



# Mesane Ürotelyal Kanserlerinin Tanısal Prognostik Moleküler Özellikleri ve Yeni Tedavi Yaklaşımları

## Diagnostic and Prognostic Molecular Features of Urothelial Bladder Cancer and New Treatment Approaches

Dr. Zafer Küçükodacı<sup>1</sup>, Dr. Kutsal Yörükoğlu<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Haydarpaşa Eğitim Hastanesi, Patoloji Kliniği, İstanbul, Türkiye

<sup>2</sup>Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

### Öz

Kanser genetiği ve genomu konusunda bilgilerin artması ile kanserlerin tedavisinde önemli gelişmeler olmaktadır. Meme, kolon, akciğer kanseri gibi bazı tümörlerde moleküler tanı, tedavinin önemli bir parçasını oluşturmaktadır. Ancak ürolojik kanserlerde moleküler belirteçler tanı/tedavi algoritmalarında henüz yer bulamamıştır. Mesane kanseri tedavisinde Her2, epidermal büyüme faktörü reseptörü, fibroblast büyüme faktörü reseptörü, mTOR ve diğerlerinin etkin olabileceğine dair bulgular elde edilmektedir. Bu derlemede önce mesane kanserinin moleküler patogenezi üzerinde durulacak, bunların prognostik değeri incelenecek, tanıda kullanılan moleküler tümör belirteçleri aktarılacak ve moleküler biyobelirteçlerin tedavide nerede ve nasıl kullanılabileceği, bugüne kadar yapılan çalışmalar eşliğinde aktarılacaktır.

**Anahtar Kelimeler:** Biyobelirteç, mesane kanseri, kişiselleştirilmiş tedavi, hedefe yönelik tedavi, ürotelyal kanser

### Summary

As a result of improvement of the knowledge about cancer genetics and genomics, substantial developments have occurred in the clinical management of cancers. Molecular diagnosis and therapies targeted at altered genetic pathways are important stages of breast, colon, lung and other cancers. However, this progress is not effective in urologic malignancies as well. Recent studies suggest that Her2, epidermal growth factor receptor, fibroblast growth factor receptor, mTOR and others may have clinical benefits in urinary bladder cancers. In this article, recent developments in molecular pathogenesis of bladder cancer, prognostic significance of molecular mechanisms, molecular tumor markers, and the role of molecular biomarkers reviewed.

**Keywords:** Biomarkers, bladder cancer, personalized medicine, targeted therapy, urothelial cancer

### Giriş

İnsan genom projesinin tamamlanmasından sonra pek çok kanserin temelinde yatan moleküler mekanizmaların aydınlatılmaya başlaması hastaların tanı, tedavi ve klinik takiplerinde moleküler testlerin giderek artan oranlarda kullanımını getirmiştir.

Günümüzde moleküler uygulamalar meme, kolon ve akciğer gibi çeşitli solid tümörlerin tedavi algoritmasının ayrılmaz bir parçasıdır. Ürolojik malignitelere ise klinik olarak ihtiyaç duyulan ve hedefe yönelik ajanlara duyarlılığı ya da daha agresif tedavi gerekliliğini belirleyen moleküler prognostik belirteçler henüz bulunmamaktadır. Ancak tanı, prognoz ve hedefe yönelik tedaviler için çeşitli biyobelirteçler araştırılmaktadır (1).

Birçok kanser tipi için neoplastik transformasyonu gösteren pek çok moleküler mekanizma ortaya konmuştur. Ancak bu moleküler mekanizmaların tamamı iki ana değişiklik ile oluşur. Bunlar genetik ve epigenetik değişikliklerdir.

Onkogenез sırasında DNA'da yalnızca nükleotid diziliminde değişiklikler olmadığı (nokta mutasyonu, delesyon ve insersiyonlar gibi) DNA düzeyinde bazı kimyasal modifikasyonların da gen ekspresyonunu etkilediği anlaşılmıştır. Özellikle DNA metilasyonu ve kromatinin yapısında bulunan histon proteinlerinin modifikasyonu malign transformasyonda önemli rol oynamaktadır.

Hücrenin genetik materyalindeki değişiklikler yani mutasyonlar bir gende sadece bir harf değişikliği kadar küçük olabileceği gibi, bir kromozomun delesyonu gibi çok daha büyük bir alanı da etkileyebilir. Gen mutasyonları büyük bir DNA segmentinde ya da tek bir kodonda nokta mutasyonları şeklinde olabilirken kromozom mutasyonları kromozomun yapısındaki değişikliğe ya da kromozomun kaybına bağlı olabilir.

Fizyolojik koşullarda hücre proliferasyonu gerçekleşirken, büyüme faktörleri, hormonlar ya da sitokinler spesifik reseptörlerine bağlanır. Bir büyüme faktörü intrinsik tirozin kinaz

aktivitesine sahip reseptörüne bağlandığında, reseptörün geçici ve sınırlı aktivasyonu plazma membranının iç yaprağındaki birçok sinyal iletilici proteini aktive eder. Böylece uyarı sitozolden nükleusa taşınmış olur. DNA transkripsiyonunu başlatan nükleer düzenleyici faktörlerin uyarılması ve aktivasyonu meydana gelir (2). Bundan sonra da hücre, hücre siklusuna girer, ilerler ve hücre bölünmesi meydana gelir. İşte bu fizyolojik basamaklarda görevli proteinleri ya da bunların fonksiyonunu kontrol eden proteinleri kodlayan genlerde meydana gelen mutasyonlar neoplastik süreçten büyük oranda sorumludur.

Hücrenin kontrollü büyümesinin düzenlenmesinde görev alan büyüme faktörleri, büyüme faktör reseptörleri, transkripsiyon faktörleri ve apoptotik düzenleyiciler protoonkogenlerdir. Protoonkogenler mutasyon, kromozomal yeniden düzenlenme, gen amplifikasyonu gibi moleküler değişiklikler sonucu onkogenlere dönüşürler. Tümör süpresör genler protoonkogenler ile denge içinde olan ve bozulmuş hücre döngüsünün devamını engelleyerek hücre çoğalmasını kontrol altında tutan genlerdir. Proliferasyonu doğrudan baskılayan tümör süpresör genlere "bekçi" (gatekeeper) tipi genler denmektedir. Hücre çoğalmasını doğrudan baskılayan bekçi tipi tümör süpresör genlerden başka, dolaylı etki gösterenler de vardır. Bunlara da "bakıcı" (caretaker) tipi tümör süpresör genleri denir. Bakıcılar genomun bütünlüğünden sorumlu DNA tamir genleridir ve mutasyon oluşumunu engellerler. Bunların kendileri işlev kaybettirici bir mutasyona uğradığında, genom boyunca mutasyonlar ortaya çıkmaya başlar, yani genomik instabilite gelişir. Genomik instabilite bekçi tipi tümör süpresör genleri ve protoonkogenlerin mutasyona uğramasıyla sonuçlanabilir.

DNA dizisinde değişiklik olmadan gen ekspresyonunun değişikliğe uğramasına epigenetik değişiklik denir. Kromozom ya da gen düzeyinde olan mutasyonlar genlerin değişikliğe uğramasında tek etken değildir. Yani onkogeneze DNA nükleotid dizilimindeki genetik değişiklikler ile DNA dizi değişikliğine yol açmadan gen ifadesini değiştiren kromatin konformasyon değişiklikleri, histon değişiklikleri ve DNA metillenmesi gibi epigenetik değişiklikler birlikte sorumludur (3,4,5).

Son yıllarda protein kodlayan yapısal genler üzerinde yoğunlaşan çalışmalar insan genomunda çok miktarda protein kodlamayan genlerin varlığını ortaya çıkarmıştır. Bu genlerin ürünleri regülatör fonksiyonlarda önemli rol oynar. Bu genler üzerinde yapılan son çalışmalar, bunların mikroRNA'lar (miRNA) denen protein kodlamayan ve aslında gen ekspresyonunu inhibe eden küçük RNA moleküllerini kodladıklarını göstermiştir. miRNA ile gen ekspresyonunun susturulmasının tüm yaşayan canlılarda korunmuş olması bu durumun gen regülasyonunda temel mekanizma olduğunun göstergesidir. İnsan genomundaki genlerin yaklaşık üçte birinin miRNA'ların hedefi olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle normal gelişimsel yollar ve kanser gibi patolojik olayların anlaşılmasında merkezi öneme sahiptirler (6,7).

miRNA'lar, sayıları bini geçen, 21-23 nükleotid uzunluğunda tek iplikli RNA molekülleridir. Hücre çekirdeğinde ve stoplazmasında bir takım enzimler tarafından kesilerek oluşan olgun miRNA'lar, hedef mRNA'lara bağlanarak translasyonu doğrudan engellemeyi başarmaktadır (8). miRNA'ların onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerin yanı sıra apoptozu ve hücre

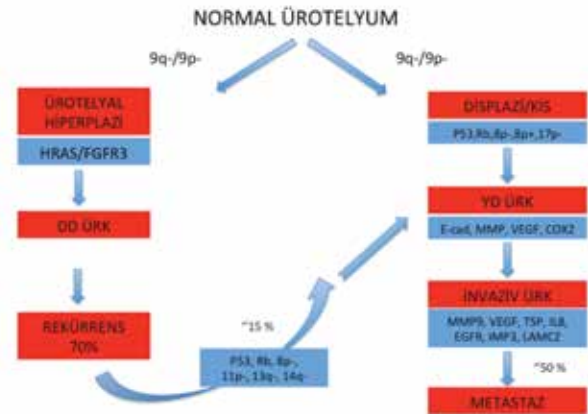
çoğalmasını tetikleyen genlerin ekspresyonunda değişikliğe neden olarak, kanser oluşumunda rol oynadıkları bildirilmiştir (9). Bu durum miRNA'ların bir kısmının tümör baskılayıcı gen özelliğine sahip iken, diğer bir bölümünün ise onkogen olarak hareket ettiğini göstermektedir. Farklı hücre tiplerinde farklı miRNA'lar bulunmaktadır ve farklı kanser türlerinin kendilerine özgü miRNA ekspresyon profilleri olduğu görülmektedir. Genel olarak tümör dokusunda miRNA ekspresyon profilinin tümörün tipi ve farklılaşması ile ilişki gösterdiği bulunmuştur (10).

## Ürotelyal Kanser Onkogenezinde Moleküler Yollar

Mesanein ürotelyal karsinomları (ÜRK) klinik davranışları, prognozları, tedavileri ve buna paralel olarak onkogenetik mekanizmaları birbirinden farklı 2 ayrı gruba ayrılabilir.

İlk grup olan çoğu düşük dereceli, kasa invaziv olmayan ÜRK'nın (pTa, pT1) büyük çoğunluğu transuretral rezeksiyon (TUR) sonrası nüks ederken, ufak bir bölümü yüksek dereceli daha invaziv agresif tümörlere progresyon gösterir. Bu tümörlerde tedavinin temelini intravezikal kemoterapi ve immün tedavinin Bacillus Calmette-Guérin'in (BCG) de eklenebildiği TUR oluşturur (11). Tüm ÜRK'nın %20-30'unu oluşturan ikinci grupta ise kasa invaziv yüksek dereceli tümörler bulunur. Bu grup tümörlerin büyük çoğunluğu de novo gelişirken yaklaşık %15'inin yüzeysel ÜRK'lardan progresse olduğu düşünülmektedir. Kasa invaziv yüksek dereceli ÜRK'larda sistektomi ve kemoterapi gibi kombine agresif tedaviler kullanılmasına rağmen tümörlerin yaklaşık yarısında metastaz gelişmektedir (12,13).

Mesanein biyolojik ve klinik fenotipik özellikleri farklı olan kasa invaziv ÜRK (Kİ-ÜRK) ile kas invazyonu olmayan yüzeysel tümörlerinin (KİO-ÜRK) 2 ayrı patogenetik yolak ile geliştiğine dair artan oranda moleküler ve genetik delil bulunmaktadır (Resim 1). KİO-ÜRK'lar benign ürotelyumdan gelişen ürotelyal hiperplaziden köken almaktadır. Kİ-ÜRK'ların çoğunluğu ürotelyal displaziden köken alır ve düz karsinoma in situ (KİS) ve yüksek dereceli non-invaziv lezyonlar üzerinden progresse olur. Daha az bir kısmı ise yüzeysel lezyonların yüksek dereceli non-invaziv lezyonlar üzerinden Kİ-ÜRK'lara progresse olması ile oluşur (1,11). Bu progresyon için gerekli genetik değişikliklerin birikiminde genetik instabilite anahtar rol oynar (12,13).



