

**ANNALES
ACADEMIAE MEDICAE
GEDANENSIS
TOM XXXIX
2009
SUPPLEMENT 5**

GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

Beata Schlichtholz

**Zmiany genetyczne i epigenetyczne
w raku pęcherza moczowego**

***Genetic and epigenetic alterations in cancer
of the urinary bladder***

Rozprawa habilitacyjna

Katedra i Zakład Biochemii
Wydziału Lekarskiego
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
Kierownik: Prof. dr hab. med. Julian Świerczyński

GDAŃSK 2009

Wydano za zgodą
Senackiej Komisji Wydawnictw Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

REDAKTOR NACZELNY

EDITOR-IN-CHIEF
prof. dr Marek Grzybiak

KOMITET REDAKCYJNY

EDITORIAL BOARD

Z-ca redaktora naczelnego – prof. dr Zbigniew Machaliński,
sekretarz redakcji – dr Włodzimierz Kuta,
prof. dr Zdzisław Bereznowski, prof. dr Andrzej Hellmann, prof. dr Józef Jordan,
mgr Józefa de Laval, prof. dr Jerzy Łukasiak, prof. dr Stefan Raszeja

ADRES REDAKCJI

ADDRESS OF EDITORIAL OFFICE
Annales Academiae Medicae Gedanensis
Zakład Anatomii Klinicznej
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk, Poland
e-mail: annales@gumed.edu.pl

Artykuły opublikowane w Annales AMG
są zamieszczane w bazie EMBASE

Articles published In Annales AMG are covered
by the Excerpta Medica database (EMBASE)

PL ISSN 0303–4135

Gdański Uniwersytet Medyczny

SPIS TREŚCI

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	10
1. WSTĘP.....	15
1.1. Mechanizm procesu nowotworzenia.....	15
1.2. Epidemiologia i etiologia raka pęcherza moczowego.....	16
1.3. Morfologia raka pęcherza moczowego	18
1.4. Defekty genetyczne w raku pęcherza moczowego	19
1.4.1. Aberracje chromosomowe.....	19
1.4.2. Niestabilność mikrosatelitarna	21
1.4.3. Telomery i aktywność telomerazy	22
1.4.4. Onkogeny i supresory transformacji nowotworowej	23
1.5. Mikrośrodowisko guza pęcherza moczowego.....	43
1.6. Zmiany epigenetyczne w raku pęcherza moczowego.....	44
1.6.1. Hipermetylacja DNA	44
1.6.2. Hipometylacja DNA a proces nowotworzenia	50
1.6.3. Modyfikacja struktury i funkcji białek chromatyny	51
1.6.4. Zależne od RNA wyciszanie ekspresji genów.....	53
1.7. Markery nowotworowe w diagnostyce i prognostyce raka pęcherza moczowego	55
1.8. Perspektywy zastosowania badań molekularnych w terapii raka pęcherza moczowego.....	60
2. CEL PRACY.....	63
3. MATERIAŁY I METODY	64
3.1. Materiał tkankowy	64
3.2. Izolacja RNA i synteza cDNA.....	65
3.3. Amplifikacja cDNA genu <i>TP53</i> metodą PCR.....	66
3.4. Homologiczna rekombinacja w systemie drożdżowym	66
3.5. Sekwencjonowanie cDNA genu <i>TP53</i>	71
3.6. Detekcja autoprzeciwciał anty-p53 z wykorzystaniem testu ELISA	72
3.7. Modyfikacja genomowego DNA wodorosiarczynem sodu	72
3.8. Amplifikacja zmodyfikowanego DNA wg Hermana.....	73
3.9. Amplifikacja <i>loci</i> mikrosatelitarnych metodą PCR	74
3.10. Analiza statystyczna	75
4. WYNIKI.....	76
4.1. Analiza częstości występowania i rozmieszczenia mutacji w genie <i>TP53</i> z wykorzystaniem systemu drożdżowego w raku pęcherza moczowego.....	76
4.1.1. Analiza częstości występowania i rozmieszczenia mutacji w genie <i>TP53</i> w guzie oraz w komórkach z osadu moczu.....	76
4.1.2. Analiza przeżycia	80
4.2. Analiza częstości występowania autoprzeciwciał anty-p53 w osoczu chorych na raka pęcherza moczowego w relacji z mutacją w genie <i>TP53</i> i wybranymi czynnikami klinicznymi	83
4.3. Ocena wartości rokowniczej metylacji regionu 5' genów <i>MLH1</i> , <i>MGMT</i> i <i>DAPK</i> u chorych na raka pęcherza moczowego.....	85
4.3.1. Analiza metylacji regionu 5' genu <i>MLH1</i> , <i>MGMT</i> i <i>DAPK</i> w guzie oraz komórkach z osadu moczu.....	85
4.3.2. Ocena obecności metylacji regionu 5' genów <i>MLH1</i> , <i>MGMT</i> i <i>DAPK</i> w relacji z mutacją w genie <i>TP53</i>	89

4.3.3. Analiza czasu wolnego od wznowy oraz czasu przeżycia	90
4.4. Analiza niestabilności genomowej w <i>locus</i> genu <i>MSH2</i> i <i>MLH1</i> w relacji do niestabilności mikrosatelitowej w raku pęcherza moczowego	92
5. DYSKUSJA	95
6. WNIOSKI	106
7. STRESZCZENIE	107
8. SUMMARY	110
9. PIŚMIENNICTWO	113

Podziękowania:

*Serdeczne podziękowania za okazaną pomoc,
radę oraz ogromne wsparcie kieruję
do profesora Juliana Świerczyńskiego*

*Dziękuję również kolegom i koleżankom
z Zakładu i Katedry Biochemii GUMed
za dobrą atmosferę pracy i okazaną pomoc*

*Szczególne podziękowania składam mojemu mężowi
za wielką cierpliwość i wyrozumiałość
oraz za to, że zawsze mogłam na niego liczyć*

*Praca była częściowo finansowana w ramach
projektu badawczego KBN nr 6 P05A 092 20*

W tekście niniejszej rozprawy wykorzystałam wykonane przeze mnie fragmenty prac zespołowych, będących przedmiotem następujących publikacji:

1. **Schlichtholz B.**, Presler M., Matuszewski M.: Clinical implications of p53 mutation analysis in bladder cancer tissue and urine sediment by functional assay in yeast. *Carcinogenesis* 2004, 25, 2319.
2. Turyn J., Matuszewski M., **Schlichtholz B.**: Genomic instability analysis of urine sediment versus tumor tissue in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Oncol.Rep.* 2006, 15, 259.
3. **Schlichtholz B.**, Presler M., Matuszewski M.:Hypermethylation of the 5' regions of *MLH1*, *MGMT* and *DAPK* in relation to *p53* status and overall survival in human bladder cancer – manuskrypt w przygotowaniu.

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

ABH	<i>ABH blood group</i> / układ grupowy ABH
AMPK	<i>protein kinase, AMP activated</i> / kinaza białkowa aktywowana AMP
APC	<i>adenomatous polyposis coli</i> / gen polipowatości gruczolakowatej okrężnicy
ATM	<i>ataxia telangiectasia mutated</i> / gen zespołu ataksja-teleangiektazja
ATR	<i>ataxia telangiectasia and Rad3 related</i>
BAD	<i>BCL2-associated agonist of cell death</i> / związany z BCL2 agonista śmierci komórki
BAX	<i>BCL2-associated X protein</i> / białko X łączące się z BCL2
BCG	<i>Bacillus Calmette Guérin</i> / szczepionka przeciw gruźlicy
BCL2	<i>B-cell lymphoma 2</i> / produkt protoonkogenu Bcl-2
BCL2L1	<i>BCL2-like 1</i> / podobny do BCL2
BIRC5	<i>baculoviral IAP repeat-containing protein 5</i> / białko z rodziny inhibitorów apoptozy – surwiwina
Bn	symbol oznaczający materiał tkankowy pobrany od chorego na raka pęcherza moczowego
CBP	<i>CREB (cAMP response element-binding protein)-binding protein</i> / białko wiążące CREB
CCND1	<i>cyclin D1</i> / cyklina D1
CCND2	<i>cyclin D2</i> / cyklina D2
CDC20	<i>cell division cycle 20 homolog (S. cerevisiae)</i> / gen cyklu komórkowego
CDK	<i>cyclin dependent kinase</i> / kinaza cyklinozależna
CD44	<i>CD44 antigen</i> / antygen CD44
CDH1	<i>cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)</i> / kadheryna E
CDH4	<i>cadherin 4, type 1, R-cadherin (retinal)</i> / kadheryna 4, typ 1, kadheryna R
cDNA	<i>complementary DNA</i> / DNA komplementarny do mRNA (wyprodukowany przez tzw. odwrotną transkryptazę)
CHD1	<i>chromodomain helicase DNA-binding protein-1</i> / czynnik remodelujący chromatynę zależny od ATP
CHK-1	<i>cell cycle checkpoint kinase</i> / kinaza białkowa punktu kontrolnego cyklu komórkowego
CI	<i>confidence interval</i> / przedział ufności
CIS (Tis)	<i>carcinoma in situ</i> / rak śródnowłonkowy
CK	<i>casein kinase</i> / kinaza kazeinowa
DAPK	<i>death-associated protein kinase 1</i> / kinaza białkowa związana ze śmiercią
DBC1	<i>deleted in bladder cancer 1</i> / nieobecny w raku pęcherza 1
DDB2	<i>DNA damage-binding protein 2</i> / białko 2 łączące się z uszkodzonym DNA

DNMT	<i>DNA methyltransferase</i> / metylotransferaza DNA
dTMase	<i>DNA demethylase</i> / demetylaza DNA
E2F	<i>E2F transcription factor</i> / czynnik transkrypcyjny E2F
EDNRB	<i>endothelin receptor type B</i> / endotelialny receptor typu B
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i> / receptor nabłonkowego czynnika wzrostu
ERBB2	<i>v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2</i> / protoonkogen kodujący białko o funkcji receptorowej kinazy tyrozynowej będący homologiem wirusowego onkogenu zidentyfikowanego w wirusie erytroblastozy ptaków
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinases</i> / kinazy białkowe MAPK aktywowane przez czynniki wzrostowe
FGF	<i>fibroblast growth factor</i> / czynnik wzrostu fibroblastów
FGFR3	<i>fibroblast growth factor receptor 3</i> / receptor 3 FGF
FISH	<i>fluorescent in situ hybridization</i> / fluorescencyjna hybrydyzacja in situ
GADD45	<i>growth arrest-and DNA damage-inducible gene</i> / gen indukowany zahamowaniem wzrostu i uszkodzeniem DNA
GRB	<i>growth factor receptor-bound protein</i> / białko cytoplazmatyczne uczestniczące w transdukcji sygnału
GSK3	<i>glycogen synthase kinase 3</i> / kinaza 3 syntazy glikogenu
GSTP1	<i>glutathione S-transferase pi 1</i> / transferaza S-glutationu
HDAC	<i>histone deacetylase</i> / deacetylaza histonu
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i> / czynnik wzrostu hepatocytów
HIC-1	<i>hypermethylated in cancer 1</i> / hipermetylowany w raku
HIF-1- α	<i>hypoxia inducible factor-1</i> / czynnik indukowany hipoksją
hTERT	<i>human telomerase reverse transcriptase</i> / podjednostka białkowa ludzkiej telomerazy
hTR	<i>human telomerase RNA</i> / podjednostka RNA ludzkiej telomerazy
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i> / Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem
IGFBP3	<i>insulin-like growth factor binding protein 3</i> / białko 3 wiążące insulinopodobny czynnik wzrostu
JAK	<i>Janus kinase</i> / kinaza Janusa
JUN	<i>jun oncogene</i> / onkogen jun
LINE	<i>long interspersed nuclear elements</i> / długie sekwencje rozproszone
LOH	<i>loss of heterozygosity</i> / utrata heterozygotyczności
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i> / kinaza białkowa aktywowana mitogenem
MAPKK	<i>MAP kinase kinase</i> / kinaza kinazy MAP
MAPKKK	<i>MAP kinase kinase kinase</i> / kinaza kinazy kinazy MAP
MCM	<i>minichromosomal maintenance proteins</i> / białka biorące udział w inicjacji replikacji DNA
MDM2	<i>mouse double minute 2 homolog</i>

MeCP2	<i>methyl-CpG-binding protein 2</i> / białko 2 wiążące metylo-CpG
MET	<i>met proto-oncogene</i> / protoonkogen MET
MGMT	<i>O6-methylguanine-DNA methyltransferase</i> / metylotransferaza O6-metyloguaniny DNA
miRNA	<i>microRNA</i> / mikroRNA
miR-34α	mikroRNA 34α
MLH1	<i>human mutL homolog 1 gene</i> / ludzki gen kodujący białko MLH1 będący homologiem mutL E. coli
MMP	<i>matrix metalloproteinases</i> / metaloproteinazy macierzy
MMR	<i>mismatch repair</i> / system naprawy błędnie sparowanych zasad
mRNA	<i>messenger RNA</i> / informacyjny RNA
MSI	<i>microsatellite instability</i> / niestabilność mikrosatelitarna
MSH2	<i>human mutS homolog 2 gene</i> / ludzki gen kodujący białko MSH2 będący homologiem mutS E. coli
MSP	<i>methylation specific PCR</i> / reakcja PCR specyficzna dla metylowanych sekwencji
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i> / kinaza mTOR
MYC	<i>v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog</i> / białko kodowane przez protoonkogen MYC, będący homologiem wirusowego onkogenu zidentyfikowanego w wirusie białaczki ptaków
NEDD8	<i>neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 8</i>
NOXA	<i>phorbol-12-Myristate-13-acetate-induced protein</i> / mediator apoptozy zależnej od białka p53
NMP22	<i>nuclear matrix protein 22</i> / białko 22 macierzy jądra
OR	<i>odds ratio</i> / iloraz szans
P	<i>p-value</i> / poziom istotności
p16INK4A (CDKN2A)	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2A gene</i> / inhibitor kinaz cyklinozależnych gen 2A
p53AIP1	<i>p53-regulated Apoptosis Inducing Protein 1</i> / białko 1 indukujące apoptozę zależne od p53
p53R2	<i>ribonucleotide reductase, M2 B</i> / reduktaza rybonukleotydowa
p300	<i>E1A binding protein p300</i> / białko p300 łączące się z E1A, acetylo-transferaza histonów
PAI	<i>plasminogen activator inhibitor</i> / inhibitor aktywatora plazminogenu
PCAF	<i>p300/CBP Associating Factor</i> / czynnik związany z p300/CBP
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i> / antygen jądrowy komórki proliferującej
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> / łańcuchowa reakcja polimerazy
PDGF	<i>platelet derived endothelial cell growth factor</i> / płytkowo-pochodny czynnik wzrostu komórek śródbłónka
PI3K	<i>phosphatidylinositol 3-kinase</i> / kinaza 3-fosfatydyloinozytolu
PKB/AKT	<i>protein kinase B/virus akt8 oncogene</i> / kinaza białkowa B opisywana również symbolem AKT

PPARD	<i>peroxisome proliferator-activated receptor delta</i> / receptor typu delta aktywowany przez proliferatory peroksysomów
PTCH	<i>patched homolog 1(Drosophila)</i> / homolog genu patched u <i>Drosophila</i>
PTEN	<i>phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10</i> / koduje fosfatazę białek i lipidów
PUMA	<i>p53 up-regulate modulator of apoptosis</i> / zależne od p53 białko promujące apoptozę
pz	para zasad
RARB	<i>retinoic acid receptor-β gene</i> / receptor kwasu retinowego
RASSF1A	<i>ras association domain family 1A gene</i> / gen 1A rodziny wiążącej się z Ras
RB1	<i>retinoblastoma 1</i> / retinoblastoma 1
Reprimo	<i>reprimo, TP53 dependent G2 arrest mediator candidate</i> / regulator cyklu komórkowego indukowany przez białko p53
RT	<i>reverse transcriptase</i> / odwrotna transkryptaza
RTK	<i>receptor tyrosine kinase</i> / receptor kinazy tyrozynowej
S6K	<i>ribosomal S6 kinase</i> / kinaza rybosomowa S6
SAM	S-adenozynometionina
siRNA	<i>short interfering RNA</i> / krótki dwuniciowy fragment RNA
SH2	<i>Src homology-2</i> / domena homologii z białkiem Src
SIRT-1	<i>S. cerevisiae, homolog-like 1</i> / ludzka sirtuina
SNF2	katalityczna podjednostka kompleksu SWI/SNF
SOS	<i>son of sevenless</i> / czynnik wymiany nukleotydu
Src	<i>v-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog (avian)</i> / kinaza tyrozynowa
STAT	<i>signal transducers and activators of transcriptions</i> / białka transdukcji sygnałów i aktywacji transkrypcji
SUMO-1	<i>small ubiquitin-like modifier</i> / ubikwitynopodobne małe białko modyfikujące
SWI/SNF	<i>Switch/Sucrose non fermenting</i> / kompleks zależny od ATP biorący udział w przebudowie chromatyny i regulacji ekspresji genów
TCC	<i>transitional cell carcinoma</i> / rak przejściowokomórkowy
TGF- α	<i>tumor growth factor α</i> / transformujący czynnik wzrostu - α
TGF- β	<i>tumor growth factor β</i> / transformujący czynnik wzrostu - β
TIGAR	<i>TP-53 induced glycolysis and apoptosis activator</i> / indukowany przez TP53 aktywator glikolizy i apoptozy
TIMP	<i>tissue inhibitor of metalloproteinase</i> / tkankowy inhibitor metaloproteinazy
TNFRSF25	<i>tumor necrosis factor receptor superfamily, member 25</i> / receptor superrodziny czynnika martwicy nowotworu, członek 25
TNFRSF10B	<i>tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10B</i> / receptor superrodziny czynnika martwicy nowotworu, członek 10B)
TNM	<i>Tumour, Noduli, Metastases</i> / guz, węzeł, przerzut

TP53	<i>tumor protein p53</i> / białko nowotworowe p53
TRAF	<i>TNF-associated factors</i> / czynnik związany z receptorem TNF
TSC1	<i>tuberous sclerosis 1</i> / hamartyna
TSC2	<i>tuberous sclerosis2</i> / tuberyna
TSP1	thrombospondin 1 / trombospondyna
TUR	<i>transurethral resection</i> / elektroresekcja przezcewkowa
uPA	<i>urinary plasminogen activator</i> / urokinaza
uPAR	receptor uPA
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i> / naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu
VEGFR	receptor VEGF
WHSC1	<i>Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1</i> / gen syndromu Wolf-Hirschhorna
WWOX	<i>WW domain containing oxidoreductase</i> / oksydoreduktaza zawierająca domenę WW

Nazwy genów oraz skróty nazw opracowano na podstawie baz danych dostępnych w sieci na stronie HUGO Gene Nomenclature Committee:

<http://www.genenames.org>

National Center for Biotechnology Information (NCBI), Online Mendelian Inheritance in Man:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?=gene>

oraz GeneCards:

<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl>.

1. WSTĘP

1.1. Mechanizm procesu nowotworzenia

Onkogeneza jest złożonym oraz wieloetapowym procesem akumulacji defektów genetycznych i zmian epigenetycznych, które prowadzą od inicjacji poprzez promocję do progresji choroby nowotworowej. Jest powszechnie uznawane, że progresja nowotworu jest formą somatycznej ewolucji, w trakcie, której mutacje somatyczne nadają komórce przewagę nad innymi umożliwiając jej selektywną proliferację [34]. Mutacje somatyczne tłumaczą klonalne pochodzenie nowotworu oraz nieodwracalność procesu nowotworowego, co zostało zaobserwowane w 1914 roku przez Bovery'ego. Obecnie dominuje pogląd, że procesowi nowotworzenia towarzyszą dynamiczne zmiany w genomie, które związane są z zaburzeniem równowagi pomiędzy protoonkogenami promującymi wzrost a supresorami transformacji nowotworowej hamującymi podziały komórkowe. Zmiany te są najczęściej wynikiem od 4 do 6 mutacji w tych dwóch grupach genów [323]. Całkowita liczba mutacji w komórce nowotworowej jest jednak zdecydowanie wyższa, ocenia się ją na 11 000 i więcej, co jest wynikiem akumulacji mutacji przed oraz w trakcie transformacji nowotworowej [379, 390]. Liczba mutacji znacznie wzrasta w przypadku nowotworu o fenotypie mutatorowym, związanym z mutacjami w genach odpowiedzialnych za dokładność procesu replikacji DNA i/lub naprawę uszkodzeń DNA [239]. Duża heterogenność nowotworów stała się podstawą hipotezy zakładającej, że fenotyp mutatorowy charakteryzujący się zwiększoną liczbą mutacji punktowych, niestabilnością mikrosatelitarną (MSI) oraz utratą heterozygotyczności (LOH) jest niezbędny do pojawienia się transformacji nowotworowej [240]. Należy także zwrócić uwagę na hipotezę zakładającą, że aneuploidia indukowana kancerogenami może być niezależną i prawdopodobnie wystarczającą przyczyną transformacji nowotworowej [85]. Duesberg i wsp., [84] określają nowotwór jako chorobę chromosomów. Dyskusja czy aneuploidia jest przyczyną czy też konsekwencją nowotworu wciąż trwa. Niezaprzeczalnym jest jednak fakt, że proces nowotworzenia jest wynikiem nakładających się na siebie predyspozycji genetycznych, zmian zachodzących w wyniku starzenia się organizmu (np. metylacji wysp CpG) oraz ekspozycji na kancerogenne czynniki środowiskowe. Proces ten wiąże się z aktywnym nabywaniem przez komórkę nowych funkcji w tym szybkiej adaptacji do zmiany środowiska i zdolności oddziaływania na komórki prawidłowe. Zgodnie z propozycją Hanahan i Weinberg [147] przyjęto, że sześć zmian komórkowych prowadzi zespołowo do przemiany komórki normalnej w nowotworową i są to: a) samowystarczalność w generowaniu sygnałów wzrostu i autokrynną stymulacją; b) niewrażliwość na sygnały hamujące wzrost; c) uniknięcie apoptozy; d) nieograniczony potencjał replikacyjny; e) trwała angiogeneza; f) inwazja tkankowa oraz zdolność do przerzutów.

1.2. Epidemiologia i etiologia raka pęcherza moczowego

Rak pęcherza moczowego jest najczęściej występującym nowotworem układu moczowego u mężczyzn. W latach 1991-2000 liczbę nowych zachorowań na świecie oszacowano na około 350 000, a liczbę zgonów na 145 000 [180]. Największe zagrożenie rakiem pęcherza moczowego obserwuje się w krajach Ameryki Północnej, Europy Południowej i Zachodniej oraz Afryce Północnej. Najwyższe standaryzowane względem wieku współczynniki zachorowalności u mężczyzn odnotowano w Egipcie (37,1/100 tys.), Hiszpanii (33/100 tys.) oraz Holandii (32,6/100 tys.) [180]. W 2006 roku w Polsce zarejestrowano około 4000 przypadków raka pęcherza moczowego u mężczyzn, co stanowi 6,2% wszystkich zachorowań na nowotwory złośliwe (tab. 1A). U kobiet nowotwór ten ze względu na liczbę nowych zachorowań zajmuje szesnastą pozycję wśród najczęściej występujących nowotworów złośliwych (tab. 1A). Pomimo nowoczesnych metod leczenia śmiertelność jest wysoka i niepokojąco wzrasta na przestrzeni ostatnich 26 lat (ryc. 1). Rak pęcherza moczowego jest szóstą pod względem częstości przyczyną zgonów mężczyzn z powodu chorób nowotworowych w Polsce (tab. 1B). Ponadto Polska z powodu wysokiego współczynnika standaryzowanego dla zgonów (8,4/100 tys.) znajduje się na trzecim miejscu w Europie pod względem umieralności na raka pęcherza moczowego zaraz po Danii (10,4/100 tys.) oraz Hiszpanii (9,1/100 tys.) [180].

Do najważniejszych czynników ryzyka należy wiek, płeć, palenie papierosów, dieta, przewlekły stan zapalny, terapia cyklofosfamidem, przyjmowanie leków zawierających fenacetynę oraz kontakt z czynnikami chemicznymi w niektórych grupach zawodowych, zwłaszcza osób o zwiększonej podatności osobniczej, tj. osób z wolno metabolizującym fenotypem acetylacji ksenobiotyków [157]. Zakłada się, że około 20% raków pęcherza moczowego wynika z charakteru pracy zawodowej i kontaktu głównie z aminami aromatycznymi, takimi jak 2-naftyloamina i benzydyna [172]. W związku z tym szczególnie narażeni są pracownicy przemysłu skórzanego, gumowego, aluminium, malarze oraz fryzjerzy. Podatność zachorowania na raka pęcherza moczowego związana nie tylko z fenotypem acetylacji, ale również z genetycznym polimorfizmem enzymów metabolizujących substancje kancerogenne, takich jak S-transferaza glutationowa, N-acetylotransferaza, sulfonotransferaza, oraz cytochrom P450 [171]. Ponadto czynnikiem biologicznym indukującym rozwój głównie płaskonabłonkowego raka pęcherza moczowego jest infekcja pasożytem *Schistosoma haematobium* szczególnie częsta w krajach Afryki Północnej [8].

