

MESANE TÜMÖRLÜ HASTALARIN KANLARINDA EPİGENETİK BİYOBELİRTEÇLER OLARAK PROTOKADERİN GEN AİLESİ ÜYELERİ PCDH8, PCDH10 VE PCDH17’NİN ARAŞTIRILMASI

The Investigation of Protocadherin Gene Family Members PCDH8, PCDH10, and PCDH17 as Epigenetic Biomarkers in Blood Samples of Patients with Bladder Tumor

Zeynep YEĞİN¹, Filiz ÖZEN², Haydar KOÇ³, Asif YILDIRIM⁴, Recep BÜYÜKALPELLİ⁵

¹Sinop Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Laboratuvar Teknikleri Programı, Sinop, TÜRKİYE

²İstanbul Medeniyet Üniversitesi, Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Genetik A.D., İstanbul, TÜRKİYE

³Çankırı Karatekin Üniversitesi, Fen Fakültesi, İstatistik Bölümü, Çankırı, TÜRKİYE

⁴İstanbul Medeniyet Üniversitesi, Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Üroloji A.D., İstanbul, TÜRKİYE

⁵Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Üroloji A.D., Samsun, TÜRKİYE

ÖZ

ABSTRACT

Amaç: Çalışmanın amacı mesane tümörlü hastalarda ve sağlıklı kontrollerde protokaderin gen ailesine ait olan protokaderin 8 (*PCDH8*), protokaderin 10 (*PCDH10*) ve protokaderin 17 (*PCDH17*) genlerinin periferik kan DNA metilasyon profillerini analiz ederek bu profillerin tümör-spesifik olası etkilerini değerlendirmektir. Araştırılan üç genin metilasyon profiliyle spesifik demografik ve/veya klinikopatolojik veriler arasındaki olası ilişkinin araştırılması da çalışmanın ikinci hedefidir.

Gereç ve Yöntemler: Mesane karsinomalı (n=80; düşük dereceli: 40, yüksek dereceli: 40) ve sağlıklı kontrollerin (n=40) periferik kan örneklerinden ekstrakte edilen genomik DNA promotör bölgelerinin hipermetilasyon analizi için bisülfid modifikasyon ve metilasyon-spesifik PCR işlemine maruz bırakılmıştır.

Bulgular: *PCDH8* metilasyon profilinin yaşla birlikte artış gösterdiği gözlemlenmiştir. Neredeyse kontrollerin tamamında da bu genler bakımından kısmi metilasyon profilleri belirlendiği için hasta örneklerindeki *PCDH10* ve *PCDH17* metilasyon paternleri bir farklılık oluşturmamakla beraber *PCDH8* daha farklı bir kan epigenetik profili sergilemiştir.

Sonuç: *PCDH8* geninin kandaki metilasyon modelinin yaşlanma süreciyle ilişkisi çalışmamızda gösterilmiştir. Mesane kanserindeki etkisi açısından daha kesin bir sonuca varabilmek için *PCDH8*'in kandaki metilasyon durumunun daha yüksek sayılı kohortta ve MethyLight gibi daha duyarlı metotlarla araştırılmasını tavsiye etmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Mesane kanseri, DNA metilasyonu, periferik kan, *PCDH8*, *PCDH10*, *PCDH17*

Objective: The aim of the study was to evaluate the potential tumor-specific effects of peripheral blood DNA methylation profiles of *protocadherin 8 (PCDH8)*, *protocadherin 10 (PCDH10)*, and *protocadherin 17 (PCDH17)* genes who belong to the protocadherin gene family, in patients with bladder tumors and healthy controls. The potential association between methylation profiles of the investigated three genes and demographic and/or clinicopathologic data was a second target of the study.

Material and Methods: Genomic DNA extracted from peripheral blood samples of patients with bladder carcinoma (n=80; low-grade: 40, high-grade: 40) and healthy controls (n=40) was subjected to bisulphite modification and methylation-specific PCR for hypermethylation analyses of promoter regions.

Results: *PCDH8* methylation profile was observed to be increased with age. Though *PCDH10* and *PCDH17* methylation patterns did not reflect a difference in patients since partial methylation profiles were also almost completely detected in controls; *PCDH8* displayed a more different blood epigenetic profile.

Conclusion: The association of blood methylation pattern of *PCDH8* with aging process was shown in our study. We recommend the investigation of the status of *PCDH8* methylation in blood in larger cohorts and with more sensitive methods such as MethyLight to draw a more precise conclusion in terms of its effect in bladder carcinoma.