Resim 1. Ürotelyal karsinomlarda moleküler patogenetik model (1) ÜRK: Ürotelyal karsinom

Her iki fenotipik grupta da mesane kanserlerinin gelişiminde rol oynadığı düşünülen önemli sayıda genetik değişiklik vardır. Yüzeysel ÜRK patogenezinde FGFR3, HRAS (14) ve PIK3CA gibi protoonkogenlerdeki mutasyonlar ön plandadır (15,16,17). Kasa invaziv ÜRK'ların gelişiminde ise TP53, p16 ve RB gibi tümör süpresör genlerdeki değişiklikler primer sorumludur (12,13,18). Ayrıca KİO-ÜRK'ların bazılarının daha yüksek dereceli ve Kİ-ÜRK'lara progresyonunda da TP53 ve RB genlerindeki değişiklikler sorumludur (19).

Mesanenin ürotelyal kanserlerinde kromozomal düzeyde görülen mutasyonlar sayısal ve yapısal kromozomal anomaliler şeklinde olur. Sayısal kromozom anomalileri, en sık olarak 1., 8., 9., 10., 11., 13. ve 14. kromozomlarda saptanmıştır (20). Ayrıca kromozomlar üzerindeki gen loküslerinde translokasyon, insersiyon, delesyon gibi düzenlenmelerle DNA kopya sayısında değişikliğe yol açan yapısal kromozomal değişiklikler de ÜRK'larda sık olarak görülür (21).

Mesane kanserlerinde en önemli kromozomal değişiklikler kromozom 9'da meydana gelen değişikliklerdir. Bu değişiklikler erken evre mesane kanserinde %60 oranında saptanmıştır (22). Kromozom 9'da gözlenen kayıpların, hiperplastik ve displastik ürotelyal epitelde de tespit edilmiş olması kromozom 9'un kısa ve uzun kolunda görülen delesyonların ürotelyal karsinogeneze erken evre değişiklik olduğunu göstermiştir (23). Kromozom 9 değişiklikleri her iki fenotipik grup ÜRK'da da ortaktır ve bu değişikliklerin, sonraki genetik değişikliklere ortam hazırlayan genetik instabiliteyi sağladığı düşünülmektedir (1). Bu durum kromozom 9 üzerinde bulunduğu düşünülen tümör baskılayıcı genlerdeki değişikliklerin sonucudur. Bu genlerin her iki allelinde ortaya çıkan kayıpların heterozigozite kaybına (loss of heterozygosity=LOH) neden olarak tümör baskılayıcı proteinlerin üretiminde durmaya neden oldukları düşünülmektedir (23,24,25).

Dokuzuncu kromozomun hem uzun hem de kısa kolundaki delesyonlar ÜRK ile ilişkilidir. Tübero skleroz 1 (TSK1), patched homologue 1 (PTCH1) ve deleted in bladder cancer gene 1 (DBC1) genleri kromozom 9'un uzun kolunda bulunan tümör süpresör genlerdir (25). TSK1 geni 9q34 de yer alıp hamartin isimli proteini kodlar. ÜRK'larda 9q34 bölgesinde

çok sayıda mutasyonlar olduğu ve sıklıkla da bu bölgede delesyon bulunduğu saptanmıştır (26). Kromozom 9q üzerinde bulunan bu mutasyonların %90'ının tübero skleroz olgularında bulunmayan ve ÜRK'ya spesifik yeni mutasyonlar olduğu görülmektedir (27). PTCH1 geni 9q22 lokalizasyonunda bulunmakta ve mutasyonları Gorlin sendromuna neden olur (28). Özellikle 9q22.3 loküsündeki delesyonların, derinin bazal hücreli karsinomları dışında ÜRK gelişimi için de önemli olduğu gösterilmiştir (25). Dokuzuncu kromozom uzun kolunda bulunan ve ÜRK ile ilişkilendirilen bir diğer tümör süpresör gen ise DBC1 genidir. Bu gen 9q32-33'de lokalize olup, fonksiyonu tam olarak bilinmemekle birlikte, hücre büyümesinin düzenlenmesinde ve apoptoz dışındaki hücre ölümünün programlanmasında görevli olduğu düşünülmektedir (29). Bu gen bölgesinin delesyonunun (30) ve bu bölgedeki epigenetik değişikliklerin ÜRK'larda sık ortaya çıktığı gösterilmiştir (31). Kromozom 9 kısa kolunda bulunan iki tümör süpresör gen de ÜRK gelişiminde sorumludur. Bunlar 9p21 bulunan cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (siklin bağımlı kinaz inhibitörleri) (CDKN2A) ve CDKN2B genleridir. Bu genlerin homozigot delesyon ile inaktive olmaları ile hücre siklusunda negatif düzenleyiciler olarak görev alıp hücre döngüsünü kontrol eden p16 ve p15 proteinlerinin sentezi bozulmaktadır (32).

ÜRK'larda comparative genomic hybridization (karşılaştırmalı genomik hibridizasyon) (CGH) analizlerinde 9. kromozom değişiklikleri dışında pek çok kromozomda kazanımlar ve delesyonlar gösterilmiştir (33,34,35). Kromozom ya da kromozom bölümlerinin kayıpları ya da tam tersi sayıca artış göstermeleri üzerinde taşıdıkları genlerin özelliklerine göre ÜRK'nın değişik aşamaları ile ilişki göstermektedir (Tablo 1) (36). Söz konusu bölümlerde yer alan hangi genlerin ya da genomik düzenleyicilerin mesane kanserine ilişkin olarak ne şekilde etki gösterdikleri ise bundan sonra yapılacak araştırmaların sonucunda ortaya çıkacaktır. Şu an için potansiyel tanısallık değerlerinden dolayı 9p21 lokusunun delesyonu ile 3. ve 17. kromozomun uzun kolları ve 7. kromozomun kısa kolunun kazanımı özellikli olanlardır.

Tablo 1. Ürotelyal karsinomlarda kromozom bozuklukları ve klinik karşılıkları (36)	
Klinikopatolojik anlam	Kopya sayısı değişiklikleri
Daha yüksek histolojik derece	2q33.3-q37.3, 4p15.2-q13.1 ve 5q13.3-q35.3 kayıpları 7p11.2-q11.23 ve 20q13.12-q13.2'de ortaya çıkan kazanımları
Daha derin invazyon	7p21.2-p21.12 kazanımları
Lenfatik tutulum	6q14.1-q27 ve 17p13.3-q11.1 kayıpları 19q13.12-q13.2 ve 20q13.12-q13.33 kazanımları
Vasküler invazyon	16p12.2-p12.1 kayıpları 3q26.32-q29 kazanımları
Agresif papiller olmayan ürotelyal karsinom gelişmesi	5q14.1-q23.1, 6q14.1-q27, 8p22-p21.3, 11q13.5-q14.1 ve 15q11.2-q22.2 kayıpları 7p11.2-q11.22 ve 19q13.12-q13.2 kazanımları
Tümör nüksleri	1p32.2-p31.3, 10q11.23-q21.1 ve 15q21.3 kayıpları

ÜRK'nin gelişiminde, kromozomal değişiklikler dışında DNA diziliminde değişikliklere yol açan mutasyonlar da, ilgili genlerin kodladığı proteinleri artırarak ya da azaltarak rol oynarlar. ÜRK'larda tirozin kinaz reseptörü (TKR)-RAS-RAF, fosfoinozitol 3-kinaz (PI3K)/AKT/mTOR yolaklarından birinde ve/veya TP53 ve RB1 gibi G1-S hücre siklus devamlılığında görevli genlerinden bir tanesinde mutlaka mutasyon olduğu bildirilmiştir (37). TKR-RAS yolağı, hücre yüzeyinden nükleusa mitojenik sinyaller ileterek hücrelerin çoğalmasından sorumludur. Bu sinyal yolağının ÜRK'larda sıklıkla aktive olduğu gösterilmiştir (38). Ürotelyal neoplazilerde kontrolsüz hücre proliferasyonundan büyük ölçüde RAS-mitogen aktive eden protein kinaz (MAPK) ve PI3K-AKT sinyal ileti yolaklarındaki değişiklikler sorumludur. RAS protoonkogenini aktive eden mutasyonlar MAPK ve PI3K yolaklarını aktive eder. TKR olan fibroblast büyüme faktör reseptörü 3 (FGFR3) mutasyonları sıklıkla PIK3CA mutasyonları ile birlikte olurken, RAS mutasyonunu daima dışlar (mutually exclusive) (17). Yüzeysel ÜRK'ların gelişiminde sorumlu en önemli gen mutasyonları HRAS ve FGFR3 de görülen mutasyonlardır. FGFR3 tirozin kinaz reseptör gen ailesinin 4 üyesinden biridir ve 4p16.3 de lokalizedir. FGFR3 mutasyonları reseptörün artmış ve uzamış aktivasyonuna neden olarak MAPK veya PI3K-AKT yolağını tetiklemektedir (39). KİO-ÜRK'ların %70'den fazlasında saptanan FGFR3 mutasyonlarına Kİ-ÜRK'ların küçük bir kısmında rastlanır (13,40,41,42). Hücrenel transforme edici onkogenler ailesinden olan RAS geninde meydana gelen mutasyonlar yüzeysel ÜRK'lardaki bir diğer önemli genetik değişikliklerdir (43). RAS gen ailesinden KRAS ve NRAS mutasyonları pek çok kanserde görülse de ÜRK'lar için bu aileden yalnızca HRAS önem arz etmektedir (44,45). HRAS geninin 12., 13., 59. ve 61. kodonlarında oluşan mutasyonlar, ürotelyal kanserlerde %30-40 oranında görülmektedir (25,46,47,48). Bu mutasyonlar sonucunda genin ürününün aşırı üretimi meydana gelmekte ve hücre çoğalması hızlanmaktadır. Kİ-ÜRK'ların moleküler yolağında ise hücre siklus kontrolünden sorumlu olan TP53, p16 ve RB gibi tümör süpresör genlerdeki mutasyonlar primer sorumludur (12,49,50). Bir tümör süpresör gen olan ve 17p13.1 de yer alan TP53 geni hücre siklusunda G1/S geçişinde anahtar rol oynayan DNA tamirini ve apoptozu düzenleyen bir protein kodlar (13). TP53 gen mutasyonları ÜRK'lar da dahil olmak üzere pek çok kanserin onkogenezinde sorumludur(51). Ürotelyal epitelde görülen TP53 mutasyonlarının agresif fenotip ile ilişkili olduğuna dair klinikopatolojik kanıtlar mevcuttur (52). RB geni 13q14 de lokalizedir ve negatif hücre siklus regülatörü olarak fonksiyon gösteren bir nükleer fosfoprotein kodlar. RB gen mutasyonları TP53 mutasyonlarına benzer şekilde hücre döngüsü kontrolünün kaybı ile sonuçlanır. RB lokusunda heterozigozite kaybı RB protein ekspresyonunda azalmaya yol açar ve bu durum Kİ-ÜRK'larla oldukça koreledir (44,53,54). Yaygın yüksek dereceli KİS lezyonlar oluşumunda ve bunların Kİ-ÜRK'da progrese olmasında TP53 ve RB'nin sinerjistik etkisi olduğu gösterilmiştir (55). Düşük ve yüksek dereceli ÜRK'ların yaklaşık %60'ında UTX, MLL-MLL3, CREBBP-EP300, NCOR1, ARID1A ve CHD6 gibi kromatin yapılanmasında görevli genlerde de değişiklikler saptanmıştır (56). DNA replikasyonu sonrasında kardeş kromatidlerin birleşmesi için gerekli bir proteini kodlayan STAG2 geninde de yüzeysel ÜRK'ların %36'sında Kİ-ÜRK'ların %16'sında mutasyon saptanmıştır (57).

