZR Tamponları ve DNA Polimeraz Enzimleri	20
3.3.2. Restriksiyon Enzimleri ve Reaksiyon Tamponları	20
3.3.3. Elektroforez Tamponları ve Jel Sistemleri	20
3.3.4. Oligonükleotid Primerler	21
3.3.5. DNA Büyüklük Markörleri	21
3.3.6. Cihazlar	21
3.3.7. RGDE Metodunda Kullanılan Tampon ve Solüsyonlar	22
4. YÖNTEMLER	24
4.1. RGDE Metodu ile Periferik Kandan Hızlı Genomik DNA İzolasyonu.....	24
4.2. Yanak İçi Epitel Dokudan DNA İzolasyonu	24
4.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	25
4.4. Restriksiyon Reaksiyonları	26
4.5. Agaroz Jel Elektroforezi	27
4.6. PZR saflaştırma ve Dizi Analizi	28
4.7. İstatistiksel Analizler	28
5. SONUÇLAR	30
5.1. DNA İzolasyonu	30
5.2. RAF1 Geninin PZR ile Çoğaltılması	30
5.3. PZR Ürünlerinin Restriksiyon Analizi	31
5.4. PZR Ürünlerinin Dizi Analizi	31
5.5. Hasta ve Kontrol Grupları Cinsiyet, Yaş ve Sigara Kullanım Verileri	33
5.5.1. RAF1 rs1051208 Polimorfizmi Hasta Grubu Genotip Verileri	33
5.5.2. RAF1 rs1051208 Polimorfizmi Kontrol Grubu Genotip Verileri	36
5.6. Asosiyasyon Analizleri	37
6. TARTIŞMA	40
7. KAYNAKLAR	45
8. ÖZGEÇMİŞ	54

KISALTMALAR

(NH₄)₂SO₄	: Amonyum sülfat
ΔG	: Gibbs Free Energy
AGO2	: Argonat RISC Catalytic Component 2
AKT	: Protein Kinaz B (PKB)
APC	: Adenomatous polyposis coli
bç, bp	: Baz çifti
BPB	: Bromfenol mavisi
BTA STAT/TRAK	: Mesane tümörü antijen testi
CATT	: Cochran-Armitage Trend Test
CDK	: Siklin bağımlı kinaz
CIS	: Karsinoma <i>in situ</i>
CNV	: Kopya sayısı varyasyonu
CTNNB1	: Catenin (Cadherin-Associated Protein), Beta 1
df	: Serbestlik derecesi
DGCR8	: DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8
dNTP	: Deoksiribonükleotid
DROSHA	: Drosha ribonükleaz tip III
DSB	: Çift zincir kırığı
EDTA	: Etilen diamin tetrasetik asit
EGF	: Epidermal büyüme faktörü
EGFR	: Epidermal büyüme faktörü reseptörü
ERK	: Extracellular signal-regulated protein kinases
EtBr	: Etidyum bromür
FGF	: Fibroblast büyüme faktörü
FGFR₃	: Fibroblast büyüme faktörü reseptörü 3
FISH	: Floresan in situ hibridizasyon
GDP	: Guanozin difosfat
GTP	: Guanozin trifosfat
HER2/neu	: Human epidermal growth factor receptor 2
HOXB5	: Homeobox B5 Protein

HWD	: Hardy-Weinberg Dengesi
IL-6	: Interleukin 6
ITGB4	: Integrin beta 4
L	: Litre
LOH	: Heterozigotluk kaybı
M	: Molar
MAPK	: Mitogen-activated protein kinase
MEK	: Mitogen-activated protein kinase kinase
MgCl₂	: Magnezyum klorür
µg	: Mikrogram
m7g	: m7GpppN difosfataz 5'Cap
ml	: Mililitre
µl	: Mikrolitre
mM	: Milimolar
MNK	: MAP kinase interacting serine/Threonine Kinase
mTOR	:Mechanistic target of rapamycin (serine/threonine kinase)
NaCl	: Sodyum klorür
NIH 3T3	: Fibroblast Hücre Hattı
NMP22	: Nükleer matriks protein 22
OR	: Görelî Orantı
ORF	: Open reading frame
PARP	: Poly (ADP-ribose) polymerase
PI3K	: Phosphoinositide-3-kinase
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Rb	: Retinoblastoma
RAF1	: v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1
RFLP	: Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmi
RGDE	: Rapid Genomic DNA Extraction
RISC	: RNA-induced silencing complex
RTK	: Reseptör Tirozin Kinaz
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SNP	: Tek nükleotid polimorfizmi

TBE	: Tris-Borik asit-EDTA
TCC	: Tranzisyonel Hücre Karsinomu
TE	: Tris-EDTA
TNM	: Malign Tümör, Nod ve Metastaz Sınıflandırması
TP53	: Tumor Protein 53
TRBP	: Transactivating response RNA-binding protein
TSC1	: Tuberous Sclerosis Syndrome Gene 1
U	: Ünite
UCC	: Ürotelyal Hücre Karsinomu
VSV	: Veziküler Stomatitis Virüs
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
XPD	: Nucleotid Eksilme Tamir Geni
XRCC1	: X-ray repair cross-complementing protein
X²	: Ki-kare

ŞEKİLLER

Şekil 1.1 Mesane Kanseri Derecelendirmesi	3
Şekil 1.2. Mesane Moleküler Değişim ve Derecelendirmesi	5
Şekil 1.3. Mesane Karsinogenezinde TP53 ve FGFR3 Mutasyonları.....	6
Şekil 1.4. RAS/RAF1/MAPK Sinyal Yolağı	10
Şekil 1.5. MikroRNA ve Hedef mRNA Eşleşmeleri	15
Şekil 1.6. RAF1 mRNA ve Hedef MikroRNA'ları	17
Şekil 5.1. DNA İzolasyonlarının %1'lik Agaroz Jelde Görüntülenmesi	30
Şekil 5.2. PZR Ürünlerinin %2'lik Agaroz Jelde Görüntülenmesi	31
Şekil 5.3. <i>HhaI</i> Kesimlerinin %1'lik Agaroz Jelde Görüntülenmesi	31
Şekil 5.4. rs1051208, CC Genotip Dizi Analizi (GCG)	32
Şekil 5.5. rs1051208, CT Genotip Dizi Analizi (GCG/GTC)	32
Şekil 5.6. rs1051208, TT Genotip Dizi Analizi (GTG)	32
Şekil 5.7. Hasta Grubu Yaş Dağılımları	33
Şekil 5.8. Tümör Evreleri Dağılımı	34
Şekil 5.9. Genotiplerin Tümör Evrelerinde Oranları	35
Şekil 5.10. Tümör Evrelerinde Genotip Oranları	35
Şekil 5.11. Alel Frekanslarının Tümör Evrelerindeki Oranı	36
Şekil 5.12. Kontrol Grubu Genotip Oranları	37
Şekil 6.1. rs1051208 Polimorfizmi İçin Popülasyon Taramaları	41

TABLÖLAR

Tablo 1.1. Mesane Kanseri Sıklığı, GLOBOCAN 2008.....	1
Tablo 1.2. 2004 WHO Ürotel Neoplazm Sınıflandırması	2
Tablo 4.1. PZR Bileşenleri ve Miktarları	25
Tablo 4.2. RAF1 PZR Koşulları	26
Tablo 4.3. rs1051208 RFLP Reaksiyonu Koşulları.....	27
Tablo 4.4. rs1051208 RFLP Fragmanları.....	27
Tablo 5.1. Hasta Grubu Genotipleri	34
Tablo 5.2. Genotiplere Göre Tümör Evreleri	34
Tablo 5.3. Genotiplerin Tümör Evrelerine Dağılımı	35
Tablo 5.4. Farklı Tümör Evrelerinde rs1051208 Alel Frekansları	36
Tablo 5.5. Kontrol Grubu Genotipleri	36
Tablo 5.6. Kontrol ve Hastalar İçin HWD Testi	37
Tablo 5.7. Cinsiyetin Mesane Kansere Etkisi	37
Tablo 5.8. RAF1 rs1051208 için CATT ve Lojistik Regresyon Analizleri	38
Tablo 5.9. Sigara Kullanımının Mesane Kansere Etkisi	38
Tablo 5.10. Sigara Kullanımı ve Genotip İçin Risk Analizi	39
Tablo 5.11. Tümör Evreleri ve rs1051208 Polimorfizmi için CATT	39

GENEL BİLGİLER

Adı ve Soyadı	: Fulya KÖKSALAR
Anabilim Dalı	: Moleküler Biyoloji ve Genetik
Programı	: Moleküler Biyoloji ve Genetik
Tez Danışmanı	: Yrd. Doç. Dr. Nagehan ERSOY TUNALI
Tez Türü ve Tarihi	: Yüksek Lisans – Eylül 2013

ÖZET

Mesane kanseri oluşumu ve ilerlemesinde bir veya birden fazla genin mutasyonuna rastlanmaktadır. Bunun yanı sıra birçok moleküler yolak birlikte hareket ederken, herhangi bir basamakta anormal bir fonksiyon da mesanenin karsinogenezini etkileyebilmektedir. Mesane kanserinde FGFR3, TP53 ve Rb genleri sıklıkla mutanttır. RAS/RAF/MAPK hücre büyümesi sinyal yolağında görevli proteinlerden birini kodlayan RAF1 geninin de mutasyona uğrayabildiği ve bu nedenle de ilgili proteinin sinyal yolağında anormal fonksiyon gösterdiği bilinmektedir. rs1051208 c.*266C>T polimorfizmi popülasyonlarda sıklıkla görülmekte ve birkaç mikroRNA için RAF1 mRNA 3'UTR bağlanma bölgesinde bulunmaktadır. Bu nedenle mesane kanseri riski açısından bu polimorfizmin taranması önemlidir.

Bu tezde mesane kanseri hastalarında ve sağlıklı kontrol grubunda, çeşitli popülasyonlarda polimorfikliği belirlenmiş olan RAF1 rs1051208 c.*266C>T SNP'si PZR-RFLP metodu ile taranmıştır. 189 mesane kanseri hastası ve 278 sağlıklı bireyin dahil edildiği bu çalışma sonucunda, varyant olan T alelinin mesane kanseri için koruyucu etken olduğu ve CT genotipinin de bireyde hastalık oluşumu açısından koruyucu eğilim gösterdiği belirlenmiştir. Erkek olmanın hastalık riskini 1,86 kat, sigara içmenin ise riski 4,45 kat artırdığı gösterilmiştir. İleri evre tümör oluşumunda genotip etkisi belirlenmemiştir.

Anahtar Kelimeler: Mesane kanseri, mikroRNA, RAF1, rs1051208, tek nükleotid polimorfizmi.

GENERAL INFORMATION

Name and Surname : Fulya KÖKSALAR
Field : Molecular Biology and Genetics
Program : Molecular Biology and Genetics
Supervisor : Assist. Prof. Dr. Nagehan ERSOY TUNALI
Degree Awarded and Date : Master of Science – September 2013

ABSTRACT

One or more gene mutations are shown to be responsible in bladder cancer development and progression. Additionally, while many molecular pathways act together, an abnormal function in one of them may also affect the carcinogenesis of bladder. TP53, FGFR3 and Rb are the most frequently mutated genes in bladder cancer. Furthermore, the RAF1 gene, which codes for a protein having a role in the RAS/RAF/MAPK cell proliferation pathway, can also be mutated, and the related protein ends up with an abnormal function in the signaling cascade. The rs1051208 c.*266C>T polymorphism has been found frequently in various populations and resides in the miRNA binding region of the RAF1 mRNA 3'UTR. In this sense, screening of this polymorphism for bladder cancer risk is of great importance.

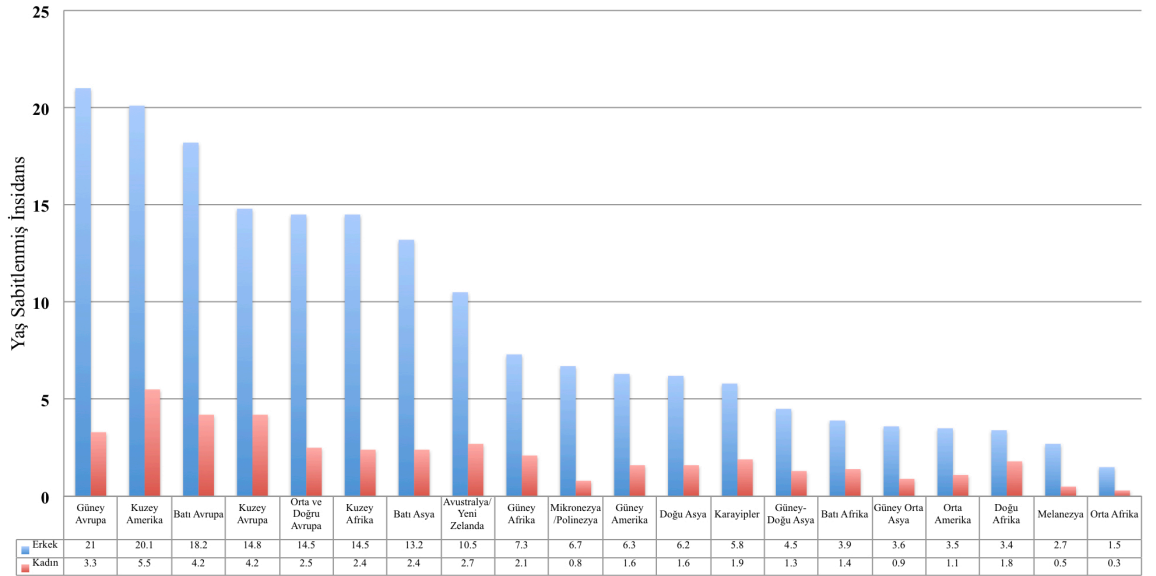
In this thesis, RAF1 rs1051208 c.*266C>T SNP, which has been identified as a polymorphism, was screened in bladder cancer patients and healthy controls using PCR-RFLP. 189 bladder cancer patients and 278 healthy controls were included in the study. According to the results, the variant T allele was identified as protective against bladder cancer, and the CT genotype was found to have a protective trend in disease development. Being a male and cigarette smoking were shown to increase the disease risk by 1,86 and 4,45 folds, respectively. The effect of the genotype could not be proven for the late stage tumors.

Keywords: Bladder cancer, microRNA, RAF1, rs1051208, single nucleotide polymorphism

1.GİRİŞ

1.1. Mesane Kanseri

Mesane kanseri GLOBOCAN 2008 verilerine göre yılda 386,300 yeni olgu ile dünya çapında en sık rastlanan dokuzuncu; kanser kaynaklı ölümlerde 150,200 ölüm vakası ile 13. sırada yer almaktadır. Mesane kanserine erkeklerde, kadınlara oranla daha sık rastlanır (ölüm sayısı 112,300, yeni olgu sayısı 297,300). En yüksek ölüm oranı (100,000’de 16.3) Mısır’lı erkeklerde iken, en düşük oranlar Orta Afrika ve Melanezya’dadır (Tablo 1.1.) (Jemal vd., 2011; Global Cancer: Facts & Figures 2nd Edition).



Tablo 1.1. Mesane Kanseri Sıklığı, GLOBOCAN 2008

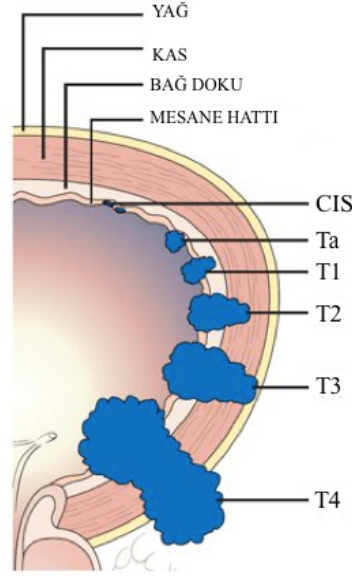
Mesane tümörlerinin sınıflandırılmasında ve teşhisinde kullanılan 2004 yılı Dünya Sağlık Örgütü (WHO) kriterleri Tablo 1.2.’deki gibidir.

Tablo 1.2. 2004 WHO Ürotel Neoplazm Sınıflandırması

Dereceler	Açıklamalar
Ürotelyal papiloma	Benign tümörler
Düşük malign potansiyelli papiler ürotelyal neoplazmları (PUNLMP)	Çok yavaş ilerleyen ve yayılımcı olmayan
Düşük derece papiler ürotelyal karsinom	Yavaş ilerleyen ve yayılımcı olmayan
Yüksek derece papiler ürotelyal karsinom	Çok hızlı ilerleyen ve yayılımcı olan

Mesane kanserinin patolojik verileri birçok tarama testi ile ortaya koyulmaktadır. Ancak bu testler henüz tam verimde, yüksek duyarlılık ve özgünlükte sonuç verme standardına ulaşmamıştır. Yüksek duyarlılıkta, pahalı ve invaziv bir teknik olan sitoskopi; daha duyarlı ancak özgünlüğü düşük BTA STAT/TRAK testleri; kantitatif, kalitatif ve düşük özgünlükte NMP22 testi; Ta, T1 ve T2 evreleri ve G1 ve G2 derecelere yüksek özgünlükte ve sitolojinin duyarlılığını artıran, fakat pahalı ImmunoCyt/Cyt+, Hiyolüronik Asit (HA-), hiyalüranidaz (HAse) idrar testleri ve *survivin* gibi proteomik taramalar ürotelyal hücre karsinomunun teşhis ve takibinde standartları yakalamış testler olmadıkları için, klinikte avantaj sağlayacak biyomarkör tespitleri ve kanser teşhislerinde aktif kullanımı için çalışmalar sürdürülmektedir. (Budman vd., 2008; Vrooman vd. 2008; Rouprêt vd.,2011). Farklı evre ve derecelerdeki mesane kanserlerinde, karsinogenez süresince moleküler profildeki ifadenme değişimleri araştırıldığında çok sayıda olası biyomarkör ile karşılaşmaktadır. Aynı ve/veya farklı popülasyonlardaki bireyler arası benzer patolojik bulgular üzerinden yapılan biyomarkör araştırmaları ile genlerin ifadenme seviyeleri ve/veya gen ürünleri (miRNA, mRNA, protein) seviyelerindeki değişimler saptandığı takdirde ve bu teknikler standartlaştırıldığında genel kabul edilecek eşsiz teşhis, tedavi ve takip alternatifleri ortaya çıkacaktır.