Keywords: Bladder cancer, DNA methylation, peripheral blood, *PCDH8*, *PCDH10*, *PCDH17*



Yazışma Adresi / Correspondence:

Sinop Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri MYO, Tıbbi Laboratuvar Teknikleri Programı, SİNOP, TÜRKİYE

Tel / Phone: +905054857518

Geliş Tarihi / Received: 17.01.2020

ORCID NO: ¹0000-0003-4637-0253, ²0000-0001-9187-5387

⁵0000-0001-9029-9023

Dr. Zeynep YEĞİN

E-posta / E-mail: zyeğin@sinop.edu.tr

Kabul Tarihi / Accepted: 25.08.2020

³0000-0002-8568-4717, ⁴0000-0002-3386-971X

GİRİŞ

Karsinogenez onkogenler ve tümör baskılayıcı genler tarafından yürütülen birçok genetik ve epigenetik değişimin birikmesiyle sonuçlanan çok basamaklı bir süreçtir. Mesane kanseri dünya çapında en yaygın malignant ürogenital tümörlerden biridir ve her yıl yaklaşık 145.000 ölümden sorumludur. Histolojik olarak mesane kanserlerinin %90'dan fazlası transisyonel hücre karsinomalarıdır; bunların da %70-80'i kasa bağlı olmayan invazifken (Evre pTa-pT1) geri kalanı (Evre pT2-pT4) kas invaziftir. Kası tutmayan invazif tümörlerin yaklaşık %50-70'i nüksederek %10-30'u kas-invazif kansere ilerleme gösterecektir (1). Mesane kanserleri histopatolojik, morfolojik ve davranışsal olarak heterojendir. Benzer morfolojideki tümörler de farklı şekilde davrandıkları için mesane kanserinin akıbeti geniş çapta değişmektedir. Bu bağlamda sonucun doğru şekilde tahmin edilebilmesi ve hangi hastaların operasyon sonrası daha agresif müdahaleye ihtiyaç duyduğunun belirlenebilmesi için prognostik biyobelirteçler oldukça elzemdir (1,2).

Kaderinler, tümör oluşumu süresince hücre morfolojisinde, kontakt inhibisyonunda ve sinyal iletiminde önemli rol oynayan hücre adhezyonundan sorumlu hücre yüzey glikoprotein ailesidir (3). Kaderin süper ailesi; klasik kaderinleri, protokaderinleri (PCDHs) ve kaderin-ilişkili proteinleri içermektedir. Protokaderinler ise kümeleşmiş ve kümeleşmemiş PCDHs olarak iki gruba ayrılmaktadır (4). Kümeleşmemiş *PCDH* genleri sıklıkla üç kromozomal bölgede (4q28-31, 5q31-33 ve 13q21) lokalize olmaktadır. Kromozom 13'ün q21 bölgesinde olan ve pek çok tümörde genetik değişiklikleri sıklıkla gözlemlenen kümeleşmemiş protokaderinlerin (*PCDH8*, *PCDH9*, *PCDH17* ve *PCDH20*) tümör baskılayıcı gen adayları olabilecekleri rapor edilmiştir (5).

Epigenetik modifikasyon; DNA metilasyonu, histon modifikasyonları, kromatin yeniden modellenmesi ve RNA interferans gibi DNA dizisinde değişiklik olmadan gen transkripsiyonunu ve translasyonunu etkileyen modifikasyonlar olarak tanımlanır. DNA metilasyonu kromatin yapısını ve genin stabilitesini etkileyen yaygın bir epigenetik modifikasyon olup tümör baskılayıcı genlerin CpG adacıklarındaki atipik DNA promotor metilasyonu çoğu kanser türünde önemli bir rol oynamaktadır (6-7). Kanser araştırmalarında prognostik bir biyobelirteç olarak DNA metilasyonunun kullanılmasının birçok avantajı bulunmaktadır; genomik DNA, RNA ve proteinden daha stabildir, DNA metilasyonu kolaylıkla rutin klinik pratiğe uygulanabilecek metilasyona-spesifik PCR (MSP) gibi diğer yöntemlere göre nispeten daha az pahalı metotlarla çalışılabilir, minimal derecede invazif bir prosedürdür ve sadece doku örneklerinde değil kan, serum, idrar gibi vücut sıvılarında da belirlenebilir (8).

Çalışmamızda 3 protokaderin gen ailesi üyesinin (*PCDH8*, *PCDH10*, *PCDH17*) periferik kandan izole edilen DNA örneklerindeki promotor metilasyon profillerinin birarada analiz edilmesi amaçlanmıştır. Tüm kandan izole edilen DNA'ların olası epigenetik fonksiyonlarına dair çalışmalar literatürde nispeten birkaç çalışmayla son derece sınırlı olup bu konuda daha fazla çalışmaya duyulan ihtiyacı yansıtmaktadır. Çalışmamızda mesane tümürlü hastaların ve sağlıklı kontrol bireylerinin kanlarından izole edilen DNA örneklerinde bu üçlü epigenetik marker panelinin mesane kanserindeki olası etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Klinik Data

Üroloji kliniğine 2015-2017 tarihleri arasında başvuran transisyonel mesane tümürlü hastaların ve sağlıklı kontrol bireylerinin kan örnekleri toplanmış ve bu kan örneklerinden DNA izolasyonu yapılmıştır. Medikal

kayıtlardan klinik ve patolojik veriler ışığında hasta grubu (80 hasta: 40 düşük dereceli, 40 yüksek dereceli) oluşturulmuş ve herhangi bir tümör öyküsüne sahip olmayan 40 birey de sağlıklı kontrol grubu olarak seçilmiştir. Çalışma Helsinki Deklarasyonuna uygun şekilde ve yerel etik kuruldan gerekli onay alınarak gerçekleştirilmiştir (*İstanbul Medeniyet Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu, 23.05.2017-2017/0177*).