Tabela 1A. Zarejestrowane zachorowania na nowotwór złośliwy pęcherza moczowego w Polsce w roku 2006 (dane wg Krajowego Rejestru Nowotworów)

Table 1A. Registered incidence of invasive bladder cancer in Poland in year 2006 (according to National Cancer Registry)

Płeć <i>Sex</i>	N	Współczynnik surowy ¹ <i>Crude rate</i>	Współczynnik standaryzowany ² <i>Age-standardized rate</i>	Wskaźnik struktury % <i>Rate structure %</i>	Kolejność występowania <i>Order of apperance</i>
Kobiety <i>Female</i>	1101	5,6	3,0	1,78	16
Mężczyźni <i>Male</i>	3998	21,7	15	6,24	4

¹ współczynnik surowy na 100 tys. ludności; ² Współczynnik standaryzowany wg wieku; na 100 tys. ludności

¹ crude rate per 100 000 population; ² age-standardized rate per 100 000 population

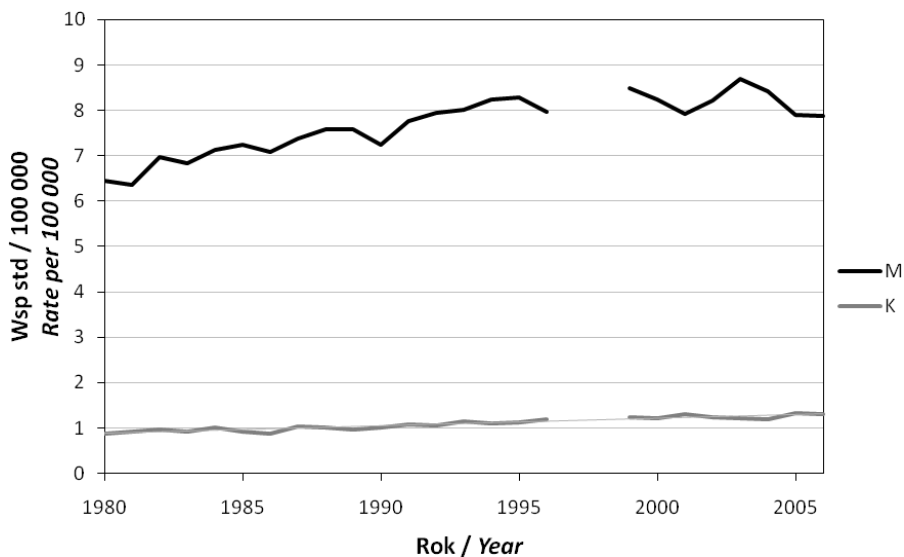
Tabela 1B. Zgony z powodu nowotworu złośliwego pęcherza moczowego w Polsce w roku 2006 (dane wg Krajowego Rejestru Nowotworów)

Table 1B. Invasive bladder cancer mortality in Poland in year 2006 (according to National Cancer Registry)

Płeć <i>Sex</i>	N	Współczynnik surowy ¹ <i>Crude rate</i>	Współczynnik standaryzowany ² <i>Age-standardized rate</i>	Wskaźnik struktury % <i>Rate structure %</i>	Kolejność występowania <i>Order of apperance</i>
Kobiety <i>Female</i>	588	3	1,3	1,48	19
Mężczyźni <i>Male</i>	2218	12	8	4,28	6

¹ współczynnik surowy na 100 tys. ludności; ² Współczynnik standaryzowany wg wieku; na 100 tys. ludności

¹ crude rate per 100 000 population; ² age-standardized rate per 100 000 population



Ryc. 1. Zgony z powodu raka pęcherza moczowego wg płci, Polska 1980-2006 (dane według Krajowego Rejestru Nowotworów); M – mężczyźni; K – kobiety

Fig. 1. Bladder cancer mortality according to sex, Poland 1980-2006 (according to National Cancer Registry); M – males; K – females

1.3. Morfologia raka pęcherza moczowego

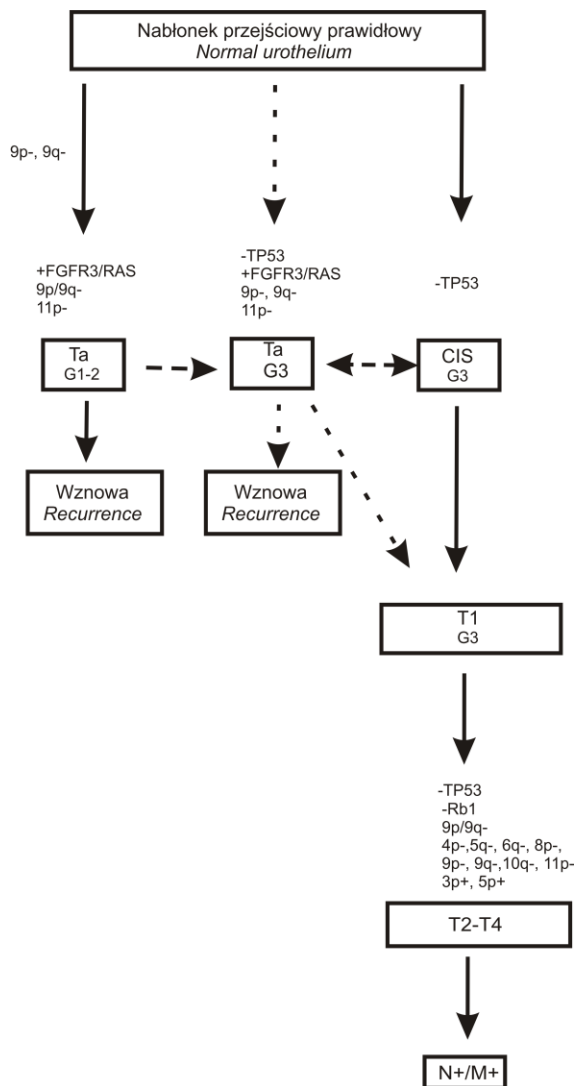
Nowotwory pęcherza moczowego wywodzą się z nabłonka przejściowego i w 90% przypadków są to tzw. raki przejściowokomórkowe (*transitional cell carcinoma, TCC*), 5-10% to raki płaskonabłonkowe i 2-3% to raki o utkaniu gruczołowym. Występują one w postaci powierzchownej (CIS–Ta–T1) lub naciekającej (T2–T3–T4). U około 70% chorych w chwili rozpoznania rak jest ograniczony do błony śluzowej (CIS–Ta) lub podśluzowej (T1). Guzy brodawkowate (Ta) dobrze roją, jakkolwiek ryzyko wznowy sięga 70%, a 10–45% przypadków ulega progresji do formy inwazyjnej [158]. Raki śródna-błonkowe (CIS) źle zróżnicowane morfologicznie ulegają progresji w 50-75% przypadków a odsetek wznów przekracza 80% [426]. Guzy naciekające błonę mięśniową (T2–T4) występują u około 30% chorych, są związane ze znacznie gorszym rokowaniem i jeżeli nie zostanie zastosowana radykalna terapia, to u ponad połowy chorych rozwijają się przerzuty w ciągu 2 lat [368].

1.4. Defekty genetyczne w raku pęcherza moczowego

1.4.1. Aberracje chromosomowe

Rak pęcherza moczowego charakteryzuje się dużą niestabilnością genomu, czego dowodem jest znaczna liczba zmian na poziomie genów, jak i chromosomów. Analizy cytogenetyczne oraz genetyka molekularna wskazały na istnienie dwóch głównych szlaków biorących udział w patogenezie raka pęcherza moczowego (ryc. 2) [374]. Jeden ze szlaków charakteryzujący się aberracjami chromosomu 9 oraz zmianami poziomu cyklin regulujących cykl komórkowy, prowadzi do rozwoju dobrze zróżnicowanego nieinwazyjnego raka brodawczakowatego. Drugi szlak, w którym inaktywacja supresorów transformacji nowotworowej, takich jak p53 oraz RB1 jest szczególnie często obserwowana, związany jest z inwazyjnym rakiem pęcherza moczowego. Prawdopodobnym jest również istnienie trzeciego szlaku prowadzącego do powstania zło zróżnicowanego stadium Ta ulegającego progresji do formy inwazyjnej [200]. Aberracje chromosomowe zarówno liczbowe jak i strukturalne są powszechnym zjawiskiem w raku pęcherza moczowego [125]. Delecje czy też duplikacje fragmentów lub całych chromosomów, jak również amplifikacje regionów DNA są cechami niestabilności chromosomowej (*chromosomal instability* – CIN) [222]. Analizy kariotypu komórek nowotworowych pęcherza moczowego wykazały aberracje liczbowe głównie chromosomów 1, 7, 8, 9, 11 oraz liczne aberracje strukturalne zlokalizowane najczęściej w regionach kodujących protoonkogeny lub supresory transformacji nowotworowej [94, 168]. Szczególnie często obserwuje się aberracje prowadzące do utraty materiału genetycznego chromosomów 8p (54%), 9q (60%), 10q (54%), 17p (45%) i Y (50%) oraz nabycia materiału genetycznego chromosomów 1q (36%), 6p (54%), 8q (45%), 17q (73%) [324]. Amplifikacje dotyczą głównie chromosomów 10q (33%), 17q (24%), 1q (11%) i 20q (9%) [324]. Rak brodawczakowaty (Ta, G1-2) uznawany powszechnie, jako genetycznie stabilny charakteryzuje się rzadko występującym nabyciem materiału genetycznego chromosomów 1q, 17q i 20q, amplifikacją 11q oraz utratą 9p, 9q, 10q, 11p, i Y [199]. W niestabilnym genetycznie raku inwazyjnym (T1-T4) badania kariotypowe wykazały utratę chromosomów 2q, 4p, 4q, 5q, 6q, 8p, 9p, 9q, 10q, 11p, 11q, 13q, 17p, 18p, 18q i Y, nabycie materiału genetycznego chromosomów 1q, 3p, 3q, 5p, 6p, 8q, 10p, 17q, 19p, 19q, 20p i 20q oraz amplifikację 1q, 3p, 6p, 8p, 8q, 10p, 10q, 11q, 12q, 17q, 20q [199].

Trisomia chromosomu 7 pojawia się we wczesnej fazie TCC i może wskazywać na nieinwazyjny charakter nowotworu [18]. Molekularną konsekwencją trisomii chromosomu 7 jest wzrost liczby alleli kodujących receptor naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR). Polisomia chromosomu 7 i 17 oraz monosomia chromosomu 9 wykazują asocjację ze zwiększonym ryzykiem wznowy [12, 419], zaś aberracje chromosomów 8, 10 oraz 11 wykazują związek z progresją nowotworu.



Ryc. 2. Model patogenezy raka pęcherza moczowego. Dwa główne szlaki prowadzą bądź do rozwoju dobrze zróżnicowanego raka Ta lub poprzez stadium CIS do naciekającego mięśniówkę raka T2–T4. Ostatnio sugeruje się istnienie trzeciego szlaku (środkowego), który prowadzi do powstania słabo zróżnicowanego raka Ta. Mechanizm progresji tego nowotworu do stopnia T1 nie jest znany. Utrata chromosomu 9, mutacja genów *FGFR3* i *RAS* są identyfikowane z wysoką częstością w powierzchniowym raku brodawkowatym. Mutacje w genie *TP53* i *RB1* są charakterystyczne dla raków inwazyjnych (wg Knowles et al. [200], zmodyfikowany)

Fig. 2. Model of bladder cancer pathogenesis. Two major pathways lead to the development either low-grade Ta tumors or via CIS to muscle-invasive T2–T4 tumors. Recently, the third pathway (middle) leading to high-grade Ta tumors has been suggested. The mechanism of its progression to T1 tumor is not clear. Chromosome 9 loss, *FGFR3* and *RAS* mutations are found at high frequency in superficial papillary tumours. Mutations in *TP53* and *RB1* gene are characteristic of invasive tumors. (Adapted from Knowles et al. [200], modified)

Aberracje chromosomowe najczęściej dotyczą chromosomu 9 [-9, del(9p), del(9q)] i są obserwowane zarówno w raku powierzchniowym jak i inwazyjnym [102]. Całkowita utrata chromosomu 9 obserwowana jest w 50% przypadków raka pęcherza moczowego, zaś delecje prowadzące do utraty heterozygotyczności (LOH) w obrębie chromosomu 9 stanowią najczęściej występującą aberrację w przypadku raka przejściowokomórkowego, niezależnie od jego stopnia zaawansowania i złośliwości [36]. Zmiany w postaci LOH pojawiają się już w początkowych stadiach choroby nowotworowej i są związane przede wszystkim z delecjami *locus* 9p21 chromosomu 9, prowadzącymi do utraty supresora transformacji nowotworowej – genu *p16INK4A* (*CDKN2A*) [37]. Utrata *loci* 3p14, 8p21, 11p15, 13q14 i 17p13 koreluje z wyższym stopniem zaawansowania i naciekaniem błony mięśniowej pęcherza moczowego [144, 201, 318], podczas gdy delecja chromosomu 9q nie wykazuje zależności ze stopniem zaawansowania i/lub złośliwości [331]. Analiza aberracji chromosomowych wskazuje, że najczęściej inaktywacji w wyniku delecji ulega gen *RB1* (13q14.2), *TP53* (17p13.1) oraz *p16INK4A* (*CDKN2A*) (9p21), zaś amplifikacji gen *EGFR* (7p12) i *ERBB2* (17q21.1) [35, 95, 318]. Amplifikacje genów często towarzyszą progresji raka pęcherza moczowego i reprezentują jeden z mechanizmów aktywacji protoonkogenów.

1.4.2. Niestabilność mikrosatelitarna

Drugim rodzajem niestabilności genomu poza CIN jest niestabilność mikrosatelitarna (MSI) [222]. Mikrosatelity są wysoce polimorficznymi regionami DNA równomiernie rozproszonymi w genomie. Regiony te, zlokalizowane głównie w sekwencjach intronowych genów, składają się z tandemowych powtórzeń sekwencji 1-5 nukleotydowej. Duża zmienność *loci* mikrosatelitarnych czyni je użytecznym narzędziem wykorzystywanym do genotypowania DNA. Zmiany w liczbie powtórzeń (na skutek insercji lub delecji motywów powtórzeń) obserwowane są w wielu chorobach nowotworowych w tym w raku pęcherza moczowego [243]. Po raz pierwszy związek pomiędzy występowaniem MSI a mutacjami w genach MMR został zaobserwowany w przypadku dziedzicznego niepolipowatego raka jelita grubego (*hereditary nonpolyposis colorectal cancer* – HNPCC) [311]. Wysoka częstość MSI w HNPCC wynosząca 75-100% jest

wynikiem mutacji germinalnych, głównie w genach *MLH1* (*mutL homolog 1*) i *MSH2* (*mutS homolog 2*) [1, 232]. Mutacje tych genów występują stosunkowo rzadko w nowotworach sporadycznych, w których inaktywacja MMR związana jest przede wszystkim z wyciszeniem ekspresji *MLH1* poprzez metylację sekwencji 5' genu [314]. W sporadycznym raku okrężnicy częstość MSI wynosi 15% [396], podczas gdy w raku pęcherza moczowego około 16%, jakkolwiek istnieją duże rozbieżności w wynikach badań [333, 392]. Bonnal i wsp. [26] nie stwierdzili MSI w czterech liniach komórkowych i 33 przypadkach TCC pęcherza moczowego, używając do tego 6 markerów mikrosatelitarnych, podczas gdy badania Christensen i wsp. [55] wykazały obecność MSI w 100% analizowanych przypadków przy użyciu 22 markerów mikrosatelitarnych. Nie ma także zgodności, co do korelacji pomiędzy częstością MSI a danymi klinicznymi. Stwierdzono zarówno istnienie związku, jak i jego brak pomiędzy obecnością MSI a stopniem zaawansowania i złośliwości nowotworu [55, 133, 340]. Rozbieżności te wskazują na konieczność ustalenia liczby oraz rodzaju polimorficznych markerów mikrosatelitarnych, które zapewniłyby jak największą czułość i specyficzność analiz. Z klinicznego punktu widzenia niezwykle istotny jest fakt, że analiza mikrosatelitarna obejmująca zarówno analizę LOH, jak i MSI charakteryzuje się 95% czułością detekcji raka pęcherza moczowego w porównaniu z 50% czułością analizy cytologicznej [251]. Stanowi ona tym samym alternatywną, nieinwazyjną, opartą na analizie komórek z osadu moczu, metodę diagnostyczną raka pęcherza moczowego.

1.4.3. Telomery i aktywność telomerazy

Telomer, czyli końcowy odcinek chromosomu u człowieka zbudowany jest z krótkich tandemowych powtórzeń sekwencji 5'-TTAGGG-3' o długości ok. 15-20 kpz. [136]. Białka tworzące kompleks z telomerem zabezpieczają koniec chromosomu między innymi przed degradacją, rekombinacją i łączeniem się z innymi chromosomami gwarantując tym samym integralność chromosomu. W wyniku niekompletnej replikacji nici opóźnionej, telomery ulegają skróceniu o ok. 200 pz po każdym podziale komórkowym, co w efekcie końcowym prowadzi do zahamowania wzrostu komórek zwanego starzeniem replikacyjnym. Enzym telomeraza odpowiedzialna jest za wydłużanie telomerów rekompensując tym samym utratę sekwencji podczas replikacji DNA. Telomeraza o aktywności odwrotnej transkryptazy składa się z podjednostki katalitycznej (hTERT), krótkiego fragmentu RNA (hTR) służącego, jako matryca do syntezy DNA oraz telomerowego białka TP1/TEP1 [149]. W większości komórek somatycznych aktywność telomerazy jest wykrywana w czasie rozwoju embrionalnego i obniża się w trakcie różnicowania tkankowego. Aktywność enzymu obserwuje się wyłącznie w stymulowanych limfocytach, komórkach macierzystych szpiku kostnego, jak i komórkach nowotworowych [165, 355]. Wydłużanie telomerów oraz

podwyższona aktywność telomerazy związana jest ze zdolnością komórek do nieograniczonej liczby podziałów, przekroczeniem limitu Hayflicka i nabyciem "nieśmiertelności". Opracowanie w roku 1994 przez Kim i wsp. [196] metody TRAP (*telomeric repeat amplification protocol*) polegającej na amplifikacji metodą łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) powtórzeń sekwencji telomero- wych, umożliwiło detekcję aktywności telomerazy również w raku pęcherza moczowego. Alternatywne metody, stosowane głównie do analizy komórek z osadu moczu wykazujące dużą zgodność z aktywnością telomerazy, obejmują detekcję mRNA podjednostki hTERT oraz hTR z wykorzystaniem RT-PCR [92]. Analiza guzów pęcherza moczowego wykazała aktywność telomerazy średnio w 90% przypadków [281]. Większe rozbieżności, w granicach od 0 do 100%, obserwuje się w przypadku pomiaru aktywności telomerazy w komórkach z osadu moczu [281]. Są one najprawdopodobniej z jednej strony wynikiem spadku aktywności telomerazy na skutek kwaśnego odczynu moczu czy też obecności proteinaz i mocznika, a z drugiej występowaniem limfocytów, które mogą być przyczyną fałszywie dodatnich wyników [29]. Z systematycznego przeglądu piśmiennictwa wg Glassa i wsp. [127] wynika, że test na aktywność telomerazy w komórkach z osadu moczu charakteryzuje się najwyższą czułością (75%) w porównaniu do innych markerów nowotworowych włączając w to również cytologię (55%). Niestety jego specyficzność na poziomie 86% w porównaniu z 94% specyficznością analizy cytologicznej sprawia, iż kwestia wykorzystania w praktyce klinicznej telomerazy jako markera różnicującego jest dyskusyjna. Niezaprzeczalnym jest jednak fakt, że wysoka częstość występowania aktywności telomerazy w komórkach nowotworowych czyni ten enzym dogodnym, potencjalnym obiektem w terapii przeciwnowotworowej [341].

1.4.4. Onkogeny i supresory transformacji nowotworowej

Grupą genów związanych z transformacją nowotworową są protoonkogeny, których produkty białkowe odgrywają istotną rolę w transdukcji sygnałów, regulacji prawidłowych podziałów komórkowych i procesów różnicowania [39, 408]. Funkcje tych genów w procesie onkogenezy ulegają zaburzeniu i są wynikiem przekształcenia protoonkogenu w onkogen, zaś głównymi mechanizmami aktywującym tę przemianę są mutacja somatyczna, amplifikacja genu i translokacja chromosomowa [376].

Grupa genów o funkcji przeciwstawnej do onkogenów to supresory transformacji nowotworowej zwane antyonkogenami. Aktywne produkty białkowe supresorów transformacji nowotworowej pełnią między innymi funkcję regulatorów cyklu komórkowego i są w stanie zahamować proces transformacji nowotworowej [150, 375]. Onkogeny oraz nieaktywne (np. w wyniku mutacji lub delecji) supresory transformacji nowotworowej stymulują podziały komórkowe, hamują apoptozę, uniemożliwiają zatrzymanie cyklu komórkowego w celu na-

prawy uszkodzonego DNA i tym samym przyczyniają się do powstania fenotypu nowotworowego komórki. Onkogeny ulegające aktywacji oraz supresory transformacji nowotworowej, których funkcja ulega zakłóceniu w raku pęcherza moczowego zostały przedstawione w tabelach 2 i 3. Większość produktów białkowych tych genów pełni określone funkcje w szlakach sygnałowych oraz regulacji cyklu komórkowego i jest omówiona w kolejnych rozdziałach rozprawy.

Tabela 2. Onkogeny w raku pęcherza moczowego
Table 2. Oncogenes in bladder cancer

Symbol genu (położenie)	Funkcja	Rodzaj zmiany/częstość występowania	Pismienictwo
<i>Gene symbol (Location)</i>	<i>Function</i>	<i>Type of alteration / frequency</i>	<i>References</i>
JUNC (1p32-p31)	Czynnik transkrypcyjny / <i>Transcription factor</i>	Podwyższona ekspresja / <i>Overexpression</i> 88%	[369]
FGFR3 (4p16)	Receptor czynnika wzrostu fibroblastów / <i>Fibroblast growth factor receptor</i>	Aktywująca mutacja / <i>Activating mutation</i> 30–80%	[40, 402]
E2F3 (6p22.3)	Czynnik transkrypcyjny / <i>Transcription factor</i>	Amplifikacja / <i>Amplification</i> 11–27%	[301, 403]
EGFR (7p12.3-p12.1)	Receptorowa kinaza tyrozynowa / <i>Receptor tyrosin kinase</i>	Podwyższona ekspresja / <i>Overexpression</i> 48%	[292]
MET (7q31)	Receptorowa kinaza tyrozynowa / <i>Receptor tyrosin kinase</i>	Amplifikacja / Podwyższona ekspresja / <i>Amplification / Overexpression</i> 45%	[51, 52]
MYC 8q24.12-q24.13	Czynnik transkrypcyjny / <i>Transcription factor</i>	Hipometylacja / Podwyższona ekspresja / <i>Hypomethylation /Overexpression</i> 8,3% G1; 80% G2; 86% G3	[73, 209]
HRAS (11p15.5)	Białko wiążące GTP / <i>GTP binding protein</i>	Aktywująca mutacja / Podwyższona ekspresja / <i>Activating mutation / Overexpression</i> 6–44%	[66, 110, 203]
CCND1 (11q13)	Cyklina D1 / <i>Cyclin D1</i>	Amplifikacja / Podwyższona ekspresja / <i>Amplification / Overexpression</i> 31% 34% Ta, 21% T1; 47% G1;	[219, 381]

Symbol genu (położenie)	Funkcja	Rodzaj zmiany/częstość występowania	Pismienictwo
<i>Gene symbol</i> (<i>Location</i>)	<i>Function</i>	<i>Type of alteration / frequency</i>	<i>References</i>
		20% G2; 0% G3	
<i>MDM2</i> (12q14.3-q15)	Białko wiążące p53 / <i>p53 binding protein</i>	Amplifikacja / podwyższona ekspresja / <i>Amplification / Overexpression</i> 5–38%	[206, 364]
<i>ERBB2</i> (17q21.1)	Receptor kinazy tyrozynowej / <i>Receptor tyrosin kinase</i>	Amplifikacja / podwyższona ekspresja / <i>Amplification / Overexpression</i> 18–26%	[342, 397]
<i>BCL2</i> 18q21.3	Inhibitor apoptozy / <i>Inhibitor of apoptosis</i>	Podwyższona ekspresja / <i>Overexpression</i> 17–50%	[225, 394]

Tabela 3. Tumour suppressor genes in bladder cancer

Table 3. Supresory transformacji nowotworowej w raku pęcherza moczowego

Symbol genu (położenie)	Funkcja	Rodzaj zmiany/częstość występowania	Pismienictwo
<i>Gene symbol</i> (<i>Location</i>)	<i>Function</i>	<i>Type of alteration/ frequency</i>	<i>References</i>
<i>FHIT</i> (3p14.2)	Regulator apoptozy / <i>Apoptosis regulator</i>	Delecja / <i>Deletion</i> , LOH, 22% Metylacja / <i>Methylation</i> , 11% Obniżony poziom białka / <i>Decreased level of protein</i> , 61%	[9, 175, 411]
<i>RASSF1A</i> (3p21)	Inhibitor mitozy / <i>Inhibitor of mitosis</i>	Metylacja / <i>Methylation</i> , 54%	[43]
<i>APC</i> (5q21-q22)	Regulator cyklu komórkowego / <i>Regulator of cell cycle</i>	Metylacja / <i>Methylation</i> , 35% Delecja – LOH / <i>Deletion – LOH</i> , 6%	[274]
<i>CDKN2A</i> (9p21)	Regulator cyklu komórkowego / <i>Regulator of cell cycle</i>	Delecja – LOH / <i>Deletion-LOH</i> , 37% Metylacja / <i>Methylation</i> , 9–26,5%	[43, 45, 47]
<i>PTCH</i> (9q22)	Receptor białek Hedgehog (Hh), Hamowanie podziałów komórkowych / <i>Receptor protein Hedgehog</i>	Delecja – LOH / <i>Deletion – LOH</i> , 60% Mutacja / <i>Methylation</i> , 3,7%	[262]

Symbol genu (położenie)	Funkcja	Rodzaj zmiany/częstość występowania	Pismienictwo
<i>Gene symbol (Location)</i>	<i>Function</i>	<i>Type of alteration/ frequency</i>	<i>References</i>
	<i>(Hh), Inhibition of cell cycle</i>		
<i>TSC1</i> (9q34)	Hamowanie cyklu komórkowego / <i>Inhibition of cell cycle</i>	Delecja – LOH / <i>Deletion-LOH</i> , 50% Mutacja / <i>Mutation</i> , 12%	[170, 202]
<i>DBC1</i> (9q32–33)	Brak danych / <i>No data</i>	Metylacja / <i>Methylation</i> , 52%	[145]
<i>PTEN</i> (10q23)	Antagonista kinazy PI3, fosfataza białkowa / <i>Antagonist of PI3 kinas, protein phosphatase</i>	Delecja – LOH / <i>Deletion-LOH</i> , 32% T2–T4, 6,6% Ta/T1 Mutacja / <i>Mutation</i> , 17% T2–T4	[7, 414]
<i>p27KIP1</i> (<i>CDKN1B</i>) (12p13)	Regulator cyklu komórkowego / <i>Regulator of cell cycle</i>	Obniżony poziom białka / <i>Decreased level of protein</i> 45% Ta/T1 55% T2–T4	[190]
<i>RB1</i> (13q14.2)	Regulator cyklu komórkowego / <i>Regulator of cell cycle</i>	Delecja – LOH / <i>Deletion-LOH</i> , 22–32% Mutacja / <i>Mutation</i> , 37%	[274, 275, 410]
<i>CDH1</i> (16q22.1)	Adhezja komórek / <i>Cell adhesion</i>	Metylacja / <i>Methylation</i> , 8–84%	[117, 325]
<i>TP53</i> (17p13.1)	Regulator cyklu komórkowego / <i>Regulator of cell cycle</i>	Delecja – LOH / <i>Deletion-LOH</i> , 50–67% Mutacja / <i>Methylation</i> , 46,5–61% T2–T4	[306, 363, 395]
<i>DAPK</i> (9q34.1)	Regulator apoptozy / <i>Apoptosis regulator</i>	Metylacja / <i>Methylation</i> 58%	[45]

1.4.4.1. Szlaki transdukcji sygnału związane z rozwojem i progresją raka pęcherza moczowego

Wyjątkowo dużym wyzwaniem badań procesu nowotworzenia jest połączenie w jedną całość wszystkich najistotniejszych szlaków sygnałowych, których zaburzenia prowadzą do fenotypu nowotworowego. Badania Kendall i wsp. [194] na trzech różnych liniach komórkowych wykazały, że aktywacja *RAS*, *MYC* oraz *TERT* w połączeniu z inaktywacją takich supresorów transformacji nowotworowej jak *RB1* i *TP53* wystarczy do konwersji komórki "prawidłowej"

w nowotworową. Zaburzenie homeostazy komórki w wyniku wadliwego funkcjonowania szlaków sygnałowych obserwowane jest również w raku pęcherza moczowego i związane jest głównie z: a) aktywacją szlaku RAS/MAPK; b) aktywacją szlaku PI3K/AKT/mTOR; c) szlakiem JAK/STAT.