ÜRK'larda sık görülen ve erken dönemde ortaya çıkan değişikliklerden bir diğeri de miRNA ekspresyon profillerindedir (58). ÜRK'larda miRNA ekspresyon değişiklikleri ilk kez 2007 yılında 10 miRNA'nın ekspresyonunda artış (up-regülasyon) şeklinde bildirilmiştir (59). ÜRK'larda miRNA ekspresyon profillerini gösteren birkaç geniş çaplı çalışma mevcuttur. Normal ürotelyum, kanser ve hastalığın farklı evrelerinin karşılaştırıldığı çalışmada 290 miRNA arasından normal dokuya göre kanserde ekspresyonu en fazla artan miRNA tipi mir-145, ekspresyonu en düşük olan ise miR-21 bulunmuştur (60). Yüzeysel ve kasa invaziv ÜRK'da patogeneze sorumlu olduğu düşünülen miRNA'lar ve değişiklikleri farklı iken, miR-153b değişiklikleri ÜRK'nin her iki yolağında ortaktır. KİO-ÜRK'larda pek çok miRNA'nın ekspresyonunda azalmaya (down-regülasyon) rastlanırken, Kİ-ÜRK'larda ekspresyonda artış çoğunluktadır (61). Yüzeysel tümörlerde miR-99a/100 ekspresyon azalışının FGFR3 deki mutasyonlardan önce meydana geldiği ve bu molekülde artışa yol açtıkları gösterilmiştir. Kasa invaziv yüksek dereceli tümörlerde ise muhtemelen TP53 üzerinde etkisi olan miR-21'deki ekspresyon artışı dikkat çekicidir (58,61). Son yıllarda yapılan çalışmalar, ÜRK'da kromozom ve gen düzeyindeki değişiklikler dışında epigenetik değişikliklerin de onkogeneze etkili olduğunu göstermiştir. Mesane kanserlerinde sıklıkla promotör hipermetilasyonu şeklinde olan DNA metilasyonu en önemli epigenetik değişiklik mekanizmasıdır (62,63). Promoter hipermetilasyonu genellikle tümör süpresör genlerin transkripsiyonel inaktivasyonuna yol açarak onkogeneze rol oynar (64). CDKN2A geninin kodladığı iki protein olan p14 ve p16 G1 fazından S fazına geçişte frenleyici etkiye sahiptir. Bu gendeki heterozigozite kaybı, delesyon ve nokta mutasyonları gibi genetik değişiklikler dışında promotör hipermetilasyonu ile de bu proteinler etkisiz hale gelir (65). Cadherin-1 (E-cadherin), CDH1 geni tarafından kodlanan bir adezyon molekülüdür. Genin hipermetilasyonu ile E-cadherin inaktive olmakta ve hücrelerarası adezyon sistemi bozulmaktadır (66). Glutamat S Transferaz Pi (GSTP1) geni potansiyel karsinogenlerin detoksifikasyonu ve konjugasyonunda görev alan GSTπ enzimini kodlar. GSTP1'in hipermetilasyon sonucu inaktive olması, karsinogenlere karşı hassasiyeti artırır ve yeni DNA hasar ve mutasyonlarının gelişimine neden olur (67). GSTP1 hipermetilasyonu, mesane kanserlerinin %10-60'ında ortaya çıkan bir durumdur (68). Mesane tümörlerinin genetik değişiklikler açısından belirgin farklılıklar izlenen 2 moleküler yolağında epigenetik değişiklikler de farklıdır (69). Yüzeysel tümörlerde sıklıkla hipometilasyonlar dikkat çekerken promotör hipermetilasyonları invaziv tümör yolağı için daha tipiktir (70). RASSF1A ve RARB tümör süpresör genlerinin promotör hipermetilasyonu yüksek evre ve yüksek derece ile ilişkili iken, SFRP1 yüksek evre ile, SFRP5 ise yüksek derece ile ilişkilidir (64). Mesane kanserlerinde promotör hipermetilasyonu ile inaktive olduğu bilinen diğer tümör süpresör genlerden bazıları CDH1, CDH13, APC, ARF, MLH1 ve DAPK'dır (69).

## Tanı

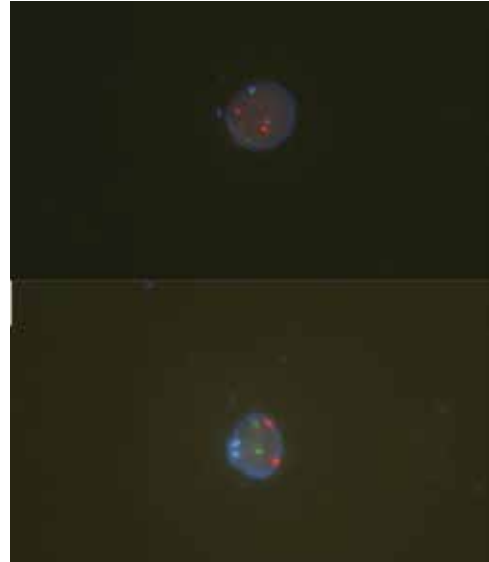
Mesane tümörlerinin büyük çoğunluğunu tanı esnasında kasa invaze olmayan yüksek veya düşük dereceli ÜRK'lar oluşturmaktadır. Bu tümörler tedaviye iyi yanıt vermelerine karşın, yineleme oranları oldukça yüksektir. Bu nedenle, bu hastalığın yakın ve doğru takibi tedavi ve ilerlemeyi engellemek

açısından çok önemlidir. Bu olgular, sık nüks ettiklerinden dolayı kanser tedavisinde maliyeti en yüksek olan grubu oluşturmaktadır (71,72). Mesane tümörü tanısında sistoskopi altın standarttır. İdrar sitolojisi tanıda yardımcı olmakla birlikte özellikle düşük dereceli tümörlerdeki düşük duyarlılığı nedeniyle sistoskopinin yerini alamamıştır. Bu nedenle, bu hastalarda sistoskopi sayısını ve maliyeti azaltmak için invaziv olmayan tanı yöntemlerine ya da biyobelirteçlere ihtiyaç duyulmaktadır. Mesane kanseri tanısını koyabilmek için, idrarda ölçülebilen, yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip, basit, hızlı sonuç alınabilen, düşük değişkenlik gösteren ideal belirteçleri bulmak için moleküler mekanizmalar kullanılarak çok sayıda ürün ortaya çıkmıştır (73,74).

Bunlardan bir kısmı idrarda çözünebilir tümör ürünlerini tespit etmeye yönelik iken, diğerleri idrara dökülen tümör hücrelerindeki moleküler değişiklikleri saptamaya yöneliktir (Tablo 2).

*UroVysion*, hematürisi olan ve mesane kanseri olduğundan şüphelenilen hastaların idrarında floresan in situ hibridizasyon (FISH) yöntemi ile 9p21 lokus kaybı ve 3., 7. ve 17. kromozomlardaki anöploidiyi tespit etmek için geliştirilmiş bir yöntemdir. Bu testin hem mesane tümürlü hastaların takibinde hem de hematürisi olan hastalarda mesane tümörünün tespitinde kullanımı Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration=FDA) tarafından onaylanmıştır. Özgüllüğü düşük olmasına karşılık intrakaviter tedavilerden etkilenmemesi ve idrar yanı sıra yıkama sıvılarında da çalışabilmesi üstün yönleridir. *UroVysion* çok hedefli bir FISH testidir. *UroVysion* kiti 3., 7., 9. ve 17. kromozomlardaki spesifik bölgelere hibridize olan farklı renkte floresan işaretli 4 farklı DNA probunun karışımından oluşmaktadır. Bu 4 probdan kromozom sayım probu (chromosome enumeration probe=CEP) olup sentromerik bölgeyle hibridize olurken, bir tanesi spesifik lokus tanımlayıcı (locus specific identifier=LSI) probdur ve 9p21'de bulunan p16 genine hibridize olur. CEP 3 kırmızı, CEP 7 yeşil, CEP 17 mavi ve LSI 9p21 ise turuncu spekturumda floresan işaretlidir. İdrardaki normal hücreler 4 prob için de 2'şer kopya içerir (dizomi) (Resim 2). Ancak sağlıklı kişilerden alınan idrar örneklerinde yapılan çalışmalarda hücrelerin yaklaşık %5-10'unun belirli bir prob için sadece 1 kopya (monozomi) içerebileceği ve %1-3'lük bir kısmının da 3 (trizomi) ya da 4 kopya (tetrazomi) içerebileceği görülmüştür. Normal hücrelerde görülen monozomi, iki sinyalin üst üste binmesine bağlı olarak tek sinyal şeklinde görülmesiyle ya da hibridizasyonun hücrelerin tamamında gerçekleşmemiş olmasıyla açıklanabilir. Trizomi ya da tetrazomi gösteren normal hücreler için ise en olası açıklama bu hücrelerin hücre siklusunun S ya da G2 fazında olmalarıdır. Bu bulgular gösteriyor ki az sayıdaki

hücrede monozomi, tetrazomi ya da trizomi olması neoplaziyi göstermez (75). Bu nedenle bu yöntem değerlendirilirken dikkat edilmesi gereken kantitasyonlar mevcuttur. En önemli husus, sadece morfolojik olarak anormal ve malign olduğundan şüphelenilen hücrelerin değerlendirilmesidir. Bu hücreler, kümeler şeklinde bulunan ve yamasal DAPI boyanması gösteren, iri, düzensiz şekilli nükleusludur. Tek hücreler ve üst üste binmiş hücreler değerlendirme dışı bırakılır. Bu testte, morfolojik olarak anormal 25 hücre değerlendirilir. En az 4 hücrede 2 veya daha fazla kromozomda kazanım (polizomi 3., 7. veya 17.) tespit edilmesi veya en az 12 hücrede 9p21'in homozigot kaybı varsa pozitif kabul edilir (Resim 3). Eğer değerlendirilen 25 atipik hücrede bu 2 kriterden birine ulaşılamamışsa yaymadaki tüm atipik hücreler taranır. Hibridizasyon bazlı bir yöntem olan *UroVysion* konvansiyonel sitolojideki morfolojik değişiklikler ile kromozomal genetik değişiklikleri kombine eden bir testtir. Duyarlılığı %30-86 arasında özgüllüğü ise %63-95 arasında değişmektedir. Fakat henüz hangi hücrelerin anormal kabul edileceği ve ÜRK tanısı konulması için ne kadar hücrenin kromozom anomalisi göstermesi gerektiği konusunda bir fikir birliği bulunmamaktadır. Pahalı bir yöntem olmasına karşılık, günümüzde değerlendirmede otomasyon



Resim 2. a, b) *UroVysion* floresan in situ hibridizasyon değerlendirmesinde normal hücrelerde dizomi paterni

Tablo 2. Ürotelyal karsinomlarda idrar belirteçleri

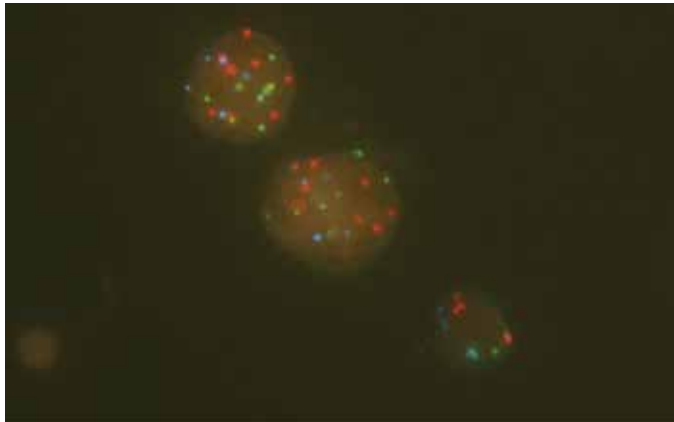
Belirteçler	Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)	Yüksek dereceli tümörler için duyarlılık (%)
<i>Kanser hücre bazlı belirteçler</i>			
<i>UroVysion</i>	30-86	63-95	66-70
Mikrosatellit analizi	58-92	73-100	90-92
uCyt+/Immunocyt	52-100	63-75	62-92
<i>İdrarda çözünebilir tümör ürün bazlı belirteçler</i>			
NMP22	47-100	55-98	75-83
BTA stat	29-83	56-86	62-75

BTA: Bladder tumor antigen, NMP: Nükleer matriks proteini



sistemlerinin geliştirilmesi ile insan gücü zorluğu aşılabilmekte ve standardizasyon sağlanmaktadır.