Kan Örneklerinden DNA İzolasyonu

Magnesia 16 model otomatik izolasyon robotu ve cihaza uygun periferik kandan DNA izolasyon kiti kullanılarak, 400 µl periferik kandan 100 µl DNA elde edilmiştir.

DNA'ların Bisülfid Modifikasyonu

DNA bisülfid modifikasyonu için EZ DNA Methylation-Gold™ Kit (ZymoResearch, ABD) kullanıldı. Bisülfid modifikasyonu, metillenmemiş sitozinler urasile dönüşürken metillenmiş sitozinler

değişmeden kalmaktadır. Dönüşüm gerçekleştirildikten sonra DNA'nın metilasyon profili metilasyona-özümlü PCR (MSP) veya DNA dizileme gibi tekniklerle belirlenebilir. EZ DNA Methylation-Gold™ Kitinde kullanılan DNA miktarımız ~ 500-1000 ng arasındadır. Modifiye edilen DNA'lar sonraki kullanım aşamaları için çok kısa süreli olarak (1 haftayı geçmeyecek şekilde) ≤ -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Metilasyona-Spesifik PCR

MSP işlemi için ZymoTaq™ DNA Polimeraz (ZymoResearch, ABD) kullanıldı (Hot-start özellikte bir Taq polimeraz türü). Hot-start polimerazlar diğer polimerazlardan farklı olarak primer dimeri ve spesifik olmayan ürün oluşumunu en aza indirmekte olup metilasyonun belirlenmesi amacıyla bisülfitle muamele edilmiş DNA'nın amplifikasyonu için spesifik olarak üretilmişlerdir. MSP-PCR reaksiyon koşulları (50 µl); 1x ZymoTaq Premix, 1 µM PCDH genlerine spesifik primerler (Tablo 1) ve 2 µl modifiye edilmiş DNA örnekleri kullanılarak gerçekleştirildi.

Tablo 1: PCDH genlerinin primer dizileri

Gen	Oligonükleotit dizisi	Referans
PCDH8	PCDH8-UM-F: 5'-GGT GGT TAT TGG TTA TTT GGT TT-3'	Zhang ve ark., 2017 (18)
	PCDH8-UM-R: 5'-CCA ACA AAC TCT AAA AAC ACA CA-3'	
	PCDH8-ME-F: 5'-CGG TTA TTG GTT ATT CGG TTC C-3'	
	PCDH8-ME-R: 5'-ACG AAC TCT AAA AAC GCG CG-3'	
PCDH10	PCDH10-UM-F: 5'-AGA GTT TTG TTT TGT TTT GTT T-3'	Miyamoto ve ark., 2005 (19)
	PCDH10-UM-R: 5'-CAC CCA CCA AAC TAC CA-3'	
	PCDH10-ME-F: 5'-AGT TTT GTT TCG TTT CGT TC-3'	
	PCDH10-ME-R: 5'-CCC ACC GAA CTA CCG-3'	
PCDH17	PCDH17-UM-F: 5'-AGA TTA TTG GGT GTT GTA GTT T-3'	Luo ve ark., 2014 (2)
	PCDH17-UM-R: 5'-AAC CCT AAC ACA ACA TAC ACA-3'	
	PCDH17-ME-F: 5'-GAT TAT CGG GTG TCG TAG TTC-3'	
	PCDH17-ME-R: 5'-CCC TAA CGC AAC GTA CGC G-3'	

UM: Metillenmemiş, ME: Metillenmiş

Isı döngüleyici reaksiyon koşulları ise şu şekildedir: 95°C 10 dk başlangıç denatürasyonu, 40 döngülük 95°C 30 sn denatürasyon, 40 sn annealing (Annealing sıcaklıkları: *PCDH8* için 60°C (metillenmemiş), 53°C (metillenmiş), *PCDH10* için 57.4°C (metillenmemiş&metillenmiş) ve *PCDH17* için 58°C (metillenmemiş&metillenmiş)), 72°C 1 dk ekstensiyon ve 72°C 7 dk final ekstensiyon. Bu MSP-reaksiyonları sonucu oluşan totalde 50 µl ampikonların yarısı EtBr ile boyanmış %2.5'luk agaroz jele yüklenilerek UV dökümantasyon sisteminde (SYNGENE Ingenius 3, England) 50 bç'lik marker DNA varlığında analiz edilmiştir. *PCDH8* için metillenmiş (M) ve metillenmemiş (U) bantları sırasıyla 94 bç ve 97 bç ampikon oluşumuyla sonuçlanmaktadır. *PCDH10* için metillenmiş (M) ve metillenmemiş (U) bantları sırasıyla 81 bç ve 85 bç ampikon oluşumuyla sonuçlanmaktadır. *PCDH17* için metillenmiş (M) ve metillenmemiş (U) bantları sırasıyla 87 bç ve 90 bç ampikon oluşumuyla sonuçlanmaktadır. Universal methylated human DNA standard (250 ng/µl) (Zymo research, Orange, CA, USA) metilasyonun pozitif kontrolü olarak ve su ise PCR reaksiyonlarının negatif kontrolü olarak kullanılmıştır. Çalışılan genlerin metilasyon durumu şu şekilde analiz edilmiştir: Amplifikasyon ürünleri sadece M primerleriyle veya hem M hem de U primerleri varlığında belirlendiyse (kısmi metilasyon durumu) gen metillenmiş olarak, amplifikasyon ürünleri sadece U primerleri varlığında belirlendiyse gen metillenmemiş kabul edilmiştir (Şekil 1).

