

**T.C.**  
**ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**

**MESANE KANSERİNDE miRNA'LARIN**  
**EKSPRESYONLARININ BELİRLENMESİ**

**Dr. Kemal Murat CANTÜRK**

**Tıbbi Genetik Anabilim Dalı**  
**TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**ESKİŞEHİR**

**2010**



**T.C.**  
**ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**

**MESANE KANSERİNDE miRNA'LARIN**  
**EKSPRESYONLARININ BELİRLENMESİ**

**Dr. Kemal Murat CANTÜRK**

**Tıbbi Genetik Anabilim Dalı**  
**TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŐMANI**  
**Prof. Dr. Sevilhan ARTAN**

**ESKİŞEHİR**  
**2010**

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince beni her zaman motive eden, bilgi ve tecrübeleriyle yol gösteren tez danışmanım Prof. Dr. Sevilhan Artan hocama özellikle teşekkür etmek istiyorum . Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilimdalı öğretim görevlileri Doç. Dr. Hamza Müslümanoğlu, Yrd. Doç. Dr. Muhsin Özdemir, Yrd. Doç. Dr. Oğuz Çilingir, Yrd. Doç. Dr. Beyhan Durak-Aras hocalarıma minnettarım. Tez çalışmamda katkı sağlayan ESOGÜ Üroloji A.B.D.'dan Doç. Dr. Cavit Can'a , Bioistatistik A.B.D.'dan Doç. Dr. Setenay Öner'e ve Tıbbi Patoloji A.B.D.'dan Yrd. Doç. Dr. Evrim Çiftçi'ye teşekkür ederim. Ayrıca Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik A.B.D.'dan Doç. Dr. Mustafa Özen'e mikroarray çalışmasındaki katkılarından dolayı teşekkür ederim.

## ÖZET

**Cantürk, K.M. Mesane kanserinde mikroRNA'ların ekspresyonlarının mikroarray yöntemiyle belirlenmesi. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık Tezi, Eskişehir, 2010.**

Mesane kanseri gelişmiş ülkelerde genitoüriner sistemde 2. Sıklıkta görülen kanserdir. Ürotelyal karsinom mesane kanserinin en sık (% 90) görülen histolojik türüdür. Bir çok güncel tedavi yaklaşımına rağmen ileri evre mesane kanserinde 5 yıllık sağ kalım % 20-40 kadardır. Günümüzde miRNA'ların ürotelyal karsinom patogenezindeki rolleri ve potansiyel terapötik etkileri araştırılmaya devam etmektedir. Çalışmamızda 17 ürotelyal karsinom örneği ve 6 normal mesane dokusu miRNA ekspresyon profilleri açısından karşılaştırılmıştır. T-test sonrası mir-143 (27 kat ↓), mir-145 (16 kat ↓), mir-125b (11 kat ↓), mir-99a (11 kat ↓), mir-133b (10 kat ↓), mir-100 (6 kat ↓), mir-497 (4.9 kat ↓), mir-139-5p (3.7 kat ↓), mir-18a (3.1 kat ↑) ürotelyal karsinomda normal ürotelyuma göre farklı eksprese olduğu belirlenmiştir ( $p < 0.01$ ). Farklı eksprese olan miRNA'ların hedef genleri internet tabanlı biyoinformatik programlarla değerlendirilmiştir. Derece ve evreye göre ürotelyal karsinom dokuları karşılaştırıldığında mir-10a, mir-34a, mir-141 ve mir-210'un derece ve evre arttığında azalan ekspresyon paternleri olduğu belirlenmiştir ( $p < 0.05$ ). Özellikle bu miRNA'lar ürotelyal karsinom prognozunu tahmin etmede kullanılabilirler. Farklı eksprese olan miRNA'larla hiyerarşik kümeleme analizi yaptığımızda, tümör örnekleri patolojik derece ve evrelerine göre ayrılabilmiştir. Sonuç olarak ürotelyal karsinomda mikroRNA ekspresyon patternini belirlemede mikroarray yöntemi etkin bir yöntemdir. Ürotelyal karsinomda mikroRNA'ların normal ürotelyoma göre farklı eksprese olmalarından dolayı ürotelial karsinom patogenezinde önemli rolleri olabilir. Özellikle belirgin şekilde azalan miRNA'lar tümörsüpresör miRNA'lar olabilirler. MiRNA'ların ürotelyal karsinom yolağındaki net rollerinin ortaya konulması için ayrıntılı fonksiyonel çalışmalar yapılması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Ürotelyal karsinom, miRNA, mikroarray

## ABSTRACT

**Cantürk, K.M. Determination of miRNAs' expressions in bladder cancer by microarray method. Eskişehir Osmangazi University Faculty of Medicine, Medical Speciality Thesis in Department of Medical Genetics.** Bladder cancer is the second malignancy of genitourinary system in developed countries. Urothelial carcinoma is the most frequent (%90) histological type of bladder cancer. Although several treatment options, 5 year survival is nearly %20-40 in the advanced stage bladder cancer. Nowadays microRNAs' functions in the pathogenesis of urothelial carcinoma and therapeutic effects have been investigated. In our study microRNA expression profiles of 17 urothelial carcinomas and 6 normal bladder tissues were compared. After t-test mir-143 (27 fold ↓), mir-145 (16 fold ↓), mir-125b (11 fold ↓), mir-99a (11 fold ↓), mir-133b (10 fold ↓), mir-100 (6 fold ↓), mir-497 (4.9 fold ↓), mir-139-5p (3.7 fold ↓) and mir-18a (3.1 fold ↑) were determined that differently expressed in urothelial carcinoma than normal urothelium. Target genes of differently expressed miRNA were evaluated by web based bioinformatic programmes. According to grade and stage urothelial carcinoma samples were compared and determined that mir-10a, mir-34a, mir-141, mir-210 had decreased expression patterns if stage and grade increased ( $p < 0.05$ ). Especially these miRNAs might be use to predict prognosis of urothelial carcinoma. When we perform hiyerarshic clustering analisis with differently expressed miRNAs, tumor samples could be distinguished according to grade and stage. In conclusion, microarray is efficient method for determining expression pattern of miRNAs in urothelial carcinoma. MiRNAs are differently expressed in urothelial carcinoma than normal urothelium so, they might be have very important roles in the pathogenesis of urothelial carcinoma. Especially distinctly decreased miRNAs might be tumorsupresor miRNAs. Detailed functional studies are necessary to identify real roles of miRNAs in urothelial carcinoma pathway.

**Key Words:** urothelial carcinoma, miRNA, microarray

## İÇİNDEKİLER

|  | Sayfa |
|--|-------|
| TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI  | iii   |
| TEŞEKKÜR   | iv    |
| ÖZET   | v     |
| ABSTRACT   | vi    |
| İÇİNDEKİLER  | vii   |
| SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ  | x     |
| ŞEKİLLER DİZİNİ  | xii   |
| TABLolar DİZİNİ  | xiii  |
| 1. GİRİŞ   | 1     |
| 2. GENEL BİLGİLER  | 3     |
| 2.1. MicroRNA'ların Yapısı ve İşlenmesi                              | 3     |
| 2.2. MicroRNA ve Kanseri   | 5     |
| 2.3. Onkogenik ve Tümörsüpresör MikroRNA'lar                         | 7     |
| 2.4. Mesane Kanseri  | 9     |
| 2.4.1. Mesane kanserinde Etiyoloji, Epidemiyoloji ve Risk faktörleri | 9     |
| 2.4.2. Mesane Kanserinin Patolojisi                                  | 10    |
| 2.4.3. Ürotelyal Karsinom (Değişici Epitel Karsinomu)                | 10    |
| 2.4.4. Mesane Kanserinde Evreleme                                    | 11    |
| 2.5. Mesane Kanserinde Moleküler Çalışmaların Önemi                  | 12    |
| 2.6. Mesane Kanserinde Tümör Belirleyiciler                          | 13    |
| 2.7. Ürotelyal Karsinom Genetiği                                     | 14    |
| 2.8. Mesane Kanseri ve MikroRNA                                      | 17    |
| 2.9. Mikroarray Teknolojisi  | 18    |
| 2.9.1. Mikroarray Platformları                                       | 19    |
| 2.9.2. Mikroarray Teknolojisinde Data Analizi                        | 20    |
| 3. GEREÇ ve YÖNTEM   | 21    |
| 3.1. Hasta grubu   | 21    |
| 3.2. Gereçler  | 21    |

|   |    |
|---|----|
| 3.2.1. Kullanılan Aletler   | 21 |
| 3.2.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler   | 22 |
| 3.3. Yöntem   | 22 |
| 3.3.1. Taze Doku Örneklerinden Total RNA İzolasyonu   | 22 |
| 3.3.2. Total RNA Kalitesinin ve Miktarının Spektrofotometre ve Bioanalizer Cihazıyla Tayini   | 23 |
| 3.3.3. İşaretleme ve Hibridizasyon Aşaması  | 24 |
| 3.3.4. Posthibridizasyon Yıkama   | 26 |
| 3.3.5. Preperat Taraması ve Feature Extraction 10.01 Yazılımıyla Görüntü Analizleri   | 27 |
| 3.3.6. İstatistiksel Analizi  | 29 |
| 4. BULGULAR   | 31 |
| 4.1. Ürotelial Karsinomda MiRNA'ların Ekspresyon Düzeyleri  | 31 |
| 4.1.1. Normal Mesane Dokusu ve Ürotelial Karsinomda MiRNA Ekspresyon Düzeyleri  | 33 |
| 4.1.2. Farklı Eksprese olan MiRNA'ların Hedef Analizleri  | 34 |
| 4.1.3. Ürotelyal Karsinom ve Normal Dokunun Kümeleme Analizi  | 36 |
| 4.1.4. Tümör Derece ve Evresine Göre Farklı Eksprese olan MiRNA'lar   | 37 |
| 4.1.5. Evre ve Dereceye Göre Farklı Eksprese Olan MiRNA'larda Kümeleme Analizi  | 38 |
| 5. TARTIŞMA   | 41 |
| 6. SONUÇ ve ÖNERİLER  | 49 |
| KAYNAKLAR   |    |
| ÖZGEÇMİŞ  |    |
| EKLER   |    |
| EK 1: Normal ve tümör örnekleri karşılaştırmasında $p < 0.05$ düzeyinde anlamlı farklılık gösteren miRNAlar   |    |
| EK 2: Filtreleme sonrasında (present-marginal) sadece ürotelyal karsinomda eksprese olan miRNAlar ve sadece normal ürotelyumda eksprese olan miRNAlar |    |



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

|       |                                       |
|-------|---------------------------------------|
| ANOVA | Analysis of variance                  |
| CIP   | Calf intestine phosphatase            |
| cDNA  | Komplementer DNA                      |
| CGH   | Comparative Genomic Hybridization     |
| DEK   | Değişici epitelyal karsinom           |
| DMSO  | Dimethyl sulfoxide                    |
| Dk    | Dakika                                |
| KLL   | Kronik lenfositik lösemi              |
| KİDEM | Kanser İzleme ve Denetim Merkezi      |
| MiRNA | MikroRNA                              |
| Mg    | Miligram                              |
| ml    | Mililitre                             |
| Ng    | Nanogram                              |
| PCR   | Polymerase Chain Reaction             |
| RB    | Retinoblastoma                        |
| RIN   | RNA integrity number                  |
| RISC  | RNA ile indüklenen susturma kompleksi |
| sn    | Saniye                                |
| SNP   | Single nucleotide polymorphism        |
| QC    | Quality Control                       |
| UTR   | Untranslated region                   |
| WHO   | World Health Organization             |
| µl    | Mikrolitre                            |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|   | Sayfa |
|---|-------|
| 2.1. MikroRNA'nın işlenmesi   | 5     |
| 2.2. Kromozomal değişiklik sonrası miRNA ekspresyon farklılıkları ve kanserde etki mekanizması    | 7     |
| 2.3. Onkogenik ve tümörsüpresör miRNA'lar ve kanserdeki değişim mekanizmaları                     | 8     |
| 2.4. Mesane kanserinde moleküler yollar   | 15    |
| 3.1. Agilent 2100 biyoanalizer'da total RNA elektroforegram görüntüsü                             | 23    |
| 3.2. Hibridizasyon hücresinin tabanındaki gasket slayta örnek yüklenmesi-<br>Hibridizasyon fırını | 26    |
| 3.3. Agilent slayt tarayıcı   | 27    |
| 3.4. Feature extraction 10.01 yazılımında array preparatının görüntüsü                            | 27    |
| 3.5. Feature extraction 10.01 yazılımında örneklerin data analizleri                              | 28    |
| 3.6. Kalite kontrol dataları (QC reports)   | 29    |
| 3.7. Genespring GX 10.0.2 yazılımı  | 30    |
| 4.1. Agilent Feature Extraction 10.01 yazılımında bir örneğin mikroarray image görüntüsü          | 32    |
| 4.2. Tümör dokusunda farklı eksprese olan miRNA'lara yönelik hiyerarşik kümeleme analizi          | 36    |
| 4.3. Evreye göre farklı eksprese olan miRNA'lara yönelik hiyerarşik kümeleme analizi              | 39    |
| 4.4. Dereceye göre farklı eksprese olan miRNA'lara yönelik hiyerarşik kümeleme analizi            | 40    |

## TABLOLAR DİZİNİ

|   | Sayfa |
|---|-------|
| 2.1. Mesane tümörlerinin sınıflandırılması (WHO 2004)                         | 10    |
| 2.2. Ürotelyal kanserlerin sınıflandırılması (WHO 2004 / ISUP Sınıflaması)    | 11    |
| 2.3. TNM (Tümör, Lenf Nodu, Metastaz) evreleme sistemi                        | 12    |
| 2.4. Mikroarray teknolojisinin kullanım alanları                              | 19    |
| 2.5. Mikroarray platformlarının karşılaştırılması                             | 20    |
| 4.1. Hastaların klinik ve patolojik özellikleri                               | 31    |
| 4.2. İstatistiksel p değeri <0.01 alındığında farklı eksprese olan miRNA' lar | 34    |
| 4.3. Ürotelyal karsinomda farklı eksprese olan miRNA' ların hedef analizleri  | 35    |
| 4.4. Evre ve dereceye göre farklı eksprese olan miRNA' lar                    | 37    |
| 5.1. Çalışmamızın literatürdeki çalışmalarla karşılaştırılması                | 45    |

## 1. GİRİŞ

Kanser, protein kodlayan ve kodlamayan genlerdeki yapısal ve ekspresyon anomalilerinin görüldüğü kompleks bir genetik hastalıktır. Yaklaşık 30 senedir sadece protein kodlayan onkogen ve/veya tümör süpresör genlerdeki değişimlerin kansere neden olduğu düşünülmüştür. Son yıllarda protein kodlamayan mikroRNA (miRNA)'ların da tümörogeneze katkıda bulunduğunun keşfiyle kanserin genetik nedenlerinin beklenilenden daha karmaşık olduğu ortaya çıkmıştır (1,2).

MikroRNAlar, 20-22 nükleotid uzunluğunda, tek zincirli, protein kodlamayan RNA molekülleridir. Hedef mRNA'ların 3'UTR (untranslated region) bölgelerine bağlanırlar ve gen ekspresyonunu transkripsiyon sonrası mekanizmayla baskırlar. Fonksiyonel ve transgenik fare çalışmalarında miRNA ekspresyon profilleri değerlendirilmiş ve miRNA-kanser ilişkisi kanıtlanmıştır. MikroRNAlar, hedefledikleri gene göre onkogenik ve/veya tümörsüpresör miRNAlar şeklinde sınıflandırılmaktadırlar (3,4,5).

Mesane kanseri, gelişmiş ülkelerde genitüriner sistemde 2. sıklıkla görülen kanserdir. Yaklaşık % 90 ile değici epitel karsinomu (DEK) mesane kanserlerinin en sık görülen histolojik türüdür. Hastalar kliniğe başvurduklarında %75-80 kadarında yüzeysel tümörle karşılaşılrken geri kalan % 20-25 kadarı invazif veya metastatik hastadır. Yüzeysel tümörlerin %70'inde ilk tedavi sonrasında bir veya daha fazla rekürrens görülür. Yüzeysel tümörlerin % 5-25'i daha sonrasında kas tabakaya invazyon gösterebilir. Bir çok güncel tedavi yaklaşımına rağmen ileri evre mesane kanserinde 5 yıllık sağ kalım % 20-40 civarındadır. Teknolojik gelişmelere rağmen bu oran 20 yıldır değişmemiştir ve devamlı rekürrenslerin olması ülkelerin sağlık harcamalarına büyük yük getirmektedir. Bu yüzden mesane kanserinin etyolojisinin aydınlatılıp, yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi gerekmektedir (6,7).

Oligonükleotid miRNA mikroarray analizi günümüzde kanserde miRNA ekspresyon profillinin belirlendiği etkili bir moleküler tekniktir. Günümüzde miRNA'ların kanser ve normal dokularda farklı düzeylerde eksprese oldukları bir çok çalışmada gösterilmiştir. Bu farklılıklar tümör türüne özgüdür ve bazı türlerde prognozla ilişkilendirilmiştir (1,8,9).

Bu bilgiler doğrultusunda çalışmamızda mesane kanseri ve normal mesane dokusu miRNA ekspresyon profillerinin mikroarray tekniği kullanılarak

karşılaştırılması amaçlanmıştır. Mesane kanseri patogeneğinde etkili olabilecek miRNAlar belirlenmeye çalışılmıştır. MikroRNAların hedef mRNA'larının bioinformatik açıdan değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca mesane kanserinin histopatolojik özellikleri ve miRNA ekspresyon düzeyi arasındaki ilişki belirlenmeye çalışılmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

İnsan genomunun % 65'inin transkribe olduğu tahmin edilmesine rağmen bugün için % 2'den az kısmının proteine çevrildiği bilinmektedir. Komplementer DNA (cDNA) kütüphanelerinin sistematik sekanslanması ve transkriptom çalışmaları, tüm transkribe olan RNAların en azından yarısının protein kodlamayan RNA molekülleri olduğunu göstermiştir. Bugün RNA ailesine baktığımız zaman mRNA, tRNA, rRNA moleküllerinin dışında özellikle bir çok biyolojik süreçte etkili miRNA, siRNA ve piwiRNA molekülleri bildirilmektedir (10,11).

İlk olarak 1993 yılında Ambros ve ark. protein kodlayan genlerin negatif regülatörü olarak miRNA'ları keşfetmişlerdir. C.elegansta yaptıkları çalışmada; lin-4 miRNA mutasyonunun lin-14 gen ekspresyonunu etkileyerek gelişimsel süreçte aksamaya neden olduğunu bulmuşlardır. Başlangıçta miRNAlar nematodlara ait gelişimsel genler olarak düşünülmesine rağmen let-7 miRNAsının birçok türde filogenetik olarak korunduğu bulunmuştur. Bugün araştırmacılar cDNA kütüphanelerini sekanslayarak yeni miRNAlar keşfetmeye devam etmektedirler (12).

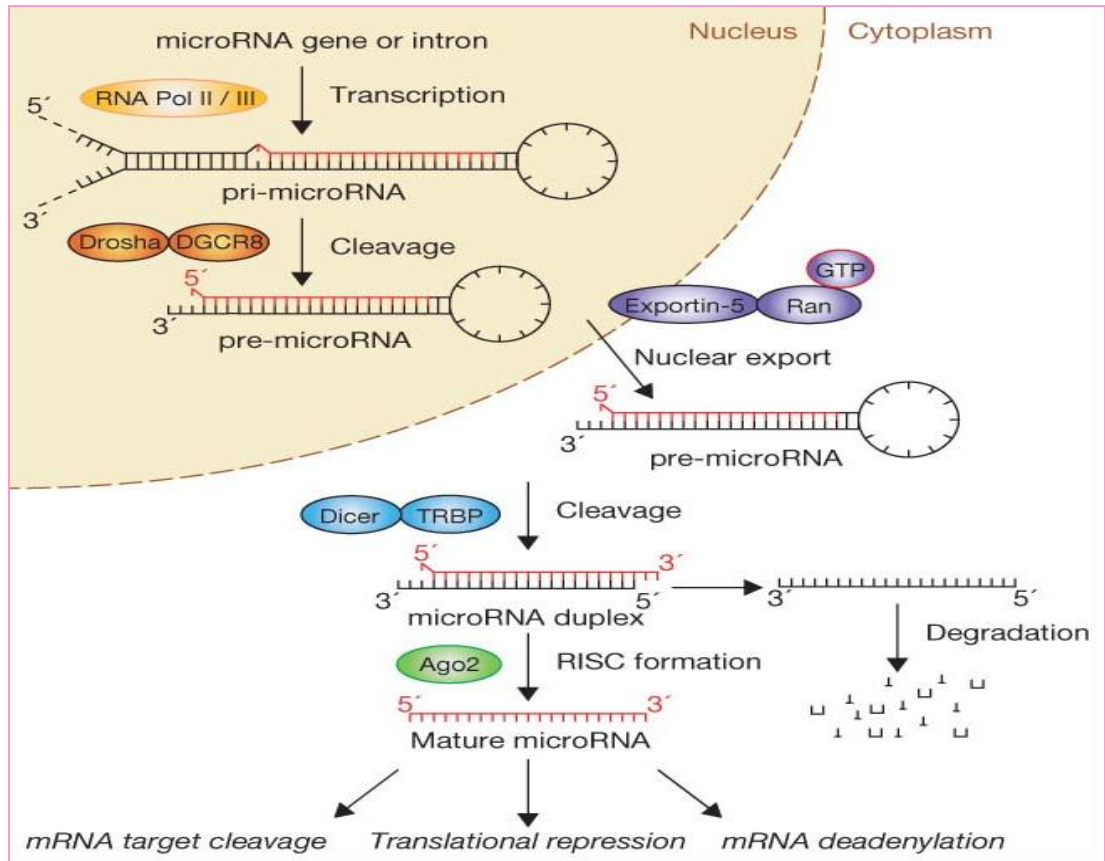
### 2.1. MikroRNA'ların Yapısı ve İşlenmesi

MikroRNAlar, genomik DNA'da ilgili miRNA geninden binlerce baz uzunluğunda primer transkript (pri-miRNA) olarak RNA polimeraz II enzimi tarafından sentezlenirler. Birbirini izleyen iki süreç ile matür miRNA oluşumu gerçekleşir. İlk aşamada, DNA'dan bilgi aktarımı ile oluşan binlerce baz uzunluğundaki pri-miRNA, yaklaşık 70 nükleotidlik prekürsör miRNA (pre-miRNA) haline getirilir. İkinci aşamada ise bu prekürsör, yaklaşık 21-25 nükleotidlik matur miRNA'ya çevrilirler.