A. Aktywacja szlaku RAS/MAPK

Szlak RAS/MAPK jest odpowiedzialny za indukcję procesów różnicowania oraz apoptozy. Zależne od mitogenów kinazy MAP (MAPK) stanowią kluczowy mechanizm przekazywania sygnału w komórce, który ulega zaburzeniu w komórce nowotworowej. Kinazy MAP aktywowane są przez receptory błonowe za pośrednictwem cytoplazmatycznych białek adaptorowych i tzw. małych białek G. Białko RAS (p21) należy do rodziny małych białek G zaangażowanych w transmisję sygnałów zewnątrzkomórkowych. Aktywujące mutacje w genie *HRAS* występują w około 10 % przypadków raka pęcherza moczowego, zaś w 39% przypadków zaobserwowano podwyższony poziom *HRAS* mRNA [335, 399].

Podwyższony poziom transkryptu *HRAS* koreluje z epigenetyczną inaktywacją domniemanego inhibitora funkcji RAS białka RASSF1A [220], ponadto częste mutacje w genie *TP53*, który jest negatywnym regulatorem ekspresji *HRAS*, mogą sugerować udział białka RAS w progresji raka pęcherza moczowego [227]. Transdukcja sygnału poprzez szlak RAS/MAPK związana jest aktywacją receptorowych kinaz tyrozynowych (RTK). Podstawą mechanizmu aktywacji kinazy tyrozynowej jest dimeryzacja receptorów monomerycznych lub zmiana ich konformacji. Nadekspresja receptora naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR) oraz receptora ERBB2 jest często obserwowana w raku pęcherza moczowego [292, 342]. Do rodziny receptorów ERBB należą receptory kodowane przez protoonkogeny/onkogeny komórkowe rodziny ERBB wiążące czynniki wzrostowe o strukturze homologicznej do czynnika wzrostu naskórka (EGF). Receptory EGFR oraz ERBB2 indukują przekazywanie sygnału między innymi poprzez aktywację: 1) szlaku RAS/MAPK, który aktywuje liczne czynniki transkrypcyjne; 2) kinazę 3-fosfatydylinozytolu (PI3K) indukującą serynowo-treoninową kinazę białkową B/Akt; 3) czynników transkrypcyjnych STAT (ryc. 3).

Na szczególną uwagę zasługuje receptor 3 czynnika wzrostu fibroblastów (FGFR3), należący do rodziny receptorowych kinaz tyrozynowych odgrywających istotną rolę w rozwoju embrionalnym, wzroście, różnicowaniu, podziałach komórkowych oraz angiogenezie [307]. Analiza genu *FGFR3* wykazała występowanie aktywujących mutacji zarówno w raku pęcherza jak i szyjki macicy [40]. *FGFR3* jest jednym z najczęściej zmutowanych genów w raku pęcherza moczowego [360]. Mutacje *FGFR3* występują w 74% nieinwazyjnych, dobrze zróżnicowanych guzach brodawkowatych. Dla porównania częstość mutacji

FGFR3 w inwazyjnym raku pęcherza moczowego wynosi 16%, tym samym analiza obecności mutacji pozwala wyselekcjonować grupę pacjentów o znacznie łagodniejszym przebiegu choroby [20]. Badania ostatnich lat wykazały, że onkogenna funkcja *FGFR3* będąca wynikiem aktywujących mutacji związana jest ze stymulacją, takich szlaków sygnałowych jak RAS/MAPK, PI3K-AKT oraz JAK/STAT (ryc. 3) [2, 152]. Aktywacja szlaku RAS/MAPK zachodzi za pośrednictwem białek adaptorowych GRB2 i SOS. SOS jest czynnikiem wymiany nukleotydów guaninowych GDP→GTP, aktywując tym samym białko RAS. W wyniku przekazania sygnału do jądra komórkowego dochodzi do aktywacji czynników transkrypcyjnych, które regulują ekspresję genów odpowiedzialnych między innymi za podziały komórkowe i transformację nowotworową. Mutacje *FGFR3* i *HRAS* aktywują ten sam szlak nie wiadomo jednak, czy mutacje w tych dwóch genach mogą wystąpić jednocześnie w tym samym nowotworze. Brak prognostycznego znaczenia mutacji w genie *HRAS* sprawia, że nie są one zaliczane do najistotniejszych zmian leżących u podstaw rozwoju większości przypadków TCC [203]. Statystycznie istotną korelację wykazano pomiędzy podwyższonym poziomem białka *HRAS* a zwiększonym ryzykiem wznowy w guzach powierzchniowych pęcherza moczowego [113], tym samym prognostyczny aspekt tego markera wymaga dalszych badań.

Poza *FGFR3* inne receptorowe kinazy tyrozynowe takie, jak *EGFR*, *ERBB2*, *ERBB3* i *ERBB4* ulegają nadekspresji w raku pęcherza moczowego. Interesującym jest fakt, że podwyższony poziom *ERBB3* i *ERBB4* wykazuje asocjację z nieinwazyjnym guzem brodawczakowatych, zaś nadekspresja *EGFR* i *ERBB2* oraz amplifikacja *ERBB2* są obserwowane w guzach inwazyjnych [58]. Guz, w którym stwierdza się nadmierną ekspresję *EGFR*, przebiega agresywniej. Wyrazem tego jest skrócenie czasu wolnego od wznowy i czasu przeżycia [291]. Ponadto w badaniach przeprowadzonych przez Sato i wsp. [342] wykazano, że nadekspresja *ERBB2* związana jest z krótszym czasem przeżycia chorych oraz jest niezależnym czynnikiem prognostycznym w raku pęcherza moczowego.

B. Aktywacja szlaku PI3K/AKT/mTOR

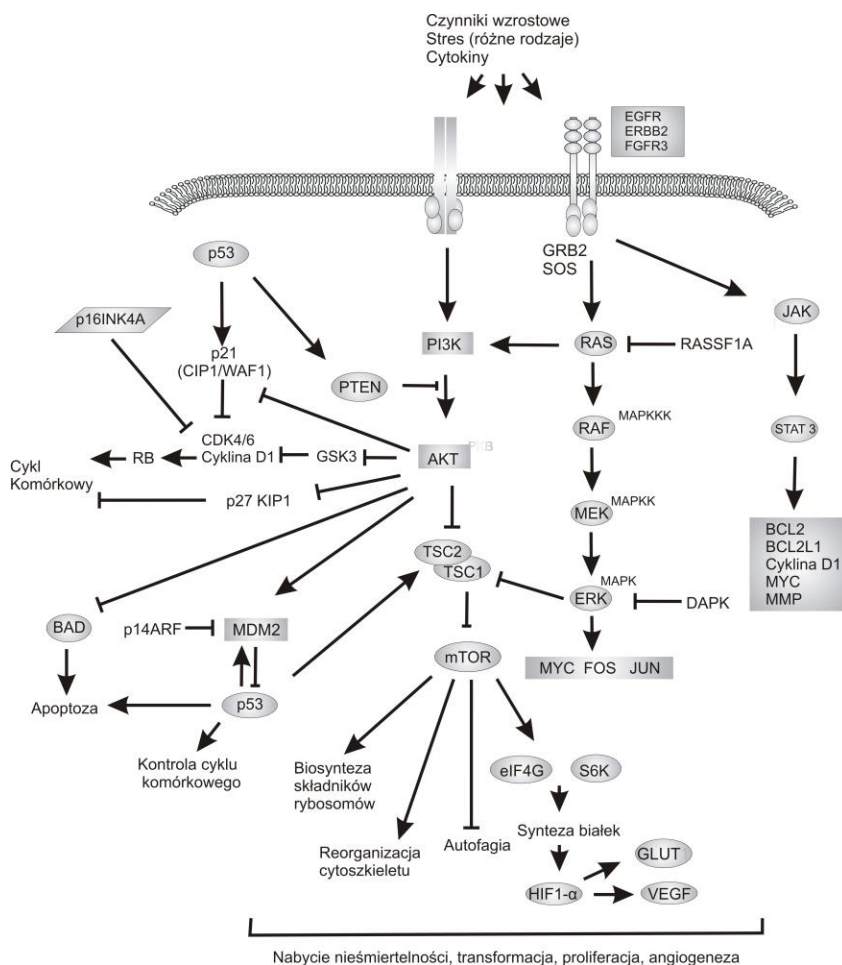
Aktywowana mitogenami kinaza 3 fosfatydyloinozytolu (PI3K), indukuje serynowo-treoninową kinazę Akt/PKB stymulując tym samym proliferację komórki (ryc.3). Antagonista PI3K, produkt białkowy antyonkogenu *PTEN* o podwójnej aktywności fosfatazy (fosfatazy lipidów i białek), w komórkach nienowotworowych hamuje szlak sygnałowy z udziałem kinazy Akt. Utrata aktywności *PTEN* jest najczęstszym mechanizmem prowadzącym do aktywacji szlaku PI3K/AKT/mTOR w chorobie nowotworowej. W raku pęcherza moczowego mutacje *PTEN* obserwowane są w 0-17% przypadków głównie raków inwazyjnych [7, 414]. Biorąc pod uwagę fakt, że białko p53 reguluje ekspresję genu *PTEN* oraz obecność funkcjonalnego oddziaływania pomiędzy białkiem *PTEN* i p53, można przypuszczać, że wzrost aktywności PI3K odgrywa istotną rolę w

progresji raka pęcherza moczowego. Inaktywacja PTEN znosi mechanizm osłony dla białka p53, albowiem onkogen MDM2 o funkcji ligazy ubiquitynowej E3 po translokacji do jądra komórkowego prowadzi do degradacji p53 stymulując tym samym podział komórki [259]. Poza rakiem pęcherza moczowego amplifikacja kinazy PI3, Akt oraz mutacje aktywujące tę kaskadę sygnałową obserwowane są w raku jajnika, okrężnicy, piersi oraz gruczołu krokowego. Aktywna kinaza Akt reguluje metabolizm komórki oraz procesy związane z przeżyciem, progresją i wzrostem poprzez fosforylację takich białek jak BAD, p21(CIP1/WAF1), p27KIP1, GSK3 [156, 407]. Ponadto fosforylacja kompleksu TSC1/TSC2 i związana z tym utrata funkcji GTP-azy prowadzi w konsekwencji do aktywacji kinazy serynowo-treoninowej mTOR [156]. Kinaza mTOR koordynuje wzrost komórki poprzez regulację syntezy białek oraz jest mediatorem aktywacji czynnika transkrypcyjnego HIF-1 α . Aktywacja HIF-1 α prowadzi do wzrostu ekspresji transportera glukozy GLUT-1 (*glucose transporter 1*) oraz enzymów glikolitycznych [315]. Wzrost ekspresji HIF-1 α oraz GLUT-1 w raku pęcherza moczowego związany jest ze zwiększonym ryzykiem wznowy oraz krótszym czasem przeżycia [310].

Jednym z substratów Akt jest również wspomniane powyżej białko MDM2, które oprócz udziału w ubiquitynacji i degradacji białka p53 pełni także funkcję jądrowo-cytoplazmatycznego transportera p53, dodatkowo ekspresja genu *MDM2* indukowana jest przez białko p53 [188, 430]. Białka te tworzą "pętlę sprzężenia zwrotnego", w której p53 jest pozytywnym regulatorem MDM2, zaś MDM2 negatywnym regulatorem p53 [116]. Z badań Mayo i wsp. [258] wynika, że białko MDM2 po fosforylacji przez kinazę Akt tworzy w jądrze komórkowym kompleks MDM2/p53 umożliwiając eksport białka p53 do cytosolu oraz jego degradację. Tym samym Akt może negatywnie regulować aktywność p53 w prawidłowo dzielącej się komórce, jak również chronić komórkę przed zależną od p53 apoptozą [433]. Podwyższona ekspresja MDM2 jest obserwowana w wielu nowotworach w tym w raku pęcherza moczowego i koreluje z niskim stopniem zaawansowania i złośliwości [228]. Aspekt prognostyczny ma również analiza koekspresji p53/MDM2, albowiem podwyższony poziom obu markerów wykazuje związek z progresją raka pęcherza moczowego [358].

C. Szlak JAK/STAT

Regulacja aktywacji czynników transkrypcyjnych STAT odgrywa istotną rolę w generowaniu odpowiedzi komórki na cytokiny, hormony oraz czynniki wzrostu [218]. Transmisja sygnałów zewnątrzkomórkowych związana jest z fosforylacją reszty tyrozyny białek STAT, która prowadzi do dimeryzacji poprzez domenę homologiczną do domeny 2 kinazy Src (domena SH2) i następnie transportu dimerów do jądra komórkowego, w którym łączą się one ze specyficznymi sekwencjami nukleotydowymi DNA [174]. W jądrze komórkowym STAT3 reguluje ekspresję genów związanych z proliferacją komórki, tj. *FOS* [163], *JUNB*, *CCND1* [31], *MYC* [27] oraz czynników antyapoptotycznych *BCL2L1* (Bcl-X) i *BCL2* [42].



Ryc. 3. Schemat głównych szlaków transdukcji sygnałów, ulegających reorganizacji w przypadku raka pęcherza moczowego. Sześć głównych szlaków transdukcji sygnału odgrywa kluczową rolę w odbiorze i integracji różnorodnych informacji pod postacią chemicznych i fizycznych sygnałów, są to: szlak RAS/MAPK, JAK/STAT, PI3K/AKT, mTOR, RB/p16INK4A oraz szlak p53. Prowadzą one do uruchomienia procesów regulujących cykl komórkowy, apoptozę, autofagię, biosyntezę rybosomów, reorganizację cytoskieletu, kontrolę translacji wpływając tym samym na wzrost, przeżycie oraz śmierć komórki. W przeniesieniu sygnału uczestniczą receptory błonowe o aktywności kinazy tyrozynowej. Dimeryzacja receptorów pod wpływem czynnika zewnątrzkomórkowego prowadzi do autofosforylacji reszt tyrozyny domeny wewnątrzkomórkowej i aktywacji kinazy tyrozynowej. Szlak PI3K/Akt poprzez MDM2 oddziałuje również ze szlakiem p53. Ponadto p53 reguluje ekspresję genu PTEN kodującego białko-lipidową fosfatazę będącą negatywnym regulatorem PI3K

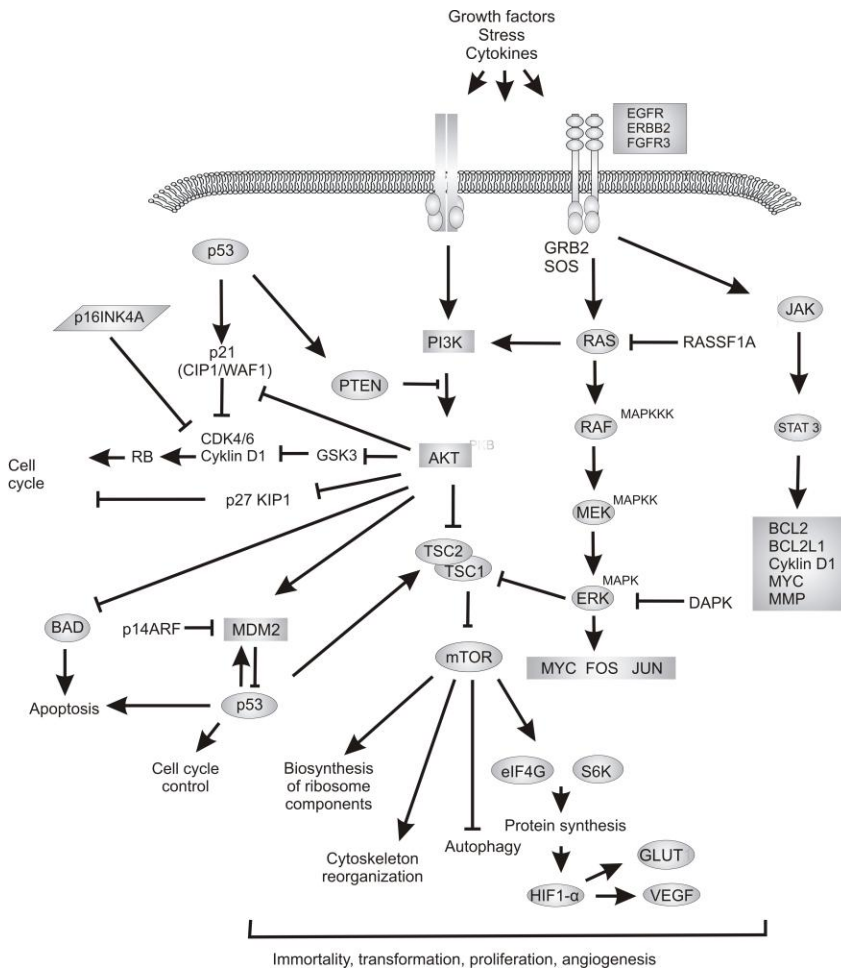


Fig. 3. The pathways of signal transduction, deranged (perturbed in bladder cancer). Six major signal transduction pathways play critical roles in receiving and integrating different chemical or physical signals: the RAS/MAPK pathway, the JAK/STAT pathway, the PI3K/AKT pathway, the mTOR pathway, RB/p16INK4A and the p53 pathway. They lead to cellular responses including regulation of the cell cycle, apoptosis, autophagy, ribosome biosynthesis, reorganization of the cytoskeleton, translational controls, which determine cell growth or arrest, cell survival or death. Membrane receptors with tyrosin kinase activity are involved in signal transduction. External factors cause the receptor to dimerize and through the autophosphorylation of the tyrosine residues the receptor's intrinsic tyrosine kinase is activated. PI3K/AKT pathway through MDM2 also interacts with the p53 pathway. Moreover p53 regulates the expression of the PTEN lipid phosphatase, a negative regulator of PI3K

Z ostatnio przeprowadzonych badań wynika, że zwiększona inwazyjność nowotworu i związana z nią migracja komórek jest wynikiem aktywacji STAT3 indukowanej za pośrednictwem EGFR [5]. Badania wykonane na linii komórkowej raka pęcherza moczowego (T24) wskazują, że indukowana przez EGFR fosforylacja STAT3 prowadzi do tworzenia kompleksu z JUNC i indukcji ekspresji kolagenazy-1 (metaloproteinazy MMP-1) [179]. Enzymy proteolityczne, włączając w to rodzinę metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej związane są z inwazją nowotworu poprzez proteolizę włókien kolagenowych [205]. W raku pęcherza moczowego immunoreaktywność MMP-1 obserwowana jest w około 30% przypadków i koreluje z rakami inwazyjnymi o wysokim stopniu nieznaczenia [286].

Inwazyjność raka pęcherza moczowego związana jest również z nadekspresją proteiny serynowej – aktywatora plazminogenu typu urokinazy (u-PA) oraz receptora aktywatora plazminogenu typu urokinazy (uPAR), który to receptor aktywuje, takie szlaki sygnałowe jak RAS/MAPK, PI3K/AKT/mTOR oraz JAK/STAT [3, 261, 357]. Białka te odgrywają główną rolę w regulacji adhezji komórek nowotworowych, migracji oraz inwazji [23]. Aktywny kompleks uPA/uPAR reguluje degradację macierzy przez konwersję plazminogenu do plazminy, jak również chroni komórki przed apoptozą poprzez aktywację szlaków transdukcji sygnału prowadzących do wzrostu ekspresji inhibitora apoptozy białka BCL2L1 (Bcl-X) [3].

Genem, którego ekspresja indukowana jest aktywnością STAT3 jest *CCND1* kodujący cyklinę D1 należącą do pozytywnych regulatorów cyklu komórkowego w fazie G1 [11]. Ekspresja *CCND1* jest również indukowana przez szlak Wnt/ β -katenina, którego aktywacja jest obserwowana głównie w raku okrężnicy [387]. Cyklina D1 tworzy kompleksy z kinazami Cdk4 lub Cdk6 i nie ulega ekspresji w "komórkach spoczynkowych". Obecnie wiadomym jest, że podwyższony poziom cykliny D1 obserwowany jest w wielu chorobach nowotworowych, w tym w raku pęcherza moczowego i wykazuje związek z dobrze zróżnicowanymi rakami brodawkowatymi [219]. Ponadto podwyższony poziom cykliny D1 i białka MYC w powierzchniowym raku pęcherza moczowego wskazuje na inwazyjny potencjał nowotworu [420]. Chromosomowe translokacje oraz amplifikacje genów należących do rodziny MYC są zjawiskiem powszechnie obserwowanym w różnych typach nowotworów, a ich zwiększona ekspresja stymuluje proliferację komórek nowotworowych [418]. Wynika to z faktu, że białko MYC w kompleksie z MAX (*MYC associated factor*) aktywuje transkrypcję genów zaangażowanych w prawidłowy wzrost i proliferację komórek, metabolizm RNA oraz progresję cyklu komórkowego [134]. Z badań Kotake i wsp. [209] wynika, że podwyższony poziom MYC w raku pęcherza moczowego koreluje z wyższym stopniem złośliwości, podczas gdy Lipponen i wsp. [236] w swoich badaniach nie wykazali prognostycznego znaczenia podwyższonej ekspresji tego białka. Obserwowane rozbieżności wskazują, że analiza zmian ekspresji MYC może mieć prognostyczne znaczenie jedynie w analizie kom-

pleksowej z uwzględnieniem innych markerów nowotworowych, np. cykliny D1.

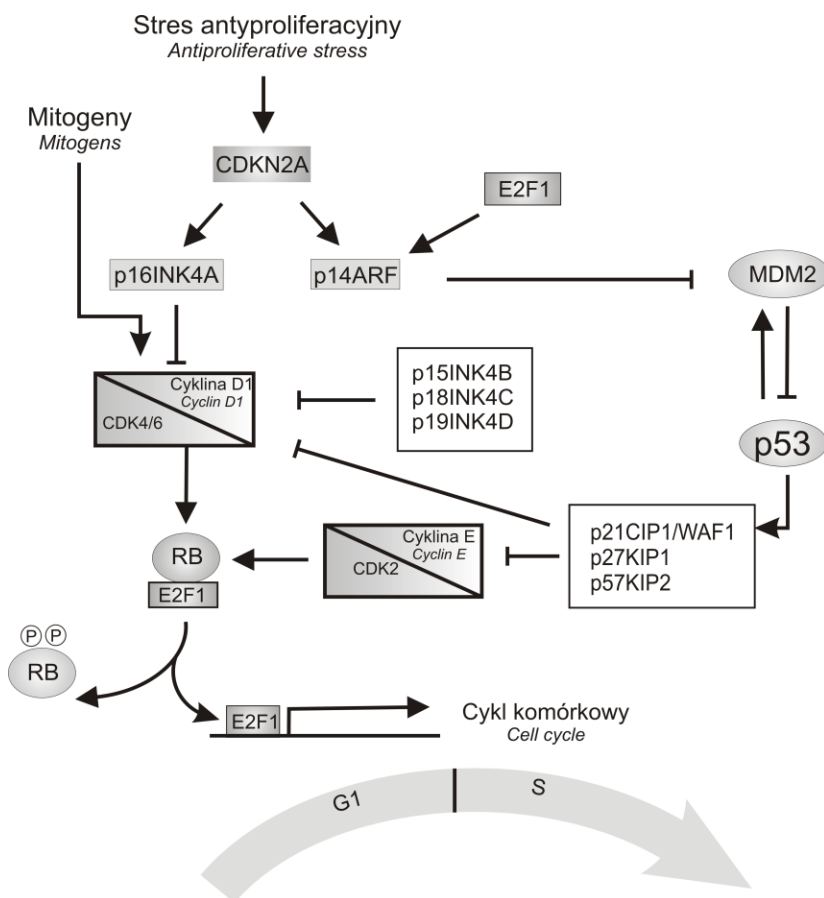
1.4.4.2. Zaburzenia regulacji cyklu komórkowego

Cykl komórkowy obejmuje ściśle określoną i uporządkowaną sekwencję zdarzeń prowadzących do podziału komórki, w którym kluczową rolę odgrywają cykliny, kinazy zależne od cyklin (CDK) oraz inhibitory CDK (CKI). Podwyższony poziom cyklin D skraca czas trwania fazy G1 oraz redukuje zapotrzebowanie na egzogenne czynniki wzrostu [356]. Cykliny aktywują CDK, które następnie fosforylują białka biorące udział w procesie replikacji DNA i mitozie. Aktywność kinaz CDK jest również regulowana przez białkowe inhibitory należące do rodziny INK4 oraz CIP/KIP. Do rodziny INK4 należą białka p16INK4A, p15INK4B, p18INK4C i p19INK4D będące specyficznymi inhibitorami kompleksów cyklin D-CDK4/6 [350]. Rodzina CIP/KIP zawiera białka p21(CIP1/WAF1), p27KIP1 oraz p57KIP2 hamujące aktywność kompleksów cyklin-CDK [148, 356]. Podwyższona ekspresja genów kodujących CKI prowadzi do zatrzymania cyklu komórkowego w późnej fazie G1 hamując przejście komórki do fazy S. [356]. Jest to pierwszy z dwóch punktów kontrolnych zwany punktem restrykcyjnym R. Drugi punkt kontrolny znajduje się w późnej fazie G2 przed przejściem G2/M [21]. Zahamowanie cyklu komórkowego w fazie G1 chroni komórkę przed replikacją uszkodzonego DNA, zaś zahamowanie w fazie G2 zapobiega segregacji wadliwych chromosomów [107]. Tym samym punkty kontrolne są odpowiedzialne za utrzymanie stabilności genomu poprzez dostarczenie dodatkowego czasu potrzebnego do naprawy uszkodzeń DNA. Kluczowe znaczenie w regulacji tranzycji G1/S mają wzajemne oddziaływania pomiędzy takimi białkami jak p53, p14(ARF), p21(CIP1/WAF1), p16INK4A, cyklin D1, MDM2 oraz RB (ryc. 4) [32]. Cechą charakterystyczną wielu nowotworów jest podwyższony poziom pozytywnych regulatorów cyklu komórkowego, tj. cyklin i CDK oraz brak aktywności negatywnych regulatorów, czyli CKI. W raku pęcherza moczowego wysoka częstość mutacji w genie *TP53*, delecje *p16INK4A* i *p14(ARF)* oraz zredukowana ekspresja genu *RB1* wskazują na częste zaburzenia funkcji punktów kontrolnych cyklu komórkowego zwłaszcza w fazie G1. Z badań Doherty i wsp. [79] wynika, że inaktywacja funkcji punktów kontrolnych G1 oraz G2 ma związek ze wzrostem niestabilności genomu oraz progresją raka pęcherza moczowego. Dwa główne szlaki biorące udział w regulacji cyklu komórkowego to: a) szlak RB/p16INK4A; b) szlak zależny od białka p53.