İstatistiksel Analiz

Deneysel datanın istatistik analizi SPSS 22.0 programı kullanılarak araştırılmıştır. Protokaderin ailesi genlerinin metilasyon profillerinde hasta ve kontrol gruplarının arasındaki farklılıkları, metilasyon profilleri ve klinikopatolojik özellikler arasındaki ilişkiyi değerlendirmek için X² testi kullanılmıştır. $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR

Hastaların Demografik ve Klinikopatolojik Özellikleri

Çalışmada 80 mesane tümörlü hasta (40 düşük dereceli ve 40 yüksek dereceli) ve 40 sağlıklı kontrol bireyi yer almıştır. Hastaların yaş ortalaması 68.08 (minimum 40, maksimum 88) kontrollerin yaş ortalaması ise 43.38 (minimum 26, maksimum 73) olarak hesaplanmıştır.

PCDH8 Metilasyon Durumu

Araştırılan protokaderin genlerinin periferik kandan izole edilen DNA örneklerindeki durumu analiz edildiğinde; *PCDH8* metilasyonu düşük dereceli mesane tümörlü hastaların %17.5'inde, yüksek dereceli hastaların %20'sinde, kontrollerin ise %7.5'inde gözlenmiştir. *PCDH10* metilasyonu düşük dereceli hastaların %100'ünde, yüksek dereceli hastaların ve kontrollerin ise %95'inde gözlenmiştir. *PCDH17* metilasyonu ise düşük dereceli ve yüksek dereceli hastaların %100'ünde ve kontrollerin de %100'ünde gözlenmiştir.

PCDH10 ve *PCDH17* genleri açısından istatistik fark yaratabilecek değerler bulunmadığından hastalar ve kontrollerin metilasyon durumları arasındaki ilişki değerlendirmeleri hariç diğer ileri analizler bu 2 gen için yapılmamıştır. Diğer yandan, *PCDH8* genindeki durum daha ileri analizleri gerektirmektedir. Kontrollerdeki orana (%7.5) kıyasla gerek düşük dereceli (%17.5), gerekse yüksek dereceli (%20) tümörlerin metilasyon yüzdelerindeki nispeten önemli artış *PCDH8* geninin daha kapsamlı şekilde analiz edilmesine zemin oluşturmuştur (Tablo 2).

Düşük dereceli, yüksek dereceli tümörlere sahip bireylerin ve kontrol grubundaki bireylerin *PCDH8* geninde metile olma durumları arasındaki ilişki durumu ki-kare testi ile test edildi, ancak aralarında istatistiksel olarak önemli ilişki bulunamadı (Tablo 2). Klinikopatolojik özellikler ile *PCDH8* metilasyon durumu arasındaki ilişki araştırıldığında istatistiksel olarak önemli herhangi bir ilişki bulunmamıştır ($p > 0.05$). *PCDH8* geninin kandaki metilasyon

analizinde metillenme oranının (50 yaş ve üzeri bireylerde) *PCDH17* metilasyon durumu arttığı ispatlanmıştır (p=0.029) (Tablo 3).

PCDH10 Metilasyon Durumu

PCDH10 geninin kandaki metilasyon profilleri açısından hastalar ve kontroller açısından bir farklılık gözlenmedi (p>0.05). Gerek hastalarda gerekse kontrollerde kısmi metilasyon durumu gözlemlendi (Hem

M hem de U bantlarının birarada görüldüğü). Sadece 1 örnekte tam metilasyon gözlenmiştir (Sadece M bantı).

Düşük dereceli, yüksek dereceli olgu grubu ve kontrol grupları ile *PCDH17* genindeki metilasyon arasındaki ilişki durumu veri uygun olmadığı için ki-kare ile test edilemedi. Gerek hastalarda (2 örneğin tam metile olduğu durum hariç; sadece M bantı) gerekse kontrollerde kısmi metilasyon (Hem M hem de U bantlarının birarada görüldüğü) durumu gözlemlendi.