Primer miRNAların transkripsiyonel regülasyonu hakkındaki bilgilerimiz henüz yetersizdir. Ancak, bazılarının hem protein kodlayan hem de kodlamayan genlerin intronları içerisinde lokalize oldukları ve böylece konakçı genlerin promotorları aracılığıyla transkripsiyonlarının düzenlendiği bilinmektedir. Ayrıca bazı miRNAlar polisistronik transkriptlerde demetler halinde bulunurlar ki bu da miRNAların gelişim sırasında koordineli bir şekilde regüle edildiklerini göstermektedir.

MikroRNA maturasyonu için gerçekleşen dizisel parçalanma aşamalarında “Drosha” ve “Dicer” olarak isimlendirilen iki RNaz-III enzimi rol oynamaktadır. Her ikisi de çift dal RNA (dsRNA) spesifik endonükleazlardır. Drosha çoğunlukla nükleusta lokalizedir ve iki tandem RNase-III domaini içerir: dsRNA bağlanma domaini ve fonksiyonu bilinmeyen amino-uç segmenti. Farklı yapı ve dizide olmalarına bakmaksızın Drosha pri-miRNAları yaklaşık 70bp lik parçalara bölmektedir. Bu oluşan parçalar stem-loop biçimindedirler. Drosha işlemlerinin etkinliğinde terminal ilmek boyutları, ana yapı ve Drosha parçalama bölgesi çevresindeki dizi önemli rol oynamaktadır. Terminal ilmekte kısalma, ana yapıdaki komplementerliğin bozulması ve Drosha kesim bölgesindeki dizilerin delesyonu veya mutasyonu kesim işlemini anlamlı derecede azaltmaktadır.

Nükleusta oluşan pre-miRNAlar nükleustan sitoplazmaya Exportin5 (Exp5) aracılığıyla taşınır. Exportin5 bir Ran-GTP temelli nucleo/sitoplazmik kargo transporter molekülüdür. Sitoplazmada bu firkete biçimindeki prekürsörler bir başka enzim olan “Dicer” tarafından 20-22 nükleotid uzunluğunda küçük, çift dal RNA dubleks (miRNA:miRNA\*) haline getirilirler ki bu dubleks yapıda hem matur miRNA dalı hem de onun komplementeri (miRNA\*) birlikte bulunur. Olgun miRNA, RNA’la indüklenen susturma kompleksine (RISC) katılır. MikroRNA’lar etkilerini hedefledikleri mRNA’nın 3’ UTR bölgesindeki baz komplementerliğine göre iki mekanizmayla gösterirler. Yüksek oranda 3’UTR bölgesine komplementerlik varsa mRNA degrade edilir. Komplementerlik azsa mRNA’nın translasyonu baskılanır (13) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. MikroRNA'nın işlenmesi (biyogenez) – Julia Winter (14)'dan alınmıştır.

## 2.2. MikroRNA ve Kanser

Hücreler anormal olarak proliferasyon yaptıklarında ve apoptoz fonksiyonlarını kayb ettiklerinde genelde kanserleşirler. Bugün miRNA'ların hücre proliferasyonu ve apoptoz gibi bir çok biyolojik süreçte etkili anahtar moleküller oldukları bilinmektedir.

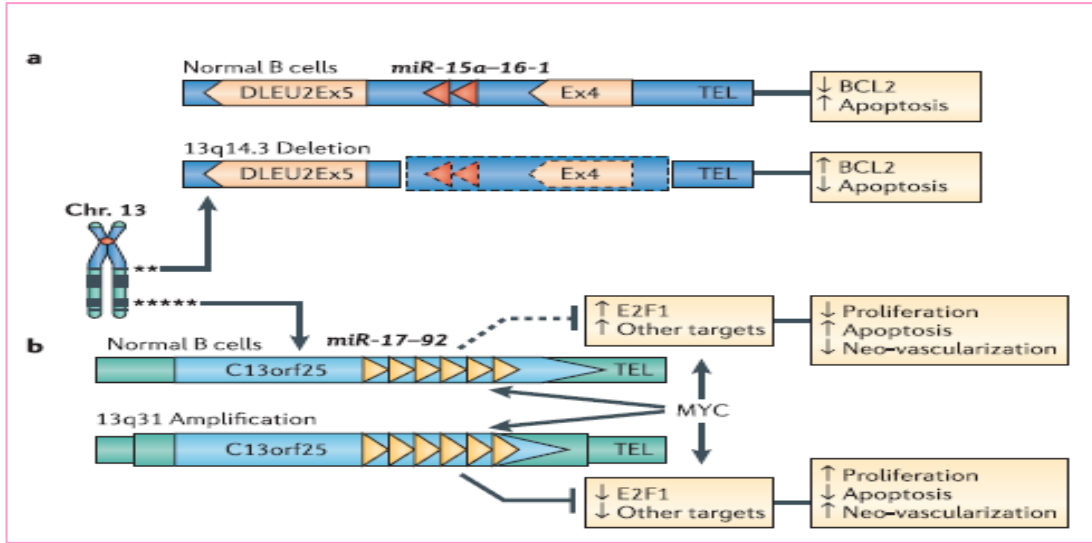
Kansereleşme sürecine miRNA'ların katkıda bulunduğu ilk kanıtı Calin ve ark. tarafından kronik lenfositik lösemi (KLL) hastalarında yaptıkları moleküler çalışmayla ortaya konulmuştur. Batı toplumlarında KLL, en sık görülen yetişkin lösemi formudur. Hastaların yaklaşık %50'sinde 13q14 bölgesi delesyona uğramaktadır. Detaylı delesyon analizleri sonucunda delesyonun olduğu bu bölgede yalnızca mir-15a ve mir-16-1 genlerinin bulunduğu tespit edilmiştir. Daha sonra KLL hastalarının % 68'inde bu miRNA'ların ekspresyonlarının azaldığı ya da olmadığı ortaya konmuştur (Şekil 2.2) (15).



Kanser ve normal doku arasındaki ekspresyon farklılıklarının belirlenmesi miRNA'ların kanser patogenezindeki rollerini güçlendirmiştir. Calin ve ark. B hücreli KLL hastalarında 245 insan ve fare miRNA probunu içeren miRNA mikroarray çalışmasıyla mir-15a ve mir-16-1'in ekspresyon düzeylerinin belirgin şekilde azaldığını, miRNA ekspresyon profilinin KLL hastalarının klinik ve biyolojik davranışıyla ilişkili olduğunu göstermişlerdir (8). Cimmino ve ark. BCL2 anti-apoptotik geninin iki miRNA tarafından hedeflendiğini ve BCL2'nin aşırı eksprese olduğu lösemi hücre serilerinde terapötik olarak kullanılabileceklerini bildirmişlerdir (16).

Akciğer kanseri yetişkinlerde en sık görülen kanser tipidir. Akciğer kanserinde let-7 miRNAsının patogeneze etkili olduğunu gösteren veriler her geçen gün artmaktadır. Takamizawa ve ark. *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarla let-7 miRNA'sının önemli derecede azaldığını ve kanser evresinden bağımsız olarak operasyon sonrası sağ kalımla ilişkili olduğunu öne sürmüşlerdir. Ayrıca let-7'nin adenokarsinomlu hücre serilerinde hücre proliferasyonu azalttığı gözlenmiştir (17). RAS ve MYC onkogenlerinin 3'UTR bölgelerinde let-7 miRNA'ya komplementer bölgeler bulunmaktadır ve let-7 bu onkogenlerin ekspresyonunu translasyon sırasında inhibe etmektedir (18).

Let-7'nin tersine mir-17-92 kümesi kromozom 13q31 bölgesinde lokalizedir. Kromozom 13q31 bölgesi akciğer kanseri yanında birçok lenfoma çeşidinde amplifiye olan bölgedir. Mir-17-92 kümesi araştırıldığında, bu miRNA kümesinin MYC tarafından aktive edildiği ve bu kümedeki mir-17-5p ve mir-20a'nın E2F1 transkriptini hedeflediği bildirilmiştir. E2F1'in aktivasyonu normal hücreleri apoptozise götürür fakat bu miRNAların amplifikasyona uğradığı hücrelerde, E2F1 ekspresyonu azalacağı için onkogeneze tetiklenir (Şekil 2.2) (19).



Şekil 2.2. Kromozom değişikliği sonrası miRNA ekspresyon farklılıkları ve kanserde etki mekanizmaları-George Calin'den (2) alınmıştır.

Kolorektal kanserlerde Michael ve ark.'ı mir-143 ve mir-145'in normal dokuya oranla tmor hücrelerinde anlamlı şekilde azaldığını bulmuşlardır (20).

Chan ve ark. mir-21'in glioblastom hastalarında anlamlı şekilde arttığını ve mir-21 susturulmuş glioblastom hücre serilerinin kaspaz aktivasyonu ile apoptozise yönlendiklerini bildirmiştir (21).

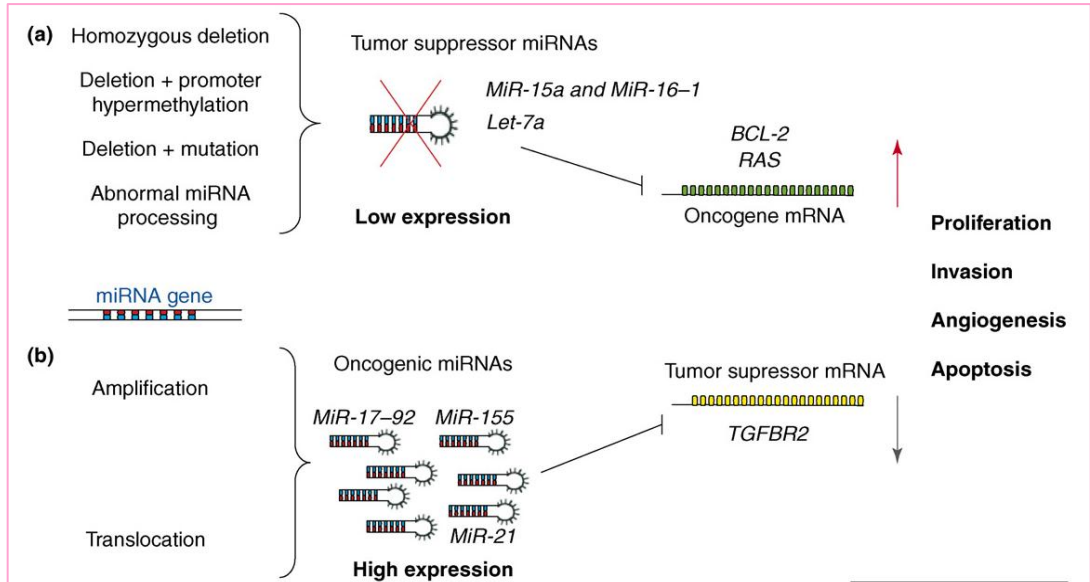
Burkitt lenfoma dahil çoğu lenfoma türünde mir-155'in normal dokuya oranla artmış ekspresyonu gözlenmiştir. BIC geni ekspresyonunun artışı Hodgkin lenfomada ve Burkitt lenfomda rapor edilmiştir. BIC ilişkili kanserlerin moleküler patogenezi henüz anlaşılabilir değildir. Yeni bir çalışmada mir-155'in, BIC geninin filogenetik olarak korunmuş bölgesinde olduğu bildirilmiştir (22).

### 2.3. Onkogenik ve Tümör (Baskılayıcı) Süpresör MikroRNA'lar

MikroRNA'lar hedefledikleri mRNA'nın moleküler yollardaki özelliğine göre onkogenik veya tümör baskılayıcı (süpresör) özellik kazanabilir. Çeşitli kanser türlerinde ekspresyon düzeyleri azaldığı için bazı miRNA'ların tümör baskılayıcı miRNA'lar olduğu düşünülmüştür. Ekspresyon düzeyi azalan bu miRNA'larla fonksiyonel çalışmalar yapıldığında bunların genelde onkogenleri hedef aldıkları görülmüştür (2,16). Dolayısıyla tümör baskılayıcı miRNA'nın ekspresyonunun azalması onkogen ekspresyonunun artmasına ve tümör oluşumuna sebep olur.

Ekspresyon çalışmalarında, çeşitli kanser türlerinde ekspresyonu artan mikroRNAlar onkogenik miRNAlar olarak düşünülmektedir. Bunlara “onkomir” adı verilir. Bu miRNAların aktivitelerinin artması hedefleri olan tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonlarının azalmasına dolayısıyla tümör oluşum ve gelişimine sebep olabileceği ifade edilmektedir (Şekil 2.3).

MikroRNAların ekspresyonlarının artmasına veya azalmasına genomik değişimler, gen mutasyonları ve epigenetik değişimler gibi bir çok mekanizma sebep olabilir. Ayrıca miRNA:mRNA komplementerliğini etkileyen mutasyonlar veya polimorfizmler translasyonu etkileyerek kanser oluşumuna katkıda bulunabilirler. Örneğin HMGA2 onkogeninin mRNA’sında let-7 komplementerliğinin olmaması hücreleri onkogenik transformasyona uğratmıştır (23). Lösemi tipi olan KLL ile ilgili yapılan çalışmada miRNA genlerinde %15 somatik mutasyon saptanması ve pri-miR-16-1/15a’da germ-line bir mutasyon bulunması miRNAların genomik mutasyonlar açısından incelenmesi gerekliliğini ortaya koymuştur (24). Ayrıca bir miRNA’nın birçok genin transkriptini hedefliyor olması, küçük bir değişikliğin dahi malign transformasyonda önemli sonuçları olacağını düşündürmektedir. Hipermetilasyon ve histon modifikasyonları gibi değişimler de miRNA ekspresyonlarını etkilemektedirler (Şekil 2.3) (25).



Şekil 2.3. Onkogenik ve tümör (baskılayıcı) süpresör miRNA’lar ve kanserdeki değişim mekanizmaları - Ramiro’dan alınmıştır (26).

## 2.4. Mesane Kanseri

### 2.4. 1. Mesane Kanserinde Etiyoloji, Epidemiyoloji ve Risk Faktörleri

Mesane kanseri gelişmiş ülkelerde üriner sistemi ikinci sıklıkta etkileyen kanser tipidir. Mesane kanseri ABD’de tüm kanserler içinde erkeklerde dördüncü, bayanlarda sekizinci sıklıktadır. ABD’de 2010 yılında 71000 kişide mesane kanseri gelişeceği (53000 erkek, 18000 bayan) ve 14000 kişinin de mesane kanserinden öleceği tahmin edilmektedir. Mesane kanseri ABD’de tüm kanserlerin erkeklerde %6’sını, bayanlarda ise %2’sini oluşturur (27).

İzmir ilinde Kanser İzleme ve Denetim Merkezi’nin (KİDEM) elde ettiği Türkiye verilerinde mesane kanseri erkeklerde en sık görülen ürolojik kanserdir. İnsidans tanım olarak 100.000 nüfusta, bir yılda yeni tanı konulan kanser olgularının sayısıdır. Mesane kanseri insidansı dünyada coğrafi bölgeler arasında 10 kat farklılık göstermektedir. Merkezin verilerine göre Türkiye’de mesane kanseri insidans hızı erkeklerde yüzde 13 ile batı ülkelerine yakın iken bayanlarda yaklaşık erkeklerin onda biri kadardır (28).

Ailesel mesane kanseri rapor edilmekle birlikte genellikle çevresel faktörler mesane kanserine sebep olmaktadır. Kabaca erkeklerde %50 ve bayanlarda %23 oranla sigara en önemli etyolojik faktördür. Mesane kanserinin yaklaşık %20’si mesleki maruz kalma sonrası oluşmaktadır.

Sigara içimi mesane kanseri riskini ortalama 2-3 kat artırır. Sigara içicilik süresi ve mesane kanseri arasında doğrudan bir ilişki vardır. Yirmi yıl sonunda risk yaklaşık 2 kat, 40 yıl sonunda risk yaklaşık 5 kat artar (29).

Sigara, kimyasal karsinojenler ve reaktif oksijen türevlerinden zengin olmakla birlikte, mesane kanserine yol açan faktörler tam olarak belirlenememiştir. Polisiklik aromatik hidrokarbonlar, aromatik aminler, unsature aldehitler sigarada bulunan potansiyel karsinojenlerdir.

Sentetik boya sanayi çalışanlarında ilk kez 19. yüzyılda saptanan kimyasallara maruz kalma ve mesane kanseri ilişkisi daha sonradan başka kanıtlarla kuvvetlenmiştir. Yirminci yüzyılda boya sanayide kullanılan aromatik aminlerden 2-naftilaminle deneysel kanser oluşturulmuştur. 1950’lerin başlarında benzidin ve 4-aminobifenile maruz kalan işçilerde mesane kanseri 30 kat fazla saptanmıştır.

Alüminyum, boya, petrol, lastik, tekstil endüstrisinde kullanılan kimyasallar insanlar için kanserojendir. Mesane tümörünün yaklaşık %20'sinin kimyasallara maruz kalma olduğu tahmin edilmektedir (30).

Mesane kanserinin etyolojisinde kemoterapotik ajanlara maruz kalma, kronik sistit, alkol, kahve, yapay tatlandırıcılar ve içme suyundaki arsenik de sorumlu tutulmaktadır.

### 2.4.3. Mesane Kanserinin Patolojisi

Malign mesane tümörlerinin %90'ı epitelyal kaynaklıdır. Geriye kalan %10 ise mezankimal, lenfoplazmositer neoplaziler ve komşuluk veya uzak metastazla gelen sekonder tümörlerdir. Mezenkimal tümörlerden leiomyosarkom, rabdomyosarkom, hemanjiom ve anjiosarkom görülebilmektedir. Sekonder tümörler genellikle komşu organlardan invazyonla gelişir. Daha seyrek olarak metastaz yapar. Komşuluk nedeniyle yayılım daha çok prostat, serviks, uterus ve rektosigmoidden kaynaklanır (Tablo2.1).

Tablo 2.1 Mesane Tümörlerinin Sınıflandırılması (WHO 2004).

|  |
|--|
| İnvazif Ürotelyal Tümörler   |
| Non-invazif Ürotelyal Tümörler   |
| Skvamöz Neoplaziler  |
| Glandüler Neoplaziler  |
| Nöroendokrin Tümörler  |
| Mezenkimal Tümörler (leiomyosarkom, rabdomyosarkom, hemanjiom anjiosarkom) |
| Hematopoetik-Lenfoid Neoplaziler   |
| Sekonder Tümörler (prostat, serviks, uterus, rektosigmoid)                 |

### 2.4.3. Ürotelyal Karsinom (Değişici Epitel Karsinomu)

Epitelyal tümörler içinde en sık görüleni ürotelyal karsinomdur. Diğer epitelyal tümörlerin başlıcaları bazı endemik bölgelerdeki skuamöz hücreli karsinom ve adenokarsinomdur.

Ürotelyal kanserlerin sınıflandırılmasında, son yıllarda Dünya Sağlık Örgütü ve Uluslararası Üropatoloji Uzmanları Birliği (WHO/ISUP) sistemi yaygınlık kazanmaktadır. Daha önce yaygın olarak kullanılan WHO sınıflamasına göre, bu sistemde yeni bir grup olarak biyolojik davranış potansiyeli papillom ve karsinom

arasında olan düşük malign potansiyelli ürotelyal neoplazi yer almaktadır. Ayrıca karsinomlar grade 1,2,3 yerine düşük ve yüksek dereceli olarak iki gruba toplanmıştır. Değişici epitelyum yerine de, ürotelyum kullanılması önerilmektedir. Grade 1 karsinom düşük dereceli, grade 2 ve 3 ise yüksek dereceli karsinom ile eşdeğerdir. Ürotelyal karsinom histopatolojik olarak papiller veya yassı morfolojide izlenir (31). (Tablo 2.2)

Tablo 2.2 Ürotelyal Kanserlerin Sınıflandırılması (WHO 2004 / ISUP Sınıflaması)

|   |
|---|
| <b>Papiller Ürotelyal Lezyonlar</b>                                       |
| Hiperplazi  |
| Papillom  |
| Papiller Neoplazi (Düşük Malign Potansiyelli Papiller Ürotelyal Neoplazi) |
| Ürotelyal Karsinom (Düşük ve Yüksek Dereceli)                             |
| <b>Papiller Olmayan Ürotelyal Lezyonlar</b>                               |
| Hiperplazi  |
| Ürotelyal Atipi(Reaktif ve önemi bilinmeyen atipi)                        |
| Displazi (Düşük dereceli intraürotelial lezyon)                           |
| Karsinoma in situ (Yüksek dereceli intraürotelyal lezyon)                 |

#### **Düşük Dereceli Papiller Ürotelyal Karsinom**

Ürotelyum hücre diziliminde bozukluk (polarite kaybı), sitolojik atipi (nukleer pleomorfizm ve belirgin nukleol), genel olarak ürotelyumun bazal seviyesini aşmayan mitotik figürler izlenir. Daha önceki WHO sınıflamasında grade 1 ile eş anlamlıdır. Rekürrens sık olmakla beraber, progresyon ve mortalite oranı azdır.

#### **Yüksek Dereceli Papiller Ürotelyal Karsinom**

Sitolojik atipi belirgindir. Pleomorfizm genelde küçük büyütmelelerde dahi fark edilir. Mitotik figürler sadece bazalde değil orta ve yüzeysel ürotelyumda görülür. Önceki WHO sınıflamasında grade 2-3 ile eş anlamlıdır. Rekürrens, progresyon ve mortalite oranı düşük dereceli ürotelyal karsinomdan fazladır (31).