Mesane kanserlerinin %75-80'i Tis (CIS), Ta (yüzeysel ve/veya invaziv olmayan papiler) ve T1 (erken invaziv ve/veya epitelyal bağ dokuya ulaşmış), %15-25'i invaziv ve metastaz yapmış T2 (kas invazyonu), T3 (kasta periüreterik yağ dokuya invazyon) ve T4 (böbrekten periferik yağ dokuya doğru ve/veya diğer organlara metastaz) evrelerinde olup, tipik papiler ve ürotelyal mukoza patolojisi gösteren ve hızlı prognoz ve nüks ile karakterize karsinomlardır (Şekil 1.1.) (Lindgren vd., 2006; Tanaka vd., 2011).



Şekil 1.1. Mesane Kanseri Derecelendirmesi

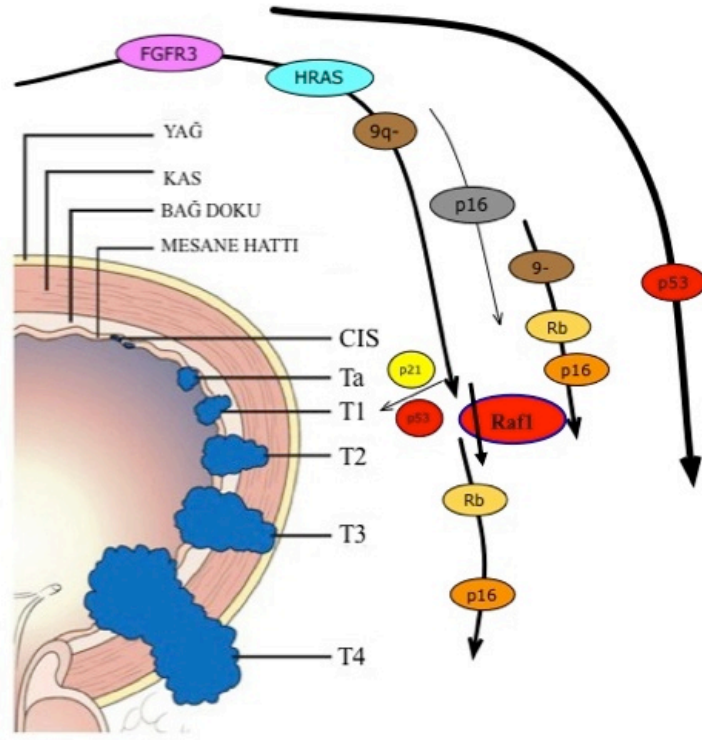
Normal ürotelyum iltihaplanması ve enfeksiyon gibi etkiler ile papiler görümlü ve yoğunlaşmış hücrelerden oluşan mukozal yapı, hiperplazi olarak adlandırılır (Grignon, 2009). Anormal sitoloji teşhisinde bulunulamayan bu basamaktan ilerlemesini sürdüren kanserleşme başlangıcındaki hücreler reaktif atipide, daha belirgin nükleuslu ve dağınıklaşmaya başlamış hücre topluluklarına dönüşür. Sıçan modellerinde, hiperplazi ile başlayan ürotelyal karsinomanın sıklıkla papiler hiperplazi ve daha ilerisinde de yüksek derece, invaziv olmayan karsinomalar ve invaziv neoplazmlara ilerleyebildiği görülmüştür (Tanaka vd., 2011). Genellikle karsinoma *in situ* ve ürotelyal neoplazmlar ile aynı teşhis kriterleri ve hiperkromazi izlenen bu yapı, orta ve düşük dereceli neoplazi de denilen displazi formuna geçebilmektedir. Buradan sonra karsinogenez TNM sınıflandırmasına göre seçilebilir. Anormal patolojik bulgular gösteren Tis (CIS), Ta, T1 gibi mesane submukozasına yerleşik seviyelerde, geniş boyutta tümör kitlelerine ve lenf nodları

ve/veya diğerk organlara da yayılmış agresif T2, T3 ve T4 evrelerine de ilerleyebilir (Proctor vd., 2010). Tranzisyonel Hücre Karsinomları (TCC) yüksek (G3) ve düşük (G1, G2) dereceli T1 tümörleridir ve tüm mesane kanserleri bulgularının %90'ından fazlasını oluşturup, görülme sıklığı ve ölüm oranları bakımından sırasıyla, en sık rastlanan ikinci ve üçüncü mesane karsinogenesidir (Raman vd., 2005; Tanaka vd.,2011). Düşük derece papiller neoplazmlar genelde yüzeysel kalırken, yüksek derece papiller karsinomlar nüks potansiyelli, metastatik ve invaziv olabilmektedir.

1.2. Mesane Kanseri Moleküler Patolojisi

Ürotelyal Hücreli Karsinom (UHC-UCC; Urothelial Cell Carcinoma) veya Tranzisyonel Hücreli Karsinom (TCC; Transitional Cell Carcinoma) olarak da bilinen mesane kanseri, davranış ve moleküler profil olarak farklı özelliklere sahiptir. Karsinogenez süresince moleküler profildeki farklılıklar önemli patolojik sonuçlar doğurmaktadır. Kanser hücrelerinin büyüme, bölünme, apoptoz, invazyon ve metastazını belirleyen farklı gen ve genlerin mutasyonları karsinogenez, tanı, prognoz ve tedavi çalışmalarının esas hedefidir .

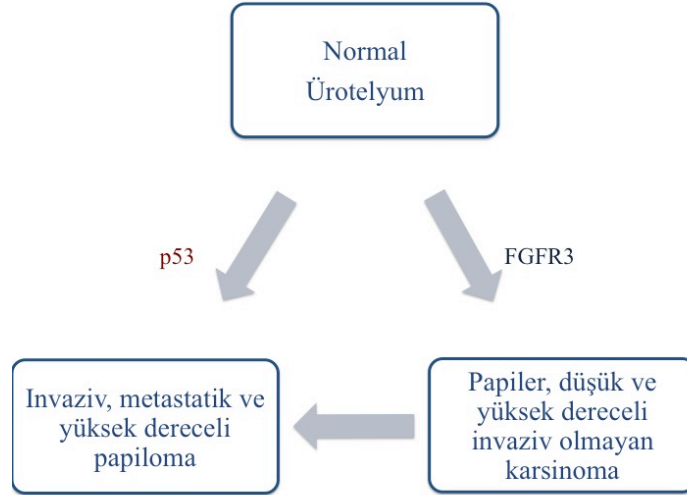
Farklı evre ve dereceli mesane kanserlerindeki özgün genlerin mutasyon durumları incelenerek ifadenmesi değişen genler ve bunlarla bağlantısı bulunan anormal mikroRNA ifadenme ve işleyişleri tespit edilmektedir. FISH tekniğiyle gerçekleştirilen mesane karsinogenezi mutasyon taramalarında 1., 3., 5., 7., 9., 11. ve 17. kromozomlarda anomaliler belirlenmiştir (Fassan vd., 2007; Budman vd., 2008). Kromozom 3p11, 3p25, 3p23, 5p11-p13, 7p13, 8p11.2-p12, 8q24, 11q13, 12q13-15, 17q21, 18p11, Xp21 amplifikasyon/delesyonları, 7p12.1-12.3, 9p21, 11p15, 17p11-13, 18q21 alelik kayıpları ve kromozom 9 monozomilerine mesane kanserinde sıklıkla karşılaşılır (Li M vd., 1996; Zhao vd., 1999, Simon vd., 2001, Chu vd., 2012). FGFR3 (4p16.3) ve TP53 (17p13.1) mutasyonları, tek nükleotid polimorfizmleri (SNP), kopya sayısı varyasyonları (CNV), heterozigotluk kayıpları (LOH) ve fonksiyon kazanım/kayıpları karsinogenezin evre ve derece yönünden farklılaşmasında rol oynar (van Rhijn vd., 2004; Ahmad vd.,2012) (Şekil 1.2.).



Şekil 1.2. Mesanede Moleküler Değişim ve Derecelendirmesi

1.2.1. Mesane Kanseri ve FGFR3, RAS ve TP53 Genleri

Mesane karsinogenezi ve tümör evre ve derecelerinin ortaya çıkışında iki temel moleküler yolak vardır. İfadesi artmış veya azalmış FGFR3 ve TP53 mutasyonları bu ilerleyişte en etkili genler olarak belirlenmiştir (Şekil 1.3). 19 ekzondan oluşan 4p16.3 lokasyonlu FGFR3 genindeki aşırı aktivite mutasyonları, düşük derece ürotelyal tümörlerin gelişimine yol açar. Yüzeysel mesane kanserlerinde FGFR3 genindeki değişimler sonucu, RAS/RAF1/MAPK yolağının aşırı aktivasyonu ve düşük dereceden yüksek dereceye karsinogenez izlenirken, metastatik ve ağır hastalık süreci ile takip eden invaziv mesane karsinogenezinde sıklıkla TP53 gen değişimlerine rastlanmaktadır (Lindgren vd., 2006). G1/G2 dereceli mesane kanserlerinde yüksek sıklıkta FGFR3 geni nokta mutasyonları gözlenirken, pTa/pT1 evre hastalarının idrar sedimentlerinde de ayırt edici artmış FGFR3 protein seviyeleri



Şekil 1.3. Mesane Karsinogenezinde TP53 ve FGFR3 Mutasyonları

de ölçülmüştür (Lindgren vd., 2006; Bryan vd., 2009; Proctor vd., 2010). Bodoor ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada FGFR3 geni 10.ekzon G382R, R248C, G382E ve Y375C nokta mutasyonlarının karsinogenezde prognostik biyomarkörler olabileceklerini öne sürmüşlerdir (Bodoor vd., 2010). Ras protein ailesi (H-ras, K-Ras ve N-Ras) etkileşime girdiği GTPaz'lar ile hücrede sinyal iletimi, büyüme, bölünme, farklılaşma ve gen ifadenmesinde görev alırken, aynı zamanda RAS/RAF1/MAPK yolağı üzerinden birçok karsinogeneze de etki etmektedir. RAS onkogen mutasyonları, bu yolağın anormal çalışmasıyla farklı kanser tiplerinde olduğu gibi, düşük derece mesane karsinogenezinde de etkili olmakta ve tüm evre ve derecelerdeki birincil tümörlerde sıklıkla gözlenmektedir (Fransén vd., 2004; Schubert vd.,2007; Kompier vd., 2010). hücre döngüsü düzenleyici RAS protein profili artmış olan hücrelerde, FGFR3'ün aktivasyonu ile mitojenik sinyaller uyarılır ve epitel hücrelerin kendini yenilemesi ve proliferasyonu gözlenir (Lott S vd., 2009). Ligand FGF ile FGFR3 aktivasyonu sonucu RAS/RAF1/MAPK yolağından aşırı büyüme sinyali aktarımı başlar ve hücrede farklılaşma meydana gelir (Proctor vd., 2010). Düşük dereceli tümörlerde FGFR3 mutasyonu ve sonrasında da RAS/RAF1/MAPK yolağının aşırı aktivasyonu bir tür 'birlikte hareket' gösterdiği gibi maligniteyle de ilişkilendirilmiştir. Türkiye'de yapılmış bir mutasyon insidans çalışmasında farklı evre ve derece mesane tümörüne sahip 56 hastanın 28'inde S249C nokta mutasyonuna yüksek sıklıkta, G372C nokta mutasyonuna ise hiç rastlanmamıştır (Dodurga vd., 2011). Aynı çalışmada FGFR3 mutasyonları ile tümör

evre ve derecesi arasında korelasyon bulunamamıştır. Bir başka çalışmada primer tümörler ile düşük derece ve evre tümörler arası risk oluşturucu FGFR3 mutasyonları taranmış ve aralarında anlamlı bir ilişki olduğu gösterilmiştir (Kompier vd., 2010). Bu sonuç 2004 yılında Rhijn ve arkadaşlarının elde ettiği, mutant FGFR3 ile ilişkili düşük dereceli, düşük nüks oranı ve daha iyi prognoz sonucuyla da uyumludur (van Rhijn vd., 2004). FGFR3'ün üzerinden RAS ve p110 ile aktive edilen PI3K (Fosfoinositol 3 kinaz) proteini, hücre büyümesi, proliferasyonu, hayatta kalımı, farklılaşımı ve hücre iskeletindeki değişimleri de yönlendirme etkisine sahiptir. Ürotelyal tümörlerde FGFR3'teki çok yönlü etki mekanizmasına sahip mutasyonlar sıklıkla ekzon 7 kodon 248 (%63), ekzon 10 kodon 375 (%18) ve ekzon 10 kodon 372'de (%6) görülmektedir ve bu mutasyonlar da yüzeysel papiller tümör ve düşük nüks ile ilişkilendirilmiştir (Lott S vd., 2009). Ayrıca FGFR3 mutasyonlu ürotelyal karsinomların ilerleme sürecinde TP53 mutasyonlarının da devreye girmesi apoptotik sistemin tamamen bozularak, daha kötü bir prognoz ve yüksek nükse yol açtığı da düşünülmektedir.

TP53 gen mutasyonları mesane karsinogenezinde etkili ikinci yolağı oluşturlar (Şekil 1.3.). 17p13.1 lokasyonlu 11 ekzondan oluşan ve hücre döngüsü, DNA hasar tamiri ve apoptozda önemli bir rol oynayan TP53 geninde özellikle DNA bağlanma bölgesinde ve genelinde meydana gelen mutasyonlar, proteinde fonksiyon kaybı ile sonuçlanır. Bir alt hedefi olan p21 gen ifadesinde de düşüşe yol açan bu tip TP53 mutasyonlarına ürotelyal karsinomlarda sık rastlanmaktadır (Lott S vd. 2009). TP53, RB ve p21 genlerindeki değişimler, FGFR3 değişimlerinden daha farklı bir moleküler profil göstermesi nedeniyle biyomarkör çalışmalarında hedefi oluşturan önemli genlerdendir. Agresif yüksek derece tümörlerde sıklıkla TP53 ve RB genlerinde mutasyonlara ve ilgili sinyal yollarında değişimlere rastlanmaktadır.

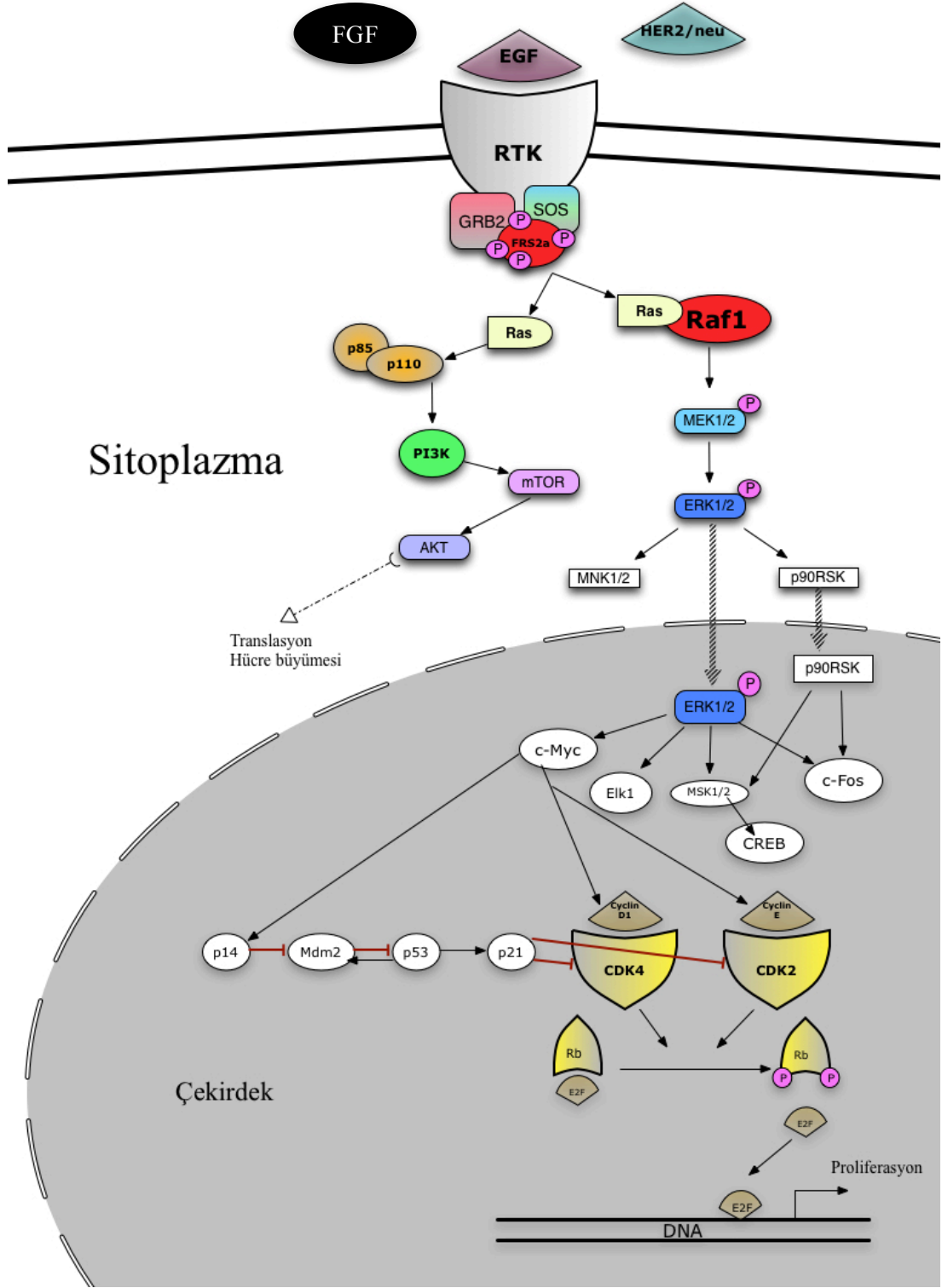
Farklı kanserlerle ilişkilendirilmiş TP53 gen mutasyonları genellikle proteinin merkez DNA bağlanma bölgesinde ve özellikle 175., 245., 248., 249., 273., ve 282. kodonlarda görülmektedir (Robles vd. 2010). Bu mutasyonlar, FGFR3 mutasyonlu kas invazyonu yapmamış mesane kanseri ile kas invazyonlu mesane kanserlerinin ayırt edilmesi ve izlenebilmesi açısından önemli biyomarkörlerdir (van Rhijn vd., 2004; Kompier vd., 2010; Lindgren vd.,2006). G1 derecesindeki 260 tümörde TP53

