

TUNAY DOĞAN

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

DOKTORA TEZİ

İSTANBUL-2023

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

MESANE KANSERİNDE ÜRİNER EKSOZOMLARIN
MİKRORNA VE PROTEOM PROFİLİNİN
ARAŞTIRILMASI

TUNAY DOĞAN

DANIŞMAN
PROF. DR. NECAT VAKUR OLGAÇ
İKİNCİ DANIŞMAN
PROF. DR. HÜLYA YAZICI
TEMEL ONKOLOJİ ANABİLİM DALI
KANSER GENETİĞİ PROGRAMI

İSTANBUL-2023

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Tunay DOĞAN

İTHAF

Eşim Dr. Vetfa DOĞAN'a ithafen...

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimi sürecinin her aşamasında işleri benim için olabilecek en kolay hale getiren, her daim destekleyen ve bilgisiyle yol gösteren değerli danışman hocam Prof. Dr. Hülya YAZICI'ya ve saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Necat Vakur OLGAC'a teşekkürü bir borç biliyorum.

Her zaman yanımda olan kıymetli aileme ve eşim Dr. Vetfa DOĞAN'a sonsuz teşekkür ediyorum.

Doktora eğitimim "YÖK 100/2000 Doktora Bursu Projesi" kapsamında YÖK tarafından finanse edilmiştir.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2022-38933

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	ii
İTHAF.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
TABLolar LİSTESİ.....	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	xii
ÖZET	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Mesane Kanseri.....	3
2.1.1. Mesane Kanserinin Epidemiyolojisi ve Risk Faktörleri	3
2.1.2. Mesane Kanseri Tanı, Takip ve Tedavi	6
2.1.3. Mesane Tümörlerinde Sınıflandırma ve Evrelendirme.....	10
2.1.4. Mesane Kanseri Genetik Değişiklikler ve Moleküler Subtipleme.....	13
2.1.5. Mesane Kanseri Epigenetik Değişiklikler.....	19
2.1.6. Mesane Kanseri Tanı Testleri ve Mevcut İdrar Biyobelirteçleri.....	33
2.2. Üriner Eksozomlar ve Mesane Kanseri	41
2.2.1. EV'lerin/Eksozomların Mesane Tümörögenezindeki Rollerini.....	41
2.2.2. Mesane Kanseri Üriner EV/Eksozom Temelli Çalışmalar	48
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	64
3.1. Gereçler.....	64
3.1.1. Kullanılan Cihazlar	64
3.1.2. Kullanılan Kitler/Sarflar	64
3.2. Yöntem.....	65
3.2.1. Biyolojik Örnek Hazırlığı	65
3.2.2. İdrardan Eksozom İzolasyonu.....	66
3.2.3. NTA ve TEM ile Eksozom Karakterizasyonu	67
3.2.4. Eksozom ve Dokudan miRNA İzolasyonu	68

3.2.5. cDNA Sentezi	69
3.2.6. qRT-PCR ile miRNA Kantitasyonu.....	70
3.2.7. Eksozomdan Protein Ekstraksiyonu ve FASP	73
3.2.8. Eksozomun LC-MS/MS ile Analizi.....	75
3.2.9. Eksozomun MALDI-TOF MS ile Analizi	75
3.2.10. Tumor-Free Mesane Dokusunun Histotekniği.....	76
3.2.11. Hematoksilen & Eozin Boyama.....	76
3.2.12. FFPET Bloğundan İHK Analizi.....	77
3.2.13. Taze Dokudan Protein Ekstraksiyonu ve WB Analizi.....	78
3.2.14. Biyoinformatik ve Biyoistatistik Analiz	79
4. BULGULAR.....	80
4.1. NTA ile Eksozom Karakterizasyonu	80
4.2. TEM ile Eksozom Karakterizasyonu	82
4.3. Üriner Eksozomların miRNA Profili	82
4.4. Mesane Dokularındaki hsa-miRNA-200a-3p Düzeyi.....	102
4.5. Üriner Eksozomların LC-MS/MS Analizi	112
4.6. Üriner Eksozomların MALDI-TOF MS Analizi	123
4.7. Mesane Dokularında SBSN İmmün İfadesi.....	129
4.8. Dokulardaki SBSN Düzeyinin WB ile Analizi.....	149
5. TARTIŞMA	150
KAYNAKLAR	159
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	174

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: MK için tanımlanmış risk faktörleri.....	5
Tablo 2-2: WHO 2016 üriner sistem tümörleri sınıflandırması	11
Tablo 2-3: AJCC 2017 sistemine göre MK’da TNM evrelemesi.....	12
Tablo 2-4: AJCC 2017’ye göre MK’da TNM evreleme grupları.....	13
Tablo 2-5: MK’da aktive olan onkogenler ve mutasyonların türleri.	17
Tablo 2-6: MK’da inaktive olan tümör baskılayıcı genler ve mutasyonlar.....	18
Tablo 2-7: MK’da kullanılan FDA onaylı idrar belirteçleri/testleri	35
Tablo 2-8: MK’da kullanılan FDA onayı almamış “protein temelli” idrar belirteçleri/testleri.	36
Tablo 2-9: MK’da kullanılan FDA onayı almamış “mRNA temelli” idrar belirteçleri/testleri.	37
Tablo 2-10: MK’da kullanılan FDA onayı almamış “DNA temelli” idrar belirteçleri/testleri..	38
Tablo 4-1: KİOMT’li 10 vakaya ait demografik ve klinik bilgiler.....	83
Tablo 4-2: Sağlıklı 6 katılımcıya ait demografik bilgiler	83
Tablo 4-3: Sağlıklı katılımcılar ile MK’lı vakaların üriner eksozomları arasında farklılık gösteren miRNA’lar.....	88
Tablo 4-4: Sağlıklı katılımcılar ile MK’lı vakaların üriner eksozomları arasında farklılık gösteren miRNA’lar.....	90
Tablo 4-5: Sağlıklı katılımcılar ile Ta evre (Ta-Low Grade+ Ta-High Grade) MK’lı vakaların üriner eksozomları arasında farklılık gösteren miRNA’lar..	91
Tablo 4-6: Sağlıklı katılımcılar ile T1-High Grade evre MK’lı vakaların üriner eksozomları arasında farklılık gösteren miRNA’lar	91
Tablo 4-7: Ta evre (Ta-Low Grade+Ta-High Grade) MK’lı vakalar ile T1-High Grade evre MK’lı vakaların üriner eksozomları arasında farklılık gösteren miRNA’lar.....	92
Tablo 4-8: Sağlıklı katılımcılar ile Ta-High Grade evre MK’lı vakaların üriner eksozomları arasında farklılık gösteren miRNA’lar	92
Tablo 4-9: Ta-Low Grade evre MK’lı vakalar ile Ta-High Grade MK’lı vakaların üriner eksozomları arasında farklılık gösteren miRNA’lar	92

Tablo 4-10: Ta-Low Grade evre MK'lı vakalar ile T1-High Grade MK'lı vakaların üriner eksozomları arasında farklılık gösteren miRNA'lar..	93
Tablo 4-11: Ta-High Grade evre MK'lı vakalar ile T1-High Grade evre MK'lı vakaların üriner eksozomları arasında farklılık gösteren miRNA'lar.	93
Tablo 4-12: MK'lı 25 vakaya ait demografik ve klinik bilgiler	107
Tablo 4-13: Tumor-Free dokuların alındığı 9 katılımcıya ait demografik bilgiler.....	108
Tablo 4-14: KİOMT'li 12 vakaya ait demografik ve klinik bilgiler.....	113
Tablo 4-15: Sağlıklı 9 katılımcıya ait demografik bilgiler	113
Tablo 4-16: KİOMT'li vakaların üriner eksozomlarında artış gösteren proteinler ile “Unique Peptides”, FC ve FDR-Corrected p-Değeri bilgileri	115
Tablo 4-17: KİOMT'li vakaların üriner eksozomlarında azalış gösteren proteinler ile “Unique Peptides”, FC ve FDR-Corrected p-Değeri bilgileri	116
Tablo 4-18: KİOMT'li 18 vakaya ait demografik ve klinik bilgiler.....	123
Tablo 4-19: İHK analizine dahil edilen vakalara ait medyan bilgiler.....	141
Tablo 4-20: KİOMT'li 4 vakaya ait demografik ve klinik bilgiler.....	149
Tablo 4-21: Tumor-Free dokuların alındığı 2 katılımcıya ait demografik bilgiler.....	149

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Mesane duvarının histolojik yapısı	7
Şekil 2-2: Mesane kanserinde sistoskopi ve TUR-MT	8
Şekil 2-3: Mesane tümörlerinde moleküler sınıflama sistemleri	16
Şekil 2-4: Ürotelyal karsinoma patogeneğinde “Two-Pathways” hipotezi	19
Şekil 2-5: İdrar biyobelirteçlerinin şematik illüstrasyonu	39
Şekil 2-6: Bir eksozomun şematik illüstrasyonu.	42
Şekil 4-1: Eksozomların “Nanoparticle Viewing Unit” ile elde edilen görüntüleri	80
Şekil 4-2: NTA analizi sonuçları	81
Şekil 4-3: TEM ile yapılan eksozom karakterizasyonuna ait görüntüler.....	82
Şekil 4-4: 87 miRNA’nın kantitasyon sonucunun dağılımını gösteren Scatter Plot	84
Şekil 4-5: 87 miRNA’nın kantitasyon sonucunun dağılımını gösteren Volcano Plot....	85
Şekil 4-6: 87 miRNA’nın kantitasyon sonucunun dağılımını gösteren PCA grafiği	86
Şekil 4-7: 87 miRNA’nın kantitasyon sonucuna göre MK’lı vakaları ve sağlıklı katılımcıları sınıflandıran clustergram.	87
Şekil 4-8: Sağlıklı katılımcılar ile KİOMT’li vakaların üriner eksozomları arasında farklılık gösteren miRNA’lar.....	88
Şekil 4-9: Sağlıklı katılımcılar ile MK’lı vakalar arasında değişim gösteren 7 miRNA’ya ait ROC analizi.....	89
Şekil 4-10: Sağlıklı katılımcılar ile MK’lı vakalar arasında değişim gösteren 3 miRNA’ya ait ROC analizi.....	90
Şekil 4-11: STRING analizi.....	94
Şekil 4-12: STRING analizi.....	95
Şekil 4-13: PANTHER veritabanında yapılan moleküler fonksiyon analizi	96
Şekil 4-14: PANTHER veritabanında yapılan biyolojik proses analizi	96
Şekil 4-15: PANTHER veritabanında yapılan protein klasifikasyon analizi	97
Şekil 4-16: PANTHER veritabanında yapılan pathway analizi sonuçları	98
Şekil 4-17: PANTHER veritabanında yapılan moleküler fonksiyon analizi.....	99
Şekil 4-18: PANTHER veritabanında yapılan biyolojik proses analizi	99
Şekil 4-19: PANTHER veritabanında yapılan protein klasifikasyon analizi	100
Şekil 4-20: PANTHER veritabanında yapılan pathway analizi.....	101
Şekil 4-21: miRNA-200 ailesinin sitogenetik lokalizasyonları	106

Şekil 4-22: Seed sekanslarına göre mature miRNA-200 ailesi üyeleri	106
Şekil 4-23: Sağlıklı katılımcılar ile KİOMT'li vakaların üriner eksozomları arasındaki miRNA-200 ailesi üyelerinin anlatımının değişimi.....	106
Şekil 4-24: Mesane tümör dokuları ve NAT'ların hsa-miRNA-200a-3p anlatım düzeyleri.....	109
Şekil 4-25: Kasa invazyon durumuna göre gruplandırılmış mesane tümör dokularına ve Tumor-Free mesane dokularına ait hsa-miRNA-200a-3p anlatımının NAT'lar ile karşılaştırılması.....	109
Şekil 4-26: Subgruplara ayrılmış mesane tümör dokuları ve eşlenik NAT'lardaki hsa-miRNA-200a-3p anlatımının birbirleri ve Tumor-Free mesane dokularına ait hsa-miRNA-200a-3p anlatımı ile karşılaştırılması.....	110
Şekil 4-27: Subgruplara ayrılmış mesane tümör dokuları, eşlenik NAT'lar ve Tumor-Free mesane dokularına ait U6 snRNA (hsa) anlatımı	111
Şekil 4-28: hsa-miRNA-200a-3p düzeylerine ait ROC analizi	112
Şekil 4-29: KİOMT'li vakaların ve sağlıklı katılımcıların üriner eksozomlarında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) düzeyde değişim gösteren proteinlerin sayısı	114
Şekil 4-30: KİOMT'li vakalar ile sağlıklı katılımcılar arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) düzeyde farklılık gösterdiği ortaya konulan 57 proteinin log ₂ 'ye göre transforme edilmiş LFQ sinyal intensitelerini sınıflandıran heatmap grafiği.....	114
Şekil 4-31: STRING analizi.....	117
Şekil 4-32: Signor analizi	118
Şekil 4-33: Signor analizi	118
Şekil 4-34: PANTHER veritabanında yapılan moleküler fonksiyon analizi.....	119
Şekil 4-35: PANTHER veritabanında yapılan biyolojik proses analizi	120
Şekil 4-36: PANTHER veritabanında yapılan protein klasifikasyon analizi	120
Şekil 4-37: PANTHER veritabanında yapılan pathway analizi.....	120
Şekil 4-38: PANTHER veritabanında yapılan moleküler fonksiyon analizi.....	121
Şekil 4-39: PANTHER veritabanında yapılan biyolojik proses analizi	121
Şekil 4-40: PANTHER veritabanında yapılan protein klasifikasyon analizi	122
Şekil 4-41: PANTHER veritabanında yapılan pathway analizi.....	123
Şekil 4-42: KİOMT'li vakaların üriner eksozomlarının MALDI-TOF MS analizi neticesinde elde edilen mass spectral fingerprint'ler.....	124

Şekil 4-43: Sağlıklı katılımcıların üriner eksozomlarının MALDI-TOF MS analizi neticesinde elde edilen mass spectral fingerprint'ler.	127
Şekil 4-44: SBSN proteininin 3D yapısı.....	130
Şekil 4-45: SBSN'ye ait interaction network haritası.....	134
Şekil 4-46: SBSN ile <i>CTCF</i> , <i>CTCF</i> L, <i>SOX2</i> ve <i>AKT</i> anlatımlarının korelasyonu	134
Şekil 4-47: SBSN'ye ait LFQ sinyal intensitelerinin değişimi.....	138
Şekil 4-48: MK'da SBSN anlatımının değişimi	140
Şekil 4-49: T1-High Grade Evre bir mesane tümör dokusuna ait İHK sonucu.....	142
Şekil 4-50: T2-High Grade evre bir mesane tümör dokusuna ait İHK sonucu.....	142
Şekil 4-51: T2-High Grade evre bir mesane tümör dokusuna ait İHK sonucu.....	142
Şekil 4-52: Ta-Low Grade evre bir mesane tümör dokusuna ait İHK sonucu	143
Şekil 4-53: Ta-High Grade evre bir mesane tümör dokusuna ait İHK sonucu.....	143
Şekil 4-54: T4a-High Grade evre bir mesane tümör dokusuna ait İHK sonucu.....	143
Şekil 4-55: Ta-High Grade evre bir mesane tümör dokusuna ait İHK sonucu.....	144
Şekil 4-56: Ta-High Grade evre bir mesane tümör dokusuna ait İHK sonucu.....	144
Şekil 4-57: T2-High Grade evre bir mesane tümör dokusuna ait İHK sonucu.....	144
Şekil 4-58: Tumor-Free mesane dokusuna ait İHK sonucu.....	145
Şekil 4-59: İHK analizi sonucunda umbrella (facet) hücrelerinde, endotel hücrelerinde ve Muscularis Propria'nın kas hücrelerinde gözlenen SBSN immün ifadesi.	145
Şekil 4-60: İHK analizi sonuçları	146
Şekil 4-61: Stage-dependent SBSN immün ifadesi değişimi	147
Şekil 4-62: KİMT'de stage-dependent SBSN anlatımının değişimi	147
Şekil 4-63: T2-High Grade evre mesane tümör dokularındaki SBSN immün ifadesinin lenfovasküler invazyon durumuna göre değişimi	148
Şekil 4-64: MK'da SBSN anlatım düzeyinin survival ile ilişkisi.....	148
Şekil 4-65: WB analiz sonuçları	149

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

KİOMT	: Kasa İnvaze Olmayan Mesane Kanseri
KİMT	: Kasa İnvaze Mesane Kanseri
CIS	: Carcinoma In Situ
PUNLMP	: Papillary Urothelial Neoplasm of Low Malignant Potential
TUR-MT	: Mesane Tümörünün Transüretal Rezeksiyonu
BCG	: Bacillus Calmette-Guérin
NAT	: Normal Tissue Adjacent to the Tumor
FFPET	: Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue
VKİ	: Vücut Kitle İndeksi
EMT	: Epitelyal-Mezenkimal Transizyon
EV	: Ekstraselüler Vezikül
İHK	: İmmünohistokimya
WB	: Western Blot
PEG	: Polietilen Glikol
NTA	: Nanoparticle Tracking Analysis
TEM	: Transmission Electron Microscope
FASP	: Filter Aided Sample Preparation
FR	: Fold Regulation
FC	: Fold Change
ROC	: Receiver Operating Characteristic
AUC	: Area Under the Curve
CI	: Confidence Interval
FDR	: False Discovery Rate
TPM	: Transcripts Per Million
LFQ	: Label-Free Quantification
TCGA	: Kanser Genom Atlası
GTE _x	: Genotype-Tissue Expression

ÖZET

Dogan, T. (2023). Mesane Kanserinde Üriner Eksozomların MikroRNA ve Proteom Profilinin Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Temel Onkoloji Anabilim Dalı, Kanser Genetiği Bilim Dalı. Doktora Tezi. İstanbul.

Mesane kanseri (MK) sadece dünya genelindeki en yaygın 10. kanser türü değil aynı zamanda en fazla rekürrensin görüldüğü malignitedir ve tanı/takip için invaziv bir yöntem olan sistoskopiye alternatif biyobelirtec(ler)e ihtiyaç vardır. Çalışmamızda MK için biyobelirteç olma potansiyeli taşıyan idrar eksozomlarının miRNA ve proteom profili araştırıldı. İdrar örneklerinden eksozom izolasyonu için ultrasantrifüj ve PEG temelli kit kullanıldı. Eksozomlar NTA ve TEM ile karakterize edildi. Seksen yedi eksozomal miRNA'nın değişimi qRT-PCR ile araştırıldı ve bunlar içerisinde MK'da 2 kat veya üzeri artış/azalış gösteren istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) 7 miRNA'nın ROC analizine göre MK'yı sağlıklı kontrollerden ayırabilecek yüksek performansa sahip olduğu görüldü ($p < 0.0001$; AUC: 0,7641; %95 CI: 0,6850-0,8432). Mesane kanserli vakaların idrar eksozomlarında 1,49 kat azalış gösteren ($p = 0.016$) hsa-miRNA-200a-3p'nin mesane dokularındaki değişimi qRT-PCR ile valide edildi. LC-MS/MS analizi neticesinde tanımlanan 645 proteinden 57 tanesi anlamlı düzeyde ($p < 0.05$) değişim gösteriyordu. Bunlardan PAPP2, TMCC1 ve MGAM2 daha önce ExoCarta veritabanında kayıtlı olmayan yeni (novel) proteinlerdi. STRING ve Signor biyoinformatik araçlarıyla yapılan analiz RHOA ve YWHAZ proteinlerinin MK için önemli birer terapötik hedef olabileceğine işaret etti. LFQ sinyal intensitelerine göre Suprabasin'in (SBSN) en yüksek performansta artış gösteren protein olduğu anlaşıldı (Fold Change: 31,79; $p = 0.001$). TCGA ve GTEx verileri ile yaptığımız veri madenciliği ($n = 404$ MK; $n = 28$ kontrol), SBSN anlatımının mesane tümör dokularında arttığını ve artmış SBSN anlatımının anlamlı düzeyde ($p = 0.032$) azalmış genel sağkalım ile ilişkili olduğunu ortaya koydu. Western blot analizi mesane tümöründeki rölatif SBSN artışını destekledi. İmmünohistokimya analizi T2-High Grade evre mesane tümörlerindeki SBSN immün ifadesinin lenfovasküler invazyon pozitifliği gösteren vakalarda anlamlı düzeyde ($p = 0.030$) daha yüksek olduğuna işaret etti. MALDI-TOF MS ile analizi intakt eksozomlardan elde edilen mass spektral fingerprint'lerin sağlıklı kontrollerle MK'lı vakalar arasında özellikle m/z 2000-5000 aralığında farklılık gösterdiğine işaret etti. Bulgular birlikte değerlendirildiğinde üriner eksozom kökenli miRNA ve proteinlerin MK için prognostik ve prediktif belirteç olarak ya da terapötik hedef olarak umut vaat ettiği söylenebilir.

Anahtar Kelimeler: mesane kanseri, idrar, eksozom, miRNA, hsa-miRNA-200a-3p, suprabasin, LC-MS/MS, MALDI-TOF MS.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2022-38933

ABSTRACT

Dogan, T. (2023). Investigation of MicroRNA and Proteome Profile of Urinary Exosomes in Bladder Cancer. Istanbul University, Institute of Health Science, Department of Basic Oncology, Division of Cancer Genetics. Doctoral Thesis. Istanbul.

Bladder cancer (BC) is not only the 10th most common type of cancer worldwide but also the malignancy with the highest recurrence rate. There is a pressing need for alternative biomarkers to cystoscopy, which is an invasive method for diagnosis and monitoring. In our study, we investigated the miRNA and proteome profiles of urinary exosomes, which have the potential to serve as biomarkers for BC. We isolated exosomes from urine samples using ultracentrifugation and a PEG-based kit. Exosomes were characterized using NTA and TEM. Eighty-seven exosomal miRNAs were examined using qRT-PCR. According to ROC analysis, 7 miRNAs exhibited a statistically significant increase or decrease of at least 2-fold in BC compared to healthy controls ($p < 0.05$). These 7 miRNAs demonstrated high performance in distinguishing BC from healthy controls, with a p-value of less than 0.0001, an AUC of 0.7641, and a 95% confidence interval of 0.6850-0.8432. The reduction of hsa-miRNA-200a-3p, which showed a 1.49-fold decrease ($p = 0.016$) in the urinary exosomes of BC cases, was validated by qRT-PCR. Of the 645 proteins identified through LC-MS/MS analysis, 57 showed significant changes ($p < 0.05$). Among these, PAPP2, TMCC1, and MGAM2 were novel proteins not previously registered in the ExoCarta database. Analysis with the STRING and Signor bioinformatics tools suggested that RHOA and YWHAZ proteins might each be important therapeutic targets for BC. Based on LFQ signal intensities, Suprabasin (SBSN) exhibited the highest increase in performance (Fold Change: 31.79; $p = 0.001$). Data mining with TCGA and GTEx data ($n = 404$ MK; $n = 28$ controls) revealed that SBSN expression increased in bladder tumor tissues and that elevated SBSN expression was associated with significantly reduced overall survival ($p = 0.032$). Western blot analysis supported the relative increase of SBSN in bladder tumors. Immunohistochemistry analysis indicated that SBSN immune expression was significantly higher ($p = 0.030$) in T2-High Grade bladder tumors with lymphovascular invasion positivity. Analysis by MALDI-TOF MS indicated that mass spectral fingerprints obtained from intact exosomes differed between healthy controls and BC cases, particularly in the m/z range of 2000-5000. In conclusion, urinary exosome-derived miRNAs and proteins hold promise as prognostic and predictive markers for BC, or as therapeutic targets.

Key Words: bladder cancer, urine, exosome, miRNA, hsa-miRNA-200a-3p, suprabasin, LC-MS/MS, MALDI-TOF MS.

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No: TDK-2022-38933

1. GİRİŞ VE AMAÇ

GLOBOCAN verilerine göre mesane kanseri (MK) dünya genelinde görülen en yaygın 10. kanser türüdür ve 2020 yılı itibarıyla 573.000 kişi MK tanısı almıştır (Sung ve ark. 2021). Tüm vakaların dörtte üçünden fazlasını erkek hastalar oluşturmakta olup bu durum MK'yı erkeklerdeki en yaygın 6. kanser türü yapmaktadır (Hoogstraten ve ark. 2023). Mesane tümörlerinin %90'ı mesane iç yüzeyini kaplayan epitel tabakası olan ürotelyumdan köken almaktadır ve tanı anında vakaların %75'i mukoza ile sınırlı, kasa invaze olmayan mesane tümörüne (KİOMT) sahiptir (Sanli ve ark. 2017; Kamoun ve ark. 2020). Buna karşılık KİOMT'li vakaların %10-20'si genellikle 5 yıllık sürvisi lokal tümörlü vakalar için %60 ve metastatik vakalar için ise %10 olan, kötü prognozlu, kasa invaze mesane tümörüne (KİMT) ilerleme göstermektedir (Kamoun ve ark. 2020). Mesane tümörünün transüretal rezeksiyonu (TUR-MT) adı verilen cerrahi operasyon ile KİOMT'lerde yüksek sağkalım elde edilebilmekte ancak hastalık çoğu zaman ilk 5 yılda daha agresif bir tümör olarak nüks etmektedir (Guidance ve ark. 2017). Bugün için MK'nın tanısında ve rekürrens takibinde altın standart yöntem olarak hala sistoskopi ve idrar sitolojisi kullanılmaktadır (Sanli ve ark. 2017). Sistoskopi ile görüntüleme invaziv olması bakımından hem hasta açısından konforsuz ve hekim açısından zaman kaybettiricidir bu nedenle rutin üroonkoloji pratiğinde kullanılabilecek “Prostat Spesifik Antijen (PSA)” gibi serum ya da idrar bazlı bir biyobelirtece gereksinim vardır. Zaman içerisinde “FDA/EUA/AUA” onayları almış olan/olmayan pek çok biyobelirteç/tanı testi önerilmişse de klinik kullanıma uygun olmamaları, düşük sensitivite/spesifite yüzdeleri, geniş kohortlardan elde edilen yeterli bilgi bulunmaması, belirteçlerin/testlerin “intravezikal BCG instilasyonundan” etkilenmesi ve tekrarlanabilir olmamaları ya da maliyet etkin olmamaları gibi sebeplerle yaygın kullanım alanı bulamamışlardır.

Biyobelirteç keşfi çalışmalarının son yıllarda eksozomlar üzerine yoğunlaştığı görülmektedir. Yaklaşık 30-150 nm boyutunda olan eksozomlar bir ekstraselüler vezikül (EV) türü olup sentezlendikleri tümör hücresinin özelliklerine göre değişen düzeyde “protein, lipid, DNA, mRNA, miRNA, lncRNA ve circRNA” içermekte ve bunları diğer hücreler arasında transfer ederek alıcı hücrelerde biyolojik değişiklikler yaratabilmektedirler (Lee ve ark. 2022). Ayrıca içerdikleri moleküller membranla

çevrili olan eksozomların içerisinde “RNaz’lardan, DNaz’lardan ve proteazlardan” korunmakta; MK özelinde düşünüldüğünde ise tümör kökenli moleküllerin eksozomların içerisinde idrarın yıkıcı asiditesine ve idrarda bulunan enzimlere karşı korunduğu söylenebilmektedir ve bu özellikleri eksozomların idrar kökenli likit biyopsi için uygun bir kaynak olabileceğine işaret etmektedir (Zhou ve ark. 2020). Bu bilgiler doğrultusunda söz konusu çalışmada MK’lı vakaların üriner eksozomlarına ait miRNA ve proteom profilinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmamızda idrar eksozomları hem PEG temelli kit ile hem de eksozom izolasyonu için altın standart yöntem olan ultrasantrifüj ile izole edilerek yöntemlerin verimlilikleri karşılaştırılmıştır. Eksozomların karakterizasyonu hem NTA hem de TEM ile yapılmıştır. Literatürdeki çalışmalar, kanserde düzeyi değişen onlarca farklı eksozomal miRNA’dan bahsetmekle birlikte MK’ya ilişkin yapılan çalışmalar kısıtlıdır. Çalışmamızda MK’lı vakaların ve sağlıklı katılımcıların üriner eksozomlarındaki 87 miRNA’nın değişimi qRT-PCR ile analiz edilerek MK’da eksozomal miRNA profilinin nasıl değiştiği sorusuna cevap arandı. Üriner eksozomlara ait miRNA profili prognostik olduğu kadar prediktif de öneme sahiptir. Bu sebeple analiz sonucunda istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) düzeyde farklılık gösteren miRNA’lar Fold-Regulation (FR) threshold’ları da dikkate alınarak listelendi ve panel olarak MK ile sağlıklı kontrolleri ayırmadaki performansları ROC analizi ile değerlendirildi. Üriner eksozomlara ait proteom profilleri LC-MS/MS ile analiz edildi. qRT-PCR ve LC-MS/MS sonuçlarının validasyonu mesane dokularında gerçekleştirildi. Çalışmamız kapsamında ayrıca MK’lı vakaların ve sağlıklı kontrollerin üriner eksozomları intakt halde MALDI-TOF MS ile analiz edilerek elde edilen mass spectral fingerprint’lerin biyobelirteç olarak kullanılabilirliği değerlendirildi. Tüm bulgularımız basit biyoinformatik araçlarla elde edilen sonuçların eşliğinde ve PubMed üzerinde uygun MeSH terimleri ile yapılan aramalarda karşılaşılan tüm çalışmaların filtrelenip sistematik şekilde derlenmesiyle birlikte ele alındı. Ayrıca sonuçlarımız, TCGA ve GTEx verilerini kullanarak yaptığımız veri madenciliğinden elde ettiğimiz bulgularla zenginleştirildi. Nihayetinde sunulan çalışmanın sadece MK’daki eksozomal miRNA ve proteom profili hakkında bilgi sağlamakla kalmayıp MK’da terapötik hedef olarak kullanılabilecek genlere/gen ürünlerine işaret ettiğini düşünmekteyiz. Buna ek olarak önerdiğimiz miRNA panellinin MK’da biyobelirteç olarak kullanılabilecek potansiyele sahip olduğuna inanmaktayız.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mesane Kanseri

2.1.1. Mesane Kanserinin Epidemiyolojisi ve Risk Faktörleri

Mesane kanseri (MK), dünya genelinde görülen en yaygın 10. kanser türü olup GLOBOCAN verilerine göre 2020 yılında yaklaşık olarak 573.000 kişi MK tanısı almıştır (Sung ve ark. 2021). Bu vakaların dörtte üçünden fazlasını erkek hastalar oluşturmaktadır ve bu durum MK'yı erkeklerdeki en yaygın 6. kanser türü yapmaktadır (Hoogstraten ve ark. 2023). Bununla birlikte 2020 yılında dünya genelinde yaklaşık 213.000 kişinin MK sebebiyle öldüğü bildirilmiş olup bu durum yine MK'yı kansere bağlı ölüm nedenleri arasında cinsiyet fark etmeksizin 13. sıraya, erkekler arasında ise 9. sıraya taşımaktadır (Sung ve ark. 2021; Hoogstraten ve ark. 2023). Mesane kanseri gelişimi için en önemli risk faktörünün sigara kullanımı olduğu (Freedman ve ark. 2011) kanıtlanmıştır ve Mayıs 2023 itibarıyla literatürde bu konuyu pipo, puro, elektronik sigara ve tütün çeşitlerini de dahil ederek ele alan 83'ten fazla meta-analiz çalışması bulunmaktadır. Epidemiyolojik çalışmaların erkeklerin kadınlardan daha yüksek düzeyde sigara tükettiğini gösterdiği düşünüldüğünde, erkeklerdeki artmış MK insidansını açıklamak kolaylaşmaktadır.

Mesane, anatomik yapısı gereği idrar için bir rezervuar görevi üstlenmektedir. Yaşam tarzı ve çevresel maruziyetle ilişkilendirilebilecek karsinojenlere ait metabolitler idrara geçerek ürotelyumda karsinogenezi indüklemektedir. Bu konseptten hareketle sıvı tüketimi ile MK gelişim riski arasındaki ilişki 1980'li yıllardan beri araştırma konusu olsa da elde edilen kanıtlar bugün için bile tutarsızdır. Total sıvı alımının, idrara geçen karsinojenik metabolitleri dilüe ederek ürotelyum üzerinde koruyucu etki yaratacağı varsayılmaktadır ancak tersten düşünüldüğünde tüketilen sıvıların bizzat kendisi karsinojenik ajanlar ihtiva ediyorsa, kümülatif doza bağlı olarak MK gelişimi için risk faktörü olabilmektedirler (Christoforidou ve ark. 2013). Jiang ve arkadaşlarının yaptığı 1586 katılımcılı Los Angeles vaka-kontrol çalışmasında; su, kahve, çay, alkol, süt, meyve suları, sıcak çikolata ve soda gibi tüm içecekler dahil edilerek total sıvı alımı ile MK gelişim riski arasındaki ilişki sorgulanmış fakat anlamlı bir ilişki olmadığı gösterilmiştir (Jiang ve ark. 2008). Bununla birlikte tek başına ≥ 6 bardak/gün su tüketiminin; <1 bardak/güne kıyasla MK gelişim riskini zayıf düzeyde de olsa azalttığı

bildirilmiştir (Jiang ve ark. 2008). Temiz içme suyuna erişim MK gelişimi için kritik öneme sahiptir. Epidemiyolojik çalışmalar $>50 \mu\text{g/L}$ konsantrasyonun üzerinde arsenik ihtiva eden içme sularının MK gelişim riskini doza bağımlı biçimde arttırdığına dair güçlü kanıtlar sunmaktadır (Christoforidou ve ark. 2013; Hoogstraten ve ark. 2023).

Tek başına değerlendirildiğinde, görüş birliği olmasa da alkol tüketiminin MK gelişim riskini arttırabileceği (Zaitsu ve ark. 2016) ve içeriğindeki zengin polifenol bileşikleri ile yeşil çay gibi çay türevlerinin MK gelişim riskini azaltabileceği düşünülmektedir (Wang ve ark. 2013). Diyabet, kardiyolojik hastalıklar ve diğer bazı kanser türleri üzerinde koruyucu etkileri olduğu gösterilse de vaka-kontrol çalışmaları kahve tüketiminin MK gelişimi için bir risk faktörü olduğunu söylemekte ancak bu kanıtlar bazı kohortlardaki çalışmalarla örtüşmemektedir (Zhou ve ark. 2012). Meyve ve sebze tüketiminin MK'ya karşı koruyucu etkileri olduğuna dair güçlü kanıtlar bulunmakta olup özellikle koyu yeşil yapraklı sebzelerin, karotenoidlerin ve A vitamini gibi mikronutrientlerin tüketimi önerilmektedir (Dogan ve ark. 2021). “Sedanter yaşam, kısıtlı fiziksel aktivite, obezite, tip 2 diyabet varlığı, nulliparite, iyonize edici radyasyon maruziyeti (X-ray ve gama radyasyonu) ve çeşitli ilaçlar (siklofosamid, klornafazin, fenasetin, aristoloşik asit (aynı zamanda bir diyet risk faktörü) ve pioglitazon) da artmış MK gelişim riski ile ilişkilendirilen diğer faktörlerdir” (Hoogstraten ve ark. 2023). Bunların yanı sıra MK riskini azaltan ilaçlar da bildirilmiştir. Örneğin sedatif etkiye sahip barbitüratların (Habel ve ark. 1998) ve non-steroidal antienflamatuvar ilaçların (NSAİİ) MK riskini azalttığına dair kanıtlar mevcuttur (Castelao ve ark. 2000). Ülkemizde nadir olmakla birlikte bazı Afrika ülkelerinde görülen ve Mısır'da ise endemik olan Şistozomiyaz enfeksiyonu mesaneyi (vezikal venöz pleksusu) tutarak çoğunlukla skuamöz hücreli karsinomaya neden olmaktadır (Santos ve ark., 2021). Şistozomiyaz enfeksiyonundan Trematoda sınıfına ait *Schistosoma haematobium* paraziti sorumludur ve enfekte bireylerden tatlı sulara idrar yoluyla geçen parazit yumurtalarının önemli bir bulaş yolu olduğu anlaşılmıştır (Santos ve ark. 2021).

Yaşam tarzı, meslek ve çevreyle ilişkili karsinojen maruziyetinin sebep olduğu MK gelişimi de önemli bir konudur. Tüm MK vakalarının %20-25 kadarının mesleki karsinojenlere bağlı olarak geliştiği düşünülmekte olup karsinojenik ajanlara maruziyet ve meslek arasındaki ilişkiye ilk defa 20 Nisan 1895 yılında Alman cerrah Ludwig Rehn'in Frankfurt'taki bir kimya fabrikasında anilin ile çalışan işçiler arasında artan MK vakalarını bildirdiği ünlü konferansı ile dikkat çekilmiştir (Babjuk ve ark., 2009). Riskli

meslek gruplarında çalışan bireylerin idrar örnekleri üzerinde yapılan analizlerde, maruz kaldıkları ürotelyal karsinojenlerin metabolitlerine rastlanmaktadır (Boffetta ve ark. 2001; Carreón ve ark. 2006). Boyacılık sektöründe çalışanlar, kauçuk ve alüminyum üretiminde çalışanlar, saç boyalarına maruz kalan berber ve kuaförler, kuru temizlemeciler, matbaa çalışanları ve kumaş boyama faaliyetleri yürüten tekstil sektörü çalışanları mesleki karsinojenlere en fazla maruz kalan meslek gruplarına mensuplardır. “International Agency for Research on Cancer (IARC)”, meslek gruplarına göre en sık maruz kalınan ve ürotelyum için karsinojen olarak tanımlanan özel 11 aromatik amini; “Grup 1 (Definite) (4-aminobifenil, Arsenik, Benzo[a]pirin, Benzidin, β -Naftilamin, *N,N*-bis(2-kloroetil)-2-naftilamin (klornafazin), 4,4’-metilen bis(2-kloroanlin) (MOCA), *orto*-toluidin), Grup 2A (Probable) (4-kloro-*orto*-toluidin) ve Grup 2B (Possible) (4,4’-metilen bis(2-metilanilin), Perkloroetilen, Trikloroetilen, Tetrakloroetilen)” şeklinde gruplandırmıştır (Dalclos ve ark. 2008). IARC tarafından tanımlanmış bu kimyasallarla çalışan meslek gruplarının MK gelişimine karşı ekstra koruyucu önlemler almaları önem taşımaktadır. Karsinojenlere maruziyet kadar bu karsinojenleri metabolize eden enzimlerin, örneğin; NAT2 enziminin yavaş asetilatör varyantının ve *GSTM1*’in null genotipinin MK riski arttırdığına dair meta-analizler mevcuttur (García-Closas ve ark. 2005). Tablo 2-1’de MK için tanımlanmış risk faktörleri ve kanıt düzeyine göre seviyeleri özetlenmiştir.

Tablo 2-1: Mesane kanseri için tanımlanmış risk faktörleri ve kanıt düzeyine göre seviyeleri ((Hoogstraten ve ark. 2023)’den uyarlanmıştır).

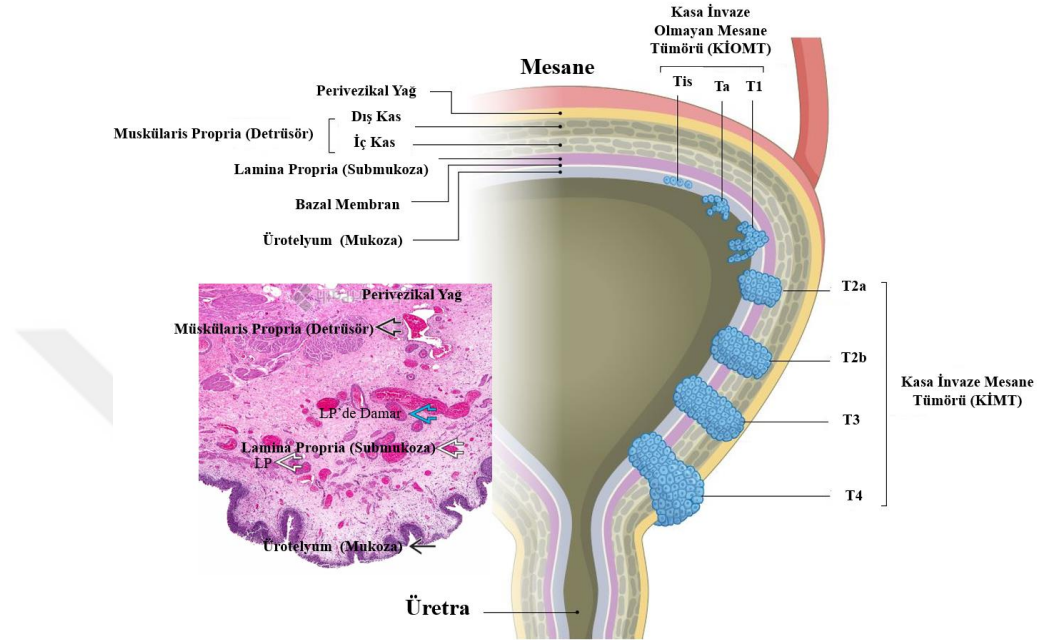
Risk Faktörü	Kanıt Düzeyi ve İlişkisi
Kanıtlanmış Risk Faktörleri	-
Sigara Kullanımı	↑↑
Genetik yatkınlık: karsinojen metabolizmasında (<i>NAT2</i> , <i>GSTM1</i> ve <i>UGT1A6</i> gibi), hücre döngüsünün kontrolünde (<i>TP63</i> , <i>CCNE1</i> , <i>MYC</i> ve <i>FGFR3</i> gibi) ve/veya DNA onarımında rol oynayan proteinleri (<i>XRCC1</i> , <i>XRCC2</i> , <i>XRCC3</i> , <i>ERCC2</i> , <i>ERCC4</i> , <i>ERCC5</i> ve <i>NRN</i> gibi) kodlayan genlerdeki varyasyonlar	↑
<i>Schistosoma haematobium</i> enfeksiyonu	↑↑
İçme suları yoluyla arsenik maruziyeti	↑
Mesleki karsinojen maruziyetleri: aromatik aminler ve boyalar (4-aminobifenil, benzidin, 2-naftilamin ve <i>orto</i> -toluidin)	↑↑

Meslekler ve endüstriyel alanlar: boyacılık, kauçuk endüstrisi, alüminyum üretimi, auramin üretimi, magenta boyası üretimi ve itfaiyecilik	↑
İlaçlar: siklofosfamid, klornafazin, fenasetin, aristoloşik asit (aynı zamanda bir diyet risk faktörü) ve pioglitazon	↑↑
Aile öyküsü	↑
İyonlaştırıcı radyasyon (X-ışını radyasyonu ve γ-radyasyonu)	↑
Önemli Kanıtlara Dayalı Olası Risk Faktörleri	-
İçme sularındaki dezenfeksiyon yan ürünleri	↑
Mesleki karsinojen maruziyetleri: dizel motor egzoz emisyonları, 4-kloro-orto-toluidin, kömür, katran ve/veya zift, kurum, tetrakloretilen ve perkloretilen, metal işleme sıvıları	↑
Meslekler ve endüstriyel alanlar: berberler ve kuaförler, kuru temizleme sektörü, matbaacılık ve tekstil sektörü	↑
Pipo ve puro kullanımı	↑
Tip 2 diyabet	↑
Önemli Kanıtlara Dayalı Zayıf Faktörler	-
Parite	↓
Çay tüketimi	↓
Sebze ve meyve tüketimi	↓
Fiziksel aktivite	↓
Tutarsız Bulgulara ya da Kısıtlı Kanıtlara Dayalı Faktörler	-
Hava kirliliği	↑
Saç boyaları	↑
Diyet: tahıllar ve tahıl ürünleri, bakliyatlar, beyaz ve kırmızı et, balık, süt ürünleri, içecekler (kahve, meyve suları ve alkolsüz içecekler), artmış kalori alımı, makro ve mikro nutrientler, multivitamin takviyeleri, biyoaktif bileşikler, diyetetik gıdalar, yapay tatlandırıcılar	↑ ya da ↓
Sıvı alımı	↓
Alkol tüketimi	↑
Obezite	↑
Enfeksiyonlar (<i>S. haematobium</i> dışı)	↑
İlaçlar: sedatif barbitüratlar ve non-steroidal antienflamatuvar ilaçlar (NSAİİ)	↓

2.1.2. Mesane Kanseri Tanı, Takip ve Tedavi

Mesane tümörlerinin %90'ı mesane iç yüzeyini kaplayan epitel tabakası olan ürotelyumdan köken almaktadır ve tanı anında vakaların %75'i mukoza ile sınırlı, kasa invaze olmayan mesane tümörüne (KİOMT) sahiptir (Sanli ve ark. 2017; Kamoun ve ark. 2020). Buna karşılık KİOMT'li vakaların %10-20'si genellikle 5 yıllık sürvisi lokal tümörlü vakalar için %60 ve metastatik vakalar için ise %10 olan, kötü prognozlu, kasa invaze mesane tümörüne (KİMT) ilerleme göstermektedir (Kamoun ve ark. 2020) (Şekil 2-1). Mesane tümörünün transüretral rezeksiyonu (TUR-MT) adı verilen cerrahi operasyon ile KİOMT'lerde yüksek sağkalım elde edilebilmekte ancak hastalık çoğu

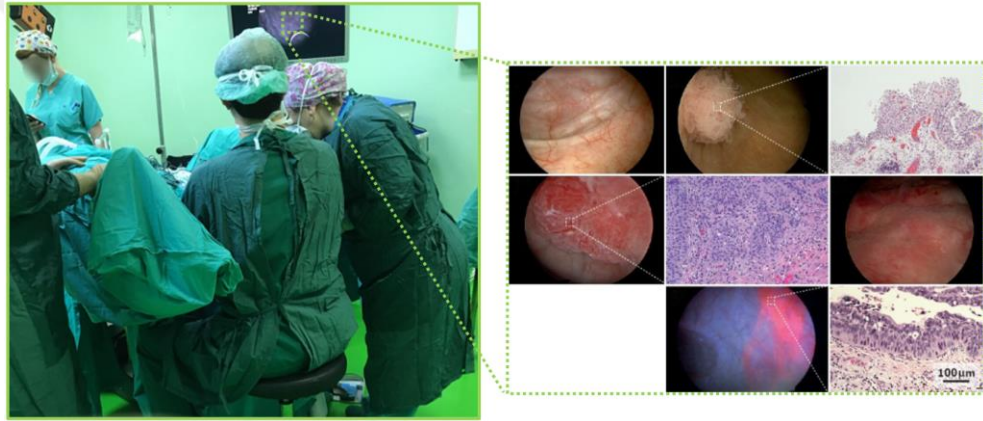
zaman ilk 5 yılda daha agresif bir tümör olarak nüks etmektedir (Guidance ve ark. 2017). Tüm bu bilgiler, MK'lı hastaların özellikle TUR-MT sonrasında düzenli aralıklarla takip edilmesinin gerekliliğini ortaya koymaktadır.



Şekil 2-1: Mesane duvarının histolojik yapısı ve tümör infiltrasyonunun farklı aşamaları ((Hoogstraten ve ark, 2023)'den uyarlanmıştır, H&E boyalı histolojik kesit ExpertPath'den alınmıştır). Kasa invaze olmayan mesane tümörü (KİOMT); karsinoma in situ (Tis/CIS/flat tümör), non-invaziv papiller Ta tümörleri ve Lamina Propria'yı infiltre eden T1 tümörlerden oluşmaktadır. Kasa infaz mesane tümörü (KİMT); yüzeysel detrüsr kasını infiltre eden T2a tümörleri, derin detrüsr kasını infiltre eden T2b tümörleri, perivezikal yağ dokusunu infiltre eden T3 tümörleri ve perivezikal organları (prostat, uterus, vajina veya abdominal/pelvik duvar) infiltre eden T4 tümörleri kapsamaktadır.

Mesane kanserinde görülen en yaygın semptom makro ya da mikro hematüridir. Buna sık aralıklı ve ağrılı miksiyon ile sırt ağrıları da eşlik edebilmektedir. Yaklaşık olarak 1000:1 ml idrar/kan oranı makrohematüri için yeterliken “American Urological Association (AUA)” kılavuzlarına göre yaklaşık 2 ya da 3 haftalık aralıklarda mikroskopi ya da dipstick ile yapılacak üç idrar analizinin ikisinde >3 sayıda alyuvar izlenmesi mikrohematüri lehine yorumlanmaktadır (Özen ve ark. 2011). Hematüri analizi dışında idrara dökülen tümör hücrelerinin incelenmesini tarif eden idrar sitolojisi de MK tanısında, özellikle High Grade tümörlerin tespitinde yüksek duyarlılığa sahip bir noninvaziv tarama yöntemidir (Planz ve ark. 2005). Bunlarla birlikte, MK'nın tanı ve takibi için altın standart yöntem olarak günümüzde hala sistoskop ile görüntüleme

kullanılmaktadır (Sanli ve ark. 2017). Sistoskoplar, üretradan girilerek mesane içerisinde görüntülenmesine olanak sağlayan optik aletler olup biyopsi forsepsleri ile doku örnekleme de yapabilmektedirler (Şekil 2-2). Buna karşılık, sistoskop ile görüntüleme invaziv bir işlem olup hasta açısından oldukça konforsuz, hekim açısından ise zaman kaybettiricidir. Postoperatif dönemde nüks ihtimaline karşılık sık aralıklarla yapılan sistoskopi ile takip, hastalar için önemli bir yük oluşturmaktadır. Mesane kanseri tedavisinde sistoskopi ile görüntülemenin yüksek maliyeti de ayrı bir konudur. Johnson ve arkadaşları MK'da nüks ile artan sistoskopi maliyetine vurgu yapmakta (Johnson ve ark. 2015), Sloan ve arkadaşları ise ABD'de MK'lı hasta yönetiminin, sağlık giderleri arasındaki yüksek payına dikkat çekmektedir (Sloan ve ark. 2020).



Şekil 2-2: Mesane kanserinde sistoskopi ve TUR-MT (fotoğraf yazar tarafından çekilmiştir, figür (Sanli ve ark. 2017)'den alınmıştır). İnvaziv bir görüntüleme yöntemi olmasına karşılık sistoskopi MK'nın diyagnozunda ve rekürrens monitörizasyonunda hala altın standart yöntem olarak kullanılmaktadır. Sistoskoplar mesane içerisinde görüntülenmesine ek olarak biyopsi forsepsleri ile doku örnekleme/KİOMT'lerin rezeksiyonunu da yapabilmektedir. Sağdaki figürde sırasıyla; sağlıklı mesane duvarının sistoskopi ile elde edilen görüntüsü, papiller bir tümörün görüntüsü ve rezeke edilen tümörün H&E boyaması sonucu elde edilen mikroskopik görüntüsü (pTa, 100X büyütme) görülmektedir. Bir alt sırada bir KİMT ve H&E boyaması sonucu elde edilen mikroskopik görüntüsü (pT2, 200X büyütme) görülmektedir. Sonraki görseller bir CIS'e aittir. Klasik sistoskopinin CIS'i ayırmadaki zorluğu floresan sistoskoplar ile (mavi ışık sistoskopisi) aşılabilmektedir. Figürün son görselinde CIS'e ait H&E boyaması sonucu elde edilen mikroskopik görüntü görülmektedir (Sanli ve ark. 2017).

Mesane kanserinin tanı ve klinik durumunun değerlendirilmesinde radyolojik görüntülemelerin yeri bulunmaktadır. Başta bilgisayarlı tomografi (BT) ürografisi ve retrograd pyelogram olmak üzere, özellikle metastatik vakalarda BT taraması, manyetik rezonans görüntüleme (MRG), pozitron emisyon tomografisi (PET), kemik taraması ve

göğüs grafisi gibi tetkikler kullanılmaktadır (Purysko ve ark. 2012). Mesane kanserinin tedavi modalitesinde cerrahi, kemoterapi, radyoterapi, immünoterapi ve hedefe yönelik (targeted) tedaviler yer almaktadır. Sistoskopi esnasında yapılacak TUR-MT, tümör evre derecesini belirlemeye yönelik patolojik inceleme için biyopsi örneği sağlayabileceği gibi özellikle KİOMT'ler için aynı zamanda kendi başına bir cerrahi tedavidir. Kasa invaze olan ileri evre mesane tümörleri için mesanenin bir kısmının ya da tamamının çıkarıldığı sistektomi ya da tüm mesanenin çevredeki lenf düğümleri de dahil edilerek ve ek olarak erkeklerde prostat bezinin ve seminal veziküllerin; kadınlarda ise uterusun, overlerin ve vajinanın ise bir kısmının çıkarılmasını kapsayacak şekilde genişletildiği radikal sistektomi şeklinde uygulanabilir (Stein ve ark. 2001). Sistektomi ya da radikal sistektomiden sonra üriner diversiyon için neobladder rekonstrüksiyonu, ileal kondüit ile ürostomi torbası bağlanması ve kontinan diversiyon seçenekleri değerlendirilmektedir (Hautmann ve ark. 2013). Mesane kanserinde kombinasyon kemoterapisi için sisplatin, metotreksat ve vinblastin kemoterapötikleri sistektomi öncesinde (neoadjuvan) ya da sistektomiden daha sonra (adjuvan) olarak uygulanabileceği gibi özellikle yüzeysel mesane tümörlerinde intravezikal şekilde primer tedavi olarak uygulanabilmektedir (Sternberg ve ark. 2007). Güncel durumda, "European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC)", KİOMT vakalarında risk durumuna göre Mitomisin-C, Doksorubisin ve Epirubisin'in intavezikal kemoterapi şeklinde adjuvan olarak uygulanmasının TUR-MT sonrası rekürrens/progresyon üzerinde koruyucu etkilere sahip olduğundan önermektedir (Sylvester ve ark. 2010). Radyoterapinin MK tedavisinde yeri olmakla birlikte tek başına ya da cerrahi ve kemoterapi ile kombine olarak uygulandığındaki etkinliği "Société Internationale d'Urologie (SIU)" tarafından düzenlenen konsensus toplantısında ele alınmıştır (Milosevic ve ark. 2007). Mesane kanseri için bir diğer tedavi aracı ise immünoterapi olup en yaygın olarak kullanılan immünoterapi intravezikal Bacille Calmette-Guérin (BCG)'dir. BCG, orijinal olarak patojenik olan *Mycobacterium bovis*'in "Albert Calmette ve Camille Guérin" tarafından uzun süre rekültüre edilmesiyle ortaya çıkmış olup bu türün *M. bovis* aksine patojenik olmadığı ve hatta hayvan deneylerinde aşı olarak kullanımının tüberküloza karşı koruyucu etkiye sahip olduğu 1920'lerde ortaya konulmuştur (Guallar-Garrido ve ark., 2020). Sonraki yıllarda BCG'nin kanser hastalarında kullanımı gündeme gelmiş ve 1976 yılında ise Morales ve arkadaşları, intavezikal BCG uygulamasının yüzeysel mesane tümörlerinde

rekürrensi önlemeye yönelik kullanılabileceğine değinmiştir (Morales ve ark. 1976). BCG immünoterapisi için günümüzdeki protokol, TUR-MT sonrası 6 haftalık indüksiyon tedavisi ve sonrasında tedaviye uygun yanıt alırsa rekürrens/progresyonu önleyecek optimum etkiye ulaşabilmek için 1-3 yıl boyunca her 3 ayda bir 6 haftalık idame tedavisi uygulanmasıdır (Guallar-Garrido ve ark. 2020). BCG immünoterapisinin temel mantığı kişinin immün sistemini tümör rekürrensi ve progresyonuna karşı uyarmaktır. İntavezikal BCG instilasyonunu takiben mesane duvarında inflamasyon ve makrofaj birikimiyle karakterize granüloma oluşumu ile “efektör yardımcı T helper 1 (Th1)” hücrelerinin aktivasyonu BCG immünoterapisinin başarısını destekleyen bulgulardır (van Puffelen ve ark. 2020). Buna karşılık yüksek risk kategorisindeki KİOMT’li hasta popülasyonunun %40’ından fazlasında BCG immünoterapisine immün yanıt alınamamaktadır (van Puffelen ve ark. 2020). Bu grup hastalar için çeşitli immünoterapötikler ile intravenöz immünoterapi ve targeted terapiler güncel çalışma konularıdır. Mesane kanseri tedavisinde özellikle diğer tedavi seçenekleri sonrasında progresyon gözlenen ya da yaş ve morbiditeler nedeniyle platin bazı tedavilere uygun olmayan hastalarda immün checkpoint inhibitörleri alternatif bir tedavi seçeneği olarak değerlendirilmektedir. Bu inhibitörler başta “Programmed Death Receptor 1 (PD-1)” ve “Programmed Death-Ligand 1 (PDL-1)” olmak üzere, “T-cell immunoglobulin and mucin domain-containing-3 (TIM-3)” ya da “Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein-4 (CTLA-4)” gibi immün checkpoint reseptörlerini hedef alan “Pembrolizumab, Atezolizumab, Nivolumab, İpilumumab, Avelumab ve Durvalumab” olarak sıralanabilir (Guallar-Garrido ve ark. 2020; Lopez-Beltran ve ark. 2021).

2.1.3. Mesane Tümörlerinde Sınıflandırma ve Evrelendirme

Mesane tümörlerinin sınıflandırılması için en fazla kullanılan sistem WHO tarafından önerilenlerdir. WHO 1973 sistemi, mesane tümörlerini benign ürotelyal papillom ve derece 1, 2 ya da 3 karsinom olarak sınıflamayı önermiştir (Slyvester ve ark. 2021). Bu sınıflamadaki eksikliklerden yola çıkılarak 1998 yılında WHO ve “International Society of Urological Pathology (ISUP)” tarafından “WHO/ISUP” konsensus sınıflaması yayınlanmış ve 2004 yılında ise bu sınıflama WHO tarafından yeniden gözden geçirilmiştir. WHO 2004 sınıflama sisteminde mesane tümörleri benign ürotelyal papillom, düşük malign potansiyele sahip papiller ürotelyal neoplazm (PUNLMP), düşük dereceli (Low Grade) ve yüksek dereceli (High Grade) tümörler

olarak ayrılmıştır. Güncel durumda WHO 2016 sınıflama sistemi daha fazla gelişme sunmakla birlikte “European Association of Urology (EUA)”nin önerisi hem WHO 1973 hem de WHO 2004/2016 sınıflama sistemlerinin kullanımı yönündedir (Soukup ve ark., 2017; Slyvester ve ark. 2021). WHO 2016 sınıflama sistemi (Humphrey ve ark. 2016) Tablo 2-2’deki gibidir.

Tablo 2-2: WHO 2016 üriner sistem tümörleri sınıflandırması (Humphrey ve ark. 2016).

Ürotelyal Tümörler	Nöroendokrin Tümörler
<i>İnfiltratif ürotelyal karsinom</i>	Küçük hücreli nöroendokrin karsinom
Nested, large nested dahil	Büyük hücreli nöroendokrin karsinom
Mikrokistik	İyi diferansiye nöroendokrin tümör
Mikropapiller	Paraganglioma
Lenfoepitelyoma benzeri	Melanositik Tümörler
Plazmasitoid/taşlı yüzük hücreli/diffüz	Malign melanom
Sarkomatoid	Nevüs
Dev hücreli	Melanozis
Kötü diferansiye	Mezenkimal Tümörler
Lipid zengin	Rabdomiyosarkom
Berrak hücreli	Leiomyosarkom
<i>Non-invaziv ürotelyal neoplaziler</i>	Anjiyosarkom
Ürotelyal karsinoma in situ	İnflamatuvar miyofibroblastik tümör
Non-invaziv papiller ürotelyal karsinom, LG	Perivasküler epitelioid hücre tümörleri
Non-invaziv papiller ürotelyal karsinom, HG	Benign
PUNLMP	Malign
Ürotelyal papillom	Soliter fibröz tümör
Inverted ürotelyal papillom	Leiomyom
MPBÜP	Hemanjiyom
Ürotelyal displazi	Granüler hücre tümörü
Skumöz Hücreli Neoplaziler	Nörofibroma
Saf skumöz hücreli karsinom	Ürotelyal Sistem Hematopoetik ve Lenfoid Tümörleri
Verrüköz karsinom	Çeşitli Tümörler
Skumöz hücreli papillom	Skene karsinomu
Adenokarsinoma, NOS	Cowper ve Littre bezi tümörleri
Enterik	Metastatik/diğer organlardan yayılan tümörler
Müsinöz	Üst üriner sistem epitelyal tümörleri
Mikst	Mesane divertikülünden köken alan tümörler
Villöz adenom	Üretranın ürotelyal tümörleri
Urakal Karsinom	
Müllerian Tip Tümörler	
Berrak hücreli karsinom	
Endometrioid karsinom	

Mesane kanserinde evreleme için “American Joint Committee on Cancer (AJCC)” 2017 TNM evreleme sistemi kullanılmaktadır (Amin ve ark. 2017). Bu evreleme sistemi mesane tümörünün invazyon derinliğini (T), lenf nodu tutulumunu (N) ve metastaz varlığını (M) ele almaktadır. Patolojik evreleme açısından pT ile pN, T ve N kategorilerine karşılık gelmektedir. Mesane tümörünün evrenmesinde en önemli hedef kasa invazyon durumunun (KİOMT mi yoksa KİMT mi olduğunun) belirlenmesidir. AJCC 2017 sistemine göre MK’da TNM evrelemesine dair tanımlar Tablo 2-3’teki ve evreleme grupları ise Tablo 2-4’teki gibidir (Amin ve ark. 2017).

Tablo 2-3: AJCC 2017 sistemine göre MK’da TNM evrelemesine dair tanımlamalar (Amin ve ark. 2017).

T- Primer Tümör
Tx: Primer tümör değerlendirilemiyor
T0: Primer tümöre ilişkin kanıt yok
Ta: Non-invaziv papiller karsinom
Tis: Ürotelyal karsinoma <i>in situ</i> : “flat tümör”
T1: Tümör lamina propria tabakasını (subepitelyal bağ doku) invaze etmiş
T2: Tümör müskülaris propria tabakasını invaze etmiş
T2a: Tümör yüzeysel müskülaris propria tabakasını invaze etmiş (iç yarısını)
T2b: Tümör derin müskülaris propria tabakasını invaze etmiş (dış yarısını)
T3: Tümör perivezikal yağlı dokuyu invaze etmiş
T3a: Mikroskopik olarak
T3b: Makroskopik olarak (ekstravezikal kitle)
T4: Ekstravezikal tümör prostatik stroma, seminal veziküller, uterus, vajina, pelvik duvar ya da abdominal duvardan herhangi birini doğrudan invaze etmiş
T4a: Ekstravezikal tümör prostatik stromayı, seminal vezikülleri, uterusu ya da vajinayı doğrudan invaze etmiş
T4b: Ekstravezikal tümör pelvik duvar ya da abdominal duvarı doğrudan invaze etmiş
N- Bölgesel Lenf Nodu
Nx: Bölgesel lenf nodları değerlendirilemiyor
N0: Bölgesel lenf nodu metastazı yok
N1: Gerçek pelviste tek lenf nodunda metastaz var (hipogastrik, obturator, eksternal iliak ya da presakral lenf nodları)
N2: Gerçek pelviste çoklu lenf nodu metastazı var (hipogastrik, obturator, eksternal iliak ya da presakral lenf nodları)
N3: Common iliak lenf nodunda metastaz var
M- Uzak metastaz
M0: Uzak metastaz yok
M1: Uzak metastaz var

Tablo 2-4: AJCC 2017’ye göre MK’da TNM evreleme grupları (Amin ve ark. 2017).

Evre Grubu	T	N	M
Evre 0a	Ta	N0	M0
Evre 0is	Tis	N0	M0
Evre I	T1	N0	M0
Evre II	T2a	N0	M0
Evre II	T2b	N0	M0
Evre IIIA	T3a, T3b, T4a	N0	M0
Evre IIIA	T1-T4a	N1	M0
Evre IIIB	T1-T4a	N2, N3	M0
Evre IVA	T4b	N0	M0
Evre IVA	Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1a
Evre IVB	Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1b

2.1.4. Mesane Kansерinde Genetik Değişiklikler ve Moleküler Subtipleme

Yeni Nesil Dizileme Teknolojileri (Next Generation Sequencing, NGS) sayesinde pek çok kanser türüyle birlikte MK’nın da sık rastlanılan genetik değişiklikler aydınlatılmıştır. Tüm transkriptom mRNA profillemesi (whole transcriptome mRNA profiling) yaklaşımıyla hastalara ait tümör dokularının analiz edilmesi, elde edilen moleküler değişikliklerin ışığında mesane tümörlerinin subtiplenmesi fikrini ortaya çıkarmıştır (Fong ve ark. 2020). Geldiğimiz noktada TNM evreleme sistemi ile yapılan klasifikasyonun tümöre ait histopatolojik değerlendirmenin öznel bir yansıması olduğunu ve mesane tümörlerinin heterojenitesini de yeterli düzeyde açıklayamadığını söyleyebiliriz. Deri ve akciğer tümörlerini takiben mesane tümörlerinin insan kanserleri arasında en yüksek mutasyon frekansına sahip tümörler olduğu düşünülmektedir (Tran ve ark. 2021). Bu bağlamda DNA varyasyonlarını ve gen anlatım profilini içeren spesifik genetik değişikliklere dayanarak yapılacak moleküler klasifikasyon, kişiselleştirilmiş kanser tıbbına da uygun olarak yeni tedavi seçeneklerine ve terapötik hedeflere hizmet edebilecek potansiyele sahiptir. Erken dönem çalışmalar gen anlatım profiline bakarak KİOMT ve KİMT’yi ayırmaya çalışmaktayken sonraki dönemde yapılan çalışmalar KİOMT ve KİMT’lerin kasa invazyon durumu dışında ayrıca farklı biyolojik ve klinik özellikler ortaya koyan moleküler subtiplere de ayrılabilceğine işaret etmiştir. Bu subtiplerin moleküler düzeyde meme kanserinde iyi tanımlanmış olan “bazal-like” ve luminal-like” gibi kümelenebileceği anlaşılmıştır (Guo ve ark. 2020). Farklı çalışma gruplarının mesane tümörlerinin subtiplemesi için farklı klasifikasyon önerileri bulunmaktadır. Lund grubunun ortaya koyduğu Lund taksonomisi KİOMT ve

KİMT'leri beraber değerlendirerek mesane tümörlerini 5 moleküler türe ayırmaktadır; “skuamöz hücreli karsinoma-like (squamous cell carcinoma-like, SCCL), ürobazal (urobasal, uro) B (uroB), infiltratif (infiltrated), genomik açıdan unstabil (genomically unstable, GU) ve ürobazal A (uroA)” (Sjödahl ve ark. 2012). SCCL moleküler subtipinin adı daha sonra “bazal/skuamöz-like (Ba/Sq)” olarak değiştirilmiştir. Ba/Sq ve UroB moleküler subtipleri bazal-like meme tümörleriyle ilişkili moleküler belirteçlerin anlatımına sahipken uroA ve GU'nun luminal-like meme tümörlerine ait belirteçlerin anlatımına sahip olduğu düşünülmektedir (Fong ve ark. 2020). İnfiltratif moleküler subtip, güçlü bağışıklık imzası neticesinde meydana gelen hücresel değişikliği ifade etmekte olup bir ürotelyal karsinom moleküler subtipi olarak kabul edilmemektedir; buna karşılık UroA subtipi hücre döngüsünün erken evresinde değişken düzeyde anlatıma sahip “*KRT13*, *KRT15* ve *KRT17*” ile bunlara ek olarak hücrelerin yapısal organizasyonundan sorumlu çok sayıda adezyon proteininin anlatımından oluşan bir imzaya sahiptir (Höglund ve ark. 2023). UroA moleküler subtipi ayrıca diğer subtiplere kıyasla yüksek düzeyde aktive edici *FGFR* mutasyonlarına ve özellikle de *FGFR3*'ü aktive eden mutasyonlarla ilgili bir gen imzasına sahiptir (Eriksson ve ark. 2022; Höglund ve ark. 2023). Subtiplerden GU'da ise UroA'ya nazaran hücre döngüsünün geç evrelerine ait genlerde artan sinyal, *FGFR3*'e ait gen imzasında azalma, *ERBB2* gen anlatımında artış, düşük seviyede *FGFR3* mutasyonları, buna karşılık yüksek *TP53* mutasyonları varlığı söz konusudur (Höglund ve ark. 2023). UroB'nin ise *FGFR3* gen mutasyonu ilişkili bir imzaya sahip olması ve UroA'ya benzer şekilde yüksek *FGFR3* mutasyonu frekansına sahip olmasından dolayı bazal-like bir varyant olduğu düşünülmüş ve ayrıca adlandırılmıştır (Höglund ve ark. 2023). Bunlar dışında keratin gen anlatımında artış ve skuamöz farklılaşmayla karakterize olan tümörlerden hareketle ayrıca bir subtip daha olduğu anlaşılarak SCCL (Ba/Sq) subtipi olarak sınıflandırmaya gidilmiştir (Höglund ve ark. 2023). Bu subtipler yeni çalışmalardan hareketle güncellenmeye devam etmektedir. Mesane tümörlerinin sınıflamasında Lund taksonomisi yaygın olmakla birlikte farklı çalışma grupları tarafından farklı sınıflamalar da önerilmiştir. Bunlardan bir tanesi de 2016 yılında farklı ülke ve merkezlerden oluşan UROMOL çalışma grubunun ortaya koymuş olduğu sınıflamadır (Hedgegaard ve ark. 2016). Araştırmacılar 460 KİOMT (345 Ta, 112 T1 ve 3 CIS) örneğinde RNA sekanslama yaptıkları transkripsiyonel çalışmalarında bulgularını tümör dokularının bazal-like ve luminal-like karakteristiği ile karşılaştırarak tümör dokularını Sınıf I,

Sınıf II ve Sınıf III olarak subtiplemişlerdir (Hedgegaard ve ark. 2016). UROMOL grubunun subtiplemesi temel olarak hücre döngüsü genlerinin anlatım farklılığına ve diferansiyasyon belirteçlerine dayanmaktadır. Sınıf I tümörler hücre döngüsünün erken evresine ait genlerin ve uroplakin ifadesinin artışıyla karakterizedir buna karşılık sınıf II tümörler ise “*KRT14*, *KRT20* ve uroplakin”in artmış ifadesinin yanı sıra hücre döngüsünün geç evresine ait genlerle ilişkili bir imzaya sahiptir (Hedgegaard ve ark. 2016; Sanli ve ark. 2017). Sınıf III tümörler ise *KRT14*’ün yanı sıra farklılaşmamış (bazal) hücrelerin bir özelliği olarak yüksek “*KRT5* ve *KRT15*” ekspresyonu ve uzun kodlamayan RNA’lar (lncRNA) için artmış anlatıma sahiptir (Hedgegaard ve ark. 2016; Sanli ve ark. 2017). Bunlar dışında mesane tümörlerinin moleküler subtiplemesi için University of North Caroline (UNC) (Damrauer ve ark. 2014), MD Anderson Cancer Center (MDA) (Choi ve ark. 2014) ve The Cancer Genome Atlas Network (TCGA) (TCGA, 2014) sınıflama sistemleri de mevcuttur. Bu üç sınıflama sistemi de KİMT örneklerinde subtipleme yapmaya yöneliktir. Tüm sınıflama sistemleri mesane tümörlerinin subtiplemesini yaparken benzer karakteristik özellikleri dikkate almasına rağmen sınıflama sistemlerinin nomenklatüründeki çeşitlilik bu sınıflama sistemlerinin ortak bir düzlemde birleştirilmesi ve böylece klinikte kolay uygulanabilir bir forma getirilmesi gerekliliğini ortaya çıkarmıştır. Bu bağlamda 2020 yılında MK moleküler taksonomi grubu, yayınlanmış 16 veri seti ve 2 kohortu kapsayan toplamda 1750 KİMT örneğine ait transkriptomik veriyi birlikte analiz ederek mesane tümörlerini 6 moleküler subtip ayırmışlardır: “luminal-papiller (LumP), luminal-nonspecified (LumNS), luminal-unstabil (LumU), Stroma-zengin, Bazal/Skuamöz (Ba/Sq) ve Nöroendokrin-like (NE-like)” (Kamoun ve ark. 2020). “Konsensus Moleküler Klasifikasyon (Concensus Molecular Classification, CMC)” olarak adlandırılan bu moleküler sınıflama sistemi Lund taksonomisinin aksine sadece KİMT dokusu örneklerini ele almaktadır. Mesane tümörlerinin moleküler sınıflamasına ilişkin önerilen tüm sınıflama sistemleri Şekil 2-3’te özetlenmiştir.

UROMOL	Smf I		Smf II		Smf III		KİOMT
UNC	Luminal					Bazal	KİMT
MDA	Luminal			TP53-Like	Bazal		KİMT
TCGA	Nöronal	Skuamöz	Luminal-İnfiltr	Luminal	Luminal-Papiller	KİMT	
Lund	Bazal		UroB	İnfiltr	GU	UroA	KİOMT + KİMT
CMC	NE	Ba/Sq	Stroma-Zengin	LumNS	Luminal-Unstabil	LumP	KİMT

Şekil 2-3: Mesane tümörlerinde moleküler sınıflama sistemleri. KİOMT: kasa invaze olmayan mesane tümörü, KİMT: kasa invaze mesane tümörü, “UNC: University of North Caroline, MDA: MD Anderson Cancer Center, TCGA: The Cancer Genome Atlas Network, CMC: Consensus Molecular Classification, UroB: ürobazal B, GU: genomik açıdan unstabil, UroA: ürobazal A, NE: nöroendokrin, Ba/Sq: bazal/skuamöz-like, LumNS: luminal-nonspecified, LumP: luminal-papiller”.

Moleküler subtiplerede kullanılacak biyobelirteçlerin belirlenmesinde NGS teknolojileri benzersiz bir yere sahiptir ancak çoğu çalışmada analiz için tümörlü hücrelerin tüm materyalin sadece belli kısmını oluşturduğu bir biyopsi parçasının tamamı kullanılmaktadır. Bu durum tümöre ait gen ekspresyon profiline, farklı state’lerdeki ve farklı türlerdeki hücrelere ait gen anlatımlarının da dahil olmasına ve nihai durumdaki gen anlatım profilinin değişmesine neden olabilmektedir. Moleküler temelli yapılmış tümör sınıflamalarının immünohistokimyasal (İHK)/patolojik temelli sınıflama ve hücre fenotipleriyle uyuşmayabildiği literatürde tartışılmaktadır (Höglund ve ark. 2023). Böyle durumlarda tümör dışındaki hücre tiplerinin tümöre ait nihai gen anlatım profilini etkileyebildiği fikri daha da güçlenmektedir. Özellikle KİMT ve T1 evre tümörlerde immün sistem hücrelerinin ve stromal hücrelerin infiltrasyonu, kanser hücrelerinden gelen gen anlatım sinyalini değiştirmektedir. Bu noktada moleküler subtiplleme için NGS teknolojileri ve transkriptom analizleri ile aday genlerin ve mutasyonların tespit edilmesi ve daha sonra bu aday genlerin İHK yaklaşımıyla biyopsi örneklerindeki immün ifadelerinin tespit edilmesi daha tamamlayıcı bir yaklaşımdır. Çünkü İHK ile tüm biyopsi kesiti üzerinde aday bir proteinin immün ifadesinin değişimi hücre bazında ve lokalizasyonu da tespit edilerek gösterilebilmektedir. Elbette İHK analizi için doğru biyobelirteçlerin seçilmesi de MK’da değişikliğe uğrayan aday genlerin hassas şekilde tespit edilmesiyle mümkün olabilmektedir. Son yıllarda MK’da

yaygın olarak görülen genetik değişiklikler iyi şekilde aydınlatılmıştır. Tablo 2-5'te MK'da aktive olan onkogenler ve mutasyonların türü; Tablo 2-6'da ise MK'da inaktif olan tümör baskılayıcı genler ve mutasyonların türü gösterilmiştir (Sanli ve ark. 2017).