#### **2.4.4. Mesane Kanserinde Evreleme**

Mesane tümörünün evrelendirilmesinde, tümörün yüzeysel veya invazif ayrımı çok önemlidir. Eğer tümör invazifse mesane duvarını aşmış ve aşmadığı saptanmalıdır. Eğer aşmış ise o zaman da yayılımın derecesini ve metastazların yerini belirlemek,

doğru tedavi yönteminin seçimi açısından önemlidir. Mesane kanserinde TNM evreleme sistemi kullanılır.(Tablo2.3)

Tablo 2.3 TNM (Tümör, Lenf Nodu, Metastaz) Evreleme sistemi

|            |            |   |
|------------|------------|---|
| <b>Ta</b>  |            | Non-invazif papiller karsinom             |
| <b>Tis</b> |            | Karsinoma in situ ‘yassı Tümör’           |
| <b>T1</b>  |            | Subepitelyal konnektif doku invazyonu var |
| <b>T2</b>  |            | Muskularis invazyonu                      |
|            | <b>T2a</b> | Yüzeyel kas (i yarısı)                   |
|            | <b>T2b</b> | Derin kas (dış yarısı)                    |
| <b>T3</b>  |            | Musklarisi açan invazyon                 |
|            | <b>T3a</b> | Mikroskopik                               |
|            | <b>T3b</b> | Mesane dışında kitle                      |
| <b>T4</b>  |            | Komşu organ, pelvis, abdomen invazyonu    |
|            | <b>T4a</b> | Prostat, uterus, vajina                   |
|            | <b>T4b</b> | Pelvis duvarı, abdomen invazyonu          |
| <b>N1</b>  |            | Tek <2 cm                                 |
| <b>N2</b>  |            | Tek 2-5 cm; multipl <5 cm                 |
| <b>N3</b>  |            | >5 cm                                     |
| <b>M0</b>  |            | Uzak metastaz yok                         |
| <b>M1</b>  |            | Uzak metastaz var                         |

## 2.5. Mesane Kanserinde Moleküler çalışmaların önemi

Ürotelyal karsinomlar mesane kanserinin %95’ini oluşturmaktadır. İlk başvuruda hastaların %75’i papiller invazif olmayan tümör (Ta) tanısı alırlar. Hastalarda ilk başvuruda %40 oranında laminapropria invazyonu (T1), muskularis invazyonu (T2-4) ve metastaz (N+, M+) görülebilmektedir. İlk tedavi sonrası hastaların %50-80 kadarında rekürens, %10-25 inde muskularis invazyonu görülür. Muskularis invazyonu olanların %50 kadarı metastatik hastalıkla gelebilmektedirler. Tümör derecesi-evresiyle progresyon, rekürens ve beklenen yaşam süresi arasında güçlü korelasyon vardır. Yüzeyel tümörlerde beklenen yaşam süresi, muskularis invazyonu ve metastazı olan hastalara oranla çok yüksektir. Mesane kanserinde muskularis invazyonu tedavi ve prognoz açısından en önemli belirleyicidir. Kas invazyonu olmayan tümörler genellikle TUR ile takip ve tedavi edilirken, kas tutulumu bulunan olgularda sistektomi veya radyoterapi tercih edilmektedir.

Özellikle T3A (mikroskopik mesane dışında invazyon) lezyonların tespit edilmesi zordur ve birçok vaka rutin uygulamalarda gözden kaçabilmektedir. Evresi

T3A olan lezyonlar, metastaz potansiyeli taşımaktadırlar ve bu sebeple komşu lenf nodlarının çıkarılması gerekmektedir. Günümüzde dolaşımdaki mikrometastazlara yol açma potansiyeli olan tümör hücreleri RT-PCR gibi tekniklerle dolaşımda belirlenmeye çalışılmaktadır.

Aynı derece ve evreye sahip tümörlerin farklı davranış göstermeleri moleküler mekanizmaların farklı tümör davranışında etkili olabileceğini düşündürmektedir. Mesane kanserinin moleküler mekanizmalarının aydınlatılması erken tanı, prognoz tayininde ve hedefe yönelik tedavilerde yol gösterici olabilecektir (31)

## 2.6. Mesane Kanserinde Tümör Belirleyiciler

Mesane kanserli yeni tanı hastalarının büyük kısmında tümörler, yüzeysel ve düşük dereceli neoplazmlar olup prognozları mükemmeldir. Ancak hastaların %30-70'inde rekürrens izlenmekte ve bunların da %10-30'unda invazif kanser gelişebilmektedir. Bu nedenle mesane kanserli hastalarda erken rekürrens ve ilerlemeyi tespit edebilmek için, sık aralıklarla sistoskopi ve idrar sitolojisi ile yakın takip gereklidir. İdrar sedimentinde atipik hücrelerin incelemesi şeklinde olan üriner sitolojik inceleme hali hazırda ürotelyal karsinomun takibinde ve tanısında sistoskopiyle birlikte en çok kullanılan testtir. Düşük dereceli karsinomda sitolojinin tanısal değeri spontan idrar örnekleri için yaklaşık %17-70, mesane yıkama sıvısı için ise yaklaşık %70-98 arasındadır. Sistoskopinin invazif işlem olması ve sitolojinin özellikle düşük dereceli lezyonlarda yeterli duyarlılığının olmaması nedeniyle günümüzde başka marker bulma çabaları artmaktadır (31).

Hali hazırda bir çok merkezde mesane kanserine yönelik tümör belirleyici testler kullanılmaktadır (Tablo2.4). Genel olarak tümör erken tanısında kullanılacak testin; hastalığın varlığında pozitif olma yüzdesi ile değerlendirilen duyarlılık (sensitivity) %100'e yaklaşmalıdır. Aynı şekilde hastalığın olmadığı durumda testin negatif olması ile tanımlanan özgüllük de (specificity) %100'e yakın olmalıdır.

Bugün için FDA (Food and Drug Administration) BTA-STAT (Bard Diagnostics, Redmond, WA, USA), BTA TRAK (Poly Med Co, Cortlandt Manor, NY,USA), NMP 22 (the nuclear matrix protein) (Newton, MA, USA), ImmunoCyt (Diagnocure Inc, Quebec City, Quebec, Canada) Urovysion FISH analizi (Urovysion



Systems Vysis, Abbott) gibi testleri ürotelyal karsinom tanısında ve takibinde kullanımını onaylamıştır.

BTA stat ve BTA TRAK testlerinde insan kompleman faktörü H ile ilişkili protein düzeyine bakılmaktadır. Bu protein değişici epitelyal karsinomlarda izlenen bir proteindir. Her iki testin duyarlılığı %60-70 arasında; özgüllüğü ise %50-75 arasında değişmektedir.

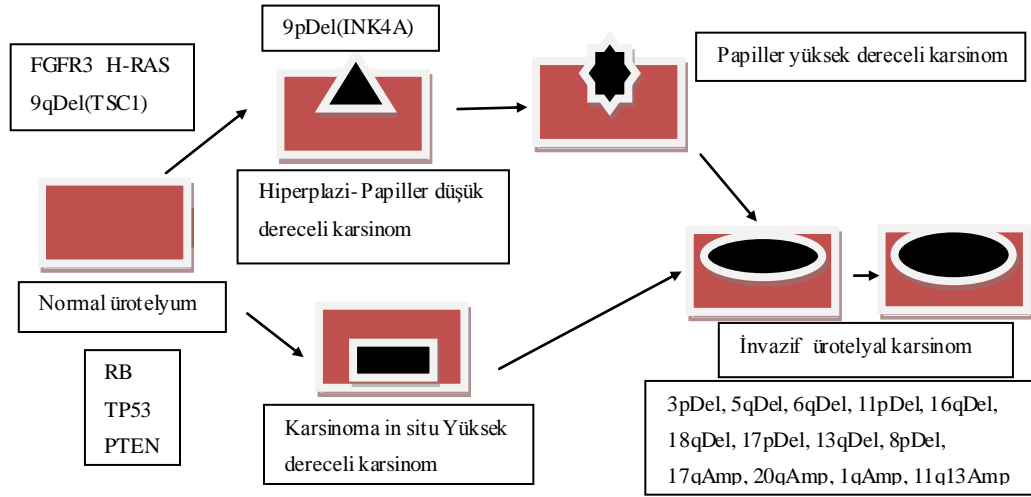
NMP 22 proteini, nükleer matriksin büyük kısmını oluşturan ve mesane kanserinde salınan bir proteindir. Bu testin duyarlılığı %60-75 arasında; özgüllüğü ise %70-75 arasındadır.

ImmunoCyt testi, immünfloresans incelemeyi sitoloji ile kombine etmektedir. Monoklonal antikoları kullanarak mesane kanserinde eksprese edilen yüksek molekül ağırlıklı karsinoembriyonik antijen ve müsini tespit etmektedir. Duyarlılık ve özgüllük oranları sırasıyla %70-95 ve %70-85 arasında değişmektedir (31).

Urovysion testiye mesane kanserinde sıklıkla kromozomal değişimlerin görüldüğü bölgelere yönelik problemlerle (CEP 17, CEP 3, CEP 7 ve LSP 9p21) yapılan FISH testidir. Urovysion testinin mesane kanseri tanısındaki değeri Mowatt ve ark. tarafından 2010 yılında 12 çalışmanın (Toplam 2535 hasta) meta-analizi yapılarak değerlendirilmiştir. Duyarlılık %76; özgüllük ise % 85 olarak bildirilmiştir (32).

## **2.7. Ürotelyal Karsinom Genetiği**

Moleküler genetik çalışmalar sonucunda ürotelyal karsinom gelişiminde iki yolağın etkili olduğu bildirilmiştir. Histopatolojik ve spesifik genetik değişimler sonucu ortaya konulan bu yolaklar; klasik olarak iyi prognozun beklendiği hiperplazi, papiller düşük dereceli karsinom yolağı ve kötü prognozun beklendiği karsinoma in situ-yüksek dereceli ürotelyal karsinom yolağıdır (33) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Mesane kanserinde moleküler yollar.

### Hiperplazi ve Papiller Düşük Dereceli Ürotelyal Karsinomda Tümör Baskılayıcı Genler ve Onkogenler

Kromozom 9'un total veya parsiyel delesyonu ürotelyal hiperplazili ve düşük dereceli karsinom hastalarında sık görülen bir anomalidir. Kromozom 9q bölgesinde haritalanan TSC1, PTCH ve DBC1 genlerinin papiller invazif olmayan mesane kanserinde etkili olduğu düşünülmektedir. Kromozom 9p21 bölgesinde INK4A/ARF lokusu bulunmaktadır ve bu bölgede lokalize olan P16 ve P14 gibi siklin bağımlı kinaz inhibitörleri kodlanmaktadır. Bu bölgenin delesyonu P53 ve RB yollarını etkilemektedir. Ayrıca INK4A/ARF bölgesi delesyonları yüksek dereceli yüzeysel karsinomlarla da ilişkilidir (34).

Moleküler genetik çalışmalarda, invazif olmayan (Ta) ve yüzeysel invazif (T1) olan ürotelyal kanserlerde FGFR3 gen mutasyonlarının sık görülmesine (%70) rağmen P53 gen mutasyonlarının nadir olduğu ortaya konmuştur. Zieger ve ark. Ta karsinomlarında sadece kromozom 9'a ilişkin anomalilerin gözlemlendiğini ve bu karsinomların genetik stabilite gösterdiklerini bildirmişlerdir. Buna karşılık T1 karsinomlarının genetik olarak stabil olmadığını ve 17p, 13q, 8p kromozom değişimlerini içerdiğini bildirmişlerdir (35).

Bir proto-onkogen olan H-RAS genindeki mutasyonlar, mesane kanseri gelişimi ve progresyonuyla ilişkilidir. RAS onkogeninin kodon 12 ve 61 değişimleri, mesane kanseri hastalarının %20 kadarında görülür. H-RAS genindeki aşırı

ekspresyon invazif olmayan hastalarda erken nüksle sonuçlanacağını öne sürenler olduğu gibi bu bulgunun aksini savunanlar da olmuştur (36).

### **Karsinoma in-situ ve İnvazif Ürotelyal Karsinomda Tümör Baskılayıcı Genler ve Onkogenler**

Papiller düşük dereceli tümörlerde daha sık görülen onkogenik değişimlerin tersine invazif ürotelyal karsinomlarda tümör baskılayıcı gen değişimlerine daha fazla rastlanmaktadır (Şekil 2.4). Tümör Baskılayıcı genlerden TP53, RB ve PTEN daha çok invazif ürotelyal kanser hastalarındaki genomik instabiliteden sorumludur (34).

Kromozom 13q14 bölgesinde lokalize RB geni, hücre döngüsünün G1/S geçişini engelleyen bir protein (pRb) kodlamaktadır. PRB inaktivasyonu, bu genin fosforilasyonunu katalizleyen siklinler tarafından gerçekleştirilir. Siklin bağımlı kinaz inhibitörleri (p21, p16, p27, p14, p57) siklin kompleksini inhibe ederek PRB fosforilasyonunu engellerler.

RB gen değişimi yüksek derece ve evredeki tümörlerde bulunur. RB kaybı olmayan hastalarda evreden bağımsız olarak beklenen yaşam süresi RB kaybı olanlardan daha uzundur. Özellikle invazif karsinomlu hastalarda RB kayıpları yaşam süresinin daha kısa olacağını göstermektedir (37, 31).

Kromozom 17p13 bölgesinde bulunan P53 geni, hücre döngüsünde kontrol noktalarını (p21), apoptozisi (BAX), DNA tamirini (GADD45) ve angienezisi (trombosponin) kontrol eden genlerin ekspresyonunu aktive eden bir transkripsiyon faktörü olarak görev yapar. Mutant P53 proteini, 'wild tip' P53'den daha uzun yarılanma ömrüne sahip olduğu için nükleusta birikir ve immünohistokimyasal olarak belirlenebilir.

İnvazif mesane kanseri nedeniyle radikal sistektomi uygulanan hastalarda P53 mutasyonları kanser nüksünü artırıp, beklenen yaşam süresini azaltmaktadır (38). Nükleusta p53 birikimi, kasa invaze tümörlerde ek prognostik faktör olmasının yanında intra vesikal BCG tedavisi uygulanan yüzeysel mesane tümörlerinde nüksü öngörebilir (39,40). Tüm bu verilerin aksine çoklu değişken analizlerde P53 protein düzeyi ile tümör evresi ve derecesi karşılaştırıldığında, P53 proteinin

immünohistokimyasal olarak gösterilmesinin hastalığın doğal seyrine yönelik ek katkı sağlamadığını belirten görüşler de vardır (41).

PTEN geni özellikle mesane kanserinin ileri evrelerinde delesyona uğrayan 10q23 bölgesine lokalizedir. Tirozin kinazları inhibe ederek tümör baskılayıcı rol oynamaktadır. Allelik değişimleri 60 invazif olmayan tümörün sadece %6'sında görülürken 53 kas invazyonu olan tümörün %32'sinde saptanmıştır (42).

## **2.8. Mesane Kanseri ve mikroRNA**

Mesane kanserinde ilk miRNA mikroarray çalışması Gottardo ve ark. tarafından yapılmıştır. Toplam 25 ürotelyal karsinomda 245 miRNA'nın ekspresyonları mikroarray yöntemiyle incelenmiştir. Mir-223, mir-26b, mir-221, mir-103-1, mir-185, mir-23b, mir-203, mir-17-5p, mir-23a ve mir-205 gibi mikroRNAların ekspresyonlarının normal dokuya oranla arttığı gözlenmiştir (1.2 kat eşik değer,  $P < 0.05$ ). Araştırmacılar ayrıca ilerleyen evre ile birlikte (T1-T4) birlikte mir-26b'nin azalma eğiliminde olduğunu belirtmişlerdir. Analizlerinde normal dokuya göre azalan miRNA tespit etmemişleridir (43).

Neely ve ark. 343 miRNA'nın ekspresyonunu invazif ve invazif olmayan mesane kanseri hücre serilerinde mikroarray yöntemiyle incelemişlerdir. Mir-21:mir-205 oranının invazif olanlarda olmayanlara göre 10 kat fazla olduğu tespit edilmiştir. Benzer oran 53 mesane kanseri olgusunda da bulunmuş ve mir-21:mir-205 oranının invazyonu tespit etmede % 100 duyarlılık ve % 78 özgünlükte olduğu tespit edilmiştir (44).

Takahiro ve ark. 14 mesane kanserini ve 5 normal mesane epitelyumunu 156 miRNA açısından mikroarray yöntemiyle karşılaştırmışlardır. Mir-145, mir-30a-3b, mir-133a, mir-133b, mir-195, mir-125b ve mir-199a gibi mikroRNAların ekspresyonlarının mesane kanseri örneklerinde azaldığını belirtmişlerdir. Keratin-7 mRNA'sının bu mikroRNAlar için ortak hedef bölge olduğunu ve keratin-7 mRNA'sının mesane kanseri dokularında azaldığını belirtmişlerdir (45).

Srinivas ve ark. 34 ürotelyal karsinomda yaptıkları çalışmada invazif tümörlerde mir-222 ve mir-125'nin Ta tümörlere oranla fazla eksprese olduğunu ayrıca Ta tümörlerde mir-10a'nın invazif tümörlere oranla fazla eksprese olduğunu bildirmişlerdir. Üç hastada mi-31'in lokalize olduğu 9p21 bölgesinin delesyona

uğradığını ; Mir-452 ve mir-452\*'in lenf nodu pozitif tümörlerde eksprese olduğunu bildirmişlerdir (46).

Tianxin ve ark. mir-143'ün mesane kanserinde tümör baskılayıcı mikroRNA olabileceğini ve RAS onkogenini hedefleyebileceğini belirtmişlerdir (47).

Lars ve ark. 106 mesane tümörü ve 11 normal urotelyumda 290 mikroRNA'nın ekspresyonunu karşılaştırmışlardır. Mir-145'in kanser dokusunda en çok ekspresyonu azalan ve mir-21'in kanser dokusunda en çok ekspresyonu artan mikroRNAlar olduğunu belirtmişlerdir. Mir-129'un preküsörünü mesane kanseri hücre serilerine verdiklerinde tümörlerde büyümenin yavaşladığını saptamışlardır (48).

Merle ve ark. mesane kanserli hastaların idrar örneklerinde 157 mikroRNA'yı RT-PCR yöntemiyle incelediklerinde mir-126:mir-152 oranının %72 duyarlılık ve % 82 özgüllükle mesane kanserini tespit edebildiğini belirtmişlerdir (49).

Qiang ve ark. yaptıkları çalışmada, mir-221 mesane kanseri hücre serilerinde antisense oligonükleotidle susturulmuş ve kanser hücrelerinin böylece apoptozise girdiği tespit edilmiştir (50).

Hushan ve ark. mesane kanserinde miRNA'ların hedef genlerindeki SNP çalışmalarında GEMIN3 genindeki polimorfizmin mesane kanseri için artmış risk ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir (51).

Yapılan çalışmalarla miRNA'ların mesane kanserinde rol oynadığı aşikar olmasına rağmen çalışmalar arasında farklılıklar bulunmaktadır. Mesane kanserinde daha fazla çalışmanın yapılmasıyla mikroRNA'ların karsinogenezdeki rolü açığa kavuşmuş olacaktır.

## 2.9. Mikroarray Teknolojisi

Mikroarray teknolojisi, nükleotid baz eşleşmesi (hibridizasyon) prensibi temel alınan bir tekniktir. Bu tekniğin en önemli özelliklerinden biri tek bir reaksiyonda tüm bilinen insan genlerinin ekspresyonlarını belirlemeyi mümkün kılmasıdır.

İlk kez 1995 yılında Patrick O. Brown, 45 genin ekspresyon analizinin, tek reaksiyonda cam slayt üzerindeki cDNA problemlerine hibridizasyonla mümkün olabileceğini göstermiştir. 1995 yılından günümüze teknik hızla ilerlemiş ve bugün

bilinen tüm ökaryotik genlerin ekspresyonları dahil birçok uygulamada kullanılır hale gelmiştir (52). (Tablo2.5)

Tablo 2.4. Mikroarray teknolojisinin kullanım alanları

| Uygulama/<br>Teknoloji        | Özet   |
|-------------------------------|--|
| Gen Ekspresyonu Analizi       | Organizmanın hastalık durumunda, tedaviye yanıt durumunda veya bir patojenle karşılaştığı durumda gen ekspresyonu profili çıkarılabilmektedir.   |
| ArrayCGH                      | Organizmanın genomik DNA'sının delesyon veya amplifikasyon durumu hastalıklarda (Kanser, Konjenital anomali vs) değerlendirilebilmektedir.   |
| GeneID                        | Küçük mikroarraylerle yiyeceklerdeki organizmalar, hücre kültüründeki mikoplazma veya patojenik ajanlar tespit edilebilmektedir.   |
| Chip on Chip                  | Proteinlerin DNA'ya bağlandığı bölgeler belirlenebilmektedir.  |
| SNP array                     | Allellerdeki SNPler mikroarray teknolojisiyle belirlenebilmektedir. Genotiplendirme, adli tıp uygulamaları, kanser predispozisyonu, bağlantı analizleri gibi birçok uygulamada kullanılmaktadır.       |
| Alternatif-splicing belirleme | Ekzon-Intron bağlantı noktalarına özel proplarla alternatif splicing tipi belirlenmeye çalışılmaktadır.  |
| Füzyon-gen mikroarray         | Özellikle kanser hastalarında füzyon transkriptlerini belirlemede kullanılmaktadır.  |
| Tilling array                 | Tilling arrayler için üst üste gelen proplar dizayn edilir ve özellikle belirlenmek istenen genomik diziler için kullanılır.   |
| Re-sequencing                 | DNA sekanslarının mikroarraydeki proplarla belirlenebilir. Bilinen hastalıklara yönelik mutasyonların veya SNP'lerin belirlenmesinde kullanılır. Dizilere özgü proplara hasta DNA'sı hibridize edilir. |

### 2.9.1. Mikroarray Platformları

Mikroarrayler çok çeşitli teknolojilerle üretilebilirler. Solid destek üzerinde oligonükleotidler '*in situ*' üretilebilirken aynı zamanda PCR'la üretilen fragmanlar veya cDNAlar array üzerine 'print' edilebilir. Mikroarrayler teknolojik olarak cDNA mikroarrayleri ve oligonükleotid mikroarrayleri şeklinde sınıflandırılabilirler. cDNA arrayleri uzun, ilgilenilen mRNA'ya komplementer olurken oligonükleotid arrayler genelde 20-60 nükleotid uzunluğunda propları içerirler. Günümüzde çeşitli ticari ve laboratuvarların kendilerinin ürettikleri mikroarrayler kullanımdadır. (Tablo2.6)

Tablo 2.5. Mikroarray platformlarının karşılaştırması

|                   | Prop tip | Printing method           | Saptama metodu           | Tek veya iki renkli sistem |
|-------------------|----------|---------------------------|--------------------------|----------------------------|
| <b>cDNA array</b> | Cdna     | Robotik print             | Cy3,Cy5                  | İki renkli                 |
| <b>Affymetrix</b> | 25mer    | Fotolitografik sentez     | Floresan                 | Tek renk                   |
| <b>Agilent</b>    | 60mer    | İn situ ink-jet ve sentez | Floresan                 | İki renk                   |
| <b>ABI</b>        | 60mer    | Robotik print             | Digo xigenin             | Tek renk                   |
| <b>CodeLink</b>   | 30mer    | -                         | Streptavidin-Alexa flour | Tek renk                   |
| <b>Nimble Gen</b> | 24mer    | İn situ sentez            | Floresan                 | Tek veya iki               |

Mikroarray teknolojisinde lam, silikon veya poliakrilamid gibi bir solid desteğin üzerine ilgilenilen materyalle ilgili (DNA, mRNA, protein, miRNA) problemler robotik olarak sırayla yerleştirilirler. Floresan boya larla (genelde Cy3,Cy5) işaretlenen örnekler propların üzerine uygun koşullarda hibridize edilirler. Hibridasyon sonrasında yanlış bağlanan propları uzaklaştırmak için değişik tuz solüsyonlarıyla yıkama işlemi gerçekleştirilir. Floresan boya larının ışımaya yoğunlukları yüksek rezolüsyonlu tarayıcılarla tespit edilir (53).