A. Szlak RB/p16INK4A

Centralną rolę w regulacji cyklu komórkowego odgrywa białko RB. Aktywne białko RB (forma słabo ufosforylowana) blokuje proliferację komórki poprzez

oddziaływanie z czynnikiem transkrypcyjnym z rodziny E2F kontrolującym ekspresję genów związanych z regulacją cyklu komórkowego, replikacją DNA, mitozą, apoptozą oraz naprawą DNA [72, 77]. Rodzina E2F składa się z ośmiu białek (E2F1–8), z których głównie E2F1, E2F2 oraz E2F3 łączą się z białkiem RB. Kompleksy cyklina D1-CDK4/6 oraz cyklina E-CDK2 fosforylując RB prowadzą do dysocjacji czynnika E2F z kompleksu RB/E2F i przejścia cyklu komórkowego do fazy S (ryc. 4).



Ryc. 4. Kontrola cyklu komórkowego przy przejściu z fazy G1 do fazy S. Punkt restrykcyjny G1/S kontroluje przejście komórek eukariotycznych z fazy G1 cyklu komórkowego do fazy S, czyli syntezy DNA, a białka RB oraz p53 odgrywają główną rolę w jego regulacji. Fosforylacja RB przez kompleksy cyklina D1-CDK4/6 lub cyklina E-CDK2 prowadzi do uwolnienia czynników transkrypcyjnych E2F z kompleksu RB/E2F. E2F regulują ekspresję wielu genów niezbędnych do przejścia komórki z fazy G1 do fazy S stymulując tym samym proliferację komórki. Wiele czynników stresu wywiera wpływ

na punkt kontrolny poprzez indukcję inhibitorów kinaz cyklozależnych należących do rodziny INK4 lub CIP/KIP. Locus *CDKN2A* (*INK4a/ARF*) jest odpowiedzialny za powstanie dwóch transkryptów z różnych promotorów. Transkrypty te oznaczono, jako *p16INK4A* i *p14(ARF)*. Pozytywnym regulatorem transkrypcji *p14(ARF)* jest *E2F1*. To pojedyncze locus reguluje dwa szlaki kontrolowane przez supresory transformacji nowotworowej, białko *RB* i *p53*. *p16INK4A* oraz inni członkowie rodziny, tj. *p15INK4B*, *p18INK4C* i *p19INK4D* są negatywnymi regulatorami kompleksów cyklina *D1-CDK4/6*. *p14(ARF)* chroni *p53* przed degradacją poprzez inaktywację *MDM2*. Białko *p53* włącza transkrypcję genów w tym genu *CDKN1A*, którego produkt białkowy *p21(CIP1/WAF1)* łączy się i inaktywuje kompleksy cyklina *D1-CDK4/6* oraz cyklina *E-CDK2*. Dodatkowo inni członkowie rodziny CIP/KIP, tj. *p27KIP1* o *p57KIP2* hamują kompleksy cyklina *E-CDK2* prowadząc tym samym do zahamowania cyklu komórkowego

Fig. 4. Cell cycle control at the G1 to S transition. The G1/S cell cycle checkpoint controls the passage of eukaryotic cells from the first gap phase (G1) into the DNA synthesis phase (S). Protein RB together with the p53 tumor suppressor plays a central role in controlling this checkpoint. When cyclin D/CDK4 or cyclin E/CDK2 phosphorylates RB, E2F transcription factors are released from RB/E2F complexes. E2Fs activate a number of target genes, the expression of which is required for cells to enter S phase, thereby stimulating proliferation. Many stress signals exert checkpoint control by inducing members of the INK4 or Kip/Cip families of cell cycle kinase inhibitors. CDKN2A (INK4a/ARF) locus gives rise to 2 distinct transcripts from different promoters. The transcripts have been designated p16INK4A and p14(ARF). The transcription of the p14(ARF) is positively regulated by E2F1. This single genetic locus regulates both the p53 and pRB tumor-suppressor pathways. p16INK4A and other members of INK4 family p15INK4B, p18INK4C, and p19INK4D are negative regulators of cyclin D/CDK4. p14(ARF) prevents p53 degradation through inactivation of MDM2. p53 turns on the transcription of genes such as CDKN1A coding for p21(CIP1/WAF1), which binds and inactivates a series of cyclin/CDK complexes like cyclin D/CDK4, cyclin E/CDK2. In addition other CIP/KIP family members p27KIP1 and p57KIP2 may inactivate cyclin E/CDK2 complexes leading to cell cycle arrest

Aktywność białka *RB* regulują CKI, głównie *p16INK4A* oraz *p21(CIP1/WAF1)*, które hamując *CDK* umożliwiają pozostanie *RB* w kompleksie z *E2F1*, co wiąże się z represją transkrypcji genów niezbędnych do inicjacji fazy *S*. Inaktywacja *p16INK4A* na skutek homozygotycznych delecji locus *CDKN2*, hipermetylacji promotora *p16INK4A* oraz mutacji tego genu jest obserwowana w około 50% guzów pęcherza moczowego [35, 132, 423]. Częstym zjawiskiem jest również inaktywacja genu *RB1* zwłaszcza w guzach inwazyjnych pęcherza moczowego [431]. Zredukowany poziom białka *RB* obserwuje się w 30-40% przypadków i jest najczęściej wynikiem LOH lub mutacji [241]. Ponadto inaktywacja *RB* związana jest z progresją guzów powierzchniowych do inwazyjnych oraz koreluje ze zwiększoną agresywnością nowotworu [62]. Wykazano również amplifikację oraz podwyższony poziom *E2F3* w raku pęcherza

moczowego, który związany był z wyższym stopniem złośliwości i zaawansowania [104, 302]. Podsumowując, obserwowany w guzach pęcherza moczowego brak aktywności p16INK4A i/lub RB oraz podwyższona ekspresja cykliny D i czynnika E2F wskazuje, że szlak RB/p16INK4A odgrywa istotną rolę w supresji raka pęcherza moczowego.

B. Szlak zależny od białka p53

Na szczególną uwagę zasługuje jeden z najważniejszych supresorów transformacji nowotworowej, zwany strażnikiem genomu – gen *TP53*. Domeny funkcjonalne oraz diagram wstążkowy białka p53 wraz z rozkładem mutacji w genie *TP53* w raku pęcherza moczowego przedstawia rycina 5. Białko p53 jest niezwykle efektywnym inhibitorem wzrostu komórki prowadzącym do zatrzymania cyklu komórkowego i/lub apoptozy w zależności od rodzaju komórki i czynników środowiskowych (ryc. 3) [409]. Regulacja aktywności p53 jest istotna zarówno w przypadku prawidłowych podziałów komórkowych, kiedy aktywność p53 musi być wyciszona a poziom białka niski, jak i w supresji transformacji nowotworowej wymagającej zależnej od p53 odpowiedzi komórki na sygnały związane z procesem nowotworzenia. Utrata funkcji supresorowej białka p53 jest zjawiskiem powszechnie obserwowanym w chorobach nowotworowych i jest ona najczęściej wynikiem mutacji w genie *TP53*, jak również efektem oddziaływania z białkami komórkowymi lub wirusowymi.

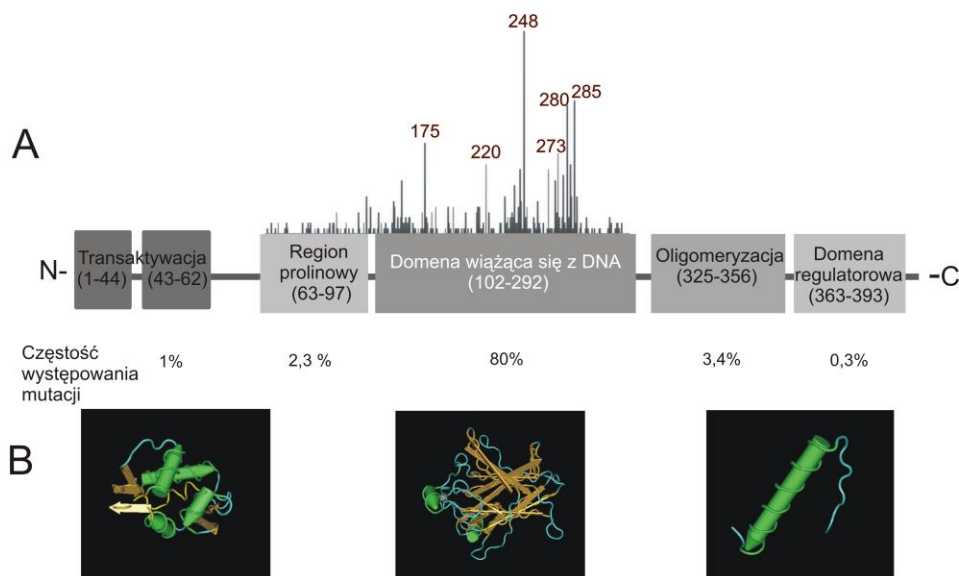
Istnieje wiele mechanizmów regulujących białko p53 włączając w to regulację ekspresji genu *TP53* oraz regulację translacji, jakkolwiek wydaje się, że najważniejszymi jest kontrola stabilności i lokalizacji białka p53 oraz modulacja jego aktywności umożliwiające pełnienie przez p53 funkcji czynnika transkrypcyjnego [106]. Aktywacja szlaku p53 jest odpowiedzią komórki na różne rodzaje stresu w tym stres genotoksyczny związany z uszkodzeniem DNA między innymi przez promieniowanie UV, X, γ , czynniki kancerogenne i reaktywne formy tlenu, jak również hipoksję, tlenek azotu, nadmiar czynników wzrostu, aktywację onkogenów oraz obniżenie stężenia trifosforanów rybonukleozydów i niedobór glukozy (ryc. 6) [124, 183]. W odpowiedzi na sygnały generowane przez czynniki stresu białko p53 poddane jest wielu modyfikacjom potranslacyjnym, takim jak fosforylacja, acetylacja, metylacja lub które prowadzą między innymi do stabilizacji i akumulacji aktywnego białka p53 w jądrze komórkowym [6]. Aktywacja wymienionych procesów zależy od rodzaju stresu i tak niedobór glukozy wiąże się z aktywacją kinazy zależnej od AMP, która poprzez fosforylację białka p53 prowadzi do zahamowania cyklu komórkowego [187]. Promienie gamma aktywują kinazę ATM oraz CHK-2, podczas gdy promienie UV aktywują kinazy ATR, CHK-1 oraz kinazę kazeinową typu 2 (CK2), które następnie fosforylują określone reszty aminokwasowe białka p53 [6]. Fosforylacja N- i C-końca białka p53 wzmacnia zdolność przyłączenia się p53 do specyficz-

nych sekwencji DNA, niezbędną do regulacji ekspresji genów zależnych od p53 [263].

Wzrost stabilności białka p53 w połączeniu ze wzrostem aktywności transkrypcyjnej związany jest z oddziaływaniem p53 z takimi białkami komórkowymi jak: polimeraza poli ADP rybozy [415], produkt genu *WT1* [247] oraz białko p300 [437]. Jednym z kluczowych regulatorów stabilność p53 jest białko MDM2, które w pętli sprzężenia zwrotnego prowadzi do ubikwitynacji i degradacji białka p53 (ryc. 6) [188, 430]. Ten rodzaj autoregulacji zwrotnej służy do zahamowania aktywności p53 wewnątrz komórki, jak również do przerywania odpowiedzi wewnątrzkomórkowej zależnej od p53 w czasie, kiedy sygnał indukcyjny jest wyłączony [116]. Alternatywnym mechanizmem stabilizacji białka p53 w odpowiedzi na uszkodzenie DNA jest fosforylacja Ser-17 białka MDM2, katalizowana przez zależną od DNA kinazę białkową, która uniemożliwia powstanie kompleksu p53/MDM2 [260].

Stres „onkogenny”, czyli aktywacja takich onkogenów jak RAS, MYC, β -katenina oraz inaktywacja supresorów transformacji nowotworowej (RB, APC) jest jednym z najbardziej intrygujących mechanizmów aktywacji p53 prowadzącym do śmierci komórki. Mutacje w onkogenach prowadzą do aktywacji czynników transkrypcyjnych i ekspresji alternatywnego produktu *locus CDKN2* kodującego białko p14(ARF), które hamuje degradację p53 poprzez blokowanie MDM2. Prowadzi to do wzrostu poziomu i aktywności p53 oraz chroni komórkę przed transformacją nowotworową (ryc. 6) [244]. Aktywacja umożliwia wiązanie się białka p53 w postaci tetrameru do specyficznych sekwencji DNA w obszarze promotora określanych jako p53RE (*p53 responsive element*) prowadząc do indukcji lub represji ekspresji ponad 500 genów [120, 421]. Geny te biorą udział w regulacji cyklu komórkowego w „punktach kontrolnych” G1 i G2, regulacji apoptozy, naprawie DNA, angiogenezie, jak i w procesie starzenia się komórki (ryc. 6) [93, 439]. Prawidłowe funkcjonowanie komórki jest efektem koordynacji wielu szlaków sygnałowych i jakiegokolwiek zaburzenie istniejącej równowagi indukuje odpowiedź regulowaną przez białko p53. Tym samym końcowy wynik aktywacji białka p53 zależy w dużej mierze od wzajemnych oddziaływań i sygnałów pochodzących z różnych szlaków transdukcji sygnału.

W dwunastu najczęściej spotykanych nowotworach mutacje somatyczne lub utrata genu *TP53* występują u około 50% chorych [167, 224]. Do roku 2007 ukazało się ponad 14 000 prac naukowych dotyczących analizy mutacji w genie *TP53* w chorobach nowotworowych. Obecnie 23 544 mutacji somatycznych oraz 376 germinalnych w *TP53* zostało skatalogowanych w bazie International Association of Cancer Registries (IARC), (www-p53.iarc.fr/). Mutacje w genie *TP53* należą głównie do mutacji punktowych zmiany sensu, którym bardzo często towarzyszy LOH [167]. 80% wszystkich mutacji genu *TP53* zlokalizowanych jest w regionie centralnym odpowiedzialnym za oddziaływanie białka p53 z DNA (ryc. 5) [223].



Ryc. 5. Domeny funkcjonalne białka p53 wraz z rozkładem mutacji w genie *TP53* w raku pęcherza moczowego. A) Rycina przedstawia N-końcówkę, domenę transaktywacyjną (złożoną z dwóch poddomen) białka p53 odpowiedzialną za aktywację transkrypcji genów zależnych od p53. Region prolinowy pośredniczy w odpowiedzi białka p53 na uszkodzenie DNA indukując apoptozę. Domena wiążąca się z DNA jest domeną centralną, w której zlokalizowanych jest 80% wszystkich mutacji genu *TP53* zidentyfikowanych w ludzkich nowotworach. Pojedyncza mutacja w obrębie tej domeny może prowadzić do poważnej zmiany konformacyjnej inaktywującej funkcję białka p53. Domena oligomeryzacyjna jest niezbędna do powstania tetrameru p53. Koniec C-terminalny zawiera negatywną domenę regulatorową, która uniemożliwia łączenie się latentnej formy białka p53 do sekwencji DNA i musi zostać kowalencyjnie zmodyfikowana w celu konwersji p53 do formy aktywnej. Liczby w nawiasach odpowiadają numerom reszt aminokwasowych białka p53. Miejsca, w których najczęściej występują mutacje w raku pęcherza moczowego to kodony, 175, 220, 248, 273, 280, 285. Spektrum mutacji jest oparte na bazie danych IARC TP53 (wersja R11, październik 2006) [305]. B) Diagram wstążkowy domen białka p53. Rysunek wykonano z wykorzystaniem programu Cn3D dostępnego na stronie www.ncbi.nlm.nih.gov, przedstawia on domenę transaktywacyjną (PDB code: 1YCR), domenę wiążącą się z DNA (PDB code: 2FEJ) oraz domenę oligomeryzacyjną (PDB code: 1AIE) [416]. Zgodnie ze schematem kolorów Cn3D struktura drugorzędowa jest oznaczona odpowiednim kolorem: helisa α – zielony, harmonijka β – złoty, β -skręt – niebieski. PDB – Protein Data Bank

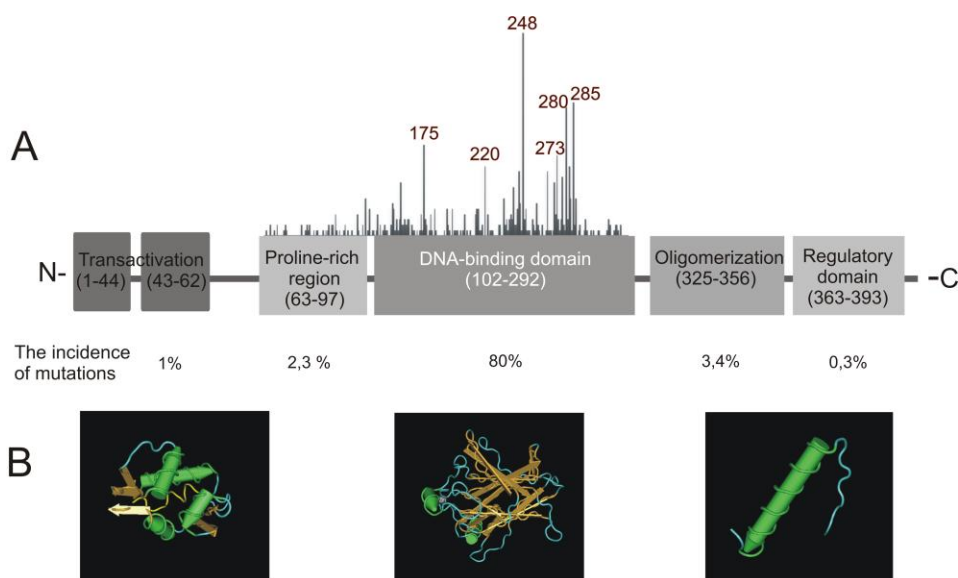
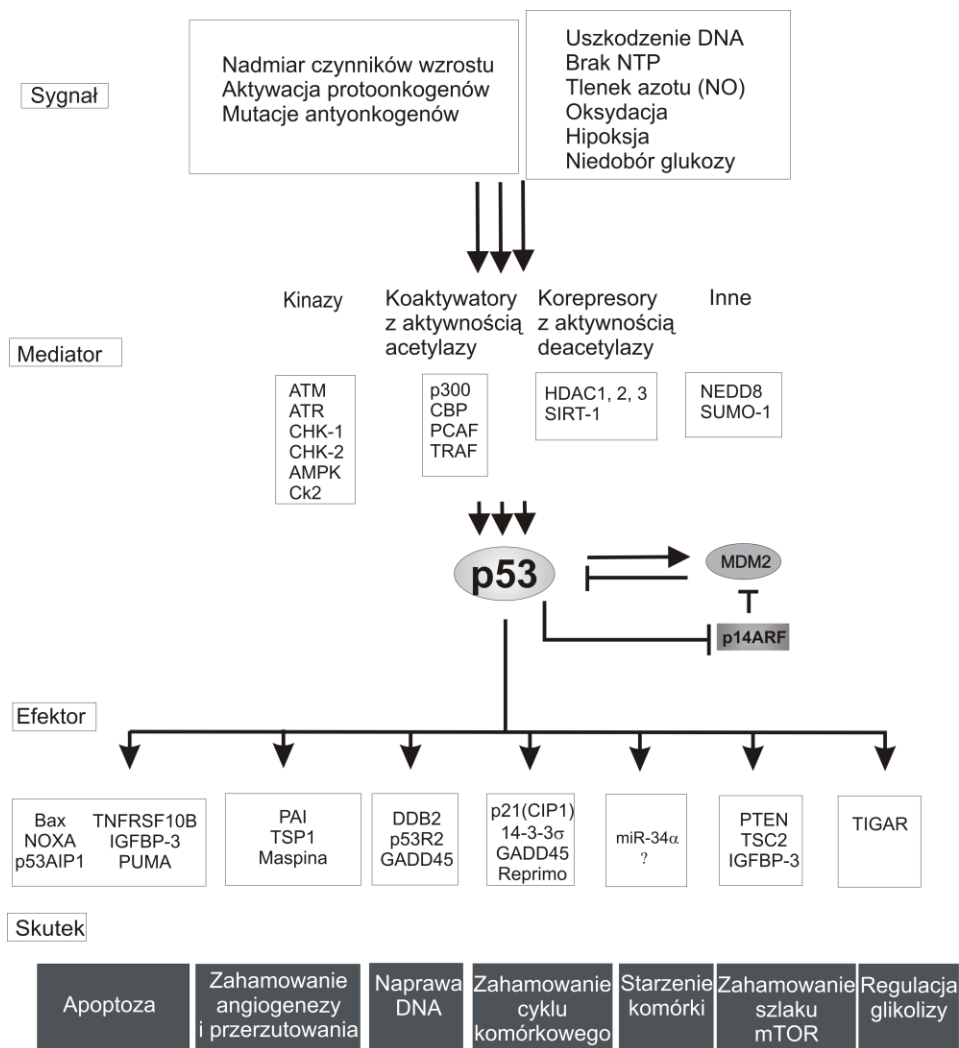


Fig. 5. Functional domains of the p53 protein together with the spectrum of the TP53 gene mutations in bladder cancer. A) The picture of p53 shows the N-terminal transactivation domain (two subdomains), responsible for activating downstream target genes. A proline-rich domain mediates p53 response to DNA damage through apoptosis. The DNA-binding domain is a core domain, and it is the target of 80% of TP53 mutations found in human cancers. A single mutation within this domain can cause a major conformational change and can inactivate the function of p53 protein. The oligomerization domain is required for p53 monomers to form tetramers. The negative regulatory domain has been identified in the C-terminus. It inhibits binding of latent p53 to its target sequence and must be covalently modified in order to convert p53 to its active state. The numbers in parenthesis refer to the numbers of amino acids in the p53 protein. The most common sites of the TP53 gene mutations in bladder cancer are codons 175, 220, 248, 273, 280, 285. The spectrum of TP53 mutations is based on IARC TP53 Database (version R11, October 2006) [305]. B) Ribbon diagram of the p53 protein domains. The illustration was designed using Cn3D from www.ncbi.nlm.nih.gov, and represents transactivation domain of the p53 protein (PDB code: 1YCR), DNA binding domain of p53 (PDB code: 2FEJ) and oligomerization domain (PDB code: 1AIE), respectively [416]. Secondary structure is indicated by the Cn3D coloration schema: α helix – green; β sheet – gold; β turn – blue. PDB – Protein Data Bank



Ryc. 6. Szlak p53. Różne rodzaje stresu aktywują szlak p53. Podstawowa regulacja szlaku jest osiągnięta poprzez zmianę stężenia i aktywności białka p53 i MDM2 oraz poprzez modyfikacje, degradacje i oddziaływania białko –białko (p14(ARF) hamuje aktywność MDM2). Białko p53 funkcjonuje, jako czynnik transkrypcyjny i inicjuje jeden z kilku możliwych efektów włączając w to zahamowanie cyklu komórkowego, przyspieszenie starzenia się komórki, apoptozę, naprawę DNA oraz zahamowanie angiogenezy i przerzutowania. Rycina zawiera przykłady białek pełniących funkcję mediatorów lub efektorów. Ostateczny efekt zależy od oddziaływań i sygnałów płynących z innych szlaków transdukcji sygnału. Pętla p53/MDM2/p14(ARF) wg Harris i Levine [151].