Tablo 2-5: Mesane kanserinde aktive olan onkogenler ve mutasyonların türleri ((Sanli ve ark. 2017)'den uyarlanmıştır).

Düşük Dereceli Ta Evre Tümörler			
Gen	Sitogenetik Lokasyon	Frekansı (%)	Alterasyonun Türü
<i>TERT</i>	5p15	73-83	Nokta Mutasyonu
<i>FGFR3</i>	4p16	• 60-70 • 80*	• Nokta Mutasyonu • Artmış Ekspresyon
<i>PIK3CA</i>	3q26	16-25	Nokta Mutasyonu
<i>HRAS</i>	11p15	~10	Nokta Mutasyonu
<i>KRAS</i>	12p12	5	Nokta Mutasyonu
<i>MDM2</i>	12q14-q15	3	Amplifikasyon
<i>AKT1</i>	14q32	1-3	Nokta Mutasyonu
Kasa İnvaze Tümörler			
Gen	Sitogenetik Lokasyon	Frekansı (%)	Alterasyonun Türü
<i>E2F3</i>	6p22	20	Fonksiyon Kazandırıcı Mutasyon ya da Amplifikasyon
<i>PIK3CA</i>	3q26	9-20	Nokta Mutasyonu
<i>FGFR3</i>	4p16	• 5-20 • 40**	• Nokta Mutasyonu • Artmış Ekspresyon
<i>MDM2</i>	12q14-q15	5-15	Amplifikasyon
<i>HRAS</i>	11p15	5-12	Nokta Mutasyonu
<i>ERBB3</i>	12q13	11	Nokta Mutasyonu
<i>CCND1</i>	11q13	10	Amplifikasyon
<i>RXRA</i>	9q34	9	Mutasyon
<i>HER2 (ERBB2)</i>	17q12	• 7 • 4,5 • 42*	• Fonksiyon Kazandırıcı Mutasyon ya da Amplifikasyon • Mutasyon • Amplifikasyon
<i>EGFR</i>	7p12	6	Fonksiyon Kazandırıcı Mutasyon ya da Amplifikasyon
<i>FGFR1</i>	8p12	6	Amplifikasyon
<i>KRAS</i>	12p12	6	Nokta Mutasyonu
<i>AKT1</i>	14q32	1-3	Nokta Mutasyonu

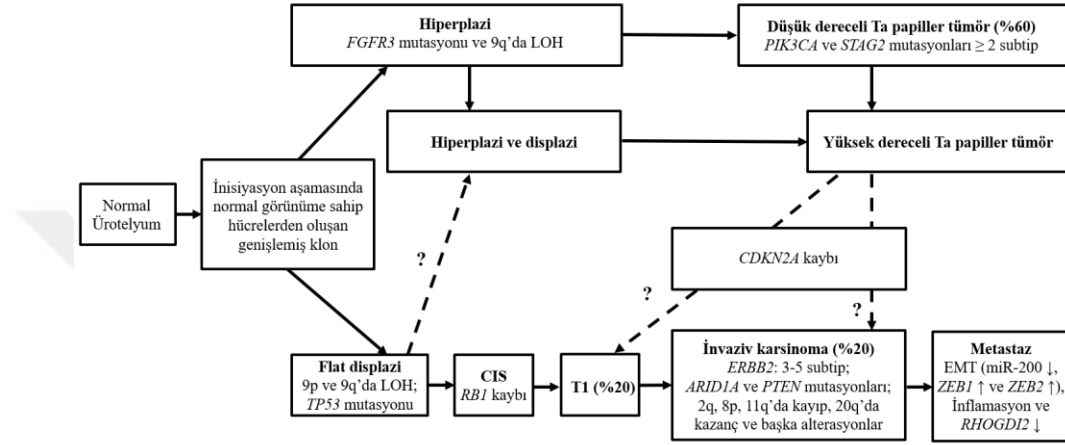
*Mikropapiller varyantta. **Karşılık gelen proteinde ölçülen değişim.

Tablo 2-6: Mesane kanserinde inaktive olan tümör baskılayıcı genler ve mutasyonların türleri ((Sanli ve ark. 2017)’den uyarlanmıştır).

Düşük Dereceli Ta Evre Tümörler			
Gen	Sitogenetik Lokasyon	Frekansı (%)	Alterasyonun Türü
<i>CDKN2A</i>	9p21	• 50-60 • 18 • 15	• Heterozigosite Kaybı • Hemizigot Delesyon • Homozigot Delesyon
<i>KDM6A</i>	Xp11	12-60	İnaktive Edici Mutasyon
<i>STAG2</i>	Xq25	32-36	İnaktive Edici Mutasyon
<i>ELF3</i>	1q32	20-25	İnaktive Edici Mutasyon
<i>ARID1A</i>	1p35	12-35	İnaktive Edici Mutasyon
<i>EP300</i>	22q13	12-25	İnaktive Edici Mutasyon
<i>KMT2D</i>	12q13	15-24	İnaktive Edici Mutasyon
<i>TP53</i>	17p13	6-20	İnaktive Edici Mutasyon
<i>RBM10</i>	Xp11	20	İnaktive Edici Mutasyon
<i>CREBBP</i>	16p13	16-20	İnaktive Edici Mutasyon
<i>ERCC2</i>	19q13	20	İnaktive Edici Mutasyon
<i>ATM</i>	11q22-23	5-15	İnaktive Edici Mutasyon
<i>TSC1</i>	9q34	~12	İnaktive Edici Mutasyon
<i>RB1</i>	13q14	~5	İnaktive Edici Mutasyon
Kasa İnvaze Tümörler			
Gen	Sitogenetik Lokasyon	Frekansı (%)	Alterasyonun Türü
<i>ARID1A</i>	1p35	25	İnaktive Edici Mutasyon
<i>TXNIP</i>	1q21	7	İnaktive Edici Mutasyon
<i>ELF3</i>	1q32	8	İnaktive Edici Mutasyon
<i>NFE2L2</i>	2q31	8	İnaktive Edici Mutasyon
<i>FBXW7</i>	4q31	10	İnaktive Edici Mutasyon
<i>APC</i>	5q21-q22	6-16	İnaktive Edici Mutasyon
<i>CDKN1A</i>	6p21	14	İnaktive Edici Mutasyon
<i>EP300</i>	22q13	15	İnaktive Edici Mutasyon
<i>CDKN2A</i>	9p21	• 50-60 • 28 • 22	• Heterozigosite Kaybı • Hemizigot Delesyon • Homozigot Delesyon
<i>TSC1</i>	9q34	8-12	İnaktive Edici Mutasyon
<i>PTEN</i>	10q23	• 13-58 • 17 • 1-6	• Heterozigosite Kaybı/Hemizigot Delesyon • Mutasyon • Homozigot Delesyon
<i>KMT2D</i>	12q13	27	İnaktive Edici Mutasyon
<i>MDM2</i>	12q14-q15	4-9	Fonksiyon Kazandırıcı Mutasyon ya da Amplifikasyon
<i>RB1</i>	13q14	13	İnaktive Edici Mutasyon
<i>KLF5</i>	13q22	8	İnaktive Edici Mutasyon
<i>TSC2</i>	16p13	2	İnaktive Edici Mutasyon

Düşük dereceli Ta evre tümörlere ilişkin ekzom dizileme ile tanımlanan inaktive edici mutasyonların frekanslarının KİMT’lerden çok daha az sayıda tümörle ilişkili çalışmadan elde edildiği bildirilmektedir (Sanli ve ark. 2017). Bu sebeple Tablo 2-6’da Ta tümörler için sadece birden fazla çalışmada bildirilen mutasyonlara yer verilmiştir (Sanli ve ark. 2017). Mesane tümörlerine ilişkin genetik değişikliklerin moleküler

düzeyde açıklanması, pre-neoplastik ürotelyumdan KİMT ve metastatik tümör gelişinceye kadar ki sürecin her basamağında hücrelerin muhtemel olarak hangi değişiklikleri akümülediğini açıklamaya yardımcı olmaktadır. Günümüzde bu konsept “Two-Pathways” hipotezi ile açıklanmaya çalışılmaktadır (Knowles ve ark. 2008; Knowles ve ark. 2015). Two-Pathways hipotezi Şekil 2-4’te gösterilmiştir.



Şekil 2-4: Ürotelyal karsinoma patogenezinin potansiyel yolağı “Two-Pathways” hipotezi ((Knowles ve ark. 2015)’den uyarlanmıştır). Histopatolojik olarak ayırt edilebilir ürotelyal değişikliklerin gelişiminden önce, inisiyasyon aşamasındaki normal görünüme sahip hücrelerin klonal ekspansiyonu gerçekleşmektedir. Düşük dereceli Ta papiller tümörler, tüm MK vakalarının %60’ını oluşturmakta olup bunlar basit düzeyde hiperplazi ve minimal displazi yoluyla ortaya çıkmaktadır ve moleküler düzeyde 9q’da LOH ile “FGFR3, PIK3CA ve STAG2” genlerindeki aktive edici mutasyonlar ile karakterize edilmektedirler. Bu KİOMT’ler yüksek rekürrens oranına sahip olmalarına karşılık genomik açıdan stabildirler. İnvaziv karsinomların, 9. kromozomdaki delesyonlara ilaveten yaygın olarak TP53 mutasyonu gösteren ancak FGFR3 mutasyonu olmayan flat displazi ve CIS’den köken aldığı düşünülmektedir. İnvaziv karsinomlar genetik açıdan unstabildirler ve birçok genetik alterasyon akümülederler. Flat displaziden yüksek dereceli Ta papiller tümörlerin muhtemel gelişimi belirsizdir (kesikli ok). FGFR3 mutasyonu ve CDKN2A kaybı olan invaziv karsinom alt tipinin bulunması düşük dereceli non-invaziv papiller tümörlerin kas invazyonuna ilerleyebileceğini düşündürmektedir (kesikli ok).

2.1.5. Mesane Kanseri Epigenetik Değişiklikler

Kanser çalışmalarında artık karsinogenezi açıklarken başlıca sebep olarak DNA bütünlüğünün bozulması gibi genetik değişiklikleri göstermenin tek başına yeterli olmayacağı ve epigenetik değişikliklerin de karsinogeneze büyük katkısı olduğu bilinmektedir. Gen diziliminde bir değişiklik olmaksızın belirli ölçülerde kalıtılabilir farklılıklar yaratan ve kelime anlamı olarak “genetik üstü” ya da “genetik ötesi” anlamlarına gelen “epigenetik”; DNA metilasyonu, histon modifikasyonu ve başta

mikroRNA (miRNA) olmak üzere kodlama yapmayan RNA'ları da kapsayan üç farklı temele dayanmaktadır (Tammen ve ark. 2013). Bu üç temel noktanın birbiri arasındaki sistematik etkileşimi, gen ifadesinin regülasyonunda önemli bir karar mekanizması oluşturmaktadır. Epigenetik mekanizmalar arasında en iyi bilinenlerden ve en çok çalışılanlardan biri DNA metilasyonudur. DNA metilasyonu, sitozin bazının 5. pozisyonundaki karbon atomuna metil grubu (-CH₃) takılarak 5-metil sitozin'in (5m-S) oluşturulmasını tarif etmektedir. DNA metilasyonunun gen ifadesini regüle edebilmesinin temelinde, genlerin promotör bölgelerinde yoğun olarak bulunan CpG adacıklarının sıklıkla metilasyona uğraması yatmaktadır. Mesane kanserinde de geçerli olmak üzere hemen hemen tüm kanser türlerinde, tümör baskılayıcı olarak davranan genlerin promotörlerinde hipermetilasyona bağlı gen ifadesinin baskılanması söz konusu olabilmektedir. Buna karşılık *housekeeping* genler gibi ifadesinin sürekli aktif olması gerekli olan genlerin promotörleri ile ilişkili CpG adaları metillenmemiş durumdadır. Öte yandan DNA metilasyon değişiklikleri sadece kanser gibi hastalıkların progresyonunda karşılaştığımız bir modifikasyon olmayıp genomik imprinting ve dişilerdeki X kromozomu inaktivasyonunun da temelini oluşturmaktadır ve eksikliği yaşamla bağdaşmamaktadır (Tammen ve ark. 2013; Michalak ve ark. 2019). Bir DNA dizisinin metillenmesinde görev alan temel elemanlar; metil vericisi olan S-Adenozil-L-Metiyonin (SAM) ile SAM'dan metil grubunu alarak sitozinin 5. karbonuna transfer edilmesini katalizleyen "DNA Metil Transferaz (DNMT)" enzimlerinden oluşmaktadır. Memelilerde bilinen 5 DNMT enzimi; "DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B ve DNMT3L" olup bunlar arasında "DNMT3A-3B" embriyonik gelişimin erken dönemlerinde *de novo* metilasyondan sorumlu olmaları ve "DNMT1" in ise replikasyon sırasında mevcut metilasyon paternini yeni zincire aktarmakta görev alması yönünden ayrı önemleri vardır. Bunlar haricinde metilasyonun tersi olarak düşünebileceğimiz demetilasyon ise "Ten-Eleven Translocation (TET)" enzim ailesinin katalizörlüğünde gerçekleşmektedir ve zigot gelişimi için gereklidir (Michalak ve ark. 2019). Mesane kanserinde DNA metilasyonu iyi çalışılmıştır. Mesane kanserini hedef alan başta meta analizler olmak üzere epigenetik temelli yayınlar, 2022 yılındaki çalışmamızda gözden geçirilmiştir (Dogan ve ark. 2022). Bai ve arkadaşları yaptıkları geniş meta analizde 2214 MK'lı vaka ve 665 sağlıklı kontrolden oluşan örnekleme *APC* geni promotör metilasyonunu incelemişler ve kanserli örneklerde sağlıklı doku ve idrar örneklerine göre metilasyonun anlamlı ($p < 0.01$) derecede artmış olduğunu bildirmişlerdir (Bai ve

ark. 2019). Bu bilgidan hareketle *APC* geni promotör metilasyonunun MK'nın progresyonu ile ilişkili olabileceğini söyleyerek idrar örnekleri üzerinden analiz edilebilecek non-invaziv bir biyobelirteç olarak değerlendirilmesini önermişlerdir (Bai ve ark. 2019). Zhan ve arkadaşlarının yaptığı geniş meta analizde *RASSF1A* gen promotör metilasyonu 1588 MK'lı vaka ve 720 sağlıklı kontrolden oluşan örnekleme araştırılmış ve metilasyonun MK'lı hastalarda anlamlı ($p<0.0001$) derecede artmış olduğu görülmüştür (Zhan ve ark. 2017). Araştırmacılar aynı zamanda meta-analizlere dahil edilen çalışmaların örneklemelerinde yaş cinsiyet ve sigara içiciliği konusunda uyumsuzluk olması ve tüm çalışmalarda metod açısından farklılıklar olmasının getirdiği biyası elimine edebilmek için bulgularını TCGA'dan elde ettikleri metilasyon analizi bulguları ile konfirme etmişlerdir (Zhan ve ark. 2017). Bunun için TCGA'da MK'lı örneklerden çalışılmış global metilasyon verisi arasından selektif olarak *RASSF1A* promotör metilasyonunu ele almak suretiyle kontrol gruplarına ve evrelere göre karşılaştırıp kendi meta-analiz sonuçları ile pozitif korelasyon gösterdiğini ortaya koymuşlardır (Zhan ve ark. 2017). Çalışma neticesinde *RASSF1A* promotör metilasyonunun sadece sağlıklı örneklere kıyasla değil aynı zamanda TNM sınıflamasına göre Evre III ve Evre IV mesane tümörlerinde, Evre I ve Evre II tümörlere göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.0001$) derecede artmış olduğunu ortaya koymuşlardır (Zhan ve ark. 2017). Bu bilgidan hareketle araştırmacılar MK ile *RASSF1A* promotör metilasyonu arasındaki anlamlı ilişkinin MK'nın diyagnozunda klinik bir biyobelirteç olarak kullanılmasını önermişlerdir (Zhan ve ark. 2017). Dai ve arkadaşlarının *DAPK* promotör metilasyonu ile MK ilişkisini ele aldıkları meta-analizde 1247 MK'lı vaka ve 405 sağlıklı kontrolden oluşan örnekleme yapılan değerlendirmede MK gelişme riski ile *DAPK* promotör metilasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.00001$) düzeyde ilişki olduğunu ifade etmişlerdir (Dai ve ark. 2016). Çalışma neticesinde araştırmacılar *DAPK* promotör metilasyonunun tümör evresi ile ilişkisinin olmadığını ($p<0.668$) fakat yüksek tümör derecesi ile ilişkili olabileceğini ($p<0.011$) ileri sürmüşlerdir (Dai ve ark. 2016). Chen ve arkadaşlarının yaptığı başka bir meta-analizde 1017 MK'lı vaka ve 265 sağlıklı kontrolden oluşan örnekleme *CDH13* geninin promotör metilasyonu incelenmiştir (Chen ve ark. 2016). Çalışma sonucunda *CDH13* metilasyonu ile MK gelişimi arasında hem tümör dokusu hem de idrar örneği düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.001$) ilişki olduğu ifade edilmiştir (Chen ve ark. 2016). Aynı zamanda araştırmacılar *CDH13* promotör

metilasyon düzeyinin Asyalılarda Kafkasyalılara göre daha fazla olduğunu ($p<0.001$) ve metilasyon durumunun cinsiyete bağlı farklılık göstermediğini ($p=0.053$) bildirmişlerdir (Chen ve ark. 2016). Bu bilgilere ek olarak artmış *CDH13* promotör metilasyonunun yüksek dereceli mesane tümörleri ($p<0.001$), KİMT'ler ($p<0.001$) ve multifokal mesane tümörleri ($p=0.032$) ile anlamlı düzeyde ilişkili bulunduğundan prognostik bir belirteç olarak kullanılabileceği önerilmiştir (Chen ve ark. 2016). Tek bir gene ilişkin metilasyon durumunun MK ile ilişkisinin yanı sıra Yu ve arkadaşları yaptıkları geniş meta-analiz ve sistematik derlemede, genel anlamda DNA metilasyonunun MK için prognostik bir önemi olup olamayacağını ele almışlar ve 2000 ile 2018 yılları arasında yapılan DNA metilasyonu bazlı çalışmaları incelemişlerdir (Yu ve ark. 2018). Meta-analizleri neticesinde artmış DNA metilasyon durumunun kötü prognoz ile pozitif korelasyon gösterdiğini ve DNA metilasyonunun MK için prognostik önem taşıdığını doğrulamışlardır (Yu ve ark. 2018). Yang ve arkadaşları TCGA'dan elde ettikleri 540 farklı metillenmiş geni içeren veriyi analiz etmişler ve bunlar arasında “*MIR6732*, *SOWAHC*, *SERPINI1*, *OR10W1*, *OR7G3*, *AIM1* ve *ZFAND5*” genlerinden oluşan 7 genin metilasyonlarını iki değişkenli ve tek değişkenli Cox regresyon analizi ile incelemişler ve her bir genin neticesinde MK için birbirinden bağımsız olarak prognostik öneme sahip olduğunu ifade etmişlerdir (Yang ve ark. 2019). Bu genler arasında ilginç şekilde *SOWAHC* gen metilasyonu ile gene ait mRNA ekspresyon düzeyinin negatif korelasyon gösterdiği fakat *SOWAHC* gen metilasyonu ve ekspresyonunun prognoz ile pozitif korelasyon gösterdiği belirtilmiştir (Yang ve ark. 2019). Zhang ve arkadaşları tarafından yapılan bir diğer çalışmada ise GEO veri tabanında yer alan ve MK'da anormal metilasyon ve ekspresyon göstermiş olan genleri ifade eden mikroarray verileri çeşitli biyoinformatik araçlar kullanılarak değerlendirilmiştir (Zhang ve ark. 2018). Analiz sonucunda elde edilen aday genler aynı zamanda TCGA'dan elde edilen veriler ile karşılaştırılarak konfirme edilmiştir. Çalışma neticesinde “*CDH1*, *DDOST*, *CASP8*, *DHX15* ve *PTPRF*” genlerinin çoğunlukla aşırı eksprese edildikleri ve hipometile oldukları görülürken; “*GNG4*, *ADCY9*, *NPY*, *ADRA2B* ve *PENK*” genlerinin ise tamamının hipermetilasyona uğradığı ve ekspresyonlarının çoğunlukla azaldığı görülmüştür (Zhang ve ark. 2018). Araştırmacılar bu 10 genin MK tanı, tedavi ve prognozunda değerlendirilebilecek biyobelirteçler olabileceğini ifade etmektedirler (Zhang ve ark. 2018). Bosschieter ve arkadaşları 72 MK'lı vakaya ve 75 sağlıklı kontrole ait idrar örneklerinde, “*CADM1*, *FAM19A4*,

GHSR, *MAL*, *PHACTR3*, *PRDM14*, *SST* ve *ZIC1*” olmak üzere 8 adet genin ve “miR-124-2, miR-129, miR-137, miR-148, miR181 ile miR-935”den oluşan 6 adet miRNA’ya ait genin metilasyon durumunu kantitatif MS-PCR kullanarak analiz etmişlerdir (Bosschieter ve ark. 2019). Analiz neticesinde, *CADM1* geni ile “miR-124-2, miR-137 ve miR-181”i kodlayan genlerdeki metilasyon durumları hariç geriye kalan 10 genin metilasyon durumunun kontrol grubuna göre MK’lı hastalarda artış ve anlamlı farklılık gösterdiği bildirilmiştir (Bosschieter ve ark. 2019). Araştırmacılar bu 10 gen arasında istatistiksel anlamlılık düzeyi en güçlü olan genleri birlikte bir panel içinde inceleyip değerlendirdiklerinde “*GHSR* ve *MAL*” genlerinin %92 sensitivite ve %85 spesifite ile MK’lı ve sağlıklı idrar örneklerini evrelere spesifik olarak başarılı bir şekilde ayırabildiğini görmüşlerdir (Bosschieter ve ark. 2019). Araştırmacılar daha sonra “*GHSR* ve *MAL*” genlerinin metilasyon durumunu doku bazında da analiz ederek tümör dokularında anlamlı derecede artış olduğunu göstermişler ve bu iki gene ait metilasyon analizinin MK için idrardan non-invaziv olarak tanı koyduracak bir panel olarak kullanılabileceğini önermişlerdir (Bosschieter ve ark. 2019). Stubendorff ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarında, KİMT’li hastalarda metastaz ve lenf nodu tutulumunun DNA metilasyonu ile ilişkisini ele almışlardır (Stubendorff ve ark. 2019). Çalışma kapsamında 23 KİMT dokusundaki global DNA metilasyonu durumunu mikroarray tabanlı olarak analiz etmişlerdir (Stubendorff ve ark. 2019). Buna ek olarak çalışmalarını, geniş sayıda hasta örneğinde protein ve mRNA ekspresyon düzeylerini analiz ederek ve T24 ile 253JB-V hücre hatlarında fonksiyonel analizler yaparak desteklemişlerdir (Stubendorff ve ark. 2019). Çalışma neticesinde “*KISS1R*, *SEPT9* ve *CSAD*” üçlü panelindeki genlere ait metilasyon analizinin KİMT’li hastalarda lenf nodu tutulumunun pozitif ya da negatif olduğunu ayırabilecek oldukça güçlü bir prognostik belirteç olabileceğini bildirmişlerdir (Stubendorff ve ark. 2019). Leao ve arkadaşları 237 mesane tümör dokusu ve 94 sağlıklı mesane dokusu ile yaptıkları çalışmada *TERT* promotör mutasyonu sıklığı ve “*TERT* Hipermetillenmiş Onkolojik Bölgesi (*THOR*)” metilasyonunu ele almışlardır (Leao ve ark. 2019). Çalışma sonucunda *THOR* hipermetilasyonunun, *TERT* ekspresyonu arttırması nedeniyle KİOMT’ler için risk faktörü olduğu ve *TERT* promotör mutasyonu ve *THOR* hipermetilasyonunun birlikte analiz edilmesinin istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.0001$) şekilde rekürrens ve progresyon ($p=0.025$) hakkında bilgi verebileceği ifade edilmiştir (Leao ve ark. 2019). Guo ve arkadaşları MK’nın en belirgin semptomlarından biri olan hematürinin, kliniğe

başvuru açısından primer sebepler arasında yer aldığını; buna karşılık çoğunlukla idiyopatik olduğunu vurgulamış ve farklı bir bakış açısıyla, üst üriner sistemde ürotelyal karsinomu olan ve ürotelyal MK olan hematürlü 217 vaka ve 256 sağlıklı kontrolün idrarlarından “*ABCC6, BRCA1, CDH1, GDF15, HSPA2, RASSF1A, SALL3, THBS1, TMEFF2* ve *VIM*” genlerini içeren 10 aday genin promotör metilasyonunu MS-PCR ile araştırarak hematüri durumunda maligniteyi belirlemeyi hedeflemişlerdir (Guo ve ark. 2018). Çalışma sonucunda araştırılan aday 10 gen arasından “*VIM, CDH1, SALL3, TMEFF2, RASSF1A, BRCA1, GDF15* ve *ABCC6*” genleri dahil olmak üzere 8 tanesinden oluşan panelin, promotör metilasyonunun analiz edilmesinin %83 sensitivite ve %60 spesifite ile hematürlü hastalarda ürotelyal karsinom varlığını ayırt edebildiği, “*CDH1, HSPA2, RASSF1A, TMEFF2, VIM* ve *GDF15*” genlerinden oluşan panelin üst üriner sistem ürotelyal karsinomunu diğer gruplardan %82 sensitivite ve %68 spesifite ile tespit edebildiği, “*VIM, RASSF1A, GDF15, ve TMEFF2*” genlerinden oluşan panelin ürotelyal MK’yı %82 sensitivite ve %53 spesifite ile diğer gruplar arasında tespit edebildiği gösterilmiştir (Guo ve ark. 2018). Buna ek olarak araştırmacılar “*CDH1, SALL3, THBS1, TMEFF2, VIM* ve *GDF15*” genlerinden oluşan panelin, idrar sitolojik analizi birlikteliği ile hematürlü hastalarda maligniteyi tespit etmek için yüksek başarı gösterdiğini belirtmişlerdir (Guo ve ark. 2018). Kessel ve arkadaşları yaptıkları ve 6 Avrupa ülkesinden araştırmacıların katıldığı çok merkezli çalışmalarında; EUA’nın mesane tümörlerinin %70’inden fazlası oluşturan KİOMT’ler için kılavuzlarda patolojik parametrelere dayalı risk sınıflaması yapılmasını önerdiğini vurgulayarak, 1239 KİOMT’li vakayı (276 düşük, 273 orta ve 555 yüksek tümör progresyonu riski olan hastalar) prospektif olarak çalışmaya dahil etmişlerdir (van Kessel ve ark. 2018). Araştırmacılar, hastalara ait taze dondurulmuş tümör dokularında “*GATA2, TBX2, TBX3* ve *ZIC4*” genlerinin metilasyon durumuna, “*FGFR3, TERT, PIK3CA* ve *RAS*” genlerinin ise mutasyon durumuna bakmışlardır (van Kessel ve ark. 2018). Çalışma neticesinde vakalardan 54 tanesinin KİMT yönünde progresyon gösterdiği gözlenmiş ve araştırılan tüm genler arasında *FGFR3* geninin mutasyon durumu ile “*GATA2* ve *TBX3*” genlerinin metilasyonunun hastalık progresyonu ile anlamlı düzeyde ilişkili olduğu gösterilmiş ve araştırmacılar bu genlerin KİOMT’li vakaların progresyon tahmininde kullanılabilecek bir risk faktörü olabileceğini belirtmişlerdir (van Kessel ve ark. 2018). Shindo ve arkadaşları yaptıkları 2 merkezli prospektif çalışmada, başlangıç olarak 132 KİOMT’li vakayı çalışmalarına dahil ederek idrar örnekleri almışlar ve bu hastaları

takip ederek rekürrens gösterenlerden tekrar idrar örneği almak suretiyle çalışma kriterlerine uygun olan tüm örneklerde “miR-9-3, miR-124-2, miR-124-3 ve miR-137” miRNA’larını kodlayan genlerin metilasyon durumunu bisülfıt pirosekanslama ile analiz etmişlerdir (Shindo ve ark. 2018). Araştırmacılar bu miRNA genlerindeki metilasyon durumu ile rekürrens arasındaki ilişkiyi araştırmışlar ve çalışma neticesinde bu miRNA gen paneli kullanılarak yapılacak idrar bazlı metilasyon analizinin MK’da rekürrens ve radikal sistektomi kararı için belirteç olabileceğini ortaya koymuşlardır (Shindo ve ark. 2018). Lopez ve arkadaşları farklı evre ve derecelerdeki 70 mesane tümörü ve 10 sağlıklı doku örneğinde genom çapında metilasyon analizi yapmışlar ve 43 genin tümör dokularında %10’dan fazla hipermetilasyona uğradığını belirtmişlerdir (Lopez ve ark. 2017). Araştırmacılar *JAK3* geni hipermetilasyonunun ve “*EYA4*, *GAT6* ve *SOX1*” genlerinin metillenmemesinin düşük dereceli invaziv olmayan mesane tümörleri ile ilişkili olduğunu ortaya koymuşlardır (Lopez ve ark. 2017). Buna karşılık “*CSPG2*, *HOXA11*, *HOXA9*, *HS3ST2*, *SOX1* ve *TWIST1*” genlerinin hipermetilasyonu kas invazyonu ile ilişkili bulunmuştur (Lopez ve ark. 2017). Araştırmacılar “*APC*, *CSPG2*, *EPHA5*, *EYA4*, *HOXA9*, *IPF1*, *ISL1*, *JAK3*, *PITX2*, *SOX1* ve *JAK3*” genlerinin hipermetilasyonunun kansere bağlı sürvi tahmininde kullanılabileceğini ve “*SOX1*, *PITX2* ya da *CSPG2*” genlerinin hipermetilasyonunun ise MK’ya bağlı mortalite riski ile anlamlı derecede ilişkili olduğunu bildirmişlerdir (Lopez ve ark. 2017). Husek ve arkadaşları çalışmalarında BCG immünoterapisine verilecek yanıtta tümör baskılayıcı genlerin DNA metilasyon durumlarının önemini araştırmışlardır (Husek ve ark. 2017). Araştırmacılar çalışmaya yüksek dereceli ve KİOMT’si bulunan 82 vakayı dahil etmişler ve vakaları BCG immünoterapisine verilen yanıtta göre başarılı ya da başarısız olarak iki gruba ayırmışlardır (Husek ve ark. 2017). Metilasyon değişikliklerine ilişkin analizler, hasta gruplarına ait parafinize tümör dokuları ve 13 sağlıklı mesane dokusu kullanılarak birçok tümör baskılayıcı gene karşı prob seti içeren ticari “ME001 (MRC-Holland Inc.) ve ME004 (MRC-Holland Inc.)” MS-MLPA kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Husek ve ark. 2017). Çalışma neticesinde araştırmacılar “*CDKN2b*, *MUS81a*, *PFM-1*, *MSH6* ve *THBS1*” tümör baskılayıcı genlerinin metilasyon durumunun BCG immünoterapi yanıtıyla anlamlı düzeyde ilişkili olduğunu, “*CDN2b* ve *MUS81a*” genlerinin metilasyonunun istatistiksel olarak anlamlı düzeyde (sırasıyla $p=0.0312$ ve $p=0.0191$) BCG immünoterapisine başarılı cevap ile ilişkili olduğu, buna karşılık BCG immünoterapisine başarısız cevap veren hasta grubunda “*CDN2B* ve

MUS81a” genlerinin metillenmemiş olduğunu göstermişlerdir (Husek ve ark. 2017). Mesane kanserinde sigara tüketimi daha önce belirttiğimiz gibi primer risk faktörü olmasına karşın literatürdeki çalışmaların çok sınırlı bir kısmında hastaların sigara içicilik durumuna göre alt gruplara ayrılarak değerlendirildiği görülmektedir. Epigenetik faktörlerin çevreyle olan etkileşimi çok iyi bilinmekle birlikte DNA metilasyonu özelinde düşündüğümüzde sigara kullanımının MK gelişimi ve progresyonu açısından bireyler arasında önemli bir varyasyon yaratacağı açıktır. Bu konuya dikkat çeken ilk klinik ve *in vitro* çalışma Jin ve arkadaşları tarafından yapılmıştır (Jin ve ark. 2017). Araştırmacılar sigara içen 78 ve içmeyen 41 MK’lı vakaya ait doku örnekleri ve yaklaşık aynı sayıda idrar örneğinin metabolomlarındaki önemli değişiklikleri LC-MS ile analiz ederek elde ettikleri bulguları biyoinformatik araçlarla değerlendirmiş, hücre hatlarıyla ve TCGA veritabanındaki bilgilerle konfirm etmişlerdir (Jin ve ark. 2017). Çalışma neticesinde, sigara içen MK’lı hasta gruplarında, sigara içmeyenlere göre anlamlı derecede yüksek düzeyde metillenmiş metabolitlere, polisiklik aromatik hidrokarbonlara, DNA’da bozulmuş nükleotidlere/“adduct”lara ve DNA hasarını gösteren genetik değişikliklere rastlanmıştır (Jin ve ark. 2017). Bu bulgular sigara kullanımı varlığında neden ileri evre yüksek dereceli tümörlere daha sık rastlandığını moleküler düzeyde açıklamaktadır (Jin ve ark. 2017). Araştırmacılar bu bulgulara ek olarak, DNMT1 enziminin (ve dolayısıyla sigara ile indüklenen DNA metilasyonunun) sigara içen MK’lı vakalarda artmış olduğunu, mesane karsinogenezinde önemli bir ksenobiyotik olan Anilin düzeyinin ve yine DNA metilasyonu ile doğrudan ilişkili olarak SAM düzeyinin sigara içen grupta anlamlı derecede yüksek bulunduğunu fakat S-Adenozil-L-Homosistein (SAH) düzeyinin anlamlı derecede azaldığını bildirmişlerdir (Jin ve ark. 2017). Epidemiyolojik çalışmalar aynı coğrafyada yaşayan diğer insanlar ile karşılaştırıldığında Afro-Amerikanlarda MK görülme sıklığının daha az olduğunu göstermiş ve bu farklılık genellenerek siyah ırkta MK’ya yatkınlığın daha az olabileceği şeklinde yorumlanmıştır. Vantaku ve arkadaşları bu durumun DNA metilasyonuna bağlı epigenetik değişikliklerden kaynaklanabileceğini düşünmüşler ve yaptıkları çalışmada Afro-Amerikan MK’lı vakalar ile Avro-Amerikan MK’lı vakaların DNA metilasyon paternlerini bisülfid sekanslama kullanarak ve metabolomlarını ise LC-MS/MS kullanarak analiz etmişler ve karşılaştırmışlardır (Vantaku ve ark. 2019). Çalışma bulguları metabolomik farkların yanı sıra MK progresyonunda önemli olduğu bilinen ksenobiyotik enzimlerin promotörlerindeki CpC adalarının Afro-Amerikanlarda, Avro-

Amerikanlara kıyasla daha yaygın olarak hipermetile olduğunu göstermiştir (Vantaku ve ark. 2019). Araştırmacılar çalışma neticesinde MK'nın moleküler biyolojisinde ırk ve etnik köken farklılıklarının DNA metilasyonu üzerinden prognostik varyasyonlar yaratabileceğini ortaya koymuşlardır (Vantaku ve ark. 2019). Mesane kanserindeki epigenetik alterasyonların önemli bir kısmı da miRNA'lar üzerinde gerçekleşmektedir. MiRNA'lar, hedef molekülleri mRNA'lar olan, 18-28 bp uzunluğunda, kısa ve kodlama yapmayan RNA molekülleridir. Tüm genlerin yarısından fazlasını hedefleri içerisine almalarına karşılık total RNA'nın oldukça küçük bir kısmını temsil etmektedirler. Öte yandan tek bir miRNA'nın birden fazla mRNA ile etkileşime girebilmesi bu moleküllerin fonksiyonelliğini arttırmaktadır. MiRNA'lar çekirdek içerisinde kompleks matürasyon sürecine tabi tutulmakta, pre-miRNA halindeki moleküller eksportin aracılığıyla taşıma ile sitoplazmaya geçerek nihai miRNA haline getirilmektedir. MiRNA'ların yaygın olarak mRNA'ların 3'-UTR bölgelerine bağlanarak transkripsiyonu baskıladığı düşünülmeye karşılık yapılan çalışmalarda transkripsiyonu arttırabildiği de görülmüştür (Huang ve ark. 2011; Rothschild ve ark. 2014). Bu özelliklerden hareketle kanser tedavisinde bir seçenek olarak onkogen ilişkili miRNA'ların anti-miRNA'lar ("antagomir"ler) ile baskılanması ya da tümör baskılayıcı genlerin stimülasyonu gibi stratejilerle kemoradyoterapi hassasiyetini arttırmada kullanılması gündeme gelmiştir (Rothschild ve ark. 2014). Şu anda birçok farklı hastalık için ticari firmalar tarafından geliştirilmiş miRNA bazlı terapötikler, güçlü tedavi seçenekleri sunabilecek kapasitededir. Mesane kanserinde miRNA'ların önemine dair en kapsamlı çalışmalardan bir tanesi Xie ve arkadaşları tarafından yapılan meta-analiz olup, araştırmacılar 2009-2016 yılları arasında konuya ilişkin olarak yapılmış tüm çalışmaları farklı veri tabanlarından derleyip filtrelemiş ve farklı evre hastalığı olan 2753 MK'lı vakadan oluşan örnekleme prognostik önemi olduğu raporlanan 37 miRNA'yı incelemişlerdir (Xie ve ark. 2017). Meta-analiz neticesinde "miRNA-21, miRNA-143, miRNA-155, miRNA-200, miRNA-214 ve miRNA-222"den oluşan 6 miRNA'nın yapılan çalışmaların çoğunda ortak olarak tekrarlandığı görülmüştür (Xie ve ark. 2017). Araştırmacılar bunlar arasında; "miRNA-21 ve miRNA-222" ekspresyonunun kısalmış genel sürvi ile korelasyon gösterdiğini, artmış "miRNA-143 ve miRNA-155" ekspresyonunun kısalmış progresyonsuz sürvi ile ilişkili olduğunu, azalmış miRNA-214 ekspresyonunun ise kısalmış nüksüz sürvi ile ilişkili olduğunu ortaya koymuş ve bu miRNA panelinin MK'lı hastaların takibinde kullanılacak yararlı biyobelirteçler ve

terapötik hedefler olarak değerlendirilebileceğini ifade etmişlerdir (Xie ve ark. 2017). Chen ve arkadaşlarının yaptığı bir diğer meta-analizde ise böbrek, mesane ve prostat ürolojik kanserlerinde miRNA düzeylerinin sürvi tahmini ile ilişkisi ele alınmıştır (Chen ve ark. 2018). Araştırmacılar, 2017 yılının sonuna kadar farklı veri tabanlarında 3 ürolojik kanser çeşidine ilişkin olarak yapılmış miRNA bazlı çalışmaların tümünü derleyip filtreleyerek 151 veri kümesinde 80 farklı miRNA'yı incelemişler ve bulgularını TCGA verileri ile konfirme etmişlerdir (Chen ve ark. 2018). Meta-analiz neticesinde “miRNA-21, miRNA-34a, miRNA-141 ve miRNA-203”deki değişiklikler her 3 ürolojik kanser türünde ortak olarak olarak izlenmiş ancak TCGA konfirmasyonu sonrasında sadece miRNA-21'in istatistiksel olarak yüksek anlamlılık ($p < 0.001$) düzeyinde kısalmış genel sürvi ile korelasyon gösterdiği görülmüştür (Chen ve ark., 2018). Ek olarak miRNA-21, diğer kanserlerden bağımsız şekilde MK'da kötü prognoz ile ilişkili bulunmuştur (Chen ve ark. 2018). Araştırmacılar miRNA bazlı belirteçlerin panel olarak değerlendirilmesinin tek tek değerlendirilmelerine göre daha yüksek başarı oranlarına sahip olacağını belirtmişler ve böbrek kanserinde “miRNA-27a, miRNA-27b, miRNA-141, miRNA-144, miRNA-497 ve miRNA-942”den oluşan panelin, paneldeki her bir miRNA ile kıyaslandığında istatistiksel olarak daha yüksek anlamlılık ($p < 0.001$) düzeyinde genel sürviyi öngörebildiğini göstermişlerdir (Chen ve ark. 2018). Buna karşılık Yang ve arkadaşları yaptıkları meta-analizde tek başına miRNA-15a'nın insana ait 18 farklı kanser türünde genel sürviye nasıl etki ettiğini ele almışlar ve 2018 yılının sonuna kadar bu konuya ilişkin yapılmış olan tüm çalışmaları farklı veri tabanlarından derleyip filtreleyerek 10 adet makaledeki 1616 kanserli vaka örneğini araştırmalarına dahil etmişlerdir (Yang ve ark. 2019). Meta-analiz neticesinde MK'nın da dahil olduğu 8 kanser türünde azalmış miRNA-15a ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı (MK için $p = 0.0081$) düzeyde kısalmış genel sürvi ile ilişkili bulunmuş olup araştırmacılar miRNA-15a'nın genel sürviyi öngörmeye biyobelirteç olarak kullanılabileceğini önermişlerdir (Yang ve ark. 2019). Farklı kombinasyonlardaki miRNA panellerinin sürvi tahmini için farklı sensitivite ve spesifite oranlarına sahip olabilmesine karşılık genel anlamda miRNA'ların MK tanısı için kullanılıp kullanılamayacağı önemli bir sorudur. Shi ve arkadaşları yaptıkları meta-analizde, filtreleme sonucu 10 makaleyi çalışmalarına dahil ederek 1556 MK'lı vaka ve 1347 sağlıklı kontrolden oluşan örneklemde miRNA'ların MK için tanısal önemini araştırmışlardır (Shi ve ark. 2017). Meta-analiz neticesinde özellikle kandan yapılacak miRNA profillemesinin MK'ya tanı

konmasında yüksek başarı gösterebildiğini ancak etnik farklılıkların aynı örnek alt grupları arasında bile önemli derecede varyasyonuna sebep olabileceğini belirtmişlerdir (Shi ve ark. 2017). Ek olarak araştırmacılar Asya popülasyonu temelli çalışmalarda kan bazlı miRNA profillemesinin MK tanısı için daha yüksek doğruluk gösterdiğini ortaya koymuş ancak kesin sonuçlar için yapılacak çalışmaların artması gerektiğini belirtmişlerdir (Shi ve ark. 2017). Ouyang ve arkadaşları yaptıkları meta-analizde böbrek, mesane ve prostat ürolojik kanserlerinde miRNA profillemesinin tanısal değerini araştırmışlar ve filtreleme sonucu 39 makaleyi çalışmalarına dahil etmişlerdir (Ouyang ve ark. 2015). Analiz neticesinde 3 ürolojik kanser türü için miRNA profillemesinin tanı koydurmadaki genel sensitivite ve spesifitesi sırasıyla %74 ve %72 olarak bulunmuştur (Ouyang ve ark. 2015). Mesane kanseri için yapılan bağımsız analizde ise miRNA profillemesinin genel anlamda %74 sensitivite ve %74 spesifite ile MK'lı örnekleri sağlıklı kontrollerden ayırabildiğini; etnik farklılıklar gözetilerek yapılan analizde ise Asyalılarda %79 sensitivite ve %73 spesifite düzeyine ulaşılırken Kafkasyalılarda %71 sensitive ve %71 spesifite düzeyinin elde edildiği belirtilmiştir (Ouyang ve ark., 2015). Bunun yanında MK'da kan ve kan dışı örneklerden yapılan miRNA profillemesinin tanısal değerini de incelemişler ve kan bazlı miRNA profillemesinde %77 sensitive ve %74 spesifite düzeyine ulaşılırken kan dışı örneklerde %74 sensitivite ve %72 spesifite düzeyinin elde edildiğini göstermişlerdir (Ouyang ve ark. 2015). Ek olarak araştırmacılar MK tanısında tek miRNA kullanımı durumunda %73 sensitivite ve %71 spesifite düzeyine ulaşılırken miRNA paneli kullanımının tanıya yönelik sensitivite ve spesifitenin her ikisini %83'e çıkardığını ortaya koymuşlardır (Ouyang ve ark., 2015). Mesane kanserinin ayırıcı tanısı ya da sürvi öngörüsü için performansı arttırmak üzere miRNA panellerinin tercih edilmesi noktasında fikir birliği bulunmasının yanı sıra tek başına miRNA'ların MK progresyonuna, tedavi cevabına ya da tümör davranışına etkisinin incelenmesi ayrıca ele alınması gereken bir konu olduğuna vurgu yapılmıştır (Ouyang ve ark. 2015). *METTL3* gen ürünü olan enzimin RNA'lar üzerinde transkribe oldukları andan itibaren tüm aşamalarda rol oynadığı, kritik onkogenlerin ve tümör baskılayıcıların mRNA'larındaki N6-Metiladenozin (m6A) modifikasyonunu düzenleyerek tümör oluşumunu etkilediği, ilaveten m6A bağımlı "AFF4/NF-κB/MYC" sinyal yolağı üzerinden spesifik olarak MK progresyonuna neden olduğu düşünülmektedir (Lin ve ark. 2016; Han ve ark. 2019). Bu bilgiden hareketle Han ve arkadaşları, *METTL3*'ün miRNA gibi kodlamayan

RNA'lardaki m6A modifikasyonunu nasıl etkilediğini MK bağlamında araştırmışlar ve MK'lı vakalara ait tümör dokusu ve tümöre komşu sağlıklı dokular yanında EJ ile T24 MK hücre hatlarını araştırmalarında kullanmışlardır (Han ve ark. 2019). Çalışma neticesinde *METTL3*'ün MK'da kötü prognozla korele şekilde ekspresyonel artış gösterdiği görülmüştür (Han ve ark. 2019). Bunun yanında araştırmacılar, "*METTL3*'ün *DGCR8*" ile etkileşime girerek m6A'ya bağımlı bir yolla "pri-miRNA-221 ve pri-miRNA-222" matürasyonunu hızlandırdığını ve bu durumun MK hücrelerinin progresyonundan önemli derecede sorumlu olan *PTEN*'in ekspresyonunu azaltmaya yardımcı olduğunu göstererek MK tedavisinde kullanılmasını önermişlerdir (Han ve ark. 2019). Bir diğer çalışmada Lu ve arkadaşları, bir kodlamayan sirküler RNA olan "circSLC8A1"ın MK progresyonundaki etkisini ele almışlar ve MK'lı hastalara ait tümör dokusu ve tümöre komşu sağlıklı dokular yanında "5637, T24, J82, EJ, UMUC, RT4 ve SV-HUC-1"den oluşan hücre hatlarını araştırmalarında kullanmışlardır (Lu ve ark. 2019). Çalışma neticesinde araştırmacılar "circSLC8A1" ekspresyonunun kanseröz hücre hatlarında ve özellikle tümör dokularında önemli derecede azaldığını ve bu azalmanın tümör evre ve derecesi ile pozitif korelasyon gösterdiğini ortaya koymuşlardır (Lu ve ark. 2019). Buna ek olarak "circSLC8A1"ın "miRNA-130b ve miRNA-494" ile doğrudan etkileşime girerek bu miRNA'ların *PTEN*'in ekspresyonunu arttırmasını engellemek suretiyle MK progresyonunu baskıladığını göstermişlerdir (Lu ve ark. 2019). Hou ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarında miRNA-127'nin MK progresyonu üzerindeki etkisini ele almışlardır (Hou ve ark. 2019). Araştırmacılar, biyoinformatik analizler neticesinde miRNA-127'nin *KMT2D*'yi hedef aldığını gösterdikten sonra bu veriyi 20 vakadan alınan KİOMT dokusu ve 20 vakadan alınan KİMT dokusu ile "RT4, T24, UMUC-3, 5637, EJ ve SV-HUC-1"den oluşan MK hücre hatlarını kullanarak araştırmışlardır (Hou ve ark. 2019). Çalışma neticesinde miRNA-127 ekspresyonu KİMT dokularında KİOMT dokularına kıyasla daha yüksek bulunmuş ve aynı zamanda MK hücre hatlarında, sağlıklı hücre hatlarına kıyasla artış gösterdiği görülmüştür (Hou ve ark. 2019). miRNA-127 ekspresyonunun susturulması "T24 ve UMUC-3" hücrelerinde canlılık ve migrasyonu belirgin biçimde azaltmıştır (Hou ve ark. 2019). Bunun yanında araştırmacılar miRNA-217'nin başta "H3K4me1" olmak üzere tüm genomun transkripsiyonunda rol oynayan *KMT2D*'nin ekspresyonunu arttırdığını göstererek *KMT2D*'nin iyi prognozla ilişkili olduğunu ifade etmişlerdir (Hou ve ark. 2019). Lin ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarında 164 MK'lı hastadan alınan

doku örnekleri ile “T24, RT4, 5637, HT-1376, J82, UMUC-3 ve TCCSUP” hücre hatlarını kullanarak miRNA-325’in MK için potansiyel bir biyobelirteç olup olamayacağını araştırmışlardır (Lin ve ark. 2018). Çalışma neticesinde miRNA-325 ekspresyonunun tümör dokuları ve kanseröz hücre hatlarında, sağlıklı doku ve hücre hatlarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) düzeyde azaldığı gösterilmiş ve miRNA-325 ekspresyonunun istatistiksel olarak anlamlı ($p=0.0114$) düzeyde azalmış postoperatif genel sürvi ile ilişkili olduğu görülmüştür (Lin ve ark. 2018). Ek olarak araştırmacılar “T24 ve 5637” hücre hatlarında miRNA-325’i lentiviral transfeksiyon yöntemiyle aşırı eksprese ederek *in vitro* deneylerde tümör proliferasyonu ve migrasyonu ile sisplatin kemorezistansının azalarak tümör baskılayıcı özelliklerin ortaya çıktığını; *in vivo* deneylerde ise transplantasyona uygun atimik nude nu/nu farelere subkutanöz implante edilen “T24 ve 5637” hücrelerinden miRNA-325’in aşırı eksprese edildiği grupta transplant büyümesinin ve hücrelerdeki G0/G1 transizyonunun istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) düzeyde geciktiğini göstermişlerdir (Lin ve ark. 2018). Tian ve arkadaşları MK’da miRNA-621’in progresyon üzerindeki etkisini inceledikleri çalışmalarında, 50 MK’lı vakadan elde edilen tümör dokusu ve tümöre komşu sağlıklı mesane dokusunun yanında “T24, J82 ve SV-HUC-1” hücre hatlarını kullanmışlardır (Tian ve ark. 2019). Araştırmacılar miRNA-621 ekspresyon düzeyinin tümör dokuları ile “T24 ve J82” hücre hatlarında, sağlıklı dokular ile kanseröz olmayan SV-HUC-1 hücre hattına kıyasla istatistiksel olarak yüksek anlamlılık ($p<0.01$) düzeyinde azaldığını ve bu azalmanın tümör progresyonu ile korele olduğunu göstermişlerdir (Tian ve ark. 2019). Bunun yanında miRNA-621 ekspresyon düzeyinin genel sürvi ile negatif korelasyon gösterdiği ortaya koyulmuştur (Tian ve ark. 2019). Araştırmacılar miRNA-621’in doğrudan *TRIM29*’un 3’-UTR bölgesini hedef aldığını, *TRIM29* düzeyinin sağlıklı dokularla kıyaslandığında istatistiksel olarak yüksek anlamlılık ($p<0.01$) düzeyinde tümör dokularında artış gösterdiğini ve “*TRIM29* ile miRNA-621”in tümör dokularında istatistiksel olarak yüksek anlamlılık ($p<0.001$) düzeyinde tamamiyle zıt yönde ekspresyonel değişim gösterdiğini belirtmişlerdir (Tian ve ark. 2019). Ayrıca çalışma sonucunda miRNA-621’in *TRIM29*’u hedef alarak MK hücrelerinde “Wnt/ β -katenin” sinyal yolağı üzerinden proliferasyonu ve metastazı inhibe ettiğini ifade edilmiştir (Tian ve ark. 2019). Feng ve arkadaşları, 100 MK’lı vakadan elde edilen tümör dokusu ve tümöre komşu sağlıklı mesane dokusunda, 50 MK’lı vakadan ve 50 sağlıklı kontrolden elde edilen plazma örneklerinde ve “J82,

HT1376, RT4, T24, TCCSUP, HCV29 ve HU609” hücre hatlarında miRNA-99a değişimini ve MK’daki prognostik önemini ele almışlardır (Feng ve ark. 2014). Çalışma neticesinde miRNA-99a’nın ekspresyon düzeyinin tümör dokularında, kanseröz hücre hatlarında ve MK’lı hastalara ait plazma örneklerinde istatistiksel olarak yüksek anlamlılık ($p<0.01$) düzeyinde daha düşük bulunmuştur (Feng ve ark. 2014). Azalmış miRNA-99a düzeyinin agresif MK fenotipi ile korele olduğu ortaya koyulmuş ve araştırmacılar miRNA-99a’yı aşırı eksprese ettikleri hücre hatlarında proliferasyonunun inhibe olduğunu göstermişlerdir (Feng ve ark. 2014). Wu ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarında, 27 MK’lı vakadan elde edilen tümör dokusu ve tümöre komşu sağlıklı mesane dokusu ile “T24, EJ, TCCSUP ve SV-HUC-1” hücre hatlarında miRNA-379-5p değişimini ve MK’daki prognostik önemini ele almışlardır (Wu ve ark. 2017). Biyoinformatik analizler miRNA-379-5p’nin direkt olarak *MDM2*’nin 3’-UTR bölgesini hedef aldığını gösterdiğinden *MDM2*’de araştırmaya dahil edilmiştir (Wu ve ark. 2017). Çalışma neticesinde miRNA-379-5p ekspresyon düzeyinin tümör dokuları ile “T24, J82 ve TCCSUP” MK hücre hatlarında, sağlıklı dokular ile kanseröz olmayan SV-HUC-1 hücre hattına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) düzeyde azaldığı, *MDM2*’nin ekspresyon düzeyinin ise kanser dokularında arttığı görülmüştür (Wu ve ark. 2017). Araştırmacılar miRNA-379-5p’yi transfeksiyon yoluyla aşırı eksprese ettikleri “T24 ve EJ” kanseröz hücre hatlarında hücre proliferasyonunun inhibe olduğunu, invazyon ve metastaz kapasitesinin istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) düzeyde azaldığını görmüşler ve aynı hücre hatlarında *MDM2* ifadesini siRNA aracılığıyla baskıladıklarında benzer sonuçlarla karşılaşmışlardır (Wu ve ark. 2017). Jiang ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarında, 30 MK’lı vakadan elde edilen tümör dokusu ve tümöre komşu sağlıklı mesane dokusu ile “TCCSUP, 5637, UMUC-3 ve T24” hücre hatlarında miRNA-93 ve onun 3’-UTR bölgesinden hedef aldığı *PEDF*’in MK proliferasyonu ve invazyonuna etkisini araştırmışlardır (Jiang ve ark. 2019). Çalışma neticesinde miRNA-93 ekspresyonunun tümör dokularında, sağlıklı dokulara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) düzeyde arttığı ve tümör evresi ve lenf nodu metastazı varlığıyla korelasyon gösterdiği ortaya koyulmuştur (Jiang ve ark. 2019). Araştırmacılar, kullandıkları tüm hücre hatları arasında miRNA-93 ekspresyonunun en yüksek olduğu “TCCSUP ve UMUC-3” hücre hatlarında miRNA-93 ifadesini baskılamışlar ve hücre proliferasyonu ile invazyonun istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) düzeyde azaldığını göstermişlerdir (Jiang ve ark. 2019). Ek olarak *PEDF*’i

aşırı eksprese ettikleri hücre hatlarında miRNA-93 ifadesinin azaldığını ve yine hücre proliferasyonu ile invazyonun istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) düzeyde azaldığını ortaya koymuşlardır (Jiang ve ark. 2019). Literatür genelinde MK ile DNA metilasyonu ilişkisi değerlendirildiğinde hipermetilasyonun, kasa invazyon, artmış tümör evresi ve derecesi, kötü prognoz ve kansere bağlı mortalite ile paralellik gösterdiği görülmektedir. Birçok araştırmacı MK'nın takibinde kullanılmak üzere birbirinden farklı onlarca geni ya da gen panelini metilasyon bazlı belirteç olarak önermektedir. Tüm bu aday genler arasında meta analizlerce de doğrulanmış yüksek sensitivite ve spesifite gösteren belirteçlerin klinikte kullanımı, MK'nın tanı ve tedavisinde gerek hasta gerekse hekim açısından kolaylık vaat etmektedir. Literatüre göre miRNA'ların da MK için büyük öneme sahip olduğu görülmektedir. İdrar ve doku miRNA profillemesi sonucu elde edilen farklı kombinasyonlardaki miRNA panelleri, MK'lı örnekleri sağlıklı kontrollerden başarılı şekilde ayırabilmekte, aynı zamanda bu paneller sürvi ve rekürrens için başarılı kestirimler yapabilmektedir. Mesane kanseri progresyonunda anahtar rol üstlenen genler ile ilişkili miRNA'lar, MK alt tiplerinin gelişiminde önemli derecede söz sahibi olmaktadır. Stratejik miRNA'ların selektif olarak inhibe edildiği ya da aşırı eksprese edildiği hücre kültürü bazlı deneylerde MK hücrelerinin proliferasyon, invazyon ve metastatik özelliklerinin baskılandığına dair çok çeşitli kanıtlar bulunmaktadır ve ilgili miRNA'ların MK için terapötik hedefler olarak değerlendirilebileceği açıktır. Tüm bunlara ek olarak miRNA'ların diğer kodlamayan RNA'lar ile ilişkilerine, histon modifikasyonu ile DNA metilasyonunda görevli regülatörleri hedefleri içerisine almalarına ve transkripsiyondan sorumlu enzimlerle etkileşimlerine bakılarak MK'da rol alan diğer epigenetik mekanizmalar ile de kompleks ilişkiler içerisinde olduğu anlaşılmaktadır. İlgili mekanizmaların aydınlatılabilmesi için MK'da epigenetik bazlı araştırmaların sayısının artması daha faydalı bilgiler sağlayacaktır (Dogan ve ark. 2022).

2.1.6. Mesane Kanseri Tanı Testleri ve Mevcut İdrar Biyobelirteçleri

Mesane tümörlerinin idrarla temas halinde olması, tümöre özgü hücre ve moleküllerin idrara geçmesini sağladığından MK tanısında kullanılabilecek idrar temelli bir biyobelirteç keşfedilmesi fikri uzun zamandır üzerinde çalışılan bir araştırma konusudur. Buna karşılık bildirilen çok sayıda başka belirteçlerin de bulunmasına rağmen idrar sitolojisi hala kılavuzlarda sistoskopiye ek olarak önerilen ve rutinde

kullanılan tek idrar belirteci olma özelliğini korumaktadır (Maas ve ark. 2023). Daha önce de bahsedildiği gibi idrar sitolojisi, idrara dökülen hücrelerin maligniteyi saptamak adına Paris Klasifikasyon Sistemi'nde belirtildiği şekilde (Barkan ve ark. 2016) nükleer atipi gibi morfolojik özellikler yönünden sitopatolog tarafından mikroskop altında incelenmesini tarif etmektedir (Maas ve ark. 2023). İdrar ve mesane yıkama sıvısından yapılan sitolojik değerlendirmenin spesifitesi >%90 olmasına karşılık özellikle en sık görülen düşük dereceli KİOMT'ler için idrar sitolojisinin sensitivitesi düşüktür (Maas ve ark. 2023). Bu durum idrar sitolojisine alternatif çok sayıda idrar testinin geliştirilmesinin yolunu açmıştır. İdrar sitolojisinin gelişimi 1970'lere dayanmaktadır, bunu 1990'larda idrardan protein tespitine dayanan "Nuclear Matrix Protein 22 (NMP22)" ve "Bladder Tumor Antigen (BTA)" testleri, 1999'da geliştirilen "Immunocyt/uCyt+" testi ve 2001'de geliştirilen FISH temelli ve hücresel yaklaşıma dayalı "UroVysion" testi izlemektedir (Maas ve ark. 2023). Farklı sensitivite ve spesifite yüzdelerine sahip bu testler genel olarak FDA onayına sahiptirler. Mesane kanserinin tanı ve takibinde kullanılan test ve biyobelirteçlerden FDA onayı alanlar Tablo 2-7'de; FDA onayı almayanlardan ise DNA, mRNA ve protein temelli olanlar ayrı ayrı Tablo 2-8, Tablo 2-9 ve Tablo 2-10'da detaylı olarak ifade edilmiştir (Maas ve ark. 2023). Bu testlerin rutin üroonkoloji pratiğinde uzun vadeli kullanılamamasındaki temel sorun, özellikle idrar protein düzeyinin analiz edildiği testlerin MK'ya eşlik eden inflamasyon ve hematüri gibi durumlarda, BCG immünoterapisinde, üriner taş gelişiminde ve üreteral stent gibi yabancı cisim varlığında yanlış pozitif sonuç verebilmesidir (Maas ve ark. 2023). Bir diğer önemli sorun ise idrar biyobelirteçlerini hedef alan prospektif randomize çalışmalardan elde edilecek yüksek kanıt değerine sahip bilgilerin eksikliğidir (Maas ve ark. 2023). Bu bağlamda prostat kanserinin tanı ve takibinde kullanılan Prostat Spesifik Antijen (PSA) gibi, MK'nın da tanı ve takibinde kullanılabilecek bir biyobelirteç ya da bir biyobelirteç paneline olan ihtiyaç açıkça görülmektedir.

Tablo 2-7: Mesane kanserinin tanı ve takibinde kullanılan FDA onaylı idrar belirteçleri/testleri ((Maas ve ark. 2023)’den uyarlanmıştır). Kısaltmalar: “AUA: American Urological Association; EUA: European Association of Urology; BTA: Bladder Tumour Antigen; CE: Conformité Européenne; CEA: Carcinoembryonic Antigen; ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; FISH: Fluorescent in situ Hybridization; MAUB: Mucin Antigen of Urinary Bladder; NMP22: Nuclear Matrix Protein 22; POC: Point of Care.

Test Adı	Ticari Olarak Mevcut Mu?	Örnek Türü	Kullanılan Teknoloji	Biyobelirteç Hedefi	FDA Onay Durumu	CE Onayı	Performansı	Meta Analizi Mevcut Mu?	Kılavuzlarda Öneriliyor Mu?
Immunocyt/uCyt+	Evet	İdrara Geçen Eksfoliyatif Hücreler	İmmünofloresan	CEA, MAUB	Tanı ve Takip	Yok	Sensitivite: %78 Spesifite: %78	Evet	AUA: Evet EUA: Hayır
UroVysion	Evet	İdrara Geçen Eksfoliyatif Hücreler	FISH	3, 7, 17 ve 9p21 Kromozomomal Alterasyonları	Tanı ve Takip	Var	Sensitivite: %63 Spesifite: %87	Evet	AUA: Evet EUA: Evet
NMP22 (Kantitatif)	Evet	İdrar Proteini	ELISA	NMP22	Tanı ve Takip	Var	Sensitivite: %69 Spesifite: %77	Evet	AUA: Evet EUA: Evet
NMP22 (Kalitatif)	Evet	İdrar Proteini	POC Dipstick İmmünoassay	NMP22	Tanı ve Takip	Var	Sensitivite: %52-59 Spesifite: %87-89	Evet	AUA: Evet EUA: Evet
BTA-TRAK (Kalitatif)	Evet	İdrar Proteini	ELISA	Complement Factor H-related Protein	Tanı ve Takip	Hayır	Sensitivite: %65 Spesifite: %74	Evet	AUA: Evet EUA: Evet
BTA-STAT (Kalitatif)	Evet	İdrar Proteini	POC Dipstick İmmünoassay	Complement Factor H-related Protein	Tanı ve Takip	Hayır	Sensitivite: %58 Spesifite: %77	Evet	AUA: Evet EUA: Evet

Tablo 2-8: Mesane kanserinin tanı ve takibinde kullanılan FDA onayı almamış “protein temelli” idrar belirteçleri/testleri ((Maas ve ark. 2023)’den uyarlanmıştır). Kısaltmalar: “AUA: American Urological Association; EUA: European Association of Urology; CE: Conformité Européenne; ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; POC: Point of Care; ApoA1: Apolipoprotein A1; BLCA4: Bladder Cancer Antigen 4; CCL18: CC-chemokine Ligand 18; CK: Cytokeratin; HA: Hyaluronic Acid; Hase: Hyaluronidase; MCM5: Minichromosome Maintenance Protein 5; MMP: Matrix Metalloprotease; SDC1: Syndecan 1; sFAS: Solubilized FAS; UBC: Urinary Bladder Cancer; VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor.”

Test Adı	Ticari Olarak Mevcut Mu?	Örnek Türü	Kullanılan Teknoloji	Biyobelirteç Hedefi	CE Onayı	Performansı	Meta Analizi Mevcut Mu?	Kılavuzlarda Öneriliyor Mu?	Vaka Sayısı
BLCA4	Hayır	İdrar Proteinini	ELISA	BLCA4	Hayır	Sensitivite: %93 Spesifite: %97	Evet	AUA: Hayır EUA: Hayır	1119
ADxBladder	Evet	İdrar Proteinini	ELISA	MCM5	Evet	Tanıda; Sensitivite: %74 Spesifite: %78 Takipte; Sensitivite: %58 Spesifite: %61	Evet	AUA: Hayır EUA: Evet	1413 5114 856
UBC Test (Kantitatif)	Evet	İdrar Proteinini	ELISA	CK8 CK18	Hayır	Sensitivite: %64 Spesifite: %80	Evet	AUA: Hayır EUA: Hayır	1825
UBC Rapid (Kalitatif)	Evet	İdrar Proteinini	POC Dipstick İmmünoassay	CK8 CK18	Hayır	Sensitivite: %59 Spesifite: %76	Evet	AUA: Hayır EUA: Hayır	1236
CYFRA 21-1	Evet	İdrar Proteinini	ELISA	CK19	Evet	Sensitivite: %82 Spesifite: %80	Evet	AUA: Hayır EUA: Hayır	1216
ApoA1	Hayır	İdrar Proteinini	ELISA	ApoA1	Hayır	Sensitivite: %89.2-95 Spesifite: %84.6-92	Hayır	AUA: Hayır EUA: Hayır	379 165
IL-8	Hayır	İdrar Proteinini	ELISA	IL-8	Hayır	Sensitivite: %69-90 Spesifite: %63-97	Hayır	AUA: Hayır EUA: Hayır	157 73 140 127
VEGF	Hayır	İdrar Proteinini	ELISA	VEGF	Hayır	Sensitivite: %16-84.8 Spesifite: %62.8-95	Hayır	AUA: Hayır EUA: Hayır	157 73 100 320
CCL18	Hayır	İdrar Proteinini	ELISA	CCL18	Hayır	Sensitivite: %88 Spesifite: %86	Hayır	AUA: Hayır EUA: Hayır	127
HA ve Hase	Hayır	İdrar Proteinini	ELISA	HA ve Hase	Hayır	Sensitivite: %90.8 Spesifite: %82.5	Evet	AUA: Hayır EUA: Hayır	1613
sFAS	Hayır	İdrar Proteinini	ELISA	FAS (CD95)	Hayır	Sensitivite: %88 Spesifite: %89.1	Hayır	AUA: Hayır EUA: Hayır	191
CD44 ve CD44 İzofomları	Hayır	İdrar Proteinini	ELISA	CD44 ve CD44 İzofomları	Hayır	Sensitivite: %81.1 Spesifite: %100	Hayır	AUA: Hayır EUA: Hayır	118
Oncuria	Evet	İdrar Proteinini	Multipleks İmmünoassay	ANG, ApoE, A1AT, CA9, IL-8, MMP9, MMP10, PAI1, SDC1, VEGF	Evet	Sensitivite: %93 Spesifite: %93	Hayır	AUA: Hayır EUA: Hayır	362

Tablo 2-9: Mesane kanserinin tanı ve takibinde kullanılan FDA onayı almamış “mRNA temelli” idrar belirteçleri/testleri ((Maas ve ark. 2023)’den uyarlanmıştır). Kısaltmalar: “AUA: American Urological Association; EUA: European Association of Urology; CE: Conformité Européenne; RT-qPCR: Real-Time Polymerase Chain Reaction; RT-PCR: Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction.”

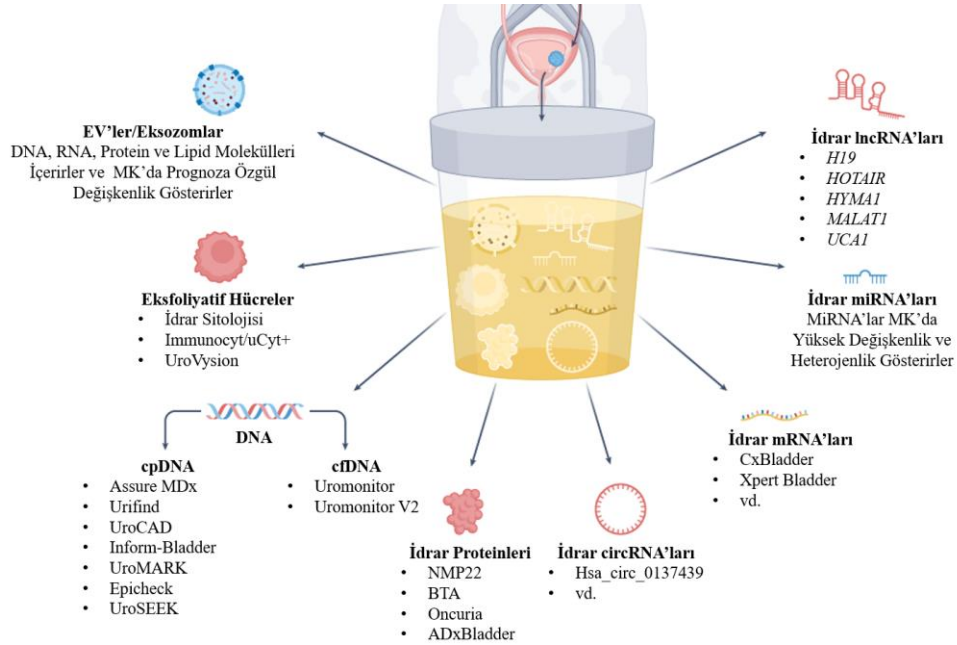
Test Adı	Ticari Olarak Mevcut Mu?	Örnek Türü	Kullanılan Teknoloji	Biyobelirteç Hedefi	CE Onayı	Performansı	Meta Analizi Mevcut Mu?	Kılavuzlarda Öneriliyor Mu?	Vaka Sayısı
Survivin	Hayır	İdrar mRNA	RT-PCR	<i>BIRC5</i> mRNA	Hayır	Sensitivite: %80.4 Spesifite: %95.1	Evet	AUA: Hayır EUA: Hayır	2051
CK20	Hayır	İdrar mRNA	RT-PCR	<i>KRT20</i> mRNA	Hayır	Sensitivite: %80 Spesifite: %91	Evet	AUA: Hayır EUA: Hayır	3473
CxBladder	Evet	İdrar mRNA	RT-qPCR	5 mRNA: <i>IGFBP5</i> , <i>HOXA13</i> , <i>MDK</i> , <i>CDK1</i> , <i>CXCR2</i>	Hayır	Sensitivite: %82 Spesifite: %85	Hayır	AUA: Evet EUA: Evet	485
CxBladder Monitor	Evet	İdrar mRNA	RT-qPCR	5 mRNA: <i>IGFBP5</i> , <i>HOXA13</i> , <i>MDK</i> , <i>CDK1</i> , <i>CXCR2</i>	Hayır	Sensitivite: %93 Spesifite: NR	Hayır	AUA: Evet EUA: Evet	763
Xpert Bladder Cancer Monitor	Evet	İdrar mRNA	RT-qPCR	5 mRNA: <i>CRH</i> , <i>IGF2</i> , <i>UPK1B</i> , <i>ANXA10</i> , <i>ABL1</i>	Evet	Sensitivite: %74 Spesifite: %80	Hayır	AUA: Hayır EUA: Evet	363

Tablo 2-10: Mesane kanserinin tanı ve takibinde kullanılan FDA onayı almamış “DNA temelli” idrar belirteçleri/testleri ((Maas ve ark. 2023)’den uyarlanmıştır). *Test türünden bahsedilmemekte ancak *TERT* ve *FGFR3*’ün analiz edilmesinden bahsedilmektedir. Kısaltmalar: “AUA: American Urological Association; EUA: European Association of Urology; CE: Conformité Européenne; cfDNA: cell-free DNA; cpDNA: cell pellet DNA; MSP qPCR: Methylation-specific Real-Time Polymerase Chain Reaction; utMeMa: urine tumour DNA Methylation Mass Array; WGS: Whole Genome Sequencing.”