*Mikrosatellit analizleri* de bir başka tümör belirteci olarak yer almaktadır. Mikrosatellitler genellikle 2-5 baz çifti uzunluğundaki DNA sekansının ardışık tekrarlarından oluşan dizilerdir. Bu diziler insan genomunda oldukça sık görülürler. Bir kişinin somatik hücrelerinde bir kromozomun 2 kopyası (paternal ve maternal alleller) farklı sayıda ancak aynı mikrosatellit sekansına sahiptir. Örneğin aynı kromozal lokalizasyonda paternal allel 10 CA baz tekrarı içerirken, maternal allel 15 CA tekrarı içerir. Bu nedenle özel bir mikrosatelliti içeren bir kromozomal DNA segmentinin amplifikasyonu sonucunda biri maternal diğeri paternal alleli gösteren 2 PCR ürünü elde edilir. İdrarda mikrosatellit analizi, tümör hücrelerindeki LOH varlığını tespit etmek için kullanılabilir. Mesanenin ÜRK'da tanımlanmış en sık ve önemli moleküler değişikliklerden bir tanesi de LOH'dur. İdrara dökülmüş hücrelerde mikrosatellitleri kullanarak LOH tespit edilmesinin tümör tanısında kullanılabileceği gösterilmiştir (76). Kasa invaziv ve kas invazyonu olmayan ÜRK'larda en sık 9. kromozomda olmak üzere genom boyunca çeşitli lokalizasyonlarda heterozigote kaybı olduğu gösterilmiştir. 8p, 11p, 13p, 16q ve 17p mesane tümörlerinde sıklıkla LOH izlenen diğer lokalizasyonlardır (77). Tipik olarak LOH yöntemlerinde, kanser şüpheli örnek ile aynı hastaya ait sağlıklı dokuda mikrosatellitlerin amplifikasyonu karşılaştırılır. Sağlıklı doku heterozigot mikrosatellit marker için 2 allel göstermelidir. Yani PCR amplifikasyonu sonrası jel elektroforezinde iki ayrı bant ya da kapiller elektroforezde allellerden bir tanesinin iki ayrı pik izlenmelidir. Tümör örneğinde LOH'un göstergesi ise jel elektroforezinde tek bant izlenmesi ya da elektroferogramda pik yüksekliğinde sağlıklı alele göre rölatif azalma olmasıdır. Mikrosatellit analizi için yüzlerce farklı mikrosatellit belirteç kullanılmaktadır. Ancak en yüksek duyarlılık ve özgüllük ile ÜRK tanısı koyabilmek için kaç tane belirteç kullanılması ve hangi kromozomal bölgelerdeki LOH'un değerlendirilmesi gerektiği belirsizdir (77). Mesane kanserinde birçok kromozom noktasında LOH saptanmaktadır. Özgüllük ve duyarlılığı için farklı değerler verilmekle birlikte, nüksü sistoskopiden önce öngörmede başarılı bulunmaktadır (78,79). FDA onayı olmayan bir testtir. *uCyt+/Immunocyt testi (Diagnocure Inc.)*, FDA onaylı üç monoklonal antikora dayalı floresan bir yöntemdir. Müsin benzeri



Resim 3. a, b) Urovysion floresan in situ hibridizasyon değerlendirmesinde anormal morfolojideki hücrelerde her üç kromozomda (3., 7. ve 17.) polizomi paterni

antijenlere yönelik 2 antikor ve karsinoembriyonik antijene yönelik bir antikor içermektedir (80). Oldukça zahmetli bir testtir ve değerlendirebilmek için eğitim gerekmektedir. Yanlış pozitifliğinin yüksek olduğu bildirilmiştir ancak bu olgularda daha sonra nükslerin çıkması, bu pozitifliklerin yanlış sonuç değil nüksleri erken öngörme olduğu şeklinde değerlendirilmiş ve testin artı yönü olarak kabul edilmiştir. Diğer testlere göre bir başka olumlu yönü de düşük dereceli tümörlerde duyarlılığının yüksek olmasıdır (81,82,83).

*Bladder tumor antigen (mesane tümör antijeni) (BTA) Stat (Alidex Inc.)*, idrarda kompleman faktör H-ilişkili protein analizine dayalıdır. Muayenehane koşullarında uygulanabilmesi en önemli avantajlı yönüdür ve FDA onaylıdır. Duyarlılığı yüksek, özgüllüğü düşüktür (73,78,81). Primer tarama veya tanı amaçlı kullanımı değil ama ancak tümör nükslerinin tespit edilmesinde idrar sitolojisinin duyarlılığını artırmak için ilave bir test olarak kullanılması önerilmektedir.

*Nükleer matris proteini-22 (NMP-22) (Matritech)*, kantitatif ELISA testi ile değerlendirilen hücre replikasyonu ile ilişkili bir NMP'dir. Normal hücrelerde NMP-22 düzeyi düşükken, mesane kanseri hücrelerinde 25 kat artma göstermektedir. FDA onaylı bir testtir. Duyarlılığı ve özgüllüğü makul düzeylerde olmasına karşın, hematüri ve enflamasyon gibi olgularda yanlış pozitif sonuçlara yol açması ve BTA Stat gibi düşük dereceli tümörlerde yanlış negatif sonuçlarının çokluğu olumsuz yönleridir (73,78). Hiçbir kanser için ideal bir tümör belirteci bulunmamaktadır. ÜRK için önerilmiş olan tüm tümör belirteçleri çok küçük serilerde çalışılmış ve sonuçları ön rapor şeklinde bildirilmiştir. Bu tümör belirteçleri için yapılan çalışmalarda verilen özgüllük ve duyarlılık oranları aslında prostat spesifik antijenin oranlarından bile daha yüksektir. Özellikle yukarıda değinilen belirteçler diğerlerine göre biraz daha ön plana çıkmaktadır ancak en iyi yöntemi belirlemek olanaksız gözükmektedir. Sistoskopi ile bazı tümörlerin ve KİS'in atlanabildiği unutulmamalıdır. İdrar sitolojisi tanıya yardımcı olmak, makroskopik izlenemeyen KİS'i yakalamak ve üst üriner sistem taraması amaçlı yapılmaktadır. Özgüllüğü yüksek bir tümör belirteci, nüksleri yakalamada sistoskopinin başarısını artırmaktadır ve gereksiz girişimsel işlemlerin engellenmesi için önemlidir (84). İdrar sitolojisine UroVysion, uCyt+/Immunocyt, mikrosatellit instabilitesi gibi tümör belirteçlerinden biri eklenerek sistoskopi sıklığı azaltılabilir.

## Prognoz

Yüzeysel ÜRK'larda pTNM evre, 'World Health Organization/International Society of Urological Pathology' (Dünya Sağlık Örgütü/Uluslararası Ürolojik Patoloji Grubu) (WHO/ISUP) derece, tümör boyutu, çok odaklılık, KİS varlığı ve rekürrens oranı klinikopatolojik prognostik parametreler olarak kabul edilmektedir (85).

Rezeke edilen dokunun patolojik incelemesine dayalı bazı yeni parametrelerin sınıflandırma ve prognostik amaçlı kullanılabilirliği değerlendirilmiştir. T1 tümürlü hastalarda lamina propria içine olan invazyonun yaygınlığı ve derinliği (T1 alt evreleme) değerlendirilebilir. WHO sınıflandırması içinde kabul edilmemişse de bu değerlendirmenin prognostik değeri bazı retrospektif kohort çalışmalarda gösterilmiştir (86,87,88,89). T1 tümörlerde lenfovasküler invazyon varlığının kötü prognostik faktör olduğu bildirilmiştir (90). Mikropapiller, nested, plazmasitoid ve sarkomatoid varyant gibi ÜRK varyantlarının

tanı anında kasa invaze olmasalar da kötü prognostik faktör oldukları gösterilmiştir (91,92,93,94,95,96). Bu varyantlarda T1 tümörlerde de metastaz varlığı bildirilmiştir (91). Bu nedenle KIO-ÜRK'lerin yüksek dereceli invaziv tümörlere progrese olan alt grubunu belirleyecek ya da daha agresif seyredebilecek varyantlar için hastalara aktif gözetim ve daha agresif tedavi planlamasını sağlayacak prognostik moleküler parametrelere ihtiyaç vardır. Aynı zamanda kötü gidişli Kİ-ÜRK olan grupta da prognostik gösterge olacak belirteçlere ihtiyaç var (97).

ÜRK'nın gelişiminde ve progresyonunda sorumlu moleküler yolakların ayrıntılarının saptanması ile mesane kanserlerinde moleküler prognostik, prediktif faktörler ve hedefe yönelik tedavi arayışları artmıştır (98,99). Son yıllarda yapılan bazı gen ekspresyon çalışmaları, ÜRK'larda nüks ve progresyonu belirlemede rol oynayabilecek bir takım gen ekspresyon değişikliklerini işaret etmiştir (12,100,101). Özellikle FGFR3, epidermal büyüme faktörü reseptörü (epidermal growth factor receptor=EGFR) ve diğer ERB ailesi üyelerinin yüzeyel ve invaziv ÜRK'larda potansiyel prognostik değeri gösterilmiştir (102,103). FGFR3 mutasyonu genellikle düşük dereceli ve kasa invaze olmayan tümörlerle ilişkilidir (104,105,106). Bu tümörlerin %70'inde tespit edilmiştir (106,107,108,109,110,111). Tek başına ya da RAS ve PIK3CA ile birlikte erken nüks belirteçi olarak kullanılabilir (11). FGFR3 mutasyonu varlığının nüks oranı üzerindeki etkisi tartışmalı olmakla birlikte daha iyi prognoza işaret ettiği açıktır (105,109,110,111,112). Son çalışmalar, sadece düşük dereceli KIO-ÜRK'larda FGFR3 mutasyonu varlığında nüks oranının arttığını, invaziv yüksek dereceli tümörlerde ise böyle bir artış olmadığını göstermiştir (112). Miyake ve ark.'nın (113) yaptığı çalışmada primer tümörde FGFR3 mutasyon varlığı rekürrens için önemli bir prognostik gösterge değil iken primer tümöründe FGFR3 mutasyonu olan hastaların preoperatif idrar örneklerinde FGFR3 mutasyon oranı rekürrens için önemli bir gösterge olarak bulunmuştur. Tümöründe FGFR3 mutasyonu olan rekürren olguların %78'inde (7/9) postoperatif idrar örneklerinde FGFR3 mutasyonu saptanırken, nüks göstermeyen 15 olgunun idrarında FGFR3 mutasyonu izlenmemiştir. İdrar sitolojisi FGFR3 mutasyonu olan olguların tamamında negatif iken, FGFR3 mutasyonu olmayan olgularda %56'lara varan oranlarda pozitiflik saptanmıştır. Bu nedenle mesanenin yüzeyel ÜRK'larının postoperatif yönetiminde idrarda FGFR mutasyon analizi ve sitolojik inceleme birbirini tamamlayan tanısal yöntemler olabilir (113). Zuiverloon ve ark.'nın (114) yaptığı çalışmada ise idrarında FGFR3 mutasyonu tespit edilen yüzeyel ÜRK'lı hastaların 4 kat daha fazla nüks riski taşıdığı ortaya konmuştur.

Van Rhijn ve ark. (109), kas invazyonu olmayan ürotelyal mesane kanserlerinde patolojik dereceye alternatif olarak FGFR3 mutasyon durumu ve Ki67/MIB-1 indeksinin kombinasyonuna dayalı bir moleküler derece önerdiler (Tablo 3). 2010 yılında aynı grup (103), uzun süreli takibi olan serilerde Avrupa Kanser Araştırma ve Tedavi Organizasyonu (European Organisation for Research and Treatment of Cancer=EORTC) risk skorunu (Tablo 4) valide etmiş ve bunun moleküler derece ile ilişkisini ve moleküler ve patolojik derecenin tekrarlanabilirliğini değerlendirmiştir (115). Moleküler derece, patolojik dereceden daha reproduktif bulunmuştur (%89-41-74). FGFR3 mutasyonları olumlu hastalık parametreleri ile sıkı korelasyon gösterirken, sıklıkla yüksek dereceli ve yüksek EORTC risk skoruna sahip ve pT1 hastalarda

MIB-1 indeksi yüksek bulunmuştur. EORTC risk skorları nüks ve progresyon için çok değişkenli analizlerde anlamlı idi. Hastalığa spesifik sağkalım ve progresyon için yapılan çok değişkenli analizlerde moleküler derecenin bağımsız bir faktör olduğu gösterilmiştir. Progresyon için çok değişkenli modele moleküler derecenin eklenmesi ile öngörü doğruluğu %74,9'dan %81,7'ye yükselmiştir (103).