Mikroarray teknolojisinde binlerce özellik incelenmesine rağmen bir çok merkezin data ları arasında farklılıklar ortaya çıkabilmektedir. Farklı array formatlarının kullanımı veya yöntem sırasında optimal olmayan uygulamalar mikroarray data larının analizini zorlaştırmaktadır. İleride analiz yöntemlerinin gelişmesiyle ve otomatize yöntemlerin uygulanmasıyla bu problemler aşılabılır.

### 2.9.2. Mikroarray Teknolojisinde Data Analizi

Mikroarray analizinde öncelikle tarayıcıdan çıkan görüntülerin kalitesinin belirlendiği ve array üzerindeki artefaktların analiz dışı bırakıldığı image analizleri yapılmaktadır. Görüntü analizi sonrasında elde edilen verilerin istatistiksel olarak normalizasyonları yapılmaktadır. Normalizasyonu yapılan arraylerin sinyal yoğunluklarının  $\log_2$  çevirimleri yapıldıktan sonra istatistiksel olarak örnekler karşılaştırılmaktadırlar. İstatistiksel olarak t-test, ANOVA (Analysis of variance), SAM (significane analisis of microarray), Bayes yöntemi ve Mann-Whitney gibi yöntemlerle veriler karşılaştırılabilmektedir. Ayrıca kümeleme analizi gibi istatistiksel yöntemlerle çoklu veriler arasında ilişki bulunmaya çalışılmaktadır (53).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1 Hasta Grubu

Çalışmamıza Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalında mesane kanseri tanısı nedeniyle opere edilen 17 tümör dokusu ve 6 normal doku örneği dahil edilmiştir. Örneklerin patolojik derece ve evreleri Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalı'nda yapılmıştır. Çalışmaya mesane tümörlerinde %95 sıklıkta görülen ürotelyal karsinom (değişici epitelyum karsinomu) patolojik tanı örnekleri alınmıştır. Çalışmaya dahil edilen hastalardan aydınlatılmış onam formu ve Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulundan 31.07.2009 tarihli, 2009/347 sayılı etik kurul raporu alınmıştır. Mesane doku örnekleri operasyon sonrası RNA later solüsyonu içine alınmış ve -20°C'de saklanmıştır. Çalışmamız Mart 2008- Eylül 2009 tarihleri arasında Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalında gerçekleştirilmiştir. Ürotelyal karsinomlu olguların miRNA ekspresyon profilleri mikroarray yöntemiyle incelenmiştir.

#### 3.2 Gereçler

##### 3.2.1 Kullanılan Aletler

Spektrofotometre (NanoDrop)

Bioanalizer (Agilent)

Slayt Tarayıcı (Scanner) (Agilent)

Hibridizasyon firmı (Agilent)

Hibridizasyon hücresi (Agilent)

Slayt boyama tabağı, kapak, sepet (Agilent)

Mikro Pipet takımı (Gilson)

Mikrosantrifüj (Eppendorf)

Thermal cycler (Gold 96 Well GenAmp PCR System 9700 ABI PRISM)

Su banyosu (Nüve)

Vorteks (Heidolph)

Deep-freeze (Meraeus)

Buzdolabı (Arçelik)



Ependorf Tüpü (1,5 ml lik)

PCR tüpleri (strip) (Perkin Elmer)

### 3.2.2 Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Trizol reagent(100 ml)(Sigma)

10X alkalın fosfataz buffer (Agilent)

Dana-bağırsak-alkalin- fosfatazı(CIF),(1000U)(Agilent)

T4 RNA ligaz (1500 U, 5U/mikrolitre)(Agilent)

T4 RNA ligaz buffer (Agilent)

İnsan miRNA mikroarray kiti(Agilent)

Dimetil sülfoksit >%99.9 (DMSO) 50 ml(Agilent)

miRNA işaretleme ve hibridizasyon kiti (Agilent)

Gen ekspresyon yıkama paketi (Agilent)

DNase/Rnase free distile su(Qiagen)

RNAlater (Qiagen) Bioanalizer nano 6000 RNA kit (Agilent)

### 3.3 Yöntem

#### 3.3.1. Taze Doku Örneklerinden Total RNA İzolasyonu

Taze doku örneklerinden total RNA izolasyonundan önce örnekler petri kabında trizol solüsyonu içinde küçük parçalara ayrılıp, havanda iyice homojenize edildi. Taze doku örneklerine uygulanan total RNA izolasyon protokolü aşağıda maddeler halinde belirtilmiştir;

-Solusyondan 15-30 mg arasında doku alınıp; 1 ml trizol solüsyonunun içine konulup 15-30 °C'de 15 dk bekletildi.

- Üzerine 0.2 ml kloroform eklendi ve yavaşça (15sn) karıştırılarak oda ısısında 2-3 dk bekletildi.

-Örnekler 15dk 2-8 °C'de, 12000 g'de santrifüjedildiler. Santrifüj sonrasında örnekler altta fenol-kloroform fazına, bir ara faza ve en üstte renksiz akköz faza ayrılmaktadır ki RNA akköz fazdadır.

-Akköz faz ayrı ependorf tüpüne aktarıldı ve 0.5 ml izopropil alkolle karıştırılarak örnekler oda ısısında 10 dk bekletildi. Sure sonunda örnekler 10 dk 12000 g'de santrifüj edildiler..

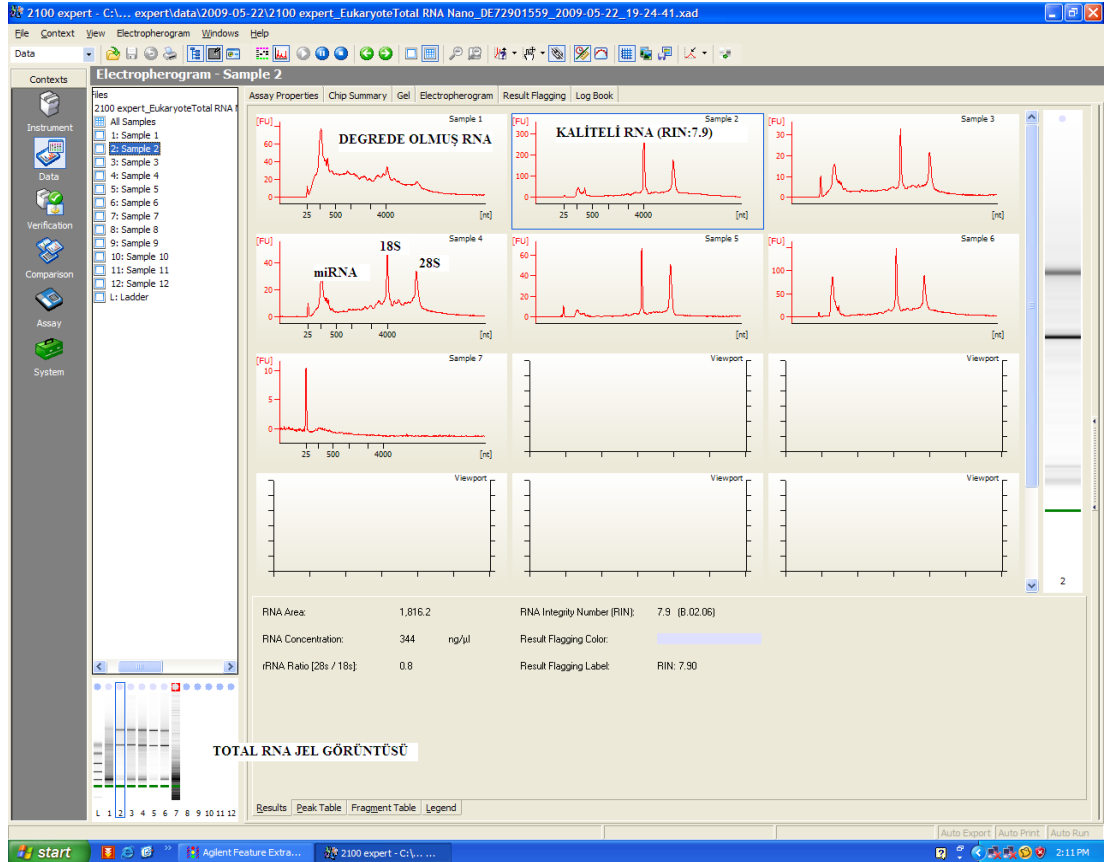
-RNA tütün dibinde jel kıvamında presipite oldu. Süpernat atıldı ve RNA peleti 1 ml %75'lik etanolle yıkanıp vortekslendi ve 7500 g'de 5 dk santrifüj edildi.

-RNA peleti 5 dk +4 °C'de kurutuldu (tamamen kurumaması gerekir) ve RNAaz free suyla sulandırıldı. Örnekler 10-15dk 55-60°C'de su banyosunda bekletildiler ve Nanodrop spektrofotometreyle miktar ve kalite değerlendirmesi yapıldı.

### 3.3.2. Total RNA Kalitesinin ve Miktarının Spektrofotometre ve Bioanalizer Cihazıyla Tayini

Kaliteli total RNA istatistiksel olarak doğru karşılaştırılma yapılması için gereklidir. İzole edilen total RNAların nanodrop spektrofotometre cihazıyla ölçümleri yapıldı. A260/280 oranı 1.8'in altındaki veya A260/230 oranı 2.0'ın altında olan örnekler çalışmaya dahil edilmedi.

Kalite ve miktarı uygun olan örneklerde Bioanalizer (Agilent) cihazında nano 6000 RNA kiti (Agilent) kullanılarak fragman analizi yapıldı ve RIN (RNA Integrity Number) değerleri 4'ün üstündekiler ileri mikroarray analizine alındılar. (Şekil 3.1)



Şekil 3.1. Agilent 2100 Bioanalizer'de total RNA elektroforegram görüntüsü.

### 3.3.3 İşaretleme ve Hibridizasyon Aşaması

#### Defosforilasyon

- Total RNAların 50ng/μl olacak şekilde RNAaz free suyla dilüsyonu yapıldı ve 0.5ml nükleaz içermeyen tüplere konularak buz üstünde bekletildiler.
- CIP (Calf Intestinal Phosphatase) master mix hazırlanıp örneklerin üzerine 2μl eklenip pipetaj yapıldı.
- Örnekler 37°C'de 30 dk PCR cihazında bekletilerek defosforilasyon işlemi tamamlandı.

#### CIP master mix hazırlanışı

| Komponent          | Hacim(μl/reaksiyon) |
|--------------------|---------------------|
| 10x CIP bufer      | 0.4                 |
| RNAaz free su      | 1.1                 |
| CIP                | 0.5                 |
| <b>Total hacim</b> | <b>2.0</b>          |

#### Denatürasyon

- Her tüpe 2.8 μl DMSO (Dimetil Sülfoksit) eklendi ve 100°C'de 5-10 dk PCR cihazında muamele edilip hemen su-buz karışımına alınarak 10 dk bekletildiler.

#### Ligasyon

- Tüm presipitatlar çözülene kadar 10x T4 RNA ligaz buffer solusyonunda 37°C'de su banyosunda bekletilip vortekslemler. T4 RNA ligasyon master mix hazırlandı ve her bir örneğe 4.5 μl eklendi.
- Örnekler 16°C'de 2 saat PCR cihazında bekletildi.

### T4 RNA ligasyon master mix hazırlanışı

| <b>Komponent</b>           | <b>Hacim (µl/reaksiyon)</b> |
|----------------------------|-----------------------------|
| 10x T4 RNA ligasyon buffer | 1.0                         |
| pCp-Cy3                    | 3.0                         |
| T4 RNA ligaz               | 0.5                         |
| <b>Total Hacim</b>         | <b>4.5</b>                  |

- 2 saat sonunda örneklerin kuruması ve DMSO'nun tamamen uzaklaşması için 6 saat 65°C'de PCR cihazında bekletildiler.

### Hibridizasyon

- Hibridizasyon fırını 55°C'e getirildi. Kuruyan örnekler 18µl RNaz suyla resüspanse edilip. 4.5 µl 10x GE Blocking agent eklendi.
- Her tüpe 22.5 µl 2x hibridizasyon buffer eklendi ve hafif vortekslandılar.
- Tüpler 100 °C'de 5 dk PCR cihazında bekletilip hemen su-buz karışımına alındılar. Buradaki hedefimiz örnekleri en kısa süre içerisinde array üzerine yüklemektir.
- Contalı taban slaytı (Gasket) hibridizasyon hücresinin tabanına konuldu ve örnekler tek tek yüklendi.
- Örnekler yüklendikten sonra array preperatı aktif yüzü örnekleri görece şekilde gasket slaytın üzerine hafifçe yerleştirildiler. Örneklerden sızıntı olmamasına dikkat edildi.
- Hibridizasyon hücresi kapatılıp; vidası sıkıca sıkıldı.
- Hibridizasyon fırınının hızı 20 rpm'ye sabitlendi ve örnekler 55°C'de 20 saat hibridize edildiler (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Hibridizasyon hücresinin tabanındaki gasket slayta örnek yüklenmesi- Hibridizasyon fırını

### 3.3.4. Posthibridizasyon Yıkama

- Posthibridizasyon yıkama solüsyonları ilk açıldığında Triton X-102 eklenmelidir. Yıkama solüsyonu 2, bir gece önce 37°C’de bekletilmelidir.
- Yıkama solüsyonları manyetik karıştırıcıların üzerinde olacak şekilde aşağıdaki gibi yıkama gerçekleştirildi.

| Yıkama             | Yıkama solüsyonu   | Sıcaklık  | Süre | Slayt ayrılması |
|--------------------|--------------------|-----------|------|-----------------|
| Yıkama solüsyonu-1 | Oda ısısı          | -         |      |                 |
| İlk yıkama         | Yıkama solüsyonu-1 | Oda ısısı | 5dk  |                 |
| İkinci yıkama      | Yıkama solüsyonu-2 | 37°C      | 5dk  |                 |

- Yıkama işleminde özellikle yıkama solüsyonu-2’den preperat alınırken çok yavaş olunmalıdır.
- Yıkama tamamlandıktan sonra array preperatı hemen tarayıcıya yüklenerek tarama işlemi gerçekleştirildi.

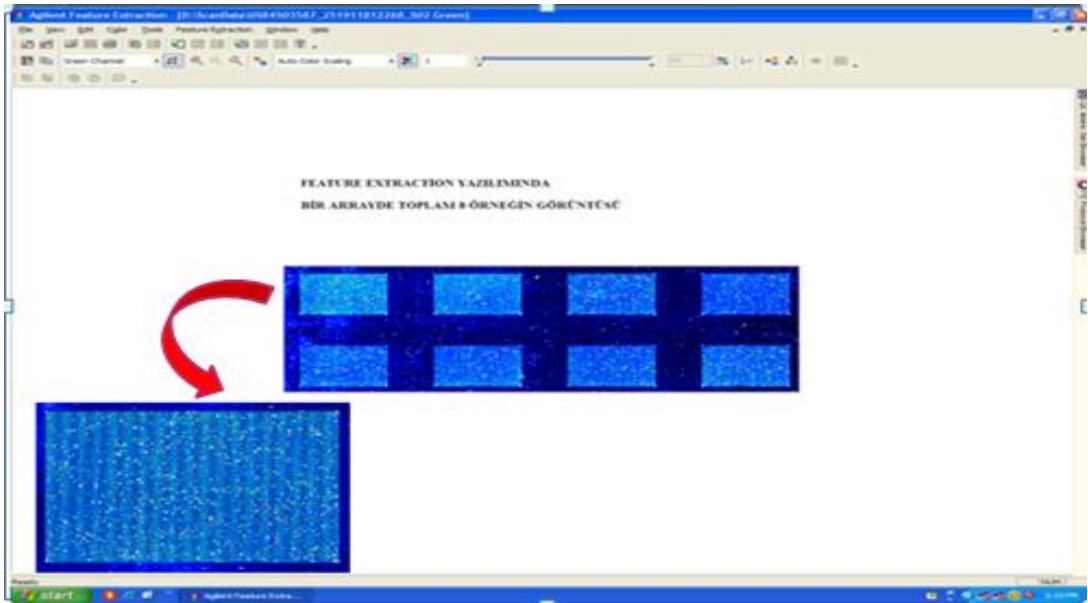
### 3.3.5. Preperat Taraması ve Feature Extraction 10.01 Yazılımıyla Görüntü Analizleri

- Agilent tarayıcı kullanılarak, softwarede miRNA protokolü seçilerek, 5  $\mu$  rezolüsyonda array preperatları tarandı.



Şekil 3.3. Agilent slayt tarayıcı

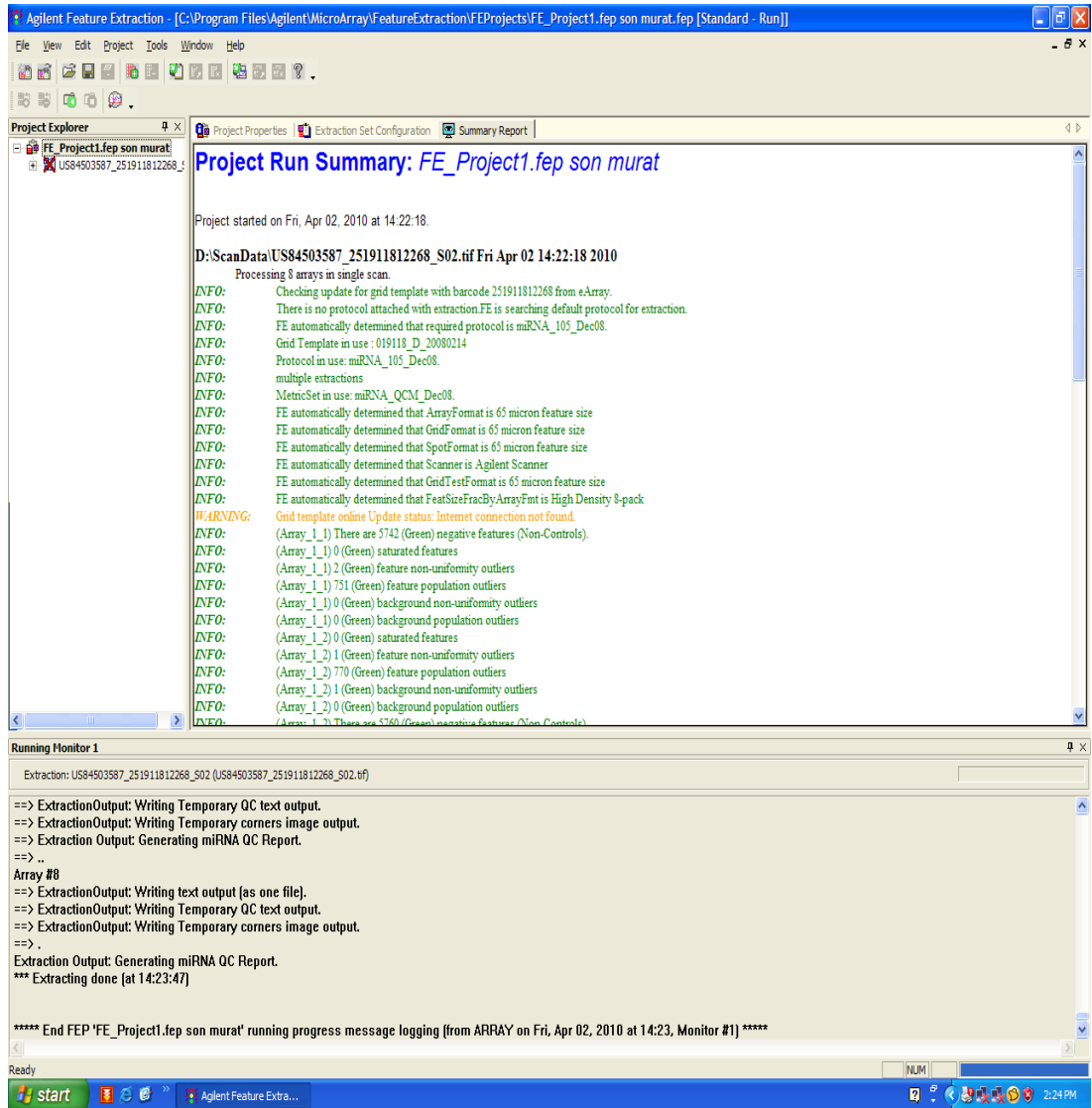
-İmage görüntüleri feature extraction 10.01 yazılımıyla açıldı.



Şekil 3.4. Feature extraction 10.01 yazılımında array preperatının görüntüsü. Bir arrayde 8 örnek çalışılabilmektedir.

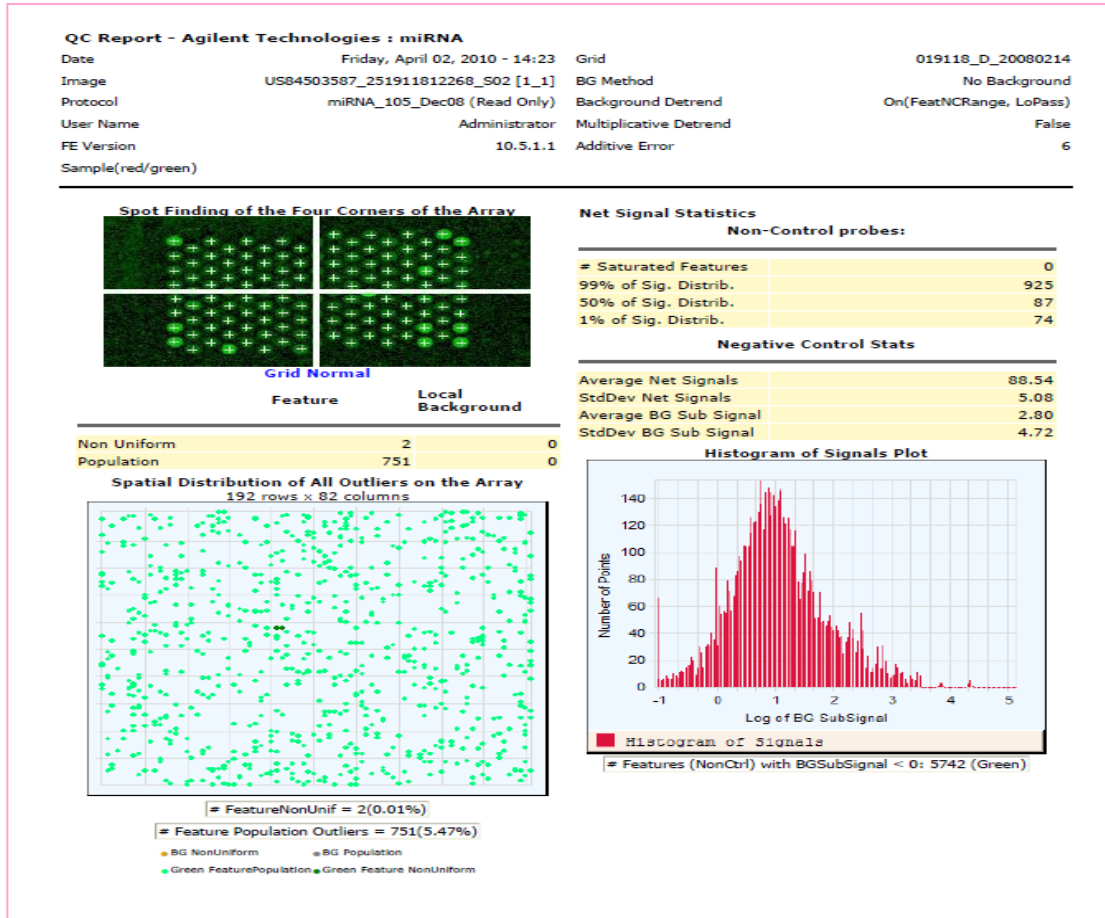
-Görüntülerin spot analizleri yapıldı ve artefaktlar analiz dışı bırakıldı. Artefakt olarak post hibribizasyon basamağından sonra lam üzerinde kalan istenmeyen toz, leke vs. değerlendirildi.