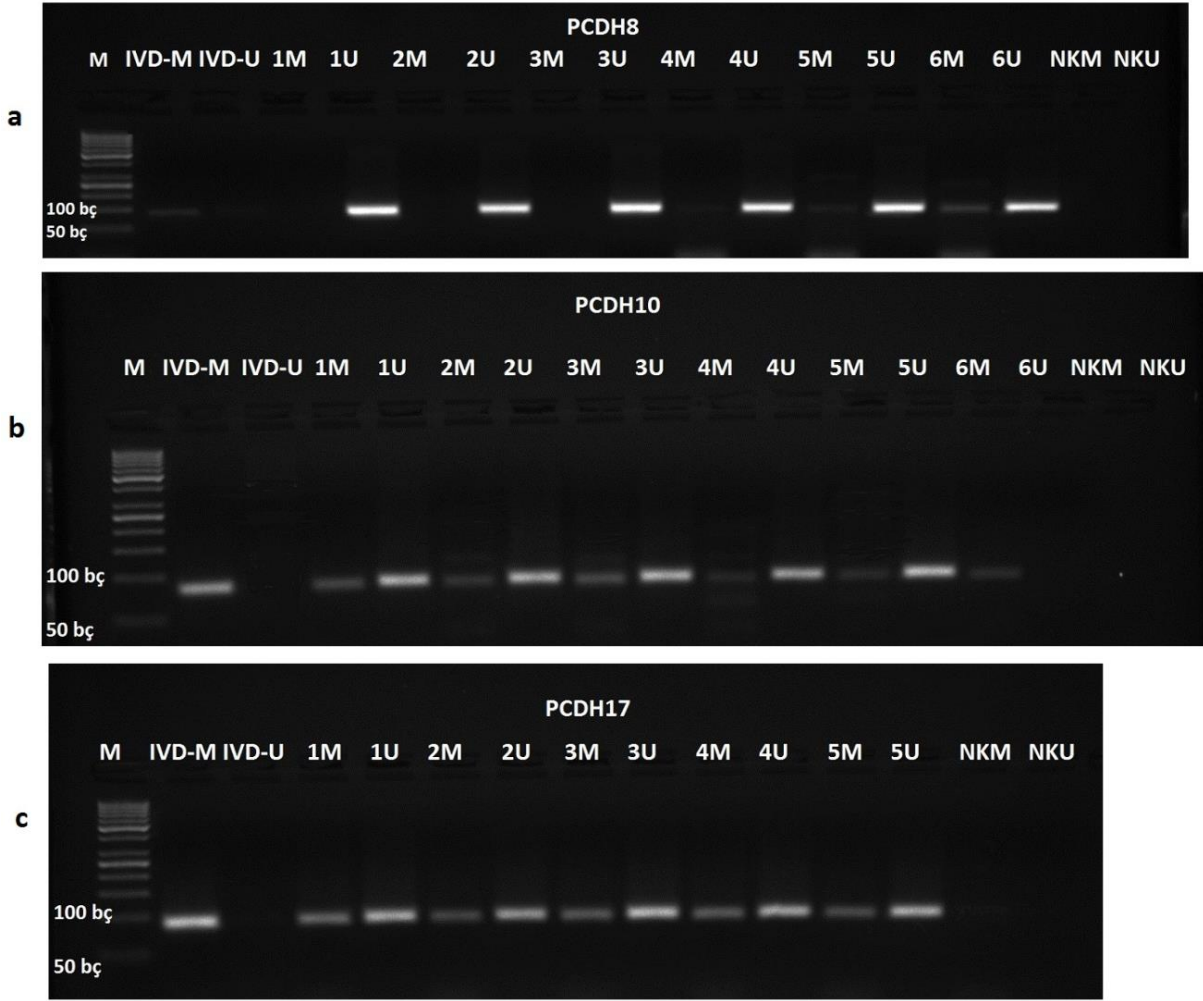
Tablo 2: *PCDH* genlerinin metilasyon dağılımları

Gen	Metile olma durumu	Derece			χ^2	P
		Düşük dereceli (%)	Yüksek dereceli (%)	Kontrol (%)		
<i>PCDH8</i>	(-)	33 (82,5)	32 (80)	37 (92,5)	2,745	0,253
	(+)	7 (17,5)	8 (20)	3 (7,5)		
	Toplam	40	40	40		
<i>PCDH10</i>	(-)	0 (0)	2 (5)	1 (2,5)	2,051	0,359
	(+)	40 (100)	38 (95)	39 (97,5)		
	Toplam	40	40	40		
<i>PCDH17</i>	(-)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	-	-
	(+)	40 (100)	40 (100)	40 (100)		
	Toplam	40	40	40		

(*) Metile olmayan kişi bulunmadığı için düşük dereceli, yüksek dereceli tümörler ve kontrol grupları ile *PCDH17* geninde metile olma durumları arasındaki ilişki istatistiksel olarak hesaplanamadı.