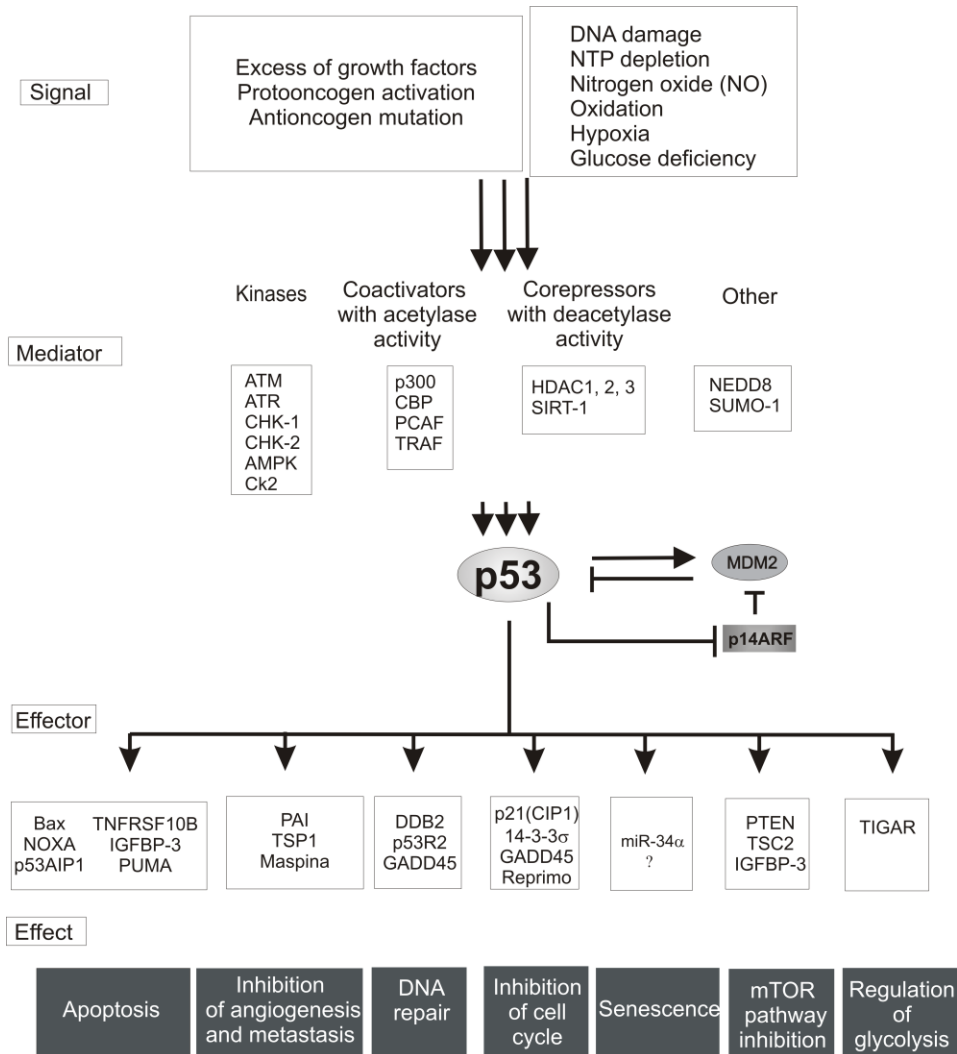


Fig. 6. The p53 pathway. Several types of stress signals activate the p53 pathway. The core regulation of the pathway is accomplished by changing the concentrations and activities of p53 and MDM2 by protein modifications, degradation or protein-protein interactions (p14(ARF) inhibits MDM2 activity). p53 acts as a transcription factor and initiates one of several possible outcomes including cell cycle arrest, senescence, apoptosis, inhibition of angiogenesis and metastasis, DNA repair, and glycolysis regulation. Examples of proteins that are encoded by mediator and effector genes are listed. Which of these outcomes is employed often depends on interactions and inputs from other signal transduction pathways. p53/MDM2/p14(ARF) loop according to Harris and Levine. [151]

W raku pęcherza moczowego najczęściej obserwuje się mutacje punktowe typu G:C→A:T 33%, G:C→A:T 19%, G:C→C:G 12%, G:C→T:A 11%, zaś kodonami najczęściej ulegającymi mutacjom są kodony: 248, 280 i 285. Jakkolwiek mutacje w genie *TP53* spotykane są w powierzchniowych guzach brodawkowatych (3%) to jednak są one najczęściej obserwowane w przypadku nowotworów inwazyjnych o wysokim stopniu złośliwości oraz rakach *in situ* (CIS) (> 50%) [61, 153, 374]. Wysoka częstość mutacji *TP53* w stadium T2–T4 w porównaniu z T1 sugeruje, że mutacje te związane są z progresją choroby [60, 374]. Nie jest, więc zaskoczeniem, że utrata zależnej od p53 ekspresji genu *CDKN1A* kodującego białko p21(CIP1/WAF1) jest także związana z progresją raka pęcherza moczowego [377].

Wydłużenie się czasu półtrwania białka p53 z kilku minut do 6 godzin, częstokroć w wyniku zmiany konformacji pod wpływem mutacji, umożliwia wykrycie stabilnego białka przy zastosowaniu techniki immunohistochemicznej używanej powszechnie, jako pośredni wskaźnik mutacji w genie *TP53* [96]. Należy jednak pamiętać, że nie wszystkie mutacje punktowe wywołują podwyższenie poziomu białka p53 jak również nie są one jedynym mechanizmem jego stabilizacji. W raku pęcherza moczowego akumulacja białka p53 obserwowana jest w granicach od 20% do 63% [312, 279]. Duże rozbieżności dotyczą także korelacji pomiędzy akumulacją białka p53 a stopniem złośliwości i zaawansowania tego nowotworu. Większość badań wskazuje, że immunoreaktywność białka p53 związana jest najczęściej z agresywnym stadium choroby nowotworowej. Różnice te wynikają najprawdopodobniej z braku standaryzacji metody oraz różnic w sposobach interpretacji obrazów immunohistochemicznych. Ponadto należy uwzględnić fakt, że negatywne wyniki analizy immunohistochemicznej mogą być skutkiem skróconej formy białka p53.

Pomimo trwających od wielu lat badań, rokownicze znaczenie analizy stanu p53 w raku pęcherza moczowego jest zagadnieniem kontrowersyjnym. Transformacja nowotworowa jest procesem złożonym i brak mutacji w genie *TP53* i/lub akumulacji białka p53 w jądrze komórkowym nie wyklucza istnienia defektów w innych składnikach (mediatorach, efektorach) szlaku p53. Ponadto założenie, że jeden marker molekularny wystarczy do prawidłowej oceny klinicznej jest założeniem bardzo uproszczonym. Tym samym obok analiz defektów genowych, w tym mutacji w onkogenach i supresorach transformacji nowotworowej, bardziej ogólne markery zmian genomowych, takie jak utrata heterozygotyczności, niestabilność mikrosatelitarna oraz metylacja DNA mogą okazać się bardzo użytecznymi w badaniach zmierzających do opracowania efektywnych metod diagnostycznych i prognostycznych raka pęcherza moczowego.

1.5. Mikrośrodowisko guza pęcherza moczowego

Mikrośrodowisko nowotworu odgrywa aktywną i złożoną rolę wpływając na kształt i metaboliczne funkcje komórek oraz przyczynia się do pobudzenia lub zahamowania wzrostu guza nowotworowego. Proces inwazji nowotworowej jest wynikiem zaburzeń oddziaływań międzykomórkowych oraz między komórkami a macierzą pozakomórkową (*extracellular matrix* – ECM). W oddziaływaniach międzykomórkowych istotną rolę odgrywa kadheryna E będąca transbłonową glikoproteiną. Obniżona ekspresja *CDH1* (gen kodujący kadherynę E) związana jest z zaburzeniem systemu adhezji i prowadzi do powstania przerzutów oraz inwazji nowotworu [14]. Istnieje kilka mechanizmów inaktywacji *CDH1*, jednym z nich jest obecność mutacji, której często towarzyszy delecja allelu prawidłowego oraz hipermetylacja regionu 5' genu *CDH1* [380]. W raku pęcherza moczowego mutacje *CDH1* występują rzadko i są obserwowane tylko u około 3% chorych [384], podczas gdy hipermetylacja regionu 5' występuje u około 84% chorych [325]. Obniżony poziom kadheryny E koreluje w tym nowotworze z wyższym stopniem zaawansowania i złośliwości oraz krótszym czasem przeżycia [30]. Ponadto, analiza cDNA z linii komórkowych raka pęcherza moczowego wykazała, że obniżenie ekspresji genu *CDH1* jest szczególnie często obserwowany w komórkach charakteryzujących się zaburzeniami szlaku p53 i/lub RB/p16INK4A [336].

W przeciwieństwie do kadheryny E, która hamuje inwazję, kadheryna N aktywuje inwazję nowotworu. W badaniach Rieger i wsp. [328] ekspresja genu *CDH2* (gen kodujący kadherynę N) w liniach komórkowych raka pęcherza moczowego niewykazujących ekspresji *CDH1* prowadziła do wzrostu inwazyjności w warunkach *in vitro*, podczas gdy w komórkach z ekspresją *CDH1* i *CDH2* inwazyjność była niska. Wyniki te wskazują na istnienie współzawodnictwa między tymi białkami, a efekt końcowy zależy od ilościowego stosunku i funkcjonalnego statusu obydwu białek.

Transbłonowa glikoproteina CD44 jest białkiem adhezyjnym zaangażowanym w oddziaływanie komórka – komórka oraz komórka – macierz pozakomórkowa. Znanych jest przynajmniej 20 izoform tego białka, będących wynikiem alternatywnego składowania RNA [288]. Jakościowe i ilościowe zmiany izoform CD44 o znaczeniu prognostycznym wykazano także w raku pęcherza moczowego [233, 373].

Urokinaza (uPA) jest proteinazą serynową odpowiedzialną za konwersję plazminogenu do plazminy, która prowadzi do inicjacji proteolitycznej kaskady i degradacji ECM, błony podstawnej oraz innych barier strukturalnych podczas migracji komórki [22]. Istotną rolę w nabywaniu przez komórkę inwazyjności odgrywa również receptor urokinazy (uPAR), tym samym oddziaływanie uPA-uPAR ma duże znaczenie w procesach proliferacji, angiogenezy, remodelowaniu tkanek i regulacji apoptozy [64]. W raku pęcherza moczowego poziom uPA w tkance nowotworowej znacznie wzrasta i ma znaczenie prognostyczne [155].

Podwyższony poziom antygenu uPA w analizie wieloczynnikowej powierzchniowych guzów raka pęcherza moczowego związany był ze zwiększoną zdolnością do inwazji i tworzenia przerzutów [154], zaś przedoperacyjny poziom uPA w osoczu chorych ze wskazaniem do radykalnej cystektomii był niezależnym czynnikiem rokowniczym związanym z przerzutami do regionalnych węzłów chłonnych i krótszym czasem przeżycia [354].

Szczególne rolę w procesie inwazji nowotworów przypisuje się metaloproteinazom macierzy (MMP), które są enzymami proteolitycznymi degradującymi macierz pozakomórkową [406]. W raku pęcherza moczowego poziom MMP-2 i MMP-9 wzrasta wraz ze wzrostem stopnia zaawansowania i złośliwości, zaś ekspresja genu kodującego MMP-2 jest znacząco związana ze skróconym czasem przeżycia [191, 406].

Progresja raka pęcherza moczowego wiąże się z angiogenezą i charakteryzuje się zwiększoną ekspresją genów czynników pro-angiogennych, do których należy VEGF [297], PDGF [299] i bFGF [298] oraz utratą ekspresji genów inhibitorów angiogenezy, takich jak IFN- β [78] i trombospodyna-1 [140]. Pierwszym mediatorem powstawania nowych naczyń krwionośnych w obrębie guza jest VEGF. Wysoki poziom VEGF w surowicy chorych na raka pęcherza moczowego wykazuje związek z wyższym stopniem zaawansowania i złośliwości, rakiem *in situ*, przerzutami oraz krótszym czasem przeżycia chorego [17]. Obniżony poziom trombospodyny-1 wykazuje związek ze zwiększonym ryzykiem wznowy, skróconym czasem przeżycia i obecnością zmutowanego białka p53 [24].

1.6. Zmiany epigenetyczne w raku pęcherza moczowego

Zmiany epigenetyczne są zdefiniowane, jako zmiany dziedziczne ekspresji genów niebędące wynikiem zmian sekwencji DNA [427]. Mechanizmami epigenetycznymi odgrywającymi kluczową rolę w regulacji ekspresji genów są metylacja DNA, modyfikacja chromatyny oraz degradacja homologicznego RNA inicjowana przez krótkie dwuniciowe fragmenty RNA.

1.6.1. Hipermetylacja DNA

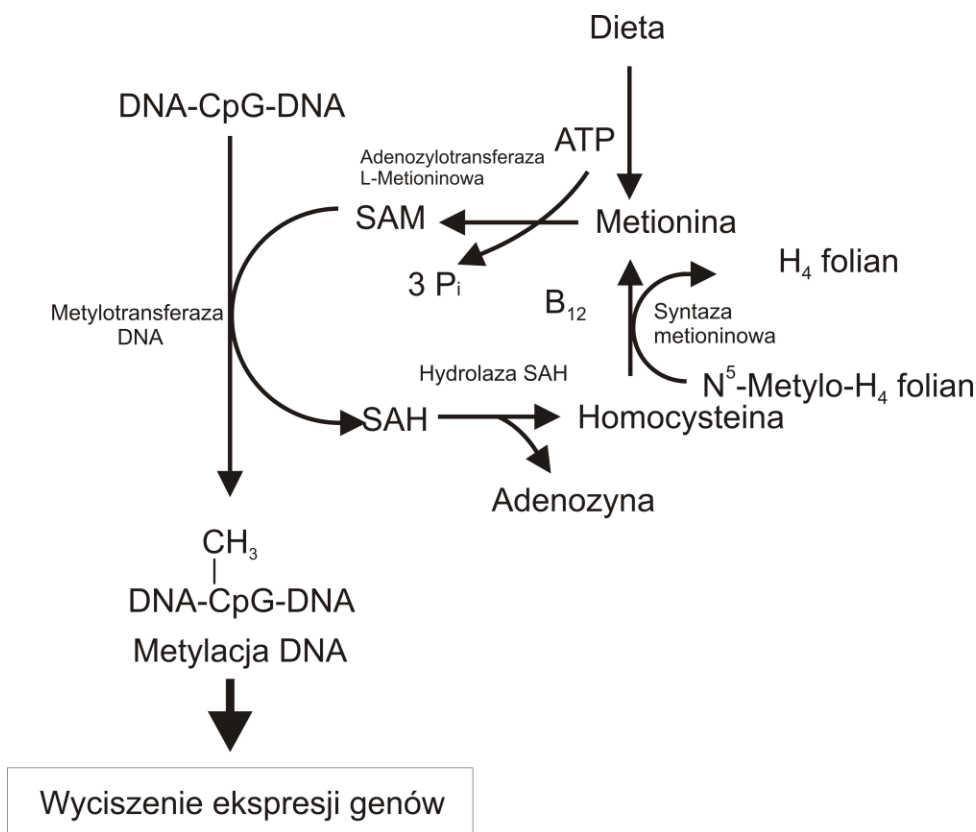
Hipermetylacja DNA w komórkach wyższych Eukaryota jest modyfikacją DNA polegającą na metylacji cytozyny do 5 metylocytozyny w reakcji katalizowanej przez metylotransferazę DNA (DNMT). U ssaków proces ten jest katalizowany głównie przez trzy metylotransferazy DNMT1, DNMT3a i DNMT3b. Metylotransferaza DNMT1 wykazuje duże powinowactwo do hemimetylowanego DNA i jest związana z utrzymaniem profilu metylacji w trakcie replikacji DNA, zaś DNMT3a i DNMT3b są odpowiedzialne za metylację *de novo* w czasie embriogenezy [304,

316]. Grupa metylowa pochodzi z S-adenozylometioniny (SAM), która ulega konwersji do S-adenozylhomocysteiny (SAH) (ryc. 7). Metylacji ulega cytozyna dwunukleotydu CpG. W komórkach prawidłowych 70-90% sekwencji CpG jest zmetylowanych co stanowi 0,75-1% wszystkich par zasad genomu ludzkiego [91]. Większość (98%) sekwencji CpG genomu powtarza się, co 80 nukleotydów z wyjątkiem wysp CpG. Wyspy CpG są regionami, gdzie częstość występowania sekwencji CpG wzrasta około pięciokrotnie w porównaniu z innymi miejscami genomu. Wyspy CpG o długości od 0,5 do 2 kbp stanowią 1-2% genomu i występują przede wszystkim w regionach 5' 60% genów [123]. Proces metylacji odgrywa istotną rolę w embriogenezie ssaków [226], związany jest także z inaktywacją jednej kopii chromosomu X u samic ssaków, piętnowaniem genów zwanym "imprintingiem" oraz represją tkankowo specyficznych genów [28, 181]. Powszechnie uważa się, że metylacja de novo wysp CpG w sekwencji promotora określonych genów jest stałą i charakterystyczną zmianą związaną z procesem nowotworzenia. Trwają badania mające na celu analizę zmian profilu metylacji w przypadku otyłości, cukrzycy, chorób serca oraz schizofrenii. Metylacja DNA odgrywa istotną rolę w naprawie DNA, niestabilności genomowej oraz regulacji struktury chromatyny. Konsekwencją metylacji sekwencji CpG jest wyciszenie ekspresji genów [322]. Hipermetylacja supresorów transformacji nowotworowej związana jest z brakiem transkrypcji genu oraz brakiem mutacji w sekwencji kodującej genu. Tym samym metylacja sekwencji 5' niektórych genów wywołuje taki sam efekt jak mutacja czy delekcja, co sugeruje, że hipermetylacja, powinna być uwzględniona, jako jeden z dwóch etapów inaktywacji supresorów transformacji nowotworowej w modelu dwóch uderzeń Knudsona [185].

Hipermetylacja DNA jest najlepiej poznaną i opisaną w literaturze zmianą epigenetyczną obserwowaną w raku pęcherza moczowego. Metylacja sekwencji 5' obserwowana jest głównie w przypadku supresorów transformacji nowotworowej oraz genów związanych z naprawą DNA, regulacją cyklu komórkowego, transdukcją sygnału, apoptozą, inwazją komórek nowotworowych i/lub przerzutami (tab. 4). Szczególnie często obserwowane jest epigenetyczne wyciszenie genów zlokalizowanych w chromosomie 9, takich jak *CDKN2A*, *DBC1* i *DAPK*. Zauważalne też są, co zostało przedstawione w tabeli 4, duże rozbieżności w wynikach, które są najprawdopodobniej efektem czułości stosowanych metod, jak i w niektórych przypadkach zbyt małą liczebnością badanej grupy chorych. Metylacja obserwowana jest zarówno w materiale pobranym z tkanki guza jak i w komórkach z osadu moczu. Nakagawa i wsp. [284] zaobserwowali korelację pomiędzy metylacją DNA, a zwiększonym poziomem białka DNMT1 w raku pęcherza moczowego. Jakkolwiek hipermetylacja DNA nie musi być wynikiem nadekspresji DNMT [90].

Dużym zainteresowanie wzbudza analiza komórek z osadu moczu, która mogłaby być wykorzystana w nieinwazyjnej diagnostyce raka pęcherza moczowego. Chan i wsp. [45] wykorzystując zestaw 7 genów (*RARB*, *DAPK*, *CDH1*, *p16INK4A*, *p15INK4B*, *GSTP1*, *MGMT*) i osady moczu stwierdzili obecność

metylacji co najmniej jednego z nich w około 90% przypadków raka pęcherza moczowego, zaś zestaw 3 genów (*DAPK*, *BCL2*, *TERT*) użyty w pracy Friedrich i wsp. [118] charakteryzował się 78% czułością i 100% specyficznością. Znacznie niższą czułość (68%) i specyficzność (60%) zaobserwował Yates i wsp. [435] w badaniach nad metylacją komórek osadu moczu z wykorzystaniem trzech genów (*RASSF1A*, *CDH1*, *APC*) i grupy kontrolnej ze średnią wieku >70.



Ryc. 7. Ogólny zarys metylacji cytozyny i wyciszania ekspresji genów. Metionina i S-adenozylometionina (SAM) są istotne ze względu na syntezę białek, poliamid i reakcji metylacji. N5-metylo-H4 folia odgrywa ważną rolę w metylacji homocysteiny do metioniny. Metionina kondensuje z ATP, tworząc S-adenozylometioninę (SAM), która dostarcza grupę metylową (-CH₃) do metylacji DNA i ulega przekształceniu do S-adenozylhomocysteiny (SAH). Zależna od SAM metylacja wysp CpG DNA odgrywa istotną rolę w regulacji ekspresji genów

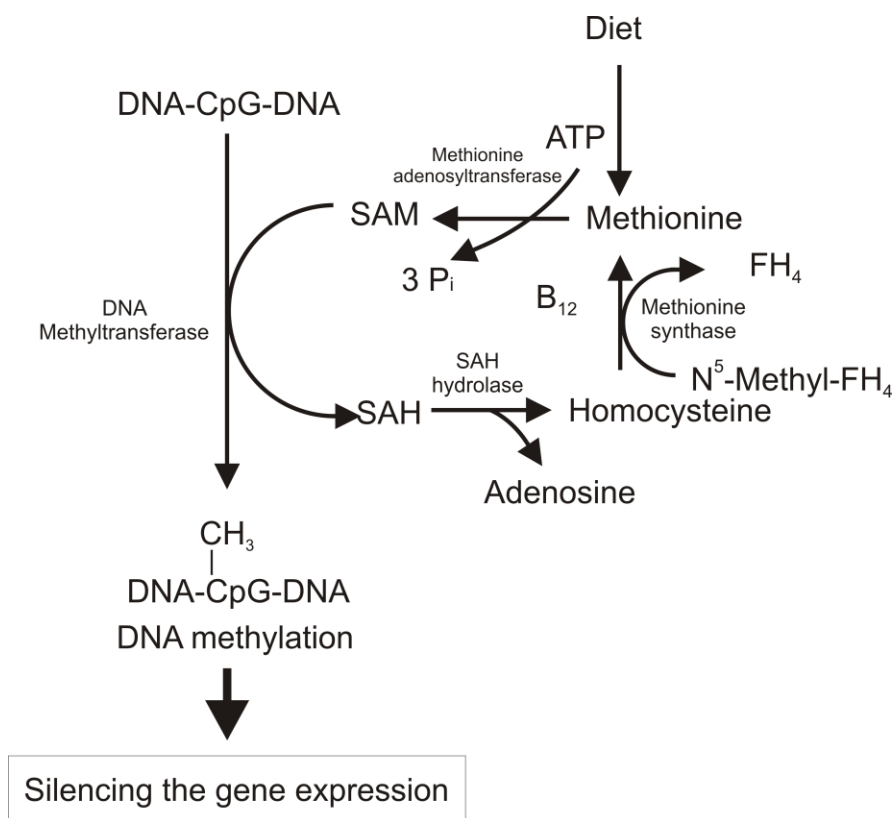


Fig. 7. An overview of the cytosine methylation and gene silencing. Methionine and S-adenosylmethionine are crucial for protein, polyamine synthesis and methylation reactions. 5-methyltetrahydrofolate donates a methyl group to homocysteine to produce methionine. Methionine reacts with ATP to form S-adenosylmethionine (SAM), which donates methyl (-CH₃) group to DNA and is converted to S-adenosylhomocysteine (SAH). SAM-dependent methylation of DNA CpG islands is an important event for the regulation of gene expression

W przypadku analizy tkanki guza dobór właściwego zestawu genów pozwala na uzyskanie wysokiej 100% czułości testu [86]. Istniejące różnice dotyczące czułości i specyficzności metody wskazują na potrzebę przeprowadzenia dodatkowych badań, które umożliwiłyby identyfikację optymalnego zestawu genów do analizy metylacji w raku pęcherza moczowego.

Tabela 4. Geny ulegające hipermetylacji w raku pęcherza moczowego
 Table 4. Genes hypermethylated in bladder cancer

Szlak lub funkcja <i>Pathway or function</i>	Geny ulegające hipermetylacji <i>Hypermethylated genes</i>	Liczba pacjentów <i>No. of Patients</i>	Pozytywnych % <i>Positive %</i>	Piśmiennictwo <i>References</i>
Naprawa DNA <i>DNA repair</i>	<i>MGMT</i>	93	10	[43]
		55	17	[383]
		98	2	[257]
		98	5	[45]
		96	37,5	[434]
	<i>MLH1</i>	55	13	[383]
		81*	29,6	[117]
		24**	58,3	[117]
Regulacja cyklu komórkowego <i>Cell-cycle regulation</i>	<i>p16INK4A</i>	102	9	[43]
		98	7	[257]
		98	26,5	[45]
		27	18	[80]
		45	7	[86]
		81*	21	[117]
		24**	4	[117]
		70	21	[284]
		86	26	[401]
	<i>DBC1</i>	45	17,8	[193]
		69	52	[145] [46]
	<i>p15INK4B</i>	98	13,3	[45]
	<i>p14(ARF)</i>	93	8	[43]
		45	35	[86]
		27	56	[80]
		45	31,1	[193]
	<i>HIC-1</i>	96	21,9	[434]
	<i>CCND2</i>	96	21,9	[434]
Transdukcja sygnału <i>Signal transduction</i>	<i>RASSF1A</i>	106	54	[43]
		98	35	[257]
		45	51	[86]
		81*	51,8	[117]
		24**	95,8	[117]
		40	47,5	[44]
		52	54,2	[434]

Szlak lub funkcja <i>Pathway or function</i>	Geny ulegające hipermetylacji <i>Hypermethylated genes</i>	Liczba pacjentów <i>No. of Patients</i>	Pozytywnych % <i>Positive %</i>	Piśmiennictwo <i>References</i>
	<i>APC</i>	98 45 96	35 69 31	[257] [86] [434]
	<i>EDNRB</i> <i>IGFBP3</i>	96 96	66,7 42,7	[434] [434]
Apoptoza <i>Apoptosis</i>	<i>DAPK</i>	98 55 106 98 81* 24** 70 21	58 29 8 4 24,6 20,8 21 21,9	[45] [383] [43] [257] [117] [117] [284], [434]
	<i>BCL2</i>	96	44,8	[434]
	<i>TNFRSF25</i>	96	75	[434]
Odpowiedź hormo- nalna <i>Hormone response</i>	<i>RARB</i>	94 98 98	24 15 87,8	[43] [257] [45]
Inwazja komórek i/lub przerzuty <i>Cell invasion and /or metastasis</i>	<i>TIMP3</i>	15 96	93 22,9	[169] [434]
	<i>CDH1</i>	101 98 98 51 81* 24** 96	60 36 63 84 8,6 8,3 40,6	[43] [257] [45] [325] [117] [117] [434]
	<i>CDH4</i>	96	14,6	[434]
Metabolizm kance- rogenów <i>Carcinogen meta- bolism</i>	<i>GSTP1</i>	82 98 98	0 11 5,1	[43] [257] [45]
Inne <i>Other</i>	<i>WWOX</i> <i>FHIT</i> <i>hTERT</i>	27 27 96	29 11 20,8	[175] [175] [434]

* pTa; **pT1

1.6.2. Hipometylacja DNA a proces nowotworzenia

Komórki nowotworowe charakteryzują się całkowitą hipometylacją DNA genomowego [130], przy jednoczesnej metylacji sekwencji CpG w regionach 5' wielu supresorów transformacji nowotworowej [216]. Stopień hipometylacji jest zmienny i zależy od typu nowotworu. W raku piersi obniżenie poziomu metylacji w tkance nowotworowej w stosunku do prawidłowej wynosi 56% podczas gdy tylko niewielkie zmiany obserwowane są w przypadku przewlekłej białaczki szpikowej i ostrej białaczki szpikowej [99]. Rola hipometylacji w procesie nowotworzenia nie jest do końca poznana. Z obserwacji wynika, że demetylacja 5-metylocytozyny (m^5C) występuje najczęściej poza regionem promotorowym oraz w regionach o niskiej częstości występowania wysp CpG [330]. Ponadto obniżony poziom m^5C może być wynikiem działania czynników kancerogennych będących inhibitorami metylotransferazy DNA [425], jak również diety ubogiej w foliany [424]. Rola hipometylacji DNA w procesie nowotworzenia polega między innymi na aktywacji genów promujących wzrost komórek nowotworowych oraz indukcji niestabilności chromosomowej [50]. Hipometylacji bardzo często ulegają powtarzające się z wysoką częstością i umiejscowione w heterochromatynie sekwencje satelitarne, co może prowadzić do zmiany struktury chromatyny i niestabilności genomu [289]. Szczególnie wrażliwe na hipometylację są sekwencje DNA przylegające do centromerów chromosomu 1, 16 oraz 9 predysponujące komórki zarówno do strukturalnych jak i liczbowych aberracji chromosomowych [319]. Wynikiem hipometylacji może być również aktywacja sekwencji nukleotydowych powtarzających się z umiarkowaną częstością np. retrotranspozonów oraz sekwencji obecnych w jednej lub bardzo niewielu kopiach [221].