Ki67 ya da MIB-1 tümör proliferasyon indeksi pek çok diğer tümör gibi mesane kanserleri için de prognostiktir. Yüzeysel mesane tümörlerinde Van Rhijn ve ark.'nın (109) ortaya koyduğu moleküler derecelenmenin bir unsuru olmakla birlikte bağımsız bir prognostik rolü olduğu da gösterilmiştir. KIO-ÜRK'larda TUR materyallerinde Ki67 proliferasyon indeksi progresyonsuz sağkalım için prediktiftir (116). İleri evre ÜRK'da da Ki67 proliferasyon indeksinin prognostik rolünü gösteren çok sayıda çalışma vardır. ÜRK nedeniyle radikal sistektomi yapılmış hastaların incelendiği çok merkezli bir çalışmada yüksek Ki67 proliferasyon indeksinin agresif ÜRK özellikleri ile, hastalık nüksü ve kansere özgü sağkalım ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle radikal sistektomi materyallerinde patolojik evre, derece, lenfovasküler invazyon gibi standart prediktif faktörlere Ki67 proliferasyon indeksinin eklenmesi, progresyon açısından daha yüksek riskli hastaların belirlenmesi oranını artırabilir ve bu hastalar adjuvan multimodal tedavilerden fayda görebilirler (117).

EGFR ailesinin diğer bir üyesi olan HER2'nin amplifikasyon/aşırı ekspresyonunun kasa invaziv mesane tümörlerinde kötü prognostik faktör olduğunu gösteren çeşitli çalışmalar mevcuttur (118,119,120). HER2 pozitif hastalarda kansere bağlı ölüm ve nüks riskinin 2 kat arttığı gösterilmiştir (121).

TP53 tümör süpresör gen mutasyonu mesanenin ÜRK'sında kötü klinik seyir ile ilişkilidir (104). Hem yüzeyel hem de kasa invaziv mesane tümörlerinde bu ilişki mevcuttur (122,123). Ayrıca TP53 mutasyonu varlığında DNA hasarı yapan kemoterapötik ajanlara duyarlılığın arttığı gösterilmiştir (124,125). Hücre siklusunun kontrolünde görevli tümör süpresör genlerden TP53, RB ve p21 ve p27 ayrı ayrı tümör progresyonu ile ilişkili bulunmuş olup, hastalık progresyonu ve rekürrensinde sinerjistik etkileri mevcuttur. Ayrıca bu 4 gen arasında mutant olanların sayısının artışı ile hastalık progresyonu ve hastalığa bağlı ölüm riski

**Tablo 3. Ürotelyal karsinomlarda moleküler derecelendirme (109)**

Moleküler derece	
Derece 1	FGFR mutasyonu var Ki-67 proliferasyon indeksi düşük
Derece 2	FGFR mutasyonu var Ki-67 proliferasyon indeksi yüksek FGFR wild tip Ki-67 proliferasyon indeksi düşük
Derece 3	FGFR wild tip Ki-67 proliferasyon indeksi yüksek
FGFR: Fibroblast büyüme faktör reseptörü	

arasında bağımsız bir ilişki vardır (126). miRNA'lardaki değişikliklerin de hastalığın progresyonunu öngörme konusunda faydalı olabileceğine dair çalışmalar mevcuttur. Mesane kanserli hastaların idrarlarında saptanan miR-145 ve miR-200a'nın hem tanısal hem de prognostik değeri olduğu gösterilmiştir. miR-145 tümör derecesi ile belirgin korelasyon gösterirken, miR-200a'nın rekürrens için bağımsız bir belirleyici olabileceği bildirilmiştir (127). miR-129, miR-133b ve miR-518c'nin hastalık progresyonunu öngörmede kullanılabileceği gösterilmiştir (60).

Pignot ve ark.'nın (128) 166 mesane tümöründe yaptıkları çalışmada 804 farklı miRNA'nın RT-PCR ile analizi sonucunda kasa invaziv mesane tümörlerinde miR-9, miR-182 ve miR-200b'nin tümör agresifliği ve prognozu ile ilişkili olabileceği bulunmuştur. Neely ve ark. (129) 343 farklı miRNA'nın yüzeyel ve invaziv mesane tümörleri arasında ekspresyon profillerindeki farklılığı değerlendirmişler ve miR-21/miR-205 oranının invaziv lezyonlarda en az 10 kat daha yüksek olduğunu göstermişlerdir. miR-21/miR-205 oranı yüzeyel ve invaziv ÜRK'nın ayırımı için oldukça yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip olup aynı zamanda bu oranın yüzeyel tümörlerin progresyon riski yüksek olanları belirleme potansiyeli olabileceği vurgulanmıştır.

Mesane kanserlerinde epigenetik analizlerin prognostik ve tanısal bir araç olarak kullanımına yönelik giderek artan ilgi mevcuttur. Mesane kanserlerinde genomdaki çok sayıda onkojenik mutasyona gen promoter bölgelerinde anormal metilasyonlar eşlik eder. Mesane kanserlerinde sık görülen genetik değişikliklerin epigenetik değişikliklerle birlikte tespiti tanı için duyarlılığı ve özgüllüğü artırmaktadır. Pek çok diğer kanser türünde olduğu gibi mesane kanserlerinde de epigenetik değişiklikler kötü klinik gidiş ile ilişkilidir (130,131,132,133). Örneğin yüzeyel mesane tümörlerinde epigenetik değişiklikler karsinogenezin erken aşamalarında meydana gelmekte ve kasa invaziv hastalığa progresyonla ilişkilidir (134). SOX9 genindeki hipermetilasyonun mesane kanserli hastalarda tümör progresyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (135). APC, CDH1, CDH13 ve RASSF1A genlerinden her birinde meydana gelen epigenetik değişiklikler kötü prognoz göstergesi olup, kısa sağkalım ile ilişkilidir (136,137). Çok değişkenli analizlerde RASSF1a ve DAPK genlerinin promoter metilasyonu, tümör derece ve evresinden bağımsız olarak hastalık progresyonu ile ilişkili bulunmuştur (138). Mesane kanserlerinde promoter hipermetilasyonunun invaziv kanser gelişimi, tümör progresyonu ve hastalığa bağlı sağkalım ile ilişkili olduğu bir diğer gen de RUNX3'tür (138).

## Tedavi

Son yıllarda kanser tedavisinde kişiselleştirilmiş tedavi yöntemleri üzerinde çalışılmaktadır. Özellikle hedefe yönelik bu tarz tedavilerin, klinik yararlılığını gösteren hassas belirteçler kullanılarak bu tedavilerin geliştirilmesi beklenmektedir. Biyomarkırların tedavi yanıtı konusunda kullanımı ve bu tedavilerin geliştirilmesi için ise ürotelyal kanserler çok uygundur (139).

ÜRK'nın gelişiminde rol oynayan genetik değişikliklerin pek çoğu hedefe yönelik tedaviler için potansiyel hedeflerdir (139). Son yıllarda bu tümörlerde bir dizi hedefe yönelik tedavi protokolleri geliştirilmiştir. Bu moleküllerin henüz klinik kullanımları onaylanmamış olmakla birlikte erken dönem

sonuçlar umut verici bulgular ortaya koymuştur. Örneğin bir mTOR yolağı inhibitörü olan 'everolimus'un TSK1 mutasyonu olan metastatik ÜRK hastalarında etkinliği gösterilmiştir (140). Moleküler analizler yüksek dereceli ÜRK'da görülen genetik ve epigenetik değişikliklerin yaklaşık %60'lara ulaşan kısmının şu anda kullanılan ya da klinik test aşamasında olan ilaçlarla tedavi edilebileceğini göstermiştir (37,141,142). RKT-RAS-RAF, PI3K/AKT/mTOR yolakları ve G1-S hücre siklus düzenleyicileri hedefe yönelik tedaviler için en önemli hedefleri içermektedir (37). ÜRK'da, tirozin kinaz reseptör aktivitesine sahip EGFR'yi hedef alan tedavi stratejileri kapsamlı klinik çalışmalar ile değerlendirilmiştir. Bu aile üyelerinden EGFR (ErbB-1) ve HER2 (ErbB-2), üzerinde en çok çalışılmış olanlardır (139). HER2 ekspresyonu ÜRK'da %8,5 ile %81 arasında değişen oranlarda bildirilmiştir (143,144,145) ve HER2 ekspresyon artışı kötü klinik seyir ile ilişkili bulunmuştur (146,147). HER2'yi hedef alan çok merkezli bir fazII çalışmasının sonuçları 2007 yılında bildirilmiştir. Bu çalışmada HER2 pozitif 44 metastatik mesane kanserli hastaya karboplatin, paklitaksel ve gemsitabinden oluşan üçlü kemoterapiye monoklonal HER2 antikoru (trastuzumab) eklenmiştir. Tedavi sonucunda 5'i komplet ve 26'sı parsiyel olmak üzere 31 hastada yanıt alınmıştır. Ortalama toplam sağkalım ise 14,1 aydır. İmmünohistokimya (IHK) sonucu 3+ olan ve FISH yöntemi ile gen amplifikasyonu gösterilen hastalarda, IHK sonucu 2+ olan ve FISH-negatif tümürlü hastalara oranlara daha

**Tablo 4. Ürotelyal karsinomlarda modifiye Avrupa Kanser Araştırma ve Tedavi Organizasyonu risk skorlama sistemi**

Faktör	Nüks	Progresyon
<i>Tümör sayısı</i>		
Tek	0	0
2-7 arası	3	3
8 ve daha fazla	6	3
<i>Tümör çapı</i>		
<3 cm	0	0
≥3 cm	3	3
<i>Önceki rekürrens oranı</i>		
İlk tümör (primer)	0	0
≤1 rekürrens/yıl	2	2
>1 rekürrens/yıl	4	2
<i>Evre</i>		
Ta	0	0
T1	1	4
<i>Eşlik eden KİS</i>		
Yok	0	0
Var	1	6
<i>Derece (WHO 1973)</i>		
G1	0	0
G2	1	0
G3	2	5
<i>Toplam skor</i>	0-17	0-23

KİS: Karsinoma in situ, WHO: World health organization (Dünya Sağlık Örgütü)



yüksek yanıt oranı elde edilmiştir (148). Kasa invaze mesane tümörü olup, sistektomi yapılmayan ve TUR sonrası standart radyoterapi alan hastalarda eşzamanlı paklitaksal ve paklitaksal + trastuzumab tedavisinin etkinliği ve güvenilirliği randomize olmayan bir fazl/II çalışma ile değerlendirilmektedir (149).

İn vitro ve prelinik çalışmaların sonuçları, HER2 gibi EGFR'nin de mesane kanser hücrelerinin proliferasyonundaki rolünü ve tedavi edici potansiyelini ortaya koymuştur (150,151,152). EGFR inhibitörleri ile tedavinin kemoterapi etkinliğini artırdığı gösterilmiştir (153). EGFR ailesini hedef alan 3 farklı tedavi stratejisi geliştirilmiştir. Hedefe yönelik moleküler ajanın tek başına kullanımı, kemoterapi ile birlikte kullanımı ve EGFR ve HER2'nin her ikisinin hedef alındığı tedaviler. ÜRK'da TKR'lerine karşı geliştirilmiş ajanların tek başına kullanımı tedavide önemli bir etki oluşturmamıştır. EGFR tirozin kinaz inhibitörü olan gefitinib metastatik ÜRK'da ikinci basamak tedavi için fazl çalışmada etkisiz bulunmuştur (154). Bir başka tirozin kinaz inhibitörü olan erlotinib klinik evresi T2 olan ve sistektomi planlanan hastalara neoadjuvan tedavi olarak verilmiş ve sistektomi materyallerinde hastaların %25'inde patolojik evrenin T0'a gerilediği gözlenmiştir. Ancak bu hastalarda 2 yıllık hastalısız sağkalıma bir katkısı olmamıştır (155). İleri evre ÜRK tedavisinde sispaltin ve gemsitabin gibi kemoterapötik ajanlara tirozin kinaz reseptör inhibitörü eklenmesinin de, tek başına kemoterapiye kıyasla bir katkı sağlamadığı gösterilmiştir (156). EGFR'nin hücre dışı parçasına (ekstrasellüler domain) karşı geliştirilen monoklonal antikor olan setuksimab da kemoterapi ile kombine edilip etkinliği test edilmiştir. İleri evre ÜRK'nın tedavisinde bu birliktelik yan etkileri artırırken, sağ kalıma bir katkı sağlamamıştır (157). Prelinik çalışmalar, HER2 ve EGFR pozitif mesane kanserlerinde, EGFR ve HER2'nin birlikte inhibisyonunun tedavide yararlı olabileceğini düşündürmektedir. EGFR ve HER2'yi birlikte bloke eden bir ajan olan lapatinib kullanılarak tedaviye dirençli ÜRK'da yapılan fazl çalışmaların sonuçları ümit vericidir (158).