-Yazılımda uygun grid modu ve protokol (miRNA) seçilerek data lar çıkarıldı. Lam üzerindeki her noktaya karşılık gelen miRNA isminin ve lokalizasyonunun bulunduğu grid modu, sinyal miktarının ölçülmesi basamağından önce mutlaka hassasiyetle yerleştirilmelidir.



Şekil 3.5. Feature extraction 10.01 yazılımında örneklerin data analizleri. Görüntüsü çıkarılan arrayin grid pozisyonlamaları yapılıyor. Ardından spotlardaki sinyal seviyeleri ölçülerek data lar çıkarılıyor.

-Arrayle ilgili kalite kontrol dataları (QC reports) incelendi.



Şekil 3.6. Kalite kontrol dataları (QC reports). Array preparatının grid pozisyonu, sinyallerin kalitelerini ve artefaktları değerlendirmeyi sağlamaktadır.

### 3.3.6. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz GenespringGX 10.02 yazılımı kullanılarak yapılmıştır. GenespringGX yazılımında arraylerin 'Quality Control Metrics' değerleri incelendi ve uygun olmayan örnekler analiz dışı bırakıldı. Örneklerin tümör ve normal doku gruplamaları yapılarak istatistiksel t-test kullanılarak karşılaştırıldı. Böylece tümör ve normal doku rasında farklı eksprese olan miRNAlar belirlendi.

Örnekleri evrelerine göre gruplandırılarak tek yönlü ANOVA testiyle evrelere göre farklı eksprese olan miRNAlar belirlendi. Ayrıca örnekler derecelerine göre gruplandırılarak tek yönlü ANOVA testiyle derecelere göre farklı eksprese olan miRNAlar belirlendi.





#### 4. BULGULAR

Çalışmamızda Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalında mesane kanseri tanısı almış 17 hastanın tümör dokusu 723 insan miRNA'sı ve 76 viral miRNA açısından mikroarray yöntemiyle 6 normal mesane dokusuyla karşılaştırılarak incelenmiştir. Mesane kanserinde %90 sıklıkta görülen ürotelyal karsinom tanısı alan hastalar çalışmaya dahil edilmiştir. Hastalarımızın yaş ortalaması  $64.16 \pm 6$ 'dır. Hastaların hepsi erkektir ve sporadik mesane kanseri tanısı almışlardır. Hastaların klinik evreleri Ta=5, T1=6 ve T2-4=6 şeklindeyken, patolojik dereceleri G2=7, G3=6 ve G4=4 şeklindedir. Hastalarla ilgili bilgiler Tablo 4.1'de bulunmaktadır.

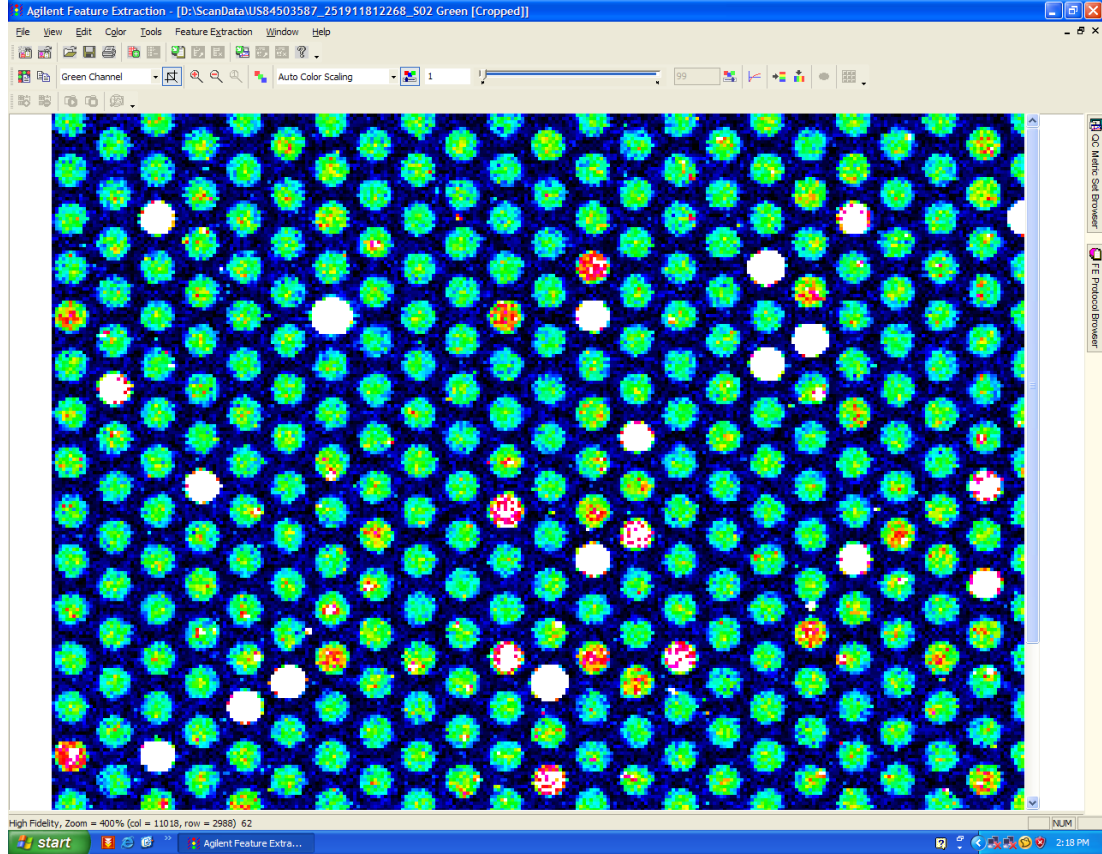
Tablo 4.1. Hastaların Klinik ve Patolojik Özellikleri

| Hasta | Yaş | Derece | Evre |
|-------|-----|--------|------|
| N.M   | 75  | G3     | T2-4 |
| C.B   | 52  | G2     | Ta   |
| İ.İ   | 39  | G2     | T1   |
| E.K   | 65  | G2     | Ta   |
| A.Y   | 67  | G4     | T2-4 |
| İ.A   | 78  | G3     | T2-4 |
| F.S   | 52  | G2     | Ta   |
| M.D   | 69  | G2     | T1   |
| İ.K   | 77  | G3     | T1   |
| S.Ö   | 69  | G3     | T1   |
| C.P   | 62  | G4     | T2-4 |
| M.Y   | 68  | G3     | T1   |
| E.S   | 65  | G2     | Ta   |
| H.K   | 70  | G3     | T1   |
| A.Ç   | 67  | G4     | T2-4 |
| K.B   | 55  | G2     | Ta   |
| R.K   | 64  | G4     | T2-4 |

##### 4.1 Ürotelyal Karsinomda miRNA'ların Ekspresyon Düzeyleri

Çalışmamızda Agilent insan mikroRNA mikroarray versiyon 2.0 kiti kullanılmıştır. Kit içeriğinde 3 array slaytı bulunmaktadır. 8 örnek tek slayt üzerinde analiz edilebilmektedir. Arrayde 723 insan ve 76 viral miRNA sekansı Sanger veri tabanı 10.1'den alınarak prop haline getirilmiştir. (Agilent insan mikroRNA mikroarray versiyon 1'de ise 470 insan miRNA'sı ve 64 viral miRNA bulunmaktadır.) Arrayde 15.000 prob bulunmakta ve aynı miRNA 16-20 kez prob

haline getirilmiştir. Çalışmamızda array slaytlarının posthibridizasyon yıkaması sonrasında Feature Extraction 10.01 yazılımı yardımıyla görüntü (image) analizleri yapıldı. (Şekil 4.1)



Şekil 4.1. Agilent Feature Extraction 10.01 yazılımında bir örneğin mikroarray image görüntüsü. Beyaz renk pozitif kontroldür. Mavi renkten kırmızı renge doğru miRNA ekspresyon düzeyi artmaktadır.

Feature Extraction 10.01 yazılımıyla örneklerdeki istenmeyen artefaktlar analiz dışında bırakıldı. Artefakt olarak post hibridizasyon basamağından sonra lam üzerinde kalan istenmeyen toz, leke vs. değerlendirildi. Arraylerin üzerindeki noktalara uygun isimlendirmelerin yapılması ve miRNA ekspresyon sinyallerinin doğru ölçülmesi için uygun grid pozisyonlamaları yapıldı. MiRNAların ekspresyon sinyal düzeylerinin bulunduğu datalar istatistiksel analiz için toplandı.

Datalar Genespring GX yazılımına yüklendi. Genespring GX yazılımıyla örnekler arasında ve array slaytları arasında istatistiksel analiz yapılabilmesi için normalizasyon aşaması gerçekleştirildi. Normalizasyon, deneyin yapılması sırasında

teknikten kaynaklanan varyasyonların minimuma indirilmesi ve sağlıklı karşılaştırma yapılması için gerekmektedir.

Normalizasyonda örneklerin sinyal düzeyleri için eşik değer 1 olarak belirlendi. Sinyallerin medianları alındı ve sinyaller %75 percentile kaydırıldı (Percentil Kaydırma Normalizasyon).

Örneklerin sonraki analizlerde kullanılabilmesi için kalite analizleri istatistiksel olarak yapıldı. Array üzerindeki her bir miRNA, 16-20 kez tekrarlandığı için kalite analizleri mümkün olmaktadır. Örneklerden kalite aşamasını geçemeyenler ileriki analizlere dahil edilmedi. Toplam 17 tümör dokusu ve 6 normal dokunun sinyal seviyeleri, spottaki sinyal durumlarına göre (flag value) filtreleme işlemleri yapıldı. Filtreleme olarak 'present' (Array üzerindeki noktanın tamamen dolu olması) ve 'marginal' (Array üzerindeki noktanın bir kısmının dolu olması) kriterleri seçildi. Toplam 381 miRNA filtreleme kriterlerini geçti. Array üzerindeki noktalarından 'Absent' (boş noktalar) olarak filtrelenenler analiz dışında bırakıldı.

Filtreleme kriterlerini (present, marginal) geçen miRNA'lardan 23 tanesi sadece normal dokuda eksprese olurken; 53 tanesi sadece tümör dokularında eksprese olmuştur (Bkz Ek-2). Filtreleme kriterlerini geçen tüm miRNAlar normal mesane dokusu ve tümör dokuları arasında istatistiksel t-test uygulanarak karşılaştırıldı.

#### **4.1.1 Normal Mesane Dokusu ve Ürotelyal Karsinomda miRNA Ekspresyon Düzeyleri**

Tümör ve normal dokulardaki miRNA ekspresyon düzeyleri t-testi kullanılarak karşılaştırıldığında 37 miRNA'nın istatistiksel olarak anlamlı ( $p < 0.05$ ) düzeyde farklı eksprese oldukları belirlendi (Bkz. Ek-1). İstatistiksel p değeri  $< 0.01$  alındığında 9 miRNA'nın farklı eksprese olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.2)

Ürotelyal karsinom ve normal mesane dokusu arasında yapılan diğer çalışmalarla uyumlu olarak miRNA ekspresyon paterni açısından anlamlı fark bulunmuştur. Bir çok miRNA artmış veya azalmıştır. Mir-125b, mir-143, mir-145, mir-99a, mir-100 ve mir-133b'nin önemli düzeyde ( $p < 0.01$  ve 5 kat üzeri) ürotelyal karsinom dokularında azaldığı belirlenmiştir (Tablo 4.2). Mi-18a ürotelyal karsinom dokularında normal mesane dokusuna göre artmıştır ( $p < 0.01$  ve 3.1 kat). Farklı

eksprese olan miRNA'lar ürotelyal karsinom tanı ve tedavisinde yeni biyomarkerların bulunması ve kanser prognozunu belirlemede temel oluşturabilir. Çalışmamızda daha spesifik miRNA ekspresyon farklılıklarını değerlendirebilmek için tümör ve normal dokular arasında çok anlamlı düzeyde ( $p < 0.01$ ) farklı eksprese olan 9 miRNA üzerine yoğunlaşmıştır.

Azalan miRNAların kromozomal lokalizasyonlarına baktığımızda birçok kanser türünde delesyona uğrayan veya translokasyona katılan frajil bölgeler olduğu görülmüştür. Mir-143 ve mir-145 aynı miRNA kümesinde ve 5q33.1 bölgesinde bulunmaktadır. Mir-125b ve mir-100 bir çok kanser türünde delesyona uğrayan frajil bir bölge olan 11q24 bölgesinde bulunmaktadır. Mir-99a, 21q21.1 kromozomal bölgede yer almaktadır. Mir-133b, 6p12.2 bölgesinde bulunmaktadır.

Tablo 4.2. İstatistiksel p değeri  $< 0.01$  alındığında farklı eksprese olan miRNAlar.

| MiRNA          | p değeri                 | Düzeltilmiş p değeri | Kat değişimi | Regülasyon |
|----------------|--------------------------|----------------------|--------------|------------|
| hsa-miR-125b   | 6.581984E-50.00313467    | 11.58854             |              | Azalmış    |
| hsa-miR-100    | 2.8312868E-50.001541029  | 6.381766             |              | Azalmış    |
| hsa-miR-497    | 2.8323196E-40.009810125  | 4.9021873            |              | Azalmış    |
| hsa-miR-139-5p | 2.0773093E-40.008793943  | 3.7002795            |              | Azalmış    |
| hsa-miR-145    | 4.0243804E-63.0665778E-4 | 16.733974            |              | Azalmış    |
| hsa-miR-133b   | 2.5942722E-73.2947257E-5 | 10.537648            |              | Azalmış    |
| hsa-miR-99a    | 5.052631E-91.9250524E-6  | 11.485797            |              | Azalmış    |
| hsa-miR-143    | 1.827128E-83.4806787E-6  | 27.029001            |              | Azalmış    |
| hsa-miR-18a    | 2.3586806E-40.008986574  | 3.1539316            |              | Artmış     |

#### 4.1.2 Farklı Eksprese Olan miRNA'ların Hedef Analizleri

Değişici epitelyal karsinomda normal dokuya göre farklı eksprese olan miRNA'ların potansiyel hedef gen analizleri için PicTar, TargetScan, miRanda ve DIANA microT gibi veri tabanları kullanıldı. Yanlış pozitifliği azaltmak için en az 3 veri tabanının belirlediği genler listelenmiştir (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. Ürotelyal karsinomda farklı eksprese olan miRNA'ların hedef genleri

| <b>Hsa-mir-125b</b> |         | <b>Hsa-mir-143</b> |                | <b>Hsa-mir-145</b> |              |
|---------------------|---------|--------------------|----------------|--------------------|--------------|
| MYT1                | PAFA    | MLTT3              | GLI3           | ACTG1              | TBPL1        |
| GPC4                | LIFR    | IGFBP5             | VAPB           | CCNL1              | SOX9         |
| <u>TRIB2</u>        | USP37   | SFRS11             | SMNDC1         | EIF4A2             | FOXO1A       |
| GTPBP2              | PI4K2B  | TARDBP             | KIAA1012       | INHBB              | FZD7         |
| SEMA4C*             | ZNF281  | ITM2B              | ATP10A         | ACTR3              | APPBP2       |
| <u>EIF2C2</u>       | MXD4    | RBM24              |                | GABARAPL2          | HOXC11       |
| DPF2                | LOXL1   |                    |                | NUAK1              | ZNF423       |
| NEF3                | SMARCD2 |                    |                | SEMA6A*            | UXS1         |
| OAZ2                |         |                    |                |                    |              |
| MSI1                |         |                    |                |                    |              |
| <b>Hsa-mir-133b</b> |         | <b>Hsa-mir-99a</b> |                | <b>Hsa-mir-100</b> |              |
| PCDHGA12            | PA      | <u>SMARCA5</u>     | <u>FRAP1</u>   | <u>TRIB2</u>       | <u>FZD8</u>  |
| SGK                 | MYCBP2  | <u>SMAD7</u>       | <u>TRIB2</u>   | <u>HOXA1</u>       | INSM1        |
| PTBP2               | RAG1    | <u>FZD8</u>        | <u>HOXA1</u>   | <u>BAZ2A</u>       | EPDR1        |
| CSF2                |         | HS3ST3B1           | <u>EIF2C2</u>  | <u>CYP26B1</u>     | FGFR3        |
|                     |         | <u>BAZ2A</u>       | <u>CYP26B1</u> | <u>SMARCA5</u>     | HS3ST2       |
|                     |         |                    |                | <u>FRAP1</u>       | <u>SMAD7</u> |
|                     |         |                    |                | <u>EIF2C2</u>      | MTMR3        |

Not: Altı çizili genler birden fazla miRNA'nın hedefi olan genlerdir.

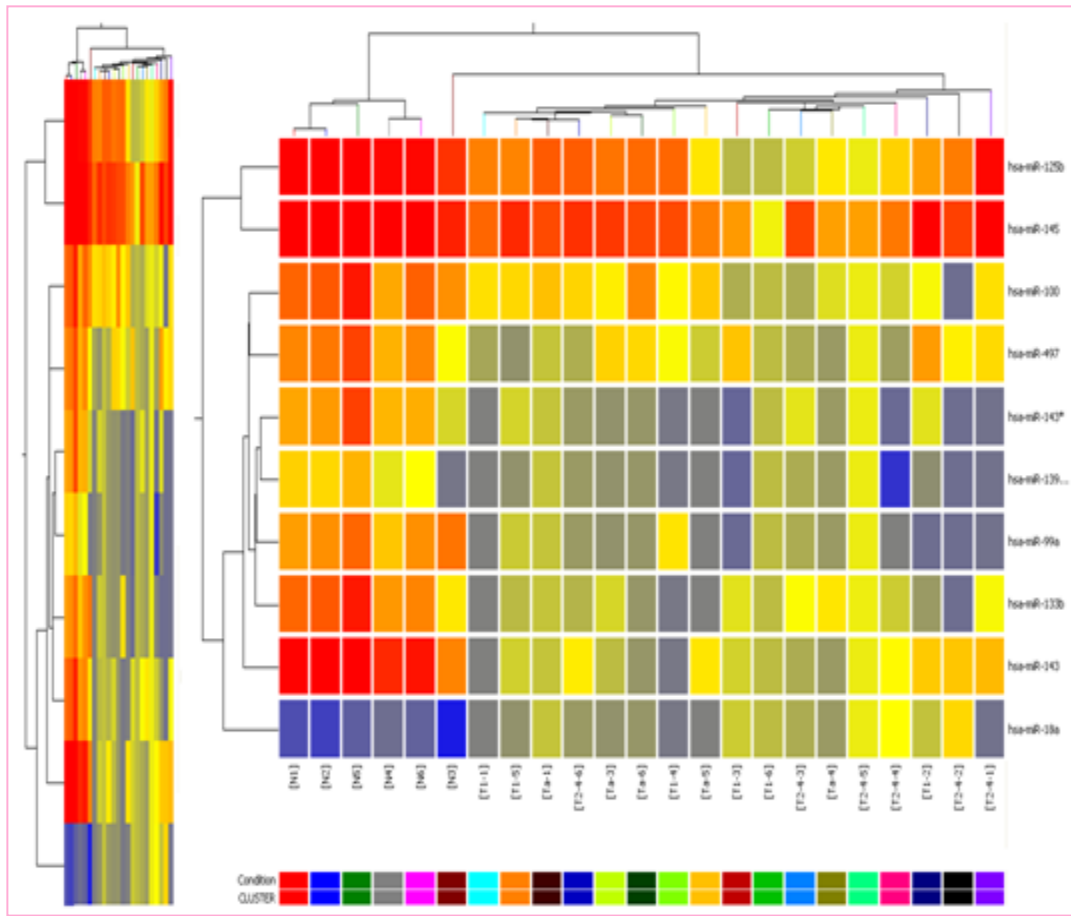
Hedef gen analizlerinde SMARCA5, FRAP1 (MTOR), SMAD7, TRIB2, FZD8, HOXA1, EIF2C2, BAZ2A, CYP26B1 genlerinin mir-99a, mir-100 tarafından hedeflendiği görülmüştür. TRIB2 ve EIF2C2 genlerinin ise mir-125b, mir-99a ve mir-100 tarafından hedeflendiği görülmüştür. Birden fazla miRNA tarafından hedeflenen genlere NCBI (National Center for Biotechnology Information) veri tabanında bakıldığında:

SMARCA5 geni, birçok geninin transkripsiyonunu kromatin yapısını değiştirerek regüle etmektedir. FRAP1 geni fosfotidilinositol bağımlı kinaz ailesindedir. PI3K-AKT-FRAP1 yolağında DNA hasarına yanıtta fonksiyon görmektedir. SMAD7 geni, TGF- $\beta$  sinyal yolağında bulunmaktadır. TGF- $\beta$  proteininin sağladığı büyüme inhibisyonu ve apoptozisi bloklamaktadır. TRIP2 geni tribble ailesinden bir protein kodlamaktadır. TRIP2 proteini hücrel sinyal iletim yollarında görev almaktadır. FZD8 geni GTP bağımlı sinyal iletiminden sorumlu reseptör proteini kodlamaktadır. Wnt sinyal yolağında fonksiyon görür. HOXA1 geni DNA'ya bağlanan transkripsiyon faktörü kodlar. Embriyonik beyin gelişiminde fonksiyon görür. EIF2C2 geni, argonate ailesinden bir protein kodlamaktadır ve

RNA bağımlı gen susturulmasında fonksiyon görmektedir. BAZ2A geni DNA metilasyonu ve kromatin modifikasyonunda fonksiyon gören protein kodlamaktadır. CYP26B1 geni stokrom P450 süper-aile üyesi bir enzim kodlamaktadır.