ve FGFR3 mutasyonları ve kanser patogenezindeki görevleri araştırıldığında, TP53 gen mutasyonlarının FGFR3 gen mutasyonlarının tam tersi olarak, yüksek derece ve invaziv tümörle ilişkili olduğu gösterilmiştir (van Rhijn vd., 2004). Serum örnekleri ile yapılan 8 G3 mesane kanseri hastasında ise %63 oranında (5/8) TP53 mutasyonu varken, hiçbirinde FGFR3 mutasyonu tespit edilememiştir (Lindgren vd., 2006). Hem doku hem de idrar örneklerinde yapılan taramalarda ise pT2/pT4 tümörlerde %42 (13/31) oranında dokuda, %39 (7/18) oranında da idrarda farklı TP53 mutasyonlarına rastlanmıştır (Schlichtholz vd., 2004). Aynı zamanda evre, derece ve lenf nodu sıçraması ile TP53 gen mutasyon durumu arasında anlamlı bir ilişki olduğu da ortaya koyulmuştur. Bu çalışmalara ek olarak TP53 gen mutasyonları ve protein ifadenme profili ile tümör evre, derece ve yayılması arasında anlamlılık araştırmaları sürmektedir. Mesane kanserinde TP53 gen mutasyonu ve aşırı gen ifadenmesinin ölçüldüğü bir çalışmada 94 hastanın %52.1'inde aşırı mutant protein ifadenmesi belirlenmiş, 8.ekzon mutasyonu ise %42.3 oranında bulunmuştur (Salinas-Sanchez vd., 2008). Mesane kanserinde p53 ile birlikte pRb yolaklarının inaktif olması, mutasyon kaynaklı olmalar ve kanser progresyonunda da birliktelik göstermeleri dolayısıyla bir tür teşvik edici ("yolcu mutasyon") etken olabilecekleri düşünülmektedir (Tanaka vd., 2011). Aşırı sigara tüketiminin FGFR3 yabanıl tip/TP53 mutant genotip ile ilişkili olduğu bulunmuş, ancak sigara kullanmayanlar ile kullananlar arası mutant genotip frekansı açısından anlamlı bir ilişki kurulamamıştır (Wallerand vd., 2005). Aynı zamanda TP53 ikili mutasyonlarının sigara kullananları, kullanmayanlardan ayırdını sağlayabilecek bir genetik belirteç olabileceği ve de TP53 mutasyon motiflerinin sigara kullanımından etkilenebileceği düşünülmektedir (Wallerand vd., 2005). Tümör baskılayıcı gen TP53'teki bazı LOH'lerin hayatta kalım ve kemoterapiye yanıtta düşüşe yol açan, agresif ve kas invazyonlu mesane kanseriyle; onkogen FGFR3 aktive edici mutasyonları ise düşük derece ve yavaş ilerleyen mesane kanseriyle ilişkilendirilmiştir (Fassan vd., 2007; Bryan vd., 2009; Tanaka vd., 2011).

1.2.2. Mesane Kanseri ve RAF1 Geni

3p25 lokasyonlu *Raf-1* (v-raf-1 mürin lösemi viral onkogen homolog 1) gen ürünü olan RAF1 proteini, hücrede plazma membranına yerleşik RAS ailesi

proteinlerini kapsayan reseptör aracılı sinyal iletiminde efektör fonksiyonu gösteren bir serin/treonin kinazdır. RAF gen ailesi üyelerinden (BRAF, ARAF) RAF1, FGFR3 tarafından sinyal (ligand; FGF) alındıktan sonra MEK1 ve MEK2 proteinlerini iki farklı rezidüsünden fosforile eder. Bu aktivasyon RAS/RAF1/MAPK yolağında, birer serin/treonin protein kinaz olan ERK1 ve ERK2'nin MEK proteinlerince fosforile edilmesi, birçok genin ifadenmesini ve hücrede çoklu yapısal değişimleri uyarır. Eğer yolak üzerinde herhangi bir basamakta görevli proteinler, ilgili genler ve gen düzenleyicilerinde, sürekli büyüme sinyali iletimine yol açacak bir mutasyon varsa, yolakta anormal aktivasyon, hücrenin kontrolsüz bölünmesi, transformasyonu ve sonucunda karsinogenez gözlenir (Marais vd.,1995; Downward vd.,2003; Marks vd., 2008) (Şekil 1.4.).



Şekil 1.4. RAS/RAF1/MAPK Sinyal Yolağı

Hücre büyüme ve bölünmesi, apoptoz, farklılaşım, hücre göçü ve onkogenik transformasyonda etkili rol oynayan RAF1 proteininde, farklı mutasyonlar sonucu

fonksiyon değişimleri gözlenebilir. RAF1 geninde meydana gelebilecek LOH, CNV, SNP, delesyon ve/veya insersiyon gibi gen anomalileri farklı türde neoplazmların gelişmesine yol açar. Özellikle kromozom 3p12-14, 3p21.3-22 ve RAF1 geni içeren 3p25 lokuslarında alelik kayıpların meydana gelmesi, mesane tranzisyonel hücre karsinomlarında sıklıkla karşılaşılan bir durumdur (Li M vd.,1996). RAF1 geni, özellikle kinaz ve korunmuş bölgelerindeki tetra-peptidik insersiyonlar sonucu aşırı aktivasyon gösterip akciğer karsinogenezine yol açabileceği düşünölmüş, ancak 140 hastayla yapılmış bu çalışmada spesifik bir RAF1 mutasyonuna rastlanmamıştır (Miwa vd., 1994). Dokuda mikroarray teknolojisi kullanılarak FGFR1 ve RAF1 genlerinde CNV'ler taranmış, iki gende de delesyon ve amplifikasyonların invaziv ve ilerleyici papiller mesane karsinomları (T1-T4) ile ilişkili olduğu ve RAF1'in 3p25 komşu lokuslarındaki farklı gen aktivasyonlarıyla birliktelik içinde ilerleyerek, mesane kanseri progresyonuna yol açtığı gösterilmiştir (Simon vd., 2001). PI3K, RAS/RAF1/MAPK ve RalGDS yolağı boyunca görevli efektör proteinlerin RAS tarafından uyarılarak aktive oldukları ve hücre transformasyonuna yol açtıkları bilinmektedir (Repasky vd., 2004). Veziküler Stomatitis Virüs (VSV) malign hücreler, normal hücrelere göre yüksek verimle çoğalmakta ve onkolitik özellik göstermektedir. Noser ve arkadaşlarının 2006 yılında yaptığı RAS/RAF1/MAPK sinyal yolağı aktivasyonları çalışmasında VSV'nin onkolitik etkisinin yolakta görevli proteinlerin aktivasyonu ile arttığı ve aşırı aktif RAF1 profili gösteren NIH 3T3 hücre hatlarında VSV için daha da geçirgen olma durumu ortaya koyulmuştur. Ayrıca anormal artmış RAF1 profili gösteren hücrede ERK1/2'nin de hızla fosforile olduğu ve artmış onkolitik etkinin de yolaktaki birlikte ilerleyiş sonucu daha da arttığı gözlenmiştir (Noser vd., 2007). Akciğer kanseri Platinyum+Gemcitabin ve Platinyum+Taksan olarak iki grup ilaç ile tedavi edilen 1,076 kemoterapi hastasının ilaçlara yanıt ve hayatta kalımda RAF1 geninin transkripsiyon fakörü bağlanma bölgesine spesifik rs11710163 SNP'si için heterozigot bireylerin homozigotlara oranla daha iyi bir hayatta kalım gösterdikleri sonucuna ulaşılmıştır (Li Y vd., 2011). Prostat kanserinde ise RAF1 apoptoz ilişkisi araştırılmak istenmiş ve rs13060691 T>G SNP'sinin heterozigot varyant genotipteki kişiler için agresif prostat karsinogenezi ile ilişkili olduğu ve 1.38 kat risk ($p=0.03<0.05$; OR=1.38; %95 CI= 1.03-1.84) oluşturduğu belirlenmiştir (Lavender vd., 2012). 145 mesane kanseri hastasında mesane kanserinde sıklıkla mutant bulunan 16 gen (FGFR3, PIK3CA,

PIK3R1, PTEN, AKT1, KRAS, HRAS, NRAS, BRAF, ARAF, RAF1, TSC1, TSC2, APC, CTNNB1 ve TP53) taranmış ve RAF1’de 14. ve 11. ekzonların dizilenmesinde özgün bir mutasyon bulunamamıştır. Ancak diğer genlerin etkisini artırıcı ve yolak üzerinde birlikte ilerleme gösteren aktive edici mutasyonlar geçirerek mesane karsinogenezinde merkezi olmasa da önemli bir basamağı oluşturduğu öne sürülmüştür (Sjödahl vd., 2011). HRAS’ın PI3K ve RAF1’i aktive ederek invaziv olmayan pTa evre tümörlerinin gelişmesine yol açması birlikte ilerleme olgusuna bir diğer örnektir (Mitra ve Richard, 2009). Doku mikroarray teknolojisi kullanılarak gen amplifikasyonuna bağlı aşırı RAF1 protein ifadesine 141 pT1 evre tümörde sık rastlanırken, bu durumun pTa/pT1 tümör davranışlarını belirlemede etkili bir prognostik değeri olmadığı görülmüştür (Mhawech-Fauceglia vd., 2006).

1.3. Mesane Kanseri ve Sigara Kullanımı

Gen mutasyonları ve bunların artıp birikerek karsinogeneze yol açması endojen ve ekzojen faktörlere bağlıdır. Başta tütün mamülleri olmak üzere zararlı çevresel maruz kalımlar (boya, kömür, tekstil kimyasalları, petro-kimyasal ürünler vb.) ise karsinogeneze etkileyen birincil ekzojen faktörlerdir. Ekzojen faktörler hücrede oksidatif DNA hasarı oluşturur ve DNA hasar tamir mekanizmalarındaki bozukluklar sonucu gözden kaçırılarak, giderek artan somatik mutasyonlara ve sonucunda da karsinogeneze yol açabilmektedir (Stratton, 2011). Tütün mamülleri karsinojenleri (tar, hidrokarbon ve aromatik aminler) mesane mukozasına girerek DNA’da hasarlar oluşturur, hasar tamir sisteminin etkili çalışmaması sonrası hücrede aşırı büyüme sinyali iletimi tetiklenir ve apoptoz baskılanarak da mesanenin kanserleşmesine neden olur (McConkey vd., 2010; Teo vd., 2011). Özellikle üst yüzey ürener hücre karsinomlarında tütün mamüllerine maruz kalımın 2.5 ila 7 kat arası risk artırıcı ekzojen bir faktör olduğu belirlenmiştir (Rouprét vd., 2011). Pasif içicilik de tıpkı sigara kullanan kişilerde olduğu gibi karsinogenezde yüksek risk oluşturmaktadır (Alberg vd., 2007).

Sigara kullanan mesane kanserli bireylerde IL-6 (-175G>C) homozigot varyant CC genotipinin istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkisi bulunurken, sigara

kullanmayanlarda anlamlı bir ilişki saptanamamıştır (Leibovici vd., 2005). Özellikle yaş ortalaması 65.2 ila 62.3 yaş olup, ortalama 32.7 ila 30.0 yıl sigara kullanmış bireylerde invaziv mesane kanseri gelişimi için yüksek risk belirtilmiştir. Yılda 29 paketten fazla sigara içen mesane kanseri hastalarında bu varyant IL-6 genotipinin, 29 ve daha az sayıda paket sigara kullanmış bireylere göre yüksek oranda mesane kanseri geliştirici bir risk faktörü olduğu ifade edilmiştir. Ancak lojistik regresyon analizleri sonucu varyant alel ile sigara kullanımı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olmadığı da belirtilmiştir. Sigara kullanan kişilerde DNA çift zincir kırıkları (DSB: “Double Strand Break”) tamirinde görevli genlerden XRCC1’in 194. kodonundaki varyant alelin düşük, nükleotid eksizyonu tamir (“Nucleotide Excision Repair”) geni XPD’deki 751. kodon homozigot varyant alelinin ise yüksek mesane kanseri riski ilişkisi belirttiği ortaya koyulmuştur (Andrew vd., 2006). Kolorektal kanserlerde RAF1 3’UTR SNP taraması yapılmış bir hasta-kontrol çalışmasında her iki grupta sigara kullanımı, cinsiyet ve vücut-kitle indeksi değişkenleri için risk oluşturuvcu özgün bir varyasyon bulunamamıştır (Azimzadeh vd., 2011). Yine 20 gende SNP taraması yapılarak sigara kullanımının mesane kanseri geliştirmede risk faktörü olduğu, ancak yaş ve cinsiyet dahil edildiğinde herhangi bir anlamlılık ifade etmediği gösterilmiştir (Teo vd., 2011).

1.4. MikroRNA ve Mesane Kanseri

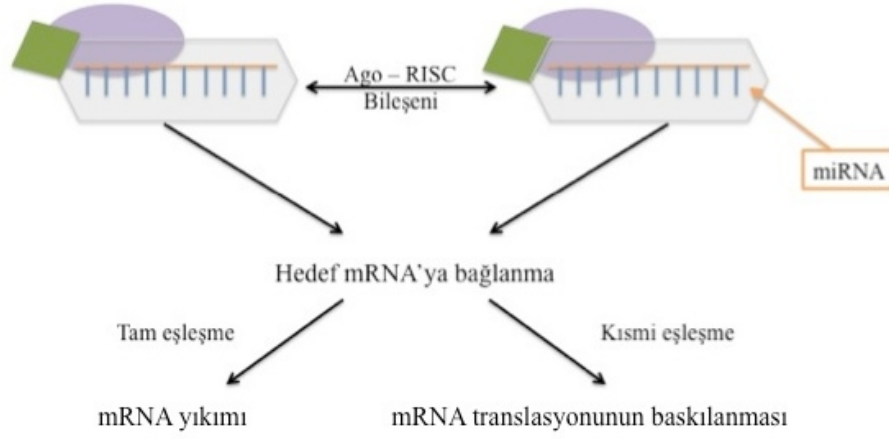
MikroRNA’lar (miRNA) ortalama 22 nükleotid uzunluğunda ve gen ifadelenmesini baskılayan tek zincirli moleküllerdir. Bu endojen yapılar, bakterilerden bitki ve memelilere; hücre proliferasyonundan hücre ölümüne kadar geniş bir alanda etkilidirler. Bitkilerde yaprak ve çiçek, sineklerde yağ metabolizması, nematodlarda nöron, hayvanlarda kas ve eşey hücre gelişimi ve memelilerde hematopoetik farklılaşımında da düzenleyici rol oynarlar (Bartel, 2009; Stefani ve Slack, 2008; Bushati ve Cohen, 2007; Feng vd., 2011). miRNA’lar intergenik, polisistronik veya intronik bölgelerden kodlanarak olgun hallerine işlenmeye başlarlar. miRNA’lara dair ayrıntılı bilgilere ulaşılmaya başlanması, *C.elegans*’ta kodlanan ve geç larval dönemden yetişkin hücrelere geçiş sürecini uyaran *let-7* ve erken gelişimde larval dönemden başlayıp ikincil sürece girilmesinde görev alan *lin-4*’ün, mutasyonlar sonucu görevlerini yerine getirmelerinin

engellediğinin bulunmasıyla mümkün olmuştur (Wightman vd.,1993; Bartel, 2004). Düzenleyici fonksiyonlarını post-transkripsiyonel olarak hedef mRNA'lara bağlanıp, onların yıkımı veya translasyonlarının baskılanmasıyla gerçekleştiren mikroRNA'lar, bu kararı kök bölge ("seed region") ile hedef mRNA'nın 3' translasyona uğramayan bölgesi (3'UTR) arasındaki eşlenikliğin seviyesine göre verir (Bao vd., 2007; Schaefer vd., 2010). miRNA'lara doku dışında diğer vücut sıvılarından da ulaşılabilmesi, klinik ve teknik tüm yaklaşımlarla, yeni ve invaziv olmayan bir biyomarkör geliştirilebilmesi umudunu ortaya çıkarmıştır.