Mechanizm odpowiedzialny za globalną hipometylację w nowotworach wciąż pozostaje nieznany. Wydaje się jednak, że ma on związek z aktywnością zależnej od ATP helikazy z rodziny SNF2 będącej katalityczną podjednostką kompleksu SWI/SNF odpowiedzialnego za przekształcenia chromatyny. Komórki z mutacją w genie *ATRX*, kodującym helikazę SNF2, wykazywały hipometylację wskazując tym samym na istotną rolę SNF2 w utrzymaniu prawidłowego profilu metylacji [126]. Drugim białkiem, które należy do rodziny SNF2 i odgrywa istotną rolę w procesie metylacji jest białko Lsh (*lymphoid specific helicase*). Całkowity brak tego białka w przypadku mysich embrionalnych fibroblastów pobranych od myszy *LSD^{-/-}* prowadził do poważnych zaburzeń procesów metylacji oraz niestabilności chromosomowej [103].

W raku pęcherza moczowego hipometylacja jest zjawiskiem znanym [349]. Neuhausen i wsp. [293] zaobserwowali hipometylację transpozonów LINE-1 u 90% chorych na raka pęcherza moczowego, która korelowała z krótszym czasem przeżycia, natomiast Kimura i wsp. [197] na podstawie wyników swoich badań zasugerowali związek pomiędzy LOH chromosomu 9, a hipometylacją genomu.

Po raz pierwszy genowo specyficzną hipometylację zauważono w przypadku protoonkogenu MYC [73], zaś ostatnio hipometylacja promotora czynnika transkrypcyjnego EGR1 (*early growth response 1*) korelowała nie tylko z podwyższonym poziomem mRNA EGR1, ale również z ekspresją mRNA, zależnej od EGR1, heparynazy aktywnie zaangażowanej w proces inwazji i tworzenia przerzutów w raku pęcherza moczowego [303]. Na dalszą weryfikację czekają również badania, w których wykazano możliwość zastosowania hipometylacja DNA, jako markera podatności na zachorowanie na raka pęcherza moczowego [278].

1.6.3. Modyfikacja struktury i funkcji białek chromatyny

Istnieją dowody na to, że metylacja DNA oraz kompleksy modelujące chromatynę działają wspólnie, czego przykładem jest DNMT3a, enzym, który nie tylko bierze udział w metylacji DNA *de novo*, ale również jest częścią kompleksu zaangażowanego w modyfikację histonów, szczególnie deacetylację i metylację [68].

Podstawową jednostką strukturalną chromatyny jest nukleosom będący oktamerem histonów rdzeniowych H2A, H2B, H3 i H4, otoczony fragmentem DNA o długości 140-160 pz [208]. Histony to małe zasadowe białka o globularnej domenie centralnej i wolnym końcu aminowym, połączone z DNA wiązaniami niekowalencyjnymi głównie pomiędzy dodatnio naładowanymi aminokwasami a resztami kwasu fosforowego w DNA. Modyfikacje struktury histonów, głównie końca aminowego związane z acetylacją, fosforylacją i metylacją, jak również zależna od ATP przebudowa nukleosomów odgrywają istotną rolę w procesie regulacji transkrypcji. Modyfikacje potranslacyjne histonów tworzą swoisty „kod histonowy”, który rozszerza potencjał informacyjny zapisany w kodzie genetycznym [182]. W okresie aktywności transkrypcyjnej chromatyny, reszty lizyny ulegają acetylacji za pośrednictwem reakcji katalizowanych przez acetyltransferazy (HAT) w obecności acetylo-CoA – donora grupy acetylowej. Enzymy te podzielono na trzy grupy: GNAT (*GCN5-related-N-acetyltransferases*), MYST (*MOZ, YBF2/SAS3, SAS2 i TIP60*) i p300/CBP [332]. Acetylacji najczęściej ulegają lizyna w poz. 9, 14, 18 i 23 histonów H3 i H4 [389]. Działanie HAT osłabia powinowactwo histonów do DNA, rozluźnia chromatynę i czyni ją bardziej dostępną dla czynników transkrypcyjnych [404]. Oprócz histonów, HAT mogą również acetylować niektóre czynniki transkrypcyjne, np. E2F1 i p53, co zwiększa ich zdolność łączenia się z DNA i regulację ekspresji genów [332].

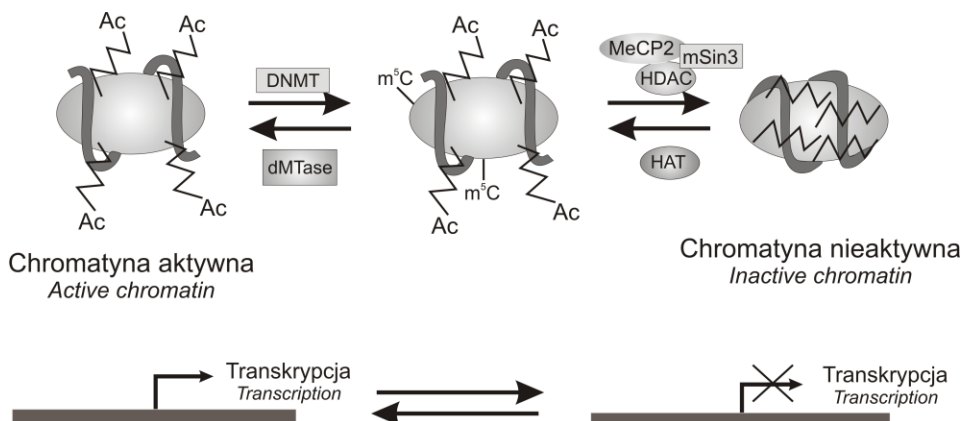
Deacetylacja jest procesem, który zmniejsza dostępność DNA poprzez przywrócenie dodatniego ładunku N-końcowym obszarom histonów [71]. Wynikiem zmiany struktury chromatyny, która przekształca się w nieaktywną transkrypcyjnie heterochromatynę jest wyciszenie ekspresji genów (ryc. 8) [33,

173]. Reakcję związaną z represją transkrypcji katalizują deacetylazy histonowe (HDAC). Wyodrębniono trzy klasy HDAC, tj. klasę I (HDAC1, HDAC2, HDAC3 i HDAC8), klasę II (HDAC4, HDAC5, HDAC6 i HDAC7) oraz klasę III składającą się z enzymów zależnych od NAD^+ , których przykładem jest deacetylaza Sir2 (*sirtuin*) [135]. Represja ekspresji genów jest związana między innymi z przyłączeniem się do DNA, białek takich jak MeCP2, zawierających domenę wiążącą się z metylovaną sekwencją CpG [287]. Białka te zawierają także domenę represji transkrypcji (*transcription repression domain* – TRD), która tworzy kompleks z wieloma korepresorami np. mSin3A oraz deacetylazami histonowymi np. HDAC1 oraz HDAC2 [186]. Deacetylazy usuwają grupę acetylową z grupy ϵ -aminowej lizyny histonów H3 i H4 [19]. Przypuszcza się, że oddziaływanie pozytywnie naładowanych reszt lizyny z cząsteczką DNA ogranicza ruchliwość nukleosomów czyniąc tym samym sekwencje regulatorowe promotora niedostępnymi dla czynników transkrypcyjnych [398]. Podobnie jak w przypadku HAT substratami HDAC mogą być czynniki transkrypcyjne, takie jak p53, E2F1, TFIIE, GATA1 [135].

Innym mechanizmem, który reguluje dostęp do cząsteczki DNA jest metylacja N-terminalnej lizyny histonów H3 i H4 katalizowana jest przez metylotransferazę histonową [213]. Generalnie metylacja lizyny 9 histonu H3 (H3K9), H3K27 i H4K20 związana jest z wyciszeniem ekspresji genów, podczas gdy metylacja H3K4, H3K36 lub H3K79 z aktywną transkrypcją genów [366]. Przyłączenie się, biorącego udział w przebudowie chromatyny kompleksu CHD1 do metylovanego epitopu H3K4 wskazuje, że metylacja histonów może być odpowiedzialna za rekrutację kompleksów biorących udział w ATP-zależnej przebudowie chromatyny [365]. Ponadto metylacja H3K9 zwiększa powinowactwo heterochromatyny do czynnika HP1 (*heterochromatin protein 1*) [214], który pełni funkcję łącznika pomiędzy białkami jądrowymi a chromosomem biorąc tym samym udział w regulacji ekspresji genów [413].

Zaburzenia w aktywnościach zarówno HAT jak i HDAC są zjawiskiem powszechnie obserwowanym w chorobach nowotworowych [248]. Aktywność HAT związana jest z przede wszystkim z supresją nowotworu, zaś aktywność HDAC z transformacją nowotworową. W komórkach nowotworowych geny kodujące enzymy HAT ulegają translokacjom, amplifikacjom, nadekspresji i/lub mutacjom. Analiza funkcji HAT i HDAC w procesie nowotworzenia opiera się głównie na stosowaniu odpowiednich inhibitorów i analizie profilu ekspresji genów. Badania Richon i wsp. [326] z wykorzystaniem ludzkiej linii komórkowej raka pęcherza moczowego (T24) wykazały 9-krotny wzrost poziomu ekspresji mRNA *p21(CIP1/WAF1)* po inkubacji komórek z inhibitorem HDAC. Jednocześnie zaobserwowano wzrost acetylacji histonów H3 i H4 i tym samym wykazano, że acetylacja histonów może być genowo specyficzna. Analizy przeprowadzone na większą skalę z wykorzystaniem mikromacierzy Affymetrix 6800, linii komórkowej T24 oraz inhibitorów HDAC pokazały, że 8-10% analizowanych genów jest regulowana przez inhibitory HDAC [128]. Istota tych

badania polega nie tylko na identyfikacji zestawu genów, których ekspresja regulowana jest przez inhibitory HDAC, ale również na wyznaczeniu nowych celów terapii przeciwnowotworowej.



Ryc. 8. Model regulacji transkrypcji poprzez metylację cytozyny i acetylację histonów. Hipermetylacja promotorowych wysp CpG katalizowana przez metylotransferazę DNA (DNMT) i hipoacetylacja katalizowana przez deacetylazę histonową (HDAC) związane są z represją transkrypcji. Białko MeCP2 tworzy kompleks z korepresorem mSin3 i HDAC. Reakcje odwrotne katalizowane są odpowiednio przez acetylotransferazę histonową (HAT) i demetylazę DNA (dMTase)

Fig. 8. Model for the role of cytosine methylation and histone acetylation in transcriptional regulation. Promoter CpG island hypermethylation catalyzed by DNA methyltransferase (DNMT) and histone hypoacetylation by histone deacetylase (HDAC) are associated with transcriptional repression. The methyl CpG-binding protein MeCP2 recruits mSin3/HDAC complex. The reverse reactions are catalyzed by histone acetyltransferase (HAT) and DNA demethylase (dMTase), respectively

1.6.4. Zależne od RNA wyciszanie ekspresji genów

Interferencja RNA jest procesem związanym z potranskrypcyjnym wyciszeniem genów i łączy się z obecnością krótkich fragmentów RNA (siRNA) indukujących degradację homologicznego RNA [393]. Degradacji może ulegać mRNA lub egzogeny RNA np. wirusowy, dlatego też uważa się, że ten rodzaj wyciszania genów u kręgowców jest istotnym elementem naturalnej odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciwko retrowirusom oraz transpozonom [249]. Ponadto, wyniki ostatnich badań nad mechanizmami wyciszania ekspresji

genów umożliwiają połączenie siRNA z dwoma innymi szlakami zaangażowanymi w bezpośrednią kontrolę profilu ekspresji ludzkiego genomu, tj. szlakiem DNMT oraz HDAC. Powstawanie siRNA jest wynikiem wieloetapowego procesu, w którym bierze udział zależna od ATP rybonukleaza Dicer, należąca do RNaz III-typu. W wyniku reakcji hydrolizy prekursora siRNA, dwuniciowej cząsteczki RNA (dsRNA), katalizowanej przez Dicer powstają krótkie siRNA o długości 21-25 pz zakończone dwoma wolnymi nukleotydami na końcu 3' [296]. siRNA ulega rozwinięciu pod wpływem działania helikazy RNA i wchodzi w skład aktywnego kompleksu RISC (*RNA-induced silencing complex*), który hybryduje z komplementarną cząsteczką mRNA prowadząc do jej degradacji [146].

Innym typem niekodującego RNA, który bierze udział w wyciszaniu ekspresji genów jest mikro RNA (miRNA). Dojrzewanie miRNA w komórce podobnie jak w przypadku siRNA wiąże się z aktywnością rybonukleazy Dicer, aczkolwiek sam mechanizm działania i funkcja miRNA są odmienne. miRNA reguluje ekspresję endogennych genów głównie na poziomie translacji poprzez przyłączenie się miRNA do nieulegającego translacji regionu 3' mRNA (3' UTR) i zahamowaniu biosyntezy białka [343]. W bazie danych sekwencji miRNA (<http://microrna.sanger.ac.uk>, wersja 13) zarejestrowano ponad 9000 (w tym 706 ludzkich) miRNA [138]. Sekwencje kodujące miRNA są zlokalizowane przede wszystkim w intronach genów kodujących białka jak również w intronach i rzadziej w eksonach niekodujących jednostek transkrypcyjnych [329]. miRNA biorą udział w rozwoju i różnicowaniu komórek oraz wykazują specyficzność zarówno tkankową, jak i komórkową. Wpływ miRNA na profil ekspresji genów nie pozostaje bez związku z procesem transformacji nowotworowej. miRNA mogą funkcjonować, jako onkogeny (miR-155, miR-21) lub jako supresory transformacji nowotworowej (miR-15a i miR-16-1) [57, 177]. Zmiany genetyczne, które mają wpływ na funkcję miRNA są takie same jak w przypadku genów kodujących białka i są to amplifikacje, delecje lub mutacje. Zróżnicowany poziom ekspresji miRNA za odnotowano w przypadku wielu chorób nowotworowych w tym w raku pęcherza moczowego [230]. Lin i wsp. [230] zaobserwowali około 14-krotny spadek ekspresji miRNA-143 w guzach pęcherza moczowego w porównaniu do tkanki bez zmian nowotworowych. Ponadto, transfekcja miRNA-143 do linii komórkowych EJ i T24 znacząco zahamowała proliferację komórek oraz obniżyła ekspresję genu *RAS*, co wskazuje na potencjalną funkcję supresorową miRNA-143 w guzach pęcherza moczowego [230]. Obniżoną ekspresję zaobserwowano także w przypadku miR-145, zaś ekspresja miR-21 była istotnie podwyższona w analizie profilu ekspresji 290 miRNA w 106 guzach pęcherza moczowego [87]. Badania te pozwoliły także na wytypowanie miRNA (miR-129, miR-133b i miR-518) wykazujących związek z progresją raka pęcherza moczowego. Tym samym pierwsze wyniki analiz ekspresji miRNA zachęcają do dalszych badań i wskazują na możliwość wykorzystania miRNA, jako nowego markera nowotworowego raka pęcherza moczowego.

1.7. Markery nowotworowe w diagnostyce i prognostyce raka pęcherza moczowego

Badania dotyczące zmian genetycznych i epigenetycznych mają na celu opracowanie klasyfikacji molekularnej, która w przyszłości byłaby uzupełnieniem klasyfikacji anatomopatologicznej. W chwili obecnej analiza cytologiczna, uzupełniona cystoskopią jest głównym narzędziem diagnostycznym raka pęcherza moczowego, zaś stopień zaawansowania i złośliwości są najbardziej wiarygodnymi wskaźnikami prognostycznymi. Nie są to narzędzia doskonałe, albowiem cystoskopia może nie wykryć małych zmian powierzchniowych, zaś analiza cytologiczna moczu pomimo dużej specyficzności (95-100%) charakteryzuje się niską czułością (30-60%) zwłaszcza w przypadku nowotworów o niskim stopniu zaawansowania. Wysoka częstość nawrotów w przypadku nowotworów powierzchniowych oraz krótki czas przeżycia w przypadku progresji do raka inwazyjnego wymagają wyznaczenia markerów pozwalających nie tylko na dokładną i nieinwazyjną diagnostykę guzów pierwotnych, ale i na monitorowanie chorych. Obecnie dostępnych jest wiele testów komercyjnych umożliwiających analizę markerów między innymi w surowicy i moczu. Amerykańska Administracja ds. Żywności i Leków (*Food and Drug Administration* – FDA) do monitorowania pacjentów z nieinwazyjnym rakiem pęcherza moczowego zaakceptowała test umożliwiający ocenę obecności pęcherzowego antygenu nowotworowego w moczu (*bladder tumor antigen* – BTA), jak również test wykrywający produkty degradacji fibryny (*fibrin degradation products* – FDP), test na obecność białka NMP22 (*nuclear matrix protein 22*) oraz fluorescencyjną hybrydyzację *in situ* (FISH). Trwają badania mające na celu ocenę użyteczności nieinwazyjnych testów opartych między innymi na analizie CYFRA21-1, specyficznego polipeptydowego antygenu tkankowego (*tissue polypeptide-specific antigen* – TPS), tkankowego polipeptydowego antygenu (*tissue polypeptide antigen* – TPA), kwasu hialuronowego, gonadotropiny kosmówkowej, telomerazy oraz niestabilności mikrosatelitarnej. Czułość tych testów waha się w granicach od 49 do 94% [242]. Na szczególną uwagę zasługuje metoda FISH zastosowana w teście UroVysion, w którym wykorzystuje się sondy centromerowe chromosomów 3, 7, 17 oraz sondę specyficzną *locus* 9p21. Analiza wyników porównujących czułość i specyficzność cytologii z metodą FISH dostępnych w bazie Medline, wykonana przez Jonesa [184] wykazała przewagę FISH w porównaniu z cytologią zwłaszcza w przypadku raków CIS gdzie czułość analizy cytologicznej wynosiła 67% a FISH 100%. Ze względu na stopień złośliwości czułość cytologii w porównaniu do FISH wynosiła odpowiednio dla guzów G1 19% i 58%, dla G2 50% i 77% dla G3 71% i 96%. Podobne wyniki uzyskano dla stopnia zaawansowania i tak dla stadium Ta czułość cytologii wynosiła 35% a FISH 64% dla T1 66% vs 83%, dla T2–T4 76% vs 94% [184]. Tym samym wydaje się, że FISH zwany cytologią molekularną stanowi interesującą alterna-

tywę dla klasycznej cytologii komórek z osadu moczu umożliwiając detekcję zmian chromosomowych we wczesnych stadiach raka pęcherza moczowego.

Obecnie znaczna uwaga skupiona jest na poszukiwaniu markerów prognostycznych i predykcyjnych głównie wśród onkogenów, regulatorów cyklu komórkowego, cząsteczek adhezyjnych, czynników wzrostu, receptorów czynników wzrostu, proteinaz powierzchniowych, jak i ploidii DNA (tab. 5). Jak dotąd żaden z tych markerów nie został zaakceptowany do użycia w badaniach standardowych w związku z tym cystoskopia i cytologia wciąż pozostają podstawowymi badaniami diagnostycznymi raka pęcherza moczowego.

Tabela 5. Markery prognostyczne raka pęcherza moczowego

Table 5 Prognostic markers of bladder cancer

Marker <i>Marker</i>	Wartość prognostyczna <i>Reported prognostic value</i>	Piśmiennictwo <i>References</i>
Regulatory cyklu komórkowego / <i>Cell cycle regulators</i>		
p53	Marker progresji / <i>Marker of progression</i>	[96, 235, 238]
RB	Korelacja z progresją i krótszym czasem przeżycia / <i>Correlation with progression and shorter survival time</i>	[62, 241]
p21(CIP1/WAF1)	Marker wznowy i krótszego czasu przeżycia / <i>Marker of recurrence and shorter survival time</i>	[268, 377]
p27KIP1	Związek z ze stopniem złośliwości i czasem przeżycia / <i>Association with the grade and survival time</i>	[207]
p16INK4A	Marker progresji w przypadku guzów T1/ <i>Marker for progression in T1</i>	[211]
Cyklina D1 <i>Cyclin D1</i>	Marker wznowy w przypadku guzów Ta/T1 / <i>Marker of recurrence in Ta/T1</i>	[351]
Cyklina E <i>Cyclin E</i>	Korelacja z czasem przeżycia / <i>Correlation with survival time</i>	[327]
Protoonkogeny/Onkogeny / <i>Proto-oncogenes/Oncogenes</i>		
MYC	Korelacja z wysokim stopniem złośliwości / <i>Correlation with high grade</i>	[209]
RAS	Marker wznowy / <i>Marker of recurrence</i>	[113]
EGFR	Korelacja z wyższym stopniem zaawansowania i złośliwości, progresją i czasem przeżycia / <i>Correlation with high stage, grade, progression and survival time</i>	[234, 265, 267, 267, 290]
ERBB2	Korelacja ze skróconym czasem przeżycia, wysokim stopniem złośliwości / <i>Correlation with shorter survival time and high grade</i>	[264, 273]
FGFR3	Marker wznowy	[402]

Marker <i>Marker</i>	Wartość prognostyczna <i>Reported prognostic value</i>	Piśmiennictwo <i>References</i>
HGF	Korelacja z wyższym stopniem zaawansowania <i>/ Correlation with higher stage</i>	[131]
Antygeny proliferacji / <i>Proliferation-associated antigens</i>		
Ki-67	Marker wznowy, progresji i czasu przeżycia / <i>Marker of recurrence, progression and survival</i>	[206] [429]
PCNA	Korelacja ze wyższym stopniem złośliwości i zaawansowania / <i>Correlation with higher grade and stage</i>	[49]
MCM	Korelacja ze stopniem złośliwości / <i>Correlation with grade</i>	[378]
Czynniki wzrostu / <i>Growth factors</i>		
FGF czynn timer angio- genny / <i>angioge- nic factor</i>	Korelacja ze stopniem zaawansowania, opor- ność na cisplatynę / <i>Correlation with stage and resistance to cisplatin</i>	[270, 295]
VEGF czynn timer angio- genny / <i>angioge- nic factor</i>	Marker wznowy, krótszego czasu przeżycia / <i>Marker of recurrence and shorter survival time</i>	[370, 382]
EGF	Marker wznowy / <i>Marker of recurrence</i>	[334]
TGF- α	Korelacja ze stopniem zaawansowania i czasem przeżycia / <i>Correlation with stage and survival time</i>	[321, 388]
TGF- β	Korelacja ze stopniem zaawansowania	[59]
Angiogeneza i inhibitory angiogenezy / <i>Angiogenesis and inhibitors of angiogenesis</i>		
Cyklooksygenaza 2 / <i>Cyclooxygenase 2</i>	Krótszy czas przeżycia, korelacja z wyższym stopniem zaawansowania i złośliwości / <i>Shorter survival time, the correlation with higher stage and grade</i>	[353, 412]
Trombospondyna- 1 / <i>Thrombos- podin-1</i>	Marker progresji, wznowy i krótszego czasu przeżycia / <i>Marker of progression, recurrence and shorter survival</i>	[129, 140]
Endostatyna / <i>Endostatin</i>	Korelacja z wyższym stopniem zaawansowania / <i>Correlation with higher stage</i>	[142]
Markery adhezji komórek / <i>Cell adhesion markers</i>		
Kadheryna E <i>E-Cadherin</i>	Związek z wznową, stopniem zaawansowania i złośliwości oraz czasem przeżycia / <i>Correla- tion with recurrence, stage, grade and survival time</i>	[122, 137, 237, 308]
Integryny <i>Integrins</i>	Korelacja z czasem przeżycia / <i>Correlation with survival time</i>	[141, 229]
Proteinazy macierzy pozakomórkowej / <i>Extracellular matrix proteinases</i>		

Marker <i>Marker</i>	Wartość prognostyczna <i>Reported prognostic value</i>	Piśmiennictwo <i>References</i>
uPA	Marker wznowy i progresji / <i>Marker of recurrence and progression</i>	[154, 354]
MMP-2, MMP-9	Korelacja ze stopniem zaawansowania i złośliwości / <i>Correlation with stage and grade</i>	[277]
TIMP-2	Korelacja z czasem przeżycia / <i>Correlation with survival time</i>	[139]
CD44	Korelacja z progresją i czasem przeżycia / <i>Correlation with progression and survival time</i>	[233, 269]
Markery apoptozy / <i>Apoptosis markers</i>		
Surwiwina / <i>survivin</i>	Korelacja ze stopniem zaawansowania, złośliwości i większym ryzykiem wznowy / <i>Correlation with stage, grade and higher risk of recurrence</i>	[352, 436]
BCL2/BAX	Wzrost potencjału przerzutowego komórek, marker progresji / <i>Increased metastatic potential of tumor cells, marker of progression</i>	[271, 313]
FAS	Marker czasu przeżycia / <i>Marker of survival time</i>	[276]
Antygeny towarzyszące nowotworom / <i>Tumor associated antigens</i>		
T138	Korelacja z progresją i ryzykiem wznowy / <i>Correlation with progression and risk of recurrence</i>	[4, 115, 320]
19A 211	Obniżone ryzyko wznowy / <i>Decreased risk of recurrence</i>	[4]
Antygeny grup krwi / <i>Blood group antigens</i>		
ABH	Korelacja ze stopniem zaawansowania i wznową / <i>Correlation with stage and recurrence</i>	[250, 294]

Ostatnio duże nadzieje wiąże się z nowoczesną technologią mikromacierzy DNA, która umożliwia określenie profilu ekspresji genów związanych z fenotypem nowotworowym [76]. Pozwala ona na jednoczesną analizę ekspresji mRNA tysięcy genów w tkance nowotworowej. Interesujących wyników dostarczyły badania Dyrskjot i wsp. [88], którzy wykorzystali mikromacierz DNA do analizy profilu ekspresji całego genomu w celu wytypowania markerów związanych z progresją powierzchownego raka pęcherza moczowego. Badania te wytypowały 45 genów, które mogą być wykorzystane, jako markery progresji. W grupie tej znalazły się geny związane z regulacją cyklu komórkowego i proliferacją, takie jak *CDC20* i *MCM7*, inhibitor apoptozy *BIRC5*, geny zaangażowane w transformację nowotworową *WHSC1*, *GRB1* oraz *PPARD* który reguluje ekspresję *VEGF* w liniach komórkowych raka pęcherza moczowego. Rozszerzeniem tej technologii jest tzw. mikromacierz tkankowa (*tissue microarray* – TMA) oparta na równoczesnej analizie kilkuset tkanek [204]. Analiza profilu molekularnego z wykorzystaniem TMA w badaniach Sanchez-Carbayo i wsp. [337]

umożliwiła nie tylko wyznaczenie potencjalnych markerów diagnostycznych, ale również określenie szlaków związanych z progresją raka pęcherza moczowego. Największa jak dotąd analiza tkanek pochodzących od 1842 pacjentów z rakiem pęcherza moczowego wykazała prognostyczną użyteczność cykliny E [327].