Tablo 3: *PCDH8* metilasyon durumu ve yaş ilişkisi

Değişkenler	n	Olgular		χ^2	P
		Metile değil (-)	Metile (+)		
Yaş					
<50	22(97,5)	22	0	4,754	0,029
≥50	98(2,5)	80	18		
Cinsiyet					
Erkek	102(83,8)	85	17	1,481	0,224
Kadın	18(16,2)	17	1		



Şekil 1: PCDH genlerinin metilasyon analizinin jel görüntüsü

M: Marker DNA (GeneRuler 50 bp DNA Ladder), IVD: Invitro metile DNA (Universal methylated human DNA standard), M: Metillenmiş, U: Metillenmemiş, NKM: Negatif kontrol metillenmiş, NKU: Negatif kontrol metillenmemiş

TARTIŞMA

PCDH8 geni 13 numaralı kromozomun q14.3 bölgesindedir ve embriyolarda gelişen hücresel yapıların oluşumunu ve polaritesini organize eden 6 kaderin tekrarına sahip bir adhezyon proteindir (3). *PCDH8* çeşitli insan malignansilerinde tümör baskılayıcı gen olarak fonksiyon göstermektedir (1). *PCDH8* promotor metilasyonunun tümör örneklerinde araştırıldığında çalışmada mesane kanserli hastaların %56.3'ünde klinikopatolojik verilerle de ilişkili olacak şekilde metilasyon gözlenmiştir (1). *PCDH10*

metilasyonunun araştırıldığı serum tabanlı çalışmalarda klinikopatolojik verilerle de ilişkili olacak şekilde prostat kanserli hastaların serumlarında *PCDH10* metilasyonu %51.5 olarak mesane kanserli hastaların serumlarından izole edilen DNA örneklerinde %50.4 olarak rapor edilmiştir (8-9). *PCDH17* geni insanda 13q21.2'de lokalize olup *PCDH17* promotoru DNA metilasyonuna duyarlı olabilen GC-zengin diziler içeren TATA-sız bir promotordür (2, 10). Costa ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada *PCDH17* hipermetilasyonu mesane tümörlerinin %48'inde, renal tümörlerin %61'inde ve prostat tümörlerinin %60'ında

belirlenmiştir (11). Başka bir çalışmada ise mesane tümör dokularındaki metilasyon oranı %67 olarak bildirilmiştir (10). Serum tabanlı bir metilasyon çalışmasında ise mesane kanserli hastaların %52.3'ünde *PCDH17* metilasyonu rapor edilmiş ve metilasyon klinikopatolojik verilerle ilişkili bulunmuştur (2).

Tümör dokularındaki gen promotör hipermetilasyonu ve global hipometilasyon birçok kanser tipinin gelişiminde rol oynayan yaygın olaylardır. Tümör dokularındaki bu değişikliklerin kan, idrar gibi vücut sıvılarında da gözlenmesi tümörlerin erken teşhisi kadar sonraki tedavi planlarında da önemli rol oynayabilecektir. İdrar/serum metilasyon profillerindeki değişiklikler çoğunlukla hemen her zaman tümör dokularındaki (dolaşımdaki tümör hücrelerini) metilasyon profillerini yansıtmakla beraber periferik kanda yapılan analizlerin hedefi genomda erken aşamalarda oluşabilecek değişikliklerin incelenerek tümör gelişimine ve progresyonuna potansiyel katkı sağlayabilecek konakçıdaki çeşitli epigenetik değişikliklerin araştırılmasıdır. Çalışmamızda olduğu gibi total kandan (periferik kan) izole edilen DNA örneklerindeki metilasyon profillerini belirlemeye yönelik çalışmalar oldukça sınırlı olup bu hususun daha fazla araştırılması gerekmektedir. Böylece genomda erken aşamalarda oluşan metilasyon değişikliklerinin kansere yol açma potansiyeli daha iyi değerlendirilebilecektir. Ayrıca epigenetik değişikliklerle çevresel faktörlerin etkileşimi gerçeği de dikkate alındığında artmış yaş, çevresel çeşitli mutajen ajanlara maruz kalma vs. gibi faktörlerin etkisi de genomda erken aşamalarda kendini gösterebilecektir. Nitekim promotör CpG adacıklarındaki metilasyonun yaşlanmayla ilişkisi çeşitli çalışmalarda gösterilmekle beraber aynı ilişki bizim çalışmamızda *PCDH8* geni açısından da bulunmuştur. Yine *PCDH8* geni açısından çalışmamızda istatistiksel olarak öneme ulaşmamakla beraber periferik kan DNA'sında kontrol bireyleriyle

hastalar arasındaki metilasyon farklılıkları daha ileri analizlerle daha net şekilde açıklığa kavuşturulabilir. Ancak *PCDH10* ve *PCDH17* genlerinin kısmi metilasyonunun hastalar kadar kontrol bireylerinde de gözlenmesi bu genlerin kan metilasyon profillerinin mesane kanseri gelişimini değerlendirmek açısından iyi belirteçler olmadığını göstermektedir.