Test Adı	Ticari Olarak Mevcut Mu?	Örnek Türü	Kullanılan Teknoloji	Biyobelirteç Hedefi	CE Onayı	Performansı	Meta Analizi Mevcut Mu?	Kılavuzlarda Öneriliyor Mu?	Vaka Sayısı
Assure MDx	Evet	İdrar cpDNA	MSP qPCR	DNA Metilasyonu: <i>OTX1</i> , <i>ONECUT2</i> , <i>TWIST1</i> ; DNA Mutasyonu: <i>FGFR3</i> , <i>TERT</i> , <i>HRAS</i>	Hayır	Sensitivite: %93 Spesifite: %86	Hayır	AUA: Hayır EUA: Hayır	200
CXCL13	Evet	İdrar cpDNA	Oligo-CGH Assay	341 Genetik Lokus	Evet	Sensitivite: %75 Spesifite: %100	Hayır	AUA: Hayır EUA: Hayır	134
Epicheck	Evet	İdrar cpDNA	qPCR	15 DNA Metilasyon Biyobelirteci	Evet	Sensitivite: %68.2 Spesifite: %88	Hayır	AUA: Hayır EUA: Evet	440
UroSEEK	Hayır	İdrar cpDNA	Multiplex ve Singleplex PCR	Mesane Kanseri ilişkili 10 Mutasyonun Multiplex PCR ile Analizi: <i>FGFR3</i> , <i>TP53</i> , <i>ERBB2</i> , <i>CDKN2A</i> , <i>KRAS</i> , <i>HRAS</i> , <i>MET</i> , <i>PIK3CA</i> , <i>MLL</i> , <i>VHL</i> ; <i>TERT</i> Promotör Alterasyonlarının Singleplex PCR ile Analizi	Hayır	Tanıda (Sitoloji ile Kombinlendiğinde): Sensitivite: %95 Spesifite: %93; Takipte (Sitoloji ile Kombinlendiğinde): Sensitivite: %71 Spesifite: %80	Hayır	AUA: Hayır EUA: Hayır	570
UroMark	Hayır	İdrar cpDNA	Mikrodroplet PCR	150 Genetik Lokusun DNA Metilasyonu (<i>OTX1</i> , <i>ONECUT2</i> , <i>ZNF154</i> , <i>TBX2</i> , <i>ZIC4</i> Dahil)	Hayır	Sensitivite: %98 Spesifite: %97	Hayır	AUA: Hayır EUA: Hayır	274
Uromonitor ve Uromonitor V2	Evet	İdrar cfDNA	qPCR	DNA Mutasyonu: <i>TERT</i> Promotörü ve <i>FGFR3</i> Metilasyon Belirteci: cg21472506 (Hedef Gen <i>OTX1</i>) ve cg11437784 (Hedef Gen <i>SOX1-OT</i>)	Evet	Sensitivite: %74 Spesifite: %93	Hayır	AUA: Hayır EUA: Evet*	185
UriFind	Hayır	cpDNA	DNA Metilasyon MassARRAY (utMeMa)	cg21472506 (Hedef Gen <i>OTX1</i>) ve cg11437784 (Hedef Gen <i>SOX1-OT</i>)	Evet	Sensitivite: %90 Spesifite: %83.1	Hayır	AUA: Hayır EUA: Hayır	313 (Keşif Kohortu); 175 (Validasyon Kohortu)
UroCad	Hayır	cpDNA	Low-coverage WGS	Kopya Numarası Varyasyonları	Hayır	Sensitivite: %80.4 Spesifite: %94.9	Hayır	AUA: Hayır EUA: Hayır	190 (Keşif Kohortu); 95 (Validasyon Kohortu)

Bladder- Inform	Evet	cpDNA	Multiplex PCR	23 Genin Mutasyonları: <i>TERT</i> Promotörü, <i>FGFR3</i> , <i>PIK3CA</i> , <i>TP53</i> , <i>ERCC2</i> , <i>RHOB</i> , <i>ERBB2</i> , <i>HRAS</i> , <i>RXRA</i> , <i>ELF3</i> , <i>CDKN1A</i> , <i>KRAS</i> , <i>KDM6A</i> , <i>AKT1</i> , <i>FBXW7</i> , <i>ERBB3</i> , <i>SF3B1</i> , <i>CTNNB1</i> , <i>BRAF</i> , <i>C3orf70</i> , <i>CREBBP</i> , <i>CDKN2A</i> ve <i>NRAS</i>	Talep Edildi	Tamda; Sensitivite: %87.3 Spesifite: %84.8 Takipte; Sensitivite: %86.2 Spesifite: %62.5	Hayır	AUA: Hayır EUA: Hayır	591 (Tanı İçin); 293 (Takip İçin)
--------------------	------	-------	------------------	---	-----------------	--	-------	--------------------------	---

Son on yılda ticari olarak geliştirilmiş testlerin hedef biyobelirteçleri multipleks protein, mRNA ve DNA'ya dayalı assay'lere odaklanmıştır. Özellikle genomik biyobelirteçler, mesane tümörlerinin biyolojisine moleküler bir bakış açısı kazandırmakta ve biyobelirteçlerin gelecekteki uygulama sahasını tanı ve takibin ötesine taşımaktadır. Güncel durumda ise kodlamayan RNA'lar ve ekstraselüler veziküllerin (EV) üriner biyobelirteçlerin giderek gelişmekte olan bir araştırma alanını oluşturmaktadır (Maas ve ark. 2023). Mesane kanserinin tanı ve takibinde kullanılmak amacıyla üzerinde çalışılan ve idrardan tespit edilebilir biyobelirteçler Şekil 2-5'te özetlenmiştir (Maas ve ark. 2023).



Şekil 2-5: İdrar biyobelirteçlerinin şematik illüstrasyonu ((Maas ve ark. 2023)'den uyarlanmıştır).

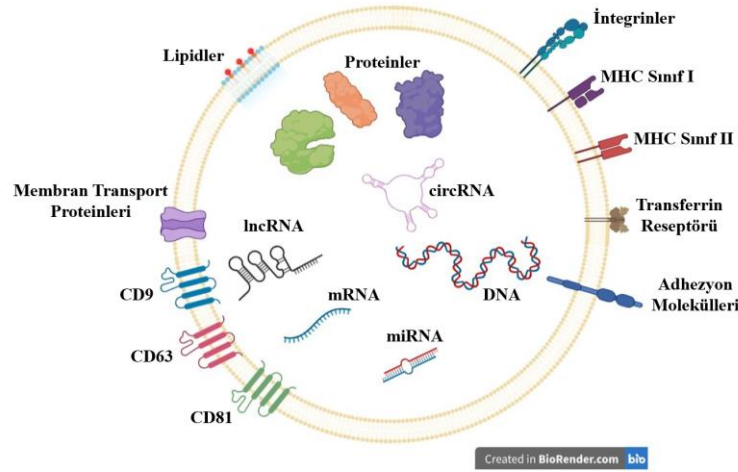
EV'ler; DNA, RNA, protein ve lipid gibi molekülleri taşıyabilen membranla çevrili heterojen vezikülleri tarif etmekte olup temel olarak boyutları itibarıyla; eksozomlar, mikroveziküller ve apoptotik cisimler olmak üzere 3 gruba ayrılmaktadırlar (Simeone ve ark. 2020). EV'ler; inflamasyon, hipoksi, oksidatif stres, yaşlanma, hücre ölümü, bakteriyel endo/ekzotoksinlere maruziyet, üremi vb. nedenlerle üretilebilmekte olup ihtiva ettikleri hücrel bileşikler hücreler arasında değiş tokuş ederek hücreler arası iletişim ve sinyalizasyona da katkıda bulunmaktadırlar (Simeone ve ark. 2020; Maas ve ark. 2023). Bunlara ek olarak literatürdeki çalışmalar EV'lerin anjiyogenezi, hücre invazyonunu, hücre migrasyonunu artırıp hücre proliferasyonunu da destekleyerek tümörogeneze katkıda bulunduğuna işaret etmektedir (Kalluri ve ark. 2016; Maas ve ark. 2023). EV'ler; kan, süt, BOS, tükürük ve idrar gibi fizyolojik sıvılarda bulunmakta olup özellikle idrarda da EV'lerin var olması onların MK'da kullanılabilecek üriner biyobelirteçler olarak değerlendirilebilmesi fikrini ortaya çıkarmıştır (Georgantzoglou ve ark. 2021). Liang ve arkadaşları idrardaki 30-200 nm boyut aralığındaki EV'leri izole eden, zenginleştiren ve daha sonra bir mikroçip ELISA ile EV'lerin konsantrasyonlarını ölçen mikroakışkan bir cihaz geliştirmişlerdir (Liang ve ark. 2017). Araştırmacılar 16 MK'lı vaka ve 8 sağlıklı kontrole ait idrar örneklerini kullanarak mikroakışkan cihaz yardımıyla EV izolasyonu ve konsantrasyon tayini yapmışlar ve MK'lı hastaların üriner EV konsantrasyonunun sağlıklı kontrollere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) düzeyde daha yüksek olduğunu ortaya koymuşlardır (Liang ve ark. 2017). Ayrıca araştırmacılar geliştirdikleri cihazın %81,3 sensitivite ve %90 spesifite ile MK'lı vakaları sağlıklı kontrollerden ayırabildiğini bildirmişlerdir (Liang ve ark. 2017). EV izolasyonu için altın standart yöntem ultrasantrifüj olmasına karşılık ultrasantrifüj kullanımı fazla zaman ve iş yükü gerektirmektedir. Bu noktada Liang ve arkadaşları geliştirdikleri bu mikroakışkan cihazın EV izolasyonunu kolaylaştırarak, bir POC test şeklinde idrar sitolojisi ve sistoskopiyle birlikte MK'nın tanı ve takibinde kullanılabileceğine işaret etmektedir (Liang ve ark. 2017). EV'lerin kendisi kadar ihtiva ettikleri moleküller de MK için önemli biyobelirteç adayı olma potansiyeline sahiptir. Tomiyama ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, 7 MK'lı hasta ve 4 sağlıklı kontrole ait idrar örneklerinden ultrasantrifüj ile EV izole edilmiş ve ayrıca; 7 MK'lı hastaya ait taze rezeke edilmiş tümör dokuları primer kültüre alınarak medyuma salınan doku kökenli EV'ler de ultrasantrifüj ile izole edilerek "TMT-labeling liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)" ile analiz edilmiştir

(Tomiya ve ark. 2021). Araştırmacılar LC-MS/MS analizi sonrasında MK'lı vakalara ait EV'lerde anlamlı düzeyde upregüle olan (Fold Change >2; p<0.01) proteinlerden 22 adet membran proteini seçerek 40 MK'lı vakaya (n=20 KİOMT; n=20 KİMT) ve 30 sağlıklı kontrole ait idrar örneklerinde “selected reaction monitoring/multiple reaction monitoring (SRM/MRM)” ile valide etmişler ve 6 EV proteininin “HSP90, SDC1, MARCKS, MARCKSL, TJP2 ve CD55” MK'lı hastalarda sağlıklı kontrollere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış gösterdiğini ortaya koymuşlardır (Tomiya ve ark. 2021). EV'ler kıymetli biyobelirteç adayları olmalarına karşılık literatüre bakıldığında MK üzerinde yapılan EV kökenli çalışmalarda, EV'lerde tanımlanan protein ve RNA moleküllerinin yüksek düzeyde heterojenite gösterdiği anlaşılmaktadır. Bu doğrultuda konuyla ilişkili olarak daha fazla sayıda çalışma yapmanın gerekliliği ortaya çıkmaktadır.

2.2. Üriner Eksozomlar ve Mesane Kanseri

2.2.1. EV'lerin/Eksozomların Mesane Tümörögenezindeki Roller

Bir EV türü olan eksozomlar, ekzositoz yoluyla salgılandıkları hücrenin fizyolojik yapısına bağlı olarak değişen çeşit ve düzeylerde bileşikler ihtiva eden “30-150 nm” boyutunda veziküller olup “CD9 ve CD63” gibi kendilerine özgü bir dizi yüzey marker'ına sahiptirler (Stickney ve ark. 2016; Mathieu ve ark. 2021) (Şekil 2-6). Eksozomların lipid bilayer membranları genel olarak içeriklerindeki bileşiklerin RNaz'lar, DNaz'lar ve proteazlardan korunmasını sağlamaktadır (Geng ve ark. 2021). Mesane kanseri özelinde düşündüğümüzde lipid bilayer membranları idrarda bol miktarda bulunan eksozomları idrarın yıkıcı asiditesine ve idrarda bulunan enzimlere karşı korumaktadır ki bu durum onların biyobelirteç olarak kullanılabilirliklerinde önemli bir avantaj sağlamaktadır (Lee ve ark. 2022).



Şekil 2-6: Bir eksozomun şematik illüstrasyonu (figür yazar tarafından BioRender’da oluşturulmuştur).

Eksozomlar proteomik ve genetik bilginin hedef hücreye iletilmesinde aktif rol almaktadırlar. Donör hücreden gelen eksozomların hedef hücrelerde değişiklik yaratabileceğine ve eksozomların tümör oluşumunda ve gelişiminde önemli roller üstelenebileceğine dair kanıtlar bulunmaktadır (Geng ve ark. 2021). Tümör kökenli eksozomların onkogenik molekülleri hücreler arasında transfer edebilmesinden kaynaklı olarak EMT, malign transformasyona, tümörögeneze, tümör progresyonuna, hücre proliferasyonuna, invazyona, anjiyogeneze, metastaza ve ilaç direncine etki ettikleri bildirilmiştir (Lee ve ark. 2022). Franzen ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada primer kültüre alınmış sağlıklı ürotelyal hücreler; MK hücre hatları olan “T24 ve UMUC-3”ün medyumlarından, MK’lı vakaların idrarlarından ve MK’lı vakaların mesane yıkama sıvılarından ultrasantrifüj ile izole edilen eksozomlar ile kültüre edilmiş ve sağlıklı ürotelyal hücrelerde EMT’nin indüklendiği görülmüştür (Franzen ve ark. 2015). Araştırmacılar MK kökenli eksozomların ürotelyal hücrelerde “ α -SMA, S100A4 ve SNAIL” gibi mezenkimal belirteçlerin anlatımını arttırdığını; “E-kaderin ve β -katenin” gibi epitelyal belirteçlerin anlatımını azalttığını ve hücre migrosyonu ve invazyonunu indüklediğini ortaya koymuşlardır (Franzen ve ark. 2015). Benzer bir çalışma Wu ve arkadaşları tarafından da yapılmış olup araştırmacılar nonkanseroz ürotelyal SV-HUC-1 hücrelerini; yüksek dereceli MK hücreleri olan “T24 ve TCC-SUP” hücre hatlarından elde ettikleri kanser kökenli eksozomlar ile uzun süreli olarak (8-13 hafta) ko-kültüre etmişler ve sağlıklı ürotelyal hücrelerde malign transformasyonun indüklendiğini

göstermişlerdir (Wu ve ark. 2019). Araştırmacılar malign transformasyona uğrayan SV-HUC-1 hücrelerinde sadece artmış genomik instabilite, artmış invazyon ve hücre-hücre kontakt inhibisyon kaybı gibi onkojenik özelliklikleri değil aynı zamanda sitoplazmik genişleme, mitokondri volümünde küçülme ve endoplazmik retikulumda (ER) yapısal bozukluk/unfolded protein response'un indüklenmesi gibi morfolojik ve yapısal değişikliklerin de ortaya çıktığını göstermişlerdir (Wu ve ark. 2019). Eksozomların içeriklerindeki kargoyu hedeflenen hücreye teslim edebilme özellikleri, onların birer ilaç taşıyıcı sistem olarak da kullanılabilmelerini gündeme getirmiştir. Henüz başlangıç seviyesinde olmakla birlikte eksozom aracılı ilaç salınımı düşük toksisiteye ve düşük immünojenliğe sahip olduğundan ve ayrıca eksozomların biyomühendislik uygulamaları ile manipüle edilmeye oldukça uygun olmalarından dolayı başta kanser olmak üzere çok çeşitli hastalıklara karşı hücresiz tedaviler için umut vaat etmektedir (Liang ve ark. 2021). Tang ve arkadaşları lokal ileri MK tedavisinde yaygın olarak tercih edilen kemoterapötiklerden bir tanesi olan gemitabinin eksozom temelli ilaç taşıyıcı sistemde uygulanmasının MK tedavisindeki etkinliğini ele almışlardır (Tang ve ark. 2022). Araştırmacılar, RAW264.7 fare mononükleer makrofajlarında M1 polarizasyonunu indükledikten sonra makrofajlardan salınan eksozomları ultrasantrifüj ile izole ederek ultrasonikasyon yöntemiyle bu eksozomlara gemitabin yüklemişler ve M1-Exo-GEM ilaç taşıyıcı sistemini oluşturarak MB49 fare MK hücre hattında bu ilaç taşıyıcı sistemin etkinliğini denemişlerdir (Tang ve ark. 2022). Çalışma neticesinde araştırmacılar M1-Exo-GEM'in tek başına verilen gemitabine kıyasla MB49 hücrelerinde istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) düzeyde daha fazla sitotoksik/apoptotik etki yarattığını göstermişlerdir (Tang ve ark. 2022). Araştırmacılar ayrıca M1-Exo-GEM'in etkinliğini *in vivo* olarak da göstermek için 5-6 haftalık dişi BalB/c farelerde MB49 hücreleriyle tümör-bearing fare modeli yaratarak tümör volümleri 50-100 mm³'e ulaştıktan sonra kuyruk veninden gemitabin ve M1-Exo-GEM enjekte edip tedavi etkinliğini incelemişlerdir (Tang ve ark. 2022). Çalışma neticesinde M1-Exo-GEM'in tek başına verilen gemitabine kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) düzeyde tümör büyümesini daha fazla inhibe ettiğini, tümör hücrelerinde daha fazla histopatolojik hasara yol açtığını ve dokudaki inflamatuvar sitokinlerin seviyesini daha fazla arttırdığını ortaya koymuşlardır (Tang ve ark. 2022). Eksozomların tümör supressör molekülleri taşıyarak tümörögenezi ve tümör progresyonunu baskılaması/geciktirmesi de söz konusudur. Farklı bir konsept de miRNA'ları hücreler

arası iletişime aracılık etmek, kanser hücrelerinin proliferasyonunu, metastazını ve apoptozunu etkilemek için eksozomlar içinde paketlenerek hücrelere hedeflemektir (Geng ve ark. 2021). Stoorvogel ve arkadaşlarının ortaya koyduğu “exosomal shuttling of miRNAs” hipotezi, hücrelerin farklı miRNA setleri içeren eksozomları salgılayarak bunları hedef hücrelere transfer ettiğini ve bu miRNA’ların ise hedef hücrelerdeki mRNA’ları baskılayabildiğini ifade etmektedir (Stoorvogel ve ark. 2012). Literatürdeki pek çok çalışma da bu hipotezi doğrulayacak bulgular bildirmiştir. Li ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada eksozomal miRNA-375-3p’nin “Wnt/ β -katenin” yolağı üzerinden MK’yı baskılayabildiği bildirilmiştir (Li ve ark. 2020). Araştırmacılar miRNA-375-3p’nin MK’da doku ve eksozom seviyesinde downregüle olduğunu ve *FZD8* geninin doğrudan miRNA-375-3p’nin transkripsiyonel hedefinde olduğunu ifade ederek miRNA-375-3p’nin aşırı ifadesinin T24 MK hücre hattında hücre proliferasyonu ve migrasyonunu inhibe edip apoptozu indüklediğini göstermişlerdir (Li ve ark. 2020). Buna ek olarak araştırmacılar, miRNA-375-3p’nin *FZD8* anlatımını doğrudan inhibe ederek “Wnt/ β -katenin” yolağını ve bu yolağın downstream molekülleri olan “siklin D1 ve c-myc”i de bloke edip “kaspaz 1 ve kaspaz 3” anlatımını arttırmak suretiyle apoptozu indüklediğini kanıtlamışlardır (Li ve ark., 2020). Araştırmacılar ayrıca 6 haftalık BALB/c nude farelerde miRNA-375-3p agomiri transfekte edilmiş T24 hücreleri ile tümör-bearing fare modeli yaratıp negatif kontrol grubuna kıyasla tümör gelişiminin nasıl olacağını değerlendirmişler ve çalışma neticesinde miRNA-375-3p agomiri transfekte edilmiş T24 hücreleri ile gelişen tümörlerin negatif kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha küçük boyuta ($p=0.012$) ve daha düşük ağırlığa ($p=0.022$) sahip olduğunu göstermişlerdir (Li ve ark. 2020). Cai ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada TCGA database’inden elde edilen 135 MK vakasına ait bilgilerden hareketle miRNA-133b anlatımının MK’da azaldığını ve bu azalışın kısalmış sürvi ile korele olduğu bildirilmiştir (Cai ve ark. 2020). Araştırmacılar bu bilgiden hareketle 11 MK’lı vakaya ait tümör dokusu ve tümöre komşu sağlıklı mesane dokusundan ve 20 MK’lı vakaya ait serum örneği ile 20 sağlıklı kontrole ait serum örneğinden izole edilmiş eksozomlarda miRNA-133b düzeyini qRT-PCR ile kantite etmişler ve MK’lı örneklerde istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) düzeyde azaldığını göstermişlerdir (Cai ve ark. 2020). Daha sonra araştırmacılar miRNA-133b agomiri transfekte edilmiş “T24 ve 5637” MK hücrelerinden eksozom izole ederek yüksek miRNA-133b içeriğine sahip eksozomları, miRNA-133b agomiri transfekte edilmemiş “T24 ve 5637” MK hücreleri

ile ko-kültüre ederek hücrelerde canlılığın azaldığını ve apoptozun indüklendiğini göstermişlerdir (Cai ve ark. 2020). Buna ek olarak araştırmacılar miRNA-133b'nin MK hücrelerindeki etkisini *in vivo* olarak da göstermek için 5 haftalık nude farelerde subkutanöz T24 hücresi enjeksiyonu ile ksenograft fare modeli yaratarak farelerdeki tümör boyutları 50 mm³'e ulaştıktan sonra fare gruplarının tümörlerine 3 günde bir doğrudan miRNA-133b agomirinin kendisini/negatif kontrol agomiri enjekte etmişler ya da 2 günde bir miRNA-133b agomiri/negatif kontrol agomiri transfekte edilmiş T24 ve 5637 hücrelerinden elde edilen eksozomları (10 µg) enjekte etmişlerdir (Cai ve ark. 2020). Çalışma neticesinde eksozomal miRNA-133b ve miRNA-133b agomiri enjekte edilmiş farelerin tümör volümlerinin ve tümör ağırlıklarının negatif kontrollere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) düzeyde daha düşük olduğu ortaya koyulmuştur (Cai ve ark. 2020). Buna ek olarak araştırmacılar miRNA-133b'nin *DUSP1* anlatımını upregüle ettiğini *in vivo* ve *in vitro* olarak göstermişler ve miRNA-133b'nin MK üzerindeki proliferasyonu inhibe edici etkisinin *DUSP1* ile ilişkili olabileceğini belirtmişlerdir (Cai ve ark. 2020). Farklı hücre türlerinden sekrete edilen eksozomların da MK gelişimi ve progresyonu üzerinde etkili olabileceğine işaret edilmektedir (Geng ve ark. 2021). Cai ve arkadaşları kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerden (bone marrow-derived mesenchymal stem cells, BMSC) üretilen eksozomların endojen molekülleri taşıyarak MK progresyonunda rol aldıklarının bildirildiğine dikkat çekerek BMSC'lerden üretilen ve miRNA-9-3p içeren eksozomların MK üzerindeki etkilerini ele almışlardır (Cai ve ark. 2019). Araştırmacılar öncelikle "GSE7476 ve GSE37815" MK ilişkili gen anlatımı veri setlerinden elde ettikleri 7 aday geni 30 MK'lı vakaya ait tümör dokusu ve tümöre komşu sağlıklı mesane dokusunda qRT-PCR ile kantite ederek *ESM1*'in istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) düzeyde mesane tümör dokularında artış gösterdiğini ortaya koymuşlardır (Cai ve ark. 2019). Sonraki aşamada araştırmacılar "mirDB, miRDiP ve TargetScan" veri tabanlarını kullanarak *ESM1*'in transkripsiyonel hedefinde olan 24 miRNA'yı belirleyerek bunlar arasında eksozomlarda enkapsüle edilen miRNA-9-3p'yi çalışmalarına dahil etmişlerdir (Cai ve ark. 2019). Daha sonra araştırmacılar "UMUC-3, BIU-87, EJ, T24 ve 5637" MK hücre hatlarında miRNA-9-3p'nin anlatımını qRT-PCR ile kantite ederek UMUC-3'ün istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) düzeyde en düşük miRNA-9-3p anlatımına sahip olduğunu göstermişler ve çalışmalarına bu hücre hattı ile devam etmişlerdir (Cai ve ark., 2019). Araştırmacılar BMSC'ler ile ko-kültüre alınan UMUC-3 hücrelerinde BMSC kökenli eksozomların

UMUC-3 hücreleri tarafından alındığını kanıtlayarak UMUC-3 hücrelerinde istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) düzeyde canlılığın, invazyonun ve migrasyonun azalıp apoptozun arttığını ortaya koymuşlardır (Cai ve ark. 2019). Sonraki aşamada araştırmacılar BMSC'lerde miRNA-9-3p'nin aşırı anlatımını sağlayıp hücrelerden salınan miRNA-9-3p yüklü eksozomları toplayarak MK hücre hatlarını bu eksozomlar ile kültüre etmişler ve istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) düzeyde canlılığın, invazyonun ve migrasyonun azalıp apoptozun arttığını ortaya koymuşlardır (Cai ve ark. 2019). Bunun dışında araştırmacılar 4-6 haftalık dişi BALB/c nude farelerde ksenograft tümör modeli yaratarak BMSC kökenli miRNA-9-3p yüklü eksozom enjeksiyonunun tümör büyümesini, tümör volümünü ve tümör ağırlığını istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) düzeyde azalttığını kanıtlamışlardır (Cai ve ark. 2019). Buna ek olarak araştırmacılar miRNA-9-3p'nin *ESM1* anlatımını downregüle ettiğini *in vivo* ve *in vitro* olarak göstermişler ve miRNA-9-3p'nin MK üzerindeki proliferasyonu inhibe edici etkisinin *ESM1* üzerinden gerçekleşiyor olabileceğine dikkat çekmişlerdir (Cai ve ark. 2019). Gelineen noktada, eksozomların hücreler arasında çeşitli moleküllerin transferini sağlayarak MK'nın progresyonu, invazyonu ve metastazı üzerinde etkin rol oynayabileceği anlaşılmaktadır. Bilindiği gibi lenf nodu metastazı MK'lı hastalarda kötü prognoz göstergesidir. Daha önceki çalışmalar MK'lı vakalarda tümör hücrelerinden (He ve ark. 2018) ve "Tümör-Associated Makrofajlardan (TAM)" (Chen ve ark. 2018) üretilen VEGF-C'nin lenfanjiogenez ve lenf nodu metastazında önemli olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte Chen ve arkadaşları lenf nodu metastazı olan tüm MK'lı vakaların yaklaşık %20'sinde düşük VEGF-C seviyesi olduğunu belirterek MK'lı vakaların lenf nodu metastazında VEGF-C bağımsız bir mekanizma olabileceğini düşünüp eksozomal lncRNA *LNMT2*'nin MK'da lenf nodu metastazına olan etkisini araştırmışlardır (Chen ve ark. 2020). Araştırmacılar *LNMT2*'nin insan lenfatik endotel hücreleri olan HLEC'de tüp formasyonunu ve hücre migrasyonunu stimüle ettiğini *in vitro* olarak; tümör lenfanjiyogenezini ve lenf nodu metastazını arttırdığını da *in vivo* olarak göstermişlerdir (Chen ve ark. 2020). Daha sonraki aşamada araştırmacılar mekanistik olarak "hnRNPA2B1" ile etkileşime soktukları *LNMT2*'yi kültüre edilmiş MK hücre hatlarından elde ettikleri eksozomlara yükleyerek bu eksozomları HLEC hücrelerine hedeflemişlerdir (Chen ve ark. 2020). Bu assay neticesinde *LNMT2* ve hnRNPA2B1 varlığında *PROX1*'in promotöründeki H3K4'ün trimetillenerek *PROX1* anlatımının epigenetik yolla upregüle edildiği ve bunun da lenfanjiyogenez ve lenf nodu

metastazı ile sonuçlandığı gösterilmiştir (Chen ve ark. 2020). İntratümöral hipoksi, tümörlerin hızla ekspanse olmasını engelleyen bir mikroçevre yaratmaktadır. Buna karşılık kanser hücreleri sağkalımı ve büyümeyi sürdürerek invazyon ve metastaza ilerleyebilmek için tümör mikroçevresini yeniden şekillendirme eğilimindedirler. Xue ve arkadaşları solid tümör hücrelerinin hipoksik mikroçevrenin üstesinden gelebilmek için tümör progresyonu ve metastazını kolaylaştırmayı hedefleyen ncRNA'lar içeren eksozomların sekresyonunu arttırdığını belirterek; MK hücre hatlarından elde edilip bir lncRNA olan UCA1 ile zenginleştirilmiş eksozomların hipoksik ortamda tümör proliferasyonu ve progresyonunu etkileyip etkilemediğini *in vitro* ve *in vivo* olarak araştırmışlardır (Xue ve ark. 2017). Araştırmacılar UCA1 anlatımının yüksek olduğu 5637 MK hücrelerini normoksik ve hipoksik ortamda kültüre ederek hücrelerden eksozom izolasyonu yapmışlar ve hipoksik ortamda kültüre edilen 5637 hücrelerine ait eksozomlarda UCA1 anlatımının daha yüksek olduğunu göstermişlerdir (Xue ve ark. 2017). Daha sonra ise araştırmacılar, hipoksik ortamda kültüre edilen 5637 hücrelerinden elde edilen eksozomlar ile düşük UCA1 anlatımına sahip UMUC-2 MK hücrelerini ko-kültüre etmişler ve hücre proliferasyonunun, hücre migrasyonunun ve hücre invazyonunun indüklendiğini görmüşlerdir (Xue ve ark. 2017). Araştırmacılar ayrıca 5 haftalık dişi atimik nude farelerde 5637 MK hücrelerini kullanarak ksenograft tümör modeli yaratmışlar ve tümör dokusunun merkezine hipoksik eksozomları 10 µg olacak şekilde enjekte ederek 3 hafta sonunda fareleri sakrifiye edip tümör dokularını rezeke etmişler ve tümör dokuları ile lenf nodlarını histopatolojik olarak incelemişlerdir (Xue ve ark. 2017). Bu assay sonuçları yüksek UCA1'e sahip hipoksik eksozomların *in vivo* olarak da EMT yoluyla tümör büyümesi ve progresyonunu indüklediğini göstermiştir (Xue ve ark. 2017). Araştırmacılar ayrıca 30 MK'lı vaka ve 30 sağlıklı kontrole ait serum örneklerinden eksozom izole ederek eksozomal lncRNA UCA1 seviyesini RT-PCR ile analiz etmişler ve MK'lı vakalarda istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) düzeyde daha yüksek olduğunu görmüşlerdir (Xue ve ark. 2017). Yeni bir ncRNA türü olan sirküler RNA'ların MK ile ilişkisini ele alan çalışmaların sayısı artmaktadır. Chen ve arkadaşları, MK'lı vakalara ait tümör dokusu ve tümöre komşu sağlıklı mesane dokusu örneklerinden sirküler RNA profilini mikroyarray kullanarak analiz etmişler ve 37 sirküler RNA'nın MK'da istatistiksel olarak anlamlı düzeyde (" $\log_2$ (fold changes) ≥ 1 , $p < 0.05$ ve FDR < 0.05 ") upregüle olduğunu, 43 sirküler RNA'nın ise downregüle olduğunu ortaya koymuşlardır (Chen ve ark. 2018).

Araştırmacılar tüm sirküler RNA'lar içerisinde “circPRMT5”'in mesane tümör dokularında yaklaşık 6 kat artış göstererek en fazla upregüle olan sirküler RNA olduğunu belirtmişler ve “circPRMT5”'i ayrıca 119 mesane tümör dokusu ve eşlenik sağlıklı mesane tümör dokusunda qRT-PCR ile kantite ederek valide etmişlerdir (Chen ve ark. 2018). Bu assay neticesinde “circPRMT5”'in kontrole kıyasla mesane tümör dokularında istatistiksel olarak yüksek anlamlılık ($p < 0.0001$) düzeyinde artış gösterdiği ortaya koyulmuştur (Chen ve ark. 2018). Araştırmacılar ayrıca 71 MK'lı vaka ve 36 sağlıklı kontrole ait serum örneklerinden ve 18 MK'lı vaka ve 14 sağlıklı kontrole ait idrar örneklerinden eksozom izolasyonu yaparak eksozomal “circPRMT5” anlatımını qRT-PCR ile kantite etmişler ve MK'lı vakalara ait serum ve idrar eksozomlarındaki “circPRMT5” anlatımının istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek olduğunu ve bu anlatımın “circPRMT5”'e bağlanabilen miRNA-30c ile ters korelasyon gösterdiğini ortaya koymuşlardır (sırasıyla $p = 0.006$; $p = 0.0378$) (Chen ve ark. 2018). Araştırmacılar ayrıca artmış “circPRMT5” düzeyinin azalmış sağkalım, ileri tümör evresi ve lenf nodu metastazı ile korelasyon gösterdiğini bildirmişlerdir (Chen ve ark. 2018). Bunlara ilaveten araştırmacılar “T24, TCC-SUP, 5637 ve UMUC-3” MK hücre hatları ile nonkanseroz ürotelyal SV-HUC-1 hücre hattını kullanarak yaptıkları assaylerde “circPRMT5”'in miRNA-30c için “sponging” aktivitesi göstererek MK'da EMT'yi indüklediğini göstermişler ve TCGA'dan elde ettikleri 2 farklı MK kohortundan hareketle yaptıkları biyoinformatik analizde “circPRMT5/miRNA-30c/SNAIL1/E-kaderin” yolağının MK'da progresyonu indükleyebileceğini ortaya koymuşlardır (Chen ve ark. 2018). Tüm bu araştırmalar birlikte değerlendirildiğinde eksozomların MK progresyonu, invazyonu ve metastazı üzerinde aktif rol oynayabileceği görülmektedir. Konuyla ilişkili yapılacak çalışmaların sayısının artması yeni terapötik hedefler ve tedavi seçeneklerinin gelişmesi konusunda önemli katkılar sunma potansiyeline sahiptir.

2.2.2. Mesane Kanseri Üriner EV/Eksozom Temelli Çalışmalar

Sunulan çalışma kapsamında PubMed üzerinde “(urine exosomes OR urine extracellular vesicles OR urinary exosomes OR urinary extracellular vesicles) AND (bladder cancer OR bladder neoplasm OR urinary bladder cancer OR urinary bladder neoplasm OR urothelial carcinoma)” MeSH term'leri ile 30.06.2023 tarihi itibarıyla arama yapılmış ve toplamda 215 çalışma ile karşılaşılmıştır. Bunlar içerisinde geniş örneklem sayısında MK'lı vakalara ait idrar EV'lerini/eksozomlarını kullanarak

biyobelirteç keşfi yapan araştırma makaleleri filtrelenmiş 28 adet çalışma olduğu görülmüş ve ilgili çalışmalar burada derlenmiştir. Literatüre bakıldığında çok az sayıda çalışmanın EV/eksozom DNA'sını ele aldığı görülmektedir. Eksozomlar çift zincirli DNA fragmentleri de içermektedir ve vücut sıvılarında sirküle halde bulunan eksozomlara ait DNA fragmentlerindeki genomik alterasyonların analiz edilmesi kanser tedavisinde yeni bir likit biyopsi yaklaşımı olarak kabul görmektedir (Lee ve ark. 2018). Lee ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada mesane tümörlerindeki genetik alterasyonların idrardaki cfDNA ve eksozomal DNA örneklerine ne derece yansıdığı ve üriner eksozomların içerdiği DNA örneklerine ait CNV ve somatik mutasyonların MK'da likit biyopsi olarak kullanılabilirliği araştırılmıştır (Lee ve ark. 2018). Çalışma kapsamında araştırmacılar, 9 MK'lı vakaya ait tümör dokularından tümör DNA'sı ve eşlenik idrar örneklerinden cfDNA ve eksozomal DNA elde ederek (kontrol olarak ise eşlenik periferik kan DNA'sı) MK'da yaygın şekilde mutasyona uğrayan 9 geni "deep sequencing" ile; CNV'leri ise WGS ile analiz etmişlerdir (Lee ve ark. 2018). Araştırmacılar cfDNA fragmentlerinin eksozomal DNA fragmentlerine göre daha kısa olduğunu belirterek DNA analizi için eksozomal DNA fragmentlerinin daha uygun olabileceğine işaret etmişlerdir (Lee ve ark. 2018). Çalışma neticesinde 9 MK'lı vakanın 6'sında "*TP53*, *FGFR3*, *RB1*, *HRAS*, *KDM6A*, *KMT2D* ve *ARID1A*" genlerinde 17 somatik mutasyon tespit edilmiştir (Lee ve ark. 2018). Somatik mutasyonlardan 14 tanesi cfDNA örneklerinde (allel frekansı: %56,2), 12 tanesi ise eksozomal DNA örneklerinde (allel frekansı: %65,6) tanımlanmıştır (Lee ve ark. 2018). İlaveten WGS ile yapılan CNV analizi okuma derinliği 0.6X iken bile tümör dokularında MK'da en fazla alterasyona uğradığı bilinen "*MDM2*, *ERBB2*, *CCND1* ve *CCNE1*" genlerinin amplifikasyona uğradığını ve "*CDKN2A*, *PTEN* ve *RB1*" genlerinin ise delesyona uğradığını göstermiştir (Lee ve ark. 2018). Bununla birlikte cfDNA ve eksozomal DNA örneklerine ait CNV plotları tümör örnekleri ile benzerlik göstermiştir (Lee ve ark. 2018). Çalışma neticesinde araştırmacılar cfDNA ve eksozomal DNA örneklerinin başarılı şekilde tümöre ait somatik mutasyon ve CNV yükünü yansıtabildiğini belirterek üriner eksozomların MK için uygun bir likit biyopsi kaynağı olduğunu ifade etmişlerdir (Lee ve ark. 2018). Zhou ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise 6 MK'lı vakaya ait tümör dokularından tümör DNA'sı ve eşlenik idrar ve serum örneklerinden eksozomal DNA elde edilerek (kontrol olarak ise eşlenik periferik kan mononükleer hücrelerine (PKMH) ait DNA) WES analizi yapılmıştır (Zhou ve ark. 2021). Araştırmacılar WES

analizi neticesinde TCGA database’indeki verileri baz alarak MK’da yaygın olarak alterasyona uğrayan genleri ayrıca filtreleyip kendi WES sonuçlarında ele almışlar ve idrar eksozomlarından elde ettikleri DNA örneklerinden yaptıkları WES analizinin sonuçlarına göre “*RXRA*, *TP53* ve *FGFR3*” genlerinin ağırlıklı olarak özellikle miRNA’ların bağlanma bölgeleri olan 3’-UTR bölgelerinde (6 adet) ve daha az ise ekzonik bölgelerde (3 adet) somatik mutasyon tespit etmişlerdir (Zhou ve ark. 2021). Buna ek olarak araştırmacılar idrar ve serum eksozomal DNA örneklerinde tespit ettikleri somatik varyantları özel biyoinformatik pipeline’lar ile karşılaştırmalı şekilde analiz ettiklerinde MK ile ilişkili genlere ait çok sayıdaki driver varyantın ve somatik mutasyonun idrardan elde edilen eksozomal DNA’da temsil edildiğini ve hedef varyantları tümör DNA’sında sanger sekanslama ile valide edebildiklerini ifade etmişlerdir (Zhou ve ark. 2021). İlginç şekilde araştırmacılar MK ilişkili driver genlerde tespit ettikleri bazı somatik varyantların idrar eksozomlarından elde ettikleri DNA örneklerine özgü olduğunu ve tümör dokularında valide edemediklerini belirterek bu durumun muhtemel sebebinin mesane tümör dokularının intratümöral heterojenitesi göz önüne alındığında rastgele örneklenmiş küçük biyopsi parçalarında ilgili somatik varyasyonların temsil edilmemiş olabileceği şeklinde yorumlamışlardır (Zhou ve ark. 2021). Bunlara ek olarak araştırmacılar çalışmalarının WES analizi kısmına sağlıklı kontrollere ait idrar eksozomlarından elde ettikleri DNA örneklerini dahil etmeseler de normalizasyon yaptıktan sonra MK’lı hastalara ait idrar eksozomlarından elde ettikleri DNA miktarı ile sağlıklı kontrollerinkini karşılaştırmışlar ve MK’lı hastalara ait idrar eksozomlarının istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.01$) düzeyde daha yüksek miktarda dsDNA fragmenti içerdiğini bildirmişlerdir (Zhou ve ark. 2021). Sonuç olarak daha geniş kohortların kullanıldığı başka çalışmalara da gereksinim duyulsa da idrar eksozomlarının ve eksozomal DNA’nın MK için önemli bir noninvaziv biyobelirteç ve likit biyopsi hedefi olma potansiyeli taşıdığı söylenebilir. Abbastabar ve arkadaşları 30 MK’lı vaka ve 10 sağlıklı kontrole ait idrar örneklerini kullanarak yaptıkları çalışmalarında idrar eksozomlarındaki “*PVT-1*, *ANRIL* ve *PCAT-1*” lncRNA anlatımlarını qRT-PCR ile kantite ederek MK evrelerini ayırabilecek birer biyobelirteç olarak kullanılıp kullanılamayacaklarını ele almışlardır (Abbastabar ve ark. 2020). Çalışma neticesinde araştırmacılar “*ANRIL* ve *PCAT-1*” anlatımının MK’lı vakaların idrar eksozomlarında kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) düzeyde daha yüksek olduğunu fakat *PVT-1* anlatımının MK’lı vakalara ait idrar eksozomlarında

tespit edilemediğini ortaya koymuşlardır (Abbastabar ve ark. 2020). Buna ek olarak araştırmacılar ANRIL'in %46,67 sensitivite ve %87,5 spesifite ile (AUC: 0.7229) MK'lı vakaları kontrolden ayırabildiği; PCAT-1'in ise %43,33 sensitivite ve %87,5 spesifite ile (AUC: 0.7292) MK'lı vakaları sağlıklı kontrolden ayırabildiğini belirterek idrar lncRNA'larının MK için birer biyobelirteç olarak kullanılabileceğine işaret etmişlerdir (Abbastabar ve ark. 2020). Amuran ve arkadaşlarının 59 MK'lı vakaya, 12 rekürrens göstermemiş takipli MK vakasına ve 34 sağlıklı kontrole ait idrar örneklerini kullanarak yaptıkları çalışmada idrar eksozomlarındaki "miRNA-19b1-5p, miRNA-21-5p, miRNA-136-3p, miRNA-139-5p ve miRNA-210-3p" anlatımları ile idrar kreatinine göre normalize edilmiş idrar "BLCA-4, NMP22, APE1/Ref1, CRK ve VIM" protein seviyelerini araştırılmıştır (Amuran ve ark. 2019). Çalışma neticesinde araştırmacılar idrar eksozomlarındaki "miRNA-19b1-5p, miRNA-136-3p ve miRNA-139-5p" anlatımları ile kreatinine göre normalize edilmiş idrar "APE1/Ref1, BLCA-4 ve CRK" protein düzeyinden oluşan panelin %80 sensitivite ve %88 spesifite ile (AUC: 0.899) MK'lı vakaları sağlıklı kontrolden ayırabildiğini belirterek önerdikleri panelin MK için biyobelirteç olarak kullanılabileceğine işaret etmektedirler (Amuran ve ark. 2019). Andreu ve arkadaşları 34 MK'lı vaka ve 9 sigara içicisi olmayan sağlıklı kontrolün idrar örneklerini kullanarak idrar EV'lerinin miRNA profilini 851 insan miRNA'sına karşı probe içeren mikroarray platformu ile; idrar EV'lerinin proteom profilini ise in-gel digestion'ı takiben RP-LC-MS/MS ile analiz etmişlerdir (Andreu ve ark. 2017). Çalışma neticesinde yüksek dereceli MK vakalarına ait idrar EV'lerinde 23 miRNA'nın downregüle olduğu, 3 miRNA'nın ise upregüle olduğu; RT-qPCR validasyonu sonrasında miRNA-375'in yüksek dereceli MK için, miRNA-146a'nın ise düşük dereceli MK için biyobelirteç olabileceği bildirilmiştir (Andreu ve ark. 2017). Araştırmacılar ayrıca proteomik analizler neticesinde EV kökenli proteinlerden "Filamin-A ve Apolipoprotein"lerin biyobelirteç olma potansiyeline odaklanmışlar ve bunlar içerisinde ise Apolipoprotein B'nin MK'da kullanılabilecek EV kökenli bir biyobelirteç olabileceğini göstermişlerdir (Andreu ve ark. 2017). Armstrong ve arkadaşları miRNA'ların potansiyel kanser biyobelirteçleri olarak yüksek potansiyele sahip olduklarını ancak literatürdeki çalışmaların miRNA anlatımlarını ilgili kanser türü için tüm eşlenik biyolojik örnekleri dahil ederek ele alma noktasında sınırlı kaldığını belirterek 16 MK'lı vakaya ait FFPE olan tümör dokularındaki, plazma örneklerindeki/plazma eksozomlarındaki, cell free idrardaki/idrar eksozomlarındaki ve

11 MK'lı vakaya ait WBC'lerdeki miRNA anlatımını "Nanostring miRNA assays" ile analiz etmişler ve bulgularını ddPCR ile valide etmişlerdir (Armstrong ve ark. 2015). Çalışma neticesinde 7 miRNA'nın ("miRNA-4454, miRNA-720, miRNA-205-5p, miRNA-200c-3p, miRNA-21-5p, miRNA-200b-3p ve miRNA-29b-3p") idrar eksozomları ve tümör dokularında ortak şekilde aşırı ifade edildiği; 8 miRNA'nın ("miRNA-548ai, miRNA-548aa, miRNA-223, miRNA-338-3p, miRNA-378e, miRNA-4455, miRNA-548n ve miRNA-1290") idrar eksozomları ve plazmada ortak şekilde aşırı ifade edildiği; 9 miRNA'nın ("let-7g-5p, miRNA-15b-5p, miRNA-126-3p, miRNA-4454, miRNA-93-5p, miRNA-150-5p, miRNA-26a-5p, miRNA-21-5p ve miRNA-191-5p") tümör dokularında ve WBC'lerde ortak şekilde aşırı ifade edildiği; 2 miRNA'nın ise ("miRNA-21 ve miRNA-4454") idrar eksozomlarında, tümör dokularında ve WBC'lerde ortak şekilde aşırı ifade edildiği bildirilmiştir (Armstrong ve ark. 2015). Araştırmacılar eşlenik örneklerden hareketle mesane tümörlerinde upregüle olan miRNA'ların profiline baktıklarında aynı miRNA'ların hastalara ait idrar eksozomlarında ve WBC'lerinde temsil edildiğini ancak kan plazmasında belirlenemediğini ortaya koymuşlar ve idrarın/idrar eksozomlarının biyobelirteç olarak kullanılmaya daha uygun olduğuna işaret etmişlerdir (Armstrong ve ark. 2015). Baumgart ve arkadaşları tümör dokularından ve idrar EV'lerinden hareketle KİOMT ile KİMT'leri ayırabilecek bir miRNA paneli tanımlamayı hedefledikleri çalışmaları kapsamında MK'lı 66 vakaya ait FFPE primer tümör dokusu ve 37 vakaya ait idrar örneklerini kullanmışlar ve tümör dokularından 24 tanesi ile yaptıkları mikroarray analizi neticesinde 63 miRNA'nın istatistiksel olarak anlamlı düzeyde KİOMT ile KİMT dokuları arasında farklılık gösterdiğini bildirmişlerdir (Baumgart ve ark. 2019). Sonraki aşamada araştırmacılar bu miRNA'lar arasında seçtikleri 5 tanesini ("miRNA-146b-5p, miRNA-155-5p, miRNA-138-5p, miRNA-144-5p ve miRNA-200a-3p") 56 FFPE olan primer tümör dokusunda ve 37 idrar EV'lerinden qRT-PCR ile valide etmişlerdir (Baumgart ve ark. 2019). Bu analiz neticesinde "miRNA-146b-5p ve miRNA-155-5p"nin EV'lerdeki anlatımının istatistiksel olarak anlamlı düzeyde (sırasıyla $p=0.004$ ve $p=0.036$) KİMT'lerde daha yüksek olduğunu gösterilmiştir (Baumgart ve ark. 2019). Ayrıca 5 miRNA'dan 4 tanesinin ("miRNA-146b-5p, miRNA-155-5p, miRNA-138-5p ve miRNA-200a-3p") yüksek dereceli tümör evresi ile ilişkili olduğu ifade edilmiştir (Baumgart ve ark. 2019). Araştırmacılar MK'nın invaziv potansiyelinin tek başına idrar EV'lerinin miRNA profiline dayalı olarak tanımlanıp

tanımlanamayacağı hakkında kesin bilgilere erişmek için geniş kohortlarda yapılacak daha fazla sayıda çalışmaya ihtiyaç olduğunu vurgulamaktadırlar (Baumgart ve ark. 2019). Bian ve arkadaşları sistoskopinin invaziv olmasına ve maliyet etkin olmayışına vurgu yaparak idrar eksozomlarında anlatımı olan lncRNA'lardan oluşturulacak bir panelin MK tanısında kullanılabileceğini belirtmiş ve 100 MK'lı vaka ile 100 sağlıklı kontrolün idrar örneklerini çalışmalarına dahil ederek idrar eksozomlarının lncRNA profilini araştırmışlardır (Bian ve ark. 2022). Araştırmacılar 7 MK'lı vaka ve 7 sağlıklı kontrolün idrar eksozomlarını kullanarak RNA dizileme yapmışlar ve MK'da 240 lncRNA'nın upregüle, 275 lncRNA'nın downregüle olduğunu göstermişlerdir (Bian ve ark. 2022). Daha sonraki aşamada bu lncRNA'lar arasından seçtikleri 4 tanesini; "MKLN1-AS, TALAM1, TTN-AS1 ve UCA1" geriye kalan kohortta RT-PCR ile kantite etmişler ve bu idrar eksozomu kökenli lncRNA'ların anlatımının MK'da sağlıklı kontrollere kıyasla daha yüksek olduğunu kanıtlamışlardır (Bian ve ark. 2022). Araştırmacılar ayrıca idrar örneklerinden NPM22 testi de çalışarak 4 lncRNA'dan oluşan panellerinin NMP22 testi ile kombinlendiğinde MK'yı sağlıklı kontrollerden daha yüksek performansta ayırabildiğini (AUC: 0.850) ortaya koymuşlar ve idrar eksozomlarından yapılacak lncRNA temelli profillemenin MK için diyagnostik öneme sahip olduğunu belirtmişlerdir (Bian ve ark. 2022). Chen ve arkadaşları idrar eksozomlarının lncRNA profilinin MK için diyagnostik ve prognostik biyobelirteç olabileceğini öne sürerek 4 MK'lı vaka ve 3 sağlıklı kontrole ait idrar örneklerinden elde ettikleri eksozomların RNA profilini RNA dizileme yöntemiyle analiz ederek 103 lncRNA'nın MK'da upregüle olduğunu ve 3 lncRNA'nın ise downregüle olduğunu ortaya koymuşlardır (Chen ve ark. 2022). Daha sonra araştırmacılar MK'da upregüle olan ve literatürde daha önce tümör progresyonuyla da ilişkili olduğu bilinen lncRNA'lardan TERC'i seçerek 94 sağlıklı kontrolün, 46 benign ürolojik lezyona sahip vakanın ve 128 MK'lı vakanın idrar eksozomlarındaki anlatımını RT-qPCR ile kantite edip MK'da istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.0001$) düzeyde daha yüksek olduğunu ortaya koymuşlardır (Chen ve ark. 2022). Buna karşılık ilginç şekilde araştırmacılar 39 MK'lı vakaya ait tümör dokusu ve eşlenik 23 sağlıklı mesane dokusunu kullanarak yaptıkları RT-qPCR kantitasyonunda, TERC anlatımı açısından anlamlı bir fark olmadığını bildirmişlerdir (Chen ve ark. 2022). Çalışma kapsamında ayrıca araştırmacılar idrar örneklerinden NMP22 ve idrar sitolojisi de çalışmışlar ve idrar eksozomlarındaki TERC anlatımının diyagnostik performansının daha yüksek olduğunu

kanıtlamışlardır (Chen ve ark. 2022). El-Shal ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 51 MK'lı vaka, 21 benign ürolojik rahatsızlığı bulunan vaka ve 28 sağlıklı kontrolden TUR-MT öncesinde ve 4 hafta sonrasında idrar örnekleri alınarak idrar eksozomlarındaki “miRNA-96-5p ve miRNA-183-5p” düzeyleri qRT-PCR ile kantite edilmiştir (El-Shal ve ark. 2021). Çalışma neticesinde araştırmacılar hem miRNA-96-5p'nin hem de miRNA-183-5p'nin istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.001$) düzeyde MK'da daha yüksek olduğunu ortaya koymuşlardır (El-Shal ve ark. 2021). Buna ek olarak araştırmacılar “miRNA-96-5p ve miRNA-183-5p”nin bir panel halinde %88,2 sensitivite ve %87,8 spesifite ile MK'yı kontrol gruplarından ayırabildiğini; tek başına miRNA-96-5p'nin %80,4 sensitivite ve %91,8 spesifiteye sahip olduğunu, tek başına miRNA-183-5p'nin %88,2 sensitivite ve %87,8 spesifiteye ulaştığını ve sonuç olarak kendi örneklerinde sensitivitesinin %37,3 ve spesifitesinin ise %100 olduğu idrar sitolojisi ile kıyaslandığında miRNA'ların daha yüksek bir biyobelirteç performansına sahip olduğunu kanıtlamışlardır (El-Shal ve ark. 2021). Çalışma kapsamında aynı zamanda TUR-MT'den 4 hafta sonra alınan idrar örneklerindeki eksozomal “miRNA-96-5p ve miRNA-183-5p” anlatımının, TUR-MT öncesindeki örneklerle kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde (sırasıyla $p<0.001$ ve $p=0.002$) düşük olduğu gösterilmiş olup bu sonuçlar seçilen miRNA'ların MK'ya özgü artış gösterdiğini desteklemiştir (El-Shal ve ark. 2021). Huang ve arkadaşları farklı bir yaklaşımla 3 MK'lı vakaya ait radikal sistektomiden elde edilmiş KİMT dokularının yüzeyel kısımlarını ve aynı dokuya eşlenik derin tümör infiltrasyonu gösteren bölgeleri örnekleyerek RNA sekanslama ile analiz etmişler ve 8 mRNA ile 32 lncRNA'nın dokulardaki derin tümör infiltrasyonu gösteren bölgelerde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış gösterdiğini ortaya koymuşlardır (Huang ve ark. 2021). Sonraki aşamada araştırmacılar aday mRNA ve lncRNA'larını TCGA database'indeki daha geniş MK kohortlarını kullanarak biyoinformatik analizlerle valide etmişler ve aday mRNA/lncRNA sayılarını 10'a düşürerek bunların anlatımlarını 10 MK'lı vaka ve 10 sağlıklı kontrole ait idrar örneklerindeki eksozomlarda RT-qPCR ile kantite etmişler ve kantitasyon sonucunda “KLHDC7B, CASP14 ve PRSS1” mRNA'ları ile “MIR205HG ve GAS5” lncRNA'larının MK'da anlamlı düzeyde artış gösterdiğini ortaya koymuşlardır (Huang ve ark. 2021). Sonraki aşamada araştırmacılar 80 MK'lı vakadan ve 80 sağlıklı kontrolden oluşan bir validasyon kohortuna ait idrar örneklerinin eksozomlarını kullanarak 5 mRNA/lncRNA'yı kantite etmişler ve her birinin MK'da

istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.001$) düzeyde artış gösterdiğini ortaya koymuşlardır (Huang ve ark. 2021). Ek olarak araştırmacılar önerdikleri panelin MK'yı sağlıklı kontrollerden ("AUC: 0.924, 95% CI, 0.875–0.974") ve özellikle erken evrelerdeki MK'lı vakaları bile sağlıklı kontrollerden ("AUC: 0.910, 95% CI, 0.850-0.971") yüksek performansta ayırabilme gücü olduğunu kanıtlamışlar ve ek analizlerle de bu RNA'ların progresyonsuz sürvi ve genel sürvi üzerindeki etkili olabileceğini göstermişlerdir (Huang ve ark. 2021). Lin ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 12 MK'lı vakaya (n=6 KİOMT ve n=6 KİMT) ve 4 sağlıklı kontrole ait idrar örneklerinden elde edilen eksozomlar high-throughput RNA sekanslama ile analiz edilmiş ve 51 miRNA'nın MK'da upregüle olduğu, 22 miRNA'nın ise downregüle olduğu saptanmıştır (Lin ve ark. 2021). RNA sekanslama sonuçları kasa invazyon durumuna göre ele alındığında ise KİOMT'lerde KİMT'lerle karşılaştırıldığında 40 miRNA'nın upregüle olduğu, 21 miRNA'nın ise downregüle olduğu ortaya koyulmuştur (Lin ve ark. 2021). Daha sonra araştırmacılar TCGA database'ini kullanarak yaptıkları biyoinformatik analizlerde MK tümör dokularında eşlenik sağlıklı dokulara kıyasla 106 miRNA'nın upregüle olduğunu ve 26 miRNA'nın downregüle olduğunu görmüşler ve sonuçları kendi RNA sekanslama sonuçları ile birlikte değerlendirerek "miRNA-93-5p, miRNA-516a-5p ve miRNA-940"ı aday miRNA'lar olarak belirlemişlerdir (Lin ve ark., 2021). Bunun ardından araştırmacılar 53 MK'lı vakadan ve 51 sağlıklı kontrolden oluşan bağımsız bir vadilasyon kohortunun idrar eksozomlarında 3 aday miRNA'nın anlatımını RT-qPCR ile kantite etmişler ve sonuç olarak miRNA-940 düzeyinin MK'lı vakalar ile sağlıklı kontroller arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değişmediğini, miRNA-93-5p düzeyinin MK'da sağlıklı kontrollere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.0001$) düzeyde artış gösterdiğini ve ayrıca KİOMT'li vakalar ile KİMT'li vakalara ait eksozomlarda ise yine istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.001$) düzeyde farklı anlatıma sahip olduğunu; miRNA-516a-5p düzeyinin MK'da sağlıklı kontrollere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.0001$) düzeyde artış gösterdiğini fakat KİOMT'li vakalar ile KİMT'li vakalara ait eksozomlarda ise istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklı bir anlatıma sahip olmadığını bildirmişlerdir (Lin ve ark. 2021). Araştırmacılar ayrıca idrar sitolojisi sonuçları ile kıyaslandığında (AUC: 0.630), "miRNA-93-5p ve miRNA-516a-5p"nin MK'yı sağlıklı kontrollerden ayırmada daha yüksek performansa sahip olduğunu ("AUC sırasıyla 0.838 ve 0.790") bildirmişlerdir (Lin ve ark. 2021). İlaveten araştırmacılar biyoinformatik analizler neticesinde *BTG2*'nin miRNA-93-

5p'nin transkripsiyonel hedefinde olduğunu göstererek, T24 ve UMUC-3 hücreleri üzerinde yaptıkları *in vitro* deneylerde miRNA-93-5p'nin *BTG2* anlatımını baskılayarak MK'da hücre proliferasyonunu, invazyonunu ve metastazını artırıyor olabileceğini ileri sürmüşlerdir (Lin ve ark. 2021). Matsuzaki ve arkadaşları 6 MK'lı vaka ve 3 sağlıklı kontrole ait idrar örneklerinden elde ettikleri EV'lerin miRNA profilini mikroarray ile analiz etmişler ve 5 miRNA'nın ("miRNA-155-5p, miRNA-15a-5p, miRNA-21-5p, miRNA-132-3p ve miRNA-31-5p") MK'lı vakalarda sağlıklı kontrollere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.01$) düzeyde en az 2,5 kat artış gösterdiğini ortaya koymuşlardır (Matsuzaki ve ark. 2017). Daha sonra araştırmacılar aday 5 miRNA'nın anlatımını 36 MK'lı vaka ve 24 sağlıklı kontrolden oluşan validasyon kohortuna ait idrar EV'lerinde RT-PCR ile kantite etmişler her birinin sağlıklı kontrollere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.0001$) düzeyde MK'da artış gösterdiğini ortaya koymuşlardır (Matsuzaki ve ark. 2017). Bununla birlikte araştırmacılar 5 miRNA içerisinde miRNA-21-5p'nin en iyi biyobelirteç potansiyeli gösterdiğini ("AUC: 0.900, 95% CI 0.782-0.958") ve MK'yı sağlıklı kontrollerden %75 sensitive ve %95,8 spesifite ile ayırabildiğini belirtmişlerdir (Matsuzaki ve ark. 2017). Murakami ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 6 MK'lı vakaya ($n=3$ KİOMT ve $n=3$ KİMT), TUR-MT sonrası rezidüel tümör görülmeyen 2 vakaya ve 4 kontrole ait idrar örneklerinden elde edilen EV'lerin mRNA profili RNA sekanslama ile analiz edilmiştir (Murakami ve ark. 2018). RNA sekanslama sonuçları 12 genin ("*CEACAM7*, *CRH*, *FABP4*, *GPRC5A*, *HSD17B2*, *KRT17*, *LINC00967*, *OLFM3*, *P4HA1*, *SLC2A1*, *TMEM45A* ve *TMPRSS4*") MK'lı vakaların EV'lerinde aşırı anlatıma sahip olduğunu göstermiştir (Murakami ve ark. 2018). Araştırmacılar daha sonra bu 12 genin anlatımını 173 MK'lı vakanın, 33 renal pelvis kanserli/üreter kanserli vakanın ve 36 rezidüel mesane tümörü bulunmayan/tamamen sağlıklı kontrolün idrar örneklerindeki EV'lerinden RT-qPCR ile kantite etmişler ve bunlar arasında "*SLC2A1*, *GPRC5A* ve *KRT17*" anlatımının pT1 ve daha ileri evredeki MK'lı vakaların idrar EV'lerinde sırasıyla 20,6 kat, 18,2 kat ve 29,5 kat daha fazla olduğunu göstermişlerdir (Murakami ve ark. 2018). İlaveten araştırmacılar bu 3 gene ait anlatımın KİOMT'leri sağlıklı kontrollerden yüksek performansta ayırabildiğini ("pTa için AUC: 0.56-0.64; pTis için AUC: 0.62-0.80; pT1 için AUC: 0.82-0.86") ve pT2 ya da daha ileri evredeki KİMT'leri de sağlıklı kontrollerden yüksek performansta ayırabildiğini ("AUC: 0.72-0.90") bildirmişlerdir (Murakami ve ark. 2018). Perez ve arkadaşlarının yaptığı pilot çalışmada 5 MK'lı vaka

ve 6 sağlıklı kontrole ait idrar örneklerinden elde edilen EV'lerin mRNA profili mikroarray ile araştırılmış ve daha sonra aday genlerin anlatımı 3 MK'lı vaka ve 5 sağlıklı kontrole ait idrar örneklerinden elde edilen EV'lerde RT-PCR ile valide edilmiştir (Perez ve ark. 2014). Çalışma neticesinde araştırmacılar “*LASS2* ve *GALNT1*” anlatımının sadece MK'lı örneklerde, “*ARHGEF39* ve *FOXO3*” anlatımının ise sadece sağlıklı kontrollere ait örneklerde tespit edildiğini belirterek literatürde daha önce tümör progresyonu ve metastaz ile ilişkili olduğu bildirilen bu genlerin MK için diyagnostik öneme sahip olabileceğini ortaya koymuşlardır (Perez ve ark. 2014). Stromme ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 41 KİOMT'li vakaya ve 15 benign sistoskopi bulguları bulunan nonkanseroz kontrole ait TUR-MT öncesinde alınmış idrar ve serum örneklerinden elde edilen EV'lerin ve serum süpernatantlarının miRNA profili NGS ile araştırılarak; TUR-MT sonrasında rekürrens gelişmediği en az bir sistoskopi ile monitörize edilmiş aynı KİOMT'li vakalardan elde edilen örneklerle karşılaştırılmıştır (Stromme ve ark. 2021). Çalışma neticesinde araştırmacılar T1 evre KİOMT'li vakalarda TUR-MT öncesi alınmış idrar örneklerinden elde edilen EV'lere ait “miRNA-451a ve miRNA-486-5p” düzeylerinin TUR-MT sonrasına ait idrar EV'lerine ve nonkanseroz kontrollere kıyasla anlamlı düzeyde daha yüksek olduğunu ancak aynı anlamlı farkın serum EV'lerinde ve serum süpernatantlarında görülmediğini bildirmişlerdir (Stromme ve ark. 2021). Bulgulardan hareketle araştırmacılar idrar EV'lerine ait “miRNA-451a ve miRNA-486-5p” düzeyinin T1 evre KİOMT'li hastalar için rekürrenssiz sürviyi öngörebilecek potansiyele sahip bir biyobelirteç olabileceğini göstermişlerdir (Stromme ve ark. 2021). Wen ve arkadaşları 168 MK'lı vaka ve 90 sağlıklı kontrolün idrar örneklerini kullanarak yaptıkları çalışmalarında idrar eksozomlarındaki CA9 anlatımının MK için diyagnostik bir belirteç olup olamayacağını araştırmışlardır (Wen ve ark. 2021). Çalışma neticesinde idrar eksozomlarındaki CA9 mRNA düzeyini RT-qPCR ile kantite etmişler ve MK'da istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.001$) düzeyde daha yüksek olduğunu göstermişlerdir (Wen ve ark. 2021). Buna ilaveten araştırmacılar CA9 mRNA düzeyinin %85,18 sensitivite ve %83,15 spesifite ile MK'yı sağlıklı kontrollerden ayırabilen yüksek performanslı (“AUC: 0.837, 95% CI: 0.743–0.859”) bir biyobelirteç olarak kullanılabileceğini ortaya koymuşlardır (Wen ve ark. 2021). Xu ve arkadaşları 408 mesane tümör dokusu ve 19 parakarsinoma mesane dokusuna ait RNA dizileme sonuçlarını içeren TCGA veri setini kullanarak MK'da anlatımının değiştiğini saptadıkları 12 aday geni belirleyerek bu genlerin anlatımlarını

126 MK'lı vaka ve 242 kontrolden oluşan deneme kohortuna ait idrar örneklerinden elde ettikleri EV'lerde RT-qPCR ile kantite etmişler ve "ExoPanel" olarak adlandırdıkları 5 genden ("*MYBL2*, *TK1*, *UBE2C*, *KRT7* ve *SI00A2*") meydana gelen bir biyobelirteç paneli oluşturmuşlardır (Xu ve ark. 2021). Araştırmacılar daha sonra bu ExoPanel'i 56 MK'lı vaka ve 99 kontrolden oluşan validasyon kohortuna ait idrar örneklerinden elde ettikleri EV'lerde RT-qPCR ile valide etmişler ve bu 5 genin %91,07 sensitivite ve %50,51 spesifite ile MK'yı kontrollerden ayırabilen yüksek performanslı ("AUC: 0.8402, 95% CI: 0.7690–0.9114") bir panel olduğunu ifade etmişlerdir (Xu ve ark. 2021). Yazarlou ve arkadaşları 59 MK'lı vakaya, 24 sağlıklı kontrole, 11 mesane taşı bulunan vakaya, 6 obstrüktif üropatili vakaya ve 6 benign prostat hipoplazi'li (BPH) vakaya ait idrar örneklerinden elde ettikleri eksozomlardaki 7 kanser/testis antijeni (KTA) ("*MAGE-A3*, *MAGE-B4*, *TSGA-10*, *AKAP4*, *SYCP1*, *OY-TES-1* ve *NY-ESO-1*") anlatımını ve NMP22 anlatımını qRT-PCR ile kantite etmişlerdir (Yazarlou ve ark. 2018a). Çalışma neticesinde araştırmacılar *MAGE-B4* anlatımının MK'lı vakalarda sağlıklı kontrollere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ($p=0.01$) şekilde 2,68 kat artış gösterdiğini ancak BPH'lı vakalara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ($p=0.01$) şekilde 0,17 kat azalış gösterdiğini ortaya koymuşlardır (Yazarlou ve ark. 2018a). Araştırmacılar ayrıca MK'lı vakaların idrar eksozomlarındaki NMP22 anlatımının BPH'lı vakalara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ($p=0.02$) şekilde 9,22 kat daha yüksek olduğunu; bununla birlikte *MAGE-B4* dışında geriye kalan 6 KTA'ya ait gen anlatımının MK'lı vakalarda, kontrol vakalarında ve non-kanseröz vakalardaki idrar eksozomlarında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık göstermediğini belirtmişlerdir (Yazarlou ve ark. 2018a). Yazarlou ve arkadaşları bir diğer çalışmalarında ise yine 59 MK'lı vakaya, 24 sağlıklı kontrole, 11 mesane taşı bulunan vakaya, 6 obstrüktif üropatili vakaya ve 6 benign prostat hipoplazi'li (BPH) vakaya ait idrar örneklerinden elde ettikleri eksozomlarda bu defa "*LINC00355*, *LINC00958*, *UCA1-201*, *UCA1-203* ve *MALAT1*" lncRNA'larının anlatımını qRT-PCR ile kantite etmişlerdir (Yazarlou ve ark. 2018b). Çalışma neticesinde "*LINC00355*, *UCA1-203* ve *MALAT1*" anlatımlarının MK'da kontrol vakalarına ve nonkanseröz vakalara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) düzeyde daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Yazarlou ve ark. 2018b). Buna ilaveten araştırmacılar "*UCA1-201*, *UCA1-203*, *MALAT1* ve *LINC00355*"den oluşan panelin %92 sensitivite ve %91,7 spesifite ile MK'yı kontrol örneklerinden ayırabildiğini ortaya koymuşlardır (Yazarlou ve ark.