#### 4.1.3. Ürotelyal Karsinom ve Normal Dokunun Kümeleme Analizi

Toplam 6 normal doku ve 17 tümör dokusu farklı eksprese olan miRNA'larla yapılan hiyerarşik kümeleme analizinde belirgin şekilde birbirinden ayrılmıştır (Şekil 4.2). Normal mesane dokusunun ve tümör örneklerinin ayrı gruplarda yer alması çalışmamızın güvenilirliğine katkıda bulunmaktadır.



Şekil 4.2. Tümör dokusunda farklı eksprese olan miRNA'lara yönelik kümeleme analizi. Satırlar farklı eksprese olan miRNA'ları, sütunlar ise normal ve tümör dokularını göstermektedir. Sütunlarda ilk 6'sı normal dokuyu sonraki 17'si ürotelyal karsinom dokusunu göstermektedir. Renk yelpazesinde kırmızı renkten koyu renklere doğru ekspresyon düzeyi azalmaktadır. Tümör dokuları belirgin şekilde normal dokulardan ayrılabilmiştir.

#### 4.1.4 Tümör Derece ve Evresine Göre Farklı Ekspresyone Olan miRNA'lar

Dokular patolojik olarak G2, G3, G4 ve N şeklinde sınıflandırılıp tek yönlü varyans analizi (ANOVA) yapıldığında G2 ve G3 arasında 1; G2 ve G4 arasında 10; G3 ve G4 arasında ise 2 miRNA'nın farklı ekspresyone olduğu görülmüştür ( $p < 0.05$ ). (Tablo 4.3)

Dokular evrelerine göre Ta, T1, T2-4 ve N şeklinde sınıflandırılıp ANOVA yapıldığında Ta ve T2-4 arasında 7; T1 ve T2-4 arasında 10 miRNA'nın farklı ekspresyone olduğu görülmüştür ( $p < 0.05$ ) (Tablo 4.3).

Derece ve evre arttıkça genellikle miRNA ekspresyonu azalmaktadır. MiRNA ekspresyonunun azalması tümör hücrelerini daha agresif hale getiriyor olabilir. Derece ve evreye göre örnekler karşılaştırma yapıldığında değişici epitelyal karsinomda miR-10a, miR-34a, miR-141, miR-210'un iki grupta da derece ve evre arttığında ekspresyonlarının azaldığı belirlenmiştir (Tablo 4.4). Özellikle iki grupta da azalan mikroRNAlar potansiyel prognostik marker olarak değerlendirilebilirler.

Tablo 4.4: Evre ve dereceye göre farklı ekspresyone olan miRNA'lar

| Dereceye Göre   |  |  |
|---|--|--|
| G2/G3   | G2/G4  | G3/G4  |
| hsa-miR-29c* ↓  | hsa-miR-10a ↓<br>hsa-miR-210 ↓<br>hsa-miR-768-3p ↓<br>hsa-miR-31 ↓<br>hsa-miR-141 ↓<br>hsa-miR-18a ↑<br>hsa-miR-29c* ↓<br>hsa-miR-181a ↓<br>hsa-miR-30a ↓<br>hsa-miR-34a ↓ | hsa-miR-18a ↑<br>hsa-miR-30a ↓   |
| Evreye Göre   |  |  |
| Ta/T2-4   | T1/T2-4  |  |
| hsa-miR-10a ↓<br>hsa-miR-210 ↓<br>hsa-miR-10b ↓<br>hsa-miR-151-3p ↓<br>hsa-miR-141 ↓<br>hsa-miR-34a ↓<br>hsa-let-7b ↓ | hsa-miR-10a ↓<br>hsa-miR-572 ↑<br>hsa-miR-10b ↓<br>hsa-miR-7 ↑<br>hsa-miR-200a* ↓<br>hsa-miR-141 ↓   | hsa-miR-210 ↓<br>hsa-miR-638 ↑<br>hsa-miR-671-5p ↓<br>hsa-miR-151-3p ↓ |



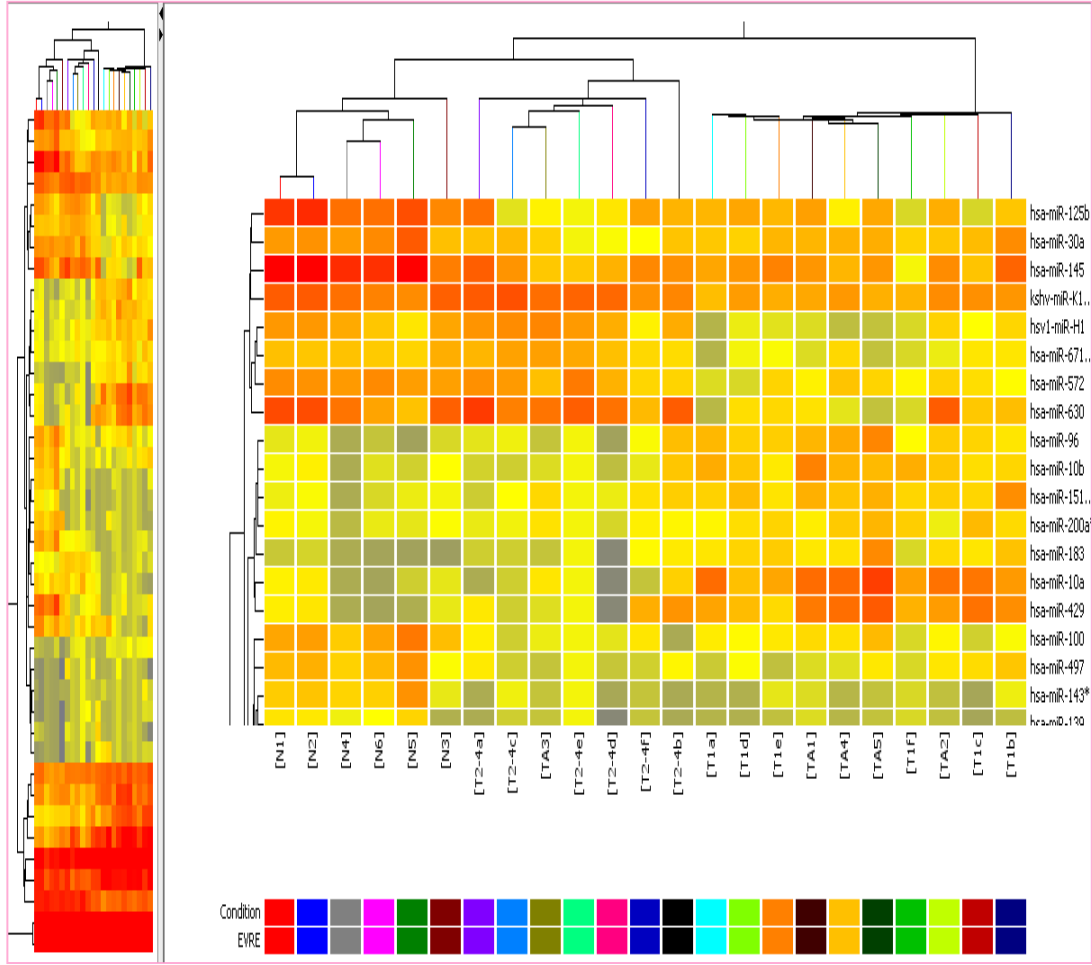
Not: Derece ve evreye göre örnekler karşılaştırma yapıldığında değişici epitelyal karsinomda mir-10a, mir-34a, mir-141 ve mir-210 un her iki grupta da ekspresyonları azaldığı belirlenmiştir. Bu miRNA lar altı çizili olarak gösterilmiştir.

#### **4.1.5 Evre ve Dereceye Göre Farklı Eksprese Olan miRNA' lar da Kümeleme Analizi**

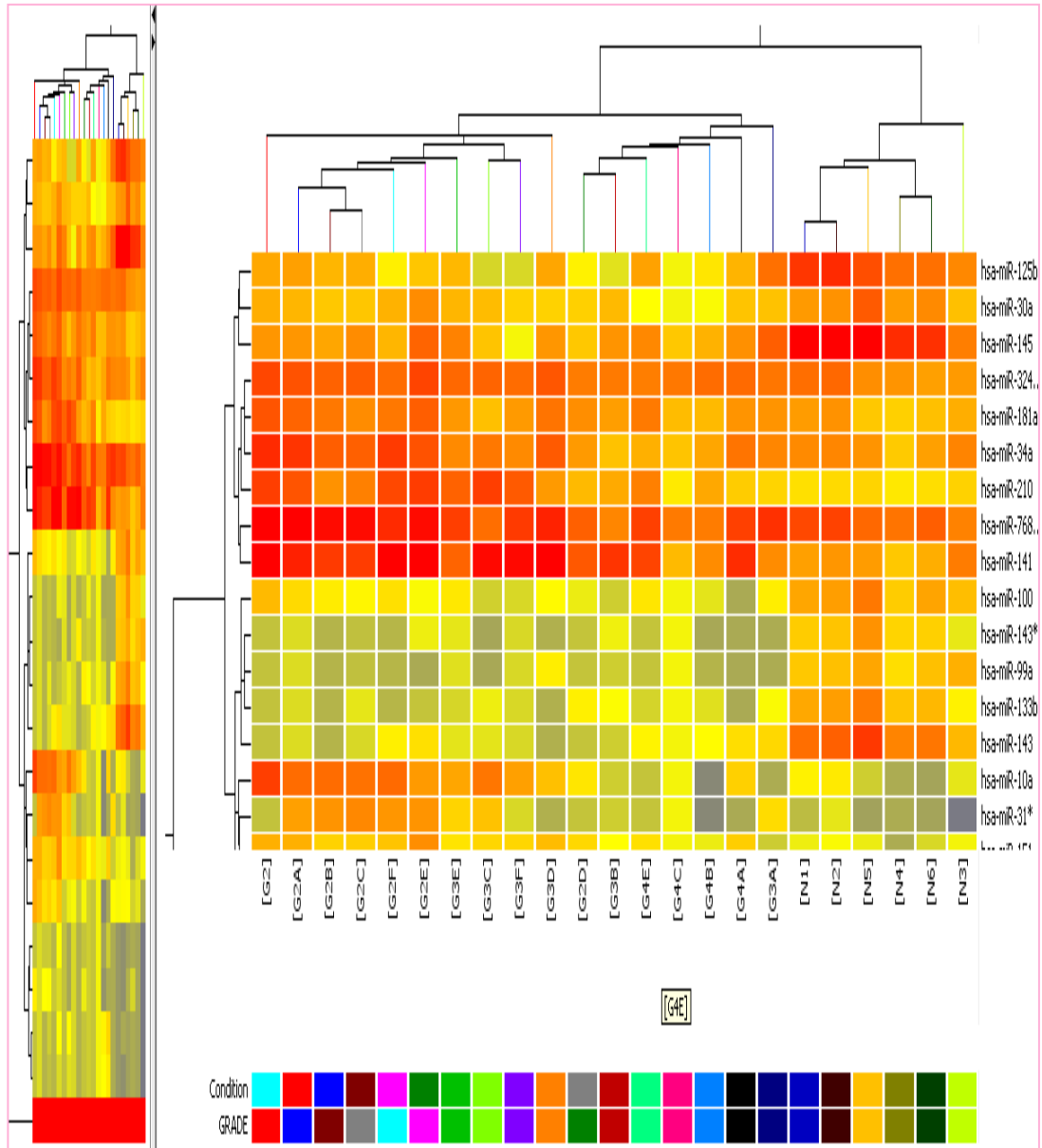
Evre ve dereceye göre farklı eksprese olan miRNA lara yönelik kümeleme analizi yapıldığında normal ve tümör dokuları farklı kümelerde yer almıştır. Ayrıca tümör dokuları evrelerine ve derecelerine göre kümelenebilmiştir (Şekil 4.3) (Şekil 4.4). Böylece miRNA ekspresyon paternleri, ileride kliniklerde patolojik derecelendirme ve evrelendirmede kullanılmaya adaydır.

Tümör grubuna bakıldığında T2-4 evresi (kasa invazif), T1/Ta evresinden (kasa invazif olmayan) kümeleme analizinde ekspresyon paternine göre ayrılabilmiştir (Şekil 4.3)

Ürotelyal karsinomda şu an belirlenen en önemli prognostik faktör tümörün kasa invazyonudur. Bu durum bize ürotelyal karsinomda tümör dokularının muskularis invazyon durumunun miRNA ekspreson paternine göre belirlenebileceğini göstermektedir.



Şekil 4.3. Evreye göre farklı ekspresyon olan miRNA'lara yönelik hiyerarşik kümeleme analizi: Satırlar farklı ekspresyon olan miRNA'ları, sütunlara ise normal ve evrelere göre tümör örneklerini göstermektedir. Soldaki 6 sütun normal dokuları, sonraki 17 sütun ise tümör örneklerini göstermektedir. Tümör grubuna bakıldığında T2-4 evresi (kasa invazif), T1/Ta evresinden (kasa invazif olmayan) net olarak ekspresyon paternine göre ayrılabilmiştir. Bu bize ürotelyal karsinomda tümör dokularının muskularis invazyon durumunun miRNA ekspresyon paternine göre belirlenebileceğini göstermektedir.



Şekil 4.4. Dereceye göre farklı eksprese olan miRNA'lara yönelik hiyerarşik kümeleme analizi: Satırlar farklı eksprese olan miRNA'ları, sütunlara ise normal ve derecelerine göre tümör örneklerini göstermektedir. Sağdaki 6 sütun normal dokuları, soldaki 17 sütun ise tümör örneklerini göstermektedir. Renk yelpazesinde kırmızı renkten koyu renklere doğru ekspresyon düzeyi azalmaktadır. Yüksek dereceli tümör örnekleri düşük derecelilerden ayrılabilmiştir. Dereceye göre farklı eksprese olan miRNA'lar prognoz tahmininde kullanılabilirler.

## 5. TARTIŞMA

Mesane kanseri üriner sistemi en sık etkileyen kanserdir. Mesane kanseri ABD’de tüm kanserler içinde erkeklerde dördüncü, bayanlarda sekizinci sıklıktadır. Mesane kanseri tedavisi ülkelerin sağlık giderlerine ağır yükler getirmektedir. Buna rağmen mesane kanserinin erken tanısına ve etkin tedavisine yönelik bilgiler hala sınırlıdır. Mesane kanserinde aynı derece veya evreye sahip hasta gruplarının farklı klinik seyir göstermesi mesane kanserinde farklı moleküler yolların patogeneizde etkili olduğunu akla getirmektedir. Ürotelyal karsinomda bir çok miRNA ekspresyon çalışması yapılmıştır fakat literatürlerde sonuçlar arasında farklılıklar bulunmaktadır.

Çalışmamızda 17 ürotelyal karsinom örneği 6 normal mesane dokusuyla 723 insan ve 76 viral miRNA açısından mikroarray yöntemiyle karşılaştırılmıştır. Ayrıca ürotelyal karsinomda prognoza yönelik potansiyel miRNAları belirlemek amacıyla miRNA ekspresyon paternleri tümör evre ve derecelerine göre karşılaştırılmıştır. Ürotelyal karsinom ve normal mesane dokusu arasında ayrıca tümör evre ve derecesi arttıkça birçok miRNA’nın farklı eksprese olduğu görülmüştür.

Ürotelyal karsinom ve normal mesane dokusu arasında yapılan diğer çalışmalarla uyumlu olarak miRNA ekspresyon paterni açısından anlamlı fark bulunmuştur. Bir çok miRNA artmış veya azalmıştır. T-test sonrası p değeri  $< 0.05$  alındığında 37 (Bkz. EK-1); p değeri  $< 0.01$  alındığında 9 miRNA’nın farklı eksprese olduğu görülmüştür. Mir-125b, mir-143, mir-145, mir-99a, mir-100 ve mir-133b’nin önemli düzeyde ( $p < 0.01$  ve 5 kat üzeri) ürotelyal karsinom dokularında azaldığı belirlenmiştir (Tablo 4.2). Mir-18a ürotelyal karsinom dokularında normal mesane dokusuna göre artmıştır ( $p < 0.01$  ve 3.1 kat). Farklı eksprese olan miRNA’lar ürotelyal karsinomda tanı ve tedavi için yeni biyomarkerların bulunmasına temel oluşturabilir.

Değişici epitelyal karsinomda normal dokuya göre önemli düzeyde farklı eksprese olan miRNA’ların potansiyel hedef gen analizleri için PicTar, TargetScan, miRanda ve DIANA microT gibi veri tabanları kullanılıp; yanlış pozitifliği azaltmak için en az 3 programın belirlediği genler listelendi (Tablo 4.3). Hedef genlerin gen ontolojilerine bakıldığında kanserle ilgili olabilecek bir çok hücrel proselerde etkili oldukları görülmüştür. Hedef gen analizlerinde SMARCA5, FRAP1, SMAD7, TRIB2, FZD8, HOXA1, EIF2C2, BAZ2A, CYP26B1 genlerinin mir-99a, mir-100

tarafından ortak hedeflendiği görülmüştür. TRIB2 ve EIF2C2 genlerinin mir-125b, mir-99a ve mir-100 tarafından ortak hedeflendiği görülmüştür. Hedef genlerin rol aldığı yollara NCBI (National Center for Biotechnology Information) veri tabanında bakıldığında kanserle ilişkili olan bir çok yolda rol aldıkları görülmüştür. Özellikle FRABP1 geninin fosfotidilinositol bağımlı kinaz ailesinden olduğu ve PI3K-AKT-FRABP1 yolağında DNA hasarına yanıtta fonksiyonu olduğu görülmüştür. Ayrıca SMAD7 geni, TGF- $\beta$  sinyal yolağında bulunmaktadır. TGF- $\beta$  proteininin sağladığı büyüme inhibisyonu ve apoptozisi bloklamaktadır. FZD8 geni GTP bağımlı sinyal iletiminden sorumlu reseptör proteini kodlamaktadır. Wnt sinyal yolağında fonksiyon görür.

Dokular patolojik olarak G2, G3, G4 ve N şeklinde sınıflandırılıp tek yönlü varyans analizi (ANOVA) yapıldığında G2 ve G3 arasında 1; G2 ve G4 arasında 10; G3 ve G4 arasında 2 miRNA'nın farklı eksprese olduğu görülmüştür ( $p < 0.05$ ). Dokular evrelerine göre Ta, T1, T2-4 ve N şeklinde sınıflandırılıp ANOVA yapıldığında Ta ve T2-4 arasında 7; T1 ve T2-4 arasında 10 miRNA'nın farklı eksprese olduğu görülmüştür ( $p < 0.05$ ) ( Tablo 4.4). Derece ve evre arttıkça genellikle miRNA ekspresyonu azalmaktadır. MiRNA ekspresyonunun azalması tümör hücrelerini daha agresif hale getiriyor olabilir. Derece ve evreye göre örnekler karşılaştırma yapıldığında değişici epitelyal karsinomda mir-10a, mir-34a, mir-141, mir-210'un iki grupta da derece ve evre arttığında ekspresyonlarının azaldığı belirlenmiştir (Tablo 4.4). Özellikle iki grupta da azalan mikroRNAlar potansiyel prognostik marker olarak değerlendirilebilirler. Lars ve ark. ürotelyal karsinomda yaptıkları miRNA mikroarray çalışmasında Ta ve T2-4 evrelerini karşılaştırdıklarında bizim çalışmamızla uyumlu olarak mir-141'in ekspresyonunun T2-4 evresinde azaldığını bildirmişlerdir (48). Ayrıca Srinivas ve ark ürotelyal karsinomda invazif tümörlere oranla Ta evresinde mir-10a'nın daha fazla eksprese olduğunu bildirmişlerdir (46).

Evre ve dereceye göre farklı eksprese olan miRNAlara yönelik kümeleme analizi yapıldığında normal ve tümör dokuları farklı kümelerde yer almıştır. Ayrıca tümör dokuları evrelerine ve derecelerine göre kümelenebilmiştir (Şekil 4.3) (Şekil 4.4). Tümör grubuna bakıldığında T2-4 evresi örnekler, T1/Ta evresi örneklerden ekspresyon paternlerine göre ayrılabilmişlerdir (Şekil 4.3). Bu bize ürotelyal

karsinomda tümör dokularının muskularis invazyon durumunun miRNA ekspresyon paternine göre belirlenebileceğini göstermektedir. Ayrıca ürotelyal karsinomda muskularis invazyonu olan ve olmayan kanserlerin farklı iki yolak üzerinden geliştiği şeklinde ifade edilen hipotezi miRNA ekspresyonu açısından bulgularımız destekler niteliktedir. Çalışmamız literatürdeki benzer makalelerle tartışılacaktır. Literatür tartışmalarında altı çizili miRNAlar bizim verilerimizle ekspresyonu anlamlı derecede azalmış ( $p < 0.01$ ) bulunmuştur.

Mesane kanserinde ilk miRNA mikroarray çalışması Gottardo ve ark. tarafından yapılmıştır. 25 ürotelyal karsinomda 245 miRNA'nın ekspresyonları mikroarray yöntemiyle incelenmiştir. Mir-223, mir-26b, mir-221, mir-103-1, mir-185, mir-23b, mir-203, mir-17-5p, mir-23a ve mir-205 gibi mikroRNAların ekspresyonlarının normal dokuya oranla arttıklarını saptanmıştır (1.2 kat eşik değer,  $P < 0.05$ ). Ayrıca evre arttıkça (T1-T4) mir-26b'nin azalma eğiliminde olduğunu belirtmişlerdir. Analizlerinde normal dokuya göre azalan miRNA tespit etmemişleridir (43). Bizim çalışmamız ve literatürdeki diğer çalışmalar, Gottardo ve ark. tarafından yapılan çalışmayla uymamaktadır. Çalışmamızda ekspresyonlardaki azalma sık görülen bir özelliktir ve bu özellik birçok literatür tarafından bildirilmektedir (45-50). Gottardo ve ark.nın verilerinin çalışmamız ve diğer literatür verileri ile uyumsuzluğunun nedeninin ilgili çalışmada az sayıda (sadece 2 adet) normal doku kullanmalarının olabileceğini düşünüyoruz.