Periferik kan metilasyonu temelli literatürde nispeten sınırlı çalışmalar mevcuttur. Miotto ve ark. kolorektal ve mide kanserinde yine bir kaderin geni olan *CDH4* metilasyonunu araştırıp sırasıyla %78 ve %95 oranlarını rapor etmişlerdir. Sağlıklı donörlerin periferik kanlarından izole edilen DNA örneklerinde ise metilasyon (0/17) belirlenmemiştir (12). Bu çalışma periferik kandan izole edilen DNA örneklerinin belirli genlerin metilasyonu açısından belirteç olarak rol oynayabileceğine ışık tutmaktadır. Hsiung ve ark. tam kandan izole ettikleri DNA örneklerindeki *LRE1* hipometilasyonunun baş ve boyun skuamöz hücre karsinoması açısından 1.6 kat artmış hastalık riskiyle ilişkili olduğunu belirtmişlerdir (13). Wong ve ark. erken yaş meme kanseri patolojisini değerlendirdikleri çalışmalarında periferik kandan izole edilen DNA örneklerindeki *BRCA1* promotör metilasyonunun 40 yaşından önce meme kanseri gelişimi için 3.5 kat artmış riskle ilişkili olduğunu belirtmişlerdir (14). Marsit ve ark. özellikle periferik kan olmak üzere hedef olmayan dokulardaki DNA metilasyon değişikliklerinin malignan hastalık riskini etkileyebileceği üzerinde durmuş, Human Methylation27 BeadArray kullanarak analiz ettikleri 460 periferik kan örneğinde mesane kanseri ve yaşlanmayla ilişkili CpG adacıklarında immün düzenlemeyle ve forkhead aile üyeleriyle ilişkili transkripsiyon faktörü bağlayıcı bölgelerinin zenginleştiğini belirterek periferik kan DNA'sının potansiyel epigenetik profilinin çıkarılmasının klinik potansiyeline değinmiştir (15). Brennan ve ark. periferik kandan izole edilen DNA örneklerindeki *ATM* geni metilasyon seviyelerinin meme kanseri gelişim

riski açısından bir marker olarak kullanılabileceğini belirtmiştir (16). Tahara ve ark. kontrol bireyleriyle karşılaştırıldığı zaman mide kanseri hastalarının total kanından izole edilen DNA örneklerinde *SFRP1* promotor metilasyonunun arttığını, ayrıca mide kanseri için artmış riskle ilişkili olmasa da analiz edilen diğer 8 gen lokusunun (içlerinde yine bir kaderin geni olan *CDH1* ve *CDH13* de yer almaktadır) metilasyonlarının ise artmış yaşla ilişkili olduğunu belirtmişlerdir (17). Analiz ettiğimiz *PCDH8* geni açısından benzer bir ilişki (yaşlanmayla beraber metilasyon yüzdesinin artması) bizim çalışmamızda da bulunmuştur.

Çalışmamızın çeşitli sınırlayıcı faktörleri mevcuttur; bunlardan biri nispeten küçük bir kohorttan oluşması ve bir diğeri ise teknik/ekonomik imkanlar nedeniyle tercih nedeni olan MS-PCR gibi metilasyonun varlığı/yokluğu temelli analiz yöntemi kullanılmasıdır. MS-PCR oldukça hassas bir yöntem olmakla beraber tümör dokularında, idrar ve serum gibi vücut sıvılarının metilasyon profilleri analizinde daha faydalı olabilir. Periferik kandaki metilasyon profili değişikliklerinin araştırıldığı çalışmalarda ise genellikle metilasyon değişikliklerinin var/yok şeklinde değil (nitekim vurgulandığı üzere yaşlanma sürecine ve çevresel çeşitli ajanlara maruz kalma sürecine bağlı olarak kısmi metilasyon profili genomda çoğu durumda oluşabilmektedir) MethyLight, Methylation Sensitive-Yüksek Resolution Melting (MS-HRM), Human Methylation27 BeadArray, bisüfit pirosekanslama metotlarıyla metilasyon yüzdelerinin değerlendirilmesiyle ifade edilmesi istatistiksel değerlendirme metotlarının potansiyelini artırarak daha kapsamlı analizlere ve daha hassas sonuçlara zemin oluşturabilir.

PCDH10 ve *PCDH17* periferik kan metilasyon profillerinin mesane kanseri risk değerlendirmesi açısından faydalı olamayacağını, *PCDH8* geninin metilasyonunun ise gerek yaşlanma süreciyle ilişkili olması gerekse istatistiksel olarak önemli bir ilişki yansıtmasa da kontroller/hastalar arasında gösterdiği

farklılıklar ve kontrollerde çok düşük yüzdeyle ve daha zayıf bantlar şeklinde gözlenmesi bu genle ilgili nispeten daha yüksek sayıda kohorttan oluşan ve daha hassas bir yöntemin kullanıldığı daha ileri analizlere duyulan ihtiyacı yansıtmaktadır.