2018b). Zhan ve arkadaşları literatürdeki çalışmalardan hareketle mesane tümörlerinde disregülasyona uğradığı ve tümöröenezdeki rolleri daha önce bildirilen 8 lncRNA'yı ("MALAT1, PCAT-1, SPRY4-IT1, UCA1, MEG3, H19, UBC1 ve TUG1") seçerek, bunları 104 MK'lı vakadan ve 104 sağlıklı kontrolden oluşan deneme kohortuna ait idrar örneklerindeki eksozomlarda qRT-PCR ile kantite etmişlerdir (Zhan ve ark. 2018). Daha sonra araştırmacılar kantitasyon sonuçlarından hareketle 8 lncRNA içerisinden "MALAT1, PCAT-1 ve SPRY4-IT1"den oluşan paneli seçerek 80 MK'lı vaka ve 80 sağlıklı kontrolden meydana gelen validasyon kohortuna ait idrar örneklerindeki eksozomlarda qRT-PCR ile kantite etmişlerdir (Zhan ve ark. 2018). Araştırmacılar validasyon sonucunda "MALAT1, PCAT-1 ve SPRY4-IT1" panelinin MK'yı sağlıklı kontrollerden yüksek performansta ayırabildiğini ("AUC: 0.813") ve idrar sitolojisine göre ("AUC: 0.619") daha başarılı olduğunu göstermişlerdir (Zhan ve ark. 2018). Buna ek olarak, çalışma neticesinde "PCAT-1 ve MALAT-1" aşırı ifadesinin KİOMT'lerde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde (sırasıyla $p<0.001$ ve $p<0.002$) azalmış rekürrensiz sürvi ile ilişkili olduğu ve PCAT-1 aşırı ifadesinin KİOMT'lerde rekürrensiz sürvi için istatistiksel olarak anlamlı ($p=0.018$) düzeyde bir prognostik faktör olduğu anlaşılmıştır (Zhan ve ark. 2018). Elsharkawi ve arkadaşları farklı bir yaklaşımla serum ve idrardaki eksozom miktarının MK için tanı ve takipte kullanılabilecek bir biyobelirteç olup olamayacağını ele almışlardır (Elsharkawi ve ark. 2019). Araştırmacılar evreleri T0 ile T3 arasında değişen toplamda 70 MK'lı vaka ve 12 sağlıklı kontrole ait serum ve idrar örneklerindeki eksozom düzeylerini ELISA yöntemiyle kantite etmişlerdir (Elsharkawi ve ark. 2019). Çalışma neticesinde MK'lı vakalara ait idrar ve serum eksozom düzeyleri kontrol grubundakilere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.001$) düzeyde yüksek bulunmuştur (Elsharkawi ve ark. 2019). Araştırmacılar idrar ve eksozom düzeyinin artan tümör evresi ve invazivlikle korelasyon gösterecek şekilde arttığını, idrar eksozom düzeyinin %92,6 sensitivite ve %83,3 spesifite ile MK'lı vakaları sağlıklı kontrollerden ayırabildiğini, serum eksozom düzeyinin ise %82,4 sensitivite ve %100 spesifite ile MK'lı vakaları sağlıklı kontrollerden ayırabildiğini göstermişlerdir (Elsharkawi ve ark. 2019). Hiltbrunner ve arkadaşları komplet downstaging izledikleri KİMT'li 13 vakayı dahil ettikleri çalışmalarında radikal sistektomi öncesinde histolojik açıdan tümörsüz kabul ettikleri mesaneden gelen idrar örneklerini ve radikal sistektomi esnasında ise kateterizasyon yardımıyla mesaneye temas etmemiş olan üreter kökenli idrar örneklerini toplayarak eksozom izolasyonu yapmışlar ve eksozomların proteom profilini LC-

MS/MS ile araştırmışlardır (Hiltbrunner ve ark. 2020). Araştırmacılar post-sistektomiye takiben komplet downstaging'i patolojik olarak da konfirme ettiklerini vurgulayarak, aynı vakalara ait eşlenik üreter kökenli olan ve ayrıca tümörsüz mesane ile temas etmiş olan idrar örneklerinin eksozomlarına ait LC-MS/MS sonuçlarını karşılaştırdıklarında mesaneden gelen idrar eksozomlarının kansere işaret eden bir metabolik profil sergilediğini, onkojenik proteinler ve mesane tümörünün metabolik yollarıyla ilişkili proteinler içerdiğini göstermişlerdir (Hiltbrunner ve ark. 2020). Araştırmacılar mevcut bulgularına dayanarak bu durumun muhtemel sebebinin mesanede tespit edilemeyen kanser hücrelerinin ya da kısmi malign transformasyona sahip hücrelerin salgıladığı eksozomlardan kaynaklı olabileceğini ileri sürmüşlerdir (Hiltbrunner ve ark. 2020). Buna ek olarak araştırmacılar eksozomların karsinogenez ve metastaza olan katkısını göz önüne alarak sistoskopide komplet downstaging izlenen vakalarda bile radikal sistoskopinin önemli olacağına işaret etmişlerdir (Hiltbrunner ve ark. 2020). Igami ve arkadaşları 4 MK'lı vakaya ve 4 sağlıklı kontrole ait idrar örneklerinden izole ettikleri EV'leri LC-MS/MS ile analiz ederek EV'lere ait proteom profilini araştırmışlardır (Igami ve ark. 2022). Analiz neticesinde MK'lı vakaların idrar EV'lerinde 585, sağlıklı kontrollerde 644 ve her iki grupta da ortak 749 protein tanımlanmıştır (Igami ve ark. 2022). Araştırmacılar bunlar arasından EV'lerin yüzeyinde ifade edilen CEACAM proteinlerine odaklanmışlar ve 33 MK'lı vakaya, 18 nonkanseroz vakaya ve 29 sağlıklı kontrole ait idrar örneklerinden izole ettikleri EV'leri kullanarak flow sitometri ile yaptıkları analizlerde "CEACAM1, CEACAM5 ve CEACAM6" proteinlerinin MK'lı vakalara ait EV'lerde ("ortalama $\pm$ SD: $8.6 \pm 13\%$ "), non-kanseroz vakalara (" 0.69 ± 0.46 ") ve sağlıklı kontrollere (" 0.46 ± 0.34 ") kıyasla daha fazla ifade edildiği ortaya koyulmuştur (Igami ve ark. 2022). Buna ek olarak araştırmacılar CEACAM proteinlerinin anlatımının olduğu EV'lerde aynı zamanda "Mucin 1" anlatımının da olduğunu göstererek CEACAM pozitif EV'lerin tümörojenik üroepitelyal hücrelerden köken alıyor olabileceğini vurgulamışlardır (Igami ve ark. 2022). Araştırmacılar CEACAM proteinlerinin MK'yı ayırmada yüksek performans gösterdiğini kanıtlayarak ("AUC: 0.907") EV'lerde ifade edilen CEACAM proteinlerinin MK için diyagnostik önem taşıyabileceğine işaret etmişlerdir (Igami ve ark. 2022). Jordaens ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, ultrasantrifüj ile izole edilen idrar EV'leri boyut dışlama kromatografisi ile ayırma tabi tutularak 40-200 nm boyutunda small EV'ler (sEV) elde edilmiş ve sEV'lerin KİOMK'da primer tanı ve rekürrens takibinde

kullanılabilirliği incelenmiştir (Jordaens ve ark. 2023). Araştırmacılar primer MK tanısı almış 50 vakanın, rekürrens tanısı almış 46 MK'lı vakanın, MK öyküsü bulunan tümörsüz 109 vakanın ve 64 sağlıklı kontrolün idrar örneklerinden elde ettikleri sEV'leri LC-MS/MS ile analiz etmişler ve analiz neticesinde primer MK tanısı almış vakaların sEV'lerine ait proteom profili ile sağlıklı kontroller arasında farklı anlatıma sahip 69 protein tanımlandığını göstermişlerdir (Jordaens ve ark. 2023). Daha sonra araştırmacılar tanımlanan proteinlerin MK'lı vakaları ayırma gücünü ele alarak "MASP2, C3, A2M, CHMP2A ve NHE-RF1"nin potansiyel biyobelirteçler olabileceğini ifade etmişlerdir (Jordaens ve ark. 2023). Araştırmacılar ayrıca rekürrens tanısı almış MK'lı vakalar ile MK öyküsü bulunan tümörsüz vakalara ait idrar sEV'lerinin proteom profilini değerlendirdiklerinde "HBB ve HBA1" proteinlerinin farklı anlatıma sahip olduğunu görmüşler ve bu iki proteinin rekürrens takibi için kullanılabilirliğine dikkat çekmişlerdir (Jordaens ve ark. 2023). Lee ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 4 MK'lı vakadan preoperatif ve postoperatif dönemde idrar örnekleri alınarak EV izolasyonu yapılmış ve EV'lere ait proteom profili antikor array ile analiz edilmiştir (Lee ve ark. 2020). Array sonucunda A2M'ye ait sinyal yoğunluğunun postoperatif dönemde preoperatif döneme kıyasla anlamlı şekilde azaldığını ortaya koyan araştırmacılar sonraki aşamada 20 MK'lı vaka ve 10 non-kanseröz kontrol grubundan oluşan deneme kohortuna ait idrar örneklerindeki ve idrar EV'lerindeki A2M düzeyini ELISA ile analiz ederek MK'da istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.0001$) düzeyde daha yüksek olduğunu görmüşlerdir (Lee ve ark. 2020). Daha sonra araştırmacılar 60 MK'lı vakadan ve 23 nonkanseröz kontrolden oluşan validasyon kohortuna ait idrar örneklerinde ve idrar örneklerinden elde ettikleri EV'lerde A2M düzeyini ELISA ile analiz etmişler ve MK'lı vakalara ait idrar EV'lerindeki A2M düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek olduğunu ancak idrar örneklerindeki A2M düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığını göstermişlerdir (Lee ve ark. 2020). Tomiyama ve arkadaşları 49 MK'lı vaka ve 48 hematürisi olan non-kanseröz kontrol grubuna ait idrar örneklerinden izole edilen EV'ler ile yapılan LC-MS/MS analizi neticesinde tanımlanan anlamlı 30 membran proteininden 8 tanesini seçerek "targeted" proteomiks ile valide etmişler ve bunlar arasından sadece "Ephrin type-A receptor 2'nin (EphA2)" MK'lı vakalara ait idrar örneklerinden elde edilen EV'lerde hematürisi olan nonkanseröz kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ($p = 0.01$) düzeyde artış gösterdiğini ortaya koymuşlardır (Tomiya ve ark. 2022). Daha sonra araştırmacılar EV'lerin

yüzeyinde ifade edildiğini gördükleri EphA2 için ultrasantrifüj ile EV izolasyonu yapmayı gerektirmeden kantitasyon yapabilen “EV-EphA2-CD9” sandviç ELISA testi geliştirerek 36 MK’lı vaka ve 36 kontrolden oluşan bir kohorta ait idrar örneklerinde bu ELISA testi ile kantitasyon yapmışlardır (Tomiya ve ark. 2022). Çalışma neticesinde araştırmacılar “EV-EphA2-CD9” ELISA testinin %61,1 sensitivite ve %97,2 spesifite ile MK’lı vakaları kontrollerden ayırabildiğini ortaya koymuşlardır (Tomiya ve ark. 2022). Ayrıca araştırmacılar yaptıkları *in vitro* deneylerde EphA2 ve EV kökenli EphA2’nin MK’da artmış proliferasyon, invazyon ve migrasyon ile ilişkili olabileceğini göstermişlerdir (Tomiya ve ark. 2022). Eksozomların proteomik analizi literatürde yaygın çalışılmış olmakla birlikte sınırlı sayıda çalışma eksozomların “Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS)” ile analizine yönelmiştir. Eksozomal biyobelirteçler yüksek sensitivite ve spesifite yüzdeleri ile MK için ideal diyagnostik araçlar olmalarına karşılık eksozomların genomik veya proteomik profillerini analiz edecek enstrümanların research laboratuvarı düzeyinde olması eksozomal belirteçlerin rutin kullanıma girmesinin önündeki bir zorluk olarak karşımıza çıkmaktadır. Buna karşılık MALDI-TOF MS cihazları rutin tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarlarında bile biyotiplendirme/identifikasyon için kullanıldıklarından eksozomların üroonkoloji pratiğinde kullanımı amacıyla analiz edilebilmesi için güçlü adaylardır. İdrar eksozomlarının MALDI-TOF MS ile analizini ilk defa Lin ve arkadaşları önermiştir (Lin ve ark. 2016). Araştırmacılar 129 MK’lı vaka ve 62 kontrolün idrar örneklerini dahil ettikleri çalışmalarında ultrasantrifüj ile elde ettikleri eksozomlardan protein izole ederek peptidleri MALDI-TOF MS ile analiz etmişler ve analiz sonucunda “m/z 3367, m/z 3441, m/z 3483 ve m/z 10884” piklerinin tüm örneklerde tespit edildiğini ve MALDI-TOF MS ile identifikasyonda eksozom için biyobelirteç olabileceğini görmüşlerdir (Lin ve ark. 2016). Buna ek olarak araştırmacılar MK’lı vakalara ait örneklerde görülen “m/z 5593 (α -1-Antitripsin’in peptid fragmenti) ve m/z 5947 (H2B1K’nın peptid fragmenti)” piklerinin kontrol örnekleri ile kıyaslandığında sırasıyla %50,4 sensitivite/%96,9 spesifite ve %62,0 sensitivite/%92,3 spesifite ile örnekleri ayırma performansına sahip olduğunu göstermişlerdir (Lin ve ark. 2016). Sonraki aşamada araştırmacılar “ α -1-Antitripsin ve H2B1K” proteinlerini 122 FFPE olan mesane tümör dokusunda ve 26 nonürotelyal karsinom dokusunda İHK ile boyayarak immün ifadelerini değerlendirmişlerdir (Lin ve ark. 2016). İHK sonuçları, “ α -1-Antitripsin ve H2B1K”ye ait immün ifadelerin kontrol

örnekleriyle kıyaslandığında MK’lı vakalarda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde (sırasıyla $p=0.038$ ve $p=0.005$) arttığını; immün reaktivite alınamayan vakalarla kıyaslandığında H2B1K immün ifadesinin olduğu vakaların 2,29 kat artmış rekürrens ve 3,11 kat artmış progresyon riskine sahip olduğunu göstermiştir (Lin ve ark. 2016). Ek olarak araştırmacılar “ α -1-Antitripsin ve H2B1K” immün ifadesindeki artışın istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) düzeyde artan tümör grade’i ile korelasyon gösterdiğini ortaya koymuşlardır (Lin ve ark. 2016). Sonuç olarak MALDI-TOF MS’in MK için diyagnostik ve prognostik öneme sahip eksozom temelli biyobelirteç keşfi için hızlı/yüksek performanslı bir araç olduğu görülmektedir.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

Sunulan çalışma için “İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu”na yapılan başvuru neticesinde 22.10.2021 tarihli ve 19 sayılı toplantıda onay alınmıştır (Dosya numarası: 2021/1807). Araştırmaya ilişkin gereç ve yöntemler aşağıda sunulmuştur.

3.1. Gereçler

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar Tablo 3-1’de listelenmiştir.

Table 3-1: Çalışmada kullanılan cihazların model ve marka bilgileri.

Cihaz, Model ve Markası
CS 150 FNX Ultrasantrifüj, Hitachi
NanoSight NS300 Nanopartikül Karakterizasyon Cihazı, Malvern Panalytical
JEM-2100 Plus Transmission Electron Microscope, JEOL
VDI 12 Homojenizatör, VWR®
NanoDrop™ OneC Microvolume UV-Vis Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific
Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cycler, Thermo Fisher Scientific
CFX96 RT-PCR, BioRad
PowerWave HT Mikroplaka Okuyucu Spektrofotometre, BioTek
Xevo G2-XS QToF Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry, Waters
Rapiflex™ MALDI-TOF MS, Bruker
MPS PII Doku Gömme Cihazı, SLEE
CUT 5062 Rotary Mikrotom, SLEE
Trans-Blot Turbo Transfer System, BioRad
ImageQuant™ LAS 500, GE Life Sciences

3.1.2. Kullanılan Kitler/Sarflar

Çalışmada kullanılan kitler/sarflar Tablo 3-2’de listelenmiştir.

Table 3-2: Çalışmada kullanılan kitlerin/sarfıların isim ve markaları.

Kit/Sarf İsim ve Markası
miRCURY® Exosome Cell/Urine/CSF Kit, Katalog No: 76743, QIAGEN
UPX™ Universal Protein Extraction Kit, Katalog No: ab270054, Abcam
miRNeasy Micro Kit, Katalog No: 217084, QIAGEN
RNAlater, Katalog No: AM7021, Thermo Fisher Scientific
Qubit™ High Sensitivity RNA Quantification Kit, Katalog No: Q32852, Thermo Fisher Scientific
miRCURY® LNA® RT Kit, Katalog No: 339340, QIAGEN
miRCURY® LNA® miRNA Focus PCR Panel-Urine Exosome Focus, YAHS-123Y, QIAGEN
miRCURY® LNA® miRNA PCR Assay, QIAGEN
miRCURY® LNA® SYBR® Green PCR Kit, Katalog No: 339347, QIAGEN
Halt™ Protease Inhibitor Cocktail, Katalog No: 78438, Thermo Fisher Scientific
Pierce™ Rapid Gold BCA Protein Assay Kit, Katalog No: A53225, Thermo Fisher Scientific
Bovine Serum Albumin, Katalog No: 15561020, Thermo Fisher Scientific
FASP Protein Digestion Kit, Katalog No: ab270519, Abcam
Pierce™ MS Grade Trypsin Protease, Katalog No: 90059, Thermo Fisher Scientific
α-Cyano-4-hydroxycinnamic Acid (CHCA ya da HCCA), Katalog No: 8201344, Bruker
Suprabasin (SBSN) Polyclonal Antikor, Katalog No: PAH197Hu01, Cloud-Clone, Amerika
T-PER™ Tissue Protein Extraction Reagent, Katalog No: 78510, Thermo Fisher Scientific
UltraVision Plus Large Volume Detection System Anti-Polyvalent-HRP, Katalog No: TP-125-HLX, Thermo Fisher Scientific
DAB Plus Substrate System, Katalog No: TA-125-HDX, Thermo Fisher Scientific
TGX™ FastCast™ Acrylamide Kit, Katalog No: 1670173, BioRad

3.2. Yöntem

3.2.1. Biyolojik Örnek Hazırlığı

Çalışmada kullanılan biyolojik örnekler “Başakşehir Çam ve Sakura Şehir Hastanesi, Üroloji Kliniği”nden toplandı. Spot idrar örnekleri MK’lı vakalardan TUR-MT öncesinde alındı ve buz içerisinde laboratuvara transfer edilerek alikotlanıp eksozom izolasyonunun yapılacağı güne kadar -80 °C’de saklandı. TUR-MT esnasında alınan tümör dokuları, Normal Tissue Adjacent to Tumor (NAT) örnekleri ve Tumor-Free mesane dokusu örnekleri soğuk PBS ile yıkandıktan sonra soğuk RNA stabilizasyon solüsyonu *RNAlater* (Katalog No: AM7021; Thermo Fisher Scientific, Amerika) içerisine alınarak laboratuvara transfer edildi ve sıvı nitrojende snap-frozen dondurularak çalışmanın yapılacağı güne kadar -80 °C’de saklandı. Tumor-Free mesane dokusu örneklerinden İHK’da kullanılacaklar %10’luk nötral tamponlanmış formaldehit içerisine alınarak fikse edildi ve daha sonra doku takibine alınarak bloklandı. Çalışmada kullanılan FFPE olan doku örnekleri Başakşehir Çam ve Sakura Şehir Hastanesi’nin patoloji laboratuvarının arşivinden elde edildi. Sağlıklı katılımcılara ait idrar örnekleri Başakşehir Çam ve Sakura Şehir Hastanesi ve çevresinde çalışmaya dahil edilme

kriterlerini sağlayan bireylerden elde edildi ve buz içerisinde laboratuvara transfer edilerek alikotlanıp eksozom izolasyonunun yapılacağı güne kadar -80  C’de saklandı. Tüm MK’lı ve sağlıklı katılımcılar çalışma hakkında bilgilendirildikten sonra bilgilendirilmiş gönüllü onam formunu imzalamaları istendi.

3.2.2. İdrardan Eksozom İzolasyonu

İdrardan eksozom izolasyonu miRCURY® Exosome Cell/Urine/CSF Kit (Katalog No: 76743; QIAGEN, Almanya) ve “Hitachi’nin CS 150 FNX Ultrasantrifj” ile yapıldı. miRNA profillemesinde kullanılacak eksozomlar PEG temelli kit aracılığıyla, proteomik analizlerde kullanılacak eksozomlar ultrasantrifüj ile izole edildi. Kit ile eksozom izolasyonu için üretici firmanın önerdiği protokol izlenmiş olup řu adımlar takip edildi:

1. Eksi 80  C’lik dondurucudan çıkarılan idrar rneęi önce -20  C’de daha sonra +4  C’de bekletilerek kademeli olarak çözdürüldü ve 3000 x g’de 10 dakika +4  C’de santrifüjlenerek freeze-thawing’e bağlı oluşan pellet uzaklaştırıldı.
2. Daha sonra 10 mL idrar rneęi 15 mL’lik falkon tüpe alındı, üzerine 4 mL Precipitation Buffer B eklendi ve 5 saniye vortekslendi.
3. İdrar rneęi +4  C’de en az 1 saat inkübe edildi ve sonrasında 10.000 x g’de 30 dakika +4  C’de santrifüjlendi.
4. Süpernatant atılarak falkon 5 saniye boyunca tekrar santrifüjlendi ve rezidüel süpernatant da uzaklaştırıldı.
5. Eksozom içeren pelletin üzerine 100  L Resuspention Buffer eklenerek 15 saniye resspansiyon yapıldı ve örnek miRNA izolasyonuna hazır halde elde edildi.

Ultrasantrifüj ile yapılan eksozom izolasyonu için Cho ve arkadaşlarının önerdiği protokol izlenmiş olup (Cho ve ark. 2020) řu adımlar takip edildi:

1. Eksi 80  C’lik dondurucudan çıkarılan idrar rneęi önce -20  C’de daha sonra +4  C’de bekletilerek kademeli olarak çözdürüldü ve 3000 x g’de 20 dakika +4  C’de santrifüjlenerek freeze-thawing’e bağlı oluşan pellet uzaklaştırıldı.
2. Daha sonra idrar rneęi yeni bir 50 mL’lik falkona alınarak 17.000 x g’de 20 dakika +4  C’de santrifüjlendi ve hücre debris, bakteri vb. uzaklaştırıldı.

3. Daha sonra idrar örneği ultrasantrifüj tüpüne alınarak 200.000 x g'de 90 dakika +4 °C'de santrifüjlendi.
4. Ultrasantrifüj sonrasında süpernatant atılarak eksozomları içeren pellet +4°C'de soğutulan steril 100 µL PBS ile resüspanse edildi ve örnek proteomik analizlerin yapılacağı güne kadar -20 °C'lik dondurucuya kaldırıldı.

Ultrasantrifüj ile idrardan eksozom izolasyonu yapılırken Tamm-Horsfall Proteini'nin (THP) uzaklaştırılması için DTT ile inkübasyon basamağı; sonrasında ise büyük boyutlu EV'lerin uzaklaştırılması için idrar örneklerinin 0,22 µm filtre ile filtrelenmesini önerilebilmektedir (Cho ve ark. 2020). Çalışmamızda eksozomlardan total protein izolasyonu için kullanılacak UPX™ Universal Protein Extraction Kit (Katalog No: ab270054; Abcam, Amerika) içeriğinde DTT bulunduğu için ekstra bir DTT basamağı uygulanmadı. İdrar örneklerindeki total eksozom düzeyinin serum, BOS vb. örneklerden daha az olması beklendiğinden 0,22 µm filtre ile filtrasyon neticesinde kayıp yaşanmaması için idrar örnekleri filtreden geçirilmedi.

3.2.3. NTA ve TEM ile Eksozom Karakterizasyonu

Kit ve ultrasantrifüj ile izole edilen eksozomlar ayrı ayrı olacak şekilde “Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)” ve “Transmission Electron Microscopy (TEM)” ile karakterize edildi. NTA analizi için “Malvern Panalytical'ın 488 nm LM14 Nanoparticle Viewing Unit” modülüne sahip “NanoSight NS300” cihazı kullanılarak izolattaki eksozomların miktarları ve parçacık boyutları belirlendi. Eksozom içeren izolat 1:1000 oranında dilüe edilerek oda sıcaklığında ve 5 tekrarlı şekilde analiz edildi. Eksozomların TEM ile görüntülenmesi için 15 µL örnek 300-mesh karbon kaplı grid üzerine damlatıldı ve grid 10 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Sonraki aşamada grid, %2,5 Gluteraldehit Solüsyonu (v/v PBS içinde) ile 10 dakika muamele edilerek eksozomların fikse edilmesi sağlandı. Bu işlemin ardından grid ultrapure sudan geçirilerek negatif boyama için %2'lik Uranil Asetat (w/v) solüsyonu ile muamele edildi. Bu işlemin ardından grid oda sıcaklığında kurutuldu ve eksozomlar 200 kV altında “JEOL'ün JEM-2100 Plus” TEM'i ile görüntülenerek fotoğraflandı.

3.2.4. Eksozom ve Dokudan miRNA İzolasyonu

Eksozom ve dokudan miRNA izolasyonu için miRNeasy Micro Kit (Katalog No: 217084; QIAGEN, Almanya) kullanıldı ve üretici firmanın önerdiği protokol izlenerek şu adımlar takip edildi:

1. miRCURY® Exosome Cell/Urine/CSF Kit (Katalog No: 76743; QIAGEN, Almanya) ile idrardan izole edilen eksozom örneğinin üzerine 700 µL QIAzol Lysis Reagent eklenerek karışım 1 dakika boyunca vortekslendi ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyona bırakıldı.
2. Örneğin üzerine 140 µL Kloroform eklendi ve kapağı iyice kapatılarak 15 saniye boyunca kuvvetlice alt-üst edildip oda sıcaklığında 2-3 dakika inkübasyona bırakıldı.
3. Sonraki aşamada örnek 12.000 x g'de 15 dakika +4 °C'de santrifüjlendi ve santrifüj sonrası fazlara ayrılan örneğin RNA içeren yaklaşık 350 µL'lik şeffaf-aqueous fazı mikropipet yardımıyla dikkatlice toplanarak yeni bir mikrosantrifüj tüpüne alındı.
4. Daha sonra örneğin üzerine 1,5 katı kadar (yaklaşık 525 µL) %100 Etanol eklenerek birkaç defa pipetaj yapıldı ve karışımdan 700 µL alınarak hızlıca kit ile sağlanan RNeasy MinElute spin kolona aktarıldı ve kolon $\geq 8000 \times g$ 'de 15 saniye santrifüjlenerek toplama kabındaki sıvı atıldı. Bu basamak tekrarlandı.
5. Bir sonraki aşamada RNeasy MinElute spin kolon üzerine 700 µL RWT Buffer eklendi ve $\geq 8000 \times g$ 'de 15 saniye santrifüjlenerek toplama kabındaki sıvı atıldı.
6. Daha sonra RNeasy MinElute spin kolonun ortasına 500 µL RPE Buffer eklenerek $\geq 8000 \times g$ 'de 15 saniye santrifüjlendi ve toplama kabındaki sıvı atıldı.
7. Bu işlemin ardından RNeasy MinElute spin kolon üzerine 500 µL %80 Etanol eklendi ve $\geq 8000 \times g$ 'de 2 dakika santrifüjlendikten sonra toplama kabı atıldı ve kolona yeni bir toplama kabı takıldı.
8. Daha sonra RNeasy MinElute spin kolon, kapağı açık şekilde mikrosantrifüj cihazına alınarak maksimum hızda 5 dakika santrifüjlenerek membran kurutuldu ve toplama kabı atılarak kolona 1,5 mL'lik RNase/DNase/Pyrogen safe mikrosantrifüj tüpü takıldı.
9. Son aşamada RNeasy MinElute spin kolonun doğrudan merkezine 14 µL RNase-free su eklenerek kolon mikrosantrifüj cihazına alındı ve maksimum hızda 1 dakika santrifüjlenerek miRNA'lar elüe edildi.

Mesane tümör dokuları ve Tümör-Free mesane dokularından miRNA izolasyonu için de aynı kit kullanıldı. Bunun için öncelikle *RNAlater* (Katalog No: AM7021; Thermo Fisher Scientific, Amerika) içerisinde fikse edilerek dondurulmuş olan doku örnekleri -80 °C’lik dondurucudan çıkarılıp kademeli olarak çözündürüldü ve bistüri yardımıyla 5 mg’lık parçalara ayrılarak 700 µL QIAzol Lysis Reagent içerisine alındıktan sonra “VWR®’nin VDI 12 Homojenizatörü” ile homojenize edildi. Daha sonra ise yukarıda anlatılan protokolün 2. adımından itibaren aynı basamaklar uygulanarak doku miRNA’ları izole edildi. Eksozom ve doku örneklerinden izole edilen miRNA’ların konsantrasyonları “Thermo Fisher Scientific’in NanoDrop™ OneC” Mikrovölüm Spektrofotometre Cihazı ve “Qubit™ High Sensitivity RNA Quantification Kit (Katalog No: Q32852; Thermo Fisher Scientific, Amerika)” kullanılarak kantite edildi. Örneklerle ait total RNA konsantrasyonun >10 ng/µl üzerinde olması beklendi. RNA konsantrasyonları ile 260/230 ve 260/280 değerleri kaydedildi. Tüm RNA örnekleri cDNA sentezinin yapılacağı güne kadar -80 °C’lik dondurucuya kaldırıldı.

3.2.5. cDNA Sentezi

İdrar eksozomları ve doku örneklerinden izole edilen miRNA’ların cDNA sentezi miRCURY® LNA® RT Kit (Katalog No: 339340; QIAGEN, Almanya) ile yapıldı ve üretici firmanın önerdiği protokol izlendi. RNA örnekleri 5 ng/µl’ye dilüe edildi. cDNA sentezinde kullanılan reverse transcription (RT) reaksiyonu komponentleri ve hacimleri Tablo 3-3’te, RT sıcaklık koşulları Tablo 3-4’te verilmiştir. Reaksiyon “Thermo Fisher Scientific’in Veriti™ 96-Well Fast Konvansiyonel PCR Cihazında” gerçekleştirildi. Elde edilen cDNA örnekleri qRT-PCR ile kantitasyonun yapılacağı güne kadar -20 °C’lik dondurucuda saklandı.

Table 3-3: RT reaksiyonu komponentleri ve hacimleri.

Komponent	Hacim
5x miRCURY RT Reaction Buffer	2 µl
RNase-free Water	4,5 µl
10x miRCURY RT Enzyme Mix	1 µl
Synthetic RNA Spike-in	0,5 µl
Kalıp RNA (5 ng/µl)	2 µl
Toplam Reaksiyon Hacmi	10 µl

Table 3-4: RT Sıcaklık Koşulları.

Aşama	Süre	Sıcaklık
Reverse Transcription Aşaması	60 Dakika	42 Derece
İnaktivasyon Aşaması	5 Dakika	95 Derece
Muhafaza	∞	4 Derece

3.2.6. qRT-PCR ile miRNA Kantitasyonu

Çalışma kapsamında idrar eksozomlarından izole edilen miRNA'ların profili "miRCURY® LNA® miRNA Focus PCR Panel-Human Urine Exosome Focus (GeneGlobe ID- YAHS-123Y; QIAGEN, Almanya)" kiti ile araştırıldı ve qRT-PCR ile toplamda 87 miRNA'nın değişimi analiz edildi. Doku örneklerinden yapılan validasyon için "miRCURY® LNA® miRNA PCR Assay" (QIAGEN, Almanya) kitleri kullanıldı. Kantitasyonların tümü "BioRad CFX96 RT-PCR" Cihazında ve "miRCURY® LNA® SYBR® Green PCR Kit (Katalog No: 339347; QIAGEN, Almanya)" kullanılarak gerçekleştirildi. Kantitasyonu yapılan tüm miRNA'ların adları ve target sekansları Tablo 3-5'te, "miRCURY® LNA® miRNA Focus PCR Panel-Human Urine Exosome Focus" kiti için kullanılan komponentler ve hacimleri Tablo 3-6'da "miRCURY® LNA® miRNA PCR Assay" (QIAGEN, Almanya) kitleri için kullanılan komponentler ve hacimleri Tablo 3-7'de ve tüm kitler için RT-PCR cihazında uygulanan döngü koşulları Tablo 3-8'de gösterilmiştir.

Table 3-5: Kantitasyonu yapılan tüm miRNA'ların adları ve target sekansları.

No	miRNA Adı	Target Sekansı
1	hsa-let-7a-5p	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU
2	hsa-let-7b-5p	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU
3	hsa-let-7d-3p	CUAUACGACCUGCUGCCUUUCU
4	hsa-let-7d-5p	AGAGGUAGUAGGUUGCAUAGUU
5	hsa-let-7e-5p	UGAGGUAGGAGGUUGUAUAGUU
6	hsa-let-7f-5p	UGAGGUAGUAGAUUGUAUAGUU
7	hsa-let-7g-5p	UGAGGUAGUAGUUUGUACAGUU
8	hsa-let-7i-5p	UGAGGUAGUAGUUUGUGCUGUU
9	hsa-miRNA-10a-5p	UACCCUGUAGAUCGAAUUUGUG
10	hsa-miRNA-10b-5p	UACCCUGUAGAACCGAAUUUGUG
11	hsa-miRNA-15a-5p	UAGCAGCACAUAAUGGUUUUGUG
12	hsa-miRNA-15b-5p	UAGCAGCACAUCAUGGUUUACA
13	hsa-miRNA-16-5p	UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG
14	hsa-miRNA-17-5p	CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG
15	hsa-miRNA-20a-5p	UAAAGUGCUUAUAGUGCAGGUAG
16	hsa-miRNA-21-5p	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA
17	hsa-miRNA-22-3p	AAGCUGCCAGUUGAAGAACUGU
18	hsa-miRNA-22-5p	AGUUCUUCAGUGGCAAGCUUUA
19	hsa-miRNA-23a-3p	AUCACAUUGCCAGGGAUUUCC
20	hsa-miRNA-23b-3p	AUCACAUUGCCAGGGAUUACC
21	hsa-miRNA-24-3p	UGGCUAGUUCAGCAGGAACAG
22	hsa-miRNA-25-3p	CAUUGCACUUGUCUCGGUCUGA
23	hsa-miRNA-26a-5p	UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGCU
24	hsa-miRNA-26b-5p	UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGU
25	hsa-miRNA-27a-3p	UUCACAGUGGCUAAGUCCGC
26	hsa-miRNA-27b-3p	UUCACAGUGGCUAAGUUCUGC
27	hsa-miRNA-29a-3p	UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA
28	hsa-miRNA-29b-3p	UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU
29	hsa-miRNA-29c-3p	UAGCACCAUUUGAAAUCGGUUA
30	hsa-miRNA-30a-5p	UGUAAACAUCCUCGACUGGAAG
31	hsa-miRNA-30b-5p	UGUAAACAUCCUACACUCAGCU
32	hsa-miRNA-30c-5p	UGUAAACAUCCUACACUCUCAGC
33	hsa-miRNA-30d-5p	UGUAAACAUCCCCGACUGGAAG
34	hsa-miRNA-30e-3p	CUUUCAGUCGGAUGUUUACAGC
35	hsa-miRNA-30e-5p	UGUAAACAUCCUUGACUGGAAG
36	hsa-miRNA-31-3p	UGCUAUGCCAACAUAUUGCCAU
37	hsa-miRNA-31-5p	AGGCAAGAUGCUGGCAUAGCU
38	hsa-miRNA-34a-5p	UGGCAAGUUCUAGCUGGUUGU
39	hsa-miRNA-92a-3p	UAUUGCACUUGUCCCGGCCUGU
40	hsa-miRNA-93-5p	CAAAGUGCUGUUCGUGCAGGUAG
41	hsa-miRNA-99a-5p	AACCCGUAGAUCGACUUGUG
42	hsa-miRNA-99b-5p	CACCCGUAGAACCGACCUUGCG
43	hsa-miRNA-101-3p	UACAGUACUGUGAUAAACUGAA

44	hsa-miRNA-103a-3p	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUGA
45	hsa-miRNA-106a-5p	AAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG
46	hsa-miRNA-106b-5p	UAAAGUGCUGACAGUGCAGAU
47	hsa-miRNA-107	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUCA
48	hsa-miRNA-125b-5p	UCCCUGAGACCCUAAUUGUGA
49	hsa-miRNA-126-3p	UCGUACCGUGAGUAAUAAUGCG
50	hsa-miRNA-128-3p	UCACAGUGAACCGGUCUCUUU
51	hsa-miRNA-133a-3p	UUUGGUCCCCUUAACCAGCUG
52	hsa-miRNA-135b-5p	UAUGGCUUUUCAUUCCUAUGUGA
53	hsa-miRNA-141-3p	UAACACUGUCUGGUAAAGAUGG
54	hsa-miRNA-145-5p	GUCCAGUUUUCCCAGGAAUCCCU
55	hsa-miRNA-148a-3p	UCAGUGCACUACAGAACUUUGU
56	hsa-miRNA-148b-3p	UCAGUGCAUCACAGAACUUUGU
57	hsa-miRNA-149-5p	UCUGGCUCCGUGUCUUCACUCCC
58	hsa-miRNA-151a-5p	UCGAGGAGCUCACAGUCUAGU
59	hsa-miRNA-181a-5p	AACAUUCAACGCUGUCGGUGAGU
60	hsa-miRNA-187-3p	UCGUGUCUUGUGUUGCAGCCGG
61	hsa-miRNA-191-5p	CAACGGAUCCCAAAGCAGCUG
62	hsa-miRNA-193b-3p	AACUGGCCCCUAAAGUCCCGCU
63	hsa-miRNA-195-5p	UAGCAGCACAGAAAUAUUGGC
64	hsa-miRNA-197-3p	UUCACCACCUUCUCCACCCAGC
65	hsa-miRNA-200a-3p	UAACACUGUCUGGUAAACGAUGU
66	hsa-miRNA-200b-3p	UAAUACUGCCUGGUAAUGAUGA
67	hsa-miRNA-200c-3p	UAAUACUGCCGGGUAAUGAUGGA
68	hsa-miRNA-203a	GUGAAAUGUUUAGGACCACUAG
69	hsa-miRNA-204-5p	UUCCCUUUGUCAUCCUAUGCCU
70	hsa-miRNA-210-3p	CUGUGCGUGUGACAGCGGCUGA
71	hsa-miRNA-221-3p	AGCUACAUUGUCUGCUGGGUUUC
72	hsa-miRNA-222-3p	AGCUACAUCUGGCUACUGGGU
73	hsa-miRNA-301a-3p	CAGUGCAAUAGUAUUGUCAAAAGC
74	hsa-miRNA-342-3p	UCUCACACAGAAAUCGCACCCGU
75	hsa-miRNA-365a-3p	UAAUGCCCCUAAAAUCCUUAU
76	hsa-miRNA-375	UUUGUUCGUUCGGCUCGCGUGA
77	hsa-miRNA-378a-3p	ACUGGACUUGGAGUCAGAAGG
78	hsa-miRNA-423-3p	AGCUCGGUCUGAGGCCCCUCAGU
79	hsa-miRNA-423-5p	UGAGGGGCAGAGAGCGAGACUUU
80	hsa-miRNA-425-5p	AAUGACACGAUCACUCCCGUUGA
81	hsa-miRNA-429	UAAUACUGUCUGGUAAAACCGU
82	hsa-miRNA-500a-5p	UAAUCCUUGCUACCUGGGUGAGA
83	hsa-miRNA-532-5p	CAUGCCUUGAGUGUAGGACCGU
84	hsa-miRNA-574-3p	CACGCUCAUGCACACACCCACA
85	hsa-miRNA-582-5p	UUACAGUUGUUAACCAGUUACU
86	hsa-miRNA-598-3p	UACGUCAUCGUUGUCAUCGUCA
87	hsa-miRNA-660-5p	UACCAUUGCAUAUCGGAGUUG

Table 3-6: miRCURY® LNA® miRNA Focus PCR Panel-Human Urine Exosome Focus kiti için kullanılan komponentler ve hacimleri. Hazırlanan karışım farklı miRNA primerleri içeren 96-well plate'in her bir kuyusuna 10 µl olarak dağıtıldı.

Komponent	Hacim
2x miRCURY SYBR Green Master Mix	500 µl
cDNA Template (Dilüe Edilmeden)	10 µl
RNase-free Water	490 µl
Toplam Reaksiyon Hacmi	1000 µl

Table 3-7: miRCURY® LNA® miRNA PCR Assay kiti için kullanılan komponentler ve hacimleri. Hazırlanan karışım beyaz steril strip PCR tüplerine dağıtıldı.

Komponent	Hacim
2x miRCURY SYBR Green Master Mix	5 µl
PCR Primer Mix	1 µl
cDNA Template (60x Dilüe Edilmiş)	3 µl
RNase-Free Water	1 µl
Toplam Reaksiyon Hacmi	10 µl

Table 3-8: Tüm kitler için RT-PCR cihazında uygulanan döngü koşulları.

Aşama	Süre	Sıcaklık	Ramp Rate
PCR Initial Heat Activation	2 Dakika	95 Derece	Maximal/Fast Mode
2-Step Cycling			
Denatürasyon	10 Saniye	95 Derece	Maximal/Fast Mode
Combined Annealing/Extension	60 Saniye	56 Derece	Maximal/Fast Mode
Döngü Sayısı	40 Döngü		
Melting Curve Analizi	60-95 Derece		

3.2.7. Eksozomdan Protein Ekstraksiyonu ve FASP

İdrardan ultrasantrifüj ile izole edilen eksozom örneğinin üzerine, “Halt™ Protease Inhibitor Cocktail (Katalog No: 78438; Thermo Fisher Scientific, Amerika)” ilave edilmiş “UPX™ Universal Protein Extraction Kit (Katalog No: ab270054; Abcam, Amerika)” 1:1 oranda eklendi ve karışım 2-3 dakika vortekslendi. Daha sonra örnek 100 dereceye ayarlanmış su banyosuna alınarak 5 dakika kaynatıldı ve ardından +4 °C’lik soğutucuya alınarak 1 saat soğutuldu. Sonraki aşamada örnek 15.000 x g’de 10 dakika santrifüjlendi ve süpernatant LoBind mikrosantrifüj tüpüne alındı. Ekstrakte edilen total protein konsantrasyonu “Pierce™ Rapid Gold BCA Protein Assay Kit (Katalog No: A53225; Thermo Fisher Scientific, Amerika)” yardımıyla üretici firmanın önerdiği

protokol izlenerek kolorimetrik şekilde tayin edildi. 96-well plate içerisine “Bovine Serum Albumin (Katalog No: 15561020; Thermo Fisher Scientific, Amerika)” ile 5 standart hazırlandı ve standartlar ile eksozomal protein örneklerinden 10 µL alınıp 3'er tekrarlı olacak şekilde kuyulara dağıtılarak üzerlerine 190 µL boya solüsyonu eklendi. Daha sonra plate 15 dakika karanlıkta inkübe edildi ve “BioTek'in PowerWave HT” Mikroplaka Okuyucu Spektrofotometre'sine yerleştirilerek 595 nm dalga boyunda ölçüm alındı. Daha sonra absorbans değerleri ve standartlara ait bilinen protein konsantrasyonları kullanılarak standart eğri grafiği oluşturulup elde edilen eğri denkleminde hareketle örneğe ait protein konsantrasyonu hesaplandı. Bu aşamadan sonra proteom profilinin araştırılabilmesi için örnek Wisniewski ve arkadaşlarının tavsiye ettiği Filter-Aided Sample Preparation (FASP) yöntemi ile hazırlandı (Wisniewski ve ark. 2009). Çalışmada “FASP Protein Digestion Kit (Katalog No: ab270519; Abcam, Amerika)” kullanıldı ve üretici firmanın önerdiği protokol izlenerek şu adımlar takip edildi:

1. Protein konsantrasyon tayinini takiben 0,4 mg protein ekstraktı, kitin tarif ettiği şekilde önceden hazırlanan 200 µL Urea Sample Solution ile karıştırılarak Spin Filter'a aktarıldı ve 14.000 x g'de 15 dakika santrifüjlendi.
2. Daha sonra Spin Filter üzerine 200 µL Urea Sample Solution eklenerek 14.000 x g'de 15 dakika santrifüjlendi ve toplama kabındaki sıvı atıldı.
3. Bu işleminin ardından kitin tarif ettiği şekilde önceden hazırlanan 10 Iodoacetamide Solution'dan 10 µL alınarak 90 µL Urea Sample Solution ile karıştırıldı ve karışım Spin Filter'a aktarılarak 1 dakika boyunca vortekslenip 20 dakika karanlıkta inkübe edildi.
4. İnkübasyondan sonra Spin Filter 14.000 x g'de 10 dakika santrifüjlendi. Spin Filter üzerine 100 µL Urea Sample Solution eklenerek 14.000 x g'de 15 dakika santrifüjlendi ve bu yıkama işlemi 2 defa daha yapılarak toplama kabındaki sıvı atıldı.
5. Sonraki aşamada Spin Filter üzerine 100 µL 50 mM Ammonium Bicarbonate Solution eklendi ve 14.000 x g'de 10 dakika santrifüjlendi. Bu yıkama işlemi 2 defa daha yapıldı.
6. Sonraki aşamada Spin Filter üzerine, önceden hazırlanmış ve 4 µg MS grade “Pierce™ Trypsin Protease (Katalog No: 90059; Thermo Fisher Scientific,

Amerika)” içeren 75 µL Digestion Solution eklendi ve Spin Filter parafilm ile sarılarak 37 °C’de 18 saat inkübe edildi.

7. İnkübasyondan sonra Spin Filter’a yeni bir toplama kabı takıldı ve Spin Filter üzerine 40 µL 50 mM Ammonium Bicarbonate Solution eklenerek 14.000 x g’de 10 dakika santrifüjlendi. Bu yıkama işlemi 1 defa daha yapıldı.
8. Daha sonra Spin Filter üzerine 50 µL 0,5 M Sodium Chloride Solution eklendi ve 14.000 x g’de 10 dakika santrifüjlendi. Bu basamakta elde edilen filtrat idrardan izole edilen eksozoma ait digested proteinleri/peptidleri içermekteydi. Örneğin ağzı parafillenerek LC-MS/MS analizinin yapılacağı güne kadar -80 °C’lik dondurucuya kaldırıldı.

3.2.8. Eksozomun LC-MS/MS ile Analizi

FASP ile elde edilen eksozomal protein/peptid örneği final konsantrasyonu 200 ng/µL olacak şekilde %0,1 Formik Asit ile dilüe edildi ve vial tüpe alınarak analize hazır hale getirildi. Analiz Waters’ın “Xevo G2-XS QToF Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry” cihazında yapıldı. Analizden öncesinde “MassLynx” programı kullanılarak kalibrasyon ve dedektör ayarları yapıldı. “Metod SONAR, pozitif iyon ve sensitivite moduna getirilerek oluşturulan triptik peptitler hidrofobikliklerine göre HSS T3 kolonunda Asetonitril gradienti ile fraksiyonlandı. Asetonitril %5-35 aralığında arttırılarak peptitlerin kolondan ayrılması sağlandı ve electrospray iyonlaşması sonucu kütle spektrometresinde analiz edildi. Analiz esnasında 50-1950 m/z aralığında tanımlanabilecek peptitler için veri toplandı ve 0,7 saniye kadar MS analizi gerçekleştirilerek peptidin bütünü hakkında bilgi toplandı. Ardından 0,7 saniye kadar MS/MS analizi yapılarak peptidler parçalanıp sekans bilgisi elde edildi. Cihazın tüm analiz prosesi 132 dakika olmakla birlikte analizin 15 ile 110 dakikalık güvenilir aralığı değerlendirmeye alındı.” (Dogan ve ark. 2019).

3.2.9. Eksozomun MALDI-TOF MS ile Analizi

Çalışmada “Bruker’ın Rapiflex™ MALDI-TOF MS” Cihazı kullanıldı ve eksozom örneği intakt halde analiz edildi. “α-Cyano-4-hydroxycinnamic Acid (CHCA ya da HCCA) (Katalog No: 8201344; Bruker, Almanya)” matriksi (10 g/L), %1 Trifluoroacetic Acid içeren Asetonitril-Su (1:1) karışımında çözülerek hazırlandı. Matriksten “MTP 384 Polished Steel Target Plate” üzerine 1 µL eklenerek spotlandı ve target plate oda sıcaklığında kurutuldu. Daha sonra spotların üzerine 1 µL eksozom

örneği eklenerek yine oda sıcaklığında kurutuldu. En son ise tekrar 1 µL matriks eklenerek target plate oda sıcaklığında kurutularak analize hazır hale getirildi. Target plate MALDI-TOF MS cihazının pozitif iyon modunda analiz edildi. Mass spektrumu eksozomlara özgü olarak 2000-20.000 m/z aralığında elde edildi (Zhu ve ark. 2019) ve mass spectral fingerprint değerlendirildi.

3.2.10. Tumor-Free Mesane Dokusunun Histotekniği

Tumor-free mesane doku biyopsisi örneği -80 °C'lik dondurucudan çıkarılarak kademeli olarak çözündürüldü, kasetlendi ve %10'luk nötral tamponlanmış Formaldehit içerisinde alınarak fikse edildi. Bu işlemin ardından doku takibine geçildi. İlk olarak doku örneği 1 saat boyunca akarsu altında yıkanarak Formaldehit uzaklaştırıldı. Daha sonra doku örneği %50'lik, %70'lik, %80'lik ve %96'lık artan derecedeki Etanol serisinin her birinde 1'er saat bekletildi. Bu işlemlerin ardından doku örneği 3 farklı %100 Etanol serisinde 1'er saat bekletildi ve "dehydration" yapıldı. Sonraki aşamada doku örneği 3 farklı Ksilen serisinde 20'şer dakika bekletilerek "clearing" yapıldı. Son aşamada doku örneği 60 dereceye ayarlı etüvde bulunan 2 farklı erimiş Parafin serisi içerisinde 1'er saat tutularak "infiltration" yapıldı ve doku örneği bloklamaya hazır hale getirildi. Bloklama işlemi "SLEE'nin MPS PII doku gömme cihazında" uygun boyutta base mold kullanılarak yapıldı.

3.2.11. Hematoksilen & Eozin Boyama

FFPET bloğundan "SLEE'nin CUT 5062 Rotary Mikrotomu" yardımıyla su banyosuna 5 mikronluk kesitler alındı ve daha sonra kesitler lama yerleştirilerek 60 derecelik etüve alınıp 2 saat bekletildi. Ardından lam 3 farklı Ksilen serisinde 10'ar dakika ve 2 farklı %100 Etanol serisinde 10'ar dakika bekletildi. Daha sonra lam %96'lık, %80'lik, %70'lik ve %50'lik azalan derecedeki Etanol serisinin her birinde 5'er dakika bekletildi. Sonrasında lam akarsuda 5 dakika bekletilerek Hematoksilene alındı ve 6-8 dakika bekletildikten sonra tekrar akarsuda 5 dakika tutuldu. Daha sonra lam Eozin boyasına alınarak 3-5 dakika bekletildi ve akarsuda 5 dakika tutuldu. Bu işlemlerin ardından lam %50'lik, %70'lik, %80'lik ve %96'lık artan derecedeki Etanol serisinin her birinde 1'er dakika bekletildi. Daha sonra lam 3 farklı %100 Etanol serisinde 1'er dakika bekletilip 3 farklı Ksilen serisine alınarak 5'er dakika tutuldu. Bu işlemlerin ardından lam üzerine Ksilen bazlı Mounting Medium damlatılarak lamelle kapatıldı ve ışık mikroskopunda incelendi.

3.2.12. FFPET Bloğundan İHK Analizi

Çalışmada “UltraVision Plus Large Volume Detection System Anti-Polyvalent, HRP-Ready-To-Use (Katalog No: TP-125-HLX; Thermo Fisher Scientific, Amerika)” İHK kiti ve “DAB Plus Substrate System (Katalog No: TA-125-HDX; Thermo Fisher Scientific, Amerika)” kiti kullanıldı. FFPET bloktan “SLEE’nin CUT 5062 Rotary Mikrotomu” yardımıyla su banyosuna 5 mikronluk kesitler alındı ve daha sonra kesitler “Polyl-L-Lysine” kaplı Pozitif Charged lama yerleştirilerek 60 °C’ye ayarlanmış etüve alınıp 2 saat bekletildi. Ardından lam 3 farklı Ksilen serisinde 5’er dakika bekletildi. Daha sonra lam %100’lük, %96’lık, %80’lik ve %70’lik azalan derecedeki Etanol serisinin her birinde 5’er dakika bekletildi. Ardından lam 2 farklı distile su serisinde 5’er dakika bekletildi. Bu işlemin ardından lam %10’luk Citrate Buffer içerisine alınarak 5 dakika boyunca 800 W’a ayarlı mikrodalga fırında ısıtıldı ve 20 dakika oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. Daha sonra lam 3 farklı PBS serisi içerisinde 5’er dakika bekletildi. Bu işlemin ardından lam %3’lük H₂O₂’de 15 dakika bekletildi ve tekrar 3 farklı PBS serisi içerisinde 5’er dakika tutuldu. Daha sonra lam üzerindeki dokunun etrafı hidrofobik kalem ile işaretlendi ve üzerine Ultra V Block damlatılarak 10 dakika bekletildi. Daha sonra dokunun üzerine 20 µg/mL olacak şekilde Antibody Diluent ile dilüe edilmiş Suprabasin (SBSN) Polyclonal Antikoru (Katalog No: PAH197Hu01; Cloud-Clone, Amerika) damlatıldı ve lam 4 °C’de gece boyu inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon bitiminde lam oda sıcaklığına alınarak 30 dakika bekletildi. Daha sonra lam 3 farklı PBS serisi içerisinde 5’er dakika bekletildi. Daha sonra lamın üzerine Sekonder Antikor damlatıldı ve 20 dakika bekletilerek tekrar 3 farklı PBS serisi içerisinde 5’er dakika tutuldu. Bu işlemin ardından lam üzerine Streptavidin damlatıldı ve 20 dakika bekletilerek tekrar 3 farklı PBS serisi içerisinde 5’er dakika tutuldu. Sonraki aşamada lam üzerine 40:1000 µL olarak dileü edilmiş 3,3-Diaminobenzidine (DAB) damlatıldı ve lam 3 farklı distile su serisinde 2’şer dakika tutuldu. Bu işlemin ardından lam counterstaining için Gill’s Hematoksileninde 30 saniye tutuldu ve lam akarsuda 2 dakika yıkandı. Daha sonra lam 3 farklı distile su serisinde 3’er dakika tutuldu. Sonraki aşamada lam %70’lik, %80’lik, %96’lık ve %100’lük artan derecedeki Etanol serisinin her birinde 5’er dakika bekletildi. Bu işlemin ardından lam 3 farklı Ksilen serisine alınarak 5’er dakika tutuldu. Son aşamada ise lam Ksilen bazlı Mounting Medium ile kapatılarak ışık mikroskopunda analiz edildi. İHK sonrası 3 farklı patolog tarafından ayrı ayrı histoskorlama yapılarak skorların

ortalaması alındı. Histoskorlama için “İmmünreaktivite Yaygınlığı” (<%25: 0,1 Puan, %26-50: 0,4 Puan, %51-75: 0,6 Puan ve %76-100: 0,9 Puan) ve “Boyanma Şiddeti” (Boyanma Yok: 0 Puan, Az Boyanma Var: 1 Puan, Orta Şiddette Boyanma Var: 2 Puan ve Şiddetli Boyanma Var: 3 Puan) puanlanarak birbiriyle çarpıldı ve nihai histoskor elde edildi (Bocu ve ark. 2023).

3.2.13. Taze Dokudan Protein Ekstraksiyonu ve WB Analizi

Taze doku örneği -80 °C’lik dondurucudan çıkarılacak kademeli olarak çözdürüldü. Dokulardan total protein ekstraksiyonu için “T-PER™ Tissue Protein Extraction Reagent (Katalog No: 78510; Thermo Fisher Scientific, Amerika)” kullanıldı ve solüsyonun içerisine “Halt™ Protease Inhibitor Cocktail (Katalog No: 78438; Thermo Fisher Scientific, Amerika)” eklendi. Total protein ekstraksiyonu için üretici firmanın önerdiği protokol izlendi. Doku örneği solüsyona 1:20 (w:v) alınarak “VWR®’ın VDI 12 Homojenizatörü” ile homojenize edildi. Daha sonra homojenat 10.000 x g’de 5 dakika santrifüj edildi ve total proteini içeren süpernatant toplandı. Protein konsantrasyonu “Pierce™ Rapid Gold BCA Protein Assay Kit (Katalog No: A53225; Thermo Fisher Scientific, Amerika)” kiti kullanılarak daha önce tarif edildiği şekilde tayin edildi. Western Blot analizi için protein örneğinden 30 µg alınarak aynı hacimde Laemmli Buffer ile karıştırıldı ve 95 °C’de 5 dakika kaynatılarak denatüre edildi. Protein örneği “TGX™ FastCast™ Acrylamide Kit (Katalog No: 1670173; BioRad, Amerika)” ile hazırlanan SDS-PAGE’e yüklendi ve 120 V’da yürütüldü. Nitroselüloz Membrana transfer için “BioRad’ın Trans-Blot Turbo Transfer System”i kullanıldı. Daha sonra %0,1 Tween 20 eklenmiş 1X Tris Buffered Saline ve %5’lik Yağsız Süt Tozu ile Blocking Buffer hazırlanarak Nitroselüloz Membran ile muamele edildi. Bu işlemin ardından membran Primer Antikor olan Suprabasin (SBSN) Polyclonal Antikoru (Katalog No: PAH197Hu01; Cloud-Clone, Amerika) ile 4 °C’de gece boyu inkübe edildi. Daha sonra Nitroselüloz Membran %0,1 Tween 20 eklenmiş 1X Tris Buffered Saline ile 3 defa 5’er dakika boyunca yıkandı ve Sekonder Antikor ile 4 °C’de gece boyu inkübe edildi. Görüntüleme işlemi “GE Life Sciences’in ImageQuant™ LAS 500” cihazında yapıldı.

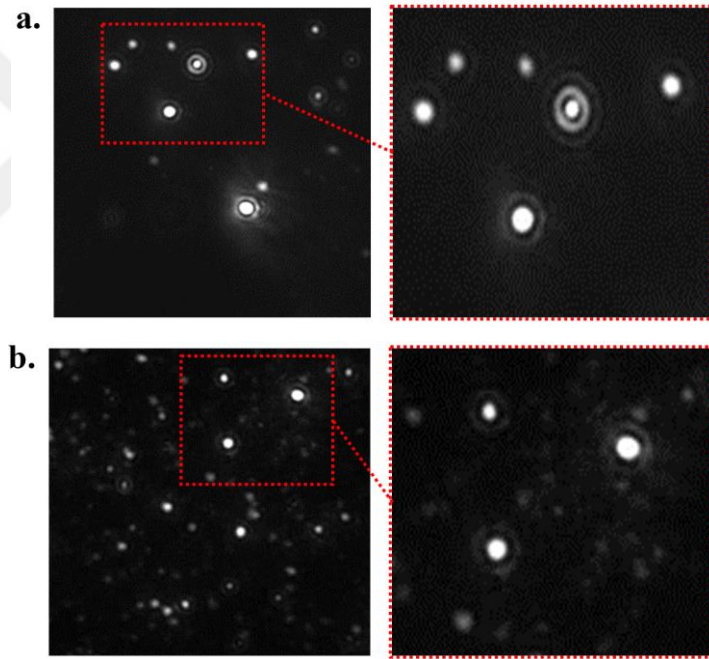
3.2.14. Biyoinformatik ve Biyoistatistik Analiz

NTA analiz sonuçları “NTA 3.3” yazılımında değerlendirildi. qRT-PCR ile miRNA kantitasyonunu takiben elde edilen C_T değerlerini içeren raw datalar “QIAGEN GeneGlobe Data Analiz Portalı”nda analiz edildi. Kantitasyon verilerinin istatistiksel analizi için “Un-Paired T-Test (Two-Tailed)” kullanıldı ve $p < 0.05$ anlamlı kabul edildi. LC-MS/MS analizini takiben elde edilen raw datalar “Progenesis QI yazılımında analiz edildi ve protein tanımlamaları için “UniProt database’i (<https://www.uniprot.org/>)” referans alındı. Protein tanımlamaları en az 2 “unique peptide” göre yapıldı ve “FDR: 4” seçildi. Verilerinin istatistiksel analizi “ANOVA” ile yapıldı ve $p < 0.05$ anlamlı kabul edildi. ROC analizi, heatmap ve diğer grafikler “GraphPad Prism v9.1.0” programı ile yapıldı. İHK sonuçlarına ait verilerin dağılımı “Shapiro-Wilk testi” ile değerlendirildi. KİOMT’li ve KİMT’li örneklerle ait İHK sonuçları “Mann Whitney U” testi ile analiz edildi. Subgruplara ayrılmış mesane tümör dokuları ile eşlenik NAT örneklerinin ve Tumor-Free mesane dokularının İHK sonuçları “Kruskal Wallis” testi ile değerlendirildi. SBSN’nin 3D yapısının görselleştirilmesi için “AlphaFold Protein Structure Database’i (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>)” ve “PyMOL 2.5” programı kullanıldı. Biyoinformatik analizler için “Proteomics DB (<https://www.proteomicsdb.org/>)”, “STRING (<https://string-db.org/>)”, “PANTHER (<http://www.pantherdb.org/>)”, “The SIGNaling Network Open Resource (Signor 3.0) (<https://signor.uniroma2.it/>)” database’leri kullanıldı. Publicly available TCGA ve GTEx verileri ile yapılan veri madenciliği için “GEPIA 2.0” arayüzü kullanıldı. İllüstrasyonların oluşturulması için “BioRender (<https://www.biorender.com/>)” programından yararlanıldı.

4. BULGULAR

4.1. NTA ile Eksozom Karakterizasyonu

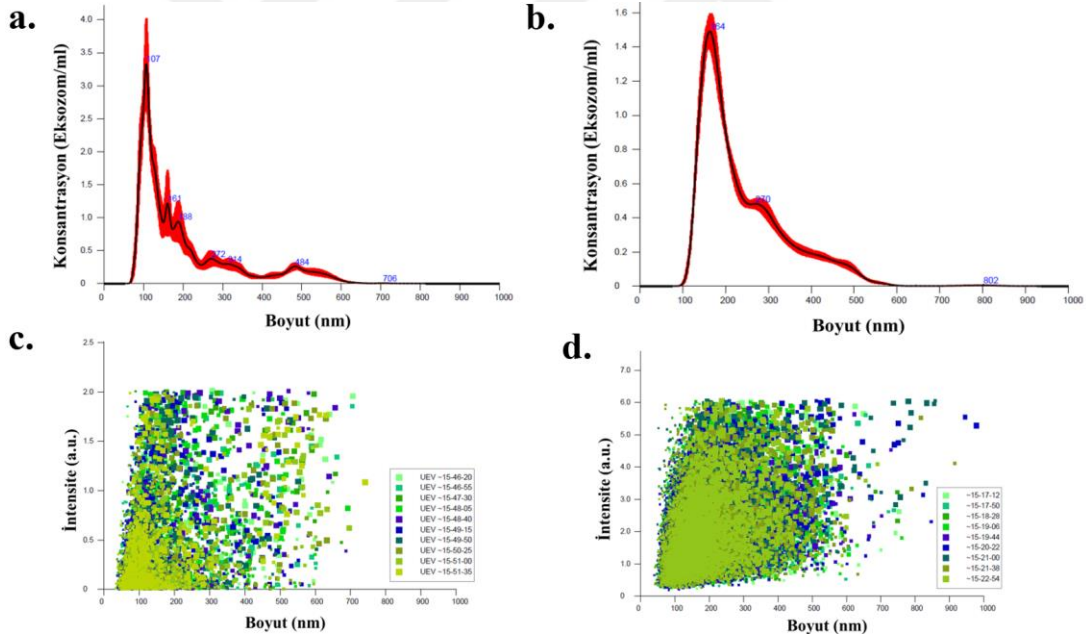
Sağlıklı katılımcılardan birisine ait idrar örneğinin alikotlarından PEG temelli kit ve ultrasantrifüj yardımıyla ayrı ayrı izole edilen eksozomlar yöntem kısmında detayları belirtildiği şekilde NTA ile karakterize edildi ve eksozomların canlı görüntüleri cihaza özgü “Nanoparticle Viewing Unit” aracılığıyla kaydedilmiş olup Şekil 4-1a’da kit ile izole edilen idrar eksozomları; Şekil 4-1b’de ultrasantrifüj ile izole edilen idrar eksozomları görülmektedir. Görüntülerde eksozomlara özgü Brownian Motion’ın (Zycienska ve ark. 2022) eksozomların çevresinde halo yarattığı izlenmektedir.



Şekil 4-1: NTA analizi esnasında eksozomların “Nanoparticle Viewing Unit” ile elde edilen görüntüleri. PEG temelli kit ile izole edilen (a) ve ultrasantrifüj ile izole edilen (b) idrar eksozomlarının çevresinde Brownian Motion’dan dolayı oluşan halolar izlenmektedir.

NTA analizi neticesinde idrar eksozomlarının rölatif konsantrasyonları ve boyutlarının dağılımı belirlenmiştir (Şekil 4-2). PEG temelli kit ile izole edilen eksozomların konsantrasyonu yaklaşık olarak $2,75 \cdot 10^{10} \pm 8,75 \cdot 10^8$ eksozom/mL olarak bulunmuştur (Şekil 4-2a). PEG temelli kit ile izole edilen idrar eksozomlarına ait ortalama boyutun 204,4 nm ($\pm 4,4$ nm) olduğu fakat intensitesi en fazla olan

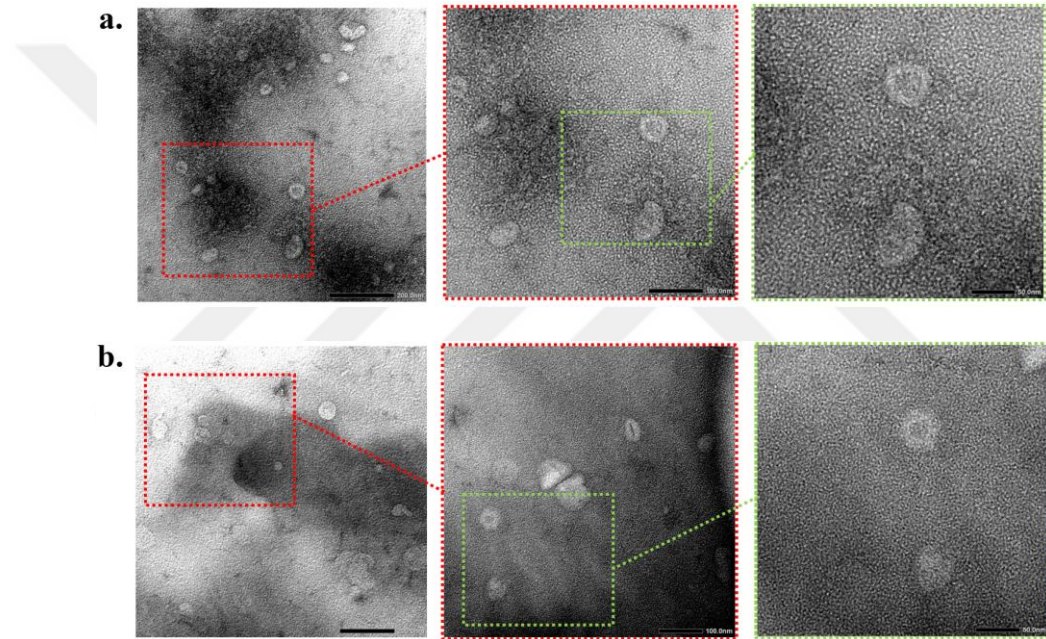
eksozomların 117,3 nm ($\pm 9,2$ nm) boyutunda olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4-2c). Eksozomlar için kabul edilen yaygın boyut aralığı 30-150 nm'dir. PEG temelli kit ile yapılan izolasyonda eksozomlara ait D10 değeri (örnekteki eksozomların %10'unun verilen nm'nin altında bir boyuta sahip olduğunu tarif eder) 96,5 nm ($\pm 1,9$ nm), D50 değeri 149.1 nm (± 6 nm) ve D90 değeri 438.3 nm ($\pm 18,2$ nm) olarak bulunmuştur. Ultrasantrifüj ile izole edilen eksozomların konsantrasyonu yaklaşık olarak $1,95.10^{11} \pm 3,41.10^9$ eksozom/ml olarak bulunmuştur (Şekil 4-2b). Ultrasantrifüj ile izole edilen idrar eksozomlarına ait ortalama boyutun 241 nm (± 2 nm) olduğu fakat intensitesi en fazla olan eksozomların 163,7 nm ($\pm 3,8$ nm) boyutunda olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4-2d). Ultrasantrifüj ile yapılan izolasyonda eksozomlara ait D10 değeri 143,3 nm ($\pm 0,9$ nm), D50 değeri 205,2 nm ($\pm 2,5$ nm) ve D90 değeri 402 nm ($\pm 6,5$ nm) olarak bulunmuştur.



Şekil 4-2: NTA analizi sonuçlarına göre idrar eksozomlarına ait Konsantrasyon (Eksozom/mL)/Boyut ve İntensite (a.u.)/Boyut (nm) grafikleri. PEG temelli kit ile yapılan izolasyon neticesinde eksozom konsantrasyonu (a) $2,75.10^{10} \pm 8,75.10^8$ eksozom/mL; intensitesi en fazla olan eksozomlara ait boyut (c) 117,3 nm ($\pm 9,2$ nm) olarak bulunmuştur. Ultrasantrifüj ile yapılan izolasyon neticesinde eksozom konsantrasyonu (b) $1,95.10^{11} \pm 3,41.10^9$ eksozom/mL; intensitesi en fazla olan eksozomlara ait boyut (d) 163,7 nm ($\pm 3,8$ nm) olarak bulunmuştur.

4.2. TEM ile Eksozom Karakterizasyonu

Sağlıklı Katılımcılardan birisine ait idrar örneğinin alikotlarından PEG temelli kit ve ultrasantrifüj ile ayrı ayrı izole edilen eksozomlar yöntem kısmında detayları belirtildiği şekilde TEM ile görüntülenerek yapısal yönden karakterize edildi (Şekil 4-3). PEG temelli kit ile izole edilen eksozomlara ait TEM görüntüleri Şekil 4-3a'da; ultrasantrifüj ile izole edilen eksozomlara ait TEM görüntüleri Şekil 4-3b'de gösterilmiştir. Eksomların intakt halde ve uygun konsantrasyonda elde edilebildiği anlaşıldıktan sonra downstream analizlere devam edilmiştir.



Şekil 4-3: TEM ile yapılan eksozom karakterizasyonuna ait görüntüler. (a) PEG temelli kit ile izole edilen eksozomların görüntüleri ve (b) ultrasantrifüj ile izole edilen eksozomların görüntüleri ayrı ayrı verilmiştir (scale bar'lar soldan sağa sırayla; 200 nm, 100 nm ve 50 nm).

4.3. Üriner Eksozomların miRNA Profili

Hepsi erkek olan KİOMT'li 10 vakanın (n=3 Ta-Low Grade, n=3 Ta-High Grade ve n=4 T1-High Grade) TUR-MT öncesinde alınan idrar örneklerinden PEG temelli kit ile izole edilen eksozomlarda 87 adet miRNA'nın (Tablo 3-5) değişimi qRT-PCR ile kantite edildi. C_T değerleri Andersen ve arkadaşlarının tarif ettiği şekilde normalize edildi (Andersen ve ark. 2004). MK'lı vakalara ait yaş ortalaması 65,9 ($\pm 8,2$) ve VKİ ortalaması 27,2 ($\pm 2,4$) olarak tespit edilmiş olup MK'lı vakalara ait demografik ve klinik bilgiler Tablo 4-1'de verilmiştir. Çalışmaya hepsi erkek olan 6 sağlıklı

katılımcı da dahil edildi. Sağlıklı katılımcılar çalışmaya dahil edilirken malignite öyküsü, İYE öyküsü, HBV öyküsü ve son 6 ay içerisinde COVID-19 enfeksiyonu geçirip geçirmediği sorgulandı ve pozitif cevap alınan bireyler çalışmadan dışlandı. Sağlıklı katılımcılara ait yaş ortalaması 62,6 ($\pm 12,3$) ve VKİ ortalaması 27,4 ($\pm 2,7$) olarak tespit edilmiş olup sağlıklı katılımcılara ait demografik bilgiler Tablo 4-2’de verilmiştir.

Tablo 4-1: KİOMT’li 10 vakaya ait demografik ve klinik bilgiler.

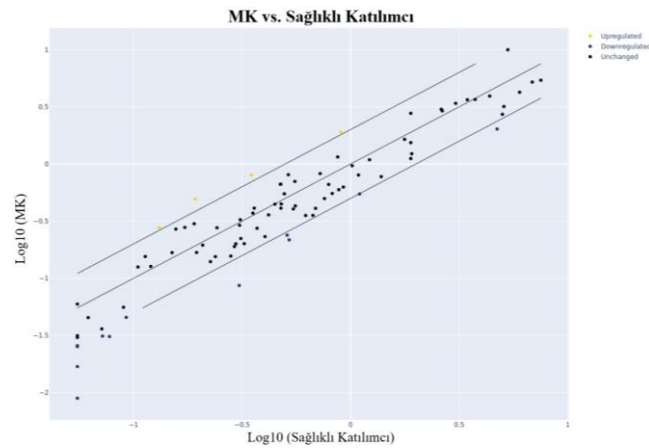
Vaka	E/K	Yaş	VKİ	Tümör (cm)	Primer/Rekürrens	Fokalite	pT	Grade	CIS	Lenfovasküler İnvazyon
MK-1	E	66	31,1	≤ 3 cm	Rekürrens	Multifokal	Ta	Low	Hayır	Negatif
MK-2	E	59	28,3	≤ 3 cm	Primer	Unifokal	Ta	Low	Hayır	Negatif
MK-3	E	65	27,4	≤ 3 cm	Primer	Unifokal	Ta	Low	Hayır	Negatif
MK-4	E	69	25,6	> 3 cm	Primer	Multifokal	Ta	High	Hayır	Negatif
MK-5	E	81	26,1	> 3 cm	Primer	Unifokal	Ta	High	Hayır	Negatif
MK-6	E	55	29,4	≤ 3 cm	Rekürrens	Multifokal	Ta	High	Hayır	Negatif
MK-7	E	62	23,6	> 3 cm	Primer	Multifokal	T1	High	Hayır	Negatif
MK-8	E	55	25	> 3 cm	Primer	Multifokal	T1	High	Hayır	Negatif
MK-9	E	70	30,4	> 3 cm	Primer	Unifokal	T1	High	Hayır	Negatif
MK-10	E	77	24,7	> 3 cm	Rekürrens	Multifokal	T1	High	Hayır	Negatif

Tablo 4-2: Sağlıklı 6 katılımcıya ait demografik bilgiler.

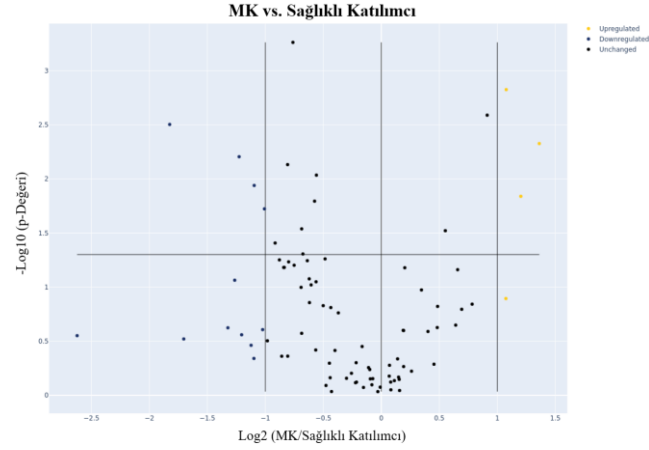
Katılımcı	E/K	Yaş	VKİ
S-1	E	62	28,7
S-2	E	46	30,1
S-3	E	49	22,6
S-4	E	71	26,5
S-5	E	66	28,8
S-6	E	82	29,1

qRT-PCR ile elde edilen 87 miRNA’ya ait normalize edilmiş kantitasyon sonuçlarının dağılımı Şekil 4-4’te Scatter Plot ve Şekil 4-5’te Volcano Plot ile görselleştirilmiştir. Scatter Plot; sağlıklı katılımcılar ve MK arasındaki büyük miRNA ekspresyon değişikliklerini iki grubu karşılaştırarak hızlı bir şekilde görselleştirmektedir. Merkezdeki diyagonal çizgi, değişmemiş miRNA ekspresyonlarını gösterirken dış diyagonal çizgiler değişimin kaç kat olduğunu ifade eden Fold-Regulation (FR) threshold’larını temsil etmektedir. Sağ ve sol alt köşelerdeki dış çizgilerin ötesinde

bulunan noktaların temsil etmiş olduğu miRNA'lar, x-ekseni grubuna göre y-ekseni grubunda FR threshold'undan daha fazla upregüle ya da downregüle olmuşlardır. Volcano Plot, miRNA anlatımındaki Fold-Change'lerin (FC) $\log_2$ 'sini alarak x-ekseni üzerinde; miRNA FC'lerinin istatistiksel anlamlılık düzeylerini ise y-ekseninde çizerek sağlıklı katılımcılar ve MK arasındaki büyük miRNA ekspresyon değişikliklerini görselleştirmektedir. Ortadaki dikey çizgi, değişmemiş miRNA ifadesini gösterirken iki dış dikey çizgi FR threshold'larını temsil etmektedir. Yatay çizgi seçilen p-değeri threshold'unu göstermektedir. Volcano Plot, sağlıklı katılımcılar ve MK'lı vakalar arasındaki miRNA anlatımlarına ait FR'leri, p-değerleri ile birleştirerek büyük ve küçük miRNA anlatım değişikliklerini görselleştirmektedir. Sağlıklı katılımcılara kıyasla MK'da upregüle olan miRNA'lar sarı; downregüle olanlar mavi ve düzeyi değişmeyenler siyah renkli noktalarla ifade edilmiştir. Sağlıklı katılımcılar ve MK'lı vakalar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılığa ($p < 0.05$; FR threshold: > 2) sahip olan miRNA'lar Tablo 4-3'te ifade edilmiştir. Buna göre; "hsa-miRNA-191-5p (FR: 2,11; $p = 0.001493$), hsa-miRNA-193b-3p (FR: 2,3; $p = 0.014477$), hsa-miRNA-425-5p (FR: 2,57; $p = 0.004707$), hsa-let-7f-5p (FR: -2,14; $p = 0.011490$), hsa-miRNA-30a-5p (-2,34; $p = 0.006231$), hsa-miRNA-30e-3p (FR: -2,01; $p = 0.018903$) ve hsa-miRNA-101-3p (FR: -3,54; $p = 0.003133$)" olmak üzere 7 miRNA'nın sağlıklı katılımcılar ile MK'lı vakaların idrar eksozomlarında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) düzeyde farklı anlatıma sahip olduğu saptanmıştır.

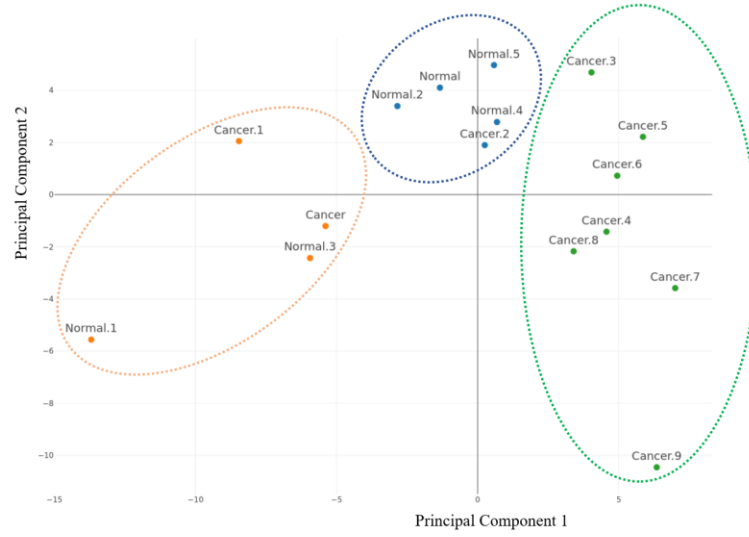


Şekil 4-4: 87 miRNA'nın kantitasyon sonucunun dağılımını gösteren Scatter Plot. Sağlıklı katılımcılara kıyasla MK'da upregüle olan miRNA'lar sarı; downregüle olanlar mavi ve düzeyi değişmeyenler siyah renkli noktalarla ifade edilmiştir.