Düşük dereceli non-invaziv tümörlerde daha sık olmak üzere, mesane tümörlerinde FGFR3 mutasyonları yaygın olarak mevcut olduğundan, bu tümörlerin tedavisinde FGFR3 inhibitörlerinin geliştirilmesi konusunda yoğun çaba harcanmaktadır. İn vitro ve in vivo olarak mutant FGFR3'ün inhibisyonu FGFR'ye bağlı ÜRK gelişimini bloke etmektedir (159). Bu prelinik bulgulara dayanarak FGFR3 mutasyonu olan ve olmayan metastatik ÜRK'da FGFR3 ve VEGFR inhibitörü bir molekül olan dovitinibin etkinliği araştırılmaktadır (160).

ÜRK'larda FGFR3'ün inhibisyonunda küçük moleküller dışında monoklonal antikorlar da kullanılmıştır (161). R3Mab FGFR3'e karşı hazırlanan bir monoklonal antikor olup mesane kanseri hücre kültüründe hücre döngüsü ilerlemesinde duraklamaya neden olduğu gösterilmiştir (162).

ÜRK'da görülen PIK3CA mutasyonları ve PTEN inaktivasyonu sonucu AKT-mTOR sinyal yolağı aktive olur ve sonuçta tümör hücrelerinin çoğalması teşvik edilmiş olur (163). BKM120 ve GSK2126458 mesane kanserlerinde geliştirilen ilk selektif PI3K inhibitörleridir. Her ikisi ile ilgili de metastatik ÜRK'nın tedavisinde kullanımına yönelik çalışmalar devam etmektedir. Ön çalışmaların sonuçları PI3K inhibitörlerinin, sadece PIK3A mutasyonu olan tümörlerde değil bu yolaktaki diğer mutasyonların varlığında da etkili olabileceğini düşündürmektedir (164).

Ki67 proliferasyon indeksi yüksek ÜRK'lar neoadjuvan tedaviden fayda görebilirler. Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF)

ve fibroblast büyüme faktörü beta (bFGF) aşırı ekspresyonu ise sispaltine bağlı apoptoza dirençle ilişkilidir (165).

İleri evre ÜRK'nın tedavisinde anjiogenezi inhibe eden küçük moleküller ve monoklonal antikorların etkinliği de araştırılmaktadır. Metastatik mesane kanserlerinde VEGF'e karşı geliştirilmiş bir monoklonal antikor olan bavaezumabın sispaltin ve gemsitabinle kombinasyonu ilk basamak tedavi olarak fazl çalışma ile değerlendirilmektedir. Hastaların önemli bir kısmında tedaviye yanıt alınsa da belirgin derecede tedavi ilişkili toksisite ortaya çıkmıştır (166).

Sonuç olarak ileri evre ÜRK'larda hedefe yönelik tedavilerin klinik sonuçlarına yönelik pek çok çalışma olumsuz sonuçlanmış olmakla birlikte özellikle mTOR sinyal ileti yolağındaki değişiklikleri hedef alan tedavi yaklaşımları ile ilgili çalışmalar devam etmektedir.

#### Yazarlık Katkıları

*Konsept: Zafer Küçükodacı, Kutsal Yörükoğlu, Dizayn: Zafer Küçükodacı, Kutsal Yörükoğlu, Veri Toplama veya İşleme: Zafer Küçükodacı, Kutsal Yörükoğlu, Analiz veya Yorumlama: Zafer Küçükodacı, Kutsal Yörükoğlu, Literatür Arama: Zafer Küçükodacı, Kutsal Yörükoğlu, Yazan: Zafer Küçükodacı, Kutsal Yörükoğlu, Hakem Değerlendirmesi: Editörler kurulu tarafından değerlendirilmiştir, Çıkar Çatışması: Yazarlar bu makale ile ilgili olarak herhangi bir çıkar çatışması bildirmemiştir, Finansal Destek: Çalışmamız için hiçbir kurum ya da kişiden finansal destek alınmamıştır.*

#### Kaynaklar

1. Netto GJ. Molecular diagnostics in urologic malignancies: a work in progress. Arch Pathol Lab Med 2011;135:610-621.
2. Kumar V, Abbas AK, Fausto N. "Tissue renewal and repair: regeneration healing, and fibrosis," in Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease 7th edition. Kumar V, Abbas AK, and Fausto N. Philadelphia, Pa, USA. Elsevier Saunders 2005. 95-100.
3. Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. Cell 2007;128:683-692.
4. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. Cell 2007;128:693-705.
5. Suzuki MM, Bird A. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. Nat Rev Genet 2008;9:465-476.
6. Jay C, Nemunaitis J, Chen P, et al. miRNA profiling for diagnosis and prognosis of human cancer. DNA Cell Biol 2007;26:293-300.
7. Eulalio A, Huntzinger E, Izaurralde E. Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing. Cell 2008;132:9-14.
8. Mendell JT. MicroRNAs: critical regulators of development, cellular physiology and malignancy. Cell Cycle 2005;4:1179-1184.
9. Davalos V, Esteller M. MicroRNAs and cancer epigenetics: a macroevolution. Curr Opin Oncol 2010;22:35-45.
10. Lu J, Getz G, Miska EA, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. Nature 2005;435:834-838.
11. Netto GJ. Clinical applications of recent molecular advances in urologic malignancies: no longer chasing a "mirage"? Adv Anat Pathol 2013;20:175-203.
12. Mitra AP, Datar RH, Cote RJ. Molecular pathways in invasive bladder cancer: new insights into mechanisms, progression, and target identification. J Clin Oncol 2006;24:5552-5564.
13. Wu XR. Urothelial tumorigenesis: a tale of divergent pathways. Nat Rev Cancer 2005;5:713-725.

14. Oxford G, Theodorescu D. The role of Ras superfamily proteins in bladder cancer progression. *J Urol* 2003;170:1987-1993.
15. Mitra AP, Cote RJ. Molecular pathogenesis and diagnostics of bladder cancer. *Annu Rev Pathol* 2009;4:251-285.
16. Lopez-Knowles E, Hernandez S, Malats N, et al. PIK3CA mutations are an early genetic alteration associated with FGFR3 mutations in superficial papillary bladder tumors. *Cancer Res* 2006;66:7401-7404.
17. Kompier LC, Lurkin I, van der Aa MN, et al. FGFR3, HRAS, KRAS, NRAS and PIK3CA mutations in bladder cancer and their potential as biomarkers for surveillance and therapy. *PLoS One* 2010;5:13821.
18. Kubota Y, Miyamoto H, Noguchi S, et al. The loss of retinoblastoma gene in association with c-myc and transforming growth factor-beta 1 gene expression in human bladder cancer. *J Urol* 1995;154:371-374.
19. Mitra AP, Cote RJ. Molecular screening for bladder cancer: progress and potential. *Nat Rev Urol* 2010;7:11-20.
20. Houskova L, Zemanova Z, Babjuk M, et al. Molecular cytogenetic characterization and diagnostics of bladder cancer. *Neoplasma* 2007;54:511-516.
21. Cheng L, Zhang S, MacLennan GT, et al. Bladder cancer: translating molecular genetic insights into clinical practice. *Human Pathol* 2011;42:455-481.
22. Tsai YC, Nichols PW, Hiti AL, et al. Allelic losses of chromosomes 9, 11, and 17 in human bladder cancer. *Cancer Res* 1990;50:44-47.
23. Abraham R, Pagano F, Gomella L, Baffa R. Chromosomal deletions in bladder cancer: shutting down pathways. *Front Biosci* 2007;12:826-838.
24. Hirao S, Hirao T, Marsit C, et al. Loss of heterozygosity on chromosome 9q and p53 alterations in human bladder cancer. *Cancer* 2005;104:1918-1923.
25. Pollard C, Smith SC, Theodorescu D. Molecular genesis of non-muscle-invasive urothelial carcinoma (NMIUC). *Expert Rev Mol Med* 2010;12:10.
26. Hornigold N, Devlin J, Davies AM, et al. Mutation of the 9q34 gene TSC1 in sporadic bladder cancer. *Oncogene* 1999;18:2657-2661.
27. Knowles MA, Habuchi T, Kennedy W, Cuthbert-Heavens D. Mutation spectrum of the 9q34 tuberous sclerosis gene TSC1 in transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer Res* 2003;63:7652-7656.
28. Aboukassim T, LaRue H, Lemieux P, et al. Alteration of the PATCHED locus in superficial bladder cancer. *Oncogene* 2003;22:2967-2971.
29. Larsen K, Momeni J, Farajzadeh L, et al. Cloning and characterization of the porcine DBC1 gene encoding deleted in bladder cancer. *Mol Biol Rep* 2015;42:383-391.
30. Lopez-Beltran A, Alvarez-Kindelan J, Luque RJ, et al. Loss of heterozygosity at 9q32-33 (DBC1 locus) in primary non-invasive papillary urothelial neoplasm of low malignant potential and low-grade urothelial carcinoma of the bladder and their associated normal urothelium. *J Pathol* 2008;215:263-272.
31. Habuchi T, Luscombe M, Elder PA, Knowles MA. Structure and methylation-based silencing of a gene (DBCCR1) within a candidate bladder cancer tumor suppressor region at 9q32-q33. *Genomics* 1998;48:277-288.
32. Chapman EJ, Harriden P, Chambers P, et al. Comprehensive analysis of CDKN2A status in microdissected urothelial cell carcinoma reveals potential haploinsufficiency, a high frequency of homozygous co-deletion and associations with clinical phenotype. *Clin Cancer Res* 2005;11:5740-5747.
33. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Citro G, et al. Identification of gains and losses of DNA sequences in primary bladder cancer by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 1995;12:213-219.
34. Simon R, Bürger H, Brinkschmidt C, et al. Chromosomal aberrations associated with invasion in papillary superficial bladder cancer. *J Pathol* 1998;185:345-351.
35. Chan MW, Hui AB, Yip SK, et al. Progressive increase of genetic alteration in urinary bladder cancer by combined allelotyping analysis and comparative genomic hybridization. *Int J Oncol* 2009;34:963-970.
36. Nishiyama N, Arai E, Nagashio R, et al. Copy number alterations in urothelial carcinomas: their clinicopathological significance and correlation with DNA methylation alterations. *Carcinogenesis* 2011;32:462-469.
37. Iyer G, Al-Ahmadie H, Schultz N, et al. Prevalence and co-occurrence of actionable genomic alterations in high-grade bladder cancer. *J Clin Oncol* 2013;31:3133-3340.
38. Gschwind A, Fischer OM, Ullrich A. The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nature Rev Cancer* 2004;4:361-370.
39. Jebar AH, Hurst CD, Tomlinson DC, et al. FGFR3 and Ras gene mutations are mutually exclusive genetic events in urothelial cell carcinoma. *Oncogene* 2005;24:5218-5225.
40. Lacy S, Lopez-Beltran A, MacLennan GT, et al. Molecular pathogenesis of urothelial carcinoma: the clinical utility of emerging new biomarkers and future molecular classification of bladder cancer. *Anal Quant Cytol Histol* 2009;31:5-16.
41. Lindgren D, Liedberg F, Andersson A, et al. Molecular characterization of early-stage bladder carcinomas by expression profiles, FGFR3 mutation status, and loss of 9q. *Oncogene* 2006;25:2685-2696.
42. Al-Ahmadie HA, Iyer G, Janakiraman M, et al. Somatic mutation of fibroblast growth factor receptor-3 (FGFR3) defines a distinct morphological subtype of high-grade urothelial carcinoma. *J Pathol* 2011;224:270-279.
43. Al Hussain TO, Akhtar M. Molecular basis of urinary bladder cancer. *Adv Anat Pathol* 2013;20:53-60.
44. Baffa R, Letko J, Mc Clung C, et al. Molecular genetics of bladder cancer: targets for diagnosis and therapy. *J Exp Clin Cancer Res* 2006;25:145-160.
45. Bos JL. Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 1989;49:4682-4689.
46. Czerniak B, Cohen GL, Etkind P, et al. Concurrent mutations of coding and regulatory sequences of the Ha-ras gene in urinary bladder carcinomas. *Hum Pathol* 1992;23:1199-1204.
47. Buyru N, Tigli H, Ozcan F, Dalay N. Ras oncogene mutations in urine sediments of patients with bladder cancer. *J Biochem Mol Biol* 2003;36:399-402.
48. Caraway NP, Katz RL. A review on the current state of urine cytology emphasizing the role of fluorescence in situ hybridization as an adjunct to diagnosis. *Cancer Cytopathol* 2010;118:175-183.
49. Larkin S, Kyprianou N. Molecular signatures in urologic tumors. *Int J Mol Sci* 2013;14:18421-18436.
50. Kubota Y, Miyamoto H, Noguchi S, et al. The loss of retinoblastoma gene in association with c-myc and transforming growth factor-beta 1 gene expression in human bladder cancer. *J Urol* 1995;154:371-374.
51. Lin HY, Huang CH, Yu TJ, et al. p53 codon 72 polymorphism as a progression index for bladder cancer. *Oncol Rep* 2011;27:1193-1199.
52. Kamat AM, Mathew P. Bladder cancer: imperatives for personalized medicine. *Oncology (Williston Park)* 2011;25:951-960.
53. Cairns P, Proctor AJ, Knowles MA. Loss of heterozygosity at the RB locus is frequent and correlates with muscle invasion in bladder carcinoma. *Oncogene* 1991;6:2305-2309.
54. Cordon-Cardo C, Wartinger D, Petrylak D, et al. Altered expression of the retinoblastoma gene product: prognostic indicator in bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 1992;84:1251-1256.
55. He F, Mo L, Zheng XY, et al. Deficiency of pRb family proteins and p53 in invasive urothelial tumorigenesis. *Cancer Res* 2009;69:9413-9421.