1.4.1. miRNA'lar, Biyogenezi ve 3'UTR SNP'leri

İlgili genomik bölgelerden RNA pol II aracılığı ile transkripsiyonu gerçekleştiren mikroRNA'lar, pri-miRNA olarak nükleusta bulunur. Klasik bir mRNA gibi, 5' cap ve 3' poliA kuyruğa sahip 500 ila 3000 nükleotid uzunluktaki pri-miRNA dizileri, sap-iplik ("stem-loop") yapılarında katlanmış haldedirler (Schaefer vd.,2010; Ryan vd., 2010). RNaz III endonükleaz DROSHA ve DiGeorge-syndrome critical-region protein 8 (DGCR8) kompleksi, mikroprosesör, intronik miRNA bölgeleri keserek ortalama 70 nükleotidlik saç tokası ("hairpin") şeklindeki pre-miRNA'yı oluşturur (Han et al., 2004; Takane ve Kanai, 2011). 2 nükleotidlik 3'sarkan uç taşıyan pre-miRNA'yı bu bölgesinden tanıyan Exportin-5, RAN GTPaz ile kompleks oluşturarak, nükleustan sitoplazmaya taşınmasını gerçekleştirir (Bushati ve Cohen, 2007; Ryan vd., 2010). Sitoplazmaya geçmiş olan pre-miRNA, bir diğer RNaz III endonükleaz olan Dicer ve kofaktörleri TRBP (HIV-1 trans-activation response-TAR-binding protein) ve PACT ile birleşerek, sap-iplik kısmından ayrıştırılır (Bushati ve Cohen, 2007; Tunali ve Tiryakioğlu, 2010). 20-25 nükleotid uzunluğundaki miRNA/mRNA ikili yapısından rehber dizi "guide strand", miRNA-induced silencing complex (RISC) ve Argonaute 2 (AGO2) kompleksinde gen ifadenmesini düzenleme görevini yüklenirken, diğer dizinin ("passenger strand") yıkımı gerçekleştirilir (Bushati ve Cohen, 2007; Takane ve Kanai, 2011; Feng vd.,2011). RISC ile kompleks halindeki miRNA, hedef mRNA'nın 3'UTR bölgesine gider. miRNA kök bölge ile hedef mRNA 3'UTR arasındaki eşleniklik seviyesine göre farklı yollar aktiflenir (Şekil 1.5). Watson-Crick modeli temelindeki miRNA:mRNA ikili yapıda miRNA, eğer hedef mRNA'nın 3'UTR'sine

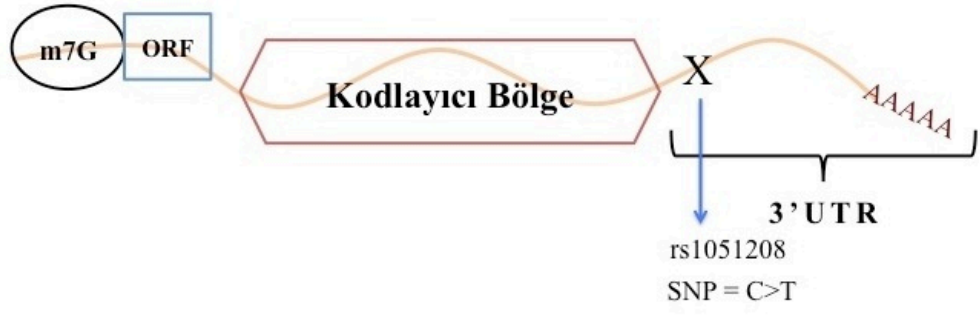
özgünlüğünü güçlendiren tam (7'li ve/veya 8'li) baz eşleşmesini sağlıyorsa mRNA'nın yıkımını, daha az eşleşme yapıyorsa da translasyonunun baskılanmasını düzenler (Taby ve Issa, 2010; Wiemer, 2007).



Şekil 1.5. MikroRNA ve Hedef mRNA Eşleşmeleri

Son yıllarda miRNA'ların kök bölgeleri farklı kanser türlerinin gelişmesinde etkili olabileceği düşünülerek çok sayıda çalışmanın hedefini oluşturmaktadır. Gen ürünü transkripsiyonu, pri-miRNA ve pre-miRNA işlenmesi, miRNA:mRNA eşleşmesi gibi yolakları olumsuz yönde etkileyebilen SNP için yapılan taramalar, özellikle miRNA hedef bölgeleri veya miRNA kök bölgelerindekilere yöneliktir. Hedef mRNA'nın kaderini etkilediği belirlenmiş SNP'ler veritabanlarında biriktirilmektedir. Buralar işlenecek veriler için bir deneysel araştırmanın basamakları şu şekilde ilerler: 1) mRNA:miRNA eşleşmesini belirleyen bu diziler ve hedef gen tahminleri; 2) olgun miRNA dizilerinin belirlenmesi; 3) hedef dizilerdeki SNP'ler ve/veya CNV'lerin tanımlanması; 4) yabancı tip/ varyant alelin Gibbs serbest bağlanma enerjilerinin belirlenmesi (ΔG ve $\Delta\Delta G$); ve 5) polimorfizmlerin etkisinin belirlenmesi. Varyant ve yabancı tip alellerin mikroRNA'ların hedef mRNA 3'UTR bölgesine bağlanma enerjisi (ΔG) ve arasındaki fark ($\Delta\Delta G$), polimorfizmin hedefe bağlanmaya etkisinin ortaya koyulması için önemli bir parametredir. Kansere sebep olan hedef gendeki miRNA bağlanmasını etkileyen SNP, bu çalışma prensibi ile veritabanına işlenip kesinlik kazanır.

Kanserde risk oluşturucu endojen faktör olduğu düşünölen SNP'lerin tespiti ile elde edilmiş en önemli bilgilerden biri, miRNA'ların onkogen ve/veya tümör baskılayıcı genlerin ifadenmesini değiştirmeleridir (George ve Mittal , 2010). 2008 yılında sigara kullanan akciğer kanserli hastalarda let-7 miRNA'sının hedef genlerinden KRAS'ın mRNA 3'UTR SNP'sinin yüksek hastalık riski oluşturduğu ortaya koyulmuştur (Chin vd., 2008). Mesane kanserinde mRNA:miRNA bağlanma polimorfizmi ortaya koyan ilk çalışma ise 2011 yılında Teo ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir (Teo vd., 2011). Yüksek dereceli mesane karsinogeneziyle ilişkilendirilmiş ve miR-145'in hedef mRNA'larından PARP1 genindeki rs8679 mRNA 3'UTR SNP'si için CC ve CT genotiplerine sahip hastalarda bağlanmanın engellendiği, sonucunda da varyant PARP1 profilinin hücrede risk artırıcı faktör olduğu gösterilmiştir. HOXB5 geni 3'UTR 1010 A>G polimorfizmi taranmış mesane kanserli hastalarda AG+GG genotipi taşıyanların risk oluşturduğu ve G aleline sahip kişilerde miR-7 bağlanmasının engellenerek mesane karsinogenezi ve proliferasyonuna yol açtığı belirlenmiştir (Luo vd., 2012). Kolorektal kanserde incelenmiş RAF1 rs1051208 c.*266C>T SNP'sinde varyant T alelinin kadınlarda hastalık riskiyle ilişkili olduğu (p=0,032; OR=0,62; %95 CI=0,401-0,96), ancak Bonferroni doğrulama testiyle bunun istatistiksel bir anlamlılık teşkil etmediği gösterilmiştir (Azimzadeh vd., 2011). Gibbs serbest enerjisinin 2,8 kJ/mol'den büyük olması koşulunu sağlamış RAF1 rs1051208 c.*266C>T polimorfizmi, RAF1 mRNA 3'UTR bölgesinde bulunan ve miR-213'ün de bağlanmasını etkileyen bir SNP'dir (Landi vd., 2008). RAF1 rs1051208 için mikroRNA veritabanları araştırıldığında bu bölgeye hedef 3 mikroRNA daha görölmektedir: hsa-miR-186 (MI0000483), hsa-let-7i-3p (MI0000434) ve hsa-miR-5589-3p (MIMAT0022298). C ve T aleli taşınması durumuna göre bu mikroRNA'lar için eşleşme özgünlüğu Şekil 1.6'da gösterilmiştir. Henüz bu polimorfizm için mesane karsinogenez ve progresyonuna etkileri belirlenmemiş bu mikroRNA'ların, RAS/RAF1/MAPK yolağında ne tip bir katılımcı etkisi olduğu yukarıda bahsedilen SNP tarama basamaklarını içeren araştırmalar ile ortaya koyulabilir.



Lokasyon: 12625747

hsa-miR-186 için hedef bölgesi cccatgctcaaGGCCCAGccttctgtagatgcgcaagtggatg

hsa-let-7i-3p için hedef bölgesi

tagaTGCGCAAgt

ise *hsa-miR-5589-3p* için hedef bölgesi:

tagATGTGCAagt

Şekil 1.6. RAF1 mRNA ve Hedef mikroRNA'ları

2. AMAÇ

Mesane kanseri dünyada olduğu gibi ülkemizde de ileri yaşlarda ve çevresel maruz kalımlardan etkilenecek şekilde ortaya çıkan kanser türlerindedir. Ailesel geçişlerin yanı sıra sonradan kazanılmış somatik mutasyonlar da karsinogenez sürecini hızlandıran ve prognoza etkiyen endojen faktörlerdir. Hücre büyümesi, bölünmesi ve farklılaşması süreçlerinde görev alan moleküler yapılarda meydana gelen özgün mutasyonların birikerek kanserleşme yönünde bir kuvvet oluşturması da hastalığın ağır seyrine yol açar.

RAS/RAF1/MAPK sinyal yolağı birçok kanserde olduğu gibi mesane kanserinde de sıklıkla protein ve ilgili gen mutasyonları bakımından ele alınan önemli bir hücre büyüme ve bölünmesi yolağıdır. Bu sinyal yolağında farklı basamaklarda görevleri bulunan FGFR3, TP53 ve RB proteinlerinin mutant oluşu mesane kanserinin iki farklı yoldan ilerleyişine yol açar. Son yıllarda da RAS ve RAF gen mutasyonlarının ürotelyal kanserlerde tümörlerin invaziv ve papiller karsinomaya ilerlemesinde etkin rol oynadıkları ortaya koyulmuştur ve bu genlerdeki mutasyon, polimorfizmler ile ifade araştırmaları yoğunluk kazanmıştır. Buna ek olarak, RAF1 genindeki rs1051208 polimorfizminin RAF1 mRNA 3'UTR bölgesindeki miR-213 bağlanma bölgesinde yer alan bir SNP olduğu gösterilmiştir.

Bu tez kapsamında, henüz mesane kanseriyle ilişkisi araştırılmamış olan rs1051208 c.*266C>T polimorfizminin Türk mesane kanseri hastalarında ve sağlıklı bireylerde taranarak hastalık riski ile ilişkilendirilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla sağlıklı kontrol grubu ve farklı derece ve evrelerde mesane tümörü tespit edilmiş hastaların bu polimorfizm açısından genotipleri belirlenecek ve polimorfizmin mesane tümörü riskine katkısı, bireylerin cinsiyet ve sigara kullanım bilgileri ile birlikte değerlendirilecektir. Polimorfizmin hastalık riski teşkil ettiği belirlendiği takdirde, elde edilen bulgular mesane tümörlerinin teşhis ve tedavisine yönelik yeni çalışmalara yön verecektir.

3. GEREÇLER

3.1. Deneydeki Örnekler

Deneydeki hasta grubu örnekleri ve patolojik bilgileri Türkiye'nin farklı coğrafi bölgelerinden 2008-2012 yılları arasında İstanbul'daki farklı hastanelere başvuran ve klinik ve patolojik olarak mesane kanseri tanısı koyulan 189 bireyden oluşturulmuştur. Hastalardan EDTA'lı tüplere alınan 10ml kan DNA izolasyonu yapılmak üzere buz içerisinde laboratuvara taşınmış ve işlem yapılana kadar +4°C'de saklanmıştır.

Hasta bilgileri sigara ve alkol kullanımı, kullanılıyorsa miktarı, süresi, meslek, yaş, cinsiyet ve doğum yerini içermektedir. Çalışmada 189 hasta vardır ve her birine gönüllü onay formu doldurtulup, bilgilendirilmeleri gerçekleştirilmiştir. Deneydeki kontrol grubunu kendisinde ve ailesinde kanser öyküsü bulunmayan 278 birey oluşturmaktadır. Bu bireylerden steril pamuklu çubuk yardımıyla yanak içi epitel hücreleri toplanmış ve DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

Bu araştırmada kullanılan örneklerin toplanması için Haliç Üniversitesi İnsan Araştırmaları Etik Kurulu'ndan onay alınmış ve bireyler hasta/sağlıklı gönüllü onam formları ile bilgilendirilerek rızaları alınmıştır. Örnek sahiplerinin yaş, cinsiyet, doğum yeri, meslek, sigara ve alkol kullanımı, kullanılıyorsa miktarı, süresi, metabolik hastalıkların varlığı, tansiyon ve diyabet bilgileri sorgulanmıştır.

3.2. Kimyasallar

Deneydeki tüm katı ve sıvı kimyasal malzemeler moleküler biyoloji standardında olup SIGMA ve MERCK markalarına aittir.

3.3. Tamponlar, Solüsyonlar ve Enzimler

3.3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Tamponları ve DNA Polimeraz Enzimleri

10X MgCl ₂ 'süz Tampon	: 200mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 750mM Tris-HCl (pH 8.8) %0.1 Tween 20
MgCl ₂	: dH ₂ O'da 25 mM
Deoksiribonükleotidler(dNTP)	: 100mM dATP, dCTP, dGTP ve dTTP
Taq DNA Polimeraz	: Rekombinant Taq DNA Polimeraz Fast Start Taq DNA Polimeraz

3.3.2. Restriksiyon Enzimleri ve Reaksiyon Tamponları

HhaI	: 10 U/µl
Reaksiyon Tamponu	: 1X Thermo Scientific Tango Buffer 33mM Tris-HCl (pH7.9), 1.0mM MgCl ₂ , 66 mM KCl, 0.1 mg/ml BSA
Tanıma Dizisi	: 5' G [^] CGC 3' 3' CGC [^] G 5'

3.3.3. Elektroforez Tamponları ve Jel Sistemleri

10X TBE (Tris-Borik Asit-EDTA)	: 890mM Tris-Base, 890 mM Borik Asit, 20 mM Na ₂ EDTA
--------------------------------	--

10X Bromfenol Mavisı (BPB)	: 2.5 mg/ml BPB
Etidyum Bromid (EtBr)	: 10mg/ml
%1 veya %2'lik Agaroz jel	: 0.5 X TBE tamponda %1 veya %2'lik (w/v) agaroz

3.3.4. Oligonükleotid Primerler

RAF1 F: 5' ATATCAATGCTTGCACGCTG 3'

RAF1 R: 5' CCAAAATCCATGTGTCTCC 3'

3.3.5. DNA Büyüklük Markörleri

GeneRuler 50bç DNA Markörü : 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 baz çiftlik fragmentler içeren DNA markörü

GeneRuler 100bç DNA Markörü : 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 baz çiftlik fragmentler içeren DNA markörü

3.3.6. Cihazlar

Otoklav : Dik Tip otoklav (BES, Türkiye)

Tartılar : Hassas Terazi, XB 220 A (Presica, İsviçre), Terazi, KB 400-2 (Kern, Almanya)

Santrifüjler : Mikrosantrifüj, MiniSpin Plus (Eppendorf, Almanya)

Derin dondurucular	: -20°C, 2021 D (Arçelik, Türkiye), -20°C, GSD26410N (Bosch, Almanya)
Elektroforez Sistemleri	: Flowgen (İngiltere), Sub-Cell GT (Bio-RAD, İtalya)
Isı Bloğu	: DB 2D (Techne, İngiltere)
Güç Kaynakları:	:EPS 301 (Amersham Pharmacia Biotech (İsveç)
Manyetik Karıştırıcılar	: MR3001 (Heidolph, Almanya)
Buzdolapları	: Beko 8742, Arçelik 3061 Plus (Türkiye)
Thermo-Cyclers	: Techne TC-512
Vorteks	: Heidolph REAX (Almanya)
Su banyosu	: Nüve BM 402 (Türkiye)
Su Arıtma Sistemi:	: Millipore Milli Q Synthesis A10 (Fransa)

3.3.7. RGDE Metodunda Kullanılan Tampon ve Solüsyonlar

Hücre Lizis Tamponu (pH 8.0)	: 10mM/L Tris-HCl, %11 (w/v) Sükroz, 5mM/L MgCl ₂ , %1 (w/v) Triton X-100
Hücre Çekirdeği Lizis Tamponu (pH 8.0)	: 10mM/L Tris-HCl, %1 (w/v) SDS, 10mM/L EDTA, 10mm/L Sodyum

Sitrat

Sodyum Klorür (NaCl)

: dH₂O'da 5M

Kloroform (CHCl₃)

: Saf kloroform (%100)

İzopropanol (C₃H₈O)

: Saf izopropanol (%100)

TE tamponu

: 20mM Tris-HCl (pH 8.0),
0.1 mM EDTA (pH 8.0)

4.YÖNTEMLER

4.1. RGDE Metodu ile Periferal Kandan Hızlı Genomik DNA İzolasyonu

EDTA'lı tüplerde saklanan kan örneklerinden 500µl alınarak 1.5 ml'lik eppendorf tüpe aktarılır. Üzerinde 1000µl hücre lizis tamponu eklenip tüp hafifçe çalkalanarak tampon ile kanın karışması sağlanır. 6000rpm'de 2 dakika santrifüj edilip supernatant atılır. Pellet 1000µl hücre lizis tamponu ile tekrar çözülür ve 6000rpm'de 2 dakika santrifüj edilir. Bu işlemler kremi bir pellet elde edilene kadar tekrar edilir. Pelletin üzerine 300µl hücre çekirdeği lizis tamponu eklenerek pelletin çözülmesi sağlanır. 100 µl 5M NaCl ve 600 µl kloroform eklenerek tüp hafifçe çalkalanır. 6000rpm'de 2 dakika santrifüjün ardından tüpte iki faz gözlenir; alt organik faza karıştırmadan, üst faz bir mikropipet yardımıyla dikkatle alınıp yeni bir eppendorf tüpe aktarılır. Üzerine 600 µl izopropanol eklenip tüp hafifçe birkaç kez çevrilir. Bu aşamada DNA gözle görülür bir hale gelecektir. DNA'yı çöktürmek amacıyla tüp 13000rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek süpernatant atılır. 10-15 dakika oda sıcaklığında kurumaya bırakılır. Kuruyan DNA üzerine 50-100 µl TE tampon eklenip çözülmesi sağlandıktan sonra +4°C veya -20°C'ye kaldırılır.