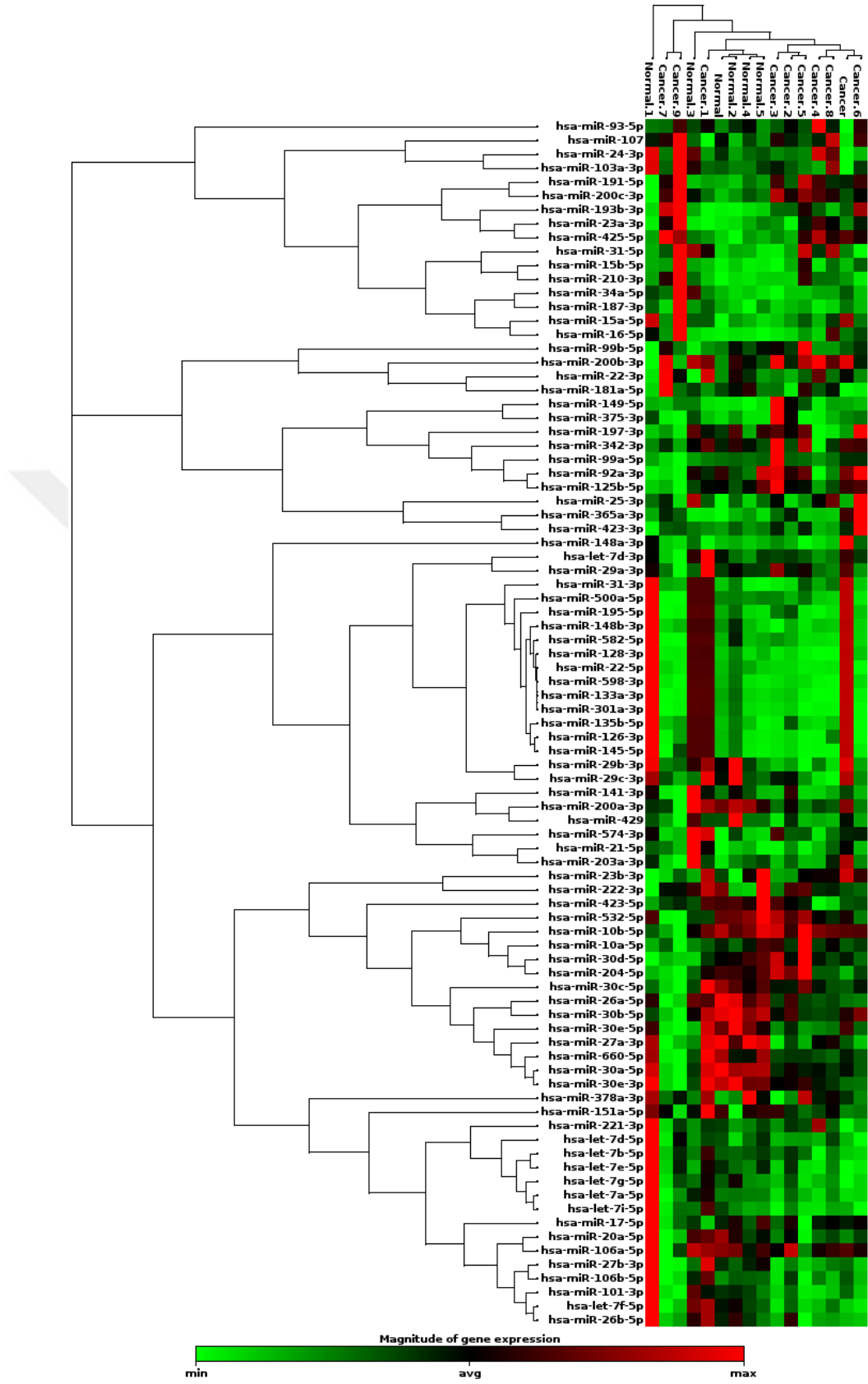
Şekil 4-5: 87 miRNA'nın kantitasyon sonucunun dağılımını gösteren Volcano Plot. Sağlıklı katılımcılara kıyasla MK'da upregüle olan miRNA'lar sarı; downregüle olanlar mavi ve düzeyi değişmeyenler siyah renkli noktalarla ifade edilmiştir.

Principal Component Analysis (PCA), üriner eksozomlardaki rölatif miRNA anlatım seviyelerine dayanarak her bir örneğin birbiri ile olan ilişkisini görselleştirmektedir ve veri analizi imkanı sağlamaktadır (Şekil 4-6). Çalışmamızda yapılan PCA analizi, örnekleri 3 gruba ayırmıştır. Normal-Normal 5; sağlıklı katılımcıları temsil etmektedir. Cancer-Cancer 2; Ta-Low Grade olan MK'lı vakaları temsil etmektedir. Cancer 3-Cancer 5; Ta-High Grade olan MK'lı vakaları temsil ederken, Cancer 6-Cancer 9 ise T1-High Grade olan MK'lı vakaları temsil etmektedir. PCA analizine dayanarak kantite edilen 87 miRNA'nın sağlıklı katılımcılar ile Ta-Low Grade olan MK'lı vakalar arasında benzerlik gösterdiği görülmektedir (turuncu ve mavi renkli kümeler). Buna karşılık kantite edilen 87 miRNA'nın Ta-High Grade ve T1-High Grade vakalar ile sağlıklı katılımcıları birbirinden ayrı gruplayabildiği anlaşılmaktadır (yeşil renkli küme). PCA grafiğinde, birinci principal component (yani x-ekseni) verilerdeki en büyük değişkenliği açıklarken ikinci principal component (yani y-ekseni) ikinci en büyük değişkenliği açıklamakta ve böylece verileri 2 boyutlu olarak kümelendirmektedir. Şekil 4-6'da yer alan yeşil kümedeki T1-High Grade olan MK örneklerinin ekseriyetle x-ekseni altında, Ta-High Grade olan MK örneklerinin ise x-ekseni üzerinde yer alması kantite edilen 87 miRNA'nın aynı kümede yer alan Ta-High Grade ve T1-High Grade vakaları da kendi içerisinde gruplandırabileceğine işaret etmektedir. Sonuç olarak üriner eksozomlardaki miRNA anlatım farklılığı bu pilot örneklemede KİOMK'lı vakalar ile sağlıklı katılımcıları birbirinden farklı olarak kümelendirebilecek performanstadır.



Şekil 4-6: 87 miRNA'nın kantitasyon sonucunun dağılımını gösteren Principal Component Analysis (PCA) grafiği. Turuncu kümede Normal 1 ve 3: sağlıklı katılımcılar; Cancer ve Cancer 1 ise Ta-Low Grade MK'lı vakalardır. Mavi kümede Normal 2, 4 ve 5: sağlıklı katılımcılar; Cancer 2 ise Ta-Low Grade bir MK'lı vakadır. Yeşil küme Cancer 3, 4 ve 5 Ta-High Grade olan MK'lı vakalarken, Cancer 6, 7, 8 ve 9 ise T1-High Grade MK'lı vakalardır.

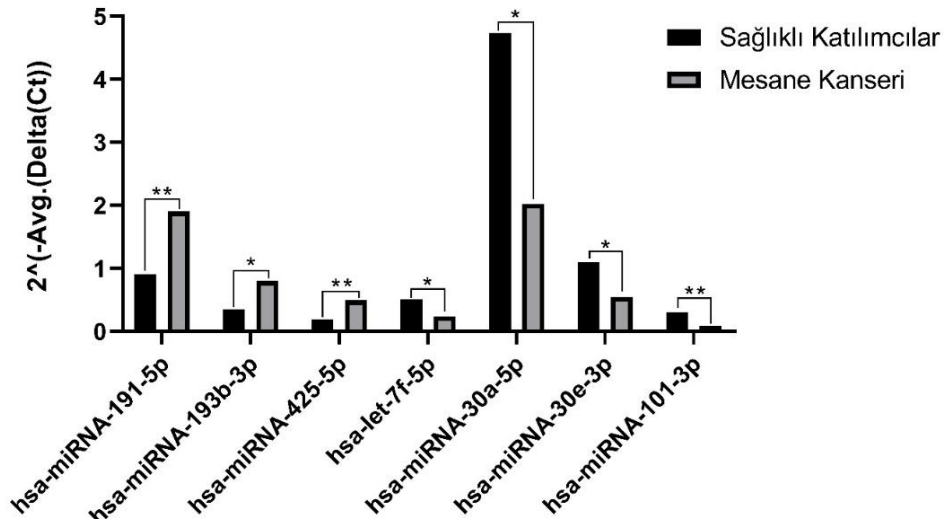
Tüm örneklerdeki 87 miRNA'nın değişimini beraber değerlendirerek görselleştiren ve sınıflandıran “clustergram” ise Şekil 4-7’de verilmiştir. qRT-PCR sonuçları birlikte değerlendirildiğinde toplamda 16 miRNA'nın MK'lı vakalar ile sağlıklı katılımcılar arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) düzeyde farklı anlatıma sahip olduğu anlaşılmıştır. Bu miRNA'lar FR threshold > 2 olacak şekilde sınıflandırıldığında 7 miRNA'nın 2 kat ya da daha fazla upregüle/downregüle olduğu saptanmış olup bu miRNA'ların adları yukarıda tek tek verilmiş ve Tablo 4-3'te gösterilmiştir. Ayrıca bu 7 miRNA'ya ait normalize edilmiş C_T değerlerine ait ortalama değişim, $2^{(-Average (Delta C_T))}$ formülüyle hesaplanarak Şekil 4-8’de istatistiksel anlamlılıklarını da içerecek şekilde görselleştirilmiştir. Sağlıklı katılımcılar ile KİOMT'li vakalar arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) düzeyde farklı anlatıma sahip olan 16 miRNA FR threshold 1 ile 2 arasında olacak şekilde sınıflandırıldığında ise 9 miRNA'nın anlamlı düzeyde upregüle/downregüle olduğu anlaşılmakta olup bu miRNA'lar Tablo 4-4’te gösterilmiştir. Bu miRNA'lardan 3 tanesinin “(hsa-miRNA-200c-3p (FR: 1,88; $p = 0.002573$), hsa-miRNA-429 (FR: -1,61; $p = 0.028942$) ve hsa-miRNA-200a-3p (FR: -1,49; $p = 0.016047$))” ilginç şekilde miRNA-200 ailesine ait olduğu anlaşılmış ve bunlar arasından hsa-miRNA-200a-3p'nin anlatımı (kırmızı renkle gösterilmiştir) sonraki aşamada doku örneklerinde valide edilmiştir.



Şekil 4-7: 87 miRNA'nın kantitasyon sonucuna göre MK'lı vakaları ve sağlıklı katılımcıları sınıflandıran clustergram.

Tablo 4-3: Sağlıklı katılımcılar ile MK'lı vakaların üriner ekzozomları arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) düzeyde farklılık gösteren miRNA'lar (FR threshold >2 alınmıştır). Sarı renkli miRNA'lar MK'da sağlıklı katılımcılara kıyasla upregüle olanları; mavi renkliler ise downregüle olanları temsil etmektedir. Colour code'lar Scatter Plot ve Volcano Plot ile eşleniktir.

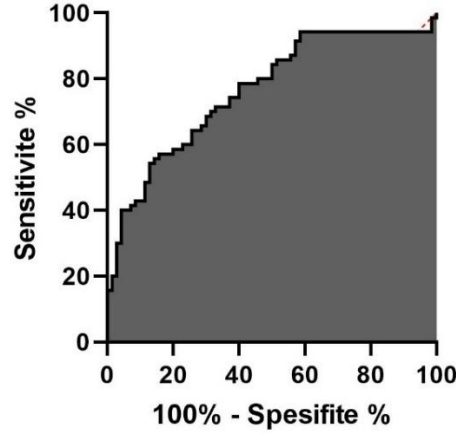
miRNA Adı	Fold-Regulation (>2)	p-Değeri ($p<0.05$)
hsa-miRNA-191-5p	2,11	$p=0.001493$
hsa-miRNA-193b-3p	2,3	$p=0.014477$
hsa-miRNA-425-5p	2,57	$p=0.004707$
hsa-let-7f-5p	-2,14	$p=0.011490$
hsa-miRNA-30a-5p	-2,34	$p=0.006231$
hsa-miRNA-30e-3p	-2,01	$p=0.018903$
hsa-miRNA-101-3p	-3,54	$p=0.003133$



Şekil 4-8: Sağlıklı katılımcılar ile KİOMT'li vakaların üriner ekzozomları arasında istatistiksel olarak anlamlı ($*p<0.05$; $**p<0.005$) düzeyde farklılık gösteren miRNA'lar (FR threshold >2). Figür ilgili miRNA'ların normalize edilmiş C_T değerlerine ait ortalama değişimi tarif etmektedir.

Sağlıklı katılımcılar ile MK'lı vakalar arasında anlamlı ($p<0.05$) düzeyde değişim gösteren Tablo 4-3'teki 7 miRNA'nın MK'lı vakaları sağlıklı kontrollerden ayırabilme performansı için miRNA'lara ait $2^{(-\Delta C_T)}$ değerleri kullanılarak Receiver Operating Characteristic (ROC) analizi yapılmıştır (Şekil 4-9). ROC analizi, tespit edilen 7 miRNA'nın istatistiksel olarak yüksek anlamlılık ($p<0.0001$) düzeyinde sağlıklı katılımcılar ile MK'lı vakaları birbirinden ayırabildiğini göstermiştir (AUC: 0,7641; %95 CI: 0,6850-0,8432).

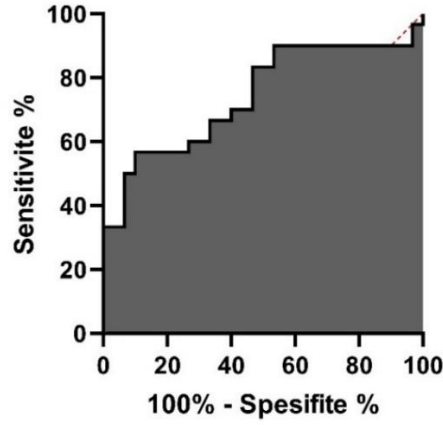
ROC Curve: Sağlıklı Katılımcılar vs. MK



Şekil 4-9: Sağlıklı katılımcılar ile MK'lı vakalar arasında anlamlı düzeyde değişim gösteren 7 miRNA'ya ait ROC analizi. Yedi miRNA'dan oluşan bu panelin istatistiksel olarak yüksek anlamlılık ($p < 0.0001$) düzeyinde sağlıklı katılımcılar ile MK'lı vakaları birbirinden ayırabildiği anlaşılmaktadır (AUC: 0,7641; %95 CI: 0,6850-0,8432).

Çalışmanın sonraki aşamasında 7 miRNA içerisinde istatistiksel anlamlılık ($p < 0.005$) düzeyi diğerlerine nazaran daha yüksek olan 3 miRNA (hsa-miRNA-191-5p, hsa-miRNA-425-5p ve hsa-miRNA-101-3p) seçilerek bu 3'lü miRNA panelinin MK'lı vakaları sağlıklı katılımcılardan ayırabilme performansını tespit edebilmek için yine miRNA'lara ait $2^{(-\Delta C_T)}$ değerleri kullanılarak ROC analizi yapılmıştır (Şekil 4-10). ROC analizi, tespit edilen 3 miRNA'nın istatistiksel olarak yüksek anlamlılık ($p = 0.0013$) düzeyinde sağlıklı katılımcılar ile MK'lı vakaları birbirinden ayırabildiğini göstermiştir (AUC: 0,7422; %95 CI: 0,6137-0,8707).

ROC Curve: Sağlıklı Katılımcılar vs. MK (3'lü Panel)



Şekil 4-10: Sağlıklı katılımcılar ile MK'lı vakalar arasında anlamlı düzeyde değişim gösteren 3 miRNA'ya ait ROC analizi. Üçlü panelin istatistiksel olarak yüksek anlamlılık ($p=0.0013$) düzeyinde sağlıklı katılımcılar ile MK'lı vakaları birbirinden ayırabildiği anlaşılmaktadır (AUC: 0,7422; %95 CI: 0,6137-0,8707).

Tablo 4-4: Sağlıklı katılımcılar ile MK'lı vakaların üriner eksozomları arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) düzeyde farklılık gösteren miRNA'lar (FR threshold >1 alınmıştır). Yıldızlı (*) miRNA'lar miRNA-200 ailesine aittir. Kırmızı renkle işaretlenmiş hsa-miRNA-200a-3p, qRT-PCR ile doku örneklerinde kantite edilmiştir.

miRNA Adı	Fold-Regulation (>1)	p-Değeri ($p<0.05$)
hsa-miRNA-23a-3p	1,47	$p=0.030095$
hsa-miRNA-200c-3p	1,88*	$p=0.002573$
hsa-miRNA-20a-5p	-1,75	$p=0.007369$
hsa-miRNA-26a-5p	-1,7	$p=0.000546$
hsa-miRNA-26b-5p	-1,89	$p=0.039127$
hsa-miRNA-27a-3p	-1,47	$p=0.009222$
hsa-miRNA-30b-5p	-1,6	$p=0.049381$
hsa-miRNA-429	-1,61*	$p=0.028942$
hsa-miRNA-200a-3p	-1,49*	$p=0.016047$

Sağlıklı katılımcılar ile KİOMT'li vakaların subgrupları arasındaki miRNA değişimleri ayrı olarak da incelenerek tablolarda ifade edilmiştir (FR threshold >2 alınmıştır). Sağlıklı katılımcılar ile Ta evre (Low Grade ve High Grade birlikte) MK'lı vakalar arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) farklılık gösteren 2 miRNA (Tablo 4-5); Sağlıklı katılımcılar ile T1-High Grade evre MK'lı vakalar arasında anlamlı ($p<0.05$) farklılık gösteren 21 miRNA (Tablo 4-6); Ta evre (Low Grade ve High Grade birlikte) MK'lı vakalar ile T1-High Grade evre MK'lı vakalar arasında anlamlı ($p<0.05$)

farklılık gösteren 5 miRNA (Tablo 4-7); Sağlıklı katılımcılar ile Ta-High Grade evre MK'lı vakalar arasında anlamlı ($p<0.05$) farklılık gösteren 9 miRNA (Tablo 4-8); Ta-Low Grade ve Ta-High Grade evre MK'lı vakalar arasında anlamlı ($p<0.05$) farklılık gösteren 6 miRNA (Tablo 4-9); Ta-Low Grade evre MK'lı vakalar ile T1-High Grade evre MK'lı vakalar arasında anlamlı ($p<0.05$) farklılık gösteren 15 miRNA (Tablo 4-10); Ta-High Grade evre MK'lı vakalar ile T1-High Grade evre MK'lı vakalar arasında anlamlı ($p<0.05$) farklılık gösteren 5 miRNA (Tablo 4-11) bulunmuştur. Ta-Low Grade evre MK'lı vakalar ile sağlıklı katılımcılar arasında FR threshold >2 için istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) düzeyde farklılık gösteren miRNA saptanmamıştır. Genel anlamda bu pilot çalışmanın sonuçları üriner eksozomlara ait miRNA profilinin MK subgruplarını birbirinden ayırabileceğine işaret etmektedir.

Tablo 4-5: Sağlıklı katılımcılar ile Ta evre (Ta-Low Grade+ Ta-High Grade) MK'lı vakaların üriner eksozomları arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) düzeyde farklılık gösteren miRNA'lar (FR threshold >2 alınmıştır).

miRNA Adı	Fold-Regulation (>2)	p-Değeri ($p<0.05$)
hsa-miRNA-425-5p	2,09	$p=0.037104$
hsa-miRNA-101-3p	-2,65	$p=0.036887$

Tablo 4-6: Sağlıklı katılımcılar ile T1-High Grade evre MK'lı vakaların üriner eksozomları arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) düzeyde farklılık gösteren miRNA'lar (FR threshold >2 alınmıştır). Yıldızlı (*) miRNA miRNA-200 ailesine aittir.

miRNA Adı	Fold-Regulation (>2)	p-Değeri ($p<0.05$)
hsa-miRNA-15b-5p	2,7	$p=0.043625$
hsa-miRNA-16-5p	2,65	$p=0.029051$
hsa-miRNA-191-5p	2,36	$p=0.001899$
hsa-miRNA-193b-3p	3,26	$p=0.003830$
hsa-miRNA-200c-3p	2,04*	$p=0.006485$
hsa-miRNA-425-5p	3,51	$p=0.000300$
hsa-let-7f-5p	-2,54	$p=0.011396$
hsa-miRNA-26a-5p	-2,18	$p=0.000517$
hsa-miRNA-26b-5p	-2,19	$p=0.016064$
hsa-miRNA-27b-3p	-2,31	$p=0.022284$
hsa-miRNA-30a-5p	-4,82	$p=0.001625$
hsa-miRNA-30b-5p	-2,28	$p=0.043355$
hsa-miRNA-30c-5p	-2,05	$p=0.036718$
hsa-miRNA-30e-3p	-3,66	$p=0.003359$
hsa-miRNA-30e-5p	-2,61	$p=0.017904$

hsa-miRNA-101-3p	-5,46	p=0.011888
hsa-miRNA-106a-5p	-6,05	p=0.036242
hsa-miRNA-106b-5p	-2,12	p=0.048020
hsa-miRNA-500a-5p	-4,64	p=0.043585
hsa-miRNA-532-5p	-2,58	p=0.003654
hsa-miRNA-660-5p	-3,12	p=0.008204

Tablo 4-7: Ta evre (Ta-Low Grade+ Ta-High Grade) MK'lı vakalar ile T1-High Grade evre MK'lı vakaların üriner eksozomları arasında istatistiksel olarak anlamlı (p<0.05) düzeyde farklılık gösteren miRNA'lar (FR threshold >2 alınmıştır).

miRNA Adı	Fold-Regulation (>2)	p-Değeri (p<0.05)
hsa-miRNA-10b-5p	2,47	p=0.038102
hsa-miRNA-30a-5p	3,33	p=0.023672
hsa-miRNA-30e-5p	2,72	p=0.028807
hsa-miRNA-532-5p	2,37	p=0.006484
hsa-miRNA-16-5p	-2,42	p=0.016825

Tablo 4-8: Sağlıklı katılımcılar ile Ta-High Grade evre MK'lı vakaların üriner eksozomları arasında istatistiksel olarak anlamlı (p<0.05) düzeyde farklılık gösteren miRNA'lar (FR threshold >2 alınmıştır). Yıldızlı (*) miRNA miRNA-200 ailesine aittir.

miRNA Adı	Fold-Regulation (>2)	p-Değeri (p<0.05)
hsa-miRNA-191-5p	2,63	p=0.000156
hsa-miRNA-193b-3p	2,3	p=0.001602
hsa-miRNA-200c-3p	2,27*	p=0.001553
hsa-miRNA-425-5p	2,6	p=0.015802
hsa-let-7f-5p	-2,64	p=0.016992
hsa-miRNA-20a-5p	-2,08	p=0.018131
hsa-miRNA-26b-5p	-2,62	p=0.025547
hsa-miRNA-27b-3p	-2,17	p=0.041327
hsa-miRNA-101-3p	-5,26	p=0.025261

Tablo 4-9: Ta-Low Grade evre MK'lı vakalar ile Ta-High Grade MK'lı vakaların üriner eksozomları arasında istatistiksel olarak anlamlı (p<0.05) düzeyde farklılık gösteren miRNA'lar (FR threshold >2 alınmıştır). Yıldızlı (*) miRNA miRNA-200 ailesine aittir.

miRNA Adı	Fold-Regulation (>2)	p-Değeri (p<0.05)
hsa-miRNA-21-5p	2,94	p=0.026529
hsa-miRNA-30e-5p	2,14	p=0.037413
hsa-miRNA-101-3p	3,93	p=0.006989
hsa-miRNA-135b-5p	5,71	p=0.023687
hsa-miRNA-141-3p	2,05*	p=0.005010
hsa-miRNA-195-5p	8,01	p=0.039196

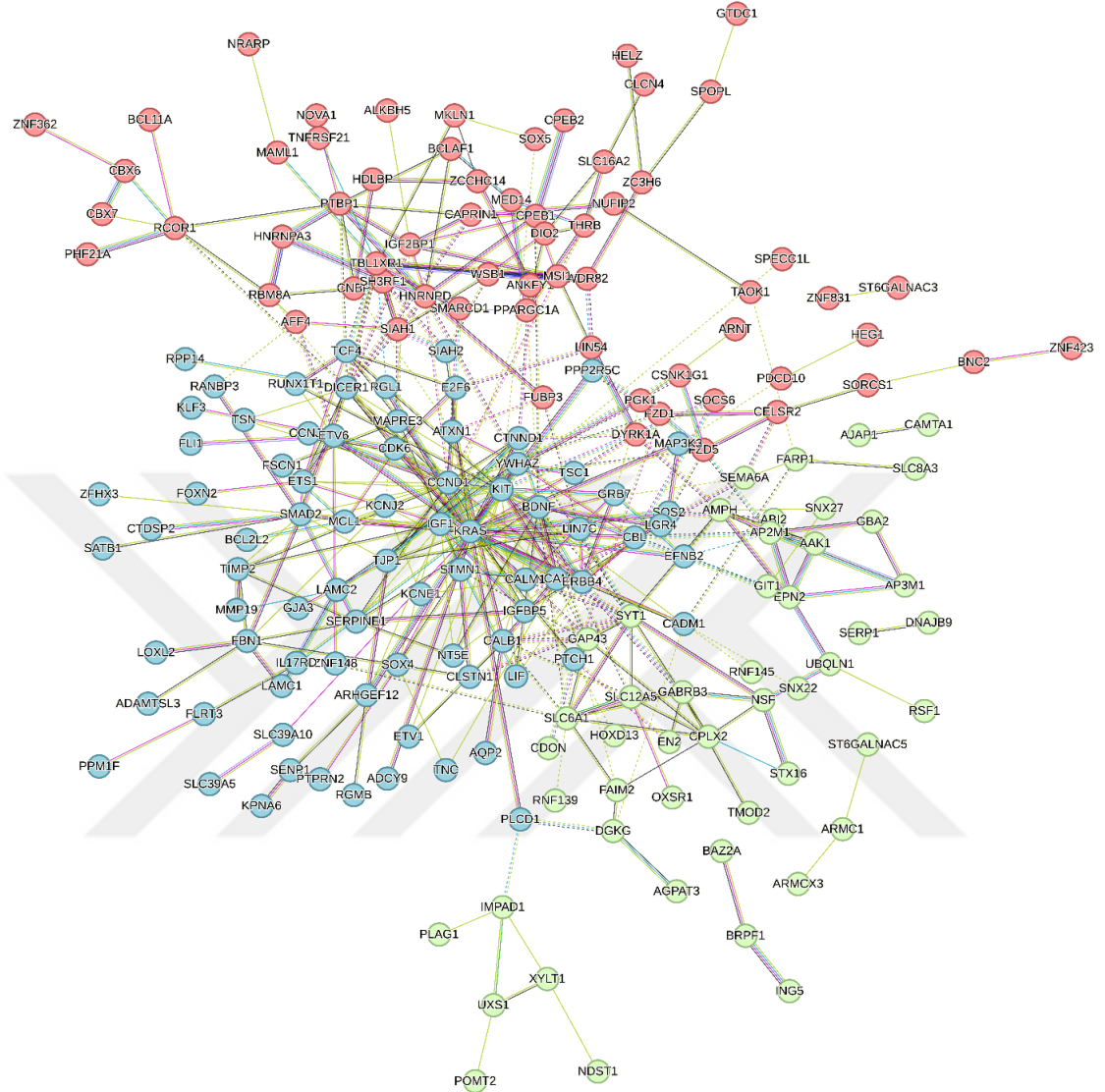
Tablo 4-10: Ta-Low Grade evre MK'lı vakalar ile T1-High Grade MK'lı vakaların üriner eksozomları arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) düzeyde farklılık gösteren miRNA'lar (FR threshold >2 alınmıştır). Yıldızlı (*) miRNA miRNA-200 ailesine aittir.

miRNA Adı	Fold-Regulation (>2)	p-Değeri ($p<0.05$)
hsa-let-7d-3p	2,32	$p=0.045378$
hsa-miRNA-30a-5p	3,9	$p=0.041424$
hsa-miRNA-30e-5p	2,87	$p=0.020231$
hsa-miRNA-101-3p	4,08	$p=0.003734$
hsa-miRNA-106b-5p	2,35	$p=0.012199$
hsa-miRNA-133a-3p	38,66	$p=0.036052$
hsa-miRNA-135b-5p	4,45	$p=0.014035$
hsa-miRNA-141-3p	2,12*	$p=0.003144$
hsa-miRNA-148b-3p	2,72	$p=0.049712$
hsa-miRNA-195-5p	13,84	$p=0.007123$
hsa-miRNA-301a-3p	13,92	$p=0.040163$
hsa-miRNA-500a-5p	5,68	$p=0.034177$
hsa-miRNA-532-5p	2,1	$p=0.049684$
hsa-miRNA-582-5p	8,61	$p=0.030915$
hsa-miRNA-598-3p	7,41	$p=0.049308$

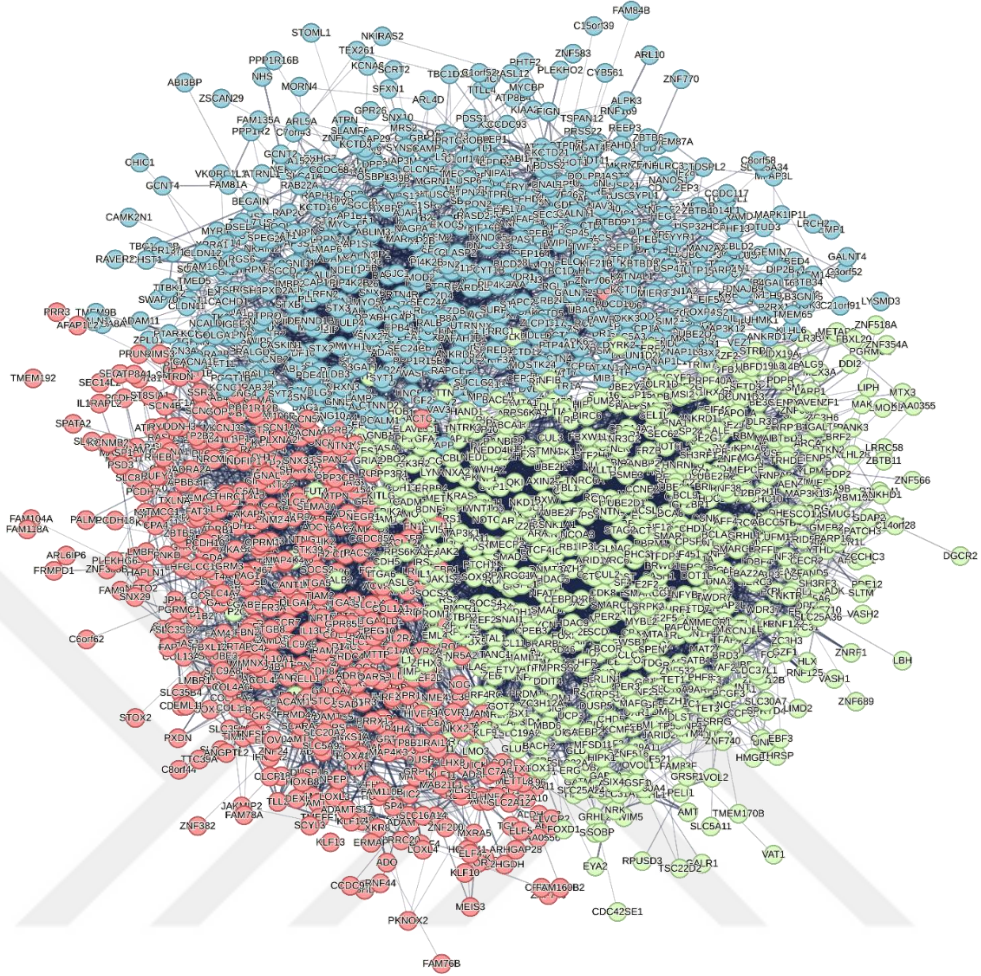
Tablo 4-11: Ta-High Grade evre MK'lı vakalar ile T1-High Grade evre MK'lı vakaların üriner eksozomları arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) düzeyde farklılık gösteren miRNA'lar (FR threshold >2 alınmıştır).

miRNA Adı	Fold-Regulation (>2)	p-Değeri ($p<0.05$)
hsa-miRNA-30d-5p	2,07	$p=0.015567$
hsa-miRNA-30e-3p	2,68	$p=0.031559$
hsa-miRNA-204-5p	4,46	$p=0.045433$
hsa-miRNA-500a-5p	2,77	$p=0.019111$
hsa-miRNA-532-5p	2,68	$p=0.013760$

Sağlıklı katılımcılar ile MK'lı vakaların üriner eksozomları arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) düzeyde farklılık gösteren (FR threshold >2) 7 miRNA'dan 3 tanesi upregüle olurken 4 tanesi downregüle olmuştur. Bu miRNA'ların regüle ettiği target genler biyoinformatik araçlarla analiz edildiğinde hsa-miRNA-191-5p, hsa-miRNA-193b-3p ve hsa-miRNA-425-5p'nin transkripsiyonel hedefinde olan 248 geni regüle ettiği; hsa-let-7f-5p, hsa-miRNA-30a-5p, hsa-miRNA-30e-3p ve hsa-miRNA-101-3p'nin ise transkripsiyonel hedefinde olan 1888 geni regüle ettiği tespit edilmiştir. Bu genlere ait protein-protein interaction network'ü STRING database'i yardımıyla analiz edilmiştir (Şekil 4-11 ve Şekil 4-12).

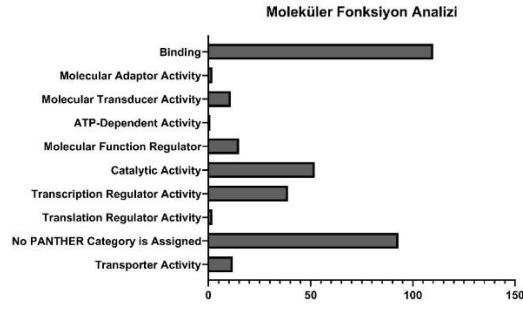


Şekil 4-11: Sağlıklı katılımcılara kıyasla MK'lı vakaların üriner eksozomlarında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) düzeyde over-expressed edilen (FR threshold > 2) hsa-miRNA-191-5p, hsa-miRNA-193b-3p ve hsa-miRNA-425-5p miRNA'larının transkripsiyonel hedefinde olan ve bu miRNA'lar tarafından regüle edilen 248 genin STRING database'inden elde edilen protein-protein interaction network haritası (kmeans clustering: 3). Yoğun node komşuluğu görülen genlerin (*KRAS*, *CCND1*, *KIT* vb.) mesane tümörögenezindeki rolleri iyi bilinen genler olduğu anlaşılmaktadır.



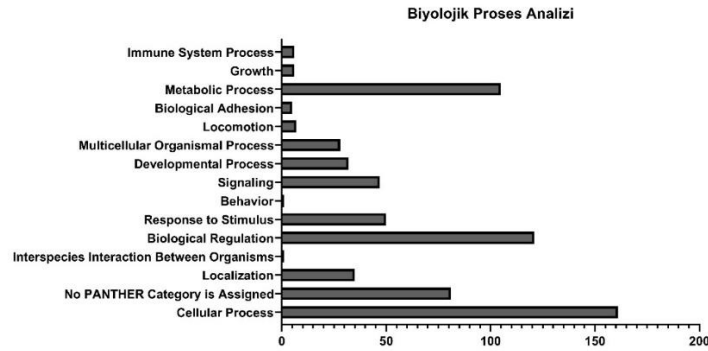
Şekil 4-12: Sağlıklı katılımcılara kıyasla MK'lı vakaların üriner eksozomlarında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) düzeyde under-expressed edilen (FR threshold > 2) hsa-let-7f-5p, hsa-miRNA-30a-5p, hsa-miRNA-30e-3p ve hsa-miRNA-101-3p miRNA'larının transkripsiyonel hedefinde olan ve bu miRNA'lar tarafından regüle edilen 1888 genin STRING database'inden elde edilen protein-protein interaction network haritası (kmeans clustering: 3).

İlgili miRNA'ların transkripsiyonel hedefinde olan genler ayrıca PANTHER database'inde analiz edilmiştir. MK'da over-expressed edilen hsa-miRNA-191-5p, hsa-miRNA-193b-3p ve hsa-miRNA-425-5p miRNA'larının transkripsiyonel hedefinde olan ve bu miRNA'lar tarafından regüle edilen 248 genin moleküler fonksiyon analizi Şekil 4-13'te verilmiştir. Bu genlerden “110 tanesinin (%43,8) binding, 52 tanesinin (%20,7) catalytic ve 39 tanesinin (%15,5) transcription regulator” aktivitesine sahip olduğu görülmüştür.



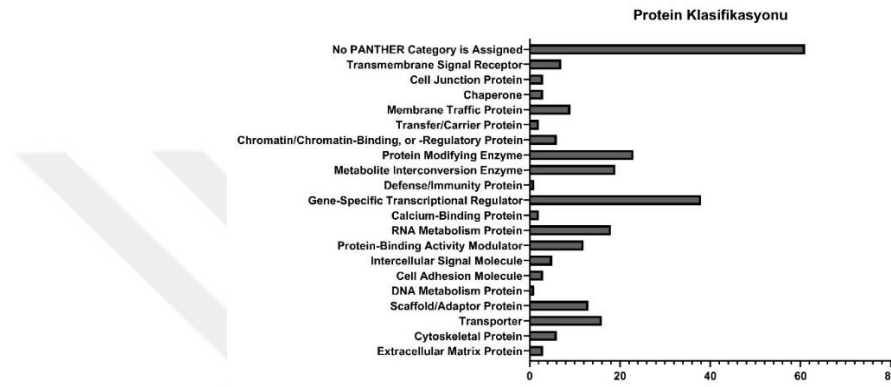
Şekil 4-13: Sağlıklı katılımcılara kıyasla MK'lı vakaların üriner eksozomlarında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) düzeyde over-expressed edilen (FR threshold > 2) hsa-miRNA-191-5p, hsa-miRNA-193b-3p ve hsa-miRNA-425-5p miRNA'larının transkripsiyonel hedefinde olan ve bu miRNA'lar tarafından regüle edilen 248 genin PANTHER database'inde yapılan moleküler fonksiyon analizi sonuçları.

MK'da over-expressed edilen hsa-miRNA-191-5p, hsa-miRNA-193b-3p ve hsa-miRNA-425-5p miRNA'larının transkripsiyonel hedefinde olan ve bu miRNA'lar tarafından regüle edilen 248 genin biyolojik proses analizi Şekil 4-14'te verilmiştir. Bu genlerden “161 tanesinin (%64,1) cellular, 121 tanesinin (%48,2) biological regulation, 50 tanesinin (%19,9) response to stimulus ve 47 tanesinin (%18,7) signaling” proseslerinde görev aldığı anlaşılmıştır.



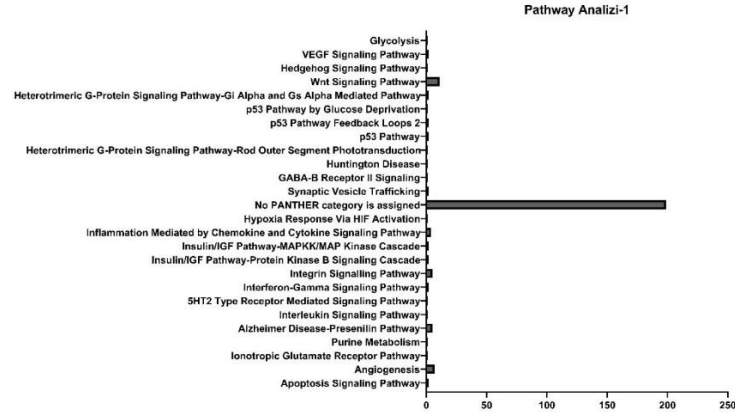
Şekil 4-14: Sağlıklı katılımcılara kıyasla MK'lı vakaların üriner eksozomlarında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) düzeyde over-expressed edilen (FR threshold > 2) hsa-miRNA-191-5p, hsa-miRNA-193b-3p ve hsa-miRNA-425-5p miRNA'larının transkripsiyonel hedefinde olan ve bu miRNA'lar tarafından regüle edilen 248 genin PANTHER database'inde yapılan biyolojik proses analizi sonuçları.

MK’da over-expressed edilen hsa-miRNA-191-5p, hsa-miRNA-193b-3p ve hsa-miRNA-425-5p miRNA’larının transkripsiyonel hedefinde olan ve bu miRNA’lar tarafından regüle edilen 248 genin protein klasifikasyon analizi Şekil 4-15’te verilmiştir. Bu genlerden “38 tanesi (%15,1) gene-specific transcriptional regulator, 23 tanesi (%9,2) protein modifying enzyme, 19 tanesi (%7,6) metabolite interconversion enzyme ve 18 tanesi (%7,2) RNA metabolism protein” olarak sınıflandırılmıştır.

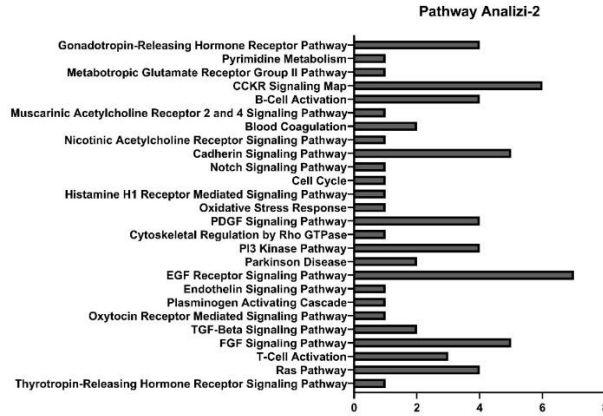


Şekil 4-15: Sağlıklı katılımcılara kıyasla MK’lı vakaların üriner eksozomlarında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) düzeyde over-expressed edilen (FR threshold > 2) hsa-miRNA-191-5p, hsa-miRNA-193b-3p ve hsa-miRNA-425-5p miRNA’larının transkripsiyonel hedefinde olan ve bu miRNA’lar tarafından regüle edilen 248 genin PANTHER database’inde yapılan protein klasifikasyon analizi sonuçları.

MK’da over-expressed edilen hsa-miRNA-191-5p, hsa-miRNA-193b-3p ve hsa-miRNA-425-5p miRNA’larının transkripsiyonel hedefinde olan ve bu miRNA’lar tarafından regüle edilen 248 genin Pathway analizi Şekil 4-16’da verilmiştir. Pathway analizi bu genlerin; “angiogenesis, Insulin/IGF Pathway-MAPKK/MAP Kinase Cascade, Hypoxia Response via HIF Activation, p53 Pathway, p53 Pathway Feedback Loops 2, p53 Pathway by Glucose Deprivation, Wnt Signaling Pathway, VEGF Signaling Pathway, glycolysis, Ras Pathway, FGF Signaling Pathway, EGF Receptor Signaling Pathway, PI3 Kinase Pathway, Cadherin Signaling Pathway, Notch Signaling Pathway ve cell cycle” gibi kanserin temel pathway’lerinde görev aldığını göstermiştir.

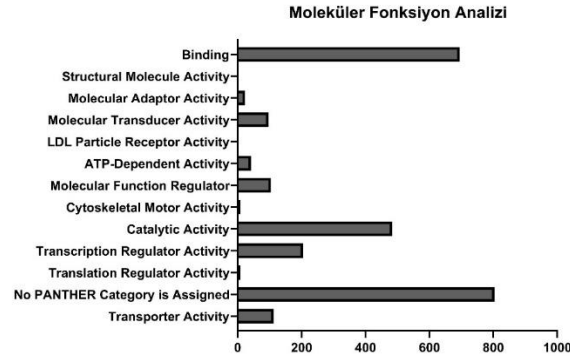


Şekil 4-16: Sağlıklı Katılımcılara kıyasla MK'lı vakaların üriner eksozomlarında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) düzeyde over-expressed edilen (FR threshold > 2) hsa-miRNA-191-5p, hsa-miRNA-193b-3p ve hsa-miRNA-425-5p miRNA'larının transkripsiyonel hedefinde olan ve bu miRNA'lar tarafından regüle edilen 248 genin PANTHER database'inde yapılan pathway analizi sonuçları.



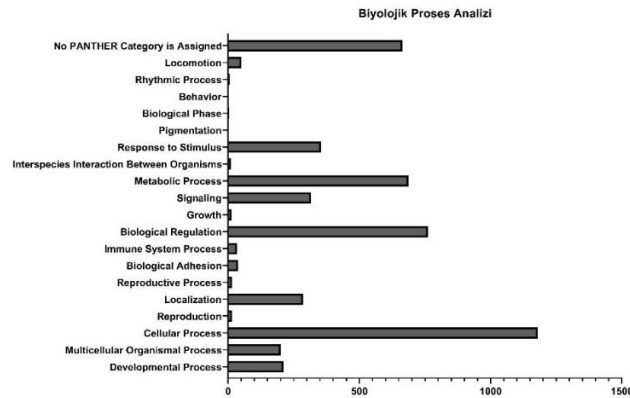
Şekil 4-16: Sağlıklı katılımcılara kıyasla MK'lı vakaların üriner eksozomlarında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) düzeyde Over-Expressed edilen (FR threshold > 2) hsa-miRNA-191-5p, hsa-miRNA-193b-3p ve hsa-miRNA-425-5p miRNA'larının transkripsiyonel hedefinde olan ve bu miRNA'lar tarafından regüle edilen 248 genin PANTHER database'inde yapılan pathway analizi sonuçları (devamı).

MK'da under-expressed edilen hsa-let-7f-5p, hsa-miRNA-30a-5p, hsa-miRNA-30e-3p ve hsa-miRNA-101-3p miRNA'larının transkripsiyonel hedefinde olan ve bu miRNA'lar tarafından regüle edilen 1888 genin moleküler fonksiyon Analizi Şekil 4-17'de verilmiştir. Bu genlerden “695 tanesinin (%36,1) binding, 483 tanesinin (%25,1) catalytic, 204 tanesinin (%10,6) transcription regulator ve 112 tanesinin (%5,8) transporter” aktivitesine sahip olduğu görülmüştür.



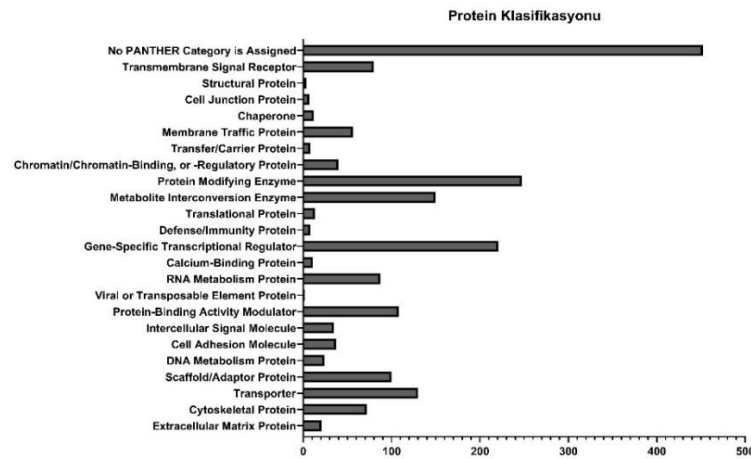
Şekil 4-17: Sağlıklı katılımcılara kıyasla MK'lı vakaların üriner eksozomlarında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) düzeyde under-expressed edilen (FR threshold > 2) hsa-let-7f-5p, hsa-miRNA-30a-5p, hsa-miRNA-30e-3p ve hsa-miRNA-101-3p miRNA'larının transkripsiyonel hedefinde olan ve bu miRNA'lar tarafından regüle edilen 1888 genin PANTHER database'inde yapılan moleküler fonksiyon analizi sonuçları.

MK'da under-expressed edilen hsa-let-7f-5p, hsa-miRNA-30a-5p, hsa-miRNA-30e-3p ve hsa-miRNA-101-3p miRNA'larının transkripsiyonel hedefinde olan ve bu miRNA'lar tarafından regüle edilen 1888 genin biyolojik proses analizi Şekil 4-18'de verilmiştir. Bu genlerden "1180 tanesinin (%61,3) cellular, 762 tanesinin (%39,6) biological regulation, 687 tanesinin (%35,7) metabolic, 354 tanesinin (%18,4) response to stimulus ve 316 (%16,4) tanesinin signaling" proseslerinde görev aldığı anlaşılmıştır.

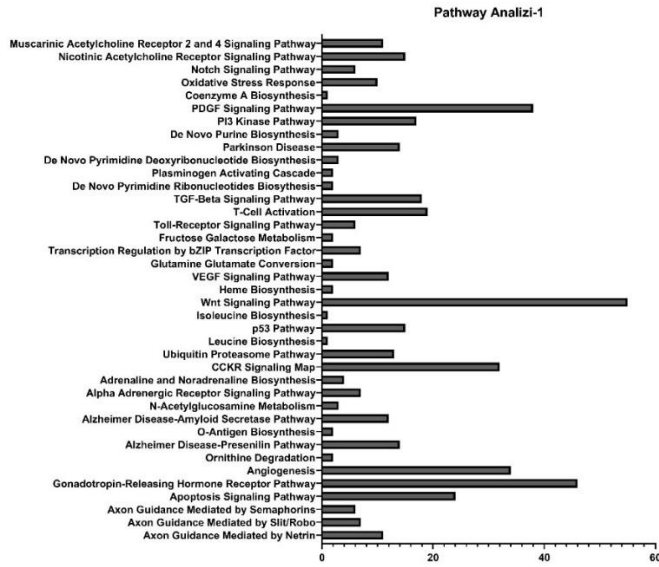


Şekil 4-18: Sağlıklı katılımcılara kıyasla MK'lı vakaların üriner eksozomlarında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) düzeyde under-expressed edilen (FR threshold > 2) hsa-let-7f-5p, hsa-miRNA-30a-5p, hsa-miRNA-30e-3p ve hsa-miRNA-101-3p miRNA'larının transkripsiyonel hedefinde olan ve bu miRNA'lar tarafından regüle edilen 1888 genin PANTHER database'inde yapılan biyolojik proses analizi sonuçları.

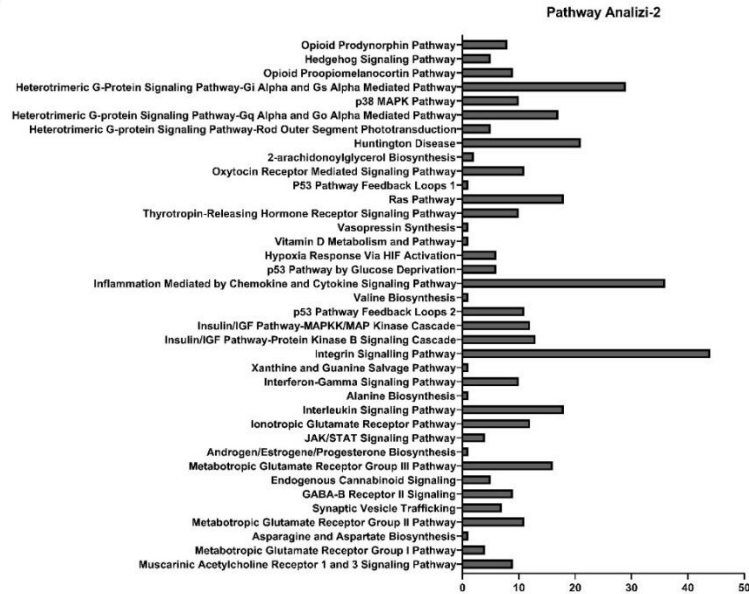
MK’da under-expressed edilen hsa-let-7f-5p, hsa-miRNA-30a-5p, hsa-miRNA-30e-3p ve hsa-miRNA-101-3p miRNA’larının transkripsiyonel hedefinde olan ve bu miRNA’lar tarafından regüle edilen 1888 genin protein klasifikasyon analizi Şekil 4-19’da verilmiştir. Bu genlerden “247 tanesi (%12,8) protein modifying enzyme, 221 tanesi (%11,5) gene-specific transcriptional regulator, 150 tanesi (%7,8) metabolite interconversion enzyme, 130 tanesi (%6,8) transporter ve 108 tanesi (%5,6) protein-binding activity modulator” olarak sınıflandırılmıştır. İlgili genlerin pathway analizi ise Şekil 4-20’de verilmiştir. Pathway analizi bu genlerin; “apoptosis signaling, angiogenesis, p53 Pathway, P53 Pathway Feedback Loops 1, p53 Pathway Feedback Loops 2, p53 Pathway by Glucose Deprivation, p38 MAPK Pathway, Ras Pathway, Wnt Signaling Pathway, VEGF Signaling Pathway, TGF-Beta Signaling Pathway, PI3 Kinase Pathway, Notch Signaling Pathway, JAK/STAT Signaling Pathway, Insulin/IGF Pathway-MAPKK/MAP Kinase Cascade, Hypoxia Response via HIF Activation, Hedgehog Signaling Pathway, FGF Signaling Pathway, FAS Signaling Pathway, EGF Receptor Signaling Pathway, Endothelin Signaling Pathway, Cadherin Signaling Pathway, DNA replication, circadian clock system ve cell cycle” gibi kanserin temel pathway’lerinde görev aldığını göstermiştir.



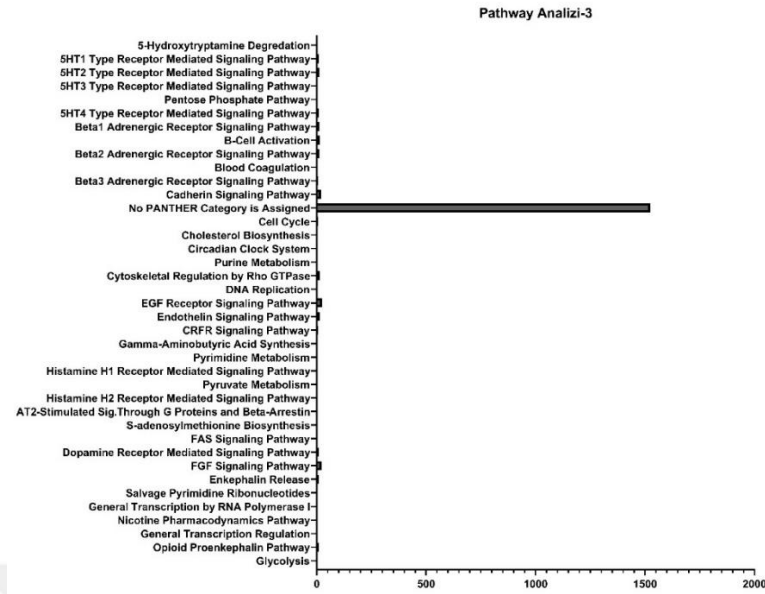
Şekil 4-19: Sağlıklı katılımcılara kıyasla MK’lı vakaların üriner eksozomlarında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) düzeyde under-expressed edilen (FR threshold > 2) hsa-let-7f-5p, hsa-miRNA-30a-5p, hsa-miRNA-30e-3p ve hsa-miRNA-101-3p miRNA’larının transkripsiyonel hedefinde olan ve bu miRNA’lar tarafından regüle edilen 1888 genin PANTHER database’inde yapılan protein klasifikasyon analizi sonuçları.



Şekil 4-20: Sağlıklı katılımcılara kıyasla MK'lı vakaların üriner eksozomlarında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) düzeyde under-expressed edilen (FR threshold > 2) hsa-let-7f-5p, hsa-miRNA-30a-5p, hsa-miRNA-30e-3p ve hsa-miRNA-101-3p miRNA'larının transkripsiyonel hedefinde olan ve bu miRNA'lar tarafından regüle edilen 1888 genin PANTHER database'inde yapılan pathway analizi sonuçları.



Şekil 4-20: Sağlıklı katılımcılara kıyasla MK'lı vakaların üriner eksozomlarında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) düzeyde under-expressed edilen (FR threshold > 2) hsa-let-7f-5p, hsa-miRNA-30a-5p, hsa-miRNA-30e-3p ve hsa-miRNA-101-3p miRNA'larının transkripsiyonel hedefinde olan ve bu miRNA'lar tarafından regüle edilen 1888 genin PANTHER database'inde yapılan pathway analizi sonuçları (devamı).



Şekil 4-20: Sağlıklı katılımcılara kıyasla MK'lı vakaların üriner eksozomlarında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) düzeyde under-expressed edilen (FR threshold > 2) hsa-let-7f-5p, hsa-miRNA-30a-5p, hsa-miRNA-30e-3p ve hsa-miRNA-101-3p miRNA'larının transkripsiyonel hedefinde olan ve bu miRNA'lar tarafından regüle edilen 1888 genin PANTHER database'inde yapılan pathway analizi sonuçları (devamı).

4.4. Mesane Dokularındaki hsa-miRNA-200a-3p Düzeyi

miRNA-200 ailesi; hsa-miRNA-141, hsa-miRNA-200a, hsa-miRNA-200b, hsa-miRNA-200c ve hsa-miRNA-429 olmak üzere 5 miRNA'dan oluşmaktadır ve literatürdeki çalışmalar miRNA-200 ailesinin hücre canlılığı, hücre migrasyonu, kemorezistans ve özellikle EMT ile doğrudan ilişkili olduğunu göstermiştir (Humphries ve ark. 2015). Lee ve arkadaşlarının 34 yayını dahil ederek yaptığı sistematik derleme ve meta-analizde, çeşitli kanser türlerinde miRNA-200 ailesinin prognostik önemi araştırılmış olup, tümör dokularında artan miRNA-200 ailesi seviyelerinin kanserde daha iyi genel ve progresyonsuz sürvi ile korelasyon gösterdiği ortaya konulmuş; buna karşılık artmış sirküle miRNA-200 ailesi seviyelerinin kötü klinik seyir ile ilişkili olduğu anlaşılmıştır (Lee ve ark. 2017). Mei ve arkadaşları ise miRNA-200 ailesinin MK üzerindeki prognostik önemini ele aldıkları sistematik derleme ve meta-analizlerine toplamda 1150 MK'lı vakadan oluşan 8 yayını dahil etmişler ve onlar da artmış miRNA-200 ailesi ifadesinin daha iyi genel ve kanser-spesifik sürvi ile ilişkili olduğunu ortaya koymuşlardır (Mei ve ark. 2020).

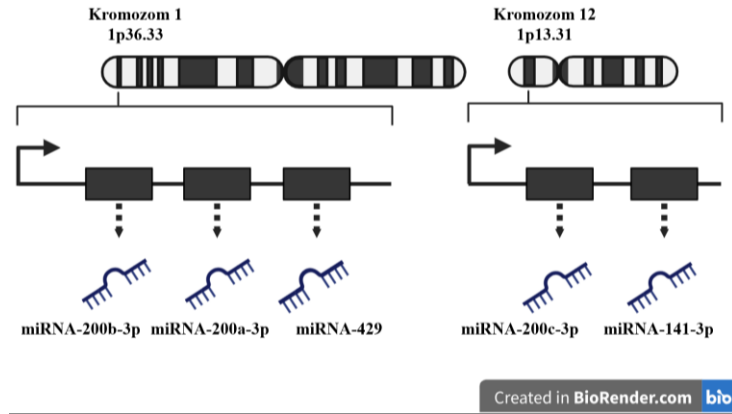
Mesane kanseri ile miRNA-200 ailesinin üyeleri arasındaki ilişkiyi ele alan çalışmaların sayısı sınırlıdır. Bu konudaki ilk çalışmalardan bir tanesi Adam ve arkadaşları tarafından yapılmış olup araştırmacılar “UMUC3, UMUC5 ve T24” MK hücre hatlarını kullanarak yaptıkları *in vitro* araştırmalarında artmış miRNA-200 ailesi ifadesinin; “ZEB1, ZEB2 ve ERFFI-1” anlatımı ile hücre migrasyonunu azaltıp E-kaderin anlatımını arttırarak MK’da EMT’yi regüle ettiğini ve EGFR blokerlerine olan sensitiviteyi arttırarak EGFR terapisi rezistansını tersine çevirebildiğini göstermişlerdir (Adam ve ark. 2009). Wiklund ve arkadaşlarının MK’lı vakalara ait tümör dokuları ve tümöre komşu sağlıklı mesane dokuları ile çeşitli MK hücre hatlarını kullanarak yaptığı çalışmada KİMT’de miRNA-200 ailesinin promotör hipermetilasyonu yoluyla sessizleştirildiği gösterilmiştir (Wiklund ve ark. 2011). Araştırmacılar ayrıca miRNA-200c’nin T1-High Grade evre MK’lı vakalarda artmış tümör progresyonu ile ilişkili olabileceğine işaret etmişlerdir (Wiklund ve ark. 2011). Chen ve arkadaşları “HTB9 ve T24” MK hücre hatlarını kullanarak yaptıkları çalışmalarında MMP-16’nın, miRNA-200b’nin doğrudan transkripsiyonel hedefinde olduğunu göstererek TGF- β 1’in MMP-16 anlatımını arttırıp miRNA-200b anlatımını azaltarak MK’da EMT’yi indüklediğini kanıtlamışlardır (Chen ve ark. 2012). Liu ve arkadaşları 15 MK’lı vakaya ait tümör dokusu ve 15 tümöre komşu sağlıklı mesane dokusu ile “5637, TCC-SUP, T24 ve UMUC-3” MK hücre hatlarını kullanarak yaptıkları çalışmalarında miRNA-200c’nin MK’da downregüle olduğunu ortaya koymuşlardır (Liu ve ark. 2014). Araştırmacılar ayrıca MK hücre hatlarında miRNA-200c’nin aşırı ifadesini sağladıklarında hücre proliferasyonu, invazyonu ve migrasyonunun azaldığını, aynı zamanda “BMI-1 ve E2F3” anlatımlarının downregüle olarak E-kaderin seviyesinin arttığını ve böylece miRNA-200c’nin EMT üzerinde etkili olabileceğini göstermişlerdir (Liu ve ark. 2014). Mahdavinezhad ve arkadaşları 33 MK’lı vakaya ait tümör dokusu (n=21 KİOMT, n=13 KİMT) ve 33 tümöre komşu sağlıklı mesane dokusu örneklerini kullanarak yaptıkları çalışmalarında miRNA-200c anlatımını qRT-PCR ile kantite etmişler ve çalışma neticesinde miRNA-200c’nin istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) düzeyde tümör dokularının %79’unda (n=26) tümöre komşu sağlıklı mesane dokularına kıyasla artış gösterdiğini ($FC>1$) ortaya koymuşlardır (Mahdavinezhad ve ark. 2015). Martínez-Fernández ve arkadaşlarının 87 MK’lı vakaya ait tümör dokusu ve tümöre komşu sağlıklı mesane dokusu örneklerini, “RT112, MGH U3 ve MGH U4” MK hücre hatlarını ve TCGA database’ini kullanarak yaptıkları çalışmalarında miRNA-200

ailesinin ifade düzeyinin ve kodlandığı genlerin promotör metilasyon durumunun MK'daki klinik seyir ile ilişkisini ele almışlardır (Martínez-Fernández ve ark. 2015). Araştırmacılar miRNA-200 ailesinin anlatımının mesane tümör dokularında, sağlıklı mesane dokularına kıyasla arttığını ve bu artışın promotör hipometilasyonu ve spesifik onkojenik sinyal yollarının aktivasyonu ile olduğunu göstermişlerdir (Martínez-Fernández ve ark. 2015). Ayrıca araştırmacılar KİMT'de miRNA-200 ailesinin, post-transkripsiyonel olarak EMT'yi regüle ettiği iyi bilinen *ZEB1* ve *ZEB2* transkripsiyon faktörlerini regüle ederek; KİOMT'de ise *BMI-1*'i anlatımını baskılayarak EMT üzerinde etkili olabileceğini literatürle uyumlu şekilde doğrulamışlardır (Martínez-Fernández ve ark. 2015). İlaveten araştırmacılar “*EZH2* ve/veya *BMI-1*” anlatımının miRNA-200 ailesinin anlatımını baskıladığını da göstermişlerdir (Martínez-Fernández ve ark. 2015). Shindo ve arkadaşları T24 MK hücre hattı ile onun sisplatin dirençli olan T24RC varyantının miRNA profilini TaqMan Array ile analiz ederek karşılaştırmış ve miRNA-200a, miRNA-200b ve miRNA-429'un T24RC hücrelerinde downregüle olduğunu göstermişlerdir (Shindo ve ark. 2018). Araştırmacılar, CpG island hipermetilasyonu ile downregüle olduğunu ortaya koydukları miRNA-200b'yi seçerek “5-aza-2'-deoxycytidine” muamelesi ile yarattıkları demetilasyonda, T24RC hücrelerindeki miRNA-200b anlatımının arttığını ve “5-aza-2'-deoxycytidine ile sisplatinin” kombine olarak uygulanmasının T24RC hücrelerinde sadece sisplatin sensitivitesini artırıp proliferasyonu inhibe etmediğini aynı zamanda sisplatin sensitivitesi ile ilişkili olan “*IGFBP3*, *ICAM1* ve *TNFSF10*” genlerinin de anlatımının indüklendiğini göstermişlerdir (Shindo ve ark. 2018). Çalışma neticesinde araştırmacılar, KİOMT ile ters ilişkili olan azalmış miRNA-200b anlatımı ve artmış DNA metilasyonunun, kötü genel sürvi ve sisplatin rezistansı ile ilişkili olabileceğine vurgu yapmaktadırlar (Shindo ve ark. 2018). Bildiğimiz kadarıyla buraya kadar bahsedilenlerden başka MK ile miRNA-200 ailesinin arasındaki ilişkiyi ele alan çalışma bulunmamaktadır.

Senfter ve arkadaşları, “The microRNA-200 family: still much to discover” başlıklı makalelerinde miRNA-200 ailesinin kanserdeki önemini ele alacak çalışmaların artmasının gerekliliğine vurgu yapmaktadır (Senfter ve ark. 2016). miRNA-200 ailesinin üyelerinden miRNA-200b-3p, miRNA-200a-3p ve miRNA-429 kromozom 1'in 1p36.33 sitogenetik lokasyonunda bulunmakta ve cluster I olarak gruplandırılmaktayken; miRNA-200c-3p ve miRNA-141-3p kromozom 12'nin 1p13.31

sitogenetik lokasyonunda bulunmaktadır (Şekil 4-21) ve cluster II olarak gruplandırılmaktadır (Humphries ve ark. 2015). Buna ek olarak miRNA-200 ailesi seed sekanslarına göre de iki farklı fonksiyonel gruba ayrılmıştır (Humphries ve ark. 2015). Fonksiyonel grup I; miRNA-200b-3p, miRNA-200c-3p ve miRNA-429'dan oluşmaktayken, fonksiyonel grup II; miRNA-141-3p ve miRNA-200a-3p'den oluşmaktadır (Humphries ve ark. 2015). Bu iki grup arasındaki temel fark; fonksiyonel grup I'deki miRNA'ların seed sekanslarının "AAUACUG" dizisinden, fonksiyonel grup II'dekilerin ise "AACACUG" dizisinden oluşması (Şekil 4-22) yani 3. pozisyonundaki bazın "U" ya da "C" olmasıdır (Humphries ve ark. 2015).

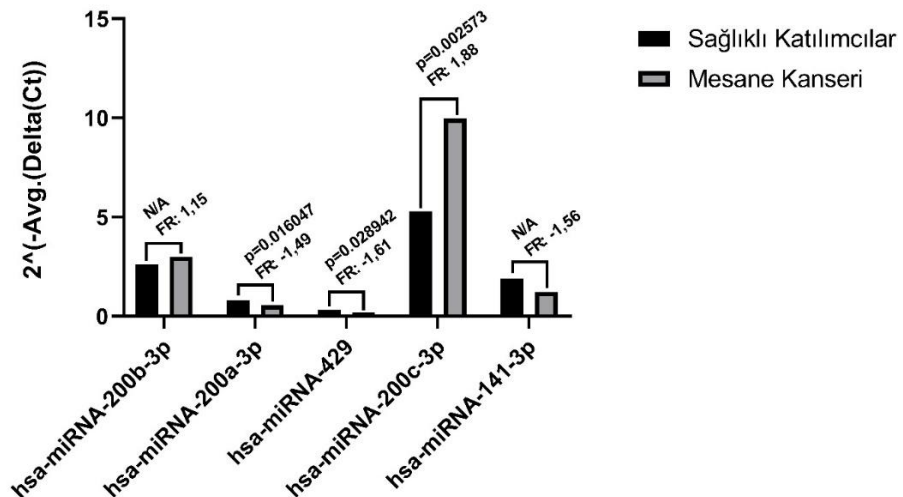
Çalışmamızda sağlıklı katılımcılar ile KİOMT'li vakaların idrar eksozomlarındaki miRNA-200 ailesi üyelerinin anlatımı qRT-PCR ile kantite edilmiş olup bu 5 miRNA'ya ait normalize edilmiş C_T değerlerine ait ortalama değişim, $2^{(-\text{Average (Delta } C_T))}$ formülüyle hesaplanmış ve kantitasyon sonuçları Şekil 4-23'de verilmiştir. Buna göre hsa-miRNA-200b-3p anlatımı MK'da sağlıklı katılımcılara kıyasla 1,15 kat arttığı; hsa-miRNA-141-3p anlatımının ise MK'da sağlıklı katılımcılara kıyasla 1,56 kat azaldığı saptanmış ancak bu FR'ler istatistiksel olarak anlamlı (Not Assessed (N/A)) bulunmamıştır (Şekil 4-23). Buna karşılık hsa-miRNA-200a-3p'nin MK'da sağlıklı katılımcılara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ($p=0.016047$) şekilde 1,49 kat azaldığı; hsa-miRNA-429'un MK'da sağlıklı katılımcılara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ($p=0.028942$) şekilde 1,61 kat azaldığı ve hsa-miRNA-200c-3p'nin MK'da sağlıklı katılımcılara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ($p=0.002573$) şekilde 1,88 kat artış gösterdiği anlaşılmıştır (Şekil 4-23). İlginç şekilde aynı sitogenetik lokasyonda bulunan miRNA'ların benzer artış ve azalış trendi gösterdiği söylenebilmektedir. Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde bildiğimiz kadarıyla tek başına hsa-miRNA-200a-3p ile MK arasındaki ilişkiyi ele alan doku temelli bir çalışma olmadığı görülmektedir. Bu sebeple çalışmamızın validasyon kısmında, sağlıklı katılımcılar ile KİOMT'li vakaların idrar eksozomlarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdiği tespit edilen hsa-miRNA-200a-3p seçilerek mesane dokularındaki anlatımı qRT-PCR ile kantite edilmiştir.



Şekil 4-21: miRNA-200 ailesinin kromozom 1 ve 12 üzerindeki sitogenetik lokalizasyonları ((Humphries ve ark. 2015)'den uyarlanmıştır; figür yazar tarafından BioRender'da oluşturulmuştur).

		Seed Sekans
Fonksiyonel Grup I	miRNA-200b	UAAUACUGCCUGGUAAGAUGA
	miRNA-200c	UAAUACUGCCGGGUAAGAUGGA
	miRNA-429	UAAUACUGUCUGGUAACCGU
Fonksiyonel Grup II	miRNA-141	UAAACACUGUCUGGUAAGAUGG
	miRNA-200a	UAAACACUGUCUGGUAACGAUGU

Şekil 4-22: Seed sekanslarına göre iki fonksiyonel gruba ayrılan mature miRNA-200 ailesi üyeleri ((Humphries ve ark. 2015) 'den uyarlanmıştır).



Şekil 4-23: Sağlıklı katılımcılar ile KİOMT'li vakaların üriner eksozomları arasındaki miRNA-200 ailesi üyelerinin anlatımının değişimi. Şekil ilgili miRNA'ların normalize edilmiş CT değerlerine ait ortalama değişimi tarif etmektedir (N/A: Not Assessed; FR: Fold-Regulation).

Hepsi erkek olan KİOMT'li 18 vakanın (n=6 Ta-Low Grade, n=6 Ta-High Grade ve n=6 T1-High Grade) TUR-MT esnasında, tümör dokuları ve tümöre en az 5 cm uzaklıktaki Normal Tissue Adjacent to the Tumor (NAT) örnekleri; KİMT'li 7 vakanın ise (n=4 T2-High Grade, n=2 T3a-High Grade ve n=1 T3b-High Grade) sistektomi esnasında tümör dokuları ve tümöre en az 5 cm uzaklıktaki NAT örnekleri çalışmaya dahil edilerek hsa-miRNA-200a-3p anlatımı qRT-PCR ile kantite edildi. Referans olarak U6 snRNA (hsa) kullanıldı ve C_T değerleri Vandesompele ve arkadaşlarının tarif ettiği şekilde normalize edildi (Vandesompele ve ark. 2002). MK'lı vakalara ait yaş ortalaması 65,2 ($\pm 7,7$) ve VKİ ortalaması 26,8 ($\pm 3,8$) olarak tespit edilmiş olup MK'lı vakalara ait demografik ve klinik bilgiler Tablo 4-12'de verilmiştir. Tümör mikro çevresinin ve multifokal tümörlü mesanelerin sağlıklı mesane dokusu üzerindeki değişimi göz önüne alınarak çalışmaya hepsi erkek olan 9 katılımcı dahil edilerek Tumor-Free mesanelerden sağlıklı mesane dokuları örneklenmiştir. Tumor-Free dokuların alındığı katılımcılara ait yaş ortalaması 69,2 ($\pm 7,6$) ve VKİ ortalaması 25,5 ($\pm 3,2$) olarak tespit edilmiş olup. Tumor-Free dokuların alındığı katılımcılara ait demografik bilgiler Tablo 4-13'te verilmiştir. Dokulardaki hsa-miRNA-200a-3p anlatımının normalize edilmiş C_T değerlerine ait ortalama değişim, $2^{(-\text{Average (Delta } C_T)})}$ formülüyle hesaplanmış ve görselleştirilmiştir. Doku örneklerine ait tüm kantitasyon sonuçları birlikte değerlendirildiğinde mesane tümör dokularındaki hsa-miRNA-200a-3p anlatımının NAT'a kıyasla 1,49 kat arttığı saptanmış ancak bu FR istatistiksel olarak anlamlı (N/A) bulunmamıştır (Şekil 4-24).