56. Gui Y, Guo G, Huang Y, et al. Frequent mutations of chromatin remodeling genes in transitional cell carcinoma of the bladder. *Nat Genet* 2011;43:875-878.
57. Solomon DA, Kim JS, Bondaruk J, et al. Frequent truncating mutations of STAG2 in bladder cancer. *Nat Genet* 2013;45:1428-1430.
58. Catto JW, Miah S, et al. Distinct microRNA alterations characterize high- and low-grade bladder cancer. *Cancer Res* 2009;69:8472-8481.
59. Gottardo F, Liu CG, Ferracin M, et al. Micro-RNA profiling in kidney and bladder cancers. *Urol Oncol* 2007;25:387-392.
60. Dyrskjot L, Ostenfeld MS, Bramsen JB, et al. Genomic profiling of microRNAs in bladder cancer: miR-129 is associated with poor outcome and promotes cell death in vitro. *Cancer Res* 2009;69:4851-4860.
61. Catto JW, Alcaraz A, Bjartell AS, et al. MicroRNA in prostate, bladder, and kidney cancer: a systematic review. *Eur Urol* 2011;59:671-681.
62. Volanis D, Kadiyska T, Galanis A, et al. Environmental factors and genetic susceptibility promote urinary bladder cancer. *Toxicol Lett* 2010;193:131-137.
63. Enokida H, Nakagawa M. Epigenetics in bladder cancer. *Int J Clin Oncol* 2008;13:298-307.
64. Serizawa RR, Ralfkiaer U, Steven K, et al. Integrated genetic and epigenetic analysis of bladder cancer reveals an additive diagnostic value of FGFR3 mutations and hypermethylation events. *Int J Cancer* 2011;129:78-87.
65. Kawamoto K, Enokida H, Gotanda T, et al. p16INK4a and p14ARF methylation as a potential biomarker for human bladder cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;339:790-796.
66. Horikawa Y, Sugano K, Shigyo M, et al. Hypermethylation of an E-cadherin (CDH1) promoter region in high grade transitional cell carcinoma of the bladder comprising carcinoma in situ. *J Urol* 2003;169:1541-1545.
67. Berber U, Haholu A, Yilmaz O, et al. Lack of association between glutathione s-transferase -M1 and -T1 gene polymorphisms with clinicopathological parameters in prostate cancer. *Dis Mol Med* 2014;2:1-6.
68. Ellinger J, El Kassem N, Heukamp LC, et al. Hypermethylation of cell-free serum DNA indicates worse outcome in patients with bladder cancer. *J Urol* 2008;179:346-352.
69. Han H, Wolff EM, Liang G. Epigenetic alterations in bladder cancer and their potential clinical implications. *Adv Urol* 2012;2012:546917.
70. Salem C, Liang G, Tsai YC, et al. Progressive increases in de novo methylation of CpG islands in bladder cancer. *Cancer Res* 2000;60:2473-2476.
71. Botteman MF, Pashos CL, Redaelli A, et al. The health economics of bladder cancer: a comprehensive review of the published literature. *Pharmacoeconomics* 2003;21:1315-1330.
72. Babjuk M, Oosterlinck W, Sylvester R, et al. EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder. *Eur Urol* 2008;54:303-314.
73. Vrooman OP, Witjes JA. Urinary markers in bladder cancer. *Eur Urol* 2008;53: 909-916.
74. Konety B, Lotan Y. Urothelial bladder cancer: biomarkers for detection and screening. *BJU Int* 2008;102:1234-1241.
75. Halling KC, Kipp BR. Bladder cancer detection using FISH (UroVysion assay). *Adv Anat Pathol* 2008;15:279-286.
76. Mao L, Schoenberg MP, Scicchitano M, et al. Molecular detection of primary bladder cancer by microsatellite analysis. *Science* 1996;271:659-662.
77. Legrand G, Soliman H, Dubosq F, et al. Prevalence and spectrum of microsatellite alterations in nonmuscle invasive bladder cancers. *Am J Cancer Res* 2011;1:595-603.
78. van Rhijn BW, van der Poel HG, van der Kwast TH. Urine markers for bladder cancer surveillance: a systematic review. *Eur Urol* 2005;47:736-748.
79. van der Aa MN, Zwarthoff EC, Steyerberg EW, et al. Microsatellite analysis of voided-urine samples for surveillance of low-grade non-muscle-invasive urothelial carcinoma: feasibility and clinical utility in a prospective multicenter study (Cost-Effectiveness of Follow-Up of Urinary Bladder Cancer trial [CEFUB]). *Eur Urol* 2009;55:659-667.
80. Fradet Y, Lockhart C. Performance characteristics of a new monoclonal antibody test for bladder cancer. *Immunocyt Trade Mark. Can J Urol* 1997;4:400-405.
81. Tetu B. Diagnosis of urothelial carcinoma. *Mod Pathol* 2009;22(Suppl 2):53-59.
82. Mian C, Maier K, Comploj E, et al. uCyt+/ImmunoCyt in the detection of recurrent urothelial carcinoma: an update on 1991 analyses. *Cancer* 2006;108:60-65.
83. Messing EM, Teot L, Korman H, et al. Performance of urine test in patients monitored for recurrence of bladder cancer: a multicenter study in the United States. *J Urol* 2005;174:1238-1241.
84. van der Aa MN, Steyerberg EW, Bangma C, et al. Cystoscopy revisited as the gold standard for detecting bladder cancer recurrence: diagnostic review bias in the randomized, prospective CEFUB trial. *J Urol* 2010;183:76-80.
85. O'Donnell MA. Advances in the management of superficial bladder cancer. *Semin Oncol* 2007;34:85-97.
86. Orsola A, Trias I, Raventós CX, et al. Initial high-grade T1 urothelial cell carcinoma: feasibility and prognostic significance of lamina propria invasion microstaging (T1a/b/c) in BCG-treated and BCG-non-treated patients. *Eur Urol* 2005;48:231-238.
87. Andius P, Johansson SL, Holmäng S. Prognostic factors in stage T1 bladder cancer: tumor pattern (solid or papillary) and vascular invasion more important than depth of invasion. *Urology* 2007;70:758-762.
88. van Rhijn BW, van der Kwast TH, Alkhateeb SS, et al. A new and highly prognostic system to discern T1 bladder cancer substage. *Eur Urol* 2012;61:378-384.
89. van Rhijn BW, Liu L, Vis AN, et al. Prognostic value of molecular markers, sub-stage and European Organisation for the research and treatment of cancer risk scores in primary T1 bladder cancer. *BJU Int* 2012;110:1169-1176.
90. Cho KS, Seo HK, Joung JY, et al. Lymphovascular invasion in transurethral resection specimens as predictor of progression and metastasis in patients with newly diagnosed T1 bladder urothelial cancer. *J Urol* 2009;182:2625-2631.
91. Kamat AM, Gee JR, Dinney CP, et al. The case for early cystectomy in the treatment of nonmuscle invasive micropapillary bladder carcinoma. *J Urol* 2006;175:881-885.
92. Amin A, Epstein JI. Noninvasive micropapillary urothelial carcinoma: a clinicopathologic study of 18 cases. *Hum Pathol* 2012;43:2124-2128.
93. Comperat E, Roupert M, Yaxley J, et al. Micropapillary urothelial carcinoma of the urinary bladder: a clinicopathological analysis of 72 cases. *Pathology* 2010;42:650-654.
94. Blochin EB, Park KJ, Tickoo SK, et al. Urothelial carcinoma with prominent squamous differentiation in the setting of neurogenic bladder: role of human papillomavirus infection. *Mod Pathol* 2012;25:1534-1542.
95. Wasco MJ, Daignault S, Zhang Y, et al. Urothelial carcinoma with divergent histologic differentiation (mixed histologic features) predicts the presence of locally advanced bladder cancer when detected at transurethral resection. *Urology* 2007;70:69-74.
96. Hansel DE, Amin MB, Compérat E, et al. A contemporary update on pathology standards for bladder cancer: transurethral resection and radical cystectomy specimens. *Eur Urol* 2013;63:321-332.
97. Stein JP, Lieskovsky G, Cote R, et al. Radical cystectomy in the treatment of invasive bladder cancer: long-term results in 1,054 patients. *J Clin Oncol* 2001;19:666-675.