4.2. Yanak içi Epitel Dokudan DNA İzolasyonu

Yanak içi epitel hücreler, steril pamuklu çubuğun ("buccal swab") her iki yanak içine sürülmesi ile elde edilir. Pamuklu çubuklar 600µl hücre lizis tamponu içeren 1.5ml'lik tüpe yerleştirilir. 50µl 10mg/ml Proteinaz K ile 55°C'de 30 – 60 dakika arası inkübe edilir. Üzerine 300 µl Fenol, 600 µl Kloroform eklenip, 12000g'de 2 dakika santrifüj edilir. Oluşan üç fazdan aköz faz, interfaz ile karıştırılmadan yeni bir tüpe aktarılır. Yeni tüpteki aköz fazın hacmine eş hacimde kloroform:izoamilalkol (24:1) (CHCl₃: IAA) eklenip 12000g'de 2 dakika santrifüj edilir. Aköz faz tekrar yeni bir tüpe aktarılarak 1/10 hacminde 3M NaOAc (Sodyum

Asetat) eklenip karıştırılır. Toplam hacmin 0.6'sı kadar (0.6 X) %100 izopropanol eklenip -20°C'de gece boyu (16 saat) presipitasyona bırakılır. Gece boyu presipitasyon sonrası tüpler 12000g'de 10 dakika santrifüjlenerek DNA çöktürülür ve DNA pelleti 500µl %70 EtOH içinde 12000g'de 5 dakika santrifüjlenerek yıkanır. Süpernatant atıldıktan sonra tüpler 10-15 dakika kurumaya bırakılır. DNA 50 µl Low-TE tamponu eklenerek oda sıcaklığında 2-3 gün çözülür ve bu şekilde +4°C'de saklanabilir.

4.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Bir PZR reaksiyonunda çift zincirli DNA molekülünde ilgilenilen gen bölgesi, farklı sıcaklıklardaki döngülerin tekrarı boyunca uygun primer çiftleri ile çoğaltılmaktadır. Reaksiyon gerçekleşen tüpün içeriği çoğaltılacak DNA, hedef bölgeye özgün ileri ve geri primer çifti, reaksiyon tamponu, MgCl₂, dNTP'ler ve Taq Polimeraz enzimi şeklindedir. Bir PZR süresince her bir döngüde üretilen ürün, bir sonraki döngüde kalıp görevi görür ve üstel olarak artarak belirlenen döngü sayısı sonucunda hedef diziden fazla miktarda elde edilmiş olur. Primerlerin kalıp DNA üzerine bağlanıp, enzim aktivitesini artırıcı Mg⁺² iyonları yardımıyla Taq polimerazın ortamdaki dNTP'leri kalıptan çoğaltılan bu yeni zincire eklemesi ile DNA sentezi gerçekleştirilir. Çalışmada kullanılan PZR bileşenleri Tablo 4.1'de, döngü koşulları ise Tablo 4.2'de belirtilmiştir.

Tablo 4.1. PZR Bileşenleri ve Miktarları

PZR İçeriği	Miktar (Stok konsantrasyon)
10X Tampon (NH₄)₂SO₄	2.5 µl (10X)
MgCl₂	3 µl (25 mM)
dNTP	2 µl (5mM)
Primer Çifti	1'er µl (12.5 pmol/ µl)
Taq Polimeraz	0.2 µl (5U/µl)
DNA	0.5-15 µl (100ng)
Toplam hacim	25 µl

Tablo 4.2. RAF1 PZR Koşulları

PZR Koşulları	RAF1
Başlangıç Denatürasyonu	94°C; 5 dakika
Denatürasyon	94°C; 30 saniye
Bağlanma	60°C; 45 saniye
Uzama	72°C; 30 saniye
Son Uzama	72°C; 5 dakika
Döngü Sayısı	30

4.4. Restriksiyon Reaksiyonları

Bakterilerde hücre içine giren yabancı bir DNA'nın ve belirli bakteriyofajların tanınıp parçalanmasında görevli endonükleazlar DNA'yı belirli diziden tanıyıp şeker fosfat bağı kırarak keser. Endonükleazlar DNA'yı 4-6 baz çiftlik dizilerden tanıyıp asimetrik veya simetrik olarak keserler. Asimetrik kesilmelerde yapışkan uçlar oluşur ve bu uçlar tekrar birleşebilir; ancak simetrik kesilmelerde küt uçlar oluşur ve DNA parçaları tekrar birleşemez. Tanıma bölgesine bir kaç baz uzaklıktan kesim yapan endonükleazlar genetik araştırmalarda mutasyon ve polimorfizm taramalarında kullanılır ve bu metod Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) olarak adlandırılır. Bir restriksiyon enzimi reaksiyonunda, enzim için tanıma bölgesi oluşturan veya tanıma bölgesini yok eden polimorfizm veya mutasyon *in vitro* olarak endonükleazlarca belirlenebilmektedir.

PZR ile çoğaltılan ilgili gen bölgesi, restriksiyon enzimi, enzim tamponu ve su ile, enzim aktivitesi için optimum bir sıcaklıkta reaksiyona sokulur. Reaksiyondaki enzim miktarı kullanılan DNA miktarına göre ayarlanır. Enzim ve DNA miktarı reaksiyon süresini etkiler; aşırı yüksek konsantrasyonda enzim kullanılması spesifik olmayan kesimlere ve enzimin bozulmasına yol açarken, düşük konsantrasyonda enzim ise düşük enzim aktivitesine ve reaksiyon süresinin uzamasına yol açar. Çalışmada kullanılan restriksiyon enzimi ve reaksiyonun koşulları Tablo 4.3'te, kesim sonrası oluşan bant uzunlukları Tablo 4.4.'te belirtilmiştir.

Tablo 4.3. rs1051208 RFLP Reaksiyonu Koşulları

Restriksiyon Enzimi	Tampon	İnkübasyon Süresi	Sıcaklık
<i>HhaI</i> , 0.5 µl	10x Buffer C, 2.0 µl 100x BSA, 0.2 µl	2 saat 30 dakika	37°C

Tablo 4.4. rs1051208 RFLP Fragmanları

Gen	SNP	Kesim enzimi	PZR	Fragmanlar
RAF1	rs1051208 c.*266C>T	<i>HhaI</i>	441 bç	CC: 318 , 123 bç CT: 441, 318, 123 bç TT: 441 bç

4.5. Agaroz Jel Elektroforezi

DNA bantlarının boylarına göre ayırt edilmesini sağlayan jel elektroforezlerinde temel prensip, uygun bir tampon içerisindeki jele yüklenen DNA'nın, iskeletindeki negatif yüklü fosfat grupları nedeniyle negatif elektrottan (katot) pozitif elektrota (anot) göç etmesi ve bantların etidyum bromid veya gümüş boyama ile gözle görülebilir hale gelmesidir. Agaroz jel elektroforezinde DNA'nın moleküler ağırlığına göre farklı agaroz konsantrasyonlarında farklı ayırt edilmesini sağlar. Yüksek konsantrasyonlar kısa parçaların ayırımında tercih edilir. %2'lik jel hazırlanması için 60 µl 0.5X TBE tamponunda 1.2g agaroz çözündürülüp kaynatılır ve solüsyona 1.8 µl 10mg/ml EtBr eklenerek sıcaklık 50°C'ye düşürülür ve jel kasetine dökülür. Taraklar yerleştirilip polimerizasyon için soğumaya bırakılan jel daha sonra içerisinde yine 0.5X TBE tampon bulunan yatay jel elektroforez tankına yerleştirilir, taraklar buradayken alınır ve kuyucuklara da tampon dolması sağlanır. İzole edilen DNA örnekleri, PCR ürünleri ve RFLP reaksiyonu örnekleri BPB yükleme boyası karıştırılarak kuyucuklara mikropipetlerle yüklenir. 120V elektrik akımında 20-25 dakika süresince DNA'nın anoda yürümesi gerçekleştirilir. Elektroforez sonucunda DNA bantları UV ışık altında gözlenir. Deneydeki PZR

örnekleri ve restriksiyon enzim kesim ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütülmüş, EtBr ile boyanmış ve UV altına gözlemlenmiştir.

4.6. PZR Saflaştırma ve Dizi Analizi

DNA bazlarının her biri, farklı floresan boyalar ile işaretlenerek kapiller bir sistemden geçirilir. Enzimatik sentez yöntemi ile gerçekleştirilen otomatik dizi analizi sisteminde, floresan işaretli boyalar bir lazer tarafından uyarılıp, yaydıkları ışıkların bir CCD kamerada toplanması ile, her bir boyanın temsil ettiği baz tek seferde ayırt edilir. Floresan miktarı ve ölçümü sonrasında DNA örneklerindeki baz dizileri belirlenir.

Dizi analizleri yapılacak PZR ürünleri, High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) ile saflaştırılmıştır. 50 µl PZR ürünü, 250µl bağlanma tamponu ile 1 dakika maksimum hızda santrifüj edilir. Süpernatant atılarak 250µl yıkama tamponu eklenip, 13000g'de 1 dakika santrifüj edilir. Süpernatant atılarak 200µl yıkama tamponu ile 13000g'de 1 dakika santrifüj edilir. Süpernatant atıldıktan sonra filtreli tüp, kapağı kesilmiş bir Eppendorf tüpe yerleştirilir ve üzerine 50µl elüsyon tamponu eklenip, 13000g'de 90 saniye santrifüj edilir. Eppendorf tüpteki saflaştırılmış DNA 0,5'lik Eppendorf tüplere aktarılarak dizi analizi için hazırlanmış olur.

4.7. İstatistiksel Analizler

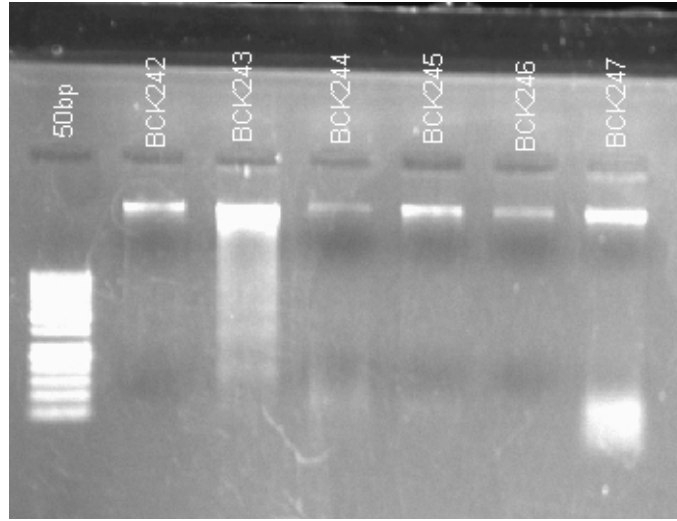
Çalışmaya dahil edilen hasta ve kontrol gruplarında tespit edilen genotip verileri SPSS 15.0 ve PLINK programları ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Hasta ve kontrol gruplarının dengeli bir popülasyon oluşturup oluşturmadığı Hardy Weinberg Denge (HWD) testiyle incelenmiştir. Cinsiyetin ve sigara kullanımının hastalıkla ilişkisi X^2 bağımsızlık testi ile incelenmiştir. Hasta ve kontrol grupları genotiplerine ve sigara kullanımlarına göre ayrıca sınıflandırılarak belli bir genotipteki bireylerin sigara kullanımına göre hastalık riskleri de lojistik regresyon analizi ile değerlendirilmiştir. rs1051208 polimorfizminin hastalıkla koruyucu veya risk oluşturucu eğilimi, HWD'nin sağlanmasını gerektirmeyen Aditif Genotipik Model ile hem Lojistik Regresyon hem de Cochran-Armitage Trend Testi (CATT) ile hesaplanmıştır (Freidlin vd., 2002). Varyantın alelinin bir kopyasının koruyucu

veya risk yönünde eğilime etkisini görmek amaçlı kodominant, dominant ve resesif model lojistik regresyon testleri uygulanmıştır (Slager ve Schaid, 2001). Erken evre ve ileri evre tümörler gruplanarak aditif, dominant ve resesif model CATT analizine tabi tutulmuş ve ileri evre tümör oluşumu ile genotip ilişkisi araştırılmıştır. Tüm analizlerde istatistiksel anlamlılık sınırı $p < 0.05$ kabul edilmiştir.

5. SONUÇLAR

5.1. DNA İzolasyonu

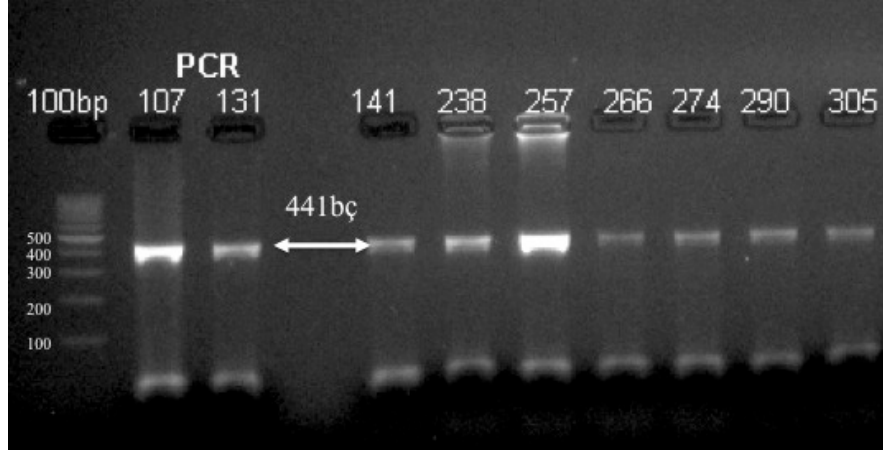
Mesane kanseri hastalarının kan örneklerinden, sağlıklı bireylerin ise yanak içi epitel doku hücrelerinden izole edilmiş DNA'lar %1'lik agaroz jele 1µl miktarda yüklenip, 15 dakika yürütülerek kalitatif ve kantitatif analizleri yapılmıştır (Şekil 5.1.).



Şekil 5.1. DNA İzolasyonlarının %1'lik Agaroz Jelde Görüntülenmesi

5.2. RAF1 Geninin PZR ile Çoğaltılması

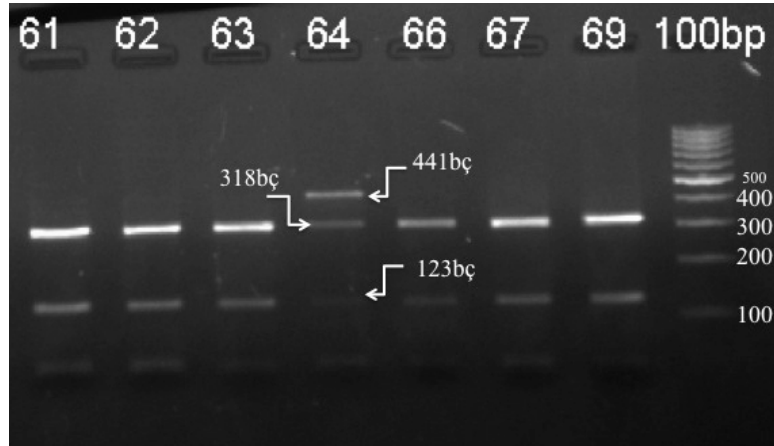
3291 aminoasit kodlayan 3p25 lokasyonlu RAF1 geninde 3' translasyon terminasyon kodonu 266. nükleotidindeki C>T dönüşümünü belirlemek üzere 441bç'lik bölge PZR ile çoğaltılarak %2'lik agaroz jele 8µl yüklenip, 20 dakika yürütülerek görüntülenmiştir. Bant boyları 100bç ve 50bç DNA markörleri ile değerlendirilmiştir (Şekil 5.2.).



Şekil 5.2. PZR Ürünlerinin %2'lik Agaroz Jelde Görüntülenmesi

5.3.PZR Ürünlerinin Restriksiyon Analizi

Çoğaltılan ilgili RAF1 gen lokusu, c.*266C>T (rs1051208) tek nükleotid polimorfizmi analizi için *HhaI* restriksiyon enzimi ile muamele edilmiştir. Bant boyları 100bç ve 50bç DNA markörleri ile %2'lik agaroz jelde 25 dakika yürütülerek değerlendirilmiştir (Şekil 5.3.).