Tablo 4-12: MK'lı 25 vakaya ait demografik ve klinik bilgiler.

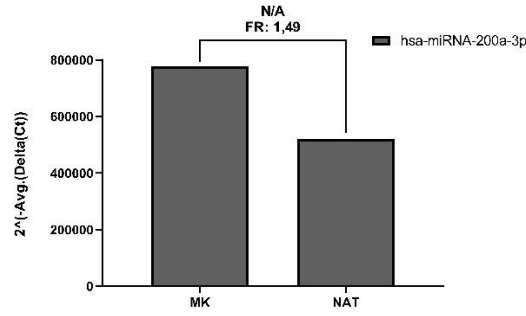
Vaka	E/K	Yaş	VKİ	Tümör (cm)	Primer/Rekürrens	Fokalite	pT	Grade	CIS	Lenfovasküler İnvazyon
MK-1	E	66	31,1	≤ 3 cm	Rekürrens	Multifokal	Ta	Low	Hayır	Negatif
MK-2	E	59	28,3	≤ 3 cm	Primer	Unifokal	Ta	Low	Hayır	Negatif
MK-3	E	65	27,4	≤ 3 cm	Primer	Unifokal	Ta	Low	Hayır	Negatif
MK-11	E	70	30,8	≤ 3 cm	Primer	Unifokal	Ta	Low	Hayır	Negatif
MK-12	E	49	22	≤ 3 cm	Primer	Unifokal	Ta	Low	Hayır	Negatif
MK-13	E	65	34,5	≤ 3 cm	Primer	Unifokal	Ta	Low	Hayır	Negatif
MK-4	E	69	25,6	> 3 cm	Primer	Multifokal	Ta	High	Hayır	Negatif
MK-5	E	81	26,1	> 3 cm	Primer	Unifokal	Ta	High	Hayır	Negatif
MK-6	E	55	29,4	≤ 3 cm	Rekürrens	Multifokal	Ta	High	Hayır	Negatif
MK-14	E	66	31,5	≤ 3 cm	Primer	Unifokal	Ta	High	Evet	Negatif
MK-15	E	61	22,7	≤ 3 cm	Primer	Unifokal	Ta	High	Hayır	Negatif

MK-16	E	70	24,4	≤3 cm	Primer	Unifokal	Ta	High	Hayır	Negatif
MK-7	E	62	23,6	>3 cm	Primer	Multifokal	T1	High	Hayır	Negatif
MK-8	E	55	25	>3 cm	Primer	Multifokal	T1	High	Hayır	Negatif
MK-9	E	70	30,4	>3 cm	Primer	Unifokal	T1	High	Hayır	Negatif
MK-10	E	77	24,7	>3 cm	Rekürrens	Multifokal	T1	High	Hayır	Negatif
MK-17	E	70	30,8	>3 cm	Primer	Multifokal	T1	High	Hayır	Negatif
MK-18	E	60	26,1	>3 cm	Primer	Unifokal	T1	High	Evet	Negatif
MK-19	E	76	23,5	>3 cm	Primer	Unifokal	T2	High	Hayır	Pozitif
MK-20	E	75	23,1	>3 cm	Primer	Unifokal	T2	High	Hayır	Negatif
MK-21	E	65	22	>3 cm	Primer	Multifokal	T2	High	Evet	Negatif
MK-22	E	51	27,1	>3 cm	Primer	Multifokal	T2	High	Evet	Pozitif
MK-23	E	63	24	>3 cm	Primer	Multifokal	T3a	High	Evet	Pozitif
MK-24	E	64	35,1	>3 cm	Primer	Unifokal	T3a	High	Hayır	Negatif
MK-25	E	66	22,8	>3 cm	Primer	Unifokal	T3b	High	Evet	Pozitif

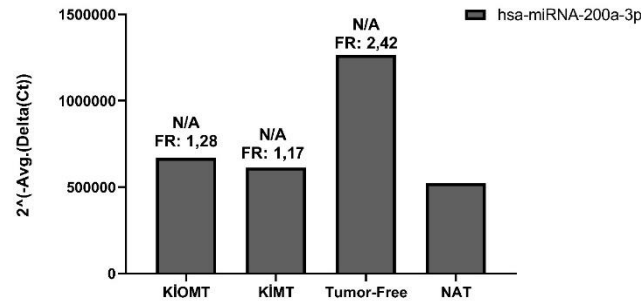
Tablo 4-13: Tumor-Free dokuların alındığı 9 katılımcıya ait demografik bilgiler.

Katılımcı	E/K	Yaş	VKİ
Tumor-Free-1	E	67	24,7
Tumor-Free-2	E	83	31,6
Tumor-Free-3	E	60	23
Tumor-Free-4	E	61	22,9
Tumor-Free-5	E	66	23,5
Tumor-Free-6	E	80	30,6
Tumor-Free-7	E	68	26,3
Tumor-Free-8	E	74	25,1
Tumor-Free-9	E	64	21,9

Doku örneklerine ait kantitasyon sonuçları KİOMT, KİMT ve Tumor-Free olarak ayrı ayrı gruplandırılıp NAT'a ait kantitasyon sonuçlarıyla karşılaştırıldığında; KİOMT'li dokulardaki hsa-miRNA-200a-3p anlatımının NAT'a kıyasla 1,28 kat arttığı, KİMT'li dokulardaki hsa- miRNA-200a-3p anlatımının NAT'a kıyasla 1,17 kat arttığı ve Tumor-Free mesane dokularındaki miRNA-200a-3p anlatımının NAT'a kıyasla 2,42 kat arttığı saptanmış ancak bu FR'ler istatistiksel olarak anlamlı (N/A) bulunmamıştır (Şekil 4-25).



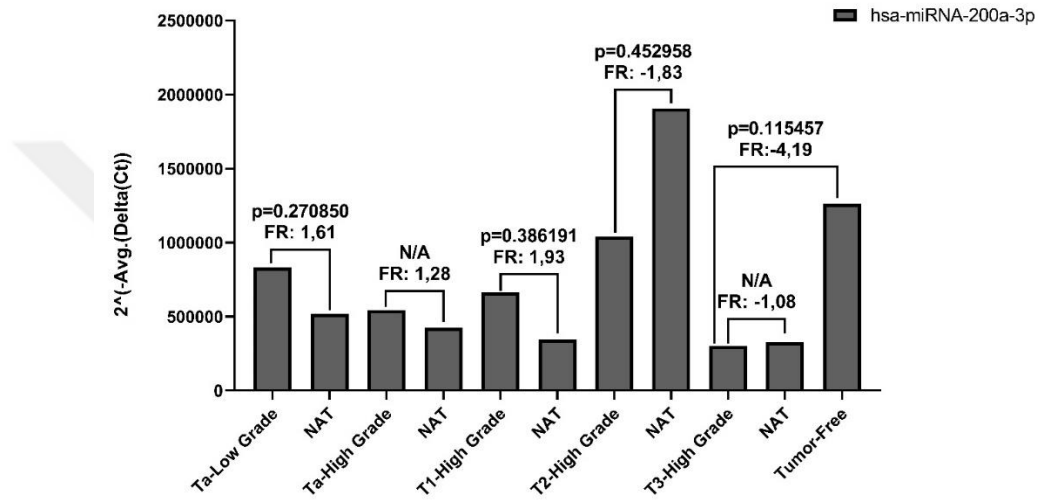
Şekil 4-24: Mesane tümör dokuları ve NAT'ların hsa-miRNA-200a-3p anlatım düzeyleri. Mesane tümör dokularındaki hsa-miRNA-200a-3p anlatımı NAT'a kıyasla 1,49 kat artmakla birlikte bu FR'ler istatistiksel olarak anlamlı (N/A) değildir (MK: Mesane Kanseri, NAT: Normal Tissue Adjacent to the Tumor, FR: Fold-Regulation, N/A: Not Assessed).



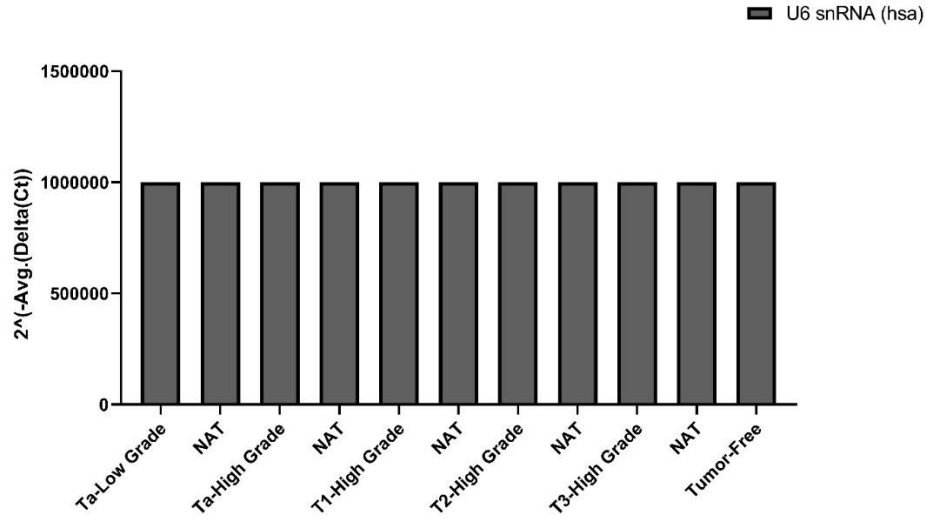
Şekil 4-25: Kasa invazyon durumuna göre gruplandırılmış mesane tümör dokularına ve Tumor-Free mesane dokularına ait hsa-miRNA-200a-3p anlatımının NAT'lar ile karşılaştırılması. KİOMT'li dokulardaki hsa-miRNA-200a-3p anlatımı NAT'a kıyasla 1,28 kat artmış, KİMT'li dokulardaki hsa-miRNA-200a-3p anlatımı NAT'a kıyasla 1,17 kat artmış ve Tumor-Free mesane dokularındaki miRNA-200a-3p anlatımı NAT'a kıyasla 2,42 kat artmıştır ancak bu FR'ler istatistiksel olarak anlamlı (N/A) değildir (KİOMT: Kasa İnvaze Olmayan Mesane Tümörü, KİMT: Kasa İnvaze Mesane Tümörü, NAT: Normal Tissue Adjacent to the Tumor, FR: Fold-Regulation, N/A: Not Assessed).

Doku örneklerine ait kantitasyon sonuçları Ta-Low Grade, Ta-High Grade, T1-High Grade, T2-High Grade ve T3-High Grade evre olarak ayrı ayrı subgruplandırılıp Tumor-Free dokulara ve NAT'lara ait kantitasyon sonuçları ile karşılaştırıldığında; Ta-Low Grade evre mesane tümör dokularındaki hsa-miRNA-200a-3p anlatımının NAT'a kıyasla 1,61 kat arttığı, Ta-High Grade evre mesane tümör dokularındaki hsa-miRNA-200a-3p anlatımının NAT'a kıyasla 1,28 kat arttığı, T1-High Grade evre mesane tümör dokularındaki hsa-miRNA-200a-3p anlatımının NAT'a kıyasla 1,93 kat arttığı, T2-High Grade evre mesane tümör dokularındaki hsa-miRNA-200a-3p anlatımının NAT'a kıyasla 1,83 kat azaldığı ve T3-High Grade evre mesane tümör dokularındaki hsa-

miRNA-200a-3p anlatımının NAT'a kıyasla 1,08 kat azaldığı saptanmış ancak bu FR'ler istatistiksel olarak anlamlı (N/A) bulunmamıştır (Şekil 4-26). İlginç şekilde T3-High Grade Evre mesane tümör dokularındaki hsa-miRNA-200a-3p anlatımı Tumor-Free mesane doku örnekleriyle kıyaslandığında 4,19 kat azalma olduğu anlaşılmıştır. Ek olarak tüm qRT-PCR sonuçlarından hareketle tüm doku örneklerine ait U6 snRNA anlatımı beklendiği şekilde aynı seviyede bulunmuştur (Şekil 4-27).

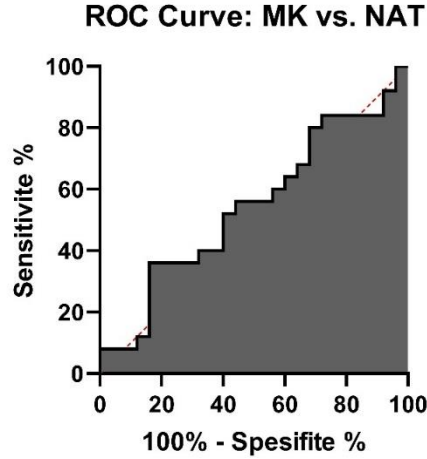


Şekil 4-26: Subgruplara ayrılmış mesane tümör dokuları ve eşlenik NAT'lardaki hsa-miRNA-200a-3p anlatımının birbirleri ve Tumor-Free mesane dokularına ait hsa-miRNA-200a-3p anlatımı ile karşılaştırılması. T3-High Grade evre mesane tümör dokularındaki hsa-miRNA-200a-3p anlatımının Tumor-Free mesane dokularına kıyasla 4,19 kat azalış gösterdiği dikkat çekmektedir (NAT: Normal Tissue Adjacent to the Tumor, FR: Fold-Regulation, N/A: Not Assessed).



Şekil 4-27: Subgruplara ayrılmış mesane tümör dokuları, eşlenik NAT'lar ve Tumor-Free mesane dokularına ait U6 snRNA (hsa) anlatımı (NAT: Normal Tissue Adjacent to the Tumor).

Çalışmanın sonraki aşamasında hsa-miRNA-200a-3p'nin mesane tümör dokularını NAT'dan ayırabilme performansını tespit edebilmek için doku örneklerine ait $2^{-(\Delta C_T)}$ değerleri kullanılarak ROC analizi yapılmıştır (Şekil 4-28). ROC analizi neticesinde istatistiksel olarak anlamlı ($p=0.5803$) bir sonuç saptanmamış olup, bu pilot çalışma ile hsa-miRNA-200a-3p'nin tek başına mesane tümör dokularını NAT'dan ayırabilmek için iyi bir performansa sahip olamayabileceği anlaşılmıştır (AUC: 0,5456; %95 CI: 0,3835-0,7077) (Şekil 4-28).



Şekil 4-28: Mesane tümör dokuları ve NAT'ların hsa-miRNA-200a-3p düzeylerine ait ROC analizi. İstatistiksel olarak anlamlı ($p=0.5803$) bir sonuç saptanmamış olup, hsa-miRNA-200a-3p anlatımı, mesane tümör dokuları ile NAT'ları ayırmak için yüksek performans göstermemektedir (AUC: 0,5456; %95 CI: 0,3835-0,7077) (MK: Mesane Kanseri, NAT: Normal Tissue Adjacent to the Tumor).

4.5. Üriner Eksozomların LC-MS/MS Analizi

Hepsi erkek olan KİOMT'li 12 vakanın ($n=3$ Ta-Low Grade, $n=6$ Ta-High Grade ve $n=3$ T1-High Grade) TUR-MT öncesinden alınan idrar örneklerinden ultrasantrifüj ile izole edilen eksozomların proteom profili LC-MS/MS yardımıyla araştırıldı. Her evreye ait 3 vakanın üriner eksozom örnekleri kendi içerisinde pool edilerek analiz edildi. KİOMT'li vakalara ait yaş ortalaması $62,4 (\pm 12,4)$ ve VKİ ortalaması $27,1 (\pm 3,4)$ olarak tespit edilmiş olup MK'lı vakalara ait demografik ve klinik bilgiler Tablo 4-14'te verilmiştir. Çalışmaya hepsi erkek olan 9 sağlıklı katılımcı da dahil edildi. Sağlıklı katılımcılar çalışmaya dahil edilirken malignite öyküsü, İYE öyküsü, HBV öyküsü ve son 6 ay içerisinde COVID-19 enfeksiyonu geçirip geçirmediği sorgulandı ve pozitif cevap alınan bireyler çalışmadan dışlandı. Sağlıklı katılımcılara ait üriner eksozom örnekleri kendi içerisinde 3'lü şekilde pool edilerek analiz edildi. Sağlıklı katılımcılara ait yaş ortalaması $62,7 (\pm 8,8)$ ve VKİ ortalaması $27,8 (\pm 5)$ olarak tespit edilmiş olup demografik bilgiler Tablo 4-15'te verilmiştir.

Tablo 4-14: KİOMT’li 12 vakaya ait demografik ve klinik bilgiler.

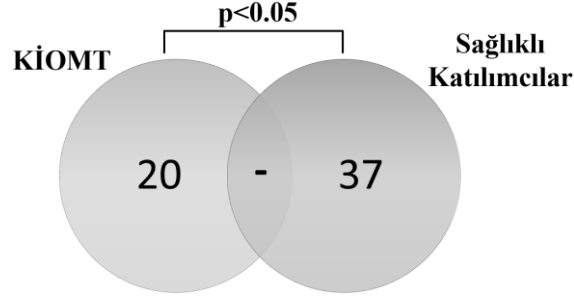
Vaka	E/K	Yaş	VKİ	Tümör (cm)	Primer/Rekürrens	Fokalite	pT	Grade	CIS	Lenfovasküler İnvazyon
MK-1	E	66	31,1	≤3 cm	Rekürrens	Multifokal	Ta	Low	Hayır	Negatif
MK-13	E	65	34,5	≤3 cm	Primer	Unifokal	Ta	Low	Hayır	Negatif
MK-26	E	65	25	≤3 cm	Rekürrens	Multifokal	Ta	Low	Hayır	Negatif
MK-27	E	55	24	≤3 cm	Rekürrens	Multifokal	Ta	High	Evet	Negatif
MK-28	E	46	28,7	≤3 cm	Primer	Unifokal	Ta	High	Hayır	Negatif
MK-29	E	74	30,6	≤3 cm	Rekürrens	Unifokal	Ta	High	Hayır	Negatif
MK-30	E	64	25	≤3 cm	Rekürrens	Multifokal	Ta	High	Hayır	Negatif
MK-31	E	41	24,5	>3 cm	Primer	Unifokal	Ta	High	Hayır	Negatif
MK-32	E	80	22,7	≤3 cm	Primer	Multifokal	Ta	High	Evet	Negatif
MK-18	E	60	26,1	>3 cm	Primer	Unifokal	T1	High	Evet	Negatif
MK-33	E	84	25,2	>3 cm	Primer	Multifokal	T1	High	Hayır	Negatif
MK-34	E	49	28,4	>3 cm	Rekürrens	Multifokal	T1	High	Hayır	Negatif

Tablo 4-15: Sağlıklı 9 katılımcıya ait demografik bilgiler.

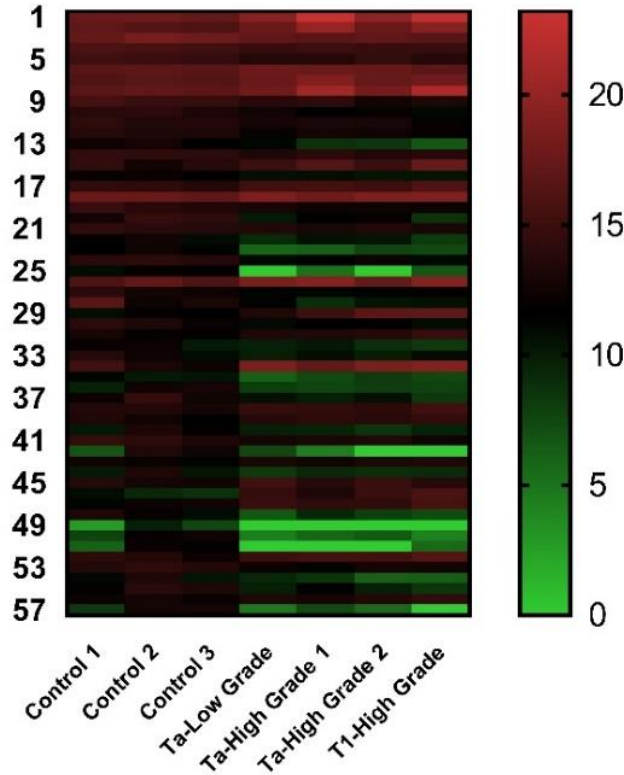
Katılımcı	E/K	Yaş	VKİ
S-7	E	53	31,2
S-8	E	56	17,6
S-9	E	64	26,5
S-10	E	70	32
S-11	E	63	25,5
S-12	E	58	35,6
S-13	E	81	30,7
S-14	E	73	23,9
S-15	E	47	27,2

LC-MS/MS analizi sonucunda toplam 645 protein tanımlandı. Bunlardan 57 tanesinin KİOMT’li vakalar ile sağlıklı katılımcılar arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) düzeyde farklılık gösterdiği saptandı. Bu 57 protein içerisinde PAPA2, TMCC1 ve MGAM2’nin daha önce ExoCarta database’inde kayıtlı olmayan novel proteinler olduğu tespit edildi. Anlamlı 57 proteinden 20 tanesi KİOMT’li vakaların üriner eksozomlarından artış gösterirken 37 tanesi sağlıklı katılımcıların üriner eksozomlarında artış göstermektedir (yani KİOMT’li vakaların üriner eksozomlarında azalış göstermektedir) (Şekil 4-29). KİOMT’li vakaların üriner eksozomlarında artış gösteren proteinler ile “Number of Unique Peptides”, FC ve p-Değeri bilgileri Tablo 4-16’da; KİOMT’li vakaların üriner eksozomlarında azalış gösteren proteinler ile “Number of Unique Peptides”, FC ve p-Değeri bilgileri ise Tablo 4-17’de gösterilmiştir.

Ek olarak, tanımlanan 57 proteinin log2'ye göre transforme edilmiş LFQ sinyal intensitelerini sınıflandıran heatmap grafiği ise Şekil 4-30'da verilmiştir.



Şekil 4-29: KİOMT'li vakaların ve sağlıklı katılımcıların üriner eksozomlarında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) düzeyde değişim gösteren proteinlerin sayısı (KİOMT: Kasa İnvaze Olmayan Mesane Tümörü). Eksozomal 20 protein KİOMT'li vakaların eksozomlarında artış gösterirken 37 protein azalış göstermektedir (sağlıklı katılımcıların eksozomlarında artış göstermektedir).



Şekil 4-30: KİOMT'li vakalar ile sağlıklı katılımcılar arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) düzeyde farklılık gösterdiği ortaya konulan 57 proteinin log2'ye göre transforme edilmiş LFQ sinyal intensitelerini sınıflandıran heatmap grafiği.

Tablo 4-16: KİOMT’li vakaların üriner eksozomlarında artış gösteren proteinler ile “Unique Peptides”, FC ve FDR-Corrected p-Değeri bilgileri. Yıldızlı (*) Subrabasin proteinini İHK ve WB ile valide edilmiştir (FC: Fold-Change, FDR: False Discovery Rate).

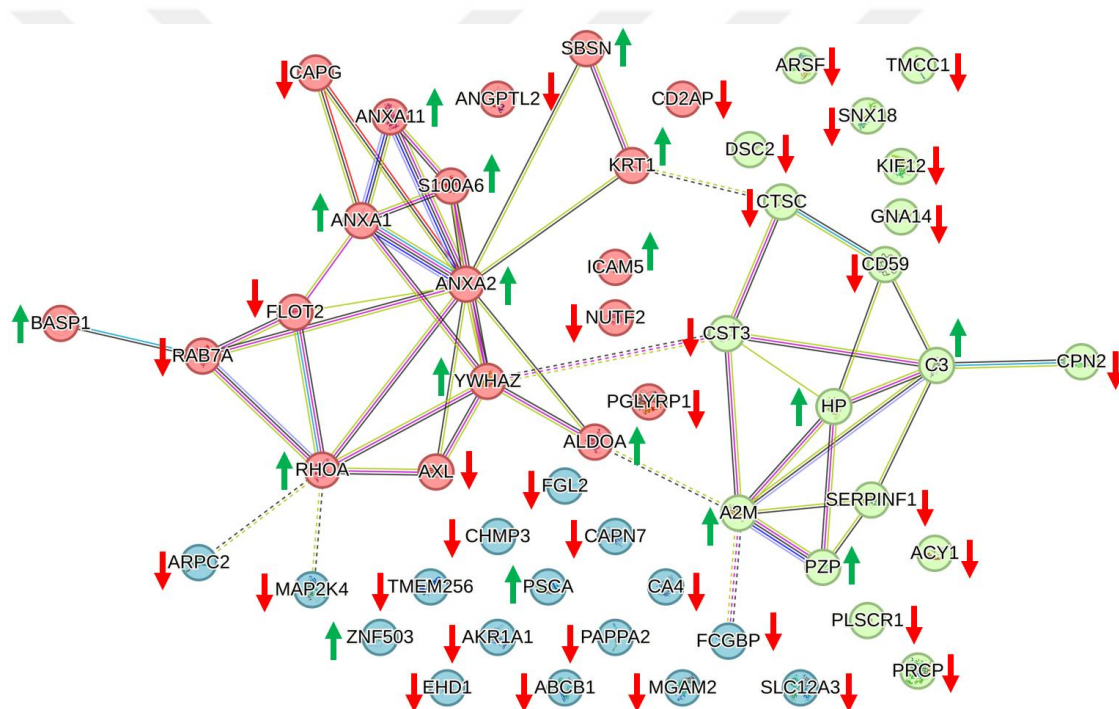
Accession	Protein	Gen	Unique Peptides	FC	FDR-Corrected p-Değeri
P01023	Alpha-2-macroglobulin	<i>A2M</i>	44	22,47	p=0.023
P01024	Complement C3	<i>C3</i>	40	5,84	p=0.035
P50995	Annexin A11	<i>ANXA11</i>	18	1,71	p=0.044
P04083	Annexin A1	<i>ANXA1</i>	17	3,31	p=0.011
P00738	Haptoglobin	<i>HP</i>	15	10,06	p=0.049
P04264	Keratin_type II cytoskeletal 1	<i>KRT1</i>	8	5,72	p=0.043
P07355	Annexin A2	<i>ANXA2</i>	7	2,68	p=0.008
P0DOX2	Ig alpha-2 heavy chain	<i>IGHA2</i>	7	2,27	p=0.014
P01834	Ig kappa constant	<i>IGKC</i>	5	4,41	p=0.017
P20742	Pregnancy zone protein	<i>PZP</i>	4	25,03	p=0.010
P04075	Fructose-bisphosphate aldolase	<i>ALDOA</i>	4	3,26	p=0.019
Q96F45	Zinc finger protein 503	<i>ZNF503</i>	3	21,78	p=0.002
P80723	Brain acid soluble protein 1	<i>BASP1</i>	3	2,4	p=0.016
P63104	14-3-3 protein zeta/delta	<i>YWHAZ</i>	3	2,66	p=0.020
P61586	Transforming protein RhoA	<i>RHOA</i>	3	2,1	p=0.039
Q9UMF0	Intercellular adhesion molecule 5	<i>ICAM5</i>	3	2,67	p=0.049
Q6UWP8	Suprabasin*	SBSN	2	31,79	p=0.001
O43653	Prostate stem cell antigen	<i>PSCA</i>	2	6,58	p=0.003
P0DOX7	Ig kappa light chain	<i>IGK</i>	2	4,1	p=0.015
P06703	Protein S100-A6	<i>S100A6</i>	2	2,38	p=0.032

Tablo 4-17: KİOMT’li vakaların üriner eksozomlarında azalış gösteren proteinler ile “Unique Peptides”, FC ve FDR-Corrected p-Değeri bilgileri (FC: Fold-Change, FDR: False Discovery Rate, N/A: Not Assessed). Yıldızlı (*) proteinler daha önce ExoCarta database’inde kayıtlı olmayan novel proteinlerdir.

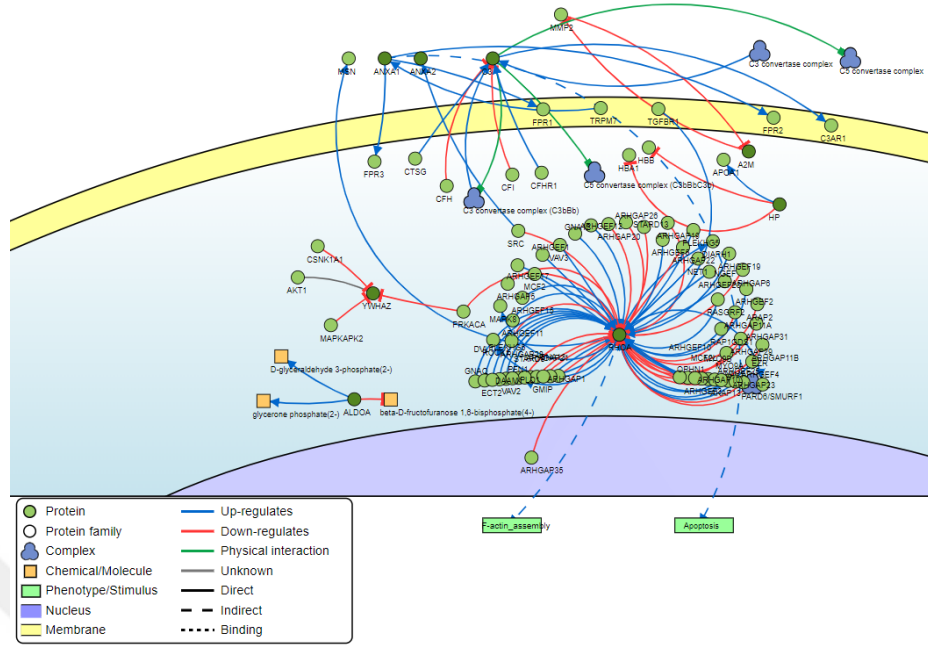
Accession	Protein	Gen	Unique Peptides	FC	FDR-Corrected p-Değeri
Q9Y6R7	IgGfc-binding protein	FCGBP	32	2,02	p=0.025
Q9Y6W3	Calpain-7	CAPN7	20	1,74	p=0.008
P08183	ATP binding cassette subfamily B member1	ABCB1	19	1,93	p=0.020
P55017	Solute carrier family 12 member 3	SLC12A3	10	2,58	p=0.024
Q9H4M9	EH domain-containing protein 1	EHD1	9	3,6	p=0.009
Q96FN5	Kinesin-like protein KIF12	KIF12	9	1,96	p=0.032
P42785	Lysosomal Pro-X carboxypeptidase	PRCP	8	2,17	p=0.007
Q14254	Flotillin-2	FLOT2	8	6,8	p=0.024
P22748	Carbonic anhydrase 4	CA4	8	1,51	p=0.038
Q9Y5K6	CD2-associated protein	CD2AP	7	2,74	p=0.001
Q9UKU9	Angiopoietin-related protein 2	ANGPTL2	6	2,91	p=0.009
P53634	Dipeptidyl peptidase 1	CTSC	6	8,14	p=0.021
P51149	Ras-related protein Rab-7a	RAB7A	6	1,63	p=0.028
Q96RF0	Sorting nexin-18	SNX18	6	4,25	p=0.036
Q14314	Fibroleukin	FGL2	5	29,44	p=0.0004
P14550	Aldo-keto reductase family 1 member A1	AKR1A1	5	5,11	p=0.001
Q9BXP8	Pappalysin-2*	PAPPA2	5	94,99	p=0.012
P22792	Carboxypeptidase N subunit 2	CPN2	5	3,31	p=0.017
O94876	Transmembrane and CCD protein 1*	TMCC1	5	26,22	p=0.028
Q03154	Aminoacylase-1	ACY1	4	4,39	p=0.013
P40121	Macrophage-capping protein	CAPG	4	4,65	p=0.039
Q02487	Desmocollin-2	DSC2	4	5,48	p=0.040
O15144	Actin-related protein 2/3 complex subunit 2	ARPC2	3	9,46	p=0.002
Q2M2H8	Probable maltase-glucoamylase 2*	MGAM2	3	19,31	p=0.007
P45985	Dual specificity MAPKK 4	MAP2K4	3	10,82	p=0.013
Q9Y3E7	Charged multivesicular body protein 3	CHMP3	3	6,91	p=0.032
P01034	Cystatin-C	CST3	3	2,17	p=0.034
P13987	CD59	CD59	3	122,45	p=0.038
O15162	Phospholipid scramblase 1	PLSCR1	3	8,61	p=0.046
P54793	Arylsulfatase F	ARSF	2	18,86	p=0.006
P36955	Pigment epithelium-derived factor	SERPINF1	2	N/A	p=0.007
Q95837	G protein subunit alpha 14	GNA14	2	75,7	p=0.011
O75594	Peptidoglycan recognition protein 1	PGLYRP1	2	234,74	p=0.014
P61970	Nuclear transport factor 2	NUTF2	2	2,7	p=0.017
AOA075B6K4	Ig lambda variable 3-10	IGLV3-10	2	14,42	p=0.022
Q8N2U0	Transmembrane protein 256	TMEM256	2	6,51	p=0.028
P30530	Tyrosine-protein kinase receptor UFO	AXL	2	82,51	p=0.035

KİOMT’li vakalar ile sağlıklı katılımcıların üriner eksozomları arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) düzeyde farklılık gösterdiği ortaya konulan 57 proteine ait protein-protein interaction network’ü STRING database’inde analiz edilmiştir (Şekil 4-31). KİOMT’de artış gösteren proteinlerin daha fazla interaksiyon/node komşuluğu gösterdiği dikkat çekmektedir (Şekil 4-31). KİOMT’de

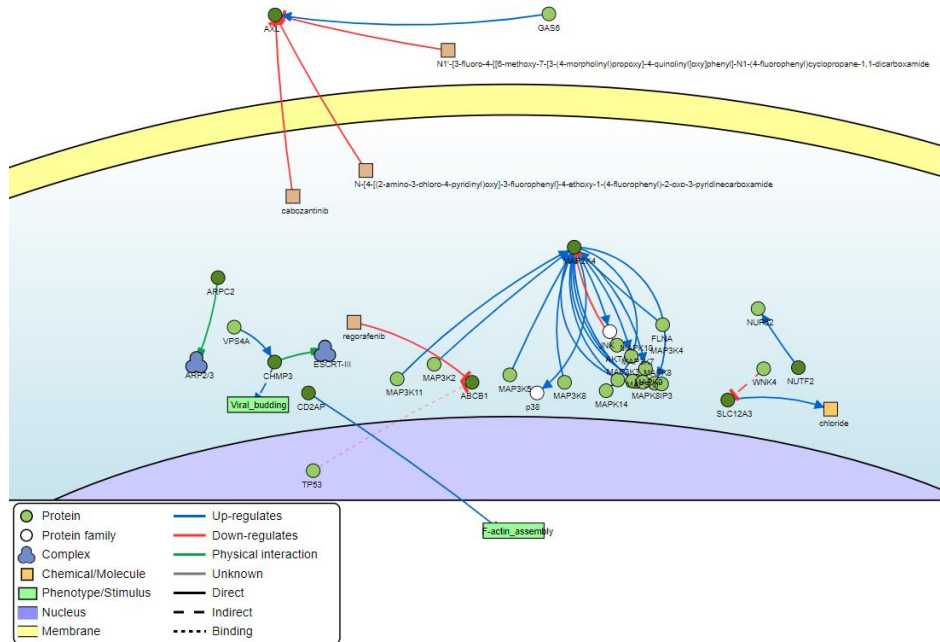
artış gösteren proteinlerden “*RHOA*, *YWHAZ*, *ANXA1*, *ANXA2*, *ANXA11*, *S100A6*, *A2M*, *HP* ve *C3*”ün en fazla interaksyon/node komşuluğu gösteren proteinler olduğu dikkat çekmektedir. KİOMT’de artış gösteren 20 protein ve azalış gösteren 37 protein ayrı ayrı olarak Signor 3.0 database’inde analiz edilerek proteinler arası ilişkiler hücresel lokalizasyonlarıyla birlikte haritalandırılmıştır (Şekil 4-32 ve Şekil 4-33). KİOMT’de artış gösteren proteinlere ilişkin Signor analizi incelendiğinde “*RHOA* ve *YWHAZ*”ın en fazla interaksyon gösteren proteinler olduğu anlaşılmaktadır. KİOMT’de azalış gösteren proteinlere ilişkin Signor analizi incelendiğinde ise “*MAP2K4* ve *AXL*” proteinlerinin en fazla interaksyon gösteren proteinler olduğu görülmektedir.



Şekil 4-31: KİOMT’li vakalar ile sağlıklı katılımcıların üriner eksozomları arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) düzeyde farklılık gösteren 57 proteine ait protein-protein interaction network haritası (kmeans clustering: 3). KİOMT’de artış gösteren proteinlerden “*RHOA*, *YWHAZ*, *ANXA1*, *ANXA2*, *ANXA11*, *S100A6*, *A2M*, *HP* ve *C3*”ün en fazla interaksiyon/node komşuluğu gösteren proteinler olduğu görülmektedir (yeşil ok: KİOMT’de artış gösteren proteinleri; kırmızı ok: KİOMT’de azalış gösteren proteinleri ifade etmektedir).

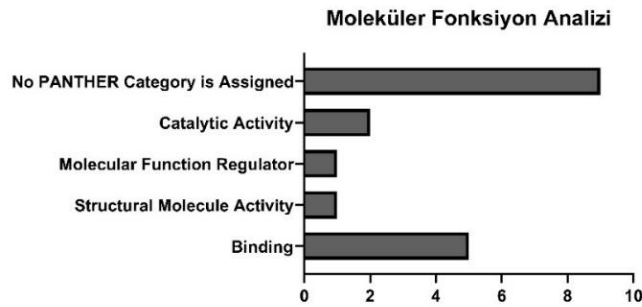


Şekil 4-32: KİOMT’li vakaların üriner ekzozomlarında artış gösteren proteinlere ait Signor analizi (Score: 0.5). “RHOA ve YWHAZ”ın en fazla interaksiyon gösteren proteinler olduğu görülmektedir.

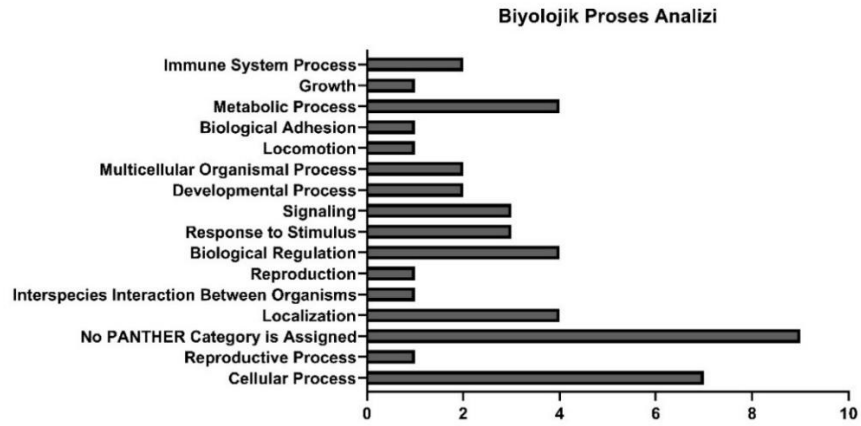


Şekil 4-33: KİOMT’li vakaların üriner ekzozomlarında azalış gösteren proteinlere ait Signor analizi (Score: 0.5). “MAP2K4 ve AXL”nin en fazla interaksiyon gösteren proteinler olduğu görülmektedir.

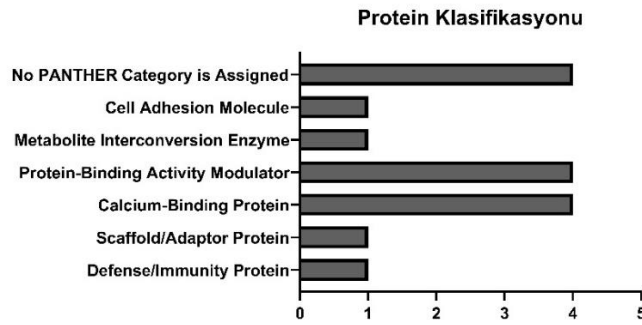
KİOMT’li vakalar ile sağlıklı katılımcıların üriner eksozomları arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) düzeyde farklılık gösterdiği ortaya konulan 57 proteinden KİOMT’de artış gösteren 20 protein ve azalış gösteren 37 protein ayrı ayrı olarak PANTHER database’inde analiz edilmiştir. KİOMT’de artış gösteren 20 proteine ait moleküler fonksiyon analizi Şekil 4-34’te verilmiştir. Bu proteinlerden “5 tanesinin (%31,3) binding ve 2 tanesinin (%12,5) catalytic” aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. KİOMT’de artış gösteren 20 proteine ait biyolojik proses analizi Şekil 4-35’te verilmiştir. Bu proteinlerden “7 tanesinin (%42,8) cellular, 4 tanesinin (%25) localization, 4 tanesinin (%25) biological regulation ve 4 tanesinin (%25) metabolic” proseslerde görev aldığı anlaşılmıştır. KİOMT’de artış gösteren 20 proteine ait protein klasifikasyon analizi Şekil 4-36’da verilmiştir. Bu proteinlerden “4 tanesi (%25) calcium-binding, 4 tanesi (%25) protein-binding activity modulator ve 1 tanesi (%6,3) cell adhesion molecule” olarak sınıflandırılmıştır. KİOMT’de artış gösteren 20 proteine ait pathway analizi Şekil 4-37’de verilmiştir. Pathway analizi bu proteinlerin; “angiogenesis, glycolysis, FGF Signaling Pathway, EGF Receptor Signaling Pathway ve PI3 Kinase Pathway” gibi kanserin temel pathway’lerinde görev aldığını göstermiştir.



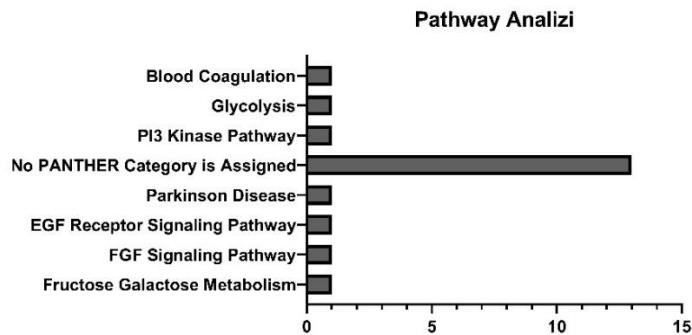
Şekil 4-34: KİOMT’li vakaların üriner eksozomlarında artış gösteren 20 proteine ait PANTHER database’inde yapılan moleküler fonksiyon analizi sonuçları.



Şekil 4-35: KİOMT’li vakaların üriner eksozomlarında artış gösteren 20 proteine ait PANTHER database’inde yapılan biyolojik proses analizi sonuçları.

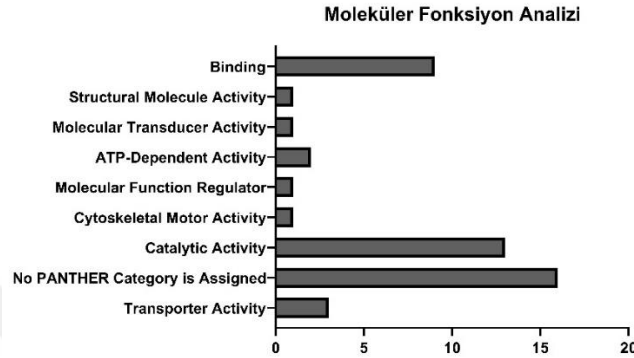


Şekil 4-36: KİOMT’li vakaların üriner eksozomlarında artış gösteren 20 proteine ait PANTHER database’inde yapılan protein klasifikasyon analizi sonuçları.



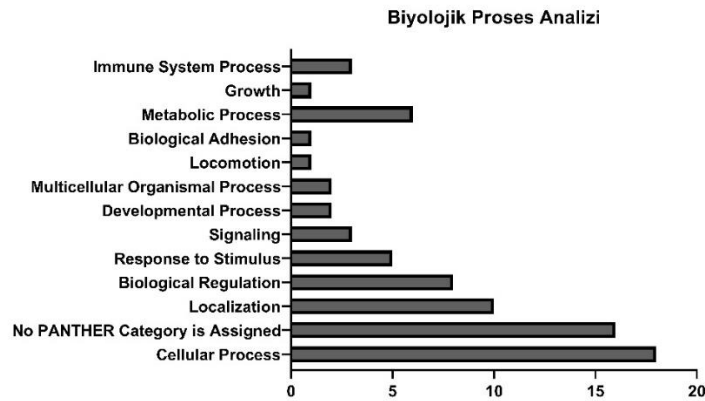
Şekil 4-37: KİOMT’li vakaların üriner eksozomlarında artış gösteren 20 proteine ait PANTHER database’inde yapılan pathway analizi sonuçları.

KİOMT’de azalış gösteren 37 proteine ait moleküler fonksiyon analizi Şekil 4-38’de verilmiştir. Bu proteinlerden “9 tanesinin (%24,3) binding, 13 tanesinin (%35,1) catalytic, 3 tanesinin (%8,1) transporter ve 2 tanesinin (%5,4) ATP-dependent” aktiviteye sahip olduğu görülmüştür.



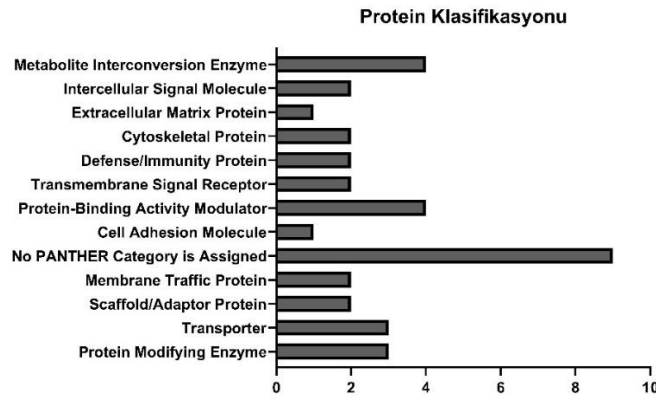
Şekil 4-38: KİOMT’li vakaların üriner eksozomlarında azalış gösteren 37 proteine ait PANTHER database’inde yapılan moleküler fonksiyon analizi sonuçları.

KİOMT’de azalış gösteren 37 proteine ait biyolojik proses analizi Şekil 4-39’da verilmiştir. Bu proteinlerden “18 tanesinin (%48,6) cellular, 10 tanesinin (%27) localization, 8 tanesinin (%21,6) biological regulation, 6 tanesinin (%25) metabolic ve 5 tanesinin (%13,5) response to stimulus” proseslerinde görev aldığı anlaşılmıştır.

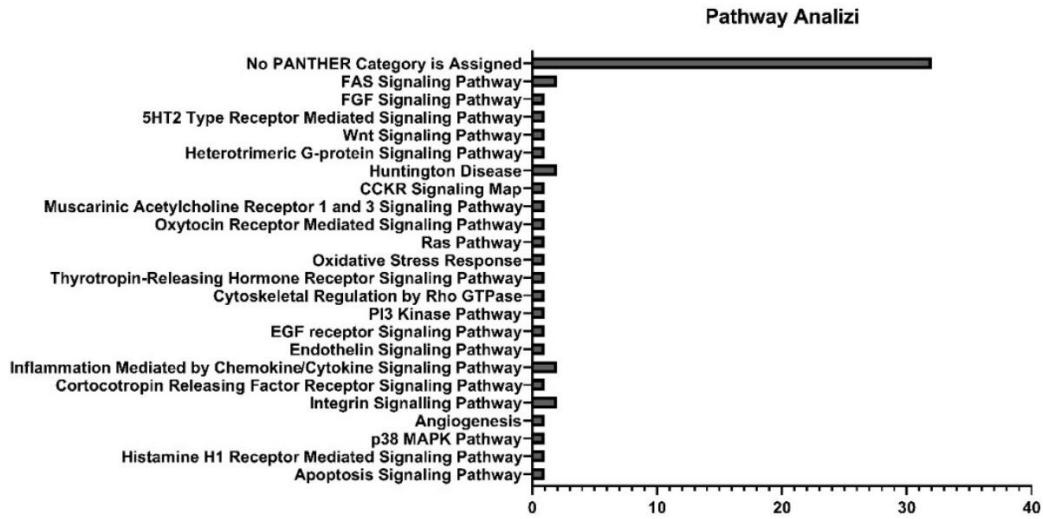


Şekil 4-39: KİOMT’li vakaların üriner eksozomlarında azalış gösteren 37 proteine ait PANTHER database’inde yapılan biyolojik proses analizi sonuçları.

KİOMT’de azalış gösteren 37 proteine ait Protein Klasifikasyon Analizi Şekil 4-40’da verilmiştir. Bu proteinlerden “4 tanesi (%10,8) protein-binding activity modulator, 4 tanesi (%10,8) metabolite interconversion enzyme, 3 tanesi (%8,1) protein modifying enzyme, 3 tanesi (%8,1) transporter ve 1 tanesi (%2,7) cell adhesion molecule” olarak sınıflandırılmıştır. KİOMT’de azalış gösteren 37 proteine ait pathway analizi Şekil 4-41’de verilmiştir. Pathway analizi bu proteinlerin; “Apoptosis Signaling Pathway, FAS Signaling Pathway, Ras Pathway, angiogenesis, FGF Signaling Pathway, EGF Receptor Signaling Pathway, PI3 Kinase Pathway, Endothelin Signaling Pathway, Integrin Signaling Pathway ve Wnt Signaling Pathway” gibi kanserin temel pathway’lerinde görev aldığını göstermiştir. Çalışmanın sonraki aşamasında KİOMT’de artış gösteren gösteren proteinler içerisinde istatistiksel olarak anlamlılık ($p < 0.005$) düzeyi ve FC’si en yüksek olan Suprabasin (SBSN) proteini (Tablo 4-16) validasyon için seçilerek İHK ve WB analizleriyle mesane tümör dokusu, NAT ve Tumor-Free doku örneklerinde incelenmiştir.



Şekil 4-40: KİOMT’li vakaların üriner eksozomlarında azalış gösteren 37 proteine ait PANTHER database’inde yapılan protein klasifikasyon analizi sonuçları.



Şekil 4-41: KİOMT’li vakaların üriner eksozomlarında azalış gösteren 37 proteine ait PANTHER database’inde yapılan pathway analizi sonuçları.

4.6. Üriner Eksozomların MALDI-TOF MS Analizi

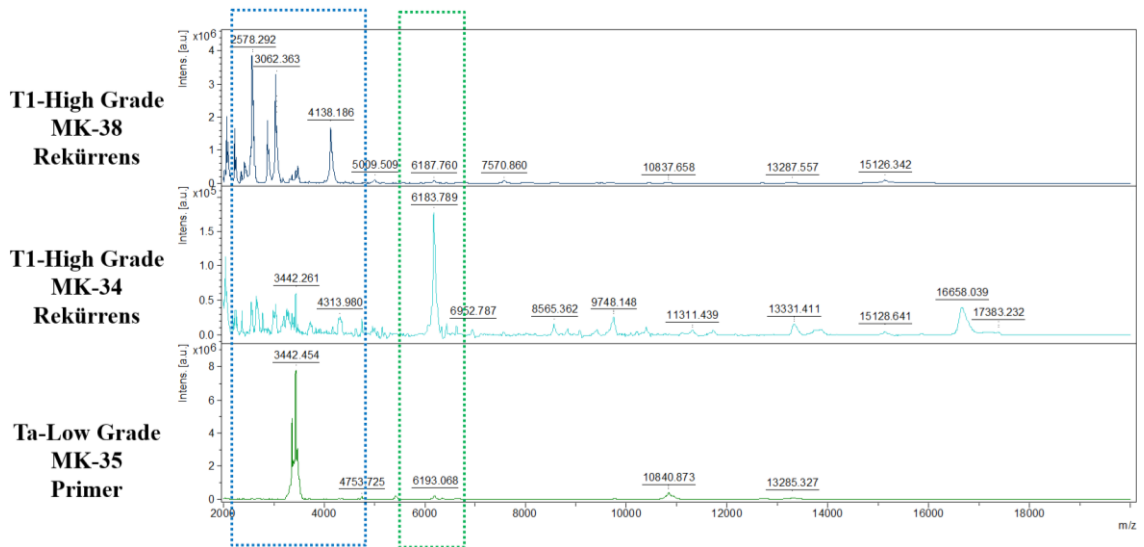
Hepsi erkek olan KİOMT’li 18 vakanın (n=6 Ta-Low Grade, n=6 Ta-High Grade ve n=6 T1-High Grade) TUR-MT öncesinden alınan idrar örneklerinden ultrasantrifüj ile izole edilen intakt eksozomları ayrı ayrı olacak şekilde MALDI-TOF MS ile analiz edilerek mass spectral fingerprint’leri incelendi. KİOMT’li vakalara ait yaş ortalaması 62,6 ($\pm 11,7$) ve VKİ ortalaması 27,6 ($\pm 3,9$) olarak tespit edilmiş olup MK’lı vakalara ait demografik ve klinik bilgiler Tablo 4-18’de verilmiştir. Çalışmada, LC-MS/MS analizinde de kullanılan ve hepsi erkek olan 9 sağlıklı katılımcıya ait üriner eksozomlar kontrol olarak kullanıldı (Tablo 4-15).

Tablo 4-18: KİOMT’li 18 vakaya ait demografik ve klinik bilgiler.

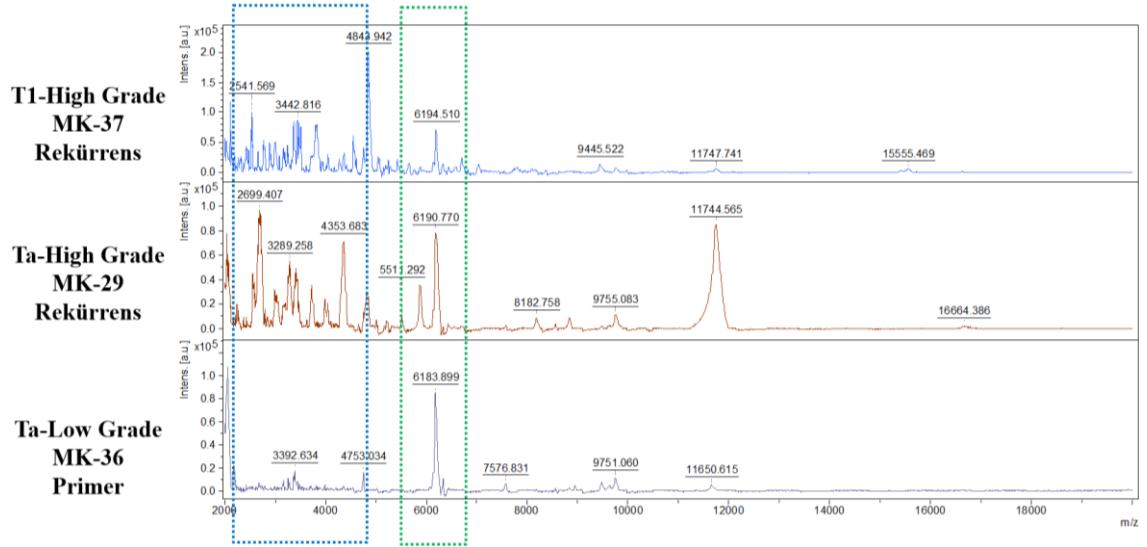
Vaka	E/K	Yaş	VKİ	Tümör (cm)	Primer/Rekürrens	Fokalite	pT	Grade	CIS	Lenfovasküler İnvazyon
MK-1	E	66	31,1	≤3 cm	Rekürrens	Multifokal	Ta	Low	Hayır	Negatif
MK-12	E	49	22	≤3 cm	Primer	Unifokal	Ta	Low	Hayır	Negatif
MK-13	E	65	34,5	≤3 cm	Primer	Unifokal	Ta	Low	Hayır	Negatif
MK-26	E	65	25	≤3 cm	Rekürrens	Multifokal	Ta	Low	Hayır	Negatif
MK-35	E	64	31,6	≤3 cm	Primer	Unifokal	Ta	Low	Hayır	Negatif
MK-36	E	69	35,6	≤3 cm	Primer	Unifokal	Ta	Low	Hayır	Negatif
MK-27	E	55	24	≤3 cm	Rekürrens	Multifokal	Ta	High	Evet	Negatif
MK-28	E	46	28,7	≤3 cm	Primer	Unifokal	Ta	High	Hayır	Negatif
MK-29	E	74	30,6	≤3 cm	Rekürrens	Unifokal	Ta	High	Hayır	Negatif
MK-30	E	64	25	≤3 cm	Rekürrens	Multifokal	Ta	High	Hayır	Negatif
MK-31	E	41	24,5	>3 cm	Primer	Unifokal	Ta	High	Hayır	Negatif

MK-32	E	80	22,7	≤3 cm	Primer	Multifokal	Ta	High	Evet	Negatif
MK-17	E	70	30,8	>3 cm	Primer	Multifokal	T1	High	Hayır	Negatif
MK-18	E	60	26,1	>3 cm	Primer	Unifokal	T1	High	Evet	Negatif
MK-33	E	84	25,2	>3 cm	Primer	Multifokal	T1	High	Hayır	Negatif
MK-34	E	49	28,4	>3 cm	Rekürrens	Multifokal	T1	High	Hayır	Negatif
MK-37	E	76	23,1	>3 cm	Rekürrens	Unifokal	T1	High	Hayır	Negatif
MK-38	E	51	28,7	>3 cm	Rekürrens	Multifokal	T1	High	Evet	Negatif

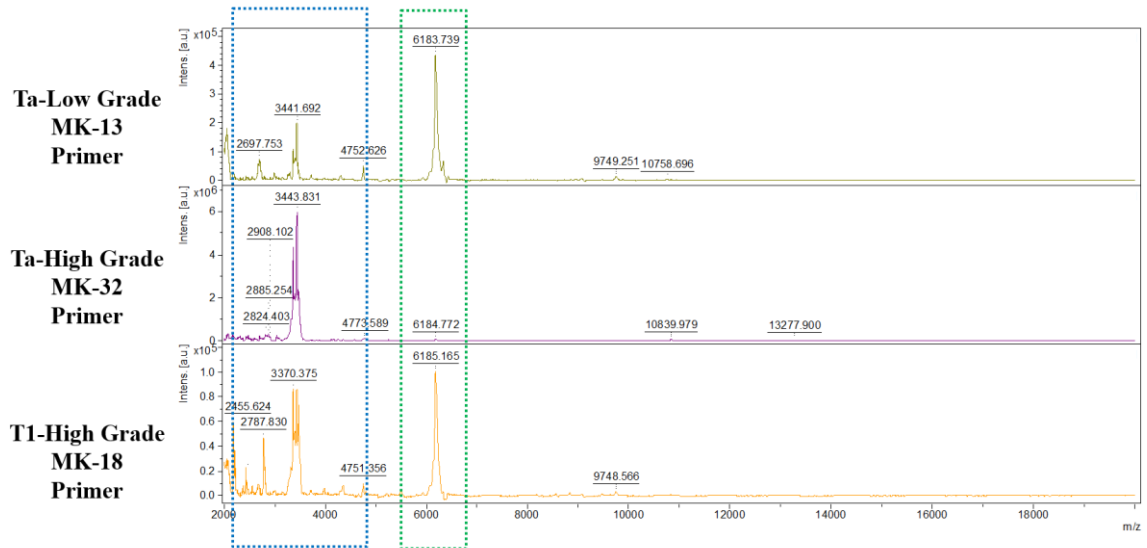
KİOMT’li vakaların üriner eksozomlarının MALDI-TOF MS analizi neticesinde elde edilen mass spectral fingerprint’ler Şekil 4-42’de; sağlıklı katılımcıların mass spectral fingerprint’leri ise Şekil 4-43’te verilmiştir. Mass spektrum’ları incelendiğinde hem MK’lı vakalarda hem sağlıklı katılımcılarda 6000-6200 m/z aralığında ortak birer pik gözlenmiştir (yeşil kutular). MK’lı vakalara ait mass spektrum’larının 2000-5000 m/z aralığında sağlıklı katılımcılara kıyasla daha fazla ve yüksek intensitede pikler verip yoğun bir fingerprint yarattığı saptanmıştır. MK’lı vakalardan primer tümörlü olanlara ait 2000-5000 m/z aralığındaki pik sayısı rekürrensi vakalara kıyasla daha az ve düşük intensitede olup seyrek bir fingerprint oluşturmuştur.



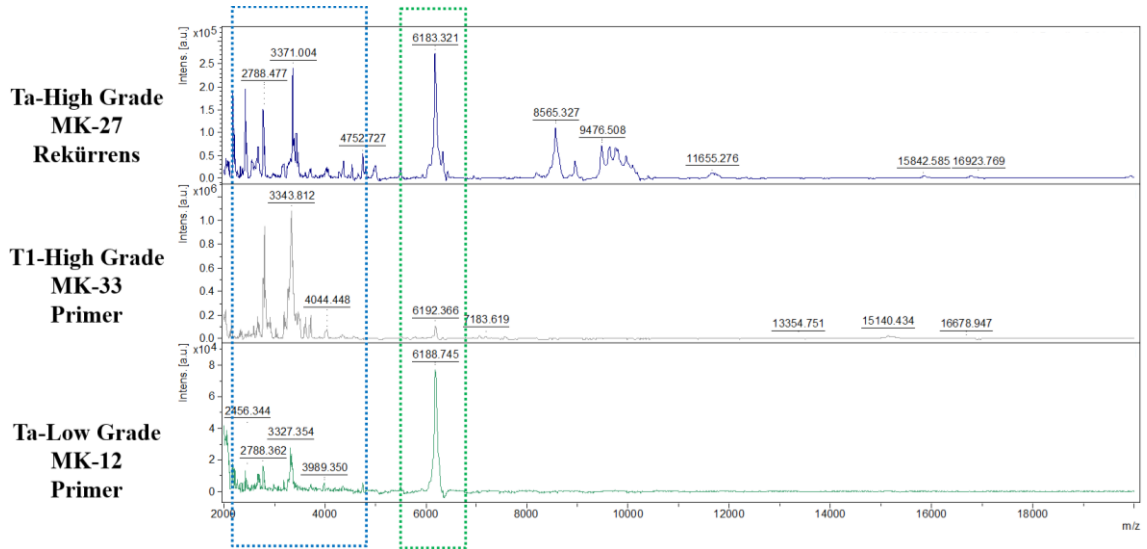
Şekil 4-42: KİOMT’li vakaların üriner eksozomlarının MALDI-TOF MS analizi neticesinde elde edilen mass spectral fingerprint’ler.



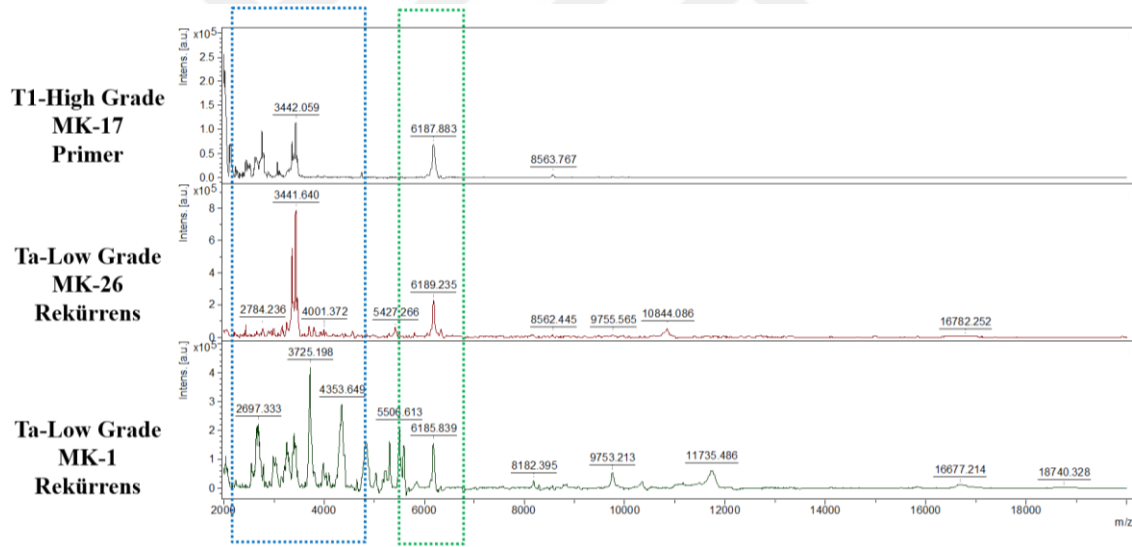
Şekil 4-42: KİOMT'li vakaların üriner eksozomlarının MALDI-TOF MS analizi neticesinde elde edilen mass spectral fingerprint'ler (devamı).



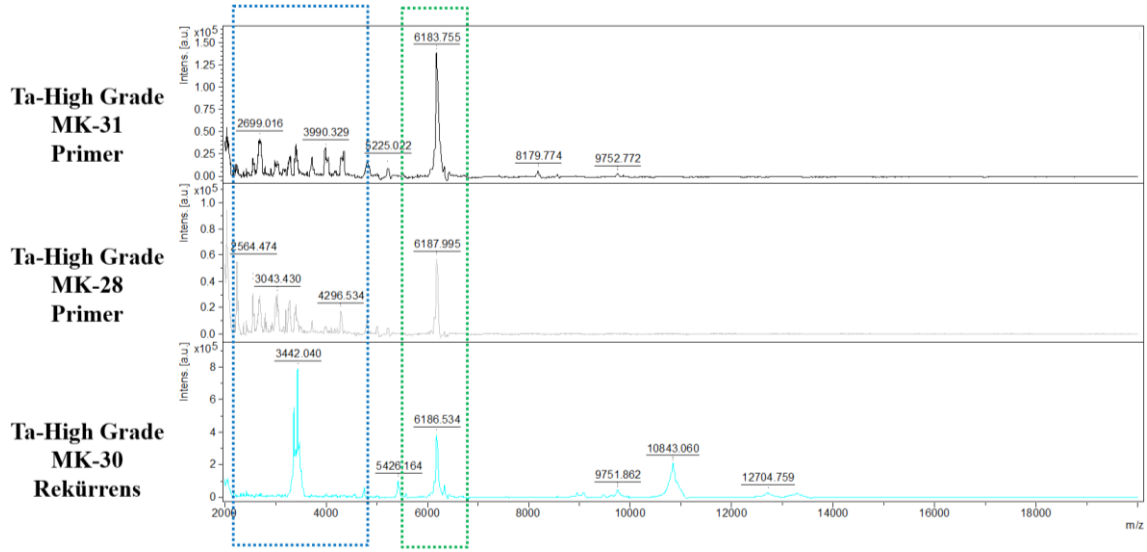
Şekil 4-42: KİOMT'li vakaların üriner eksozomlarının MALDI-TOF MS analizi neticesinde elde edilen mass spectral fingerprint'ler (devamı).



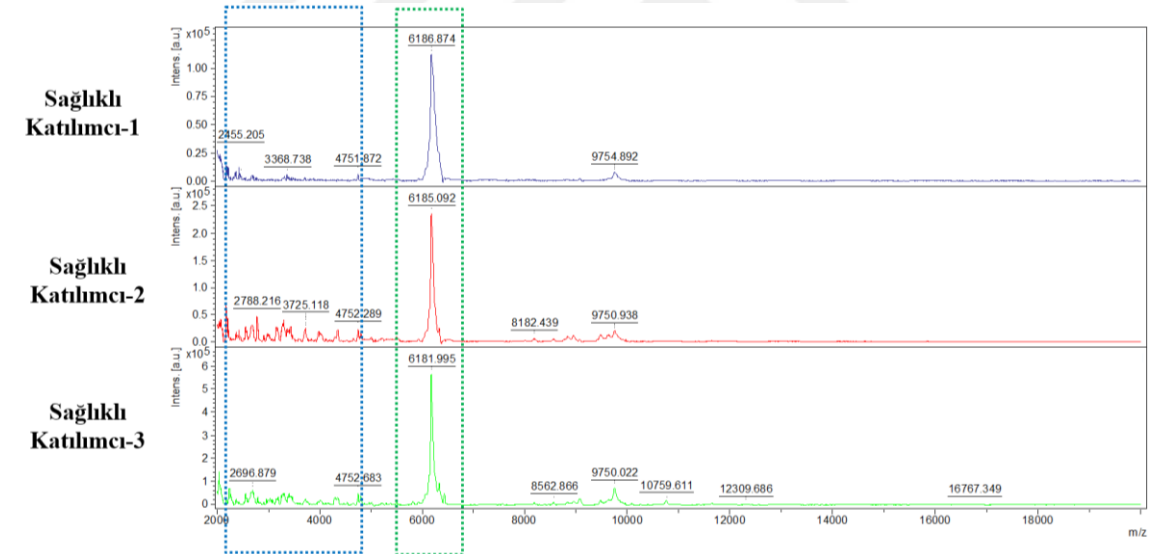
Şekil 4-42: KİOMT'li vakaların üriner eksozomlarının MALDI-TOF MS analizi neticesinde elde edilen mass spectral fingerprint'ler (devamı).



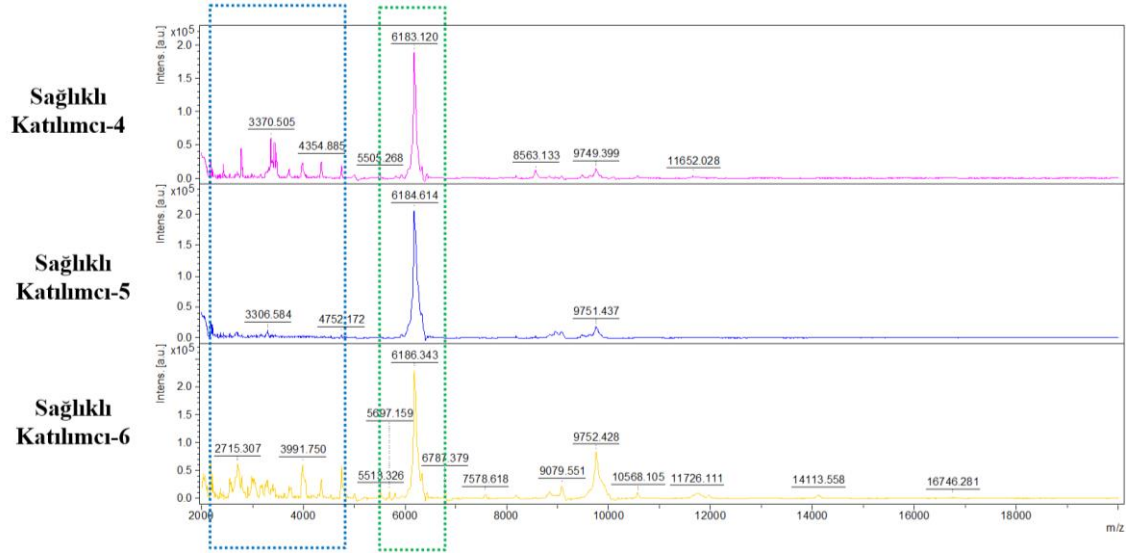
Şekil 4-42: KİOMT'li vakaların üriner eksozomlarının MALDI-TOF MS analizi neticesinde elde edilen mass spectral fingerprint'ler (devamı).



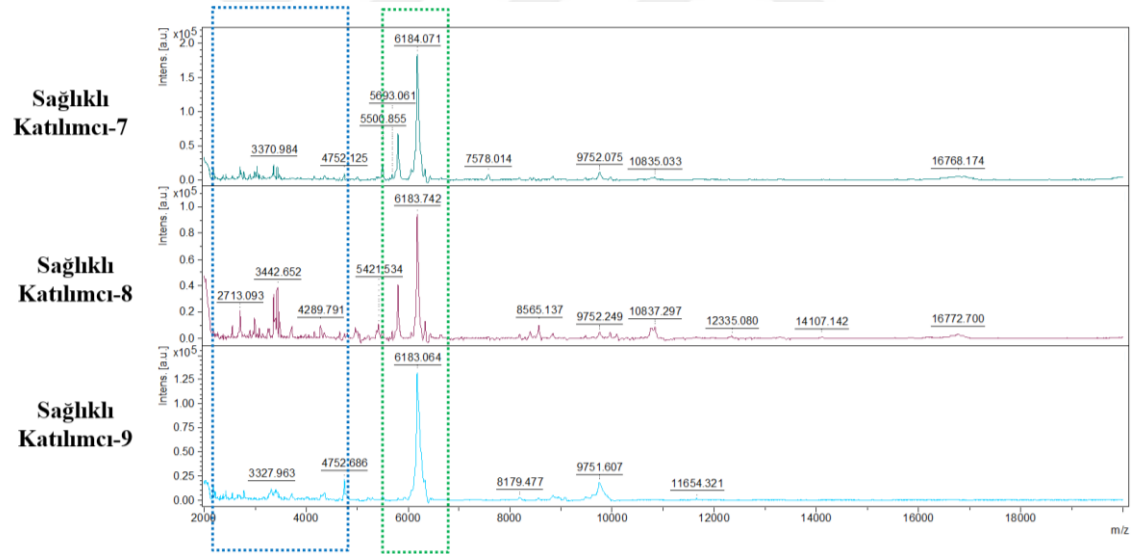
Şekil 4-42: KİOMT’li vakaların üriner eksozomlarının MALDI-TOF MS analizi neticesinde elde edilen mass spectral fingerprint’ler (devamı).



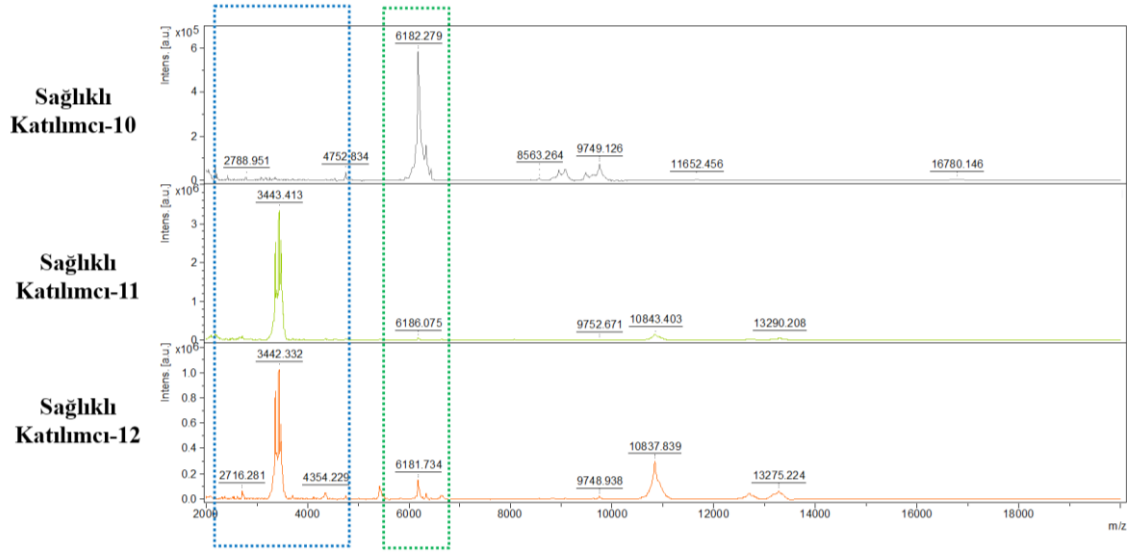
Şekil 4-43: Sağlıklı katılımcıların üriner eksozomlarının MALDI-TOF MS analizi neticesinde elde edilen mass spectral fingerprint’ler.