98. Rabbani F, Koppie TM, Charytonowicz E, et al. Prognostic significance of p27Kip1 expression in bladder cancer. *BJU Int* 2007;100:259-263.
99. Mengual L, Burset M, Ribal MJ, et al. Gene expression signature in urine for diagnosing and assessing aggressiveness of bladder urothelial carcinoma. *Clin Cancer Res* 2010;16:2624-2633.
100. Birkhahn M, Mitra AP, Williams AJ, et al. Predicting recurrence and progression of noninvasive papillary bladder cancer at initial presentation based on quantitative gene expression profiles. *Eur Urol* 2010;57:12-20.
101. Mitra AP, Pagliarulo V, Yang D, et al. Generation of a concise gene panel for outcome prediction in urinary bladder cancer. *J Clin Oncol* 2009;27:3929-3937.
102. Rotterud R, Nesland JM, Berner A, Fossa SD. Expression of the epidermal growth factor receptor family in normal and malignant urothelium. *BJU Int* 2005;95:1344-1350.
103. van Rhijn BW, Zuiverloon TC, Vis AN, et al. Molecular grade (FGFR3/MIB-1) and EORTC risk scores are predictive in primary non-muscle invasive bladder cancer. *Eur Urol* 2010;58:433-441.
104. Heijden AG, Witjes JA. Recurrence, progression, and follow-up in non-muscle invasive bladder cancer. *Eur Urol* 2009;8:556-562.
105. van Oers JM, Zwarthoff EC, Rehman I, et al. FGFR3 mutations indicate better survival in invasive upper urinary tract and bladder tumors. *Eur Urol* 2009;55:650-657.
106. van Rhijn BW, Lurkin I, Radvanyi F, et al. The fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) mutation is a strong indicator of superficial bladder cancer with low recurrence rate. *Cancer Res* 2001;61:1265-1268.
107. Cappellen D, De Oliveira C, Ricol D, et al. Frequent activating mutations of FGFR3 in human bladder and cervix carcinomas. *Nat Genet* 1999;23:18-20.
108. Billerey C, Chopin D, Aubriot-Lorton MH, et al. Frequent FGFR3 mutations in papillary non-invasive bladder (pTa) tumors. *Am J Pathol* 2001;158:1955-1959.
109. van Rhijn BW, Vis AN, van der Kwast TH, et al. Molecular grading of urothelial cell carcinoma with fibroblast growth factor receptor 3 and MIB-1 is superior to pathologic grade for the prediction of clinical outcome. *J Clin Oncol* 2003;21:1912-1921.
110. Burger M, van der Aa MN, van Oers JM, et al. Prediction of progression of non-muscle-invasive bladder cancer by WHO 1973 and 2004 grading and by FGFR3 mutation status: a prospective study. *Eur Urol* 2008;54:835-843.
111. Burger M, Catto J, van Oers J, et al. Mutation of the FGFR3 oncogene is an independent and favorable prognostic factor for tumor-specific survival in patients with urothelial carcinoma of the upper urinary tract. *Verh Dtsch Ges Pathol* 2006;90:244-252.
112. Hernandez S, Lopez-Knowles E, Lloreta J, et al. Prospective study of FGFR3 mutations as a prognostic factor in nonmuscle invasive urothelial bladder carcinomas. *J Clin Oncol* 2006;24:3664-3671.
113. Miyake M, Sugano K, Sugino H, et al. Fibroblast growth factor receptor 3 mutation in voided urine is a useful diagnostic marker and significant indicator of tumor recurrence in non-muscle invasive bladder cancer. *Cancer Sci* 2010;101:250-258.
114. Zuiverloon TC, van der Aa MN, van der Kwast TH, et al. Fibroblast growth factor receptor 3 mutation analysis on voided urine for surveillance of patients with low-grade non-muscle-invasive bladder cancer. *Clin Cancer Res* 2010;16:3011-3018.
115. Sylvester RJ, van der Meijden AP, Oosterlinck W, et al. Predicting recurrence and progression in individual patients with stage Ta T1 bladder cancer using EORTC risk tables: a combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trials. *Eur Urol* 2006;49:466-477.
116. Quintero A, Alvarez-Kindelan J, Luque RJ, et al. Ki-67 MIB1 labelling index and the prognosis of primary TaT1 urothelial cell carcinoma of the bladder. *J Clin Pathol* 2006;59:83-88.
117. Margulis V, Lotan Y, Karakiewicz PI, et al. Multi-institutional validation of the predictive value of Ki-67 labeling index in patients with urinary bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 2009;101:114-119.
118. Bolenz C, Lotan Y. Translational research in bladder cancer: from molecular pathogenesis to useful tissue biomarkers. *Cancer Biol Ther* 2010;10:407-415.
119. Chakravarti A, Winter K, Wu CL, et al. Expression of the epidermal growth factor receptor and Her-2 are predictors of favorable outcome and reduced complete response rates, respectively, in patients with muscle-invasive bladder cancers treated by concurrent radiation and cisplatin-based chemotherapy: a report from the Radiation Therapy Oncology Group. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005;62:309-317.
120. Jimenez RE, Hussain M, Bianco FJ Jr, et al. Her-2/neu overexpression in muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: prognostic significance and comparative analysis in primary and metastatic tumors. *Clin Cancer Res* 2001;7:2440-2447.
121. Bolenz C, Shariat SF, Karakiewicz PI, et al. Human epidermal growth factor receptor 2 expression status provides independent prognostic information in patients with urothelial carcinoma of the urinary bladder. *BJU Int* 2010;106:1216-1222.
122. Sarkis AS, Dalbagni G, Cordon-Cardo C, et al. Nuclear overexpression of p53 protein in transitional cell bladder carcinoma: a marker for disease progression. *J Natl Cancer Inst* 1993;85:53-59.
123. Sarkis AS, Bajorin DF, Reuter VE, et al. Prognostic value of p53 nuclear overexpression in patients with invasive bladder cancer treated with neoadjuvant MVAC. *J Clin Oncol* 1995;13:1384-1390.
124. Garcia del Muro X, Condom E, Vignes F, et al. p53 and p21 expression levels predict organ preservation and survival in invasive bladder carcinoma treated with a combined-modality approach. *Cancer* 2004;100:1859-1867.
125. Tzai TS, Tsai YS, Chow NH. The prevalence and clinicopathologic correlate of p16INK4a, retinoblastoma and p53 immunoreactivity in locally advanced urinary bladder cancer. *Urol Oncol* 2004;22:112-118.
126. Shariat SF, Ashfaq R, Sagalowsky AI, Lotan Y. Predictive value of cell cycle biomarkers in nonmuscle invasive bladder transitional cell carcinoma. *J Urol* 2007;177:481-487.
127. Yun SJ, Jeong P, Kim WT, et al. Cell-free microRNAs in urine as diagnostic and prognostic biomarkers of bladder cancer. *Int J Oncol* 2012;41:1871-1878.
128. Pignot G, Cizeron-Clairac G, Vacher S, et al. microRNA expression profile in a large series of bladder tumors: identification of a 3-miRNA signature associated with aggressiveness of muscle-invasive bladder cancer. *Int J Cancer* 2013;132:2479-2491.
129. Neely LA, Rieger-Christ KM, Neto BS, et al. A microRNA expression ratio defining the invasive phenotype in bladder tumors. *Urol Oncol* 2010;28:39-48.
130. Maruyama R, Toyooka S, Toyooka KO, et al. Aberrant promoter methylation profile of bladder cancer and its relationship to clinicopathological features. *Cancer Res* 2001;61:8659-8663.
131. Abe M, Ohira M, Kaneda A, et al. CpG island methylator phenotype is a strong determinant of poor prognosis in neuroblastomas. *Cancer Res* 2005;65:828-834.
132. Roman-Gomez J, Jimenez-Velasco A, Castillejo JA, et al. Promoter hypermethylation of cancer-related genes: a strong independent prognostic factor in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2004;104:2492-2498.
133. Safar AM, Spencer H 3rd, Su X, et al. Methylation profiling of archived non-small cell lung cancer: a promising prognostic system. *Clin Cancer Res* 2005;11:4400-4405.
134. Dhawan D, Hamdy FC, Rehman I, et al. Evidence for the early onset of aberrant promoter methylation in urothelial carcinoma. *J Pathol* 2006;209:336-343.
135. Aleman A, Adrien L, Lopez-Serra L, et al. Identification of DNA hypermethylation of SOX9 in association with bladder cancer progression using CpG microarrays. *Br J Cancer* 2008;98:466-473.



136. Catto JW, Azzouzi AR, Rehman I, et al. Promoter hypermethylation is associated with tumor location, stage, and subsequent progression in transitional cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2005;23:2903-2910.
137. Maruyama R, Toyooka S, Toyooka KO, et al. Aberrant promoter methylation profile of bladder cancer and its relationship to clinicopathological features. *Cancer Res* 2001;61:8659-8663.
138. Kim EJ, Kim YJ, Jeong P, et al. Methylation of the RUNX3 promoter as a potential prognostic marker for bladder tumor. *J Urol* 2008;180:1141-1145.
139. Nadal R, Bellmunt J. New treatments for bladder cancer: when will we make progress? *Current Treat Options Oncol* 2014;15:99-114.
140. Iyer G, Hanrahan AJ, Milowsky MI, et al. Genome sequencing identifies a basis for everolimus sensitivity. *Science* 2012;338:221.
141. Sjö Dahl G, Lauss M, Gudjonsson S, et al. A systematic study of gene mutations in urothelial carcinoma: inactivating mutations in TSC2 and PIK3R1. *PLoS One* 2011;6:18583.
142. Lindgren D, Sjö Dahl G, Lauss M, et al. Integrated genomic and gene expression profiling identifies two major genomic circuits in urothelial carcinoma. *PLoS One* 2012;7:38863.
143. Wester K, Sjöstrom A, de la Torre M, et al. HER-2: a possible target for therapy of metastatic urinary bladder carcinoma. *Acta Oncol* 2002;41:282-288.
144. Krüger S, Weitsch G, Buttner H, et al. HER2 overexpression in muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: Prognostic implications. *Int J Cancer* 2002;102:514-518.
145. Chow NH, Chan SH, Tzai TS, et al. Expression profiles of ErbB family receptors and prognosis in primary transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Clin Cancer Res* 2001;7:1957-1962.
146. Lönn U, Lönn S, Friberg S, et al. Prognostic value of amplification of c-erb-B2 in bladder carcinoma. *Clin Cancer Res* 1995;1:1189-1194.
147. Lipponen P, Eskelinen M, Syrjänen S, et al. Use of immunohistochemically demonstrated c-erb B-2 oncoprotein expression as a prognostic factor in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Eur Urol* 1991;20:238-242.
148. Hussain MH, MacVicar GR, Petrylak DP, et al. Trastuzumab, paclitaxel, carboplatin, and gemcitabine in advanced human epidermal growth factor receptor-2/neu-positive urothelial carcinoma: results of a multicenter phase II National Cancer Institute trial. *J Clin Oncol* 2007;25:2218-2224.
149. US National Library of Medicine. ClinicalTrials.gov [online], <http://www.cancer.gov/clinicaltrials/show/NCT00238420>. 2013.
150. Dominguez-Escrig JL, Kelly JD, Neal DE, et al. Evaluation of the therapeutic potential of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor gefitinib in preclinical models of bladder cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10:4874-4884.
151. Nagasawa J, Mizokami A, Koshida K, et al. Novel HER2 selective tyrosine kinase inhibitor, TAK-165, inhibits bladder, kidney and androgen-independent prostate cancer in vitro and in vivo. *Int J Urol* 2006;13:587-592.
152. Nutt JE, Lazarowicz HP, Mellon JK, Lunec J. Gefitinib ('Iressa', ZD1839) inhibits the growth response of bladder tumour cell lines to epidermal growth factor and induces TIMP2. *Br J Cancer* 2004;90:1679-1685.
153. Lichtner RB, Wiedemuth M, Noeske-Jungblut C, Schirmacher V. Rapid effects of EGF on cytoskeletal structures and adhesive properties of highly metastatic rat mammary adenocarcinoma cells. *Clin Exp Metastasis* 1993;11:113-125.
154. Petrylak DP, Tangen CM, Van Veldhuizen Jr PJ, et al. Results of the southwest oncology group phase II evaluation (study S0031) of ZD1839 for advanced transitional cell carcinoma of the urothelium. *BJU Int* 2010;105:317-321.
155. Pruthi RS, Nielsen M, Heathcote S, et al. A phase II trial of neoadjuvant erlotinib in patients with muscle-invasive bladder cancer undergoing radical cystectomy: clinical and pathological results. *BJU Int* 2010;106:349-354.
156. Philips GK, Halabi S, Sanford BL, et al. A phase II trial of cisplatin (C), gemcitabine (G) and gefitinib for advanced urothelial tract carcinoma: results of Cancer and Leukemia Group B (CALGB) 90102. *Ann Oncol* 2009;20:1074-1079.
157. Pea G. Randomized phase II trial of gemcitabine/ cisplatin (GC) with or without cetuximab (CET) in patients (pts) with advanced urothelial carcinoma (UC) [abstract]. *J Clin Oncol* 2012;30(Suppl):4506.
158. Wülfing C, Machiels JP, Richel DJ, et al. A single-arm, multicenter, open-label phase 2 study of lapatinib as the 52. second-line treatment of patients with locally advanced or metastatic transitional cell carcinoma. *Cancer* 2009;115:2881-2890.
159. Lamont FR, Tomlinson DC, Cooper PA, et al. Small molecule FGFR receptor inhibitors block FGFR-dependent urothelial carcinoma growth in vitro and in vivo. *Br J Cancer* 2011;104:75-82.
160. Milowsky M, Dittrich C, Martinez ID, et al. Final results of a multicenter, open-label phase II trial of dovitinib (TKI258) in patients with advanced urothelial carcinoma with either mutated or nonmutated FGFR3 [abstract]. *J Clin Oncol* 2013;31:a255.
161. Bernard-Pierrot I, Brams A, Dunois-Lardé C, et al. Oncogenic properties of the mutated forms of fibroblast growth factor receptor 3b. *Carcinogenesis* 2006;27:740-747.
162. Qing J, Du X, Chen Y, et al. Antibody-based targeting of FGFR3 in bladder carcinoma and t(4;14)-positive multiple myeloma in mice. *J Clin Invest* 2009;119:1216-1229.
163. Platt FM, Hurst CD, Taylor CF, et al. Spectrum of phosphatidylinositol 3-kinase pathway gene alterations in bladder cancer. *Clin Cancer Res* 2009;15:6008-6017.
164. Munster P. PI3K kinase inhibitor GSK2126458 (GSK458): clinical activity in select patient (PT) populations defined by predictive markers (study P3K112826) [abstract]. *Ann Oncol* 2012;23:4420.
165. Bellmunt J, Pons F, Orsola A. Molecular determinants of response to cisplatin-based neoadjuvant chemotherapy. *Curr Opin Urol* 2013;23:466-471.
166. Hahn NM, Stadler WM, Zon RT, et al. Phase II trial of cisplatin, gemcitabine, and bevacizumab as first-line therapy for metastatic urothelial carcinoma: Hoosier Oncology Group GU 04-75. *J Clin Oncol* 2011;29:1525-1530.