Çıkar Çatışması: Yoktur.

Finansal Destek: Bu çalışma Sinop Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimince desteklenmiştir (Proje Numarası: SHMYO-1901-18-36, 2018).

Etik Kurul Onamı: İstanbul Medeniyet Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu, 23.05.2017-2017/0177.

KAYNAKLAR

1. Lin YL, Ma JH, Luo XL, Guan TY, Li ZG. Clinical significance of protokaderin-8 (PCDH8) promotor methylation in bladder cancer. J Int Med Res. 2013;41(1):48-54.
2. Luo ZG, Li ZG, Gui SL, Chi BJ, Ma JG. Protokaderin-17 promotor methylation in serum-derived DNA is associated with poor prognosis of bladder cancer. J Int Med Res. 2014;42(1):35-41.
3. Zhang D, Zhao W, Liao X, Bi T, Li H, Che X. Frequent silencing of protokaderin 8 by promotor methylation, a candidate tumor suppressor for human gastric cancer. Oncol Rep. 2012;28(5):1785-91.
4. Lin YL, Xie PG, Wang L, Ma JG. Aberrant methylation of protokaderin 17 and its clinical significance in patients with prostate cancer after radical prostatectomy. Med Sci Monit. 2014;20:1376-82.
5. Kim SY, Yasuda S, Tanaka H, Yamagata K, Kim H. Non-clustered protokaderin. Cell Adh Migr. 2011;5(2):97-105.
6. Danese E, Minicozzi AM, Benati M, Montagnana M, Paviati E, Salvagno GL et al. Epigenetic alteration: new insights moving from tissue to

- plasma-the example of PCDH10 promotor methylation in colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2013;109(3):807-13.
7. Qiu C, Bu X, Jiang Z. Protokaderin-10 acts as a tumor suppressor gene, and is frequently downregulated by promotor methylation in pancreatic cancer cells. *Oncol Rep*. 2016;36(1):383-9.
 8. Deng QK, Lei YG, Lin YL, Ma JG, Li WP. Prognostic value of protokaderin10 (PCDH10) methylation in serum of prostate cancer patients. *Med Sci Monit*. 2016;22:516-21.
 9. Lin YL, Li ZG, He ZK, Guan TY, Ma JG. Clinical and prognostic significance of protokaderin-10 (PCDH10) promotor methylation in bladder cancer. *J Int Med Res*. 2012;40(6):2117-23.
 10. Wang XB, Lin YL, Li ZG, Ma JH, Li J, Ma JG. Protokaderin 17 promotor methylation in tumour tissue from patients with bladder transitional cell carcinoma. *J Int Med Res*. 2014;42(2):292-9.
 11. Costa VL, Henrique R, Danielsen SA, Eknaes M, Patricio P, Morais A et al. TCF21 and PCDH17 methylation: An innovative panel of biomarkers for a simultaneous detection of urological cancers. *Epigenetics*. 2011;6(9):1120-30.
 12. Miotto E, Sabbioni S, Veronese A, Calin GA, Gullini S, Liboni A et al. Frequent aberrant methylation of the CDH4 gene promotor in human colorectal and gastric cancer. *Cancer Res*. 2004;64(22):8156-9.
 13. Hsiung DT, Marsit CJ, Houseman EA, Eddy K, Furniss CS, McClean MD et al. Global DNA Methylation Level in Whole Blood as a Biomarker in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2007;16(1).
 14. Wong EM, Southey MC, Fox SB, Brown MA, Dowty JG, Jenkins MA et al. Constitutional methylation of the BRCA1 promotor is specifically associated with BRCA1 mutation-associated pathology in early-onset breast cancer. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2011;4(1):23-33.
 15. Marsit CJ, Koestler DC, Christensen BC, Karagas MR, Houseman EA, Kelsey KT. DNA methylation array analysis identifies profiles of blood-derived DNA methylation associated with bladder cancer. *J Clin Oncol*. 2011;29(9):1133-9.
 16. Brennan K, Garcia-Closas M, Orr N, Fletcher O, Jones M, Ashworth A et al. Intragenic ATM methylation in peripheral blood DNA as a biomarker of breast cancer risk. *Cancer Res*. 2012;72(9):2304-13.
 17. Tahara T, Maegawa S, Chung W, Garriga J, Jelinek J, Estécio MR et al. Examination of whole blood DNA methylation as a potential risk marker for gastric cancer. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2013;6(10):1093-100.
 18. Zhang P, Wang H, Wang J, Liu Q, Wang Y, Feng F et al. Association between protocadherin8 promoter hypermethylation and the pathological status of prostate cancer. *Oncol Lett*. 2017;14(2):1657-64.
 19. Miyamoto K, Fukutomi T, Akashi-Tanaka S, Hasegawa T, Asahara T, Sugimura T et al. Identification of 20 Genes Aberrantly Methylated in Human Breast Cancers. *Int J Cancer*. 2005;116(3):407-14.