Şekil 4-43: Sağlıklı katılımcıların üriner eksozomlarının MALDI-TOF MS analizi neticesinde elde edilen mass spectral fingerprint'ler (devamı).



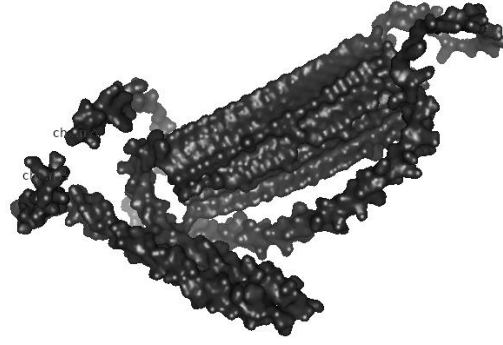
Şekil 4-43: Sağlıklı katılımcıların üriner eksozomlarının MALDI-TOF MS analizi neticesinde elde edilen mass spectral fingerprint'ler (devamı).



Şekil 4-43: Sağlıklı katılımcıların üriner eksozomlarının MALDI-TOF MS analizi neticesinde elde edilen mass spectral fingerprint'ler (devamı).

4.7. Mesane Dokularında SBSN İmmün İfadesi

Suprabasin (SBSN) 19q13.1 sitogenetik lokasyonunda ve keratinosit farklılaşması ile ilişkilendirilen “dermokin- α , dermokin- β ve *KDAP*”ye yakın bulunmaktadır (Pribyl ve ark. 2021). SBSN proteini 247 aminoasit uzunluğunda ve 25.335 kDa ağırlığında (Pribyl ve ark. 2021) olup 3D yapısı Şekil 4-44’te gösterilmiştir. İnsan *SBSN* geni 5 ekzon ile 4 introndan oluşmaktadır ve alternatif splicing’e uğrayan *SBSN* mRNA’sından “1946 bp, 957 bp ve 593 bp” uzunluğunda 3 transkript; yani 3 *SBSN* izoformu meydana gelmektedir (Pribyl ve ark. 2021). SBSN proteini ilk defa stratified epiteliumun bazal tabakasında keşfedilmiştir ve Stratum Corneum’un kornifiye zarfına tabi olan SBSN’nin keratinosit farklılaşmasında majör görev üstlendiği anlaşılmıştır (Tan ve ark. 2022). Bunun haricinde SBSN proteini hakkında literatürde sınırlı düzeyde bilgi bulunmaktadır.



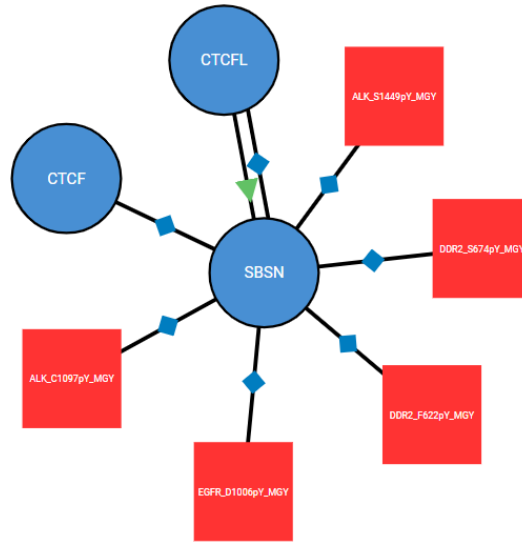
Şekil 4-44: SBSN proteininin 3D yapısı. Protein “chain A” ve “chain B” olarak gösterilen iki zincirden meydana gelmektedir (figür AlphaFold Protein Structure database’inden elde edilen AF-Q6UWP8-F1 modeli kullanılarak PyMOL 2.5 programında yazar tarafından oluşturulmuştur).

Son dönemdeki bazı çalışmalar SBSN’nin kanser ile ilişkisini inceleyerek aşırı ifade edilen SBSN’nin onkogen özelliği gösterdiğine ve tümör oluşumu ile gelişimine katkı sunduğuna işaret etmektedir (Tan ve ark. 2022). Çalışmamız kapsamında PubMed üzerinde “(suprabasin OR sbsn) AND cancer” MeSH term’leri ile 28.06.2023 tarihi itibarıyla arama yapıldı ve toplamda 28 çalışma ile karşılaşıldı. Bunlar içerisinde araştırma makaleleri filtrelendi ve sadece burada derlenen 17 makalenin kanser ve SBSN ilişkisini *in vivo/in vitro* deneylerle verifiye ederek ele aldığı görüldü. Ek olarak, bildiğimiz kadarıyla MK ile SBSN ilişkisini inceleyen sadece 1 çalışma olduğu tespit edildi. SBSN hücre dışına sekrete edilen bir proteindir ve araştırmaların çoğu SBSN’nin kanserde artış göstererek malignite lehine görev aldığına işaret etmektedir. Formolo ve arkadaşlarının “LN18, T98, U118 ve U87”den oluşan GBM hücre hatlarına ait sekretomlar üzerinde yaptığı proteomik araştırmada, diğer hücre hatlarına nazaran daha invaziv karakterli olan U87 hücre hattının sekretomunda SBSN’nin de dahil olduğu 9 proteinin anlamlı (SBSN için $p=0.01$) derecede daha yüksek düzeyde sentezlendiği gösterilmiştir (Formolo ve ark. 2011). Giri ve arkadaşları, metastatik meme ($n=24$) ve over ($n=14$) kanserli vakalar ile neoadjuvan karbotaksol alan over ($n=10$) kanserli vakaların tükürük proteomunu LC-MS/MS ile araştırmışlar ve SBSN’nin de dahil olduğu 4 proteinin sağlıklı katılımcılara ($n=20$) kıyasla neoadjuvan karbotaksol alan over kanserli vakalarda tedavi yanıtıyla ilişkili olarak artıyor olabileceğini göstermişlerdir (Giri ve ark. 2019). Sheng ve arkadaşları, akciğer adenokarsinomlu 5 vakaya ait plevral efüzyon sıvısının proteom profilini 1D-LC-MS/MS ile araştırmışlar ve çalışma neticesinde SBSN ve ANXA2’nin de dahil olduğu 7 proteini yüksek

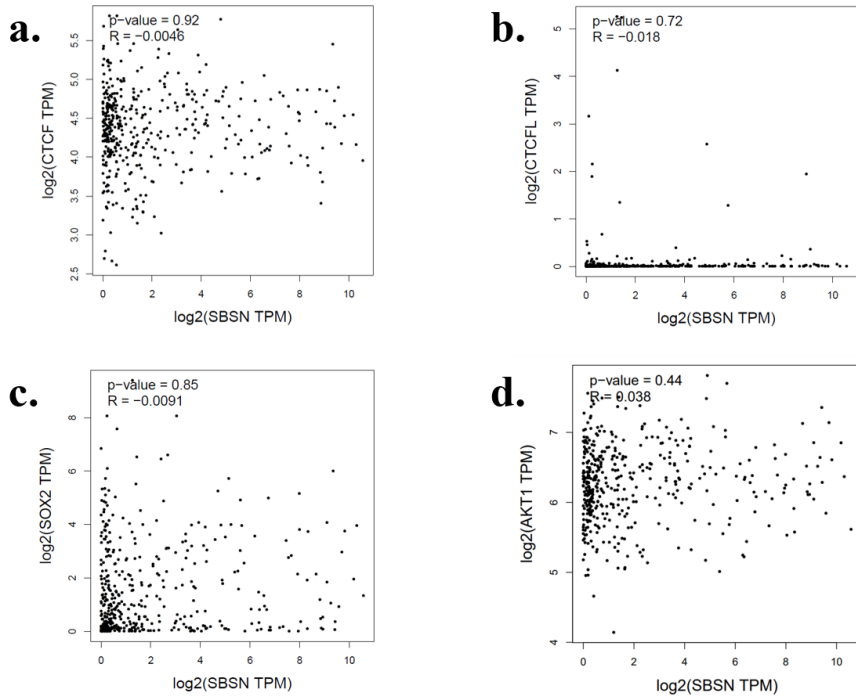
confidence seviyesinde ve literatürdeki serum bazlı akciğer adenokarsinomu çalışmalarından farklı olarak tanımladıklarını bildirmişlerdir (Sheng ve ark. 2014). Esasen Glazer ve arkadaşları daha önce küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) vakalarına ait tümör dokuları (n=28) ve sağlıklı akciğer dokularını kullanarak yaptıkları bisülfidit sekanslama ile *SBSN*'nin de içerisinde olduğu 10 genin demetile olduğunu göstermişlerdi (Glazer ve ark. 2009). Bu bilgiden hareketle Gaykalova ve arkadaşları, normal fizyolojik koşullardaki aktif anlatımının epidermiste olduğunu belirttikleri *SBSN*'nin akciğer adenokarsinomundaki artışının *SBSN* genindeki epigenetik deregülasyon yoluyla olduğunu vurgulayarak CCCTC-Binding Factor (CTCF)'nin antagonisti olan Brother of the Regulator of Imprinted Sites (BORIS) ya da diğer bir adıyla CCCTC-Binding Factor Like (CTCFL) olan transkripsiyon faktörünün *SBSN* geni anlatımını regüle ettiğini kanıtlamışlardır (Gaykalova ve ark. 2012). Araştırmacılar H358 bronkoalveolar küçük hücreli dışı akciğer karsinomu hücrelerinde indükledikleri düşük seviyedeki BORIS'in; *SBSN*'nin CpG adacıklarında demetilasyona neden olduğunu ve kromatini regüle edip *SBSN* Transcription Start Site'ını (TSS) aktive ederek *SBSN* anlatımını 35 kat arttırdığını göstermişlerdir (Gaykalova ve ark. 2012). Çalışmamız kapsamında Proteomics DB üzerinden elde ettiğimiz interaction network haritasında *SBSN*'nin *CTCF* ve *CTCFL* transkripsiyon faktörleriyle ve kanser progresyonundaki önemi iyi bilinen *EGFR*, *ALK* ve *DDR2* ile olan etkileşimi gösterilmiştir (Şekil 4-45). *SBSN*'nin epigenetik regülasyonuna ilişkin başka bir çalışma da Shao ve arkadaşları tarafından yapılmış olup araştırmacılar FFPE olan 62 adenoid kistik tükürük bezi karsinomu dokusu ve 25 sağlıklı tükürük bezi dokusunu kullanarak yaptıkları çalışmalarında *SBSN*'nin 2. intronundaki CpG island'larının kanserli dokularda istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.0001$) düzeyde hipometilasyona uğradığını göstermişlerdir (Shao ve ark. 2012). Araştırmacılar ayrıca SACC83 adenoid kistik tükürük bezi karsinomu hücre hattını kullanarak yaptıkları çalışmalarında *SBSN* aşırı ifadesinin invazyon ve metastazla ilişkili olduğunu ortaya koymuşlardır (Shao ve ark. 2012). Hourı ve arkadaşları ise oral skuamöz hücreli karsinom (OSHK) hücre hatları olan "SAS, HSC-3 ve HSC-4" hücrelerini kullanarak yaptıkları *in vitro* çalışmalarında *SBSN* aşırı ifadesinin MTT aktivitesini azalttığını ancak BrdU ve cell cycle assay'lerinde ise hücre proliferasyonunu arttırdığını göstermişlerdir (Hourı ve ark. 2023). İlaveten araştırmacılar kaspaz 3, kaspaz 7, LC-3 ve p16 düzeylerine bakarak *SBSN* aşırı ifadesinin OSHK'da apoptoz ve otofaji üzerinde güçlü şekilde etkili

olmadığını ortaya koymuşlardır (Hourı ve ark. 2023). Çalışma neticesinde SBSN anlatımının hipoksik koşullarda normoksiye kıyasla daha fazla olduğu ve hipoksik ortamda SBSN'nin hücre migrasyonuna daha fazla yol açtığı ancak MMP aktivitesi ve EMT üzerinde değişiklik yaratmadığı görülmüştür (Hourı ve ark. 2023). Araştırmacılar ayrıca SBSN aşırı ifadesinin ya da knockdown edilmesinin qRT-PCR kantitasyonu sonuçlarına göre OSHK'da VEGF anlatımı üzerinde değişiklik yaratmadığını ancak hipoksik koşullarda SBSN'nin normoksik koşullara kıyasla anjiyogenezi güçlü şekilde indüklediğini kanıtlamışlardır (Hourı ve ark. 2023). Huboackova ve arkadaşlarının yaptığı *in vitro* çalışmada “HeLa, MCF-7 ve DU145” hücreleri klinikteki dozlara göre ayarlanmış “epigenetik modifier 5-Azacytidine” ve iyonize edici radyasyon ile muamele edildikten sonra kültür ortamında hayatta kalan kök hücre benzeri low-adherent subpopülasyonlar da dahil olmak üzere tüm hücrelerin transkript profilleri “Whole-genome expression array” ile araştırılmıştır (Huboackova ve ark. 2019). Daha sonra araştırmacılar array sonuçlarının, low-adherent hücre fraksiyonlarında interferon response'u ile ilişkili genlerin deregüle edildiğine işaret ettiğini göstererek hücre hatlarını interferon- γ ile muamele etmişlerdir (Huboackova ve ark. 2019). Araştırmacılar, interferon- γ muamelesi sonrasında hücrelerden Notch sinyalizasyonu ve kök hücre belirteçleri anlatımı sergileyen heterojen low-adherent hücre fraksiyonları geliştiğini görmüşlerdir (Huboackova ve ark. 2019). Buna ilaveten araştırmacılar interferon- γ aracılı adezyon kaybı ve anoikis direnci ile low-adherent hücre fraksiyonlarının sağkalımı için aktif MEK/Erk sinyal yolağı ve “Interferon Responsible Factor 1 (IRF1)” in primer görev üstlendiğini ortaya koyarak bu yolağın aktive olmasının aynı zamanda SBSN anlatımını da upregüle ettiğini belirtmişlerdir (Huboackova ve ark. 2019). Çalışmanın devamında araştırmacılar, iyonize edici radyasyon ile ışınlanıp “5-Azacytidine” ve interferon- γ ile muamele edilen hücrelerde SBSN anlatımının knockdown edilmesinin low-adherent hücre fraksiyonlarının baskılanmasıyla sonuçlandığını kanıtlamışlardır (Huboackova ve ark., 2019). Araştırmacılar bu durumu SBSN'nin genotoksik stresle indüklenmiş fenotipik plastisite ve stres/tedavi direnci üzerinde etkili olabileceği şeklinde yorumlamışlardır (Huboackova ve ark. 2019). Sonraki aşamada araştırmacılar kolorektal kanserli vakalara ait tümör dokuları (n=8) ve tümöre komşu sağlıklı dokular (n=8) ile over kanserli vakalara ait örneklerde (n=100) ve sağlıklı katılımcılara ait örneklerde (n=14) SBSN anlatımını qRT-PCR ile kantite etmişler ve SBSN anlatımının kanserli örneklerde

istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.005$) düzeyde daha yüksek olduğunu göstermişlerdir (Huboackova ve ark. 2019). İlaveten araştırmacılar 6 haftalık dişi BALB/c Nude farelerde 4T1 fare meme kanseri hücreleriyle tümör modeli yaratarak farelere ait meme tümörü dokularında, 4T1 hücre metastazına uğramış akciğer ve karaciğer dokularında ve kan CTC'lerindeki SBSN anlatımını qRT-PCR ile kantite etmişlerdir (Huboackova ve ark. 2019). Kantitasyon sonucunda parental 4T1 hücrelerine kıyasla özellikle CTC'lerde ve akciğer dokularında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.005$) düzeyde artmış SBSN anlatımı bildirilmiştir (Huboackova ve ark. 2019). CTC'lerdeki artmış SBSN anlatımını takiben bu araştırma grubu bir sonraki çalışmalarında Miyelodisplastik Sendromda (MDS) SBSN anlatımını araştırmışlardır (Pribyl ve ark. 2020). Araştırmacılar 3 kohortun bulunduğu çalışmalarında en büyüğü 48 MDS'li vakadan oluşmak üzere MDS'li hastalara, hematolojik kanserli hastalara ve sağlıklı katılımcılara ait BM mononükleer hücrelerindeki ve periferik kan örneklerindeki SBSN anlatımını qRT-PCR ile araştırmışlardır (Pribyl ve ark. 2020). Kantitasyon sonuçlarına göre SBSN anlatımının en yüksek olduğu hasta grubunun kötü prognoza sahip grup olduğu bildirilmiştir (Pribyl ve ark. 2020). Daha sonraki aşamada araştırmacılar "SKM-1 ve OCI-M2 miyeloid lösemi hücre hatları" ile "MCF-7, U373 ve HEK293T" hücrelerini dahil ettikleri *in vitro* analizlerinde "5-Azacytidine" ve interferon- γ ile muamele edilen lösemi hücrelerinde SBSN anlatımının istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) düzeyde arttığını göstermişler ve MDS'li vakalardaki artmış ektopik SBSN anlatımının BM'deki anormal sitokin seviyeleri ile epigenetik modifikasyonlardan kaynaklanıyor olabileceğini ileri sürmüşlerdir (Pribyl ve ark. 2020). Celsi ve arkadaşları endometriyum kanseri (EK) olan 10 vakanın ve 10 sağlıklı katılımcının serum örneklerini 2D-DIGE ve MS ile analiz ederek serum proteomunu araştırmışlar ve SBSN'nin de dahil olduğu 24 proteinin EK'lı vakalar ile sağlıklı katılımcılar arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) düzeyde farklı eksprese edildiğini ortaya koymuşlardır (Celvi ve ark. 2022). Daha sonra araştırmacılar "44 EK'lı vakanın ve 60 non-EK'lı katılımcının" dahil olduğu validasyon kohortuna ait serum ve doku örneklerindeki SBSN düzeyini WB ile analiz etmişlerdir (Celvi ve ark. 2022). Çalışma neticesinde SBSN'nin 2 izoformunun da doku örneklerinde downregüle olduğu; buna karşılık serum örneklerinde SBSN izoform 1'in upregüle olurken SBSN izoform 2'nin downregüle olduğu ortaya konulmuş ve bulgular biyoinformatik analizlerle de doğrulanmıştır (Celvi ve ark. 2022).



Şekil 4-45: SBSN'ye ait interaction network haritası. CTCF ve CTCFL transkripsiyon faktörlerinin SBSN anlatımını regüle ettiği ve SBSN'nin EGFR, ALK ve DDR2 ile interaksiyon gösterdiği görülmektedir.



Şekil 4-46: MK'da SBSN anlatımı ile CTCF (a), CTCFL (b), SOX2 (c) ve AKT (d) anlatımlarının korelasyonu. SBSN'nin CTCF ($p=0.92$; $R:-0,0046$), CTCFL ($p=0.72$; $R:-0,018$) ve SOX2 ($p=0.85$; $R:-0,0091$) ile negatif korelasyon; AKT1 ($p=0.44$; $R:0,038$) ile ise pozitif korelasyon göstermektedir (TPM: Transcripts Per Million).

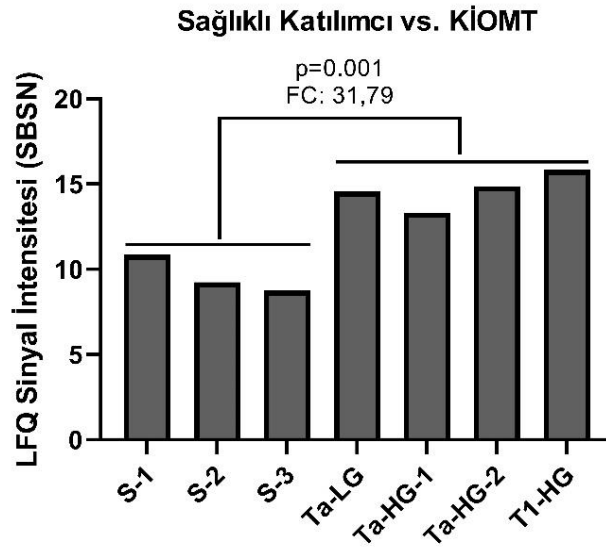
SBSN'nin artış gösterdiği bildirilen kanser türlerinden bir tanesi de özofagus kanseridir. Zhu ve arkadaşları "KYSE30, KYSE140, KYSE180, KYSE410, KYSE510, KYSE 520, ECa109, 108Ca, TE-1, EC18 ve HKESC1"den oluşan skuamöz hücreli özofagus kanseri (SHÖK) hücre hatları ile "NEEC1 ve NEEC2" normal özofagus epitel hücre hatları; SHÖK'li 170 vakaya ait FFPE olan doku bloğu, SHÖK'li 8 vakaya ait taze tümör dokusu ve tümöre komşu 8 sağlıklı taze özofagus dokusu ile TCGA database'inden elde edilen verileri dahil ettikleri çalışmalarında SBSN anlatımını araştırmışlardır (Zhu ve ark. 2016). Çalışma kapsamında TCGA database'inden elde edilen 70 SHÖK'li vaka ve 9 sağlıklı katılımcıya ait verilere göre SBSN'nin SHÖK'de istatistiksel olarak anlamlı ($p=0.0033$) düzeyde arttığı görülmüştür (Zhu ve ark. 2016). Buna ek olarak araştırmacılar SHÖK'li 11 hücre hattının hepsinde SBSN anlatımını qRT-PCR ile kantite etmişler ve "NEEC1 ve NEEC2" normal özofagus epitel hücre hatlarındaki SBSN anlatımına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) düzeyde artış gösterdiğini ortaya koymuşlar ve bulgularını WB ile de konfirme etmişlerdir (Zhu ve ark. 2016). Sonraki aşamada araştırmacılar SHÖK'li 8 vakaya ait tümör dokusu ve tümöre komşu 8 sağlıklı özofagus dokusundaki SBSN anlatımını ve protein seviyesini yine qRT-PCR ve WB ile araştırmışlar ve SBSN'nin SHÖK'da istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) düzeyde arttığını bildirmişlerdir (Zhu ve ark. 2016). Aynı sonuçlarla SHÖK'li vakalara ait FFPE doku bloklarından yapılan İHK analizinde de karşılaşılmış ve SBSN immün ifadesinin SHÖK'de istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) düzeyde artan tümör evresiyle paralel şekilde artış gösterdiği ve SHÖK'deki artmış SBSN immün ifadesinin istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.0001$) düzeyde azalmış genel sürvi ile ilişkili olduğu anlaşılmıştır (Zhu ve ark. 2016). Bunlara ek olarak araştırmacılar SHÖK hücrelerinde SBSN aşırı ifadesini indüklediklerinde hücre proliferasyonu ve tümörojenitenin arttığını buna karşılık SBSN anlatımını knockdown ettiklerinde ise azaldığını hem *in vitro* olarak hem de BALBc/Nude farelerde SBSN aşırı ifadesi yapan ve SBNS ifadesi susturulmuş KYSE510 SHÖK hücreleri ile oluşturdukları ksenograft tümör modeli aracılığıyla *in vivo* olarak kanıtlamışlardır (Zhu ve ark. 2016). Tüm bunlara ek olarak araştırmacılar, SBSN aşırı ifadesinin Wnt/ β -katenin sinyal yolağını aktive ettiğini, β -katenin'in nükleer lokalizasyonuna neden olduğunu ve "Cyclin D1 ile c-Myc" in upregülasyonuna yol açtığını ortaya koymuşlardır (Zhu ve ark. 2016). SHÖK ile SBSN ilişkisini ele alan bir diğer çalışma da Takahashi ve arkadaşları tarafından yapılmış olup araştırmacılar çalışmalarına; erken evre SHÖK'li 47 vakaya ait tümör

dokularına ek olarak “KYSE30, KYSE70, KYSE180 ve KYSE450” SHÖK hücre hatlarını, “Het-1A normal özofagus skuamöz hücre hattını” ve “HUVEC ile HEK293” hücre hatlarını dahil etmişlerdir (Takashi ve ark. 2020). Araştırmacılar 47 erken evre SHÖK’li vakaya ait doku örneklerinde İHK ile yaptıkları analizde bir transkripsiyon faktörü olan Sox2’nin immün ifadesinin tümöre komşu sağlıklı doku örneklerine kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) düzeyde arttığını göstermişlerdir (Takashi ve ark. 2020). Araştırmacılar “Het-1A” hücrelerinde SOX2’nin aşırı ifadesini sağladıklarında sekrete edilen SBSN düzeyinin arttığını göstermişler ve SBSN’nin TSS’sinde “Sox2 Binding Site” bulunduğu işaret ederek Sox2 transkripsiyon faktörünün SBSN için bir regülatör olduğunu belirtmişlerdir (Takashi ve ark. 2020). Araştırmacılar ayrıca kültüre edilmiş normal “Het-1A” hücreleri ile muamele edilen SBSN’nin proliferasyonu indüklediğini, SOX2 aşırı ifadesinin ve artmış SBSN anlatımının hücre proliferasyonunu, sferoid formasyonunu, migrasyonu ve anjiyogenezi arttırdığını kanıtlamışlardır (Takashi ve ark. 2020). Araştırmacılar 47 erken evre SHÖK’li vakaya ait doku örneklerinde İHK ile yaptıkları analizde Sox2 immün ifadesinin yüksek olduğu dokularda SBSN immün ifadesinin ve kılcal damar densitesinin de yüksek olduğunu göstermişler ve SBSN’nin anjiyogenezi indüklemek için bağımlı olduğu AKT sinyalizasyonunun, AKT fosforilasyonun inhibe edilmesi yoluyla bloklanması durumunda anjiyogenik etkinin de ortadan kalktığını bildirmişlerdir (Takashi ve ark. 2020). Sonuç olarak çalışma neticesinde; erken evre SHÖK’da tümör dokularında anlatımı artan Sox2 transkripsiyon faktörünün SBSN anlatımını da arttırdığı ve artmış hücre proliferasyonu ile anjiyogenez vasıtasıyla karsinogenezin destekleniyor olabileceği anlaşılmaktadır (Takashi ve ark. 2020). Esasen SBSN’nin proanjiyogenik özelliğine ve SBSN’nin anjiyogenezdeki rolünün AKT sinyalizasyonu üzerinden olduğuna işaret eden ilk çalışma Alam ve arkadaşları tarafından yapılmış olup araştırmacılar SBSN’nin novel bir tümör endotel hücre belirteci olabileceğini de önermişlerdir (Alam ve ark., 2014). Gelineen noktada CTCF, CTCFL, Sox2 ve AKT’nin SBSN anlatımı üzerinde etkili olabileceği sonucu ortaya çıkmaktadır. Çalışmamız kapsamında GEPIA 2.0 arayüzü kullanılarak TCGA ve GTEx verileri ile veri madenciliği yapılmış ve MK’da SBSN anlatımı ile CTCF, CTCFL, SOX2 ve AKT anlatımlarının korelasyonu incelenmiştir (Şekil 4-46). Analiz neticesinde CTCF’nin ($p=0.92$; $R:-0,0046$), CTCFL’nin ($p=0.72$; $R:-0,018$) ve SOX2’nin ($p=0.85$; $R:-0,0091$), SBSN ile negatif korelasyon gösterdiği; AKT1 ($p=0.44$; $R:0,038$) ile ise pozitif

korelasyon gösterdiği anlaşılmıştır. Ucer ve arkadaşları non-melanoma deri kanseri ile SBSN ilişkisini ele almış olup araştırmacılar FFPE olan 90 Skuamöz Hücreli Deri Karsinomu (SHDK) dokusu, 30 Bazal Hücreli Deri Karsinomu (BHDK) ve 30 sağlıklı deri dokusu örneklerini dahil ettikleri çalışmalarında SBSN immün ifadesini araştırmışlardır (Ucer ve ark. 2022a). Çalışma neticesinde ilginç şekilde SHDK evresi arttıkça SBSN immün ifadesinin istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.001$) düzeyde azaldığı; BHDK'lı örneklerde ise lezyonlu alanlarda SBSN immün ifadesinin görülmediği ancak sağlıklı deri dokusu örneklerinde SBSN immün ifadesinin gözlemlendiği bildirilmiştir (Ucer ve ark. 2022a). Bu bulgulardan hareketle araştırmacılar SBSN'nin; SHDK'da evreleme amaçlı olarak ve BHDK'da ise ayırıcı tanıda biyobelirteç olarak kullanılabileceğini vurgulamışlardır (Ucer ve ark. 2022a). Bu araştırma grubu bir diğer çalışmalarında ise FFPE olan 30 malign mezotelyoma (MM) dokusunu, 30 reaktif mezotelyal hiperplazi (RMH) dokusunu ve 30 akciğer adenokarsinomu dokusunu kullanarak SBSN ve DARS2 immün ifadelerinin ayırıcı tanıdaki etkinliğini araştırmışlardır (Ucer ve ark. 2022b). Çalışma neticesinde DARS2 immün ifadesi tüm gruplarda gözlenirken SBSN immün ifadesinin sadece akciğer adenokarsinomu dokularında ve istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.001$) düzeyde ifade edildiği bildirilmiştir (Ucer ve ark. 2022b). Çalışmamızın LC-MS/MS sonuçlarına göre, KİOMT'li vakaların üriner eksozomlarında tanımlanan SBSN'ye ait log₂'ye göre transforme edilmiş LFQ sinyal intensitelerinin sağlıklı katılımcılara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.001$) düzeyde yüksek (FC: 31,79) bir değişim gösterdiği görülmüştür (Şekil 4-47).

Bildiğimiz kadarıyla EV'lerdeki/eksozomlardaki SBSN anlatımı ile kanser arasındaki ilişkili ele alan tek bir çalışma bulunmakta olup Chen ve arkadaşlarına aittir (Chen ve ark. 2022). Araştırmacılar öncelikle FFPE olan 168 glioma dokusu ve 6 sağlıklı beyin dokusundan oluşan tissue array'i kullanarak SBSN immün ifadesini araştırmışlar ve glioma evresi arttıkça SBSN immün ifadesinin istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.01$) düzeyde arttığını ve SBSN immün ifadesindeki artışın kötü prognozla ilişki olduğunu bildirmişlerdir (Chen ve ark. 2022). Daha sonraki aşamada araştırmacılar, 4-5 haftalık dişi BALB/c nude farelere SBSN aşırı anlatımı yapan ve SBSN anlatımı susturulmuş GL261 fare glioma hücrelerini intrakranial olarak inoküle edip ortotopik tümör modeli yaratmışlar ve çalışma neticesinde SBSN aşırı anlatımı yapan GL261 hücrelerinin oluşturduğu tümörlerin volümlerinin ve ağırlıklarının istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.01$) düzeyde SBSN anlatımı susturulanlardan daha fazla

olduğunu ortaya koymuşlardır (Chen ve ark. 2022). Buna ek olarak araştırmacılar “LN229, LN18, T98G, U118MG, A172, U87MG, U251MG ve U138MG” glioma hücre hatları ile sağlıklı insan astrosit hücrelerini dahil ederek yaptıkları *in vitro* çalışmalarında, EV/eksozom aracılı transfer edilen SBSN’nin alıcı glioma hücrelerinde migrasyonu, invazyonu ve anjiyogenezi arttırarak tümör agresifliğini indüklediğini göstermişlerdir (Chen ve ark. 2022). Araştırmacılar ayrıca SBSN’nin; NF- κ B sinyal yolağını modüle eden “NF- κ B Essential Modulator”ünün (NEMO)” ubiquitinlenerek aktifleşmesinde rol alan *ANXA1* ile etkileşerek NF- κ B sinyal yolağının indüklenmesine katkı sağladığını bildirmişlerdir (Chen ve ark. 2022). EV/eksozom içeriğindeki SBSN artışı ile kanser arasındaki ilişkiyi ele alan bu çalışma sonucunda; onkogen özelliği sergileyen SBSN’nin hücreler arasında EV aracılı transfer yoluyla kanserle ilişkisi iyi bilinen NF- κ B ve Wnt/ β -katenin gibi sinyal yolaklarını aktive edip kanser progresyonuna katkı sağladığına dair güçlü kanıtlar elde edilmiştir (Chen ve ark. 2022).

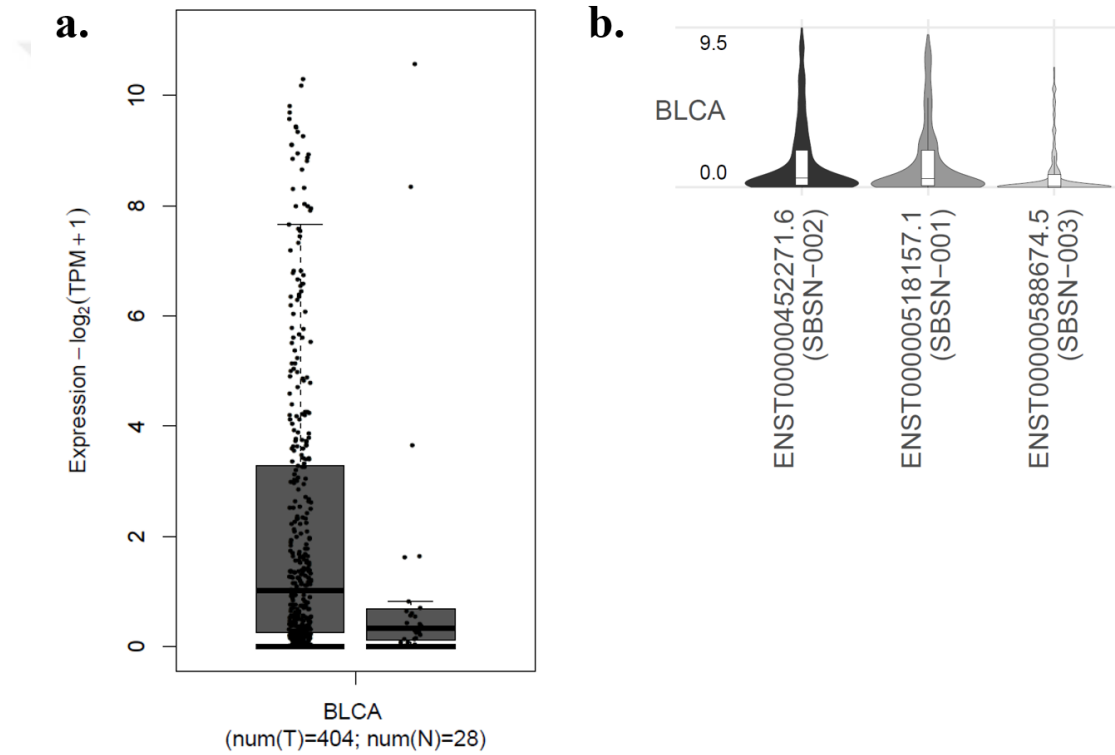


Şekil 4-47: KİOMT’li vakaların ve sağlıklı katılımcıların üriner eksozomlarında tanımlanan SBSN’ye ait log2’ye göre transforme edilmiş LFQ sinyal intensitelerinin değişimi (LFQ: Label-Free Quantification, FC: Fold Change, S: Sağlıklı Katılımcı, LG: Low Grade, HG: High Grade).

Bildiğimiz kadarıyla SBSN ile MK ilişkisini ele alan 1 çalışma bulunmakta olup Zhou ve arkadaşlarına aittir (Zhou ve ark. 2022). Araştırmacılar Oncomine database’inden elde ettikleri verilerden hareketle 62 mesane tümör dokusu ve 68 sağlıklı

mesane dokusuna ait *SBSN* anlatımını karşılaştırmışlar ve tümör dokularındaki *SBSN* anlatımının istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.001$) düzeyde arttığını göstermişlerdir (Zhou ve ark. 2022). Sonraki aşamada araştırmacılar FFPE olan 54 mesane tümör dokusundan oluşan tissue array'i kullanarak *SBSN* immün ifadesini araştırmışlar ve çalışma neticesinde *SBSN* immün ifadesinin tümörlü alanlarda güçlü olduğunu; tümörsüz mesane dokusu alanları ile stromal doku alanlarında zayıf/az olduğunu ve MK evresi arttıkça *SBSN* immün ifadesinin de istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.01$) düzeyde arttığını ortaya koymuşlardır (Zhou ve ark. 2022). Buna ek olarak artmış *SBSN* anlatımı istatistiksel olarak anlamlı düzeyde kısalmış genel sürvi ($p=0.0015$) ve rekürrensiz sürvi ($p=0.039$) ile ilişkili bulunmuş ve *SBSN*'nin MK için diyagnostik bir belirteç olabileceği vurgulanmıştır (Zhou ve ark. 2022). Sonraki aşamada araştırmacılar "RT4, ScaBER, TCCSUP, 5637, SW780, J82, T24 ve UMUC-3" MK hücre hatlarındaki ve SV-HUC-1 immortalize sağlıklı mesane epitel hücre hatlarındaki *SBSN* anlatımını qRT-PCR ve WB ile analiz etmişler ve SV-HUC-1 hücrelerine kıyasla MK'lı hücre hatlarındaki *SBSN* anlatımının istatistiksel olarak anlamlı (5637 için $p<0.05$; diğer hücre hatları için $p<0.01$) düzeyde daha yüksek olduğunu göstermişlerdir (Zhou ve ark. 2022). Bu aşamadan sonra araştırmacılar 4-5 haftalık dişi BALB/c nude farelere subkutanöz olarak *SBSN* aşırı anlatımı yapan ve *SBSN* anlatımı susturulmuş MB49 fare MK hücrelerini inoküle ederek ksenograft tümör modeli yaratmışlar ve çalışma neticesinde *SBSN* aşırı anlatımı yapan MB49 hücrelerinin oluşturduğu tümörlerin volümlerinin ve ağırlıklarının istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.001$) düzeyde *SBSN* anlatımı susturulanlardan daha fazla olduğunu ve ayrıca *SBSN* aşırı ifadesi yapan tümörlerde akciğer metastazının arttığını ortaya koymuşlardır (Zhou ve ark. 2022). Daha sonra araştırmacılar *SBSN* sekrete edilmiş medyumlarla kültüre ettikleri hücrelerde de metastazın indüklendiğini göstermişler ve hem hücreSEL *SBSN*'nin hem de sekrete edilmiş *SBSN*'nin EGFR/SRC/STAT3 sinyal yolağını aktive ederek MK'da metastazı indüklediğini bildirmişlerdir (Zhou ve ark. 2022). Çalışmamız kapsamında GEPIA 2.0 arayüzü kullanılarak TCGA ve GTEx verileri ile veri madenciliği yapılmış ve MK'da *SBSN* anlatımının mRNA düzeyindeki değişimi (Şekil 4-48a) ve *SBSN* izoformlarının MK'daki dağılımı (Şekil 4-48b) incelenmiştir. Mesane kanserli 404 vakaya ait tümör dokusunu ve 28 sağlıklı mesane dokusunu içeren verilere göre *SBSN* anlatımı MK'da artış göstermektedir (Şekil 4-48a). İlaveten; *SBSN* izoform 2 (ENST00000452271.6) ve *SBSN* izoform 1'in (ENST00000518157.1), *SBSN* izoform 3'e (ENST00000588674.5)

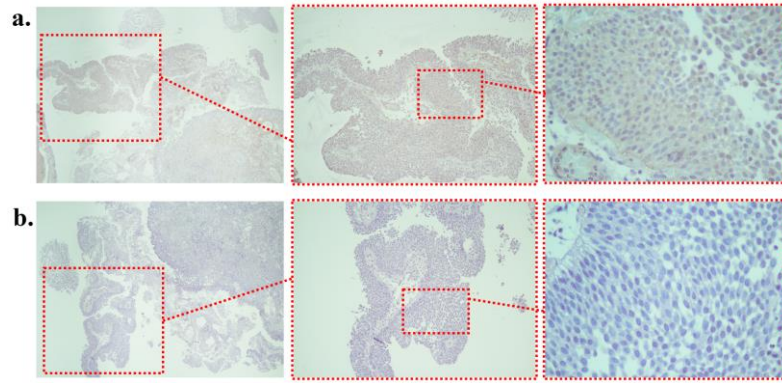
kıyasla MK'da daha yüksek anlatıma sahip olduğu görülmüştür (Şekil 4-48b). Çalışmamız kapsamında FFPE olan 85 mesane tümör dokusu (n=40 KİOMT ve n=45 KİMT) ve Tumor-Free mesane dokusu örnekleri (n=9) kullanılarak SBSN immün ifadesi İHK ile analiz edilmiştir. MK'lı vakalara ait demografik ve klinik bilgiler Tablo 4-19'da özetlenmiştir. İHK sonucunda “zayıf (weak)”, “orta (moderate)” ve “güçlü (strong)” SBSN boyanması gösteren dokulara ait örnek kesit görüntüleri Şekil 4-49-Şekil 4-57'de verilmiştir. Güçlü SBSN boyanması gösteren dokulardan birine ait örnek kesit görüntüsü Şekil 4-58'de verilmiştir.



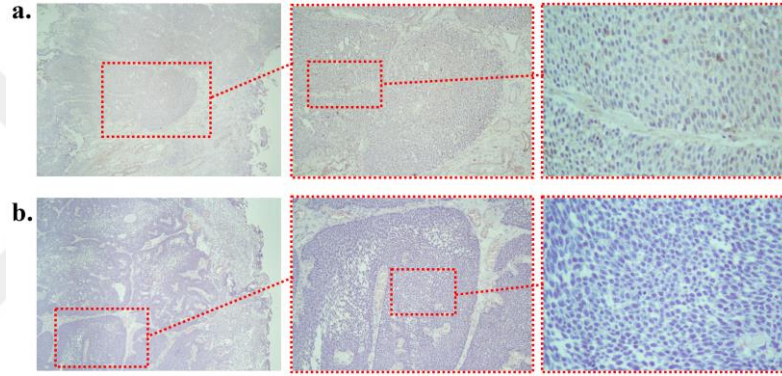
Şekil 4-48: MK'da SBSN anlatımının değişimi. MK'lı 404 vakaya ait tümör dokusunu ve 28 sağlıklı mesane dokusunu içeren verilere göre SBSN'ye ait mRNA düzeyi MK'da artış göstermekte olup, veriler dokularda ifade edilen toplam genlerin milyonu başına (Transcripts Per Million) SBSN'nin transkript sayısını logaritmik ölçekte ifade etmektedir (siyah transversal çizgiler verilerin medyanını temsil etmektedir) (a). SBSN'nin bilinen 3 izoformundan; SBSN izoform 2 (ENST00000452271.6) ve SBSN izoform 1'in (ENST00000518157.1), SBSN izoform 3'e (ENST00000588674.5) kıyasla MK'da daha yüksek anlatıma sahip olduğu anlaşılmaktadır (b). Kısaltmalar: BLCA: Mesane Kanseri, T: Tümör, N: Sağlıklı Doku, TPM: Transcripts Per Million.

Tablo 4-19: İHK analizine dahil edilen MK'lı 85 vakaya ve sağlıklı 9 kontrole (Tumor-Free) ait medyan bilgiler.

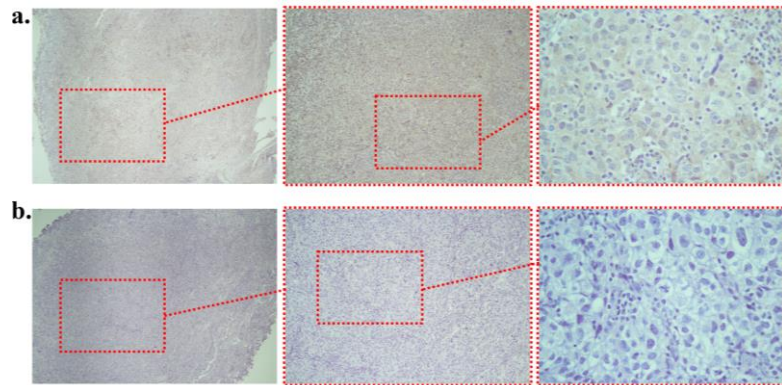
Kategori	Subkategori	Mesane Tümörü	Tumor-Free
Örnek Sayısı		n=85	n=9
Medyan Yaş (±SD)		65,4 (±10,1)	67,7 (±6,6)
Cinsiyet		Erkek	Erkek
Medyan VKİ (±SD)		26,6 (±3,7)	24,9 (±3,4)
pTNM & Patoloji	Ta	Ta-Low Grade: 19	-
		Ta-High Grade: 16	-
		Primer: 23	-
		Rekürrens: 12	-
		Multifokal: 15	-
		Unifokal: 20	-
		Tümör Boyutu: ≤3 cm: 26; >3 cm: 9	-
		Concurrent CIS: 3/35	-
		Lenfovasküler İnvazyon: 0/35	-
		Bilinen Uzak Organ Metastazı: 0/35	-
	T1	T1-High Grade: 5	-
		Primer: 3	-
		Rekürrens: 2	-
		Multifokal: 2	-
		Unifokal: 3	-
		Tümör Boyutu: >3 cm: 5	-
		Concurrent CIS: 1/5	-
		Lenfovasküler İnvazyon: 0/5	-
		Bilinen Uzak Organ Metastazı: 0/5	-
	T2	T2-High Grade: 26	-
		Primer: 23	-
		Rekürrens: 3	-
		Multifokal: 10	-
		Unifokal: 16	-
		Tümör Boyutu: ≤3 cm: 5; >3 cm: 21	-
		Concurrent CIS: 17/26	-
		Lenfovasküler İnvazyon: 13/26	-
		Bilinen Uzak Organ Metastazı: 3/26	-
	T3	T3a-High Grade: 9	-
		T3b-High Grade: 4	-
		Primer: 11	-
		Rekürrens: 2	-
		Multifokal: 7	-
		Unifokal: 6	-
		Tümör Boyutu: >3 cm: 13	-
		Concurrent CIS: 11/13	-
		Lenfovasküler İnvazyon: 10/13	-
		Bilinen Uzak Organ Metastazı: 1/13	-
	T4	T4a-High Grade: 5	-
		T4b-High Grade: 1	-
		Primer: 5	-
		Rekürrens: 1	-
		Multifokal: 5	-
		Unifokal: 1	-
		Tümör Boyutu: >3 cm: 6	-
		Concurrent CIS: 6/6	-
		Lenfovasküler İnvazyon: 6/6	-
		Bilinen Uzak Organ Metastazı: 0/6	-



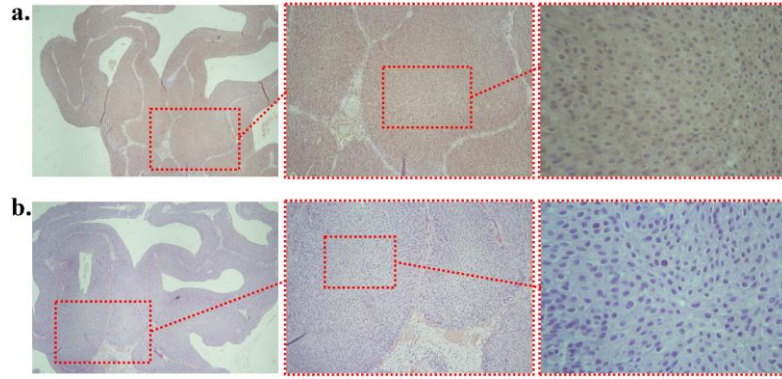
Şekil 4-49: T1-High Grade Evre bir mesane tümör dokusuna ait İHK sonucu. Dokuda zayıf (weak) seviyede SBSN immün ifadesi (a) ve dokuya eşlenik H&E boyama görüntüsü (b) verilmiştir (büyütmeler soldan sağa sırayla 4X, 10X ve 40X).



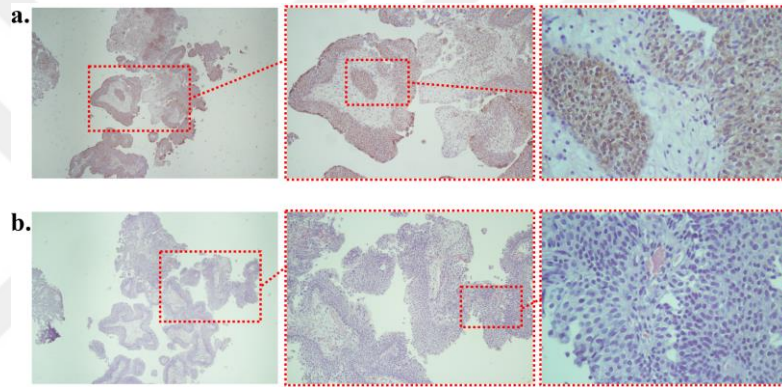
Şekil 4-50: T2-High Grade evre bir mesane tümör dokusuna ait İHK sonucu. Dokuda zayıf (weak) seviyede SBSN immün ifadesi (a) ve dokuya eşlenik H&E boyama görüntüsü (b) verilmiştir (büyütmeler soldan sağa sırayla 4X, 10X ve 40X).



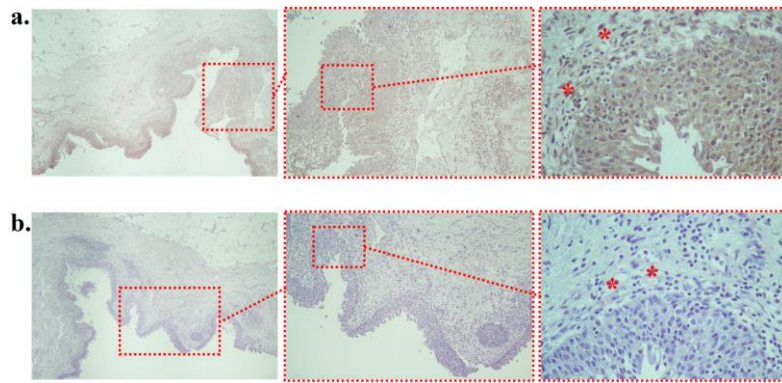
Şekil 4-51: T2-High Grade evre bir mesane tümör dokusuna ait İHK sonucu. Dokuda zayıf (weak) seviyede SBSN immün ifadesi (a) ve dokuya eşlenik H&E boyama görüntüsü (b) verilmiştir (büyütmeler soldan sağa sırayla 4X, 10X ve 40X).



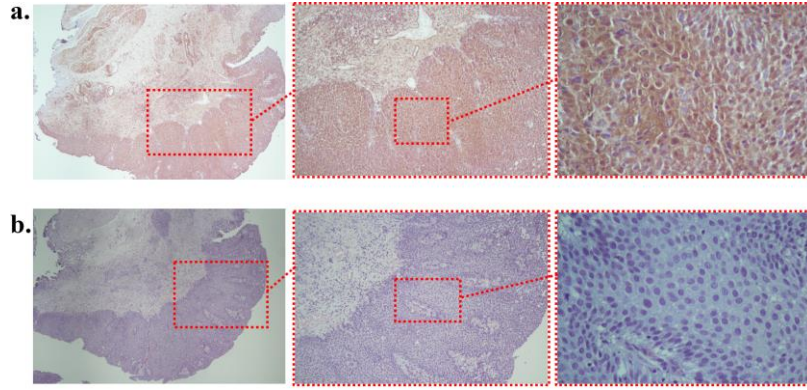
Şekil 4-52: Ta-Low Grade evre bir mesane tümör dokusuna ait İHK sonucu. Dokuda orta seviyede (moderate) SBSN immün ifadesi (a) ve dokuya eşlenik H&E boyama görüntüsü (b) verilmiştir (büyütmeler soldan sağa sırayla 4X, 10X ve 40X).



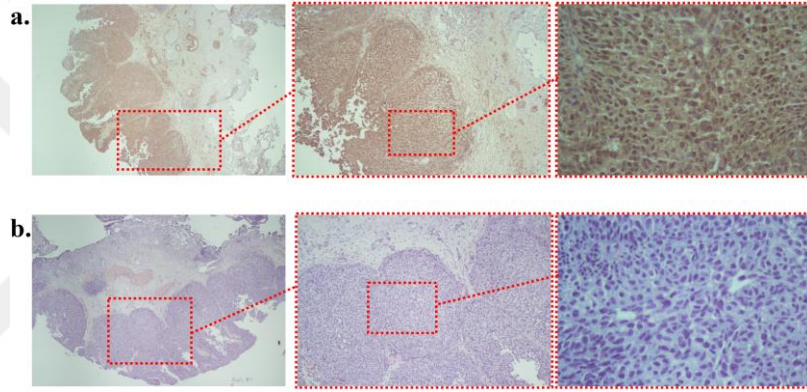
Şekil 4-53: Ta-High Grade evre bir mesane tümör dokusuna ait İHK sonucu. Dokuda orta seviyede (moderate) SBSN immün ifadesi (a) ve dokuya eşlenik H&E boyama görüntüsü (b) verilmiştir (büyütmeler soldan sağa sırayla 4X, 10X ve 40X).



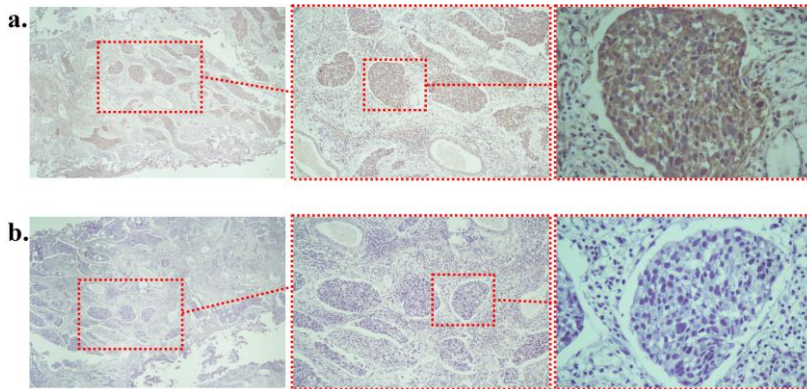
Şekil 4-54: T4a-High Grade evre bir mesane tümör dokusuna ait İHK sonucu. Dokuda orta seviyede (moderate) SBSN immün ifadesi (a) ve dokuya eşlenik H&E boyama görüntüsü (b) verilmiştir (büyütmeler soldan sağa sırayla 4X, 10X ve 40X). Yıldız (*) işaretli yerlerdeki taşlı yüzük hücreleri dikkat çekmektedir.



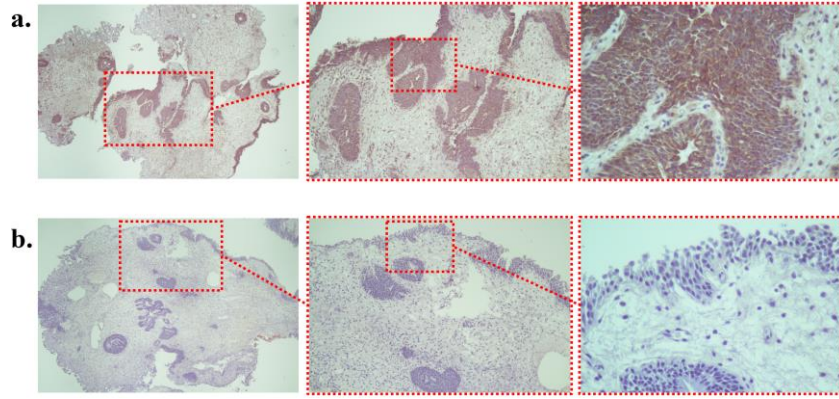
Şekil 4-55: Ta-High Grade evre bir mesane tümör dokusuna ait İHK sonucu. Dokuda güçlü (strong) seviyede SBSN immün ifadesi (a) ve dokuya eşlenik H&E boyama görüntüsü (b) verilmiştir (büyütmeler soldan sağa sırayla 4X, 10X ve 40X).



Şekil 4-56: Ta-High Grade evre bir mesane tümör dokusuna ait İHK sonucu. Dokuda orta seviyede (moderate) SBSN immün ifadesi (a) ve dokuya eşlenik H&E boyama görüntüsü (b) verilmiştir (büyütmeler soldan sağa sırayla 4X, 10X ve 40X).

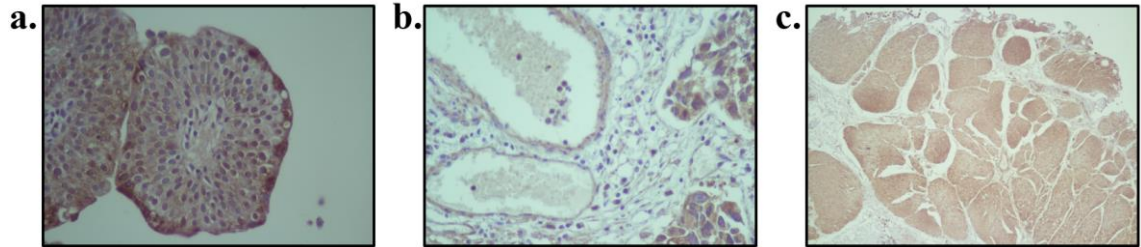


Şekil 4-57: T2-High Grade evre bir mesane tümör dokusuna ait İHK sonucu. Dokuda güçlü (strong) seviyede SBSN immün ifadesi (a) ve dokuya eşlenik H&E boyama görüntüsü (b) verilmiştir (büyütmeler soldan sağa sırayla 4X, 10X ve 40X).



Şekil 4-58: Tumor-Free mesane dokusuna ait İHK sonucu. Dokuda güçlü (strong) seviyede SBSN immün ifadesi (a) ve dokuya eşlenik H&E boyama görüntüsü (b) verilmiştir (büyütmeler soldan sağa sırayla 4X, 10X ve 40X).

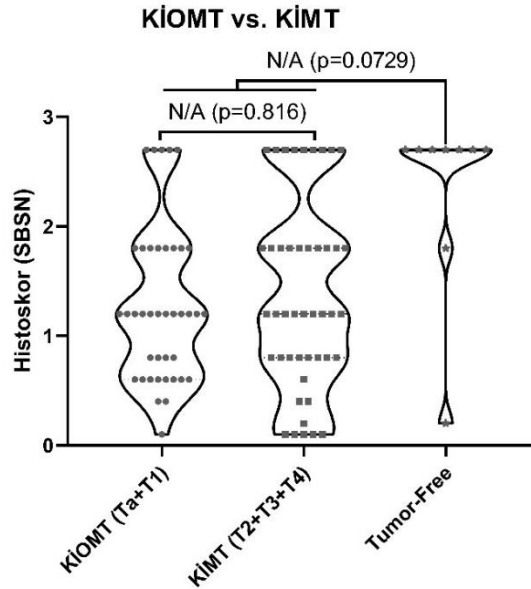
Tüm İHK sonuçları birlikte değerlendirildiğinde SBSN immün ifadesi genel olarak, süperfisyal ürotelyositleri döşeyen umbrella (facet) hücrelerinde, endotel hücrelerinde ve Muscularis Propria'nın kas hücrelerinde yoğun şekilde izlenmiştir (Şekil 4-59).



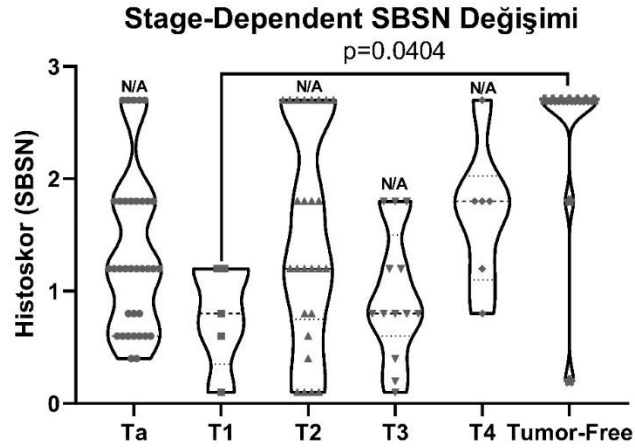
Şekil 4-59: İHK analizi sonucunda umbrella (facet) hücrelerinde (a), endotel hücrelerinde (b) ve Muscularis Propria'nın kas hücrelerinde (c) gözlenen yoğun SBSN immün ifadesi.

İHK analiz sonuçları 3 ayrı patolog tarafından değerlendirilerek histokorlama yapılmış ve her bir doku örneğine ait nihai skor için 3 değerlendirmenin ortalaması alınmıştır. Histoskorlar beraber ele alındığında, mesane tümör dokuları ile Tumor-Free doku örneklerine ait SBSN immün ifadeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p=0.0729$) bir fark olmadığı görülmüştür (Şekil 4-60). Tümör dokuları KİOMT ve KİMT olarak iki gruba ayrılıp değerlendirildiğinde de SBSN immün ifadeleri açısından istatistiksel olarak anlamlı ($p=0.816$) bir fark olmadığı anlaşılmıştır (Şekil 4-60). Tümör dokuları evrelere ayrılıp stage-dependent SBSN değişimleri karşılaştırıldığında, sadece T1-High Grade evre tümör dokularındaki SBSN immün ifadesi ile, Tumor-Free mesane

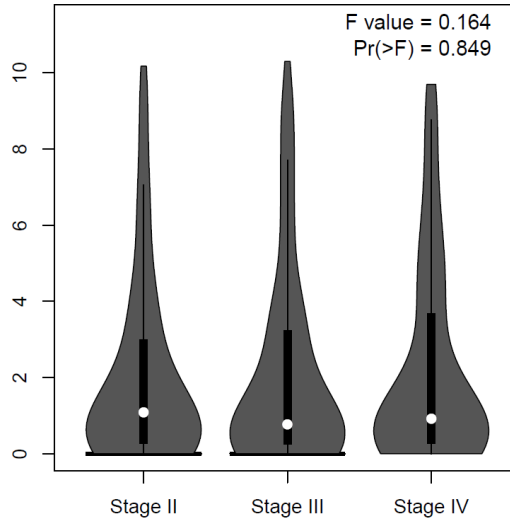
dokusu örnekleri arasında fark bulunduğu görülmüş olup, T1-High Grade Evre tümör dokularındaki SBSN immün ifadesinin istatistiksel olarak anlamlı ($p=0.0404$) düzeyde daha düşük olduğu görülmüştür (Şekil 4-61). Çalışmamız kapsamında GEPIA 2.0 arayüzü kullanılarak TCGA ve GTEx verileri ile veri madenciliği yapılmış ve KİMT’de stage-dependent SBSN anlatımının değişimi verifiye edilmiştir (Şekil 4-62). Verilerden hareketle KİMT’de T2, T3 ve T4 evreleri subgruplanıp SBSN anlatımı açısından birbiriyle karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p=0.849$) bir fark olmadığı görülmüştür.



Şekil 4-60: İHK analizi sonuçları. Mesane tümör dokuları ile Tumor-Free mesane dokuları arasında SBSN immün ifadesi açısından istatistiksel olarak anlamlı ($p=0.0729$) bir fark bulunmamıştır. Mesane tümör dokuları; KİOMT ve KİMT olarak gruplandırılarak SBSN immün ifadesi açısından birbiriyle karşılaştırıldığında yine istatistiksel olarak anlamlı ($p=0.0816$) bir fark görülmemiştir (N/A: Not Assessed).



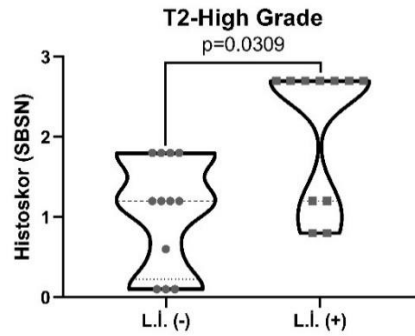
Şekil 4-61: Stage-dependent SBSN immün ifadesi değişimi. Mesane tümör dokuları evrelere ayrılarak SBSN immün ifadesi açısından birbirleri ve Tumor-Free mesane dokuları ile karşılaştırıldığında T1-High Grade evre tümör dokularındaki SBSN immün ifadesinin istatistiksel olarak anlamlı ($p=0.0404$) düzeyde daha düşük olduğu görülmüştür (N/A: Not Assessed).



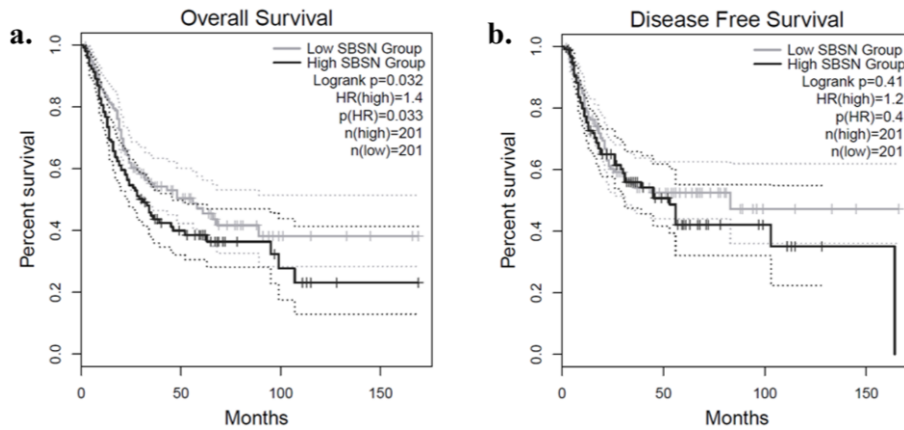
Şekil 4-62: KİMT'de stage-dependent SBSN anlatımının değişimi. KİMT'nin T2, T3 ve T4 evrelerinde SBSN anlatımı açısından istatistiksel olarak anlamlı ($p=0.849$) bir fark olmadığı görülmektedir. Veriler, tümör dokularında ifade edilen toplam genlerin milyonu başına (TPM) SBSN'nin transkript sayısını logaritmik ölçekte ifade etmektedir.

T2-High Grade evre tümör dokularındaki SBSN immün ifadeleri ayrıca değerlendirildiğinde, lenfovasküler invazyon (Lİ) görülen vakalardaki SBSN immün ifadesinin Lİ görülmeyen vakalara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ($p=0.0309$) düzeyde daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4-63). Çalışmamız kapsamında GEPIA 2.0 arayüzü kullanılarak TCGA ve GTEx verileri ile veri madenciliği yapılmış

ve MK'da SBSN anlatımının overall survival ve disease free survival ile ilişkisi incelenmiştir (Şekil 4-64). Yüksek SBSN anlatımı görülen MK'lı 201 vakaya ve düşük SBSN anlatımı görülen 201 MK'lı vakaya ait bilgilere göre düşük SBSN anlatımı görülen MK'lı vakalarda overall survival istatistiksel olarak anlamlı ($p=0.032$) düzeyde yüksek bulunmuştur (Şekil 4-64a); buna karşılık SBSN anlatımı ile disease free survival arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p=0.41$) bir ilişki saptanmamıştır (Şekil 4-64b).



Şekil 4-63: T2-High Grade evre mesane tümör dokularındaki SBSN immün ifadesinin lenfovasküler invazyon durumuna göre değişimi. Lenfovasküler invazyonun pozitif olduğu grupta SBSN immün ifadesi istatistiksel olarak anlamlı ($p=0.0309$) düzeyde daha yüksek bulunmuştur (Lİ: Lenfovasküler İnvazyon).



Şekil 4-64: MK'da SBSN anlatım düzeyinin Survival ile ilişkisi. Düşük SBSN anlatımı görülen MK'lı vakalar ($n=201$) yüksek SBSN anlatımı görülen MK'lı vakalar ($n=201$) ile karşılaştırıldığında overall survival'ın istatistiksel olarak anlamlı ($p=0.032$) düzeyde daha yüksek olduğu görülmektedir (a). SBSN anlatım düzeyi ile disease free survival arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p=0.41$) düzeyde bir fark saptanmamıştır (b).

4.8. Dokulardaki SBSN Düzeyinin WB ile Analizi

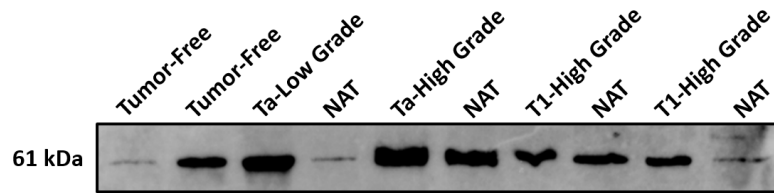
Hepsi erkek olan KİOMT'li 8 vakanın (n=2 Ta-Low Grade, n=2 Ta-High Grade ve n=4 T1-High Grade) TUR-MT esnasında alınan tümör dokularından ve NAT örneklerinden total protein ekstrakte edilerek doku SBSN düzeyleri WB ile analiz edildi. KİOMT'li vakalara ait yaş ortalaması 57,5 ($\pm 3,8$) ve VKİ ortalaması 28,9 (± 4) olarak tespit edilmiş olup MK'lı vakalara ait demografik ve klinik bilgiler Tablo 4-20'de verilmiştir. Çalışmada, hepsi erkek olan 2 katılımcıya ait Tumor-Free mesane dokuları kontrol olarak kullanıldı (Tablo 4-21). Analiz neticesinde genel olarak KİOMT dokularındaki SBSN düzeyinin NAT ve Tumor-Free mesane dokularına kıyasla rölatif bir artış gösterdiği tespit edildi (Şekil 4-65).

Tablo 4-20: KİOMT'li 4 vakaya ait demografik ve klinik bilgiler.

Vaka	E/K	Yaş	VKİ	Tümör (cm)	Primer/Rekürrens	Fokalite	pT	Grade	CIS	Lenfovasküler İnvazyon
MK-39	E	59	25	≤ 3 cm	Primer	Multifokal	Ta	Low	Hayır	Negatif
MK-40	E	61	26,4	≤ 3 cm	Primer	Unifokal	Ta	High	Hayır	Negatif
MK-38	E	51	28,7	> 3 cm	Rekürrens	Multifokal	T1	High	Evet	Negatif
MK-41	E	59	35,6	> 3 cm	Primer	Multifokal	T1	High	Evet	Negatif

Tablo 4-21: Tumor-Free dokuların alındığı 2 katılımcıya ait demografik bilgiler.

Katılımcı	E/K	Yaş	VKİ
Tumor-Free-19	E	68	23,3
Tumor-Free-20	E	72	18,9



Şekil 4-65: WB analiz sonuçları. KİOMT dokularındaki SBSN düzeyi, NAT ve Tumor-Free mesane dokularına kıyasla rölatif bir artış göstermektedir (kDa: Kilodalton, NAT: Normal Tissue Adjacent to the Tumor).

5. TARTIŞMA

Dünya genelinde görülen en yaygın 10. kanser türü olan MK, yalnızca tüm maligniteler içerisinde en sık rekürrens ile karşılaşılan malignite değildir, aynı zamanda deri ve akciğer tümörlerini takiben en fazla mutasyon frekansına sahip tümörlerin görüldüğü malignitedir (Sung ve ark. 2021; Tran ve ark. 2021). Bugün için MK'nın tanısında ve rekürrens takibinde altın standart yöntem olarak hala sistoskopi ve idrar sitolojisi kullanılmaktadır (Sanli ve ark. 2017). Sistoskopi ile görüntüleme invaziv olması bakımından hem hasta açısından konforsuz ve hekim açısından zaman kaybettiricidir hem de sağlık giderleri arasında yüksek bir paya sahiptir (Johnson ve ark. 2015; Sloan ve ark. 2020). Bu nedenle rutin üroonkoloji pratiğinde kullanılabilecek PSA gibi serum ya da idrar bazlı bir biyobelirtece ihtiyaç vardır. Zaman içerisinde FDA/EUA/AUA onayları almış olan/olmayan pek çok biyobelirteç/tanı testi önerilmişse de klinik kullanıma uygun olmamaları, düşük sensitivite/spesifite yüzdeleri, geniş kohortlardan elde edilen yeterli bilgi bulunmaması, belirteçlerin/testlerin intravezikal BCG instilasyonundan etkilenmesi ve tekrarlanabilir olmamaları ya da maliyet etkin olmamaları gibi sebeplerle yaygın kullanım alanı bulamamışlardır.

Biyobelirteç hedefli kanser araştırmalarının son dönemde EV/eksozom üzerine yoğunlaştığı görülmektedir. Bir EV türü olan eksozomlar, “30-150 nm” boyutunda veziküller olup köken aldıkları hücrenin biyolojik yapısına bağlı olarak değişen düzeyde “protein, lipid, DNA, mRNA, miRNA, lncRNA ve circRNA” ihtiva etmekte ve bunları hücreler arasında transfer ederek hedef hücrelerde değişiklik oluşturabilmektedirler (Lee ve ark. 2022). Biyobelirteç hedefli kanser araştırmalarında EV/eksozoma olan ilginin temel sebepleri; kanserde fizyolojik sıvılara geçen EV/eksozom düzeyinin artması, tümördeki artmış metabolik aktivitenin yansıması olarak eksozom içeriğinin de zenginleşmesi ve özellikle dsDNA fragmentlerinin miktar ve uzunluğunun artması, EV/eksozom içeriğindeki DNA fragmentlerinde tümör mutasyon yükünü güvenilir şekilde tespit edilebilir oluşu EV/eksozomları önemli bir yerde konumlandırmaktadır (Zhou ve ark. 2021). Eksozomların lipid bilayer membranları, içeriklerindeki bileşiklerin “RNaz’lardan, DNaz’lardan ve proteazlardan” korunmasını sağlamaktadır ve MK özelinde düşünüldüğünde tümör kökenli moleküllerin eksozomların içerisinde idrarın yıkıcı asiditesine ve idrarda bulunan enzimlere karşı korunması, eksozomların

idrar kökenli likit biyopsi için uygun bir kaynak olabileceğine işaret etmektedir (Zhou ve ark. 2020). Bu doğrultuda çalışmamızda MK'lı vakaların üriner eksozomlarının miRNA ve proteom profilinin araştırılması hedeflenmiştir.

Çalışmamızda MK'lı vakalara ve sağlıklı kontrollere ait idrar örneklerinden eksozom izolasyonu PEG içerikli ticari kit ve ultrasantrifüj ile yapıldı ve eksozom örnekleri daha sonra NTA ve TEM ile karakterize edildi. NTA analizi, PEG temelli kit ile yapılan izolasyonunun ultrasantrifüj ile yapılan izolasyona göre daha küçük boyutlu eksozomları izole edebildiğine işaret etti. Buna karşılık ultrasantrifüj ile yapılan izolasyonda eksozom konsantrasyonu daha yüksekti. Cho ve arkadaşları üriner eksozom izolasyonu için kullanımda olan ultrasantrifüj ve PEG de dahil olmak üzere 8 metodu karşılaştırmıştır (Cho ve ark. 2020) ve bulgularımız paraleldir.