Proteomika będąca intensywnie rozwijającą się dziedziną badań struktury i funkcji białek odgrywa ważną rolę w poszukiwaniu markerów raka pęcherza moczowego. Biorąc pod uwagę ilość białek, jaka może być znaleziona w moczu oraz nieinwazyjny charakter analizy profilu białkowego oczywistym jest, że ten rodzaj analizy może odgrywać istotną rolę w badaniach klinicznych. Najczęściej stosowaną metodą jest dwukierunkowa elektroforeza w żelu poliakrylamidowym (2DE), jako metoda rozdziłu białek i ich analizy ilościowej, po której przeprowadzana jest ekstrakcja z żelu i identyfikacja za pośrednictwem spektrometru masowego [81]. Najnowsza technika stosowana w proteomice, która umożliwia jakościowe i ilościowe oznaczenie białka polega na zastosowaniu mikromacierzy białkowych (*ProteinChip*), w połączeniu z powierzchniowo wzmocnioną laserową desorpcją/ionizacją (*surface-enhanced laser desorption/ionization* – SELDI) i TOF-MS (*time-of-flight-mass-spectrometry*). Czulość i specyficzność tej metody mieści się w zakresie od 50 do 90%. Mikromacierz białkowa została wykorzystana w badaniach Munro i wsp. [283], którzy przeanalizowali 118 próbek moczu od chorych na raka pęcherza moczowego oraz 109 prób kontrolnych. Zastosowana metoda charakteryzowała się około 70% czulością oraz 62,5% specyficznością. Uzyskane wyniki wskazują, że ten rodzaj analizy ma potencjalne zastosowanie w nieinwazyjnej diagnostyce TCC, pod warunkiem, że specyficzność testu zostanie zwiększona.

Kliniczne znaczenie zmian profilu metylacji w raku pęcherza moczowego wzbudza duże emocje i jest przedmiotem wielu badań naukowych. Porównywalna częstości występowania metylacji zarówno w T1/Ta oraz T2–T4 świadczy o tym, że zmiany epigenetyczne pojawiają się już na wczesnych etapach szlaku inwazyjnego. Potwierdza to także obecność metylacji *MLH1*, która związana jest z utratą ekspresji tego genu i defektami w systemie naprawy błędnie sparowanych zasad (MMR) [160]. Obecność metylacji w raku pęcherza moczowego jest związana z wyższym stanem zaawansowania oraz progresją. Analiza wieloczynnikowa wykazała istotną statystycznie korelację pomiędzy metylacją sekwencji 5' genu *RASSF1A* i *DAPK* a wyższym stopniem zaawansowania i złośliwości oraz z progresją ($P < 0,04$) [43]. Korelację pomiędzy metylacją sekwencji 5' genu a zwiększonym ryzykiem progresji i krótszym czasem przeżycia wykazały również badania Yatesa i wsp. [435], w których wykonano analizę sekwencji promotorowych 17 genów. Umożliwiły one wytypowanie 5 loci (*RASSF1A*, *CDH1*, *TNFSR25*, *EDNRB* i *APC*) związanych z progresją nowotworu ($P < 0,05$). Niewątpliwą zaletą tego typu analizy jest możliwość wykorzystania komórek z osadu moczu. Dulaimi i wsp. [86] wykonali analizę metylacji sekwencji promotorowej pięciu supresorów transformacji nowotworowej (*RB1*,

p16INK4A, *p14(ARF)*, *APC*, *RASSF1A*) i uzyskali wyższą czułość w porównaniu do analizy cytologicznej. Wyniki analiz wskazują, że metylacja DNA jest ważnym molekularnym mechanizmem w TCC i może być wykorzystana, jako marker prognostyczny i diagnostyczny.

Pomimo dynamicznie rozwijającej się biologii molekularnej i coraz liczniejszej grupy potencjalnych markerów nowotworowych idealny marker, który mógłby zastąpić cystoskopię i/lub cytologię wciąż czeka na odkrycie.

1.8. Perspektywy zastosowania badań molekularnych w terapii raka pęcherza moczowego

Podstawowym kryterium wyboru metody leczenia raka pęcherza moczowego jest nadal stopień zaawansowania guza (T) i stopień jego złośliwości histologicznej (G). Leczenie guzów Ta/T1 ukierunkowane jest na zapobieganie nawrotom i progresji choroby poprzez zastosowanie resekcji przezcewkowej i dopęcherzowych wlewek mitomycyny C w przypadku Tis stosuje się immunoterapię dopęcherzową z użyciem szczepionki BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*) opartej na szczepie *Mycobacterium bovis*, zaś guzy naciekające T2–T4 leczy się najczęściej metodą cystektomii radykalnej. Korzystny efekt stosowania takich chemioterapeutyków jak tiotepa, doksorubicyna i mitomycyna obserwuje się u 7-14% chorych z rakiem powierzchniowym [158], natomiast u 25-40% chorych brak odpowiedzi na terapię BCG [161, 217]. Niezadawalające wyniki, zwłaszcza chemioterapii, intensyfikują badania nad nowymi metodami leczenia, które mogłyby znacząco wpłynąć na wydłużenie czasu wolnego od wznowy i przeżycia chorych. Rozwój skutecznej terapii musi opierać się na zrozumieniu podłoża molekularnego leżącego u podstaw procesu onkogenezy. Istotnym jest poznanie mechanizmów regulujących neoplastyczny wzrost oraz identyfikacja cech specyficznych dla nowotworu, które umożliwią rozwój selektywnej oraz nietoksycznej w stosunku do komórek prawidłowych terapii nowotworowej. Z tego punktu widzenia telomeraza jest idealnym, potencjalnym obiektem selektywnej terapii, albowiem jej aktywność obserwowana jest u około 90% przypadków w różnych typach nowotworów przy jednoczesnym braku jej aktywności w większości komórek prawidłowych. Obecne strategie zmierzające do zahamowania aktywności telomerazy opierają się na zastosowaniu technologii antysens RNA w celu zahamowania funkcji podjednostki RNA (hTR) enzymu lub białkowej podjednostki (hTERT) o funkcji katalitycznej [210, 386]. Trwają badania nad włączeniem do terapii raka pęcherza moczowego antysensowych oligonukleotydów blokujących ekspresję mediatora angiogenezy, genu *FGFB* [176] i antyapoptotycznego genu *BCL2* [344]. Również terapia genowa z wykorzystaniem wektorów adenowirusowych w celu transdukcji komórki i syntezy białka p53 [272] lub RB [432] przynosi obiecujące wyniki. Monoklonalne przeciwciała skutecznie hamują aktywność VEGF [70], EGFR i ERBB2 [15], zaś inhibitory

COX-2 przyczyniają się do wzrostu poziomu interleukiny 12 wzmacniając tym samym efekt terapii BCG [82].

Najistotniejszą różnicą pomiędzy zmianami genetycznymi i epigenetycznymi jest potencjalna odwracalność zmian epigenetycznych przy zastosowaniu odpowiednich środków farmakologicznych. Na szczególną uwagę zasługują związki będące inhibitorami DNMT, które mogłyby być zastosowane, jako środek prewencyjny [339]. Inhibitory te są najczęściej strukturalnymi analogami deoksycytydyny i po fosforylacji mogą być włączone do cząsteczki DNA lub RNA hamując tym samym aktywność DNMT [189]. Podwyższona aktywność DNMT1 została zaobserwowana w wielu liniach komórek nowotworowych jak i nowotworach pierwotnych. Nadekspresja *DNMT1* wywołuje transformację linii komórkowej NIH-3T3 [428] oraz wzrost metylacji *de novo* wysp CpG w komórce [405], podczas gdy obniżenie poziomu DNMT1 poprzez ekspresję konstruktów zawierającego sekwencję antysens hamuje proces nowotworzenia [246]. Cheng i wsp. [53] badając wpływ inhibitora metylotransferaz DNA – zebularyny na linię komórkową raka pęcherza moczowego, T24, wykazali, że wywołuje on reekspresję wyciszonego na skutek metylacji promotora genu *p16INK4A* oraz znacznie obniża poziom białka DNMT1. Dodatkowo, połączenie środków genetycznych i farmakologicznych redukujących poziom DNMT1 doprowadziło do znacznej redukcji liczby polipów w zastosowanym do badań mysim modelu raka okrężnicy [215]. Tym samym hipermetylacja zaczyna być postrzegana nie tylko, jako ważne narzędzie diagnostyczne oraz prognostyczne, ale również jako obiekt w terapii antynowotworowej. Opracowanie skutecznej terapii opartej na demetylacji DNA nie będzie jednak zadaniem łatwym, albowiem należy uwzględnić fakt, że hipometylacja może być czynnikiem przyspieszającym progresję choroby nowotworowej.

Nową grupę czynników przeciwnowotworowych stanowią inhibitory HDAC, które mogą indukować hamowanie wzrostu, apoptozę i/lub końcowe różnicowanie w przypadku wielu chorób nowotworowych [254]. Jako inhibitory HDAC (HDACi) stosuje się krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe, benzamidy, hydroksamaty i cykliczne tetrapeptydy [438]. Cameron i wsp. [38] zaobserwowali synergistyczną aktywację wyciszonych supresorów transformacji nowotworowej poprzez zastosowanie leczenia łączonego 5-aza-2-deoksycytydyny z HDACi – trichostatyną A (TSA). Zastosowanie inhibitorów HDAC, tj. FK228 (*Depsipeptide*, FR901228) i TSA oraz hipometylującego analogu nukleozydu – 5-Azacytydyny (5-Aza) wykazało, że 5-Aza oraz TSA mogą hamować zależny od czasu i dawki wzrost komórek TCC pęcherza moczowego głównie poprzez hamowanie cyklu komórkowego w fazie G2/M, zaś FK228 indukuje zarówno areszt w fazie G2/M, jak i apoptozę [192]. Ponadto zastosowanie HDACi łączyło się z podwyższonym poziomem białka p21(CIP1/WAF1) mogącego mieć istotne znaczenie w indukcji zależnej od FK228 apoptozy [192].

Szybki rozwój terapii epigenetycznej pozwala przypuszczać, że połączenie klasycznej chemioterapii lub immunoterapii z lekami epigenetycznymi może

stanowią alternatywę dla chorych opornych na inne formy terapii [348]. Niestety, wadą obecnie testowanych terapii epigenetycznych jest niska specyficzność, dlatego dalsze badania zmierzające do poznania dokładnej funkcji wszystkich czynników związanych ze zmianami epigenetycznymi jest niezbędne do opracowania skutecznych, niedających efektów ubocznych terapii przeciwnowotworowych.

Z przedstawionych powyżej danych wynika, że obecny stan wiedzy dotyczący zmian genetycznych i epigenetycznych w raku pęcherza moczowego daje nadzieję na opracowanie multimodalnej terapii, ukierunkowanej na specyficzne szlaki biochemiczne, jakkolwiek wciąż istnieje duża potrzeba identyfikacji nowych markerów o potencjalnym znaczeniu klinicznym.

2. CEL PRACY

Celem badań, których wyniki stanowią podstawę rozprawy habilitacyjnej była analiza zmian genetycznych i epigenetycznych zarówno w tkance nowotworowej pobranej w czasie zabiegu elektroresekcji lub cystektomii, jak i w złuszczonych komórkach nabłonka przejściowego występujących w moczu chorych na raka pęcherza moczowego. Celem poszczególnych etapów badań było:

1. Określenie częstości występowania i rozmieszczenia funkcjonalnych mutacji w genie *TP53* z wykorzystaniem systemu drożdżowego w powierzchniowym oraz inwazyjnym raku pęcherza moczowego w połączeniu z wybranymi czynnikami klinicznymi.
2. Zbadanie częstości występowania autoprzeciwciał anti-p53 w osoczu chorych na raka pęcherza moczowego w relacji z mutacją w genie *TP53* i wybranymi czynnikami klinicznymi.
3. Określenie wartości rokowniczej metylacji regionów 5' genów związanych z naprawą DNA, tj. *MLH1* i *MGMT* oraz proapoptotycznej kinazy DAP.
4. Zbadanie niestabilności genomowej w *loci* genów *MSH2* i *MLH1* w relacji do niestabilności mikrosatelitarnej w raku pęcherza moczowego.

3. MATERIAŁY I METODY

3.1. Materiał tkankowy

Materiał do badań stanowiły nowotwory pęcherza moczowego, pobrane w latach 2001 – 2005 w Katedrze i Klinice Urologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (kierownik: prof. dr hab. Kazimierz Krajka). Badania uzyskały zgodę Niezależnej Komisji Bioetycznej do Spraw Badań Naukowych (NKEBN/722/2000). Analizowanym materiałem była tkanka z guza i tkanka otaczająca guz, wolna od nowotworu, pobrane w czasie zabiegu elektroresekcji lub cystektomii jak również komórki z osadu moczu oraz krew obwodowa pobrane w dniu zabiegu od chorych na raka pęcherza moczowego z nabłonka przejściowego. Ogółem przebadano 61 chorych na raka pęcherza moczowego. Ze względu na dostępność materiału badawczego oraz typ wykonywanych analiz poszczególne etapy badań różnią się liczbą badanych prób (tab. 6). Analizę mutacji w genie *TP53* oraz analizę serologiczną wykonano w grupie 61 chorych. W badanej grupie było 31 nowotworów powierzchniowych (Ta/T1) oraz 30 naciekających (T2–T4). Minimalny czas obserwacji chorych z grupy badanej wynosił 1 miesiąc a maksymalny 75 miesięcy (mediana 44 miesiące). Charakterystyka kliniczna chorych na raka pęcherza moczowego przedstawiona jest w tabeli 6 kolumna A (w tabeli 6 oraz w dalszej części pracy częstości podano z dokładnością do 0,5%).

Analizę metylacji regionów 5' genów związanych z naprawą DNA, tj. *MLH1* i *MGMT* oraz genu proapoptotycznej kinazy DAP wykonano w grupie 47 chorych na raka pęcherza moczowego (Ta/T1 = 20, T2–T4 = 27). Minimalny czas obserwacji chorych z grupy badanej wynosił 1 miesiąc, a maksymalny 75 miesięcy (mediana 44 miesiące) (tab.6 kolumna B).

Analizę niestabilności mikrosatelitarnej wykonano w grupie 38 chorych na raka pęcherza moczowego (Ta/T1 = 12, T2–T4 = 26). Minimalny czas obserwacji chorych z grupy badanej wynosił 1 miesiąc, a maksymalny 75 miesięcy (mediana 41 miesięcy) (tab.6 kolumna C).

Stopień zaawansowania nowotworu ustalano wg systemu TNM opracowanego przez IUCC w 1997 roku [371]. Ocena histopatologiczna była wykonana w Katedrze i Zakładzie Patomorfologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (kierownik: prof. dr hab. Kazimierz Jaśkiewicz) zgodnie z wytycznymi Światowej Organizacji Zdrowia (WHO).

Grupę kontrolną stanowił materiał tkankowy pobrany drogą biopsji stercza oraz komórki z osadu moczu otrzymane od 10 osób bez choroby nowotworowej leczonych z powodu łagodnego rozrostu stercza w Katedrze i Klinice Urologii GUMed, tkanka otaczająca guz, wolna od nowotworu, pochodząca od 10 chorych na raka pęcherza moczowego oraz krew obwodowa pobrana od 10 osób z kamicią układu moczowego.

Pobrany materiał tkankowy był natychmiast zamrażany w ciekłym azocie. Poranny mocz do momentu wirowania przechowywano w 2-8°C, krew pobierano sterylnie na K3 EDTA. Materiał tkankowy, osad uzyskany po odwirowaniu 50 ml porannego moczu oraz osocze przechowywano w stanie zamrożenia w -80°C.

Tabela 6. Wybrane parametry kliniczne chorych na raka pęcherza moczowego, u których przeprowadzono analizę: mutacji w genie *TP53* i autoprzeciwciał anty-p53 (A); metylacji regionu 5' genów *MLH1*, *MGMT* i *DAPK* (B); oraz analizę mikrosatelitarną (C)

Table 6. Selected clinicopathological parameters of bladder cancer patients that were scored for the presence of : the TP53 gene mutation and anti-p53 autoantibodies (A); the methylation of the 5' region of MLH1, MGMT i DAPK (B) and the microsatellite instability (C)

Zmienna <i>Variable</i>	(A) N (%)	(B) N (%)	(C) N (%)
Kobiety <i>Female</i>	14 (23)	8 (17)	8 (21)
Mężczyźni <i>Male</i>	47 (77)	39 (83)	30 (79)
Wiek <i>Age</i>			
<65	34 (56)	21 (45)	15 (39)
≥ 65	27 (44)	26 (55)	23 (61)
Stopień złośliwości <i>Grade</i>			
G1	24 (39)	10 (21)	8 (21)
G2	22 (36)	21 (49)	16 (42)
G3	15 (25)	14 (30)	14 (37)
Stopień zaawansowania <i>Pathological stage</i>			
(pTa/T1)	30 (49)	20 (43)	12 (32)
(pT2–pT4)	31 (59)	27 (57)	26 (68)

3.2. Izolacja RNA i synteza cDNA

Izolację RNA z guza, tkanki bez zmian nowotworowych oraz osadów komórek z moczu wykonano przy użyciu zestawu do izolacji RNA (RNeasy Mini Kit; QIAGEN, USA) i przechowywano w temperaturze -20°C. W przypadku osadów komórek z moczu wystarczającą ilość RNA wyizolowano z 38 osadów moczu pochodzących od chorych na raka pęcherza moczowego. Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzono z wykorzystaniem 1 µg RNA oraz zestawu Omniscript Reverse Transcriptase (QIAGEN, USA) przy użyciu starterów Oligo

d(T)15 (Promega, USA) w końcowej objętości 20 μ l zgodnie z instrukcją producenta.

3.3. Amplifikacja cDNA genu *TP53* metodą PCR

Amplifikacja cDNA genu *TP53* została przeprowadzona z wykorzystaniem dwóch zestawów starterów:

P3 (5'-ATTTGATGCTGTCCCCGGACGATATTGAAC-3')

i P17 (5'-GCCGCCCATGCAGGAAGTGTACACAT-3')

oraz P4 (5'-ACCCTTTTGGACTTCAGGTGGCTGGAGTG-3')

i P16 (5'-GCGATGGTCTGGCCCCTCCTCAGCATCTTA-3')

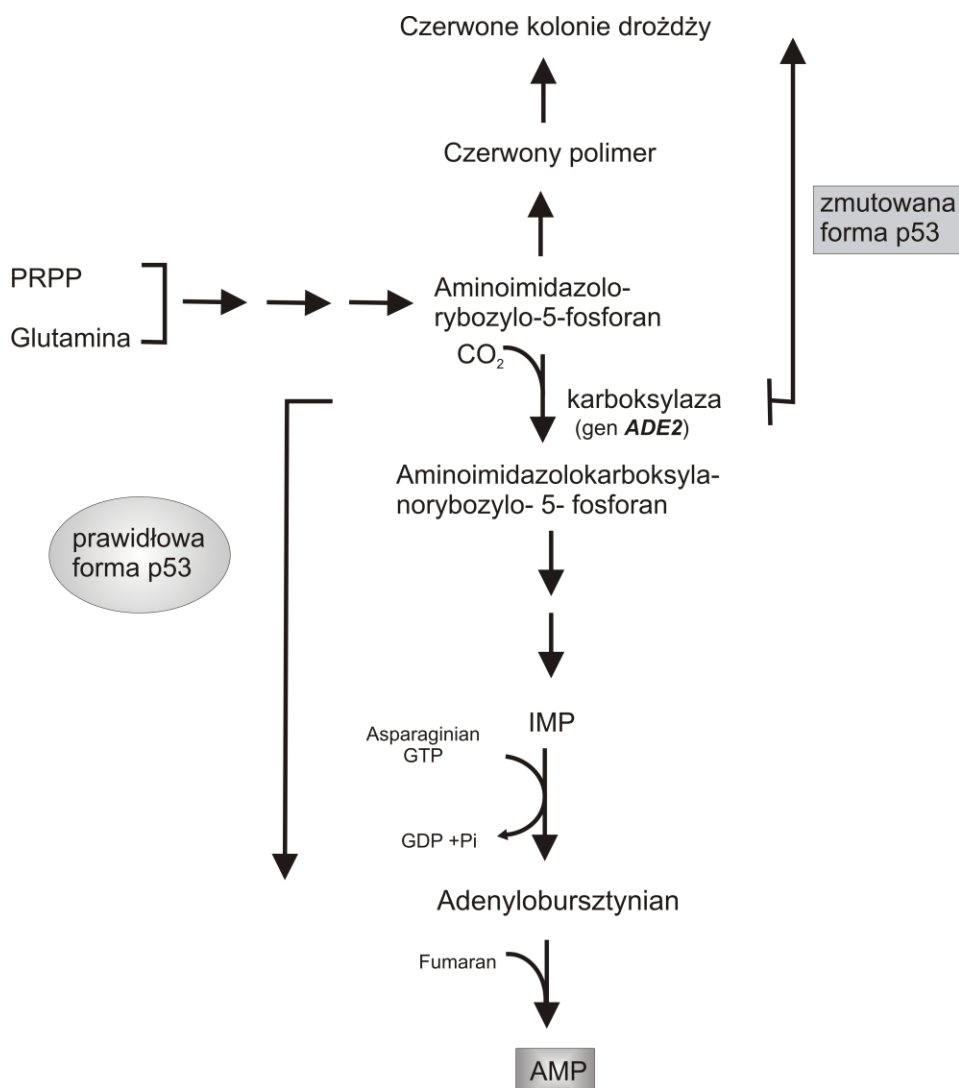
opisanych w pracy Waridela i wsp. [417]. Zestaw P3+P17 powiela fragment 5' genu *TP53* o długości 611 pz, podczas gdy zestaw P4+P16 fragment 3' genu *TP53* o długości 569 pz. Amplifikacja dwóch zachodzących na siebie fragmentów cDNA genu *TP53* pozwala na zmniejszenie wielkości amplikonu i w konsekwencji ułatwioną interpretację uzyskanych wyników. Reakcję PCR przeprowadzano z wykorzystaniem 2 μ l cDNA w objętości 25 μ l w obecności polimerazy ProofStart (QIAGEN, USA). Mieszanina reakcyjna zawierała: 1 X bufor Proof Start, 1 X roztwór Q, 1,5 mmol/l $MgCl_2$, 200 μ mol/l dNTPs, 10 pmol każdego ze starterów. Profil termiczny reakcji obejmował wstępną denaturację przez 5 min w 94°C, 35 cykli amplifikacji (30 s w 94°C, 30 s w 63°C, 1 min. w 72°C) oraz 5 minut wydłużania końcowego w 72°C. Reakcje przeprowadzano w termocyklerze PTC-200 (Bio-Rad, USA). Produkty reakcji PCR były analizowane po rozdzieleniu cDNA w 1,5% żelu agarozowym.

3.4. Homologiczna rekombinacja w systemie drożdżowym

Funkcjonalną analizę genu *TP53* przeprowadzono z wykorzystaniem systemu drożdżowego. Zastosowana w badaniach metoda split-FASAY, będąca jednym z wariantów metody FASAY (*functional analysis of separated alleles in yeast*) [417], umożliwia analizę obecności mutacji w genie *TP53* poprzez syntezę ludzkiego białka p53 w *Saccharomyces cerevisiae* i tym samym aktywację transkrypcji genu reporterowego *ADE2* [111]. Gen *ADE2* koduje karboksylazę AIR (aminoimidazolo-rybozylo-5-fosforanu) biorącą udział w biosyntezie puryn (ryc. 9) [109]. Tylko prawidłowa forma białka p53 może aktywować transkrypcję genu *ADE2*. Obecność w komórce mutantu *TP53* jest równoważna z brakiem enzymu i charakterystyczną czerwoną barwą drożdży. Czerwone zabarwienie jest wynikiem polimeryzacji *in vivo* prekursora puryn (aminoimidazolo-rybozylo-5-fosforanu). Metoda ta pozwala na odróżnienie inaktywujących mutacji w genie *TP53* od mutacji funkcjonalnie nieznaczących. Poprzez połączenie tej metody z techniką naprawy luk (*gap repair*), podczas której p53 RT-PCR

produkt wprowadzany jest do plazmidu ekspresyjnego poprzez homologiczną rekombinację w drożdżach możliwym jest analizowanie dużej ilości prób i detekcja biologicznie istotnych mutacji.