Takahiro ve ark. 14 mesane kanserini ve 5 normal mesane epitelyumunu 156 miRNA açısından mikroarray yöntemiyle karşılaştırmışlardır. Araştırmacılar 27 miRNA'nın önemli derecede farklı eksprese olduğunu tespit etmişlerdir. Bunlar arasında Mir-145, mir-30a-3b, mir-133a, mir- 133b, mir-195, mir-125b ve mir-199a gibi mikroRNAlar iki ayrı normalizasyon yöntemi kullandıklarında da önemli derecede azalmışlardır ( $p < 0.01$ ). Keratin-7 mRNA'sının bu mikroRNAlar için ortak target olduğunu belirtmişlerdir (45). Bizim çalışmamız gibi Takahiro ve ark. da mesane kanserinde normal dokuya göre önemli derecede artan ve azalan miRNAlar bildirmişlerdir.

Tianxin ve ark. 6 ürotelyal karsinom ve 6 normal mesane dokusuyla yaptıkları miRNA mikroarray çalışmasında 37 miRNA'nın arttığını, 38 miRNA'nın ise azaldığını belirtmişleridir. Mikroarray çalışmasını konfirme etmek için yaptıkları

RT-PCR sonucunda mir-143, mir-145, mir-199b, mir-125b'nin önemli derecede azaldığını bildirmişlerdir ( $p<0.05$ ). Mesane kanseri hücre serilerini mir-143 ile transfekte ettiklerinde hücre proliferasyonunun azaldığını ve mir-143'ün RAS onkogenini susturabileceğini bildirmişlerdir (47). Çalışmamızda mir-143 ün 27 kat, mir-145 in 16 ve mir-125b nin 11 kat azaldığı gözlenmiştir. Bu verilerimiz Tianxin ve ark.nın verileri ile uyumludur.

Lars ve ark. 106 mesane tümörü ve 11 normal ürotelyumda 290 mikroRNA'nın ekspresyonunu karşılaştırmışlardır. Mir-145, mir-143, mir-125b'nin ve bir çok miRNA'nın ekspresyonu azalırken; özellikle mir-21 olmak üzere bir çok miRNA'nın ekspresyonunun arttığını bildirmişlerdir. Mir-145'in kanser dokusunda en çok ekspresyonu azalan ve mir-21'in kanser dokusunda en çok ekspresyonu artan mikroRNAlar olduğunu belirtmişlerdir. Mir-129, mir-133b ve mir-518c'nin hastalığın progresyonunu tahmin etmede kullanılabileceği ifade edilmiştir. Mi-129'un prekürsörünü mesane kanseri hücre serilerine verdiklerinde tümörlerde büyümenin yavaşladığını saptamışlardır. Ta ve T2-4 evrelerini karşılaştırdıklarında bizim çalışmamızla uyumlu olarak mir-141'in ekspresyonunun T2-4 evresinde azaldığını bildirmişlerdir (48). Çalışmamızda Lars ve ark. çalışmasıyla uyumlu olarak mir-145, mir-143, mir-125b tümör dokularında azaldı. Lars ark. mir-21 açısından 3.7 kat fark bildirirken çalışmamızda tümör ve normal doku arasında mir-21 bakımından anlamlı bir fark saptanmamıştır.

James ve ark. 52 ürotelyal karsinom, 6 ürotelyal karsinom hücre serisi ve 20 normal ürotelyumla 322 miRNA'nın ekspresyonunu RT-PCR yöntemiyle analiz etmişlerdir. Mir-133b, mir-125b, mir-143, mir-100, mir99a ve mir-204'ün düşük dereceli ürotelyal karsinoma göre normal ürotelyumda fazla eksprese olduğunu saptamışlardır. MicroRNA değişimlerinin tümör progresyonunu tahmin etmede kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Ayrıca mir-99a ve mir-100'ün kaybının önce FGFR3 gen ekspresyon artışına daha sonrasında da mutasyonuna sebep olduğunu ifade etmişlerdir (54). Bu çalışma ve bizim sonuçlarımız doğrultusunda mir-99/mir-100 ve FGFR3 ün ürotelyal karsinomda aynı yolakta etkili genler olabileceği düşüncesindeyiz.

Srinivas ve ark. 34 ürotelyal karsinomda yaptıkları çalışmada invazif tümörlerde mir-222 ve mir-125 fazla eksprese olurken, Ta tümörlerde mir-10a'nın

eksprese olduğunu belirtmişlerdir. Hiyerarşik kümeleme analizinde farklı eksprese olan 51 miRNA'nın Ta, T1 ve T2-4 evrelerine sahip hastaları ayırabildiğini bildirmişlerdir (46). Bizim çalışmamızla uyumlu olarak mir-10a, Ta tümörlerde fazla eksprese olmaktadır. Mir-10a, 17q21 bölgesinde HOXB gen kümesinde HOXB4 ve HOXB5 arasında yer almaktadır. Çalışmamızda grade yükseldikçe mir-10a ekspresyonu azalmaktadır. Bu nedenle ürotelyum diferansiyasyonunda mir-10a önemli bir marker olabilir.

Tablo 5.1. Çalışmamızın literatürdeki çalışmalarla karşılaştırılması.

|                                     | Örnek n/t | Teknik                | miRNA  | Hedef gen  |
|-------------------------------------|-----------|-----------------------|--|--|
| <b>Çalışmamız</b>                   | 6/17      | Mikroarray            | mir-143↓ mir-145↓<br>mir-125b ↓ mir-99a ↓<br>mir-133b ↓ mir-100 ↓<br>mir-497↓ mir-139-5p↓<br>mir-18a↑(p<0.01)        | SMARCA5, FRAP1 (MTOR), SMAD7, TRIB2, FZD8, HOXA1, EIF2C2, BAZ2A, CYP26B1 |
| <b>Gottardo ve ark. (2007) (43)</b> | 2/25      | Mikroarray            | Mir-223↑ mir-26b↑<br>mir-221↑ mir-103-1↑<br>mir-185↑ mir-23b ↑<br>mir-203 ↑ mir-17-5p↑<br>mir-23a↑ mir-205↑ (p<0.05) |  |
| <b>Takahiro ve ark. (2009) (45)</b> | 5/14      | Mikroarray            | Mir-145↓ mir-30a-3b↓<br>mir-133a↓ mir-133b ↓<br>mir-195 ↓ mir-125b ↓<br>mir-199a ↓ (p<0.01)                          | KRT7<br>PSMA7  |
| <b>Tiixin ve ark. (2009) (47)</b>   | 6/6       | Mikroarray/<br>RT-PCR | mir-143 ↓ mir-145↓<br>mir-199b↓ mir-125b↓ (p<0.05)   | RAS  |
| <b>Lars ve ark. (2009) (48)</b>     | 11/106    | Mikroarray            | mir-143 ↓ mir-145↓<br>mir-125b↓ mir-21↑ (p<0.0001)   | -  |
| <b>James ve ark. (2009) (54)</b>    | 20/58     | RT-PCR                | Mir-133b ↓ mir-125b↓<br>mir-143↓ mir-100↓<br>mir99a↓ mir-204↓<br>(düşük dereceli /normal) (p<0.05)                   | FGFR3  |

Mir-143, 5q33.1 bölgesinde bulunmaktadır. Esau ve ark. mir-143'ün yağ hücresi farklılaşmasında etkili olduğunu bildirmişlerdir (55). Cordes ve ark. mir-143 ve mir-145'in düz kas farklılaşmasında ve proliferasyonunda etkili olduğunu öne sürmüşlerdir (56). Suziki ve ark. DNA hasarı sonrasında p53 tümör süpresör proteinin mir-143, mir-145, mir16-1 ve mir-206 gibi mikroRNA'ların



ekspresyonlarını arttırdığını bildirmişleridir (57). Chen ve ark. ilk kez mir-143'ün K-RAS onkogeninin transkripsiyonunu kolorektal kanser hücrelerinde inhibe ettiğini saptamıştır (58). K-RAS onkogeni ürotelyal karsinomda da etyolojiden sorumlu tutulmaktadır. Böylece mir-143 ekspresyonunun azalması ürotelyal karsinomda K-RAS onkogeninin ekspresyonunun artmasına sebep olabilir. Borralho ve ark. mir-143'ün kolorektal kanser hücrelerinde hücre proliferasyonu ve ölümlüyle ilgili bir çok proteini etkilediğini ve kolorektal kanser hücrelerinin 5-fluorourasil duyarlılığını arttırdığını bildirmişlerdir (59). Akao ve ark 63 kolorektal kanser ve 65 adenoma dokusunda ve komşuluğundaki tümör olmayan dokularda mikroRNA profiline bakmışlardır ve mir-143 ve mir-145'in hem kanser hem de adenoma dokularında azaldığını bildirmişlerdir. Mir-143 ve mir-145 azalmasının tümörögenезin erken safhalarında olduğunu ve mir-143 kullanılarak yapılan RNA bazlı tedavinin kanser hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği bildirmişlerdir (60).

Mir-145, 5q33.1 bölgesinde mir-143'le aynı kümede bulunmaktadır. Shi ve ark. mir-145'in kolorektal kanser hücre serilerinde hücre büyümesini inhibe ettiğini bildirmişlerdir (61). Mir-145 ve mir-143'ün bir çok kanser türünde ekspresyonun azaldığı belirtmişlerdir(62,63). Ostensfeld ve ark . mesane kanseri hücre serilerinde mir-145'in kaspaz bağımlı ve bağımsız yollar aracılığıyla hücre ölümüne neden olduğunu (64), Sachdeva ve ark. ise mir-145'in kanser hücrelerinin invazyonunu ve metastazını inhibe ettiğini öne sürmüşlerdir (65). Bizim çalışmamızda ürotelyal karsinom dokularında anlamlı şekilde mir-145 ve mir-143 ekspresyonu azalmıştır. Bu bilgiler ışığında mir-145 ve mir-143, bir çok kanser türünde aynı yolak üzerindeki tümör baskılayıcı özellik gösteren mikroRNA'lar olabilir düşüncesindeyiz. Hastalara mir-143 ve mir-145 gen terapilerinin yapılması ürotelyal karsinomda tümör büyümesini ve invazyonunu inhibe edebilir. Mir-143 ve mir-145 ekspresyon azalması 5q33.1 bölgesindeki delesyonlara veya bu gen bölgesindeki metilasyona bağlı olabilir. Bunun aydınlatırması için bu bölgelere yönelik çalışmaların yapılması gerekmektedir.

mir-125b ve mir-100 bir çok kanser türünde delesyona uğrayan fragil bir bölge olan 11q24 bölgesinde bulunmaktadır (66). Henson ve ark oral squamöz hücreli kanserlerde sürekli delesyona uğrayan 11q bölgesine yönelik yaptıkları çalışmalarında mir-100 ve mir-125b'nin azaldığını tespit etmişlerdir (67). Ozen ve

ark. 16 prostat kanseri dokusunda yaptıkları mikroarray analizinde mir-145, let-7c ve mir-125b'nin anlamlı şekilde azaldığını, (68). Ciafre ve ark. DA primer glioblastoma dokularında mir-125b'nin ekspresyonunun azaldığını bildirmişleridir (69). Saetrom ve ark. BMPR1B genindeki mir-125b'nin bağlandığı bölgedeki polimorfizmin meme kanseri riskini arttırdığını belirtmişlerdir (70). Bu literatürlere rağmen Lee ve ark. mir-125b azalmasının p53 proteininin ekspresyonunu ve p53 bağımlı apoptozisi arttırdığını öne sürmüşlerdir(71). Gefen ve ark. çocukluk çağı lösemilerinde mir-125b ekspresyonun arttığını ve mir-125b'nin onkogenik potansiyelde olduğunu bildirmişlerdir (72). Mir-125b geninin tümör baskılayıcı veya onkogenik fonksiyonuyla ilgili literatür henüz net olmamasına rağmen bizim çalışmamızda mir-125b ekspresyonu ürotelyal karsinom hücrelerinde anlamlı düzeyde azalmıştır. Verilerimiz doğrultusunda tümör baskılayıcı özellik gösterdiğini düşünmekle birlikte geniş araştırma popülasyonlarında yapılan çalışmalarla bu ilişkinin daha net ortaya konulacağı görüşündeyiz.

Mir-133b, 6p12.2 bölgesinde bulunmaktadır. Crawford ve ark. akciğer kanser dokularında mir-133b'nin ekspresyonunun azaldığını, Mir-133b'nin MCL-1 ve BCL2L2 gibi antiapoptotik genleri hedeflediğini tespit etmişlerdir (73). Chiyomaru ve ark. mir-145 ve mir-133a'nın FSCN1 ekspresyonunu azaltarak mesane kanserinde tümör baskılayıcı olarak fonksiyon gösterdiğini bildirmişlerdir (74). Mir-133a'nın ve mir-133b'nin pre-miRNA nükleotid dizileri farklı olmasına rağmen, olgun miRNA nükleotid dizisinde mRNA'ya komplementer olan nükleotid dizileri (seed sekansı-mikroRNA'nın mRNA'ya yüksek olasılıkla komplementer olduğu ilk 6-8 baz dizisi) aynıdır. Böylece her iki miRNA aynı hücresel yolda etkili olabilirler. Bizim çalışmamızda da mir-133b ürotelyal karsinom dokularında anlamlı şekilde azalmıştır. Bu bilgiler ışığında bulgularımız mir-133b'nin tümör baskılayıcı özellikte olduğunu gösterir niteliktedir.

Mir-99a, 21q21.1 kromozomal bölgede yer almaktadır. 21q21.1 bölgesi akciğer kanserinde sık delesyona uğrayan frajil bir bölgedir (75,76). Yamada ve ark.akciğer kanseri hücre serilerinde yaptıkları çalışmada 21q21.1 bölgesinin yaygın şekilde delesyona uğradığını bildirmektedirler. Delesyon bölgesindeki olası tümör süpresör genleri tanımlamak için yaptıkları analiz sonucu SAMSN1, USP25 gibi genlerin yanında mir-99a, mir-let-7c ve mir-125b gibi genlerin de delesyona

uğradığını tespit etmişlerdir (77). Bizim çalışmamızda da mir-99a ekspresyonu azalmıştır. Mir-99a ekspresyonunun azalmasının patogenezinde gen metilasyonunun yanısıra delesyon da olabilir. Bu hipotezden yola çıkarak mesane kanserinde 21q.21.1 bölgesi sık delesyona uğrayan frajil bir bölge olabilir. SNP array veya deep sequencing teknikleri kullanılarak mesane kanserindeki 21q21.1 bölgesi incelenebilir.

Messenger RNA ekspresyon çalışmalarındaki artan tecrübeye birlikte miRNA ekspresyon profillerinin de kanserin tanısı, prognozu ve tedavi optimizasyonunda birer marker olarak kullanılabilirliği sorgulanmaktadır. Lu ve ark. 68 iyi farklılaşmış farklı türdeki kanserin miRNA ve mRNA ekspresyon profillerini temel alarak 334 farklı kanser örneğine miRNA ve mRNA profillerine göre tanı koymaya çalışmışlar ve miRNA profilinin, mRNA profiline göre tanı koymada daha etkin olduğunu bildirmişlerdir. Özellikle 17 iyi farklılaşmamış kanser türünde miRNA profili 12 tümöre tanı koydururken, mRNA profili bir tümöre tanı koydurabilmiştir (78). Günümüzde mRNA ekspresyon analizlerinin meme kanserinde risk ve rekürrens tahmini için klinik pratikte kullanılması önerilmektedir. Mikro RNA profil çalışmaları henüz erken aşamada olmasına rağmen ümit vadeden çalışmalar olarak literatürde yerini almaktadır. Mikro RNA ekspresyon profillerinin akciğer kanserinde 'gefitinibe' cevabı tahmin etmede ve kolon kanserinde prognozu ve tedaviye yanıtı belirlemede kullanılabileceği bildirilmiştir (79, 80). Çalışmamızda normal ve tümör örneklerindeki miRNA ekspresyonları doğrultusunda kümeleme yapılabildiği gibi tümörler arasında erken ve ileri derece/evre gruplandırmaları da ekspresyon profillerine göre gerçekleştirilebilmiştir. Farklı eksprese olan miRNAların RT-PCR çalışmalarıyla ürotelyal karsinom tanısındaki duyarlılık ve özgüllük oranları belirlenebilir.

Mikro RNA ve kanser ilişkisi artan kanıtlarla belirlenmeye devam etmektedir. Daha fazla hasta gruplarının kullanıldığı ve hastaların klinik tedavi ve prognozuyla, miRNA ekspresyon profillerinin belirlendiği çalışmalarla ürotelyal karsinom ve miRNAlar arasındaki ilişki ileride daha net ortaya konulacaktır. Böylece miRNA ekspresyon profilleri klinik uygulamalarda yaygın kullanım alanı bulacaktır.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda 17 ürotelyal karsinom örneği ile 6 normal mesane dokusu 723 insan ve 76 viral miRNA açısından mikroarray yöntemiyle karşılaştırılıp ürotelyal karsinom patogenezinde miRNAların rolü ortaya konulmaya çalışılmıştır. Ayrıca ürotelyal karsinomda prognoza yönelik potansiyel miRNAları belirlemek amacıyla miRNA ekspresyon paternleri tümör evre ve derecelerine göre karşılaştırılmıştır. Ürotelyal karsinomda normal dokuya göre önemli düzeyde farklı eksprese olan miRNA'ların potansiyel hedef gen analizleri için PicTar, TargetScan, miRanda ve DIANA microT gibi veri tabanları kullanılıp; yanlış pozitifliği azaltmak için en az üç veri tabanının belirlenen genler listelenmiştir. Ürotelyal karsinom ve normal mesane dokusu arasında farklı eksprese olan miRNalara yönelik hiyerarşik kümeleme analizi yapılmıştır. Ayrıca ürotelyal karsinomda tümör derece ve evresine göre farklı eksprese olan miRNalara yönelik kümeleme analizleri gerçekleştirilmiştir.

- Ürotelyal karsinomda mikroRNA ekspresyonu belirlemede mikroarray yöntemi etkin bir yöntemdir. Ürotelyal karsinomda mikroRNA'lar normal ürotelyuma göre belirgin şekilde farklı eksprese olmaktadır. MikroRNAların ürotelyal karsinom yolağındaki rolleri ayrıntılı fonksiyonel çalışmalarla ortaya konulmalıdır.
- İstatistiksel t-test analizi sonrası p değeri <0.05 olarak alındığında 37 miRNA'nın ürotelyal karsinomda normal dokuya göre farklı eksprese olduğu belirlenmiştir (Bkn EK 1) . İstatistiksel p değeri < 0.01 alındığında 9 miRNA'nın farklı eksprese olduğu görülmüştür (Tablo 4.2).
- Özellikle mir-143 (27 kat ↓), mir-145 (16 kat ↓), mir-125b (11 kat ↓), mir-99a (11 kat ↓), mir-133b (10 kat ↓), mir-100 (6 kat ↓) gibi önemli düzeyde azalan miRNAlar ürotelyal karsinomda gen tedavide kullanılabilecek aday moleküllerdir.
- Hedef gen analizlerinde SMARCA5, FRAP1, SMAD7, TRIB2, FZD8, HOXA1, EIF2C2, BAZ2A, CYP26B1 genlerinin hsa-mir-99a ve hsa-mir-100 tarafından, TRIB2 ve EIF2C2 genlerinin de hsa-mir-125b, hsa-mir-99a ve hsa-mir-100 tarafından ortak hedeflendikleri görülmüştür. Hedef genler birçok kanser ilişkili yolakta fonksiyon görmektedir. Özellikle FRABP1 geninin fosfotidilinositol bağımlı kinaz ailesinden olduğu ve PI3K-AKT-

FRABP1 yolağında DNA hasarına yanıtta fonksiyonu olduğu görülmüştür. Ayrıca SMAD7 geni, TGF- $\beta$  sinyal yolağında bulunmaktadır. TGF- $\beta$  proteininin sağladığı büyüme inhibisyonu ve apoptozisi bloklamaktadır. FZD8 geni GTP bağımlı sinyal iletiminden sorumlu reseptör proteini kodlamaktadır. Wnt sinyal yolağında fonksiyon görür. MikroRNA hedef genleri, veri tabanlarıyla birlikte, eş zamanlı tüm genom mRNA analizleriyle daha net ortaya konulabilir.

- Dokular patolojik olarak G2, G3, G4 ve N şeklinde sınıflandırılıp tek yönlü varyans analizi (ANOVA) yapıldığında G2 ve G3 arasında bir; G2 ve G4 arasında 10; G3 ve G4 arasında 2 miRNA'nın farklı eksprese olduğu görülmüştür ( $p < 0.05$ ). (Tablo 4.3)

- Dokular evrelerine göre Ta, T1, T2-4 ve N şeklinde sınıflandırılıp ANOVA yapıldığında Ta ve T2-4 arasında 7; T1 ve T2-4 arasında 10 miRNA'nın farklı eksprese olduğu görülmüştür ( $p < 0.05$ ). (Tablo 4.3)

- Evre ve derece arttıkça miRNAların ekspresyonları azalmaktadır. MiRNAların ekspresyonlarının azalması tümör hücrelerini daha agresif hale getiriyor olabilir.

- Tümör dokuları ve normal dokular evrelerine göre kümeleme (Clustering) analizi yapıldığında T2-4 evresi (kasa invazif), T1/Ta evresinden (kasa invazif olmayan) miRNA ekspresyon paternine göre net şekilde ayrılabilmiştir (Şekil 4.3). Buna göre miRNA ekspresyon analiziyle mesane tümörlerinin şuan için en önemli prognozunu belirleme özelliği olan kasa invazyon potansiyelinin belirlenebileceği düşüncesindeyiz.