Çalışmamız kapsamında hepsi erkek olan KİOMT'li 10 vakanın ve 6 sağlıklı kontrolün idrar örneklerinden PEG temelli kit ile izole edilen eksozomlardaki 87 miRNA'nın ekspresyonunun değişimi qRT-PCR ile analiz edildi ve sağlıklı kontroller ile Ta-Low Grade evre MK'lı vakaların üriner eksozomlarının miRNA profilinin birbirine benzerlik gösterdiği görüldü. Çalışma neticesinde 87 miRNA içerisinden 3 tanesinin "(hsa-miRNA-191-5p, hsa-miRNA-193b-3p ve hsa-miRNA-425-5p)" MK'da sağlıklı kontrollere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde 2 kat veya üzeri ($FR > 2$) üzeri artış gösterdiği; 4 tanesinin ise "(hsa-let7f-5p, hsa-miRNA-30a-5p, hsa-miRNA-30e-3p ve hsa-miRNA-101-3p)" azalış gösterdiği tespit edilmiş olup ROC analizi bu 7 miRNA'dan oluşan panelin istatistiksel olarak yüksek anlamlılık ($p < 0.0001$) düzeyinde sağlıklı kontroller ile MK'lı vakaları birbirinden ayırabildiğini ortaya koydu (AUC: 0,7641; %95 CI: 0,6850-0,8432). Sonraki aşamada, sağlıklı kontroller ile MK'lı vakalar arasında istatistiksel olarak en yüksek anlamlılık seviyesinde farklılık gösteren 3 miRNA "(hsa-miRNA-191-5p, hsa-miRNA-425-5p ve hsa-miRNA-101-3p)" seçilerek bu miRNA'lardan oluşan panel ROC analizine tabi tutuldu ve bu 3'lü panelin de istatistiksel olarak yüksek anlamlılık ($p = 0.0013$) düzeyinde sağlıklı kontroller ile MK'lı vakaları birbirinden ayırabildiği görüldü (AUC: 0,7422; %95 CI: 0,6137-0,8707). Çalışmamız değerlendirilen 7'li ve 3'lü eksozomal miRNA panelleri, MK'da tanı ve takip için idrar temelli biyobelirteçler olarak kullanılabilirlik vaat etmekle birlikte güvenilir sonuçlar için önerilen panellerin geniş kohortların dahil edildiği çalışmalarda valide edilerek sensitivite ve spesifitelerinin değerlendirilmesi gereklidir. Çalışmamız

kapsamında, MK'da artış gösteren 3 miRNA'nın "(hsa-miRNA-191-5p, hsa-miRNA-193b-3p ve hsa-miRNA-425-5p)" transkripsiyonel hedefinde olan 248 geni; MK'da azalış gösteren 4 miRNA'nın "(hsa-let7f-5p, hsa-miRNA-30a-5p, hsa-miRNA-30e-3p ve hsa-miRNA-101-3p)" ise transkripsiyonel hedefinde olan 1888 geni regüle ettiği anlaşıldı. Bilindiği gibi miRNA'lar yaygın olarak mRNA'ların 3'-UTR bölgelerine bağlanarak transkripsiyonu baskılayabilmekte ve gen anlatımında epigenetik yolla up-/downregülasyon yaratabilmektedir (Huang ve ark. 2011; Rothschild ve ark. 2014). Çalışmamız sonucunda MK'da azalış gösteren miRNA'ların çok daha fazla sayıda geni regüle edebildiğinin görülmesi, MK'da miRNA downregülasyonunun, miRNA upregülasyonuna göre daha etkili bir epigenetik regülasyon mekanizması olabileceği düşündürmektedir. Wang ve arkadaşları da "Up-regulation of microRNA in bladder tumor tissue is not common" başlıklı çalışmalarında, MK'da miRNA downregülasyonunun daha yaygın bir alterasyon olduğuna ve ürotelyal tümörögenizde kritik bir rol oynadığına işaret etmektedirler (Wang ve ark. 2010). Kantitasyon sonuçlarımız doğrultusunda, FR threshold'u ">2" yerine ">1" seçildiğinde, 9 yeni miRNA'nın da istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) düzeyde sağlıklı kontroller ile MK'lı vakalar arasında farklılık gösterdiği anlaşıldı ve bu miRNA'lardan 3 tanesinin "(hsa-miRNA-200a-3p, hsa-miRNA-200c-3p ve hsa-miRNA-429)" miRNA-200 ailesine üye olduğu görüldü.

Detayları çalışmamızın "Bulgular" kısmında belirtildiği üzere; miRNA-200 ailesinin başta EMT olmak üzere kanser üzerinde önemli etkileri olduğuna dair kanıtlar bulunmakla birlikte konuyla ilişkili olarak yapılmış çalışmaların sınırlı olduğu görülmektedir. Çalışmamız kapsamında MK'lı vakaların üriner eksozomlarındaki hsa-miRNA-200a-3p anlatımının sağlıklı kontrollere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ($p=0.016047$) düzeyde azalış gösterdiği (FR: -1,49) saptanmıştır. Sonraki aşamada, 18 KİOMT dokusu ve eşlenik NAT örnekleri; 7 KİMT dokusu ve eşlenik NAT örnekleri ile 9 Tumor-Free mesane dokusu örneklerindeki hsa-miRNA-200a-3p anlatımı ve kontrol olarak U6 snRNA (hsa) anlatımının qRT-PCR ile analizinde mesane tümör dokularındaki hsa-miRNA-200a-3p anlatımının eşlenik NAT örneklerine kıyasla artmış olduğu (FR: 1,49) ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır. İlaveten, doku örnekleri KİOMT, KİMT ve Tumor-Free mesane dokusu örnekleri olarak subgruplanıp NAT örnekleri ile karşılaştırıldığında en yüksek hsa-miRNA-200a-3p anlatımının, eksozom örneklerine ait sonuçlarla paralel olarak, Tumor-Free mesane

dokularında olduğu tespit edildi ancak bu artışın da istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir. KİOMT, KİMT ve eşlenik NAT örnekleri evrelere göre subgruplanıp Tumor-Free mesane dokularıyla karşılaştırıldığında, hsa-miRNA-200a-3p anlatımının KİOMT dokularında eşlenik NAT örneklerine kıyasla artış gösterdiği, buna karşılık KİMT doku örneklerinde ise eşlenik NAT örneklerine kıyasla azalış gösterdiği tespit edildi. Tumor-Free mesane dokuları yine ortalamanın üzerinde hsa-miRNA-200a-3p anlatımına sahipken ilginç olarak T3-High Grade evre doku örneklerindeki hsa-miRNA-200a-3p anlatımının Tumor-Free mesane dokularına kıyasla önemli ölçüde azalış gösterdiği (FR: -4,19) görülmüştür. Bununla birlikte gruplar arasındaki miRNA-200a-3p anlatımına dair değişimler istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bildiğimiz kadarıyla literatürde mesane dokularındaki hsa-miRNA-200a-3p anlatımını ele alan tek bir çalışma bulunmaktadır (Martínez-Fernández ve ark. 2015). Martínez-Fernández ve arkadaşları qRT-PCR ile yaptıkları kantitasyon sonuçlarına göre miRNA-200a'nın KİOMT dokularında sağlıklı mesane dokularına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.0001$) düzeyde artış gösterdiğini ancak doku örnekleri Low Grade ve High Grade olarak iki gruba ayrıldığında veya doku örnekleri Ta ve T1 olarak subgruplanıp T2 evre mesane tümör dokularıyla karşılaştırıldığında gruplar arasında miRNA-200a anlatımı açısından anlamlı bir fark bulunmadığını (sırasıyla $p = 0.1006$ ve $p = 0.0672$) bildirmişlerdir (Martínez-Fernández ve ark. 2015). KİOMT subgrupları arasında hsa-miRNA-200a anlatımı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamaması bakımından çalışmamızın bulguları Martínez-Fernández ve arkadaşlarının sonuçları ile paraleldir (Martínez-Fernández ve ark. 2015). Bizim çalışmamızdan farklı olarak Martínez-Fernández ve arkadaşları KİMT dokularında ve sağlıklı mesane dokularında hsa-miRNA-200a anlatımını kantite etmemişler ancak TCGA dataset'i ile yaptıkları biyoinformatik analizde miRNA-200a anlatımının KİMT dokularında sağlıklı mesane dokularına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ($p = 0.03$) düzeyde artış gösterdiğini; doku örnekleri Low Grade ve High Grade olarak iki gruba ayrıldığında miRNA-200a anlatımının Low Grade doku örneklerinde istatistiksel olarak anlamlı ($p = 0.047$) düzeyde daha fazla olduğunu ve doku örnekleri T2, T3 ve T4 olarak subgruplandığında miRNA-200a anlatımının T3 ve T4 evrelerde T2'ye kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ($p = 0.002$) düzeyde daha az olduğunu ortaya koymuşlardır (Martínez-Fernández ve ark. 2015). Bizim çalışmamızda da T3-High Grade evre tümör dokularındaki ve onlara eşlenik NAT örneklerindeki hsa-miRNA-200a anlatımının; T2-High Grade evre tümör

dokuları ile onların eşlenik NAT örneklerine kıyasla azalmış olduğu görülmüş ancak bu azalış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Eldeki bulgular, MK'da hsa-miRNA-200a anlatımının stage-dependent değişim gösteriyor olabileceği işaret etmekle birlikte konuyla ilişkili geniş kohortların dahil edildiği başka çalışmalara ihtiyaç olduğunu göstermektedir.

Çalışmamız kapsamında hepsi erkek olan KİOMT'li 12 vakanın ve 9 sağlıklı kontrolün idrar örneklerinden ultrasantrifüj ile izole edilen eksozomlar evrelerine göre 3'erli şekilde pool edilerek LC-MS/MS ile analiz edildi ve eksozomların proteom profili araştırıldı. Analiz sonucunda tanımlanan 645 proteinden 57 tanesinin KİOMT'li vakalar ile sağlıklı kontroller arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) düzeyde farklılık gösterdiği tespit edildi. Bu 57 protein içerisinde 3 tanesinin "(PAPPA2, TMCC1 ve MGAM2)" daha önce; eksozomal "protein, lipid, mRNA ve miRNA"lara ait bilgilerin manuel olarak birleştirildiği web tabanlı bir compendium olan "ExoCarta database"inde (Keerthikumar ve ark. 2016) kayıtlı olmayan yeni (novel) proteinler olduğu saptanmış ve "ExoCarta"ya bildirimi yapılmıştır. Tanımlanan 57 proteinden KİOMT'li vakaların üriner eksozomlarından artış gösteren 20 tanesi STRING ve Signor gibi biyoinformatik araçlarla analiz edildiğinde "RHOA ve YWHAZ"ın en fazla interaksiyon gösteren proteinler olduğu anlaşıldı. Literatüre bakıldığında Rho sinyal yolağının ve onun üyesi RHOA'nın MK'da artış gösterdiği (Volanis ve ark. 2011) ve "progresyon, migrasyon, invazyon ve metastaz" artışıyla ilişkili olduğu bildirilmiştir (Kamai ve ark. 2003; Chang ve ark. 2010; Ren ve ark. 2021; Chen ve ark. 2023). Benzer şekilde YWHAZ amplifikasyonu/aşırı ifadesinin MK'da artmış "agresiflik ve kemoradyoterapi rezistansı" (Yu ve ark. 2019) ile artmış "tümörögenez" (Liu ve ark. 2018) ve "kötü prognozla" (Liu ve ark. 2016) ilişkili olduğu gösterilmiştir. RHOA (Gest ve ark. 2012; Santos ve ark. 2023) ve YWHAZ'ın (Neal ve ark. 2010) kanserde "terapötik target" olarak değerlendirilebilecek "druggable" proteinler olduğuna işaret eden çalışmalar mevcuttur. Bu durum "RHOA ve YWHAZ"ın MK tedavisinde hedeflenmesinin faydalı olabileceğini düşündürmektedir. Çalışmamız kapsamında hepsi erkek olan KİOMT'li 18 vakanın ve 9 sağlıklı kontrolün idrar örneklerinden ultrasantrifüj izole edilen eksozomlar intakt olarak MALDI-TOF MS ile analiz edildi ve mass spectral fingerprint'leri değerlendirildi. Mass spektrumları incelendiğinde hem MK'lı vakalarda hem sağlıklı kontrollerde 6000-6200 m/z aralığında ortak pikler gözlemlendi ve bu piklerin eksozoma özgü olabileceği düşünüldü. Bizim çalışmamızdan farklı olarak eksozomlardan

izole edilen peptid/proteinleri MALDI-TOF MS ile analiz eden Lin ve arkadaşları, elde ettikleri spektrumlarda “m/z 3367, m/z 3441, m/z 3483 ve m/z 10884”den oluşan 4 pikin hem MK’lı vakalarda hem de kontrollerde ortak olarak saptandığını ve bu piklerin eksozomlara özgü olabileceğini ifade etmişlerdir (Lin ve ark. 2016). Çalışmamızda MK’lı vakalara ait mass spektrumlarının 2000-5000 m/z aralığında sağlıklı kontrollere kıyasla daha fazla ve yüksek intensitede pikler verip yoğun bir fingerprint yarattığı saptandı. MK’lı vakalardan primer tümörlü olanlara ait 2000-5000 m/z aralığındaki pik sayısı rekürrensli vakalara kıyasla daha az ve düşük intensitede olup seyrek bir fingerprint oluşturdu. Bulgulardan hareketle MK’lı vakalara ait intakt üriner eksozomların MALDI-TOF MS ile analizinin; primer tümör tanısında, rekürrens takibinde ve Low Grade tümörler ile High Grade tümörlerin ayrımında kullanılabilecek bir araç olmayı vaat ettiği söylenebilir. Literatürdeki çeşitli çalışmalar bakteri türlerinin identifikasyonunda (De Bruyne ve ark. 2011), nazofaringeal örneklerden hızlı “SARS-CoV-2” tayininde (Deulofeu ve ark. 2021) ve “Anopheles” sineklerinden malarya transmisyonu tahmininde (Nabet ve ark. 2020) MALDI-TOF MS spektrumlarını “artificial intelligence (AI)” araçlarıyla birleştirmeyi önermektedir. Bu konseptten ve çalışmamızın bulgularından hareketle MK’da intakt üriner eksozomların MALDI-TOF MS analizinden elde edilecek spektrumların AI araçlarının da dahil edilmesiyle tanı ve takip amaçlı olarak kullanılabileceğini düşünmekteyiz. Eksozomların peptid/protein düzeyinde değil de intakt halde MALDI-TOF MS ile analiz edilmesinin ve elde edilecek mass spectral fingerprint’lerin kanserli ve sağlıklı örnekleri birbirinden ayırmada kullanılabileceği ilk defa Zhu ve arkadaşları tarafından öne sürülmüştür (Zhu ve ark. 2019). Araştırmacılar kültüre ettikleri şu 5 hücre hattından “(SBCI2, WM115, WM239, HeLa ve HEK293)” eksozom izole ederek bunları intakt halde MALDI-TOF MS ile analiz etmişler ve mass spektrumlarından hareketle hücre hatlarını klasifiye etmeyi başarmışlardır (Zhu ve ark. 2019). Araştırmacılar eksozom örneklerini triplicate çalışarak eksozom temelli klasifikasyonun tekrarlanabilir olduğunu belirtmişler ve ayrıca eksozomal örneklerin taşıdığı kargoların aslında sistematik ve kontrollü bir prosese sahip olduğuna ve bu kargo farklılığının kanser biyobelirteci amaçlı kullanılabilecek ayırıcı güce sahip olduğuna işaret etmişlerdir (Zhu ve ark. 2019). MALDI-TOF MS temelli intakt eksozom analizi ayrıca hızlı ve nispeten kolaydır. Örneğin 48 adet eksozom örneği 48 spotlu “MALDI target plate” ile 1 saat içinde analiz edilebilmektedir (Zhu ve ark. 2019). Lin ve arkadaşlarının MK’lı vakalara ait idrar

eksozomlarından elde ettikleri peptid/proteinleri MALDI-TOF MS ile analiz etmiş olduğundan (Lin ve ark. 2016) bildiğimiz kadarıyla daha önce MK'lı vakalara ait intakt idrar EV'lerini/eksozomlarını MALDI-TOF MS ile analiz eden ve mass spectral fingerprint'leri değerlendiren bir çalışma bulunmamaktadır. Bu bağlamda araştırmamız bu konuyu ele alan ilk çalışma olma niteliğine sahiptir. Bununla birlikte konuyla ilişkili geniş kohortların dahil edildiği başka çalışmalara da ihtiyaç vardır.

Çalışmamızın LC-MS/MS sonuçlarından hareketle, MK'lı vakaların eksozomlarında artış gösteren 20 proteinin $\log_2$ 'ye göre transforme edilmiş LFQ sinyal intensiteleri incelendiğinde SBSN'nin; istatistiksel olarak yüksek anlamlılık ($p < 0.001$) düzeyinde değişim gösterdiği ve FC: 31,79 değerine sahip olduğu görülmüştür. Bu bilgiden hareketle aday proteinler içerisinde SBSN seçilerek FFPE olan 85 mesane tümör dokusu ve 9 Tumor-Free mesane dokusu örneklerindeki SBSN immün ifadesi İHK ile analiz edilmiştir. Detayları çalışmamızın "Bulgular" kısmında açıklandığı üzere, SBSN anlatımının akciğer ve özofagus gibi kanserlerde tümör evresiyle korelasyon gösterecek biçimde arttığı ve SBSN aşırı ifadesinin kötü prognozla ilişkili olduğu bilinmektedir. Çalışmamızda KİOMT ve KİMT tümör dokuları arasında SBSN immün ifadesi açısından istatistiksel olarak anlamlı ($p = 0.816$) bir fark bulunmadığı görülmüştür. Benzer şekilde tümör dokuları evrelere göre subgruplanıp SBSN immün ifadesi açısından birbirleri ve Tumor-Free mesane dokuları ile karşılaştırıldığında yine gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı, sadece T1-High Grade evre tümör dokularındaki SBSN immün ifadesinin istatistiksel olarak anlamlı ($p = 0.0404$) düzeyde Tumor-Free mesane dokularından daha düşük olduğu görülmüştür. Bizim bulgularımızın aksine Zhou ve arkadaşları, FFPE olan 54 mesane tümör dokusundan oluşan tissue array'de analiz ettikleri SBSN immün ifadesinin sonuçlarına göre, MK evresi arttıkça SBSN immün ifadesinin de istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.01$) düzeyde arttığını ortaya koymuşlardır (Zhou ve ark. 2022). Shao ve arkadaşları, adenoid kistik tükürük bezi karsinomunda SBSN aşırı ifadesinin metastazla ilişkili olduğunu (Shao ve ark. 2012); Houri ve arkadaşları ise SBSN aşırı ifadesinin OSHK'da artmış invazyon, migrasyon ve anjiyogenezle ilişkili olduğunu (Houri ve ark. 2023) bildirmişlerdir. Çalışmamızda T2-High Grade evre tümör dokuları lenfovasküler invazyon (Lİ) durumuna göre subgruplanıp SBSN immün ifadesi açısından birbiriyle karşılaştırıldığında; Lİ pozitif olan tümör dokularındaki SBSN immün ifadesinin istatistiksel olarak anlamlı ($p = 0.0309$) düzeyde Lİ negatif gruptan daha yüksek olduğu

görülmüştür. Bu bakımdan bulgularımız literatürle uyumludur. Çalışmamız kapsamında ayrıca GEPIA 2.0 arayüzü kullanılarak TCGA ve GTEx verileri ile veri madenciliği yapıldı ve 404 MK'lı örnek ve 28 kontrole ait verilerden hareketle MK'da SBSN anlatımının arttığı ve 3 izoform içerisinden SBSN izoform 2 (ENST00000452271.6) en yüksek anlatıma sahip olduğu saptandı. İHK sonuçlarımız, mesane tümör dokuları arasından stage-dependent SBSN immün ifadesi açısından istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) bir ilişki olmadığına işaret etse de WB sonuçlarımız KİOMT'lerde; eşlenik NAT ve Tumor-Free mesane dokusu örneklerine kıyasla rölatif olarak artmış SBSN anlatımı olduğunu göstermiştir. Bunlarla birlikte yine GEPIA 2.0 arayüzü kullanılarak TCGA ve GTEx verileri ile yaptığımız analizde KİMT'de stage-dependent SBSN anlatımının değişimi incelenmiş ve T2, T3 ve T4 evrelerinde SBSN anlatımı açısından istatistiksel olarak anlamlı ($p=0.849$) bir fark olmadığı saptanmıştır. Bu veriler İHK bulgularımız ile uyumludur. Zhou ve arkadaşları düşük SBSN anlatımı görülen MK'lı vakalarda overall survival'ın istatistiksel olarak anlamlı ($p=0.0015$) düzeyde daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir (Zhou ve ark. 2022). Çalışmamızdaki MK'lı vakaların tümü 2020-2022 yılları arasında tanı/tedavi gören vakalar olduğundan geçen süre sürvi analizine uygun bulunmamıştır. Bu durumun çalışmamızın limitasyonlarından biri olduğu söylenebilir. Buna karşılık çalışmamız kapsamında yine “publicly available” TCGA ve GTEx verileri ile GEPIA 2.0 arayüzü kullanılarak veri madenciliği yapılmış ve düşük SBSN anlatımı görülen 201 MK'lı vaka ile yüksek SBSN anlatımı görülen 201 MK'lı vakaya ait bilgiler ile sürvi analizi gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar düşük SBSN anlatımı görülen MK'lı vakalarda overall survival'ın istatistiksel olarak anlamlı ($p=0.032$) düzeyde daha yüksek olduğunu göstermiştir. Buna karşılık aynı örnekleme SBSN anlatım düzeyi ile disease free survival arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p=0.41$) düzeyde bir fark saptanmamıştır. Bulgular birlikte değerlendirildiğinde, MK'da eksozomal SBSN düzeyinin arttığı; SBSN artışının Lİ pozitifliği, azalmış overall survival ve dolayısıyla kötü prognozla ilişkili olabileceği söylenebilmektedir. Daha kesin bilgiler için konuyla ilişkili geniş kohortların dahil edildiği başka çalışmalara da ihtiyaç vardır.

Tüm bulgular beraber değerlendirildiğinde üriner eksozomlara ait miRNA ve proteinlerin MK'lı vakalar ile sağlıklı kontrolleri birbirinden ayırabilecek performansa sahip olduğu söylenebilir. Sunulan çalışma ile ortaya koyduğumuz miRNA panellerinin, MK'nın tanısında ve rekürrens monitörizasyonunda kullanılabileceği düşünülmektedir.

İlgili panellerin daha geniş sayıda MK'lı vakaların dahil edildiği yeni çalışmalarda denenerek güçlü kanıt değeri taşıyan sensitivite ve spesifite yüzdelerine ulaşılması ve daha kapsamlı bilgilerin elde edilmesi geleceğe yönelik hedeflerimiz arasındadır. Çalışmamızın LC-MS/MS analizi MK'lı vakalar ile sağlıklı kontrollerin üriner eksozomlarına ait proteom profilinin istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) düzeyde farklılık gösterdiğini ortaya koymuştur. Tanımladığımız eksozomal proteinler sadece biyobelirteç olma potansiyeli taşımamakta, aynı zamanda MK tedavisinde terapötik hedef olma potansiyeline sahiptir. Yapmış olduğumuz MALDI-TOF MS analizi, intakt üriner eksozomlara ait mass spectral fingerprint'lerin MK'lı vakalar ile sağlıklı kontroller arasında farklılık gösteriyor olabileceğine işaret etmektedir. Özellikle mass spectral fingerprint'lerin AI teknolojilerinin de dahil edilerek MK tanısında ve rekürrens monitörizasyonunda kullanılması önemli katkılar sağlayabilir. Mesane kanserinde doku hsa-miRNA-200a-3p anlatımına ve SBSN immün ifadesine dair literatürde oldukça sınırlı düzeyde bilgi bulunduğundan sunulan çalışma kapsamında bu miRNA ve proteinin doku düzeyinde valide edilmesinin literatüre katkı sağladığı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Abbastabar, M., Sarfi, M., Golestani, A., Karimi, A., Pourmand, G., & Khalili, E. (2020). Tumor-derived urinary exosomal long non-coding RNAs as diagnostic biomarkers for bladder cancer. *EXCLI journal*, 19, 301.
- Adam, L., Zhong, M., Choi, W., Qi, W., Nicoloso, M., Arora, A., ... & Dinney, C. (2009). miR-200 expression regulates epithelial-to-mesenchymal transition in bladder cancer cells and reverses resistance to epidermal growth factor receptor therapy. *Clinical cancer research*, 15(16), 5060-5072.
- Alam, M. T., Nagao-Kitamoto, H., Ohga, N., Akiyama, K., Maishi, N., Kawamoto, T., ... & Hida, K. (2014). Suprabasin as a novel tumor endothelial cell marker. *Cancer science*, 105(12), 1533-1540.
- Andersen, C. L., Jensen, J. L., & Ørntoft, T. F. (2004). Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer research*, 64(15), 5245-5250.
- Andreu, Z., Oshiro, R. O., Redruello, A., López-Martín, S., Gutiérrez-Vázquez, C., Morato, E., ... & Yáñez-Mó, M. (2017). Extracellular vesicles as a source for non-invasive biomarkers in bladder cancer progression. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98, 70-79.
- Armstrong, D. A., Green, B. B., Seigne, J. D., Schned, A. R., & Marsit, C. J. (2015). MicroRNA molecular profiling from matched tumor and bio-fluids in bladder cancer. *Molecular cancer*, 14(1), 1-9.
- Babjuk, M. (2009). The search for the etiology of bladder cancer: are achievements sufficient? *European urology*, 56(5), 771-772.
- Bai, Z. J., Liu, Q., Wang, X. S., & Liu, W. Y. (2019). APC promoter methylation is correlated with development and progression of bladder cancer, but not linked to overall survival: a meta-analysis. *Neoplasma*, 66(3), 470-80.
- Barkan, G. A., Wojcik, E. M., Nayar, R., Savic-Prince, S., Quek, M. L., Kurtycz, D. F., & Rosenthal, D. L. (2016). The Paris system for reporting urinary cytology: the quest to develop a standardized terminology. *Acta cytologica*, 60(3), 185-197.
- Baumgart, S., Meschkat, P., Edelmann, P., Heinzelmann, J., Pryalukhin, A., Bohle, R., ... & Junker, K. (2019). MicroRNAs in tumor samples and urinary extracellular vesicles as a putative diagnostic tool for muscle-invasive bladder cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 145, 2725-2736.
- Bian, B., Li, L., Ke, X., Chen, H., Liu, Y., Zheng, N., ... & Shen, L. (2022). Urinary exosomal long non-coding RNAs as noninvasive biomarkers for diagnosis of bladder cancer by RNA sequencing. *Frontiers in Oncology*, 12, 976329.
- Bocu, K., Batur, A. F., Celik, Z. E., Gül, M., Altıntaş, E., Kaynar, M., ... & Goktas, S. (2023). Prognostic role of the endothelial cell-specific molecule-1 histopathologic expression in renal cell cancer. In *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. Elsevier.

- Boffetta, P., & Silverman, D. T. (2001). A meta-analysis of bladder cancer and diesel exhaust exposure. *Epidemiology*, 125-130.
- Boschieter, J., Nieuwenhuijzen, J. A., Hentschel, A., Van Splunter, A. P., Segerink, L. I., Vis, A. N., ... & Steenberg, R. D. (2019). A two-gene methylation signature for the diagnosis of bladder cancer in urine. *Epigenomics*, 11(3), 337-347.
- Byrd, D. R., Brookland, R. K., Washington, M. K., Gershenwald, J. E., Compton, C. C., Hess, K. R., ... & Meyer, L. R. (2017). *AJCC cancer staging manual* (Vol. 1024). M. B. Amin, S. B. Edge, & F. L. Greene (Eds.). New York: Springer.
- Cai, H., Yang, X., Gao, Y., Xu, Z., Yu, B., Xu, T., ... & Hua, L. (2019). Exosomal microRNA-9-3p secreted from BMSCs downregulates ESM1 to suppress the development of bladder cancer. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 18, 787-800.
- Cai, X., Qu, L., Yang, J., Xu, J., Sun, L., Wei, X., ... & Zhu, Y. (2020). Exosome-transmitted microRNA-133b inhibited bladder cancer proliferation by upregulating dual-specificity protein phosphatase 1. *Cancer Medicine*, 9(16), 6009-6019.
- Cancer Genome Atlas Research Network. (2014). Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. *Nature*, 507(7492), 315.
- Carreón, T., Ruder, A. M., Schulte, P. A., Hayes, R. B., Rothman, N., Waters, M., ... & LeMasters, G. K. (2006). NAT2 slow acetylation and bladder cancer in workers exposed to benzidine. *International journal of cancer*, 118(1), 161-168.
- Castelao, J. E., Yuan, J. M., Gago-Dominguez, M., Yu, M. C., & Ross, R. K. (2000). Non-steroidal anti-inflammatory drugs and bladder cancer prevention. *British journal of cancer*, 82(7), 1364-1369.
- Celsi, F., Monasta, L., Arrigoni, G., Battisti, I., Licastro, D., Aloisio, M., ... & Ura, B. (2022). Gel-based proteomic identification of suprabasin as a potential new candidate biomarker in endometrial cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(4), 2076.
- Chang, H. R., Huang, H. P., Kao, Y. L., Chen, S. L., Wu, S. W., Hung, T. W., ... & Wang, C. J. (2010). The suppressive effect of Rho kinase inhibitor, Y-27632, on oncogenic Ras/RhoA induced invasion/migration of human bladder cancer TSGH cells. *Chemico-biological interactions*, 183(1), 172-180.
- Chen, C., He, W., Huang, J., Wang, B., Li, H., Cai, Q., ... & Lin, T. (2018). LNMAT1 promotes lymphatic metastasis of bladder cancer via CCL2 dependent macrophage recruitment. *Nature communications*, 9(1), 3826.
- Chen, C., Luo, Y., He, W., Zhao, Y., Kong, Y., Liu, H., ... & Lin, T. (2020). Exosomal long noncoding RNA LNMAT2 promotes lymphatic metastasis in bladder cancer. *The Journal of clinical investigation*, 130(1), 404-421.
- Chen, C., Shang, A., Sun, Z., Gao, Y., Huang, J., Ping, Y., ... & Li, D. (2022). Urinary exosomal long noncoding RNA TERC as a noninvasive diagnostic and prognostic biomarker for bladder urothelial carcinoma. *Journal of Immunology Research*, 2022.
- Chen, F., Huang, T., Ren, Y., Wei, J., Lou, Z., Wang, X., ... & Yao, X. (2016). Clinical significance of CDH13 promoter methylation as a biomarker for bladder cancer: a meta-analysis. *BMC urology*, 16(1), 1-9.

- Chen, H., Chen, X., Zhang, Z., Bao, W., Gao, Z., Li, D., ... & Jiang, L. (2022). Extracellular vesicles-transferred SBSN drives glioma aggressiveness by activating NF- κ B via ANXA1-dependent ubiquitination of NEMO. *Oncogene*, 41(49), 5253-5265.
- Chen, H., Yang, W., Li, Y., & Ji, Z. (2023). PLAGL2 promotes bladder cancer progression via RACGAP1/RhoA GTPase/YAP1 signaling. *Cell Death & Disease*, 14(7), 433.
- Chen, M. F., Zeng, F., Qi, L., Zu, X. B., Wang, J., Liu, L. F., & Li, Y. (2014). Transforming growth factor- β 1 induces epithelial-mesenchymal transition and increased expression of matrix metalloproteinase-16 via miR-200b downregulation in bladder cancer cells. *Molecular Medicine Reports*, 10(3), 1549-1554.
- Chen, X., Chen, R. X., Wei, W. S., Li, Y. H., Feng, Z. H., Tan, L., ... & Xie, D. (2018). PRMT5 Circular RNA Promotes Metastasis of Urothelial Carcinoma of the Bladder through Sponging miR-30c to Induce Epithelial–Mesenchymal Transition. *Clinical Cancer Research*, 24(24), 6319-6330.
- Chen, Z., Zhan, Y., Chi, J., Guo, S., Zhong, X., He, A., ... & Zhou, L. (2018). Using microRNAs as novel predictors of urologic cancer survival: an integrated analysis. *EBioMedicine*, 34, 94-107.
- Cho, S., Yang, H. C., & Rhee, W. J. (2020). Development and comparative analysis of human urine exosome isolation strategies. *Process Biochemistry*, 88, 197-203.
- Choi, W., Porten, S., Kim, S., Willis, D., Plimack, E. R., Hoffman-Censits, J., ... & McConkey, D. J. (2014). Identification of distinct basal and luminal subtypes of muscle-invasive bladder cancer with different sensitivities to frontline chemotherapy. *Cancer cell*, 25(2), 152-165.
- Christoforidou, E. P., Riza, E., Kales, S. N., Hadjistavrou, K., Stoltidi, M., Kastania, A. N., & Linos, A. (2013). Bladder cancer and arsenic through drinking water: a systematic review of epidemiologic evidence. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 48(14), 1764-1775.
- Dai, L., Ma, C., Zhang, Z., Zeng, S., Liu, A., Tang, S., ... & Xu, C. (2016). DAPK promoter methylation and bladder cancer risk: A systematic review and meta-analysis. *PloS one*, 11(12), e0167228.
- Damrauer, J. S., Hoadley, K. A., Chism, D. D., Fan, C., Tiganelli, C. J., Wobker, S. E., ... & Kim, W. Y. (2014). Intrinsic subtypes of high-grade bladder cancer reflect the hallmarks of breast cancer biology. *Proceedings of the national academy of sciences*, 111(8), 3110-3115.
- De Bruyne, K., Slabbinck, B., Waegeman, W., Vauterin, P., De Baets, B., & Vandamme, P. (2011). Bacterial species identification from MALDI-TOF mass spectra through data analysis and machine learning. *Systematic and applied microbiology*, 34(1), 20-29.
- Delclos, G. L., & Lerner, S. P. (2008). Occupational risk factors. *Scandinavian journal of urology and nephrology*, 42(sup218), 58-63.

- Deulofeu, M., García-Cuesta, E., Peña-Méndez, E. M., Conde, J. E., Jiménez-Romero, O., Verdú, E., ... & Boadas-Vaello, P. (2021). Detection of SARS-CoV-2 infection in human nasopharyngeal samples by combining MALDI-TOF MS and artificial intelligence. *Frontiers in Medicine*, 8, 661358.
- Dogan, T. (2019). Yüksek dereceli T1 evre mesane tümör dokusu örneklerine ait proteom profilinin LC-MS/MS ile analiz edilmesi. (Master's thesis, Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü).
- Dogan, T., Sav, S. T. (2021). Biochemical Effects of Vitamin A on Bladder Cancer. *Nov Tech Nutri Food Sci*. 5(5). NTNF. 000623. 2021.DOI: 10.31031/NTNF.2021.05.000623
- Dogan, T., & Yazici, H. (2022). Epigenetics in Bladder Cancer: A Review of the Literature. *Turkish Journal of Oncology*, 37(1).
- El-Shal, A. S., Shalaby, S. M., Abouhashem, S. E., Elbary, E. H. A., Azazy, S., Rashad, N. M., & Sarhan, W. (2021). Urinary exosomal microRNA-96-5p and microRNA-183-5p expression as potential biomarkers of bladder cancer. *Molecular Biology Reports*, 48, 4361-4371.
- Elsharkawi, F., Elsabah, M., Shabayek, M., & Khaled, H. (2019). Urine and serum exosomes as novel biomarkers in detection of bladder cancer. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*, 20(7), 2219.
- Eriksson, P., Bernardo, C., Hurst, C. D., Knowles, M. A., Sjödaahl, G., Liedberg, F., & Höglund, M. (2022). The Lund Molecular Taxonomy Applied to Non-Muscle-Invasive Urothelial Carcinoma. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 24(9), 992-1008.
- Feng, Y., Kang, Y., He, Y., Liu, J., Liang, B., Yang, P., & Yu, Z. (2014). microRNA-99a acts as a tumor suppressor and is down-regulated in bladder cancer. *BMC urology*, 14(1), 1-8.
- Fong, M. H. Y., Feng, M., McConkey, D. J., & Choi, W. (2020). Update on bladder cancer molecular subtypes. *Translational andrology and urology*, 9(6), 2881.
- Formolo, C. A., Williams, R., Gordish-Dressman, H., MacDonald, T. J., Lee, N. H., & Hathout, Y. (2011). Secretome signature of invasive glioblastoma multiforme. *Journal of proteome research*, 10(7), 3149-3159.
- Franzen, C. A., Blackwell, R. H., Todorovic, V., Greco, K. A., Foreman, K. E., Flanigan, R. C., ... & Gupta, G. N. (2015). Urothelial cells undergo epithelial-to-mesenchymal transition after exposure to muscle invasive bladder cancer exosomes. *Oncogenesis*, 4(8), e163-e163.
- Freedman, N. D., Silverman, D. T., Hollenbeck, A. R., Schatzkin, A., & Abnet, C. C. (2011). Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women. *Jama*, 306(7), 737-745.
- García-Closas, M., Malats, N., Silverman, D., Dosemeci, M., Kogevinas, M., Hein, D. W., ... & Rothman, N. (2005). NAT2 slow acetylation, GSTM1 null genotype, and risk of bladder cancer: results from the Spanish Bladder Cancer Study and meta-analyses. *The Lancet*, 366(9486), 649-659.

- Gaykalova, D., Vatapalli, R., Glazer, C. A., Bhan, S., Shao, C., Sidransky, D., ... & Califano, J. A. (2012). Dose-dependent activation of putative oncogene SBSN by BORIS. *PloS one*, 7(7), e40389.
- Geng, H., Zhou, Q., Guo, W., Lu, L., Bi, L., Wang, Y., ... & Liang, Z. (2021). Exosomes in bladder cancer: novel biomarkers and targets. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*, 22(5), 341-347.
- Georgantzoglou, N., Pergaris, A., Masaoutis, C., & Theocharis, S. (2021). Extracellular vesicles as biomarkers carriers in bladder cancer: Diagnosis, surveillance, and treatment. *International journal of molecular sciences*, 22(5), 2744.
- Gest, C., Mirshahi, P., Li, H., Pritchard, L. L., Joimel, U., Blot, E., ... & Soria, C. (2012). Ovarian cancer: Stat3, RhoA and IGF-IR as therapeutic targets. *Cancer letters*, 317(2), 207-217.
- Giri, K., Mehta, A., & Ambatipudi, K. (2019). In search of the altering salivary proteome in metastatic breast and ovarian cancers. *FASEB bioAdvances*, 1(3), 191.
- Glazer, C. A., Smith, I. M., Ochs, M. F., Begum, S., Westra, W., Chang, S. S., ... & Califano, J. A. (2009). Integrative discovery of epigenetically derepressed cancer testis antigens in NSCLC. *PloS one*, 4(12), e8189.
- Guallar-Garrido, S., & Julián, E. (2020). Bacillus Calmette-Guérin (BCG) therapy for bladder cancer: an update. *ImmunoTargets and Therapy*, 1-11.
- Guidance, N. I. (2017). Bladder cancer: diagnosis and management of bladder cancer. *BJU Int*, 120(6), 755-765.
- Guo, C. C., Bondaruk, J., Yao, H., Wang, Z., Zhang, L., Lee, S., ... & Czerniak, B. (2020). Assessment of luminal and basal phenotypes in bladder cancer. *Scientific reports*, 10(1), 9743.
- Guo, R. Q., Xiong, G. Y., Yang, K. W., Zhang, L., He, S. M., Gong, Y. Q., ... & Zhou, L. Q. (2018). Detection of urothelial carcinoma, upper tract urothelial carcinoma, bladder carcinoma, and urothelial carcinoma with gross hematuria using selected urine-DNA methylation biomarkers: A prospective, single-center study. In *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* (Vol. 36, No. 7, pp. 342-e15). Elsevier.
- Güllü Amuran, G., Tinay, I., Filinte, D., Ilgin, C., Peker Eyüboğlu, I., & Akkiprik, M. (2020). Urinary micro-RNA expressions and protein concentrations may differentiate bladder cancer patients from healthy controls. *International Urology and Nephrology*, 52, 461-468.
- Habel, L. A., Bull, S. A., & Friedman, G. D. (1998). Barbiturates, smoking, and bladder cancer risk. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 7(11), 1049-1050.
- Han, J., Wang, J. Z., Yang, X., Yu, H., Zhou, R., Lu, H. C., ... & Yang, H. (2019). METTL3 promote tumor proliferation of bladder cancer by accelerating pri-miR221/222 maturation in m6A-dependent manner. *Molecular cancer*, 18, 1-15.

- Hautmann, R. E., Abol-Enein, H., Davidsson, T., Gudjonsson, S., Hautmann, S. H., Holm, H. V., ... & Xu, A. (2013). ICUD-EAU international consultation on bladder cancer 2012: urinary diversion. *European urology*, 63(1), 67-80.
- He, W., Zhong, G., Jiang, N., Wang, B., Fan, X., Chen, C., ... & Lin, T. (2018). Long noncoding RNA BLACAT2 promotes bladder cancer-associated lymphangiogenesis and lymphatic metastasis. *The Journal of clinical investigation*, 128(2), 861-875.
- Hiltbrunner, S., Mints, M., Eldh, M., Rosenblatt, R., Holmström, B., Alamdari, F., ... & Gabrielsson, S. (2020). Urinary exosomes from bladder cancer patients show a residual cancer phenotype despite complete pathological downstaging. *Scientific reports*, 10(1), 5960.
- Hou, G., Xu, W., Jin, Y., Wu, J., Pan, Y., & Zhou, F. (2019). MiRNA-217 accelerates the proliferation and migration of bladder cancer via inhibiting KMT2D. *Biochemical and biophysical research communications*, 519(4), 747-753.
- Houri, A., Mukudai, Y., Abe, Y., Watanabe, M., Nara, M., Miyamoto, S., ... & Shirota, T. (2023). Suprabasin enhances the invasion, migration, and angiogenic ability of oral squamous cell carcinoma cells under hypoxic conditions. *Oncology Reports*, 49(5), 1-11.
- Höglund, M., Bernardo, C., Sjö Dahl, G., Eriksson, P., Axelson, H., & Liedberg, F. (2023). The Lund taxonomy for bladder cancer classification—from gene expression clustering to cancer cell molecular phenotypes, and back again. *The Journal of Pathology*, 259(4), 369-375.
- Huang, H., Du, J., Jin, B., Pang, L., Duan, N., Huang, C., ... & Li, H. (2021). Combination of urine exosomal mRNAs and lncRNAs as novel diagnostic biomarkers for bladder cancer. *Frontiers in Oncology*, 11, 667212.
- Huang, Y., Shen, X. J., Zou, Q., Wang, S. P., Tang, S. M., & Zhang, G. Z. (2011). Biological functions of microRNAs: a review. *Journal of physiology and biochemistry*, 67, 129-139.
- Hubackova, S., Pribyl, M., Kyjácova, L., Moudra, A., Dzija, R., Salovska, B., ... & Hodny, Z. (2019). Interferon-regulated suprabasin is essential for stress-induced stem-like cell conversion and therapy resistance of human malignancies. *Molecular Oncology*, 13(7), 1467-1489.
- Humphrey, P. A., Moch, H., Cubilla, A. L., Ulbright, T. M., & Reuter, V. E. (2016). The 2016 WHO classification of tumours of the urinary system and male genital organs—part B: prostate and bladder tumours. *European urology*, 70(1), 106-119.
- Humphries, B., & Yang, C. (2015). The microRNA-200 family: small molecules with novel roles in cancer development, progression and therapy. *Oncotarget*, 6(9), 6472.
- Husek, P., Pacovsky, J., Chmelařova, M., Podhola, M., & Broda, M. (2017). Methylation status as a predictor of intravesical Bacillus Calmette-Guérin (BCG) immunotherapy response of high grade non-muscle invasive bladder tumor. *Biomedical Papers*, 161(2), 210-216.
- Igami, K., Uchiumi, T., Shiota, M., Ueda, S., Tsukahara, S., Akimoto, M., ... & Kang, D. (2022). Extracellular vesicles expressing CEACAM proteins in the urine of bladder cancer patients. *Cancer Science*, 113(9), 3120-3133.

- Jiang, H., Bu, Q., Zeng, M., Xia, D., & Wu, A. (2019, February). MicroRNA-93 promotes bladder cancer proliferation and invasion by targeting PEDF. *In Urologic oncology: seminars and original investigations* (Vol. 37, No. 2, pp. 150-157). Elsevier.
- Jiang, X., Castela, J. E., Groshen, S., Cortessis, V. K., Shibata, D. K., Conti, D. V., & Gago-Dominguez, M. (2008). Water intake and bladder cancer risk in Los Angeles County. *International journal of cancer*, 123(7), 1649-1656.
- Jin, F., Thaiparambil, J., Donepudi, S. R., Vantaku, V., Piyarathna, D. W. B., Maity, S., ... & Putluri, N. (2017). Tobacco-specific carcinogens induce hypermethylation, DNA adducts, and DNA damage in bladder cancer. *Cancer Prevention Research*, 10(10), 588-597.
- Johnson, D. C., Greene, P. S., & Nielsen, M. E. (2015). Surgical advances in bladder cancer: at what cost? *Urologic Clinics*, 42(2), 235-252.
- Jordaens, S., Oeyen, E., Willems, H., Ameye, F., De Wachter, S., Pauwels, P., & Mertens, I. (2023). Protein Biomarker Discovery Studies on Urinary sEV Fractions Separated with UF-SEC for the First Diagnosis and Detection of Recurrence in Bladder Cancer Patients. *Biomolecules*, 13(6), 932.
- Kalluri, R. (2016). The biology and function of exosomes in cancer. *The Journal of clinical investigation*, 126(4), 1208-1215.
- Kamai, T., Tsujii, T., Arai, K., Takagi, K., Asami, H., Ito, Y., & Oshima, H. (2003). Significant association of Rho/ROCK pathway with invasion and metastasis of bladder cancer. *Clinical Cancer Research*, 9(7), 2632-2641.
- Kamoun, A., de Reyniès, A., Allory, Y., Sjödaahl, G., Robertson, A. G., Seiler, R., ... & Weinstein, J. (2020). A consensus molecular classification of muscle-invasive bladder cancer. *European urology*, 77(4), 420-433.
- Keerthikumar, S., Chisanga, D., Ariyaratne, D., Al Saffar, H., Anand, S., Zhao, K., ... & Mathivanan, S. (2016). ExoCarta: a web-based compendium of exosomal cargo. *Journal of molecular biology*, 428(4), 688-692.
- Knowles, M. A. (2008). Molecular pathogenesis of bladder cancer. *International journal of clinical oncology*, 13(4), 287-297.
- Knowles, M. A., & Hurst, C. D. (2015). Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity. *Nature reviews cancer*, 15(1), 25-41.
- Leão, R., Lee, D., Figueiredo, A., Hermanns, T., Wild, P., Komosa, M., ... & Tabori, U. (2019). Combined genetic and epigenetic alterations of the TERT promoter affect clinical and biological behavior of bladder cancer. *International journal of cancer*, 144(7), 1676-1684.
- Lee, D. H., Yoon, H., Park, S., Kim, J. S., Ahn, Y. H., Kwon, K., ... & Kim, K. H. (2018). Urinary exosomal and cell-free DNA detects somatic mutation and copy number alteration in urothelial carcinoma of bladder. *Scientific reports*, 8(1), 14707.
- Lee, J. S., Ahn, Y. H., Won, H. S., Sun, D. S., Kim, Y. H., & Ko, Y. H. (2017). Prognostic role of the microRNA-200 family in various carcinomas: a systematic review and meta-analysis. *BioMed research international*, 2017.

- Lee, J., Park, H. S., Han, S. R., Kang, Y. H., Mun, J. Y., Shin, D. W., ... & Park, J. (2022). Alpha-2-macroglobulin as a novel diagnostic biomarker for human bladder cancer in urinary extracellular vesicles. *Frontiers in Oncology*, 12, 976407.
- Lee, N., Canagasingham, A., Bajaj, M., Shanmugasundaram, R., Hutton, A., Bucci, J., ... & Ni, J. (2022). Urine exosomes as biomarkers in bladder cancer diagnosis and prognosis: From functional roles to clinical significance. *Frontiers in Oncology*, 12, 1019391.
- Li, Q., Huyan, T., Cai, S., Huang, Q., Zhang, M., Peng, H., ... & Zhang, W. (2020). The role of exosomal miR-375-3p: A potential suppressor in bladder cancer via the Wnt/ β -catenin pathway. *The FASEB Journal*, 34(9), 12177-12196.
- Liang, L. G., Kong, M. Q., Zhou, S., Sheng, Y. F., Wang, P., Yu, T., ... & Wang, S. (2017). An integrated double-filtration microfluidic device for isolation, enrichment and quantification of urinary extracellular vesicles for detection of bladder cancer. *Scientific reports*, 7(1), 1-10.
- Liang, Y., Duan, L., Lu, J., & Xia, J. (2021). Engineering exosomes for targeted drug delivery. *Theranostics*, 11(7), 3183.
- Lin, H., Shi, X., Li, H., Hui, J., Liu, R., Chen, Z., ... & Tan, W. (2021). Urinary Exosomal miRNAs as biomarkers of bladder Cancer and experimental verification of mechanism of miR-93-5p in bladder Cancer. *BMC cancer*, 21(1), 1-17.
- Lin, S. Y., Chang, C. H., Wu, H. C., Lin, C. C., Chang, K. P., Yang, C. R., ... & Chen, C. J. (2016). Proteome profiling of urinary exosomes identifies alpha 1-antitrypsin and H2B1K as diagnostic and prognostic biomarkers for urothelial carcinoma. *Scientific reports*, 6(1), 34446.
- Lin, S., Choe, J., Du, P., Triboulet, R., & Gregory, R. I. (2016). The m6A methyltransferase METTL3 promotes translation in human cancer cells. *Molecular cell*, 62(3), 335-345.
- Lin, T., Zhou, S., Gao, H., Li, Y., & Sun, L. (2018). MicroRNA-325 is a potential biomarker and tumor regulator in human bladder cancer. *Technology in Cancer Research & Treatment*, 17, 1533033818790536.
- Liu, L., Qiu, M., Tan, G., Liang, Z., Qin, Y., Chen, L., ... & Liu, J. (2014). miR-200c inhibits invasion, migration and proliferation of bladder cancer cells through down-regulation of BMI-1 and E2F3. *Journal of translational medicine*, 12, 1-10.
- Liu, S., Jiang, H., Wen, H., Ding, Q., & Feng, C. (2018). Knockdown of tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta (YWHAZ) enhances tumorigenesis both in vivo and in vitro in bladder cancer. *Oncology Reports*, 39(5), 2127-2135.
- Liu, S., Wu, Y., Yang, T., Feng, C., & Jiang, H. (2016). Coexistence of YWHAZ amplification predicts better prognosis in muscle-invasive bladder cancer with CDKN2A or TP53 loss. *Oncotarget*, 7(23), 34752.
- López, J. I., Angulo, J. C., Martín, A., Sánchez-Chapado, M., González-Corpas, A., Colás, B., & Ropero, S. (2017). A DNA hypermethylation profile reveals new potential biomarkers for the evaluation of prognosis in urothelial bladder cancer. *Apmis*, 125(9), 787-796.

- Lopez-Beltran, A., Cimadamore, A., Blanca, A., Massari, F., Vau, N., Scarpelli, M., ... & Montironi, R. (2021). Immune checkpoint inhibitors for the treatment of bladder cancer. *Cancers*, 13(1), 131.
- Lu, Q., Liu, T., Feng, H., Yang, R., Zhao, X., Chen, W., ... & Guo, H. (2019). Circular RNA circSLC8A1 acts as a sponge of miR-130b/miR-494 in suppressing bladder cancer progression via regulating PTEN. *Molecular cancer*, 18(1), 1-13.
- Maas, M., Todenhöfer, T., & Black, P. C. (2023). Urine biomarkers in bladder cancer—current status and future perspectives. *Nature Reviews Urology*, 1-18.
- Mahdavinezhad, A., Mousavi-Bahar, S. H., Poorolajal, J., Yadegarazari, R., Jafari, M., Shabab, N., & Saidijam, M. (2015). Evaluation of miR-141, miR-200c, miR-30b expression and clinicopathological features of bladder cancer. *International journal of molecular and cellular medicine*, 4(1), 32.
- Martínez-Fernández, M., Dueñas, M., Feber, A., Segovia, C., García-Escudero, R., Rubio, C., ... & Paramio, J. M. (2015). A Polycomb-mir200 loop regulates clinical outcome in bladder cancer. *Oncotarget*, 6(39), 42258.
- Mathieu, M., Névo, N., Jouve, M., Valenzuela, J. I., Maurin, M., Verweij, F. J., ... & Théry, C. (2021). Specificities of exosome versus small ectosome secretion revealed by live intracellular tracking of CD63 and CD9. *Nature communications*, 12(1), 4389.
- Matsuzaki, K., Fujita, K., Jingushi, K., Kawashima, A., Ujike, T., Nagahara, A., ... & Nonomura, N. (2017). MiR-21-5p in urinary extracellular vesicles is a novel biomarker of urothelial carcinoma. *Oncotarget*, 8(15), 24668.
- Mei, Y., Zheng, J., Xiang, P., Liu, C., & Fan, Y. (2020). Prognostic value of the miR-200 family in bladder cancer: A systematic review and meta-analysis. *Medicine*, 99(47).
- Michalak, E. M., Burr, M. L., Bannister, A. J., & Dawson, M. A. (2019). The roles of DNA, RNA and histone methylation in ageing and cancer. *Nature reviews Molecular cell biology*, 20(10), 573-589.
- Milosevic, M., Gospodarowicz, M., Zietman, A., Abbas, F., Haustermans, K., Moonen, L., ... & Shipley, W. (2007). Radiotherapy for bladder cancer. *Urology*, 69(1), 80-92.
- Morales, A., Eidinger, D., & Bruce, A. W. (1976). Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors. *The Journal of urology*, 116(2), 180-182.
- Murakami, T., Yamamoto, C. M., Akino, T., Tanaka, H., Fukuzawa, N., Suzuki, H., ... & Harada, H. (2018). Bladder cancer detection by urinary extracellular vesicle mRNA analysis. *Oncotarget*, 9(67), 32810.
- Nabet, C., Chaline, A., Franetich, J. F., Brossas, J. Y., Shahmirian, N., Silvie, O., ... & Piarroux, R. (2020). Prediction of malaria transmission drivers in Anopheles mosquitoes using artificial intelligence coupled to MALDI-TOF mass spectrometry. *Scientific Reports*, 10(1), 11379.
- Neal, C. L., & Yu, D. (2010). 14-3-3 ζ as a prognostic marker and therapeutic target for cancer. *Expert opinion on therapeutic targets*, 14(12), 1343-1354.
- Ouyang, H., Zhou, Y., Zhang, L., & Shen, G. (2015). Diagnostic value of microRNAs for urologic cancers: a systematic review and meta-analysis. *Medicine*, 94(37).

- Özen, A., Başeskioğlu, B. A., Can, C. (2011). Hematüri göz ardı edilebilir mi? *Üroonkoloji Bülteni*, 6(1), 5-8.
- Perez, A., Loizaga, A., Arceo, R., Lacasa, I., Rabade, A., Zorroza, K., ... & Royo, F. (2014). A pilot study on the potential of RNA-associated to urinary vesicles as a suitable non-invasive source for diagnostic purposes in bladder cancer. *Cancers*, 6(1), 179-192.
- Planz, B., Jochims, E., Deix, T., Caspers, H. P., Jakse, G., & Boecking, A. (2005). The role of urinary cytology for detection of bladder cancer. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)*, 31(3), 304-308.
- Pribyl, M., Hodny, Z., & Kubikova, I. (2021). Suprabasin—A Review. *Genes*, 12(1), 108.
- Pribyl, M., Hubackova, S., Moudra, A., Vancurova, M., Polackova, H., Stopka, T., ... & Hodny, Z. (2020). Aberrantly elevated suprabasin in the bone marrow as a candidate biomarker of advanced disease state in myelodysplastic syndromes. *Molecular Oncology*, 14(10), 2403-2419.
- Purysko, A. S., Leão Filho, H. M., & Herts, B. R. (2012, October). Radiologic imaging of patients with bladder cancer. In *Seminars in oncology* (Vol. 39, No. 5, pp. 543-558). WB Saunders.
- Ren, S., Zhang, N., Shen, L., Lu, Y., Chang, Y., Lin, Z., ... & Jin, H. (2021). Lnc00892 competes with c-Jun to block NCL transcription, reducing the stability of RhoA/RhoC mRNA and impairing bladder cancer invasion. *Oncogene*, 40(48), 6579-6589.
- Rothschild, S. I. (2014). microRNA therapies in cancer. *Molecular and cellular therapies*, 2(1), 1-8.
- Sanli, O., Dobruch, J., Knowles, M. A., Burger, M., Alemozaffar, M., Nielsen, M. E., & Lotan, Y. (2017). Bladder cancer. *Nature reviews Disease primers*, 3(1), 1-19.
- Santos, J. C., Profitós-Pelejá, N., Sánchez-Vinces, S., & Roué, G. (2023). RHOA Therapeutic Targeting in Hematological Cancers. *Cells*, 12(3), 433.
- Santos, L. L., Santos, J., Gouveia, M. J., Bernardo, C., Lopes, C., Rinaldi, G., ... & Costa, J. M. C. D. (2021). Urogenital schistosomiasis—history, pathogenesis, and bladder cancer. *Journal of Clinical Medicine*, 10(2), 205.
- Senfter, D., Madlener, S., Krupitza, G., & Mader, R. M. (2016). The microRNA-200 family: still much to discover. *Biomolecular concepts*, 7(5-6), 311-319.
- Shao, C., Tan, M., Bishop, J. A., Liu, J., Bai, W., Gaykalova, D. A., ... & Ha, P. K. (2012). Suprabasin is hypomethylated and associated with metastasis in salivary adenoid cystic carcinoma. *PloS one*, 7(11), e48582.
- Sheng, S. H., & Zhu, H. L. (2014). Proteomic analysis of pleural effusion from lung adenocarcinoma patients by shotgun strategy. *Clinical and Translational Oncology*, 16, 153-157.
- Shi, H. B., Yu, J. X., Yu, J. X., Feng, Z., Zhang, C., Li, G. Y., ... & Yang, X. B. (2017). Diagnostic significance of microRNAs as novel biomarkers for bladder cancer: a meta-analysis of ten articles. *World Journal of Surgical Oncology*, 15, 1-10.

- Shindo, T., Niinuma, T., Nishiyama, N., Shinkai, N., Kitajima, H., Kai, M., ... & Suzuki, H. (2018). Epigenetic silencing of miR-200b is associated with cisplatin resistance in bladder cancer. *Oncotarget*, 9(36), 24457.
- Shindo, T., Shimizu, T., Nojima, M., Niinuma, T., Maruyama, R., Kitajima, H., ... & Masumori, N. (2018). Evaluation of urinary DNA methylation as a marker for recurrent bladder cancer: a 2-center prospective study. *Urology*, 113, 71-78.
- Simeone, P., Bologna, G., Lanuti, P., Pierdomenico, L., Guagnano, M. T., Pieragostino, D., ... & Mariani-Costantini, R. (2020). Extracellular vesicles as signaling mediators and disease biomarkers across biological barriers. *International journal of molecular sciences*, 21(7), 2514.
- Sjödahl, G., Lauss, M., Lövgren, K., Chebil, G., Gudjonsson, S., Veerla, S., ... & Höglund, M. (2012). A Molecular Taxonomy for Urothelial Carcinoma Molecular Subtypes of Urothelial Carcinoma. *Clinical cancer research*, 18(12), 3377-3386.
- Sloan, F. A., Yashkin, A. P., Akushevich, I., & Inman, B. A. (2020). The cost to medicare of bladder cancer care. *European urology oncology*, 3(4), 515-522.
- Soukup, V., Čapoun, O., Cohen, D., Hernandez, V., Babjuk, M., Burger, M., ... & Zigeuner, R. (2017). Prognostic performance and reproducibility of the 1973 and 2004/2016 World Health Organization grading classification systems in non-muscle-invasive bladder cancer: a European Association of Urology Non-muscle Invasive Bladder Cancer Guidelines Panel systematic review. *European urology*, 72(5), 801-813.
- Stein, J. P., Lieskovsky, G., Cote, R., Groshen, S., Feng, A. C., Boyd, S., ... & Skinner, D. G. (2001). Radical cystectomy in the treatment of invasive bladder cancer: long-term results in 1,054 patients. *Journal of clinical oncology*, 19(3), 666-675.
- Sternberg, C. N., Donat, S. M., Bellmunt, J., Millikan, R. E., Stadler, W., De Mulder, P., ... & Soloway, M. S. (2007). Chemotherapy for bladder cancer: treatment guidelines for neoadjuvant chemotherapy, bladder preservation, adjuvant chemotherapy, and metastatic cancer. *Urology*, 69(1), 62-79.
- Stickney, Z., Losacco, J., McDevitt, S., Zhang, Z., & Lu, B. (2016). Development of exosome surface display technology in living human cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 472(1), 53-59.
- Stoorvogel, W. (2012). Functional transfer of microRNA by exosomes. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 119(3), 646-648.
- Strømme, O., Heck, K. A., Brede, G., Lindholm, H. T., Otterlei, M., & Arum, C. J. (2021). Differentially expressed extracellular vesicle-contained microRNAs before and after transurethral resection of bladder tumors. *Current Issues in Molecular Biology*, 43(1), 286-300.
- Stubendorff, B., Wilhelm, K., Posselt, K., Catto, J., Hartmann, A., Bertz, S., ... & Junker, K. (2019). A three-gene methylation marker panel for the nodal metastatic risk assessment of muscle-invasive bladder cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 145, 811-820.

- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(3), 209-249.
- Sylvester, R. J., Brausi, M. A., Kirkels, W. J., Hoeltl, W., Da Silva, F. C., Powell, P. H., ... & Group, E. G. U. T. C. (2010). Long-term efficacy results of EORTC genitourinary group randomized phase 3 study 30911 comparing intravesical instillations of epirubicin, bacillus Calmette-Guerin, and bacillus Calmette-Guerin plus isoniazid in patients with intermediate-and high-risk stage Ta T1 urothelial carcinoma of the bladder. *European urology*, 57(5), 766-773.
- Sylvester, R. J., Rodríguez, O., Hernández, V., Turturica, D., Bauerová, L., Bruins, H. M., ... & van Rhijn, B. W. (2021). European Association of Urology (EAU) prognostic factor risk groups for non-muscle-invasive bladder cancer (NMIBC) incorporating the WHO 2004/2016 and WHO 1973 classification systems for grade: an update from the EAU NMIBC Guidelines Panel. *European urology*, 79(4), 480-488.
- Takahashi, K., Asano, N., Imatani, A., Kondo, Y., Saito, M., Takeuchi, A., ... & Masamune, A. (2020). Sox2 induces tumorigenesis and angiogenesis of early-stage esophageal squamous cell carcinoma through secretion of Suprabasin. *Carcinogenesis*, 41(11), 1543-1552.
- Tammen, S. A., Friso, S., & Choi, S. W. (2013). Epigenetics: the link between nature and nurture. *Molecular aspects of medicine*, 34(4), 753-764.
- Tan, H., Wang, L., & Liu, Z. (2022). Suprabasin: Role in human cancers and other diseases. *Molecular Biology Reports*, 1-9.
- Tang, Z., Tang, C., Sun, C., Ying, X., & Shen, R. (2022). M1 macrophage-derived exosomes synergistically enhance the anti-bladder cancer effect of gemcitabine. *Aging (Albany NY)*, 14(18), 7364.
- Tian, H., Wang, X., Lu, J., Tian, W., & Chen, P. (2019). MicroRNA-621 inhibits cell proliferation and metastasis in bladder cancer by suppressing Wnt/ β -catenin signaling. *Chemico-Biological Interactions*, 308, 244-251.
- Tomiyama, E., Fujita, K., Matsuzaki, K., Narumi, R., Yamamoto, A., Uemura, T., ... & Nonomura, N. (2022). EphA2 on urinary extracellular vesicles as a novel biomarker for bladder cancer diagnosis and its effect on the invasiveness of bladder cancer. *British Journal of Cancer*, 127(7), 1312-1323.
- Tomiyama, E., Matsuzaki, K., Fujita, K., Shiromizu, T., Narumi, R., Jingushi, K., ... & Nonomura, N. (2021). Proteomic analysis of urinary and tissue-exudative extracellular vesicles to discover novel bladder cancer biomarkers. *Cancer science*, 112(5), 2033-2045.
- Tran, L., Xiao, J. F., Agarwal, N., Duex, J. E., & Theodorescu, D. (2021). Advances in bladder cancer biology and therapy. *Nature Reviews Cancer*, 21(2), 104-121.
- Ucer, O., & Kocaman, N. (2022a). Role of suprabasin, a new biomarker in squamous cell carcinoma and basal cell carcinoma. *Tissue and Cell*, 78, 101875.

- Ucer, O., & Kocaman, N. (2022b). New candidates in the differential diagnosis of malignant mesothelioma from benign mesothelial hyperplasia and adenocarcinoma; DARS2 and suprabasin. *Tissue and Cell*, 79, 101920.
- van Hoogstraten, L. M., Vrieling, A., van der Heijden, A. G., Kogevinas, M., Richters, A., & Kiemeny, L. A. (2023). Global trends in the epidemiology of bladder cancer: challenges for public health and clinical practice. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 1-18.
- van Kessel, K. E., van der Keur, K. A., Dyrskj t, L., Algaba, F., Welvaart, N. Y., Beukers, W., ... & Zwarthoff, E. C. (2018). Molecular Markers Increase Precision of the European Association of Urology Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer Progression Risk Groups Biomarkers Improve BC Progression Risk Groups. *Clinical Cancer Research*, 24(7), 1586-1593.
- van Puffelen, J. H., Keating, S. T., Oosterwijk, E., van der Heijden, A. G., Netea, M. G., Joosten, L. A., & Vermeulen, S. H. (2020). Trained immunity as a molecular mechanism for BCG immunotherapy in bladder cancer. *Nature Reviews Urology*, 17(9), 513-525.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., & Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology*, 3(7), 1-12.
- Vantaku, V., Amara, C. S., Piyarathna, D. W. B., Donepudi, S. R., Ambati, C. R., Putluri, V., ... & Putluri, N. (2019). DNA methylation patterns in bladder tumors of African American patients point to distinct alterations in xenobiotic metabolism. *Carcinogenesis*, 40(11), 1332-1340.
- Volanis, D., Zaravinos, A., Kadiyska, T., Delakas, D., Zoumpourlis, V., & Spandidos, D. A. (2011). Expression profile of Rho kinases in urinary bladder cancer. *J BUON*, 16(3), 511-521.
- Wang, G., Zhang, H., He, H., Tong, W., Wang, B., Liao, G., ... & Du, C. (2010). Up-regulation of microRNA in bladder tumor tissue is not common. *International urology and nephrology*, 42, 95-102.
- Wang, X., Lin, Y. W., Wang, S., Wu, J., Mao, Q. Q., Zheng, X. Y., & Xie, L. P. (2013). A meta-analysis of tea consumption and the risk of bladder cancer. *Urologia Internationalis*, 90(1), 10-16.
- Wen, J., Yang, T., Mallouk, N., Zhang, Y., Li, H., Lambert, C., & Li, G. (2021). Urinary exosomal CA9 mRNA as a novel liquid biopsy for molecular diagnosis of bladder cancer. *International Journal of Nanomedicine*, 4805-4811.
- Wiklund, E. D., Bramsen, J. B., Hulf, T., Dyrskj t, L., Ramanathan, R., Hansen, T. B., ... & Clark, S. J. (2011). Coordinated epigenetic repression of the miR-200 family and miR-205 in invasive bladder cancer. *International journal of cancer*, 128(6), 1327-1334.
- Wi sniewski, J. R., Zougman, A., Nagaraj, N., & Mann, M. (2009). Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nature methods*, 6(5), 359-362.

- Wu, C. H., Silvers, C. R., Messing, E. M., & Lee, Y. F. (2019). Bladder cancer extracellular vesicles drive tumorigenesis by inducing the unfolded protein response in endoplasmic reticulum of nonmalignant cells. *Journal of Biological Chemistry*, 294(9), 3207-3218.
- Wu, D., Niu, X., Tao, J., Li, P., Lu, Q., Xu, A., ... & Wang, Z. (2017). MicroRNA-379-5p plays a tumor-suppressive role in human bladder cancer growth and metastasis by directly targeting MDM2 Corrigendum in/10.3892/or. 2022.8413. *Oncology reports*, 37(6), 3502-3508.
- Xie, Y., Ma, X., Chen, L., Li, H., Gu, L., Gao, Y., ... & Zhang, X. (2017). MicroRNAs with prognostic significance in bladder cancer: a systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports*, 7(1), 5619.
- Xu, Y., Zhang, P., Tan, Y., Jia, Z., Chen, G., Niu, Y., ... & Zhang, X. (2021). A potential panel of five mRNAs in urinary extracellular vesicles for the detection of bladder cancer. *Translational Andrology and Urology*, 10(2), 809.
- Xue, M., Chen, W., Xiang, A., Wang, R., Chen, H., Pan, J., ... & Li, X. (2017). Hypoxic exosomes facilitate bladder tumor growth and development through transferring long non-coding RNA-UCA1. *Molecular cancer*, 16, 1-13.
- Yang, F. R., Li, H. J., Li, T. T., Zhao, Y. F., Liu, Z. K., & Li, X. R. (2019). Prognostic value of MicroRNA-15a in human cancers: A meta-analysis and bioinformatics. *BioMed research international*, 2019.
- Yang, Z., Liu, A., Xiong, Q., Xue, Y., Liu, F., Zeng, S., ... & Xu, C. (2019). Prognostic value of differentially methylated gene profiles in bladder cancer. *Journal of Cellular Physiology*, 234(10), 18763-18772.
- Yazarlou, F., Mowla, S. J., Oskooei, V. K., Motevaseli, E., Tooli, L. F., Afsharpad, M., ... & Modarressi, M. H. (2018a). Urine exosome gene expression of cancer-testis antigens for prediction of bladder carcinoma. *Cancer Management and Research*, 5373-5381.
- Yazarlou, F., Modarressi, M. H., Mowla, S. J., Oskooei, V. K., Motevaseli, E., Tooli, L. F., ... & Afsharpad, M. (2018b). Urinary exosomal expression of long non-coding RNAs as diagnostic marker in bladder cancer. *Cancer management and research*, 6357-6365.
- Yu, C. C., Li, C. F., Chen, I. H., Lai, M. T., Lin, Z. J., Korla, P. K., ... & Sheu, J. J. C. (2019). YWHAZ amplification/overexpression defines aggressive bladder cancer and contributes to chemo-/radio-resistance by suppressing caspase-mediated apoptosis. *The Journal of Pathology*, 248(4), 476-487.
- Yu, Y., Cao, H., Zhang, M., Shi, F., Wang, R., & Liu, X. (2018). Prognostic value of DNA methylation for bladder cancer. *Clinica Chimica Acta*, 484, 207-212.
- Zaitsu, M., Nakamura, F., Toyokawa, S., Tonooka, A., Takeuchi, T., Homma, Y., & Kobayashi, Y. (2016). Risk of alcohol consumption in bladder cancer: case-control study from a nationwide inpatient database in Japan. *The Tohoku journal of experimental medicine*, 239(1), 9-15.
- Zhan, L., Zhang, B., Tan, Y., Yang, C., Huang, C., Wu, Q., ... & Shu, A. (2017). Quantitative assessment of the relationship between RASSF1A gene promoter methylation and bladder cancer (PRISMA). *Medicine*, 96(7).

- Zhan, Y., Du, L., Wang, L., Jiang, X., Zhang, S., Li, J., ... & Wang, C. (2018). Expression signatures of exosomal long non-coding RNAs in urine serve as novel non-invasive biomarkers for diagnosis and recurrence prediction of bladder cancer. *Molecular Cancer*, 17, 1-5.
- Zhang, Y., Fang, L., Zang, Y., & Xu, Z. (2018). Identification of core genes and key pathways via integrated analysis of gene expression and DNA methylation profiles in bladder cancer. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*, 24, 3024.
- Zhou, B., Xu, K., Zheng, X., Chen, T., Wang, J., Song, Y., ... & Zheng, S. (2020). Application of exosomes as liquid biopsy in clinical diagnosis. *Signal transduction and targeted therapy*, 5(1), 144.
- Zhou, X., Kurywachak, P., Wolf-Dennen, K., Che, S. P., Sulakhe, D., D'Souza, M., ... & Kalluri, R. (2021). Unique somatic variants in DNA from urine exosomes of individuals with bladder cancer. *Molecular Therapy-Methods & Clinical Development*, 22, 360-376.
- Zhou, Y., Tian, C., & Jia, C. (2012). A dose-response meta-analysis of coffee consumption and bladder cancer. *Preventive medicine*, 55(1), 14-22.
- Zhou, Z., Zhang, Z., Chen, H., Bao, W., Kuang, X., Zhou, P., ... & Jiang, L. (2022). SBSN drives bladder cancer metastasis via EGFR/SRC/STAT3 signalling. *British Journal of Cancer*, 127(2), 211-222.
- Zhu, J., Wu, G., Li, Q., Gong, H., Song, J., Cao, L., ... & Jiang, L. (2016). Overexpression of suprabasin is associated with proliferation and tumorigenicity of esophageal squamous cell carcinoma. *Scientific reports*, 6(1), 21549.
- Zhu, Y., Pick, H., Gasilova, N., Li, X., Lin, T. E., Laeubli, H. P., ... & Girault, H. H. (2019). MALDI detection of exosomes: a potential tool for cancer studies. *Chem*, 5(5), 1318-1336.
- Życieńska, K., Pszczółkowska, B., Brzozowska, B., Kamiński, M., Lorenc, T., Olejarz, W., ... & Ginter, J. (2022). Brownian Motion Influence on AFM Exosomes' Size Measurements. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(17), 10074.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

MESANE KANSERİNDE ÜRİNER EKSOZOMLARIN MİKRORNA VE PROTEOM PROFİLİNİN ARAŞTIRILMASI

ORJİNALLİK RAPORU

% 10	% 8	% 5	% 2
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 3
2	Junyou Zhu, Jin Deng, Lijun Zhang, Jingling Zhao, Fei Zhou, Ning Liu, Ruizhao Cai, Jun Wu, Bin Shu, Shaohai Qi. "Reconstruction of lncRNA-miRNA-mRNA network based on competitive endogenous RNA reveals functional lncRNAs in melanoma", Research Square Platform LLC, 2020 Yayın	<% 1
3	Makoto Eizuka, Mitsumasa Osakabe, Ayaka Sato, Yasuko Fujita et al. "Dysregulation of microRNA expression during the progression of colorectal tumors", Pathology International, 2020 Yayın	<% 1
4	www.ncbi.nlm.nih.gov İnternet Kaynağı	<% 1
5	9lib.net İnternet Kaynağı	<% 1