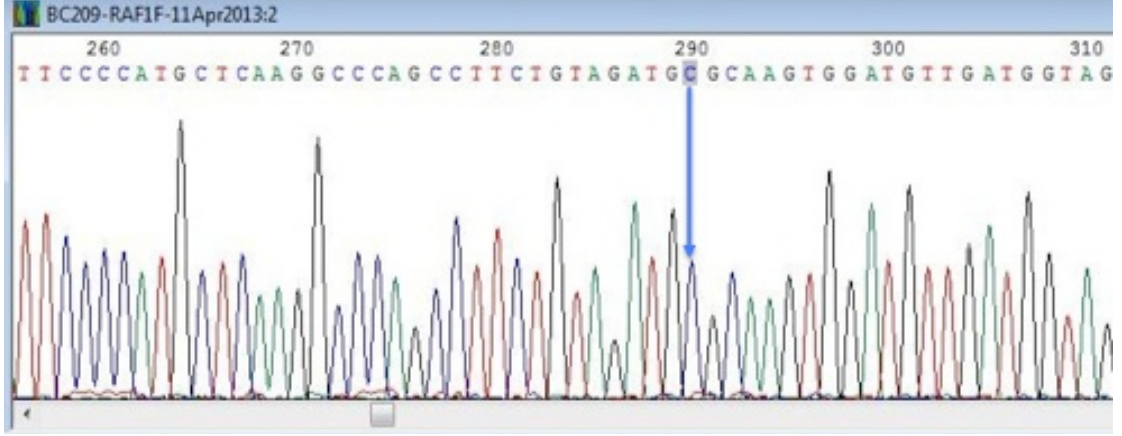


Şekil 5.3. *HhaI* Kesimlerinin %1'lik Agaroz Jelde Görüntülenmesi

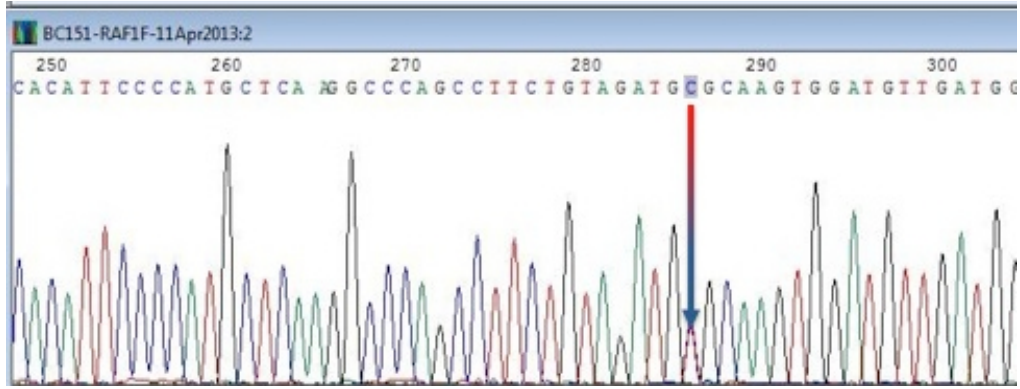
5.4. PZR Ürünlerinin Dizi Analizi

Restriksiyon analizi ile belirlenen genotiplerin doğrulanması amacıyla her üç genotipten DNA örnekleri PZR sonrasında saflaştırılıp dizi analizine tabi

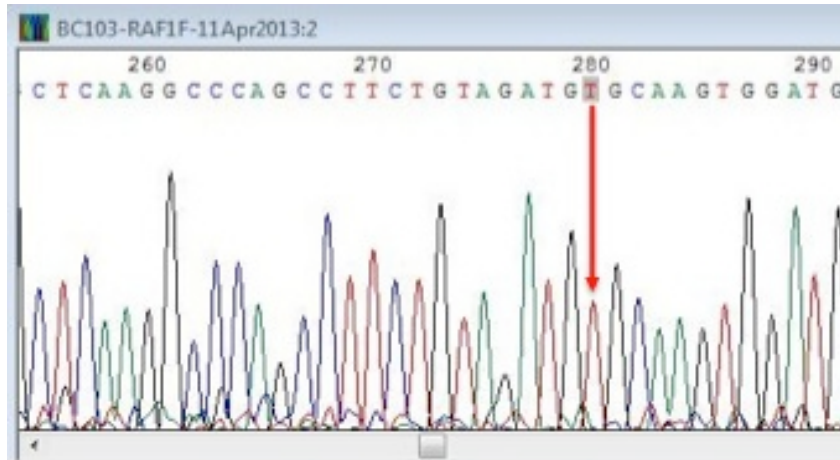
tutulmuştur. Dizi analizi reaksiyonları IONTEK A.Ş. (İstanbul, TÜRKİYE) tarafından gerçekleştirilmiştir (Şekil 5.4., 5.5. ve 5.6.).



Şekil 5.4. rs1051208, CC Genotipi Dizi Analizi (GCG)



Şekil 5.5. rs1051208, CT Genotipi Dizi Analizi (GCG/GTC)

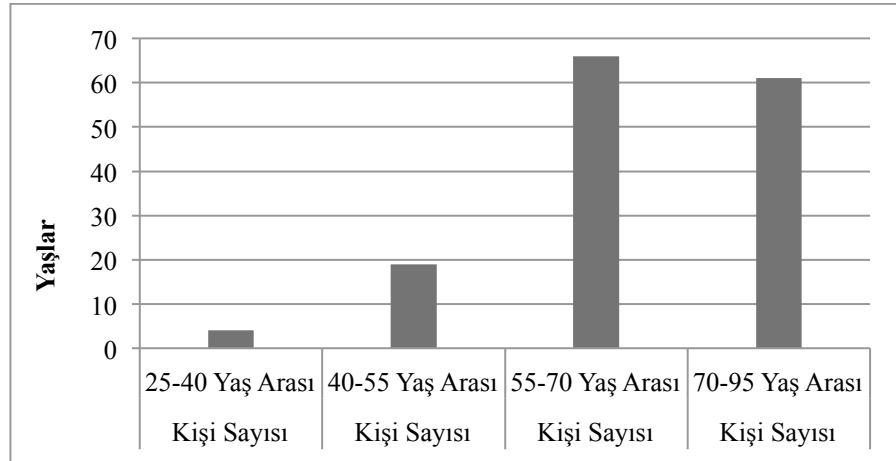


Şekil 5.6. rs1051208, TT Genotipi Dizi Analizi (GTG)

5.5. Hasta ve Kontrol Grupları Cinsiyet, Yaş ve Sigara Kullanım Verileri

Çalışmaya 278 sağlıklı birey ve 189 mesane kanseri hastası olmak üzere toplam 467 birey dahil edilmiştir. Bireyler yaş, cinsiyet, sigara kullanımı, meslek, aile öyküsü yönlerinden değerlendirilmiştir. Bu bilgilere ek olarak mesane kanseri hastaları tümör evre ve derecesi bilgileriyle de sınıflandırılmıştır.

189 mesane kanseri hastasının %16.1'i kadın, %80.9'u erkektir. Hastaların yaşları 25 ile 95 yaş arası değişmektedir ve ortalaması 68 yaşdır. 150 mesane kanseri hastasının % 2,7'si 25–40 yaş, %12,7'si 40–55 yaş, % 44'ü 55–70 yaş ve %40,6'sı 70–95 yaş arasındır (Şekil 5.7.). Sigara kullanım bilgileri verilmiş 134 mesane kanseri hastasının 104'ü (%79) sigara kullanmaktayken, 30'i (%21) hiç kullanmamıştır.



Şekil 5.7. Hasta Grubu Yaş Dağılımları

278 sağlıklı kişinin %30'u kadın, %70'i erkektir. Bilgisi verilmiş 245 kişinin yaş ortalaması 61 yaşdır. Sigara kullanım bilgileri verilmiş 242 sağlıklı kişiden 106'si (%44) sigara kullanmaktayken, 136'i (%56) kullanmamaktadır.

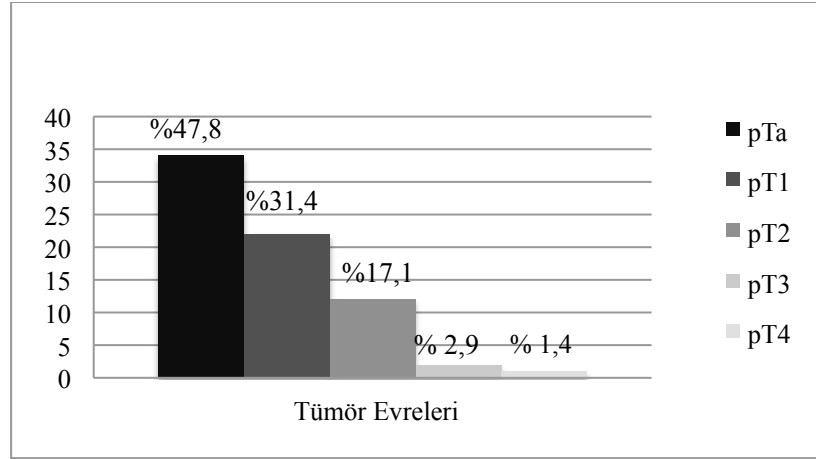
5.5.1. RAF1 rs1051208 Polimorfizmi Hasta Grubu Genotip Verileri

Mesane kanseri hastalarının genotip dağılımları Tablo 5.1'de gösterilmiştir. 189 mesane kanseri hastasından 145'i (%76,7) CC, 43'ü (%22,7) CT ve 1'i (%0,53) TT genotipinde bulunmuştur (Tablo 5.1.).

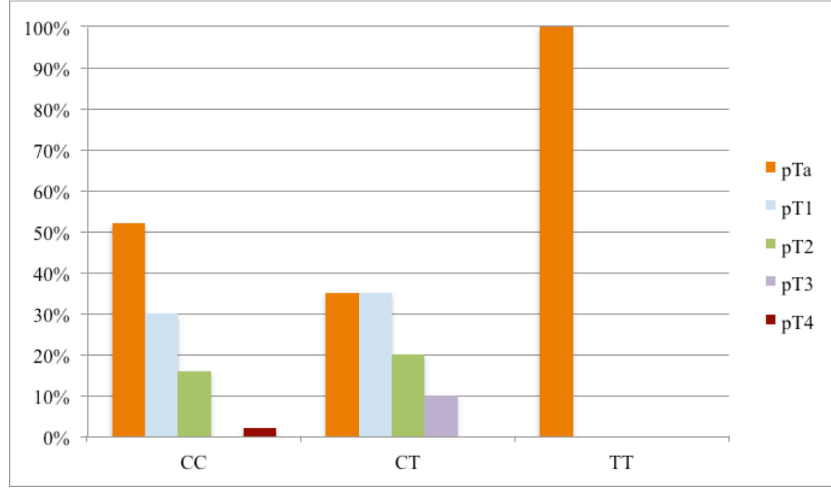
Tablo 5.1. Hasta Grubu Genotipleri

Genotip	CC	CT	TT	Toplam
n (%)	145 (76,7)	43 (22,7)	1 (0,53)	189

PZR ve RFLP çalışmaları yapılmış 189 mesane kanseri hastasından 71 tanesinin tümör evre bilgileri mevcuttur. Tümörlerin 34'ü (%47,8) pTa, 22'si (%31,4) pT1, 12'si (%17,1) pT2, 2'si (%2,9) pT3 ve 1'i (%1,4) pT4'tür (Şekil 5.8.). Buna göre, erken evre pTa ve pT1 tümörleri %79, ileri evre olarak kabul edilen pT2, pT3 ve pT4 tümörleri %21 oranındadır. Genotiplerine göre tümör evreleri Tablo 5.2. ve Şekil 5.9.'da, tümör evrelerine göre genotipler ise Tablo 5.3. ve Şekil 5.10.'da gösterilmiştir.

**Şekil 5.8.** Tümör Evreleri Dağılımı**Tablo 5.2.** Genotiplere Göre Tümör Evreleri

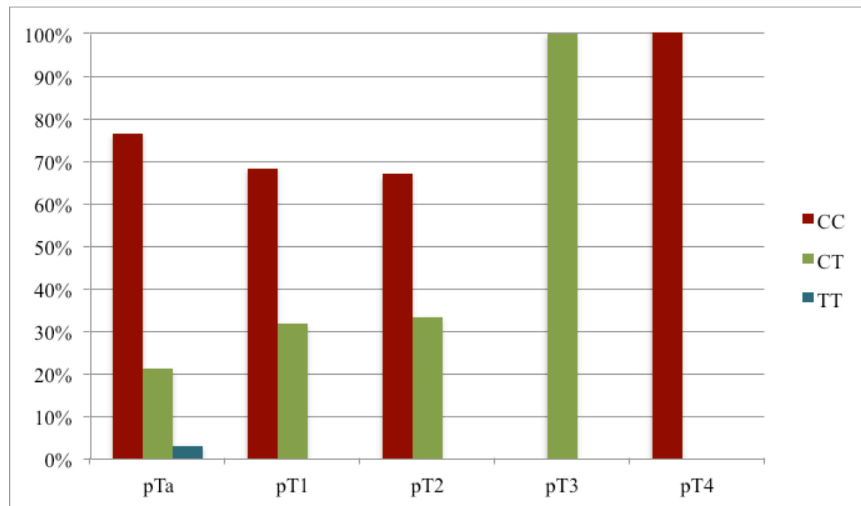
	pTa n (%)	pT1 n (%)	pT2 n (%)	pT3 n (%)	pT4 n (%)	Toplam, n
CC	26 (52)	15 (30,6)	8 (16,3)	0	1 (2)	50
CT	7 (35)	7 (35)	4 (20)	2 (10)	0	20
TT	1 (100)	0	0	0	0	1
Toplam, n (%)	34 (%47,8)	22 (%31,4)	12 (%17,1)	2 (%2,9)	1 (%1,4)	71



Şekil: 5.9. Genotiplerin Tümör Evrelerinde Oranları

Tablo 5.3. Genotiplerin Tümör Evrelerine Dağılımı

	CC n (%)	CT n (%)	TT n (%)	Toplam
pTa	26 (%76,4)	7 (%21,21)	1 (%3,03)	34 (%47,8)
pT1	15 (%68,19)	7 (%31,81)	0	22 (%31,4)
pT2	8 (%66,7)	4 (%33,3)	0	12 (%17,1)
pT3	0	2 (%100)	0	2 (%2,9)
pT4	1 (100)	0	0	1 (%1,4)
Toplam	50 (%70,4)	20 (%28,6)	1 (%1,4)	

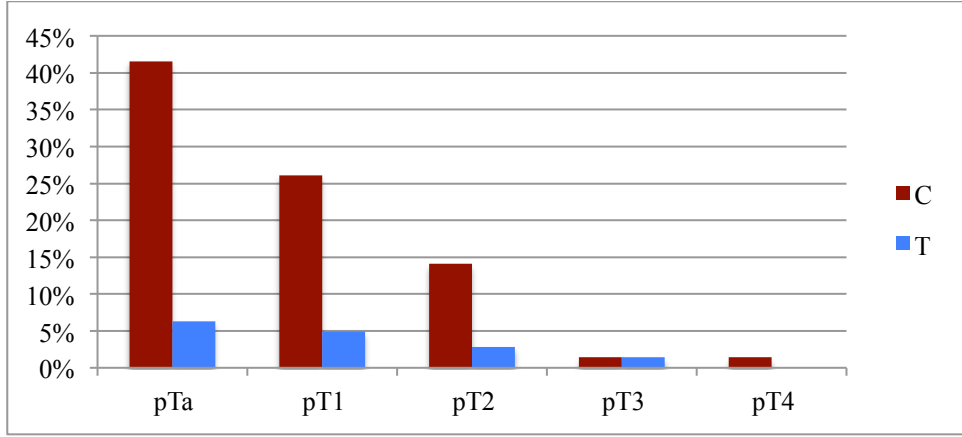


Şekil 5.10. Tümör Evrelerinde Genotip Oranları

Tümör evreleri ve genotiplerinden alel frekansları hesaplanmış ve araştırılan rs1051208 SNP'sinde atasal alel olarak bilinen C aleli yüksek oranda bulunmuştur. Risk aleli olduğu düşünülen T aleli oldukça düşüktür (Tablo 5.4. ve Şekil 5.11.).

Tablo 5.4. Farklı Tümör Evrelerinde rs1051208 Alel Frekansları

	pTa n(%)	pT1 n(%)	pT2 n(%)	pT3 n(%)	pT4 n(%)	Toplam n(%)
C	59 (41,5)	37 (26,1)	20 (14,1)	2 (1,4)	2 (1,4)	120 (84,29)
T	9 (6,3)	7 (4,9)	4 (2,8)	2 (1,4)	0	22 (15,71)
						142 (100)



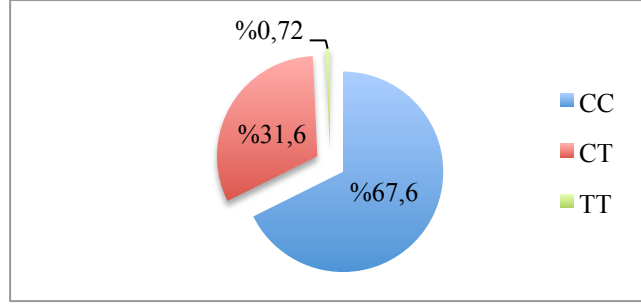
Şekil 5.11. Alel Frekanslarının Tümör Evrelerindeki Oranı

5.5.2. RAF1 rs1051208 Polimorfizmi Kontrol Grubu Genotip Verileri

RAF1 rs1051208 c.*266C>T polimorfizminin araştırıldığı ve kontrol grubunu oluşturan 278 sağlıklı kişide belirlenen genotipler Tablo 5.5'de gösterilmiştir. Bireylerin 188'i (%67,6) CC, 88'si (%31,6) CT ve 2'si (%0,72) TT genotipinde bulunmuştur (Şekil 5.12.).