- Ürotelyal karsinom örneklerinde t-testi ile **mir-143 (27 kat ↓), mir-145 (16 kat ↓), mir-125b (11 kat ↓), mir-99a (11 kat ↓), mir-133b (10 kat ↓), mir-100 (6 kat ↓), mir-497 (4.9 kat ↓), mir-139-5p (3.7 kat ↓) nin ekspresyonlarının normal dokulara göre çok anlamlı düzeyde ( $p < 0.01$ ) azaldığı, buna karşılık mir-18a (3.1 kat ↑) nin ekspresyonunun tümör hücrelerinde arttığı gözlenmiştir. Ekspresyonu azalan miRNA'ların ürotelyal karsinomun da dahil olduğu birçok kanser türünde tümör baskılayıcı özellikte rol oynayabilecekleri düşünülmektedir ki bu veri literatürde de benzer şekilde tartışılmaktadır. Farklı eksprese olan**

**miRNAlar ürotelyal karsinomda tanı ve tedavi için yeni biyomarkerların bulunmasına temel oluşturabilir.**

**•Mir-99a, 21q21.1 bölgesinde bulunmaktadır. Çalışmamızda mir-99a ekspresyonu tümör dokularında anlamlı şekilde (11 kat) azalmaktadır. Bu bölge ürotelyal karsinomda delesyona uğrayan ve mir-99a yanında başka tümör süpresör genleri barındıran frajil bir bölge olabilir. 21q21.1 bölgesinin ürotelyal karsinomun patogenezindeki rolü ‘SNP array’ veya ‘deep sequencing’ gibi daha ileri moleküler teknikler kullanılarak aydınlatılabilir.**

**• Derece ve evreye göre örnekler arasında karşılaştırma yapıldığında ürotelyal karsinomda mir-10a, mir-34a, mir-141, mir-210’un iki grupta da derece ve evre arttığında ekspresyonlarının azaldığı belirlenmiştir. Özellikle bu miRNA’ların ürotelyal karsinom prognozunu belirlemede bireş marker olabilecekleri görüşündeyiz.**

**KAYNAKLAR**

1. Calin GA, Croce CM. MicroRNA-cancer connection: the beginning of a new tale. *Cancer Res.* 2006;66(15):7390-7394.
2. Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer.* 2006;6(11):857-866.
3. Garzon R, Calin GA, Croce CM. MicroRNAs in Cancer. *Annu Rev Med.* 2009;60(167-179).
4. Ventura A, Jacks T. MicroRNAs and cancer: short RNAs go a long way. *Cell.* 2009;136(4):586-591.
5. Finoux AL, Chartrand P. [Oncogenic and tumour suppressor microRNAs]. *Med Sci (Paris).* 2008;24(12):1049-1054.
6. Lu Q, Lu C, Zhou GP, Zhang W, Xiao H, Wang XR. MicroRNA-221 silencing predisposed human bladder cancer cells to undergo apoptosis induced by TRAIL. *Urol Oncol.* 2009;
7. Neely LA, Rieger-Christ KM, Neto BS, Eroshkin A, Garver J, Patel S, Phung NA, McLaughlin S, Libertino JA, Whitney D, Summerhayes IC. A microRNA expression ratio defining the invasive phenotype in bladder tumors. *Urol Oncol.* 2008;
8. Calin GA, Liu CG, Sevignani C, Ferracin M, Felli N, Dumitru CD, Shimizu M, Cimmino A, Zupo S, Dono M, Dell'Aquila ML, Alder H, Rassenti L, Kipps TJ, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(32):11755-11760.
9. Iorio MV, Visone R, Di LG, Donati V, Petrocca F, Casalini P, Taccioli C, Volinia S, Liu CG, Alder H, Calin GA, Menard S, Croce CM. MicroRNA signatures in human ovarian cancer. *Cancer Res.* 2007;67(18):8699-8707.
10. Ambros V, Chen X. The regulation of genes and genomes by small RNAs. *Development.* 2007;134(9):1635-1641.
11. Bahadori M. New Advances in RNAs. *Arch Iran Med.* 2008;11(4):435-443.

12. Wiemer EA. The role of microRNAs in cancer: no small matter. *Eur J Cancer*. 2007;43(10):1529-1544.
13. Garzon R, Fabbri M, Cimmino A, Calin GA, Croce CM. MicroRNA expression and function in cancer. *Trends Mol Med*. 2006;12(12):580-587.
14. Julia W, Stephanie J, Sarina K, Richard I. G & Sven D. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature Cell Biology*. 2009;11: 228-234.
15. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(24):15524-15529.
16. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, Wojcik SE, Aqeilan RI, Zupo S, Dono M, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(39):13944-13949.
17. Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H, Endoh H, Harano T, Yatabe Y, Nagino M, Nimura Y, Mitsudomi T, Takahashi T. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res*. 2004;64(11):3753-3756.
18. Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, Labourier E, Reinert KL, Brown D, Slack FJ. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell*. 2005;120(5):635-647.
19. Lee YS, Dutta A. MicroRNAs in cancer. *Annu Rev Pathol*. 2009;4(199-227).
20. Chen X, Guo X, Zhang H, Xiang Y, Chen J, Yin Y, Cai X, Wang K, Wang G, Ba Y, Zhu L, Wang J, Yang R, Zhang Y, Ren Z, Zen K, Zhang J, Zhang CY. Role of miR-143 targeting KRAS in colorectal tumorigenesis. *Oncogene*. 2009;28(10):1385-1392.



21. Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res.* 2005;65(14):6029-6033.
22. Tam W, Dahlberg JE. miR-155/BIC as an oncogenic microRNA. *Genes Chromosomes Cancer.* 2006; 45(2): 211-212.
23. Si ML, Zhu S, Wu H, Lu Z, Wu F, Mo YY. miR-21-mediated tumor growth. *Oncogene.* 2007;26(19):2799-2803.
24. Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di LG, Shimizu M, Wojcik SE, Iorio MV, Visone R, Sever NI, Fabbri M, Iuliano R, Palumbo T, Pichiorri F, Roldo C, Garzon R, Sevignani C, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2005;353(17):1793-1801.
25. Fabbri M. MicroRNAs and cancer epigenetics. *Curr Opin Investig Drugs.* 2008; 9(6):583-590.
26. Ramiro G, Muller F, Amelia C, George C, Carlo C. MicroRNA expression and function in cancer. *Trends in Mol. Med.* 2006;12:580-587.
27. Jemal A, Siegel R, Ward E. Cancer Statistics 2006. *CA Cancer J Clin.* 2006; 56: 106-130.
28. Zorlu F, Eser SY, Fidaner C. İzmir ilinde ürogenital kanserlerin insidans hızları(1995-96). *Üroonkoloji Bülteni.* 2006;1 :2-9.
29. Zeeger MP, Tan FE, Dorant E. The impact of characteristics of cigarette smoking on urinary tract cancer risk: meta-analysis of epidemiologic studies. *Cancer.* 2000;89:630-639.
30. Cole P, Hoover R, Friedel GH. Occupation and cancer of lower urinary tract. *Cancer.* 1972;29:1250-1260.
31. Haluk Ö, Levent T. *Üroonkoloji.* Ankara: Üroonkoloji Derneği; 2007.
32. Mowatt G, Zhu S, Kilonzo M, Boachie C, Fraser C, Griffiths TR, N'Dow J, Nabi G, Cook J, Vale L. Systematic review of the clinical effectiveness and cost-effectiveness of photodynamic diagnosis and urine biomarkers (FISH,

- ImmunoCyt, NMP22) and cytology for the detection and follow-up of bladder cancer. *Health Technol Assess.* 2010;14(4): 1-331.
33. Van Der Kwast TH. How to combine the moleküler profil with the clinico-pathological profil of urothelial neoplastic lesions. *Scand J Urol Nefrol.*2008;42:175-184
  34. Carlos C. Molekular alterations associated with bladder cancer initiation and progression. *Scand J Urol Nefrol.*2008;42:154-165.
  35. Zieger K, Orntoft TF. Role of activating FGFR3 mutations in the development of bladder cancer. *Clin Cancer Res.* 2005;11:7709-7719.
  36. Nagata Y, Abe M, Kobayashi K. Point mutations of ras genes in human bladder cancer and kidney cancer. *Jpn J Cancer Res.*1990;81:22-27.
  37. Bajorin DF, Dodd PM, Mazumdar M. Long term survival in metastatic TCC and prognostic factors predicting outcome of therapy. *J Clin Oncol.*1999;17:3173-3181.
  38. Esrig D, Elmajian D, Groshen S. Accumulation of nuclear p53 and tumor progression in bladder cancer. *N Engl J Med.*1994;331:1259-1264.
  39. Lipponen PK. Over ekspresion of p53 oncoprotein in TCC and its prognostic value. *Int J Cancer.*1993;53:365-370.
  40. Çaliskan M, Turkeri LN , Mansuroglu B. Nuclear accumulation of mutant p53 protein: a possible predictor of failure of intravesical therapy in bladder cancer. *Br J Urol.*1997;79:373-377.
  41. Pfister C, Buzelin F, Casse C. Comperative analysis of MiB1 and p53 expression in human bladder tumors and their corelation with cancer progression. *Eur Urol.*2000;33:278-284.
  42. Aveyard J, Skilleter A, Habuchi T. Somatik mutation of PTEN in bladder carsinoma. *Br J Cancer.*1999;80:904.
  43. Gottardo and et.all. Micro-RNA profilinf in kidney and bladder cancers. *Urol Onc.*2007;25:387-392.

44. Lori AN, Kimberly M and et all. A microRNA expression ratio defining the invasive phenotype in bladder tumors. *Urol Onc.* 2008.
45. Takahiro I, Hideki E, Yasushi O and et all. Identification of novel microRNA targets based on microRNA signatures in bladder cancer. *Int. J. Cancer.* 2009;125:345-352.
46. Srinivas V, David L, Anders K and et all. MiRNA ekspression in urotelial carcinomas: Important rol of miR-10a, miR-222, miR-125b, miR-7 and miR-452 for tumor stage and metastasis and frequent loss of miR-31. *Int J Cancer.* 2009;124:2236-2242.
47. Tianxin L, Wen D, Jian H, Quihui P, Xinlan F, Caixia Z, Li H. MicroRNA-143 as a tumor suppressor for bladder cancer. *J Urol.* 2009;181:1372-1380.
48. Lars D, Marie S, Jesper B and et all. Genomic profiling of microRNAs in bladder cancer: miR-129 is associated with poor outcome and promotes cell death in vitro. *Cancer Res.* 2009;69:4851-4860.
49. Merle H, Kai H, Hartmut M and et all. A robust methology to study urine microRNA as tumor marker: microRNA-126 and microRNA-182 are related to urinary bladder cancer. *Urol Onc.* 2009.
50. Qiang L, Chao L, Guo-ping Z and et all. MicroRNA-221 silencing predisposed human bladder cancer cells to undergo apoptosis induced by TRAIL. *Urol onc.* 2009.
51. H Ushan Y, Colin D, Yuanqing H, Barton G, Xifeng W. Evaluation of genetic variants in microRNA related genes and risk of bladder cancer. *Cancer res.* 2008;68:2530-2537.
52. Wolf-Karslen Hofmann. Gene expression profiling by microarrays clinical implications. Berlin-Germany: Cambridge University Press; 2006.
53. Iris Hovatta, Katja Kimppe, Antti Lehmuusola. DNA microarray data analysis 2nd edition. Helsinki: CSC Scientific Computing Ltd; 2005.
54. James W F, Saiful M, Helen C O, Freddie C H. Distinct microRNA alterations characterize high and low grade cancer. *Cancer res.* 2009; 69:8472-8481.

55. Esau C, Kang X, Peralta E, Hanson E, Marcusson E G, Ravichandran L V, Sun Y, Koo S, Perera R J, Jain Dean N M, Freier S M, Bennett C F, Lollo B, Griffey R. MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation. *J Biol Chem.* 2004; 279: 52361-52365.
56. Cordes KR, Sheehy N T, White M P, Berry E, Morton S U, Muth A N, Lee TH, Miano J M, Ivey K N, Srivastava D. miR-145 and miR-143 regulate smooth muscle cell fate and plasticity. *Nature.* 2009; 460: 705-710.
57. Suzuki H I, Yamagata K, Sugimoto K, Iwamoto T, Kato S, Miyazono K. Modulation of microRNA processing by p53. *Nature.* 2009; 460: 529-533.
58. Chen X, Guo X, Zhang H, Xiang Y, Chen J, Yin Y, Cai X, Wang K, Wang G, Ba Y, Zhu L, Wang J, Yang R, Zhang Y, Ren Z, Zen K, Zhang J, Zhang C Y. Role of miR-143 targeting KRAS in colorectal tumorigenesis. *Oncogene.* 2009; 28(10) : 1385-1392.
59. Borralho P M, Kren B T, Castro R E, da Silva I B, Steer C J, Rodrigues C M. MicroRNA-143 reduces viability and increases sensitivity to 5-fluorouracil in HCT116 human colorectal cancer cells. *FEBS J.* 2009; 276(22), 6689-6700.
60. Akao Y, Nakagawa Y, Hirata I, Iio A, Itoh T, Kojima K, Nakashima R, Kitade Y, Naoe T. Role of anti-oncomirs miR-143 and -145 in human colorectal tumors. *Cancer Gene Ther.* 2010.
61. Shi B, Sepp-Lorenzino L, Prisco M, Linsley P, DeAngelis T, Baserga R. MicroRNA 145 targets the insulin receptor substrate-1 and inhibits the growth of colon cancer cells. *J Biol Chem.* 2007;282: 32582-32590.
62. Akao Y, Nakagawa Y, Kitade Y, Kinoshita T, Naoe T. Downregulation of microRNAs-143 and -145 in B-cell malignancies. *Cancer Sci.* 2007; 98(12): 1914-1920.
63. Takagi T, Iio A, Nakagawa Y, Naoe T, Tanigawa N, Akao Y. Decreased expression of microRNA-143 and -145 in human gastric cancers. *Oncology.* 2009; 77(1): 12-21.

64. Ostenfeld M S, Bramsen J B, Lamy P, Villadsen S B, Fristrup N, Sorensen K D, Ulhoi B, Borre M, Kjems J, Dyrskjot L, Orntoft T F. miR-145 induces caspase-dependent and -independent cell death in urothelial cancer cell lines with targeting of an expression signature present in Ta bladder tumors. *Oncogene*. 2010; 29(7): 1073-1084.
65. Sachdeva M, MoY Y. MicroRNA-145 suppresses cell invasion and metastasis by directly targeting mucin 1. *Cancer Res.*2010; 70(1): 378-387.
66. Iorio M V, Plazzo J P. MicroRNA gene ekspression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res.* 2005; 65: 7065-7070.
67. Henson B J, Bhattacharjee S, O'Dee D M, Feingold E, Gollin S M. Decreased expression of miR-125b and miR-100 in oral cancer cells contributes to malignancy. *Genes Chromosomes.Cancer.*2009; 48(7): 569-582.
68. Ozen M, Creighton C J, Ozdemir M, Ittmann M. Widespread deregulation of microRNA expression in human prostate cancer. *Oncogene*. 2008; 27(12) : 1788-1793.
69. Ciafre S A , Galardi S , Mangiola A , Ferracin M , Liu C-G , Sabatino G , Negrini M , Maira G , Croce C M , Farace M G. Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*2005; 334: 1351-1358.
70. Saetrom P, Biesinger J, Li S M, Smith D, Thomas L F, Majzoub K, Rivas G E, Alluin J, Rossi J J, Krontiris T G, Weitzel J, Daly M B, Benson A B, Kirkwood J M, O'Dwyer P J, Sutphen R, Stewart J A, Johnson D, Larson G P. A risk variant in an miR-125b binding site in *BMP1B* is associated with breast cancer pathogenesis. *Cancer Res.* 2009; 69(18): 7459-7465.
71. Le M T, Teh C, Shyh-Chang N, Xie H, Zhou B, Korzh V, Lodish H F, Lim B. MicroRNA-125b is a novel negative regulator of p53. *Genes Dev.* 2009; 23(7), 862-876.
72. Gefen N, Binder V, Zaliova M, Linka Y, Morrow M, Novosel A, Edry L, Hertzberg L, Shomron N, Williams O, Trka J, Borkhardt A, Izraeli S. Hsa-mir-

125b-2 is highly expressed in childhood ETV6/RUNX1 (TEL/AML1) leukemias and confers survival advantage to growth inhibitory signals independent of p53. *Leukemia*.2010; 24(1): 89-96.

73. Crawford M , Batte K , Yu L , Wu X, Nuovo G J, Marsh C B, Otterson G A, Nana-Sinkam S P. MicroRNA 133B targets pro-survival molecules MCL-1 and BCL2L2 in lung cancer. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2009;388(3): 483-489.
74. Chiyomaru T, Enokida H, Tatarano S, Kawahara K, Uchida Y, Nishiyama K, Fujimura L, Kikkawa N, Seki N, Nakagawa M. miR-145 and miR-133a function as tumour suppressors and directly regulate FSCN1 expression in bladder cancer. *Br.J.Cancer* . 2010.
75. Kohno T, Kawanishi M, Matsuda S, Ichikawa H, Takada M, Ohki M, Yamamoto T, Yokota J. Homozygous deletion and frequent allelic loss of the 21q11.1-q21.1 region including the ANA gene in human lung carcinoma. *Genes Chromosomes.Cancer*.1998; 21(3): 236-243.
76. Lee E B, Park T I, Park S H, Park J Y. Loss of heterozygosity on the long arm of chromosome 21 in non-small cell lung cancer. *Ann.Thorac.Surg*.2003; 75(5): 1597-1600.
77. Yamada H, Yanagisawa K, Tokumaru S, Taguchi A, Nimura Y, Osada H, Nagino M, Takahashi T. Detailed characterization of a homozygously deleted region corresponding to a candidate tumor suppressor locus at 21q11-21 in human lung cancer. *Genes Chromosomes.Cancer*.2008; 47(9): 810-818.
78. Lu J, Getz G, Miska E A, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert B L, Mak R H, Ferrando A A, Downing J R, Jacks T, Horvitz H R, Golub T R. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*.2005; 435(7043): 834-838.
79. Weiss G J, Bemis L T, Nakajima E, Sugita M, Birks D K, Robinson W A, Varella-Garcia M, Bunn P A, Jr Haney J, Helfrich B A, Kato H, Hirsch F R, Franklin W A. EGFR regulation by microRNA in lung cancer: correlation with clinical response and survival to gefitinib and EGFR expression in cell lines. *Ann.Oncol.* 2008; 19(6): 1053-1059.

80. Schetter AJ, Leung SY, Sohn JJ et al. MikroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colorectal adenocarcinoma. *JAMA*. 2008; 299: 425-36.

**EK-1: Normal ve tümör örnekleri karşılaştırmasında  $p < 0.05$  düzeyinde anlamlı farklılık gösteren miRNA' lar**

| MikroRNA        | Kat değişimi ([T] vs [N]) | Regülasyon([T] vs [N]) |
|-----------------|---------------------------|------------------------|
| hsa-miR-125b    | 11.58854↓                 |                        |
| hsa-miR-96      | 4.7779264↑                |                        |
| hsa-miR-183     | 5.496303↑                 |                        |
| hsa-miR-100     | 6.381766↓                 |                        |
| hsa-miR-143*    | 8.228997↓                 |                        |
| hsa-miR-324-3p  | 2.0173664↑                |                        |
| hsa-miR-497     | 4.9021873↓                |                        |
| hsa-miR-191     | 2.1711006↑                |                        |
| hsa-miR-139-5p  | 3.7002795↓                |                        |
| hsa-miR-138-2*  | 2.997314↑                 |                        |
| hsa-miR-769-5p  | 2.3666887↑                |                        |
| hsa-miR-145     | 16.733974↓                |                        |
| hsa-miR-210     | 6.0091925↑                |                        |
| hsa-miR-517a    | 2.8125522↑                |                        |
| hsa-miR-214     | 5.3985953↓                |                        |
| hsa-miR-195     | 4.491421↓                 |                        |
| hsa-miR-133b    | 10.537648↓                |                        |
| hsa-miR-301b    | 2.1910024↑                |                        |
| hsa-miR-517b    | 2.8784096↑                |                        |
| hsa-miR-572     | 3.58988↓                  |                        |
| hsa-miR-99a     | 11.485797↓                |                        |
| hsa-miR-660     | 2.3551471↑                |                        |
| hsa-miR-215     | 2.6138058↑                |                        |
| hsa-miR-431*    | 2.8875911↑                |                        |
| hsa-miR-151-3p  | 3.8447897↑                |                        |
| hsa-miR-106a    | 3.2935455↑                |                        |
| hsa-miR-199a-5p | 3.8412604↓                |                        |
| hsa-miR-141     | 9.276974↑                 |                        |
| hsa-miR-143     | 27.029001↓                |                        |



|                |            |
|----------------|------------|
| hsa-miR-17*    | 3.053405↑  |
| hsa-miR-18a    | 3.1539316↑ |
| hsa-miR-30a    | 3.1092706↓ |
| hsa-let-7a*    | 2.253493↑  |
| hsa-miR-224    | 3.3481987↑ |
| hsa-miR-502-3p | 2.111062↑  |
| hsa-miR-18b    | 2.3793457↑ |
| hsa-miR-34c-3p | 2.4410849↑ |
| hsa-miR-638    | 2.883909↓  |

**EK-2: Filtreleme sonrasında (present-marginal)****Sadece  rotelyal karsinomda ekspre olan miRNAlar:**

- 1.hsa-miR-223\*
- 2.hsa-miR-873
- 3.hsa-miR-31\*
- 4.hsa-miR-654-3p
- 5.hsa-miR-301b
- 6.hsa-miR-517b
- 7.hsa-miR-192
- 8.hsa-miR-362-5p
- 9.hsa-miR-885-3p
- 10.hsa-miR-944
- 11.hsa-miR-144
- 12.hsa-miR-125b-1\*
- 13.hsa-miR-146a
- 14.hsa-miR-29b-1\*
- 15.hsa-miR-660
- 16.hsa-miR-576-5p
- 17.hsa-miR-7
- 18.hsa-miR-215
- 19.hsa-miR-424
- 20.hsa-miR-431\*
- 21.hsa-miR-185
- 22.hsa-miR-383
- 23.hsa-miR-708\*
- 24.hsa-miR-106a
- 25.hsa-miR-339-3p
- 26.hsa-miR-181c\*
- 27.hsa-miR-373
- 28.hsa-miR-760
- 29.hsa-miR-17\*

- 30.hsa- miR-381
- 31.hsa- miR-18a
- 32.hsa- miR-421
- 33.hsa- miR-491-3p
- 34.hsa- miR-607
- 35.hsa- miR-372
- 36.hsa- miR-363
- 37.hsa- miR-517c
- 38.hsa- miR-136\*
- 39.hsa- miR-182
- 40.hsa- miR-127-5p
- 41.hsa- let-7c\*
- 42.hsa- miR-92a-1\*
- 43.hsa- miR-555
- 44.hsa- miR-105
- 45.hsa- let-7a\*
- 46.hsa- miR-224
- 47.hsa- miR-502-3p
- 48.hsa- miR-18b
- 49.hsa- miR-34c-3p
- 50.hsa- miR-934
- 51.hsa- miR-19a
- 52.hsa- miR-597
- 53.hsa- miR-503

**Sadece normal ürotelyumda eksprese olan miRNAlar:**

- 1-hsa- miR-520e
- 2-hsa- miR-490-3p
- 3-hsa- miR-138-1\*
- 4-hsa- miR-526b
- 5-hsa- miR-422a

6-hsa-miR-326  
7-hsa-miR-490-5p  
8-hsa-miR-376c  
9-hsa-miR-567  
10-hsa-miR-139-3p  
11-hsa-miR-145\*  
12-hsa-miR-149\*  
13-hsa-miR-133b  
14-hsa-miR-146b-3p  
15-hsa-miR-300  
16-hsa-miR-99a  
17-hsa-miR-1236  
18-hsa-miR-335\*  
19-hsa-miR-193a-5p  
20-hsa-miR-520b  
21-hsa-miR-136\*  
22-hsa-miR-941  
23-hsa-miR-1