Tablo 5.5. Kontrol Grubu Genotipleri

Genotip	CC	CT	TT	Toplam
n (%)	188 (%67,6)	88 (%31,6)	2 (%0,72)	278



Şekil 5.12. Kontrol Grubu Genotip Oranları

5.6. Asosiyasyon Analizleri

HWD (uyumluluk) testi ile hasta ve kontrol gruplarının genotip dağılımları incelenmiş; hasta grubunun dengede olduğu ($p > 0,05$), ancak kontrol grubunun dengede olmadığı ($p < 0,05$) görülmüştür (Tablo 5.6.).

Tablo 5.6. Kontrol ve Hastalar İçin HWD Testi

rs1051208	Beklenen (n)	Gözlenen (n)	X ²	p
Kontrol	CC: 193,6	CC: 188	5,94	0,0148
	CT: 76,8	CT: 88		
	TT: 7,6	TT: 2		
Hasta	CC: 146,7	CC: 145	1,35	0,244
	CT: 39,7	CT: 43		
	TT: 2,8	TT: 1		

X²: Ki-Kare, p: Anlamlılık

Cinsiyetin hastalık riskine etkisi araştırıldığında, erkeklerde hastalığın oluşma riskinin kadınlara göre 1.86 kat yüksek olduğu bulunmuştur ($X^2=6.763$, $OR=1.856$, $\%95CI=1,147-3,006$, $p=0,011$) (Tablo 5.7.).

Tablo 5.7. Cinsiyetin Mesane Kanserine Etkisi

rs1051208	Hasta	Kontrol	X ²	OR	%95 CI	p
	Gözlenen (n)	Gözlenen (n)				
			6,763	1.856	1,147-3,006	0,011
Erkek	127	171				
Kadın	30	75				

OR: Odds Ratio, %95 CI: Görelî Orantı, p: Anlamlılık

Koruyucu veya risk eğilimi ölçülmek üzere HW dengesi gerektirmeyen aditif genotipik model uygulanarak varyantın hastalığa etkisi hesaplanmıştır. TT genotipinin mesane kanserinde koruyucu eğilim gösterdiği belirlenmiştir (CATT $p=0,036$ ve Lojistik Regresyon $p=0,037$; OR=0,65) (Tablo 5.8.). T alelinin koruyucu eğilim gösterdiği bulunduktan sonra kodominant, dominant ve resesif genotipik modeller uygulanmıştır. Kodominant test ile CT genotipinin hastalık oluşumu açısından koruyucu etkisinin anlamlı olduğu gösterilmiştir ($p=0,035$; OR=0,634) (Tablo 5.8.). Dominant model lojistik regresyon analizine göre, sadece 1 varyant T alelinin taşınması koruyucu etki gözlenmesi eğilimindedir ($p=0,034$; OR=0,6339) (Tablo 5.8.).

Tablo 5.8. RAF1 rs1051208 İçin CATT ve Lojistik Regresyon Analizleri

Model	Metod	OR	%95 CI	p
Aditif	Lojistik regresyon	0,6475	0,4307 - 0,9735	0,03668
Aditif	CATT	-	-	0,036
Kodominant	Lojistik regresyon	CT: 0,634 TT: 0,648	CT: 0,415-0,998 TT: 0,58-7,219	CT: 0,035 TT: 0,724
Dominant	Lojistik regresyon	0,6339	0,4162 – 0,9653	0,03363
Resesif	Lojistik regresyon	0,734	0,06609 – 8,153	0,8013

CATT: Cochran Armitage Trend Test, OR: Odds Ratio, %95 CI: Görelî Orantı, p: Anlamlılık

Sigara kullanımının mesane kanserine etkisini incelemek üzere ki-kare testi yapılmış; sigara kullanımının hastalık riskini 4.45 kat artırdığı görülmüştür (X^2 : 39,983, OR= 4,448, %95 CI= 2,755-7,181; $p=0.0349$) (Tablo 5.9.).

Tablo 5.9. Sigara Kullanımının Mesane Kanserine Etkisi

rs1051208	Sigara Kullanan (n)	Sigara Kullanmayan (n)	X^2	OR	%95 CI	p
Hasta	104	30	39,983	4,448	2,755- 7,181	0,0349
Kontrol	106	136				

Hasta ve kontrol gruplarında sigara içenler ve içmeyenler genotiplerine göre ayrılarak genotip ve sigara kullanma durumunun birlikte, hastalığa etkisi araştırılmıştır (Tablo 5.10.). CC genotipi referans alınarak yapılan istatistiksel

analizler sonucu p değerleri 0,05' ten büyük olduğundan sigara kullanımı ile CT, TT ve CT+TT genotipleri arasında anlamlılık tespit edilememiştir.

Tablo 5.10. Sigara Kullanımı ve Genotip İçin Risk Analizi

RAF1	Sigara İçenler				Sigara İçmeyenler			
	Hasta/Kontrol	OR	95%CI	p	Hasta/Kontrol	OR	95%CI	p
CC	74/74	Referans	-	-	20/96	Referans	-	-
CT	29/32	1,103	0,607-2,004	0,747	10/40	0,866	0,385-1,948	0,728
TT	1/0	1	0,061-16,289	1	0/1	4,00E+08	0-	1
CT+TT	30/32	0,972	0,06-15,742	0,984	10/41	0,08	0,04-0,165	4,43E-12

Tümör evresi bilgileri mevcut olan 71 hasta ileri ve erken evre olarak gruplanıp, genotiplerin ileri evre tümör oluşumu ilişkisi aditif, resesif ve dominant model CATT ile yapılmış, ancak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. (Tablo 5.11.).

Tablo 5.11. Tümör Evreleri ve rs1051208 Polimorfizmi için CATT

Kromozom 3		rs1051208	
A1	MODEL	METOD	p
T	ADD	CATT	0,341
T	REC	CATT	0,390
T	DOM	CATT	0,212

ADD: Aditif, REC: Resesif, DOM: Dominant

6. TARTIŞMA

WHO verilerine göre malign neoplazmlardan kaynaklı ölümlerin %0.3'ünü oluşturan mesane kanseri, erkeklerde kadınların yaklaşık üç katı kadardır ve ağırlıklı yetmişli yaşlarda ölüm ile sonuçlanmaktadır (Global Cancer: Facts&Figures 2nd Edition). Çevresel birçok faktörün de mesane karsinogenezine ve ağır seyretmesine yol açtığı, özellikle tütün mamülleri kullanımı ve maruz kalımının bu olumsuz etkiyi artırdığı bilinmektedir (Rouprêt vd., 2011). Bu gibi ekzojen faktörlerin yanı sıra büyüme, bölünme, farklılaşma gibi önemli hücre sinyal yollarında anomalilere neden olan çok basamaklı gen mutasyonları da (endojen faktörler) karsinogenezi tetikler. Bunlar “sürücü mutasyonlar” olup önemli genlerde meydana gelerek proliferasyon ve farklılaşım ile karsinogeneze yol açarken, “yolcu mutasyonlar” olup her hücre bölünmesi süresince somatik olarak bu süreci hızlandırabilirler (Stratton, 2011).

TP53, RB ve FGFR3 genleri mesane karsinogenezinin farklı ilerlemesine etkileyen önemli SNP'ler taşırlar. TP53 ve RB gen mutasyonları sıklıkla metastatik ve yüksek derece invaziv tümörlerin gelişimine yol açar; FGFR3 mutasyonlarına ise invaziv olmayan, papiller, düşük ve yüksek derece tümörlerde sıklıkla rastlanmaktadır. FGF'nin bağlanmasıyla hücre membranındaki reseptör tirozin kinaz FGFR3 aktive olur. Hücre büyümesi yönünde sinyal iletimi yapılmasını uyaran bu durum karşısında, eğer RAS/RAF1/MAPK yolağında mutant protein/proteinler var ve hasar tamir noktalarından da kaçmış ise yukarıda bahsedildiği gibi “yolcu mutasyonlar” sonucu endojen faktörlerden kaynaklanmış karsinogenez kaçınılmaz olur. Yolak boyu ardıl fosforillenmeler ile düğme ‘açma-kapama’ gibi moleküler aktivasyonlar anormal seviyede gerçekleşir. Bu yolda MEK1/2 ve sonrasında ERK1/2 fosforillenmesinden sorumlu olan RAF1 gen mutasyonları prostat, kolorektal ve mesane kanserlerinde sıklıkla taranan endojen risk faktörlerindedir. Fosforile ERK'ler birçok gen ifadenmesini başlatacak çok farklı transkripsiyon faktörlerini aktive etmek üzere sitozolik bileşenlerin fosforilasyonunu yapar.

SNP veritabanlarında minör alel frekansı olarak belirtilen (MAF) değerinin %5'ten büyük olma koşulu sağlandığında herhangi bir popülasyonda ender görülen alel için güçlü bir istatistiksel anlamlılık ortaya koyulabilmektedir. Bu değer farklı popülasyonlarda yapılmış genom tarama projelerinde farklı sonuçlar vermiş, ancak toplam veride MAF, anlamlılığını korumuştur. Farklı popülasyon gruplarında görülen alel frekansları Şekil 6.1.'de gösterilmiştir. Bu çalışmada ise mesane kanserli 189 hastadan yalnızca 1'inde bu SNP için homozigot varyant TT genotipine rastlanırken, kontrol grubunda bu sayı 2'dir. Reference SNP Cluster raporuna göre, CC ve CT genotiplerine sıklıkla rastlandığı (273/1483 ve 118/1483) ve TT genotipine düşük sayıda rastlandığı (19/1483) bildirilmiştir (Reference SNP Cluster).

Şekil 6.1. rs1051208 Polimorfizmi İçin Popülasyon Taramaları

Population ID -Class	Total Sample (2N)	Founder (2N)	Major Allele Freq.	Minor Allele Freq.	Genotype Freq.	HWE Goodness of Fit	Data Source
HSP_GENO_PANEL	120	120	C=0.675	T=0.325	C/C=0.450 C/T=0.450 T/T=0.100	Pr(chiSq=0.039,df=1)=1.000	Genotype Freq.
CEU_GENO_PANEL	120	120	C=0.883	T=0.117	C/C=0.783 C/T=0.200 T/T=0.017	Pr(chiSq=0.053,df=1)=1.000	Genotype Freq.
AAM_GENO_PANEL	124	124	C=0.766	T=0.234	C/C=0.565 C/T=0.403 T/T=0.032	Pr(chiSq=0.972,df=1)=0.343	Genotype Freq.
CHB_GENO_PANEL	90	90	C=0.989	T=0.011	C/C=0.978 C/T=0.022	Pr(chiSq=0.000,df=1)=1.000	Genotype Freq.
YRI_GENO_PANEL	120	120	C=0.675	T=0.325	C/C=0.467 C/T=0.417 T/T=0.117	Pr(chiSq=0.152,df=1)=0.752	Genotype Freq.
JPT_GENO_PANEL	90	90	C=0.967	T=0.033	C/C=0.933 C/T=0.067	Pr(chiSq=0.004,df=1)=1.000	Genotype Freq.

Kaynak: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ss.cgi?ss=66858065

rs1051208 RAF1 c.*266C>T SNP'si daha önce İran popülasyonunda kolorektal kanser için taranmış ve T alelinin kadınlar için risk aleli olduğu belirlenmiş, ancak Bonferroni düzeltme testinde bu eğilim doğrulanamamıştır (Azimzadeh vd., 2011). Bu çalışmada 189 mesane kanseri hastası ile 278 sağlıklı bireyden alınmış örneklerde RAF1 geninde seçilmiş rs1051208, c.*266C>T SNP'si taranmış, genotip ve alel frekansları karşılaştırılarak mesane tümörü için oluşturduğu risk araştırılmış ve hastaların tümör evreleri ile genotipleri arasındaki ilişki incelenmiştir. Kontrol grubunun HW dengesini sağlamadığı belirlenmiştir. Bu lokus

için Türk popülasyonun, evrimleşmenin durduğu, herhangi bir genotipin diğerine üstünlüğünün olmadığı, mutasyon ve göçlerin olmadığı, eşit alelik dağılımının korunduğu ve dışarıdan eşleşme yani melezleşmenin olmadığı kriterlerinden birini sağlamadığı ve bu sonuç elde edilmiş olabileceği akla gelmektedir. Melezlenmenin en büyük etkisi homozigot veya heterozigot bireylerin birbirine baskınlık göstermesi ve genotipin oluşacak karaktere üstünlüğüne neden olmasıdır. Aynı zamanda bu, popülasyon ve SNP profilleri için farklılıklar, yani dengeden ayrılmalar yaratır. Bunun için çalışmalara dahil edilen birey sayısı artırılabilir veya alelin/genotipin aditif, dominant ve resesif etkisini ölçen ve HW dengesinde olmayı gerektirmeyen ilişkilendirme modelleri kullanılabilir (Slager ve Schaid, 2001).

Mesane kanseri ve rs1051208 polimorfizminde, altta yatan genetik etki modeli bilinmemektedir. Türk popülasyonunda mesane kanseri oluşturması eğilimini belirlemek üzere aditif genotipik modelde hem lojistik regresyon hem de Cochran-Armitage Trend Test uygulanmıştır. Cochran-Armitage, lojistik regresyon testleriyle uyumlu sonuçlar sağlama özelliğinde ve HWD'de olmayı gerektirmeyen bir eğilim testidir (Slager ve Schaid, 2001, Genetic Epidemiology Glossary). Varyant T alelinin risk eğilimi oluşturması beklenirken, iki testin sonucu birbirine uyumlu şekilde varyantın mesane kanserinde koruyucu eğilim gösterdiği belirlenmiştir (Tablo 5.8.). Birlikte uygulanması önerilen kodominant, dominant, resesif genotipik modellerden kodominant model, heterozigot CT genotip ve homozigot varyant TT genotipleri karşılaştırarak iki farklı görece orantı değeri elde etmeyi sağlar. Bu çalışmada kodominant genotipik test CT genotipinin bireyde hastalık oluşumu açısından koruyucu eğilim (Tablo 5.8.) oluşturduğu sonucunu vermiştir. Kodominant model, MAF değeri %5'ten büyük olma koşulunu sağlamış biyolojik etkenin (minör alel; T) hastalığa duyarlılık göstermedeki genetik senaryosunu ortaya koymakta kullanılmıştır. Alelik eğilim belirlemek amacıyla uygulanan dominant ve resesif genotipik model lojistik regresyon testlerinden dominant model, heterozigot CT ve homozigot varyant TT genotiplerini homozigot yabancıl tip CC genotip ile karşılaştırır. Bu çalışmada sadece 1 varyant T alelinin taşınması koruyucu eğilim sonucunu vermiştir ($p=0,034<0,05$, $OR=0,6339<1.0$) (Tablo 5.8.). Deneysel çalışmalarda istatistiksel test olarak tek başına veya aditif, dominant ve resesif modellerle birlikte kullanılabilen kodominant modelin, lojistik regresyon ve/veya

CATT gibi anlamlılık belirtilmesini sağlayacak testlerle de desteklenmesi önerilmektedir (Lettre vd., 2007). Mesane kanserine sebep teşkil eden bir mekanizmanın tamamlayıcı etkeni olarak düşünülebilecek rs1051208 polimorfizmi, tüm bu istatistiksel analizler sonucunda Türk popülasyonunda hastalığa karşı koruyucu bir eğilim vermiştir.

Kadın ve erkek olmanın mesane kanseri riski için farklılık gösterip göstermediği X^2 testi ile araştırılmıştır. Bu araştırmaya dahil edilen hastaların %16,1'i kadın, %80,9'u erkek ve kontrollerin %30'u kadın, %70'i erkektir. Erkekler için mesane kanseri riski kadınlarla karşılaştırıldığında 1,86 kat daha fazla bulunmuştur. Bu Türk popülasyonu için dünya verileriyle örtüşen bir sonuçtur.

Sigara kullanımının mesane kanseri için en önemli çevresel faktör olduğu bilinmektedir. Castelao ve arkadaşları, 1276 mesane kanseri hastası ve 1053 sağlıklı kontrolde, herhangi bir tütün mamülü kullanımının mesane kanseri riskini 2.4 kat, sigara kullanımının ise 2.5 kat artırdığını belirlemiştir (Castelao vd., 2001). Bu çalışmada ise, hastaların %79'unun ve kontrollerin %44'ünün sigara kullandığı saptanmıştır. Hastalar arasında sigara içmeyenler %21, kontrollerde ise %56 oranındadır. Genotip bilgileri dahil edilmeden, yalnızca sigara kullanımının hastalığa etkisi incelenmiş ve riski 4.45 kat artırdığı görülmüştür. Ancak genotiplerle birlikte ele alındığında, TT'nin az sayıda olması nedeniyle sigara kullanımı ile ilişkilendirme görülmemiştir. Azimzadeh ve arkadaşlarının kolorektal kanser çalışmasında da sigara kullanımının bu SNP için risk oluşturucu bir anlamlılık ortaya koymadığı görülmüştür (Azimzadeh vd., 2011).

Tüm tümör evrelerinin gruplandığı, pTa ve pT1'in oluşturduğu erken evre; ve pT2 ve daha yüksek tümörlerin oluşturduğu ileri evre tümörler genotipler ile karşılaştırılmış, ancak anlamlı ilişkiler bulunamamıştır. Tümör evresi bilinen hasta sayısındaki azlık ve TT genotipine az rastlanması sebebiyle, ilişkinin derecesini belirtmek üzere lojistik regresyon testi uygulanamamıştır. Şimdiye kadar rs1051208 polimorfizmi için farklı popülasyonlarda da tümör evre ve derecesine özgün, anlamlılık belirten bir sonuç bulunmamaktadır.

Reseptör tirozin kinaz aktivasyonlu yolda, RAF geni ailesi somatik mutasyonlarından *BRAF*^{V600E}, sıklıkla melanoma, tiroid, prostat, kolon ve yumurtalık kanserlerinde görülmektedir. RAS aktivasyonu ile MAPK yolağının fosforilasyonunu uyaran RAF1'in, ürotelyal kanserlerde öncü olmasa da, "yolcu mutasyon" fonksiyonu gösterdiği akla gelebilir. RAF gen ailesi üyelerinin solid tümörlerdeki tutarsız mutasyon profilleri, çalışılan topluluktaki etnik köken farklılığından kaynaklanmaktadır (Palanisamy vd., 2010; Jeong vd., 2008). rs1051208 polimorfizmi RAF1 mRNA 3'UTR mikroRNA bağlanma bölgesinde yer alır ve Gibbs serbestlik derecesi koşulunu sağlamıştır. Mesane kanserinde varyant T aleli varlığında mikroRNA'ların (miR-213, hsa-miR-186, hsa-let-71-3p ve hsa-miR-5589-3p) bağlanma özgünlükleri ve mRNA ve protein üretimine etkileri araştırılabilir ve patogenezdaki rolleri ortaya koyulabilir. RAF1 genindeki bu 3'UTR SNP'si için hedef mikroRNA'lar ile mikroarray çalışmaları tasarlanarak da mesane kanseri için olumsuz yönde bir risk oluşturup oluşturmadıkları araştırılabilir ve hastalığın teşhis, tedavi ve takibinde kullanılabilecek, klinik kullanımda değer teşkil edecek önemli bulgular ortaya koyulabilir. Bu şekilde olası hedef miRNA'ların onkogenik veya tümör baskılayıcı yönden etkisi belirlenebilir. RAF1 mutasyonları farklı kanser türlerinde ve popülasyonlarda, çok sayıda hasta ve sağlıklı kontrolde taranarak, mesane karsinogenezi ve progresyonuna etkiyen "yolcu mutasyon(lar)" ortaya koyulabilir. Teşhis, tedavi ve takip için klinikte faydalı olacak sonuçlara ulaşmak amacıyla, ifadenme seviyeleri ölçülüp mutasyon taramaları yapılarak, mesanedeki tümörün evre ve derecesine göre, RAF1 geninin tedaviye yönelik hedeflerden biri olup olmayacağı kesinleştirilebilir.

7. KAYNAKLAR

Ahmad I., Sansom O.J. ve Leung H.Y., 2012. Exploring molecular genetics of bladder cancer: lessons learned from mouse models. *Dis Model Mech.* 2012 May; 5(3):323-32.

Alberg A.J., Kouzis A., Genkinger J.M. vd., 2007. A prospective cohort study of bladder cancer risk in relation to active cigarette smoking and household exposure to secondhand cigarette smoke. *American Journal of Epidemiology* vol.165, no.6 pp 660-666.

Andrew A.S., Nelson H.H., Kelsey K.T. vd., 2006. Concordance of multiple analytical approaches demonstrates a complex relationship between repair gene SNPs, smoking and bladder cancer susceptibility. *Carcinogenesis* col.27 no5 pp.1030-1037.

Azimzadeh P., Romani S., Mohebbi S.R., vd., 2011. Association of polymorphisms in microRNA-binding sites and colorectal cancer in an Iranian population. *Canc Genet* 205; 501-507.

Bao L., Zhou M., Wu L. vd., 2006. PolymiRTS Database: linking polymorphisms in microRNA target sites with complex traits. *Nucleic Acids Res.* 2007 Jan;35(Database issue):D51-4.

Bartel D.P., 2004. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell.* 2004 Jan 23;116(2):281-97

Bartel D.P., 2009. MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory functions. *Cell.* 2009 Jan 23;136(2):215-33.

Bodoor K., Ghabkari A., Jaradat Z. vd., 2010. FGFR3 mutational status and protein expression in patients with bladder cancer in a Jordanian population. *Cancer Epidemiology* 34 (2010) 724-732.

Bryan R.T., Maurice P. Zeegers M.P., James N.D. vd., 2009. Biomarkers in bladder cancer. *BJU International* 105, 608-613.

Budman L., Kassouf W. ve Steinberg J.R., 2008. Biomarkers for detection and surveillance of bladder cancer. *CUAJ June2008, Vol.2, Issue 3*.

Bushati N. ve Cohen M., 2007. MicroRNA Functions. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2007;23:175-205

Castelao J.E., Yuan J.M. ve Skipper P.L., 2001. Gender- and Smoking-Related Bladder Cancer Risk. *J Natl Cancer Inst* 2001;93: 538–45

Chin L.J., Ratner E., Leng S. vd., 2008. A SNP in a let-7 microRNA complementary site in the KRAS 3' untranslated region increases non-small cell lung cancer risk. *Cancer Res.* 2008 Oct 15;68(20):8535-40.

Chu H., Wang M., Jin H. vd., 2012. EGFR 3' UTR 774T>C polymorphism contributes to bladder cancer risk. *Mutagenesis* 2012 pp. 1-7, 212.

Dodurga Y., Tataroglu C., Kesen Z. vd., 2011. Incidence of FGFR3 gene A248C, S249C, G372C, and T375C Mutations in Bladder Cancer. *Genet Mol Res.* 2011 Jan 18;10(1):86-95.

Downward J., 2003. Targeting Ras signaling pathways in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer.* 2003;3:11-22.

Fassan M., Trabulsi E.J., Gomella L.G. vd.,2007. Targeted therapies in the management of metastatic bladder cancer. *Biologics: Targets & Therapy* 2007: 1(4) 393-406

Feng Z., Zhang C., Wu R. vd., 2011. Tumor suppressor p53 meets microRNAs. *J Mol Cell Biol.* 2011 Feb;3(1):44-50.

Fransén K., Klintenäs M., Osterström A. vd., 2004. Mutation analysis of the BRAF,ARAF and RAF-1 genes in human colorectal adenocarcinomas. *Carcinogenesis vol.25 no.4 pp.527 533, 2004 DOI: 10.1093/carcin/bgh049*

Freidlin B., Zheng G., Zhaohai L. vd., 2002. Trend Tests for Case-Control Studies of Genetic Markers: Power, Sample Size and Robustness. *Hum Hered* 2002;53:146-152.

Genetic Epidemiology Glossary:

<http://www.dorak.info/epi/glosge.html>

(Erişim tarihi: 14/07/2013)

George G.P. ve Mittal R.D., 2010. MicroRNAs: Potential Biomarkers in Cancer. *Indian J Clin Biochem.* 2010 January; 25(1): 4–14.

Global Cancer: Facts & Figures 2nd Edition:

<http://www.cancer.org/acs/groups/content/@epidemiologysurveillance/documents/document/acspc-027766.pdf>

(Erişim tarihi: 23/07/2013)

Grignon D.J., 2009. The current classification of urothelial neoplasms. *Modern Pathology* (2009)22, S60–S69.

Han J., Lee Y., Yeom K.H. vd., 2004. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev.* 18, 3016-3027.

Jemal A., Bray F., Center M.M. vd., 2011. Global Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin* 2011;61:69-90.

Jeong J.H., Wang Z., Guimaraes A.S. vd., 2008. BRAF activation initiates but does not maintain invasive prostate adenocarcinoma. *PloS one* 2008;3:e3949.

Kompier L.C., Lurkin I., van der Aa M.N. vd., 2010. FGFR3, HRAS, KRAS, NRAS and PIK3CA mutations in bladder cancer and their potential as biomarkers for surveillance and therapy. *PLoS One*. 2010 Nov 3;5(11):e13821.

Landi D., Gemignani F., Barale R. vd., 2008. A Catalog of Polymorphisms Falling in MicroRNA-Binding Regions of Cancer Genes. *DNA and Cell Biology*. January 2008, 27(1): 35-43.

Lavender N.A., Rogers E.N., Yeyeodu S. vd., 2012. Interaction among apoptosis-associated sequence variants and joint effects on aggressive prostate cancer. *BMC Medical Genomics* 2012, 5:11.

Leibovici D., Grossman H.B., Dinney C.P. vd., 2005. Polymorphisms in Inflammation Genes and Bladder Cancer: From Initiation to Recurrence, Progression, and Survival. *J Clin Oncol*. 2005 Aug 20;23(24):5746-56.

Lette G., Lange C. ve Hirschhorn J.N., 2007. Genetic Model Testing and Statistical Power in Population-Based Association Studies of Quantitative Traits. *Genetic Epidemiology* 31: 358–362 (2007).

Li M., Zhang Z.F., Reuter V.E. vd., 1996. Chromosome 3 Allelic loses and Microsatellite Alterations in Transitional Cell Carcinoma of Urinary Bladder. *AJP July 1996, vol149, No:1*

Li Y., Sun Z., Cunningham J.M. vd., 2011. Genetic Variations in Multiple Drug Action Pathways and Survival in Advanced Stage Non-Small Lung Cancer Treated with Chemotherapy. *Clin Cancer Res*. 2011 Jun 1;17(11):3830-40.

Lindgren D., Liedberg F., Andersson A. vd., 2006. Molecular characterization of early-stage bladder carcinomas by expression profiles, FGFR3 mutation status, and loss of 9q. *Oncogene*. 2006 Apr 27;25(18):2685-96.

Lott S., Wang M., Zhang S. vd., 2009. FGFR3 and TP53 mutation analysis in inverted urothelial papilloma: incidence and etiological considerations. *Mod Pathol*. 2009 May;22(5):627-32.

Luo J., Cai Q., Wang W. vd., 2012. A microRNA-7 binding site polymorphism in HOXB5 leads to differential gene expression in bladder cancer. *PLoS One*. 2012;7(6):e40127.

Marais R., Light Y., Paterson H.F. vd., 1995. Ras recruits Raf-1 to the plasma membrane for activation by tyrosine phosphorylation. *EMBO J*.1995;14:3136-145.

Marks J.L., Gong Y., Chitale D. vd., 2008 Novel MEK Mutation Identified by Mutational analysis of EGFR-Signaling Pathway Genes in Lung Adenocarcinoma. *Cancer Res*. July 15;68(14):5524-5528.

McConkey D.J., Lee S., Choi W. vd., 2010. Molecular Genetics of Bladder Cancer: Emerging Mechanisms of Tumor Initiation and Progression. *Urol Oncol*. 2010; 28(4): 429-440.

Mhaweck-Fauceglia P., Fischer G., Beck A. vd., 2006. Raf1, Aurora-A/STFK15 and E-cadherin biomarkers expression in patients with pTa/pT1 urothelial bladder carcinoma; a retrospective TMA study of 246 patients with long-term follow up. *Eur J Surg Oncol*. 2006 May; 32(4): 439-44. Epub 2006 Mar.

Mitra A.P. ve Richard J.C., 2009. Molecular Pathogenesis and Diagnostics of Bladder Cancer. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis*. 4:251-85

Miwa W., Yasuda J., Yashima K. vd., 1994. Absence of activating mutations of the RAF1 protooncogene in human lung cancer. *Biol Chem Hoppe Seyler*. 1994 Oct;375(10):705-9.

Noser J.A., Mael A.A., Sakuma R. vd., 2007. The RAS/Raf1/MEK/ERK Signaling Pathway Facilitates VSV-mediated Oncolysis: Implication for the Defective Interferon Response in Cancer Cells. *Mol Ther*. 2007 Aug;15(8):1531-6. Epub 2007 May 15.

Palanisamy N., Ateeq B., Kalyana-Sundaram S. vd., 2010. Rearrangements of the RAF Kinase Pathway in Prostate Cancer, Gastric Cancer and Melanoma. *Nat Med*. 2010 July ; 16(7) : 793-798

Proctor I., Stoeber K. ve Williams G.H., 2010. Biomarkers in Bladder Cancer. *Histopathology*. 2010 Jul;57(1):1-13.

Raman J.D., Mongan N.P., Tickoo SK. vd., 2005. Increased Expression of the Polycomb Group Gene, *EZH2*, in Transitional Cell Carcinoma of the Bladder. *Clin Cancer Res*; 11:8570-8576.

Reference SNP Cluster Report:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=1051208

(Erişim Tarihi: 26/08/2013)

Repasky G.A., Chenette E.J. ve Der C.J., 2004. Renewing the conspiracy theory debate: does Raf function alone to mediate Ras oncogenesis? *Trends Cell Biol*. 14:639-47

van Rhijn B.W., van der Kwast T.H., Vis A.N., vd., 2004. FGFR3 and P53 characterize alternative genetic pathways in the pathogenesis of urothelial cell carcinoma. *Cancer Res*. 2004 Mar 15;64(6):1911-4.

Robles A. ve Harris C.C., 2010. Clinical Outcomes and correlates of TP53 Mutations and Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010 Mar;2(3):a001016.

Rouprêt M., Zigeuner R., Palou J., vd., 2011. European Guidelines for the Diagnosis and Management of Upper Urinary Tract Urothelial Cell Carcinomas: 2011 Update. *European Urology* 59 (2011) 584-594

Ryan B.M., Robles A., ve Harris C.C., 2010. Genetic Variation in MicroRNA networks: the implications for cancer research. *Nat Rev Cancer.* 2010 Jun;10(6):389-402.

Salinas-Sanchez A.S., Lorenzo-Romero J.G., Giménez-Bachs J.M., 2008. Implications of p53 gene mutations on patient survival in transitional cell carcinoma of the bladder: a long-term study. *Urol Oncol.* 2008. Nov-Dec;26(6):620-6.

Schaefer A., Jung M., Kristiansen G., vd., 2010. MicroRNAs and cancer: Current state and future perspectives in urologic oncology. *Urol Oncol.* 2010 Jan-Feb;28(1):4-13.

Schlichtholz B., Presler M. ve Matuszewski M., 2004. Clinical implications of p53 mutation analysis in bladder cancer tissue and urine sediment by functional assay in yeast. *Carcinogenesis.* 2004 Dec;25(12):2319-23.

Schubbert S., Shannon K. ve Bollag G., 2007. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat. Rev. Canc.* 7:295-308.

Simon R., Richter J., Wagner U. vd., 2001. High-Throughput Tissue Microarray Analysis of 3p25 (RAF1) and 8p12 (FGFR1) Copy Number Alterations in Urinary Bladder Cancer. *Cancer Res* 2001;61:4514-4519.

Sjödahl G., Lauss M., Gudjonsson S. vd., 2011. A Systematic Study of Gene Mutations in Urothelial Carcinoma, Inactivating Mutations in TSC2 and PIK3R1. *PLoS One*, 2011 Apr 14; 6(4):e18583.

Slager S.L. ve Schaid D.J., 2001. Case-Control Studies of Genetic Markers: Power and Sample Size Approximations for Armitage's Test for Trend. *Hum Hered* 2001;52:149–153.

Stefani G. ve Slack F.J., 2008. Small non-coding RNAs in animal development. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008 Mar;9(3):219-30.

Stratton M.R., 2011. Exploring the Genomes of Cancer Cells: Progress and Promise. *Science* 331, 1553 (2011).

Taby R. ve Issa J.P.J., 2010. Cancer Epigenetics. *CA Cancer J Clin.* 2010 Nov-Dec;60(6):376-92.

Takane K. ve Kanai A., 2011. Vertebrate Virus-Encoded MicroRNAs and Their sequence Conservation. *Jpn J Infect Dis.* 2011;64(5):357-66.

Tanaka T., Miyazawa K., Tsukamoto T. vd., 2011. Pathobiology and chemoprevention of Bladder Cancer. *Journal of Oncology*, Vol2011, Article ID 528353

Teo M.T.W., Landi D., Taylor C.F. vd., 2011. The role of microRNA-binding site polymorphisms in DNA repair genes as risk factors for bladder cancer and breast cancer and their impact on radiotherapy outcome. *Carcino.* vol33.no3. 581-586.

Tunalı N.E. ve Tiryakioğlu O., 2010. Kanserde MikroRNA'ların Rolü. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2010;30(5):1690-700

Vrooman O.P.J. ve Witjes A.J., 2008. Urinary Markers in Bladder Cancer. *European Urology* 53 (2008) 909-916.

Wallerand H., Bakkar A.A., de Medina S.G. vd., 2005. Mutations in TP53, but not FGFR3, in urothelial cell carcinoma of the bladder are influenced by smoking: contribution of exogenous versus endogenous carcinogens. *Carcinogenesis*. 2005 Jan;26(1):177-84.

Wiemer E.A., 2007. The role of microRNAs in cancer: No small matter. *Eur J Cancer*. 2007 Jul;43(10):1529-44

Wightman B., Ha I, ve Ruvkun G., 1993. Post-transcriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C.elegans*. *Cell* 75, 855-862.

Zhao, J., Richter, J., Wagner, U vd., 1999. Chromosomal imbalances in noninvasive papillary bladder neoplasms (pTa). *Cancer Res.*, 59: 4658–4661, 1999.

8. ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında İstanbul, Üsküdar'da doğan Fulya Köksalar, ilk, orta ve lise eğitimini İstanbul'da tamamladı.

Lisans öğrenimini Haliç Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde yaparak, 2010 yılında mezun oldu.

Yüksek lisans eğitimine Haliç Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda yapmak üzerinde 2011 yılında başlamıştır.

2003 yılından beri bas gitarist olarak farklı gruplarda müzik kariyerini sürdürmektedir.