W celu uzyskania zrekombinowanego DNA, zawierającego fragment 5' lub 3' *TP53* cDNA chorego na raka pęcherza moczowego wykorzystano dwa plazmidy ekspresyjne pFW35 i pFW34 (ryc. 10) [417]. Plazmidy te zawierają sekwencję cDNA genu *TP53*, dzięki czemu dochodzi do rekombinacji homologicznej z p53 RT-PCR produktem *in vivo*. Konstrukcja plazmidów umożliwia ekspresję genu *TP53* w *Saccharomyces cerevisiae* i niezależną analizę fragmentów 5' i 3' *TP53* cDNA. Do transformacji użyto szczep drożdżowy yIG397 (MATa *ade2-1 leu2-3,112 trp1-1 his3-11,15 can1-100 ura3-1 URA3 3XRGC::pCYC1::ADE2*), który pozwolił na ocenę transaktywacyjnych funkcji białka p53 [111]. Szczep ten charakteryzuje się zaburzeniem syntezy adeniny na skutek mutacji w genie *ADE2*, ponadto zawiera on drugą kopię genu *ADE2*, znajdującą się pod kontrolą promotora zależnego od p53. Promotor *CYC1* poprzedzony jest trzema powtórzeniami sekwencji RGC (*ribosomal gene cluster*: 5'-GGACTTGCCTGGCCTTGCCT-3'), specyficznie rozpoznawanej przez czynnik transkrypcyjny, jakim jest białko p53 [195]. Drożdże transformowano równocześnie nieoczyszczonym p53 RT-PCR produktem oraz odpowiednią, liniową formą plazmidu ekspresyjnego. Trawienie pFW35 endonukleazami *SmaI* i *BglIII* prowadzi do powstania luki pomiędzy kodonem 66 i 211 w cDNA genu *TP53* zaś trawienie pFW34 tymi samymi endonukleazami generuje lukę pomiędzy kodonem 210 i 348. Transformację przeprowadzono w buforze octanu litu (0,1 M octanu litu, 10mM Tris-HCL, 1mM EDTA Na₂, pH 7,5) zawierającym 40% glikol polietylenowy 3350 zgodnie z metodą opisaną przez Ishioka i wsp. [178]. Podczas rekombinacji w drożdżach zachodziła wymiana DNA pomiędzy sekwencjami homologicznymi p53 RT-PCR produktu i plazmidu wprowadzająca odpowiedni fragment cDNA genu *TP53* do plazmidu ekspresyjnego. Obecność funkcjonalnie istotnej mutacji w genie *TP53* związana jest z syntezą nieaktywnej formy białka p53, co przejawia się brakiem ekspresji genu *ADE2* i zaburzeniem procesów metabolicznych komórki. Selekcji transformantów dokonano na podłożu nie zawierającym leucyny z minimalną ilością adeniny (5 µg/ml). Ocenę zabarwienia drożdży przeprowadzano po trzech dniach hodowli w 30°C. Status genu *TP53* określano zgodnie z metodyką opracowaną przez Ishioka i wsp. [178]. Czerwone kolonie drożdży, wskaźnik obecności mutacji w genie *TP53*, reprezentowały średnio 69% wszystkich kolonii w przypadku analizy guza oraz 50% w przypadku osadów komórek z moczu. Ilość czerwonych kolonii w przypadku tkanki prawidłowej nie przekraczała 10%.



Ryc. 9. Szlak biosyntezy adenozymonofosforanu. Gen *ADE2* koduje karboksylazę aminoimidazolo-rybozylo-5-fosforanu, która katalizuje szóstą reakcję w szlaku biosyntezy nukleotydów purynowych de novo. *Saccharomyces cerevisiae* z mutacją w genie *ADE2* mogą rosnąć na podłożu syntetycznym zawierającym glukozę z dodatkiem adeniny, która pod wpływem fosforybozylotransferazy jest przekształcana do AMP. Mutacja genu *ADE2* powoduje akumulację w wakuolach intermediatu (aminoimidazolo-rybozylo-5-fosforanu), który nadaje komórkom barwę czerwoną. W wykorzystanym w pracy systemie drożdżowym tylko prawidłowa forma białka p53 może aktywować transkrypcję reporterowego genu *ADE2*. Obecność w komórce mutanta p53 jest równoważna z brakiem karboksylazy i charakterystyczną czerwoną barwą drożdży

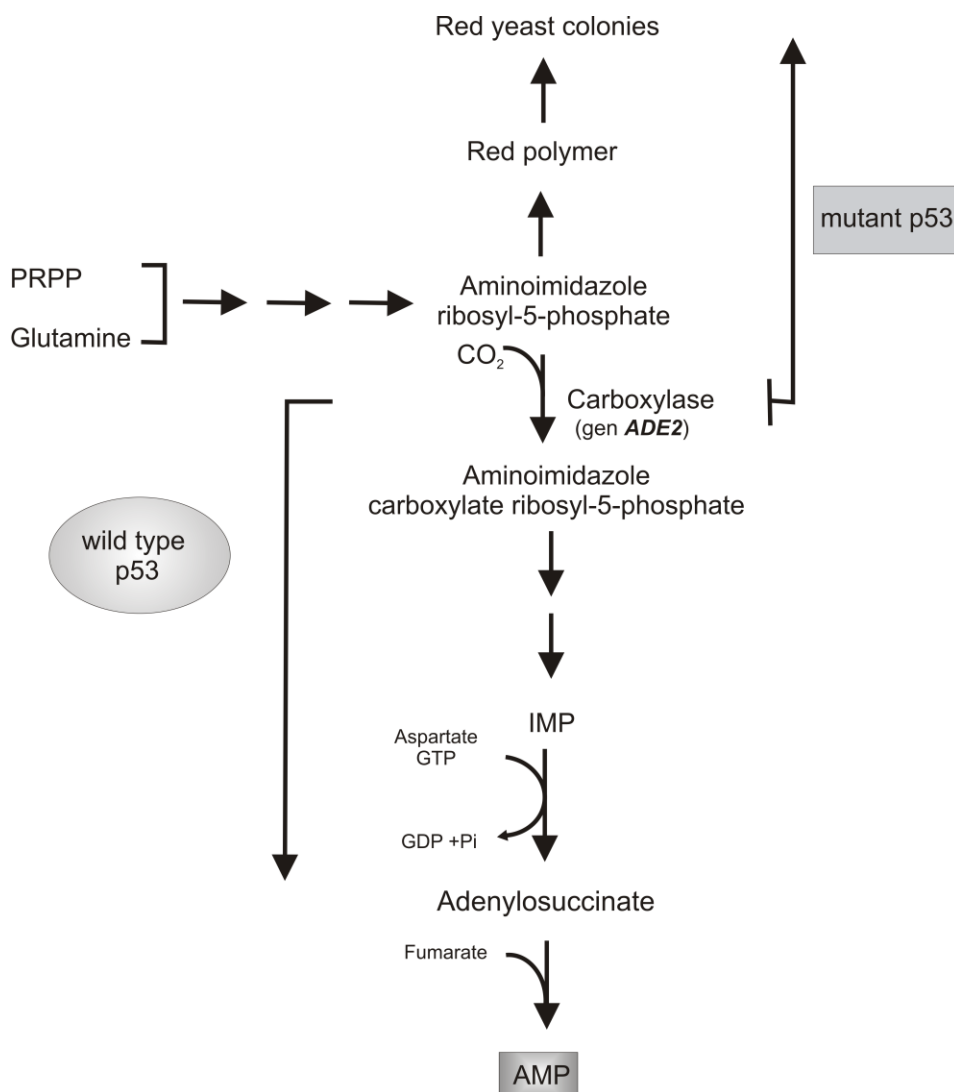
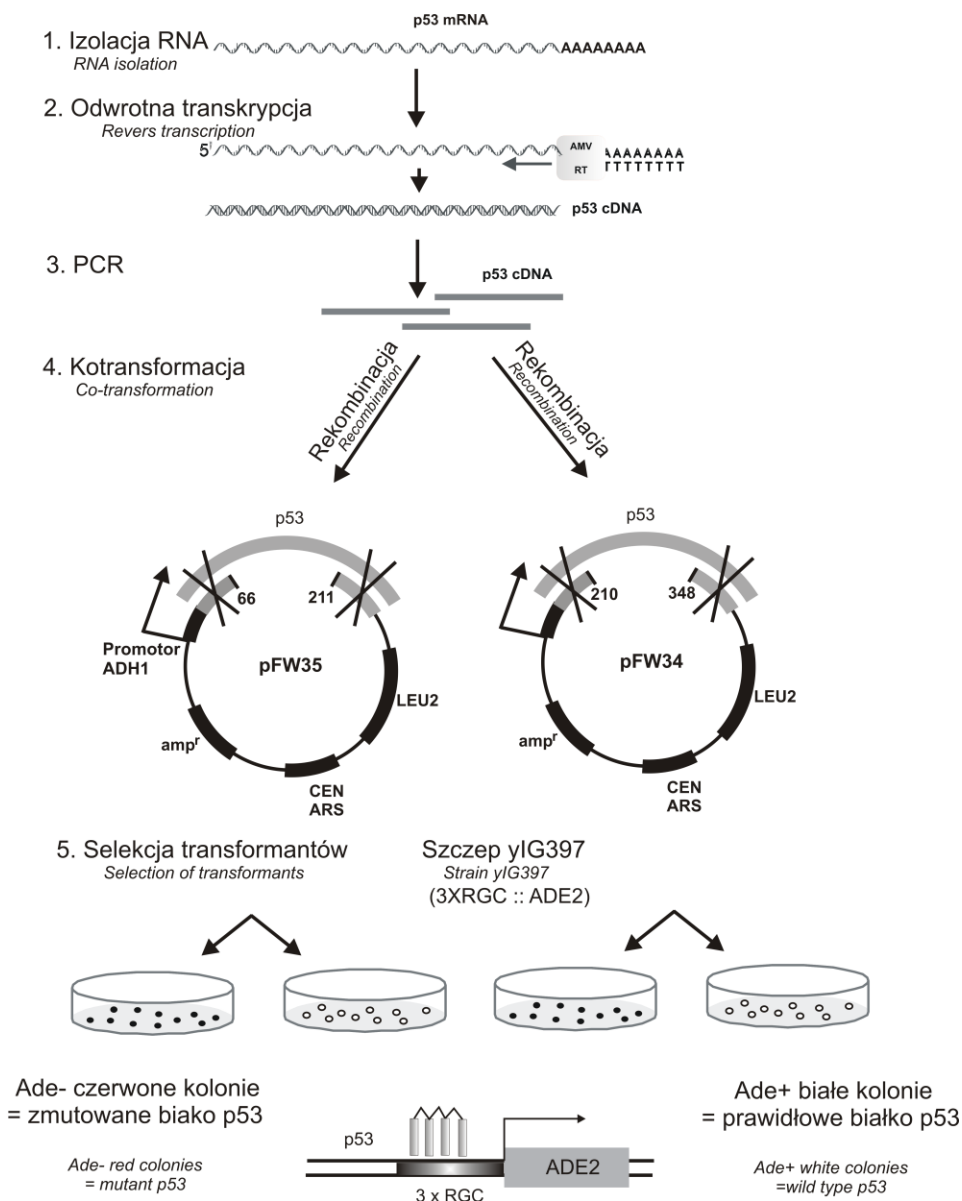


Fig. 9. The pathway of adenosine monophosphate biosynthesis. The *ADE2* gene encodes phosphoribosylaminoimidazole carboxylase, which catalyzes the sixth step in the de novo biosynthesis of purine nucleotides. *Saccharomyces cerevisiae* with mutation in *ADE2* gene are able to grow on a glucose-containing synthetic medium with the addition of adenine, which under the action of the phosphoribosyltransferases are converted into AMP. Mutation in *ADE2* causes an intermediate (5'-phosphoribosyl-5-aminoimidazole) to accumulate in the vacuole; the intermediate gives the cell a red color. In the yeast system that was used in this work only wild-type p53 can activate transcription of reporter *ADE2* gene. The presence of the mutant p53 is equivalent to the absence of the carboxylase and characteristic red colour of the yeast



Ryc. 10. Schemat przedstawiający poszczególne etapy analizy genu TP53 z wykorzystaniem systemu drożdżowego. Drożdżowo-bakteryjne niskokopijne plazmidy pFW35 i pFW34 zawierają sekwencje ARS-CEN oraz marker LEU2 (gen kodujący dehydrogenazę β -izopropylotioalanową). Kodujące sekwencje genu *TP53* pomiędzy kodonami 66 i 211 lub 210 i 348 były amplifikowane w reakcji RT-PCR z wykorzystaniem RNA wyizolowanego z tkanki guza. Zamplifikowany, komplementarny DNA razem z liniową formą plazmidu pFW35 lub pFW34 zawierającego marker selekcyjny LEU2 użyto do

ko-transformacji szczepu drożdżowego yIG397. Komórki yIG397 (*leu⁻* and *ade⁻*) zawierają reporterowy gen *ADE2* pod kontrolą promotora *CYC1* oraz sekwencję RGC rozpoznawaną przez białko p53. Komórki transformowane plazmidem kodującym funkcjonalne białko p53 wykazują ekspresję genu *ADE2* i tworzą białe kolonie na podłożu selekcyjnym. Komórki ze zmutowanym białkiem p53 nie wykazują ekspresji genu *ADE2* i tworzą małe, czerwone kolonie na podłożu selekcyjnym, na skutek akumulacji intermediatu ze szlaku syntezy adeniny

*Fig. 10. Schematic representation of the TP53 gene analysis using functional assay in yeast. Yeast-bacteria, low copy number plasmids pFW35 and pFW34 contain ARS-CEN sequences and LEU2 marker (gene coding for β -isopropylmalate dehydrogenase). Coding sequences of TP53 gene between the codons 66 and 211 or 210 and 348 were amplified by RT-PCR using RNA isolated from a tissue sample as a template. The amplified complementary DNA, the linear pFW35 or pFW34 expression vectors carrying selection marker LEU2 were used for co-transformation of the yeast strain yIG397. The *leu⁻* and *ade⁻* yIG397 cells contain the reporter *ADE2* gene placed upstream of the *CYC1* promoter and RGC p53-binding site. The cells transformed with a plasmid coding for functional p53 protein can express the *ADE2* gene and form white colonies on the selection medium. The selection medium lacks leucine but contains a limiting amount of adenine. The cells with mutant p53 proteins do not express the *ADE2* gene and form small red colonies on the selection medium because of accumulation of red intermediate of the adenine synthesis pathway*

3.5. Sekwencjonowanie cDNA genu *TP53*

W celu dokładnej analizy rodzaju mutacji w genie *TP53* przeprowadzono sekwencjonowanie oparte na metodzie terminacji łańcucha zwanej inaczej metodą dideoxy [338]. Mutacje były identyfikowane na obydwu niciach DNA. Do tego celu izolowano plazmidowy DNA z komórek drożdży zgodnie z metodą opisaną przez Hoffmana i Winstona [166]. Gen *TP53* po rekombinacji homologicznej będący elementem plazmidu był następnie powielany techniką PCR z wykorzystaniem starterów używanych wcześniej do amplifikacji cDNA genu *p53* przed rekombinacją homologiczną. Produkty reakcji PCR były oczyszczane przy pomocy zestawu QiAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) i sekwencjonowane. Reakcje sekwencjonowania przeprowadzano z użyciem starterów identycznych jak do PCR oraz zestawu BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) zgodnie z zaleceniami producenta. Produkty sekwencjonowania rozdzielono metodą elektroforezy na sekwenatorze ABI Prism 310 w Katedrze i Zakładzie Biologii i Genetyki Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (kierownik: prof. dr hab. Janusz Limon). Analizę wyników przeprowadzono przy użyciu programu Sequence Analysis (Applied Biosystems).

3.6. Detekcja autoprzeciwciał anty-p53 z wykorzystaniem testu ELISA

Do analizy obecności autoprzeciwciał skierowanych przeciwko białku p53 występujących w osoczu chorych na raka pęcherza moczowego wykorzystano technikę immunoenzymatyczną, tj. test Anti-P53 ELISA II (*enzyme-linked immunosorbent assay*) (Pharmacell, Paris, France). 96 studzienkowe płytki opłaszczane białkiem p53 inkubowano z rozcieńczonym (1:100) osoczem pochodzącym od chorych na raka pęcherza moczowego. Do przygotowania rozcieńczeń oraz przemywania płytek po inkubacjach z przeciwciałami używano roztworu PBS (6,5 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, 136 mM NaCl, 2,7 mM KCl, pH 7,4). Detekcja autoprzeciwciał anty-p53 była wykonana po uprzedniej inkubacji płytek z przeciwciałami anty-IgG sprzęgniętymi z peroksydazą chrzanową (HRP). Wszystkie inkubacje przeprowadzano w 25°C przez 1 godzinę. W celu prawidłowego zinterpretowania wyników każdorazowo wykonywano test kontrolny, jako odnośnik, w którym studzienki płytek ELISA były opłaszczane białkiem kontrolnym. Wszystkie próby testowano w dwóch powtórzeniach. W celu uzyskania reakcji barwnej dodawano chromogeny substrat tetrametylobenzydynę (TMB, *tetramethylbenzidine*), która jest substratem dla HRP. Wyniki reakcji odczytywano przy długości fali 450 nm z użyciem czytnika do testów ELISA (Bio-Rad, USA). Poziom autoprzeciwciał anty-p53 podawany w U/ml wyznaczany był zgodnie z instrukcją producenta. Zgodnie z założeniami testu osocze, dla którego poziom autoprzeciwciał anty-p53 nie przekroczył 0,85 U/ml było klasyfikowane, jako negatywne, wynik mieszczący się w przedziale 0,85–1,15 U/ml wskazywał na przypuszczalną obecność autoprzeciwciał anty-p53 i wymagał powtórzenia, zaś wszystkie wartości powyżej 1,15 U/ml były uznawane, jako pozytywne.

3.7. Modyfikacja genomowego DNA wodorosiarczynem sodu

Izolację genomowego DNA z leukocytów krwi obwodowej, tkanek guzów, tkanek bez zmian nowotworowych i osadów komórek z moczu przeprowadzono z wykorzystaniem zestawu Genomic DNA Prep Plus, (A&A Biotechnology, Polska) zgodnie z zaleceniami producenta. W celu izolacji DNA z leukocytów do 0,5 ml krwi obwodowej dodawano 1,5 ml buforu TM (5 mM MgCl₂, 20 mM Tris-HCl; pH 7,4) i wirowano przez 10 minut przy 3000 obr./min (700 x g). Osad trzykrotnie przemywano roztworem PBS i izolowano DNA. Osady komórek z moczu otrzymywano poprzez wirowanie 50 ml moczu porannego przez 10 min przy 3000 obr./min (700 x g). Izolację DNA przeprowadzano po trzykrotnym przemyciu osadów roztworem PBS. DNA przechowywano w temperaturze 4°C. Obecność metylacji regionów 5' genów *MLH1*, *MGMT*, oraz *DAPK* określono po uprzedniej chemicznej modyfikacji DNA wodorosiarczynem sodu

zgodnie z procedurą opisaną przez Frommera i wsp. [119]. W wyniku chemicznego traktowania genomowego DNA, niezmetylowane cząsteczki cytozyny ulegają deaminacji do uracylu i konwersji do tyminy w reakcji PCR, natomiast 5-metylocytozyna jest oporna na deaminację pod wpływem wodorosiarczyny sodu i w trakcie amplifikacji ulega konwersji do cytozyny. W reakcji chemicznej modyfikacji wykorzystywano 1 µg genomowego DNA, który denaturowano 0,3 M NaOH przez 15 min. w 37°C. Reakcję modyfikacji przeprowadzano w obecności wodorosiarczyny sodu (3,1 M, pH 5,0) oraz hydrochinonu (0,5 mM) w temperaturze 55°C przez 16 godzin w objętości 600 µl. Następnie DNA oczyszczano z wykorzystaniem zestawu Clean-up (A&A Biotechnology), przeprowadzono desulfonację 0,3 M NaOH przez 15 min. w 37°C, neutralizowano 5M octanem amonu (pH 7), precypitowano etanolem, rozpuszczano w 20 µl buforu TE (10mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) i przechowywano w -20°C przez okres dwóch miesięcy.

3.8. Amplifikacja zmodyfikowanego DNA wg Hermana

Metylację regionów 5' wybranych genów analizowano przy użyciu techniki MSP (*methylation specific PCR*) [159]. W tym celu zmodyfikowane DNA było powielane z wykorzystaniem dwóch zestawów starterów swoistych dla sekwencji metylowanej i niemetylowanej. Zestawy starterów dla genów *MGMT*, *DAPK* oraz *MLH1* zostały opisane w pracy Hermana i wsp. [160] oraz Balana i wsp. [10]. Sekwencje starterów użytych w pracy są następujące:

dla sekwencji metylowanej

MGMT F (sens) 5'-TTTCGACGTTTCGTAGGTTTTTCGC-3',

MGMT R (antysens) 5'-GCACTCT TCCGAAAACGAAACG-3'

dla sekwencji niemetylowanej

MGMT F 5'-TTTGTGTTTTGATGTTTGTAGGTTTTTGT-3',

MGMT R 5'-AACTCCACACTCTTCCAAAAACAAAACA-3'

dla sekwencji metylowanej

DAPK F 5'-GGA TAGTCGGATCGAGTTAACGTC-3',

DAPK R 5'-CCCTCCCAACAGCGCA-3'

dla sekwencji niemetylowanej

DAPK F 5'-GGAGGATAGTTGGATTGAGTTA ATGTT-3',

DAPK R 5'-CAAATCCCTCC CAAACACCAA-3'

dla sekwencji metylowanej

MLH1 F 5'-ACGTAGACGTTTTATTAGGGTTCGC-3',

MLH1 R 5'-CCTCATCGTAACTACCCGCG-3'

dla sekwencji niemetylowanej

MLH1 F 5'-TTTTGATGTAGATGTTTTATTAGGGTTGT-3'

MLH1 R 5'-ACCACCT CATCATAACTACCCACA-3'.

Mieszanina reakcyjna (25 μ l) zawierała: 1 x bufor do PCR (16.6 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 67 mM Tris-HCl (pH 8,8), 10 mM β -merkaptotetanol), 6,7 mM MgCl_2 , 1,25 mM dNTPs, 0,3 μ M każdego ze starterów, polimerazę *Taq* (0,5U) (Sigma-Aldrich, USA) oraz około 50 ng chemicznie modyfikowanego DNA. Profil termiczny reakcji obejmował wstępną denaturację przez 5 min w 94°C, 35 cykli amplifikacji (30 s w 94°C, 30 s w 54-60°C, 1 min w 72°C) oraz 5 min wydłużania końcowego w 72°C. Reakcje przeprowadzano w termocyklerze PTC-200 (Bio-Rad, USA). DNA wyizolowane z leukocytów posłużyło, jako negatywna kontrola dla sekwencji metylowanych, zaś DNA z łożyska, metylowane *in vitro* z wykorzystaniem metylotransferazy SssI (New England BioLabs, USA) i modyfikowane chemicznie, jako kontrola pozytywna. Metylację DNA z łożyska przeprowadzono z wykorzystaniem 1 μ g DNA (Sigma Chemical Co, USA) w obecności SssI (4 U) oraz S-adenozylometioniny (160 μ M), inkubację prowadzono w 37°C przez 2 godziny. DNA oczyszczano z wykorzystaniem zestawu Clean-up (A&A Biotechnology). Produkty reakcji MSP były rozdzielane w 8% żelu poliakryloamidowym, barwione bromkiem etydyny i uwidaczniane w świetle UV.

3.9. Amplifikacja *loci* mikrosatelitarnych metodą PCR

Genomowy DNA posłużył jako matryca do amplifikacji wybranych *loci* mikrosatelitarnych metodą PCR. Produkty PCR analizowano w kierunku niestabilności genomowej (MSI i/lub LOH) *locus* genu *MSH2* (2p22-p21) i *MLH1* (3p21.3). W tym celu użyto mononukleotydowy marker mikrosatelitarny BAT26 (*locus* 2p16) obejmujący 26 nukleotydową sekwencję pA, zlokalizowany w intronie 5 genu *MSH2* (GDB:9834505) oraz dwunukleotydowy D2S123 (2p16-p21) (GDB:187953). Do analizy *locus MLH1* użyto dwunukleotydowy marker D3S1611 (3p24.2-3p22; GDB:200039). Wszystkie sekwencje markerów pochodziły z Genome Database (<http://www.gdb.org>). Amplifikację DNA metodą PCR przeprowadzono osobno dla DNA z krwi, DNA z guza, jak również dla DNA z osadów komórek z moczu, jeśli tylko były dostępne, dla każdego chorego. Reakcję PCR przeprowadzano zgodnie ze standardowymi protokołami z wykorzystaniem polimerazy *Taq* (Sigma-Aldrich). Temperatury cyklicznej denaturacji, hybrydyzacji starterów i wydłużania wynosiły odpowiednio: 94°C przez 5 min, 46°C (BAT26), 55°C (D2S173, D3S1611) przez 30 s, 72°C przez 30 s przy zastosowaniu 35 cykli PCR. Wydłużenie końcowe prowadzono w 72°C przez 5 min. Reakcje przeprowadzano w termocyklerze PTC-200 (Bio-Rad). Produkty reakcji PCR rozdzielano elektroforetycznie w 6% poliakryloamidowych żelach denaturujących, zawierających 8M mocznik. Elektroforezę prowadzono w aparacie do żeli sekwencyjnych (Owl Separation Systems, USA) przy napięciu 1800 V w 0,5 x stężonym buforze TBE (pH 8,0) przez 2 godziny. Produkty reakcji uwidaczniano wybarwiając żele metodą srebrową. Prążki analizowano przy po-

mocy systemu Gel Doc 2000 (Bio-Rad) i oprogramowania Quantity one (Bio-Rad)

Analiza wyników polegała na porównaniu uzyskanych wzorów prążków oraz krzywych dla markerów mikrosatelitarnych między DNA wyizolowanym z tkanki guza a DNA pochodzącym z leukocytów tego samego pacjenta. Jako MSI klasyfikowano przypadki, gdy po rozdzieleniu produktów PCR w denaturującym żelu poliakryloamidowym stwierdzono obecność dodatkowych prążków lub ich przesunięcie względem próby kontrolnej (DNA z leukocytów). Również, analiza fragmentów z wykorzystaniem Systemu Gel DOC (Biorad) oraz programu Quantity One musiała potwierdzić obecność dodatkowych pików alleli lub ich przesunięcie. Jako LOH klasyfikowano przypadki, gdy zaobserwowano zmiany w intensywności prążków lub ich utratę. Wykorzystując pomiar densytometryczny przyjęto, że 50% spadek intensywności prążka jest oznaką LOH. W tym celu wyznaczano współczynnik R będący stosunkiem wysokości pików alleli w próbach kontrolnych do wysokości pików alleli w próbach pochodzących z tkanki guza. Przyjęto, że $R < 0,5$ lub $R > 2$ jest wskaźnikiem LOH.

3.10. Analiza statystyczna

Do oceny zależności pomiędzy badanymi markerami a parametrami klinicznymi, takimi jak płeć, wiek, stopień zaawansowania choroby (Ta/T1; T2–T4) i stopień zróżnicowania (G1–G2, G3) zastosowano dokładny test Fishera.

Całkowity czas przeżycia był obliczany od daty zabiegu do daty zgonu bądź ostatniej obserwacji. Czas wolny od choroby nowotworowej określano jako czas pomiędzy zabiegiem a datą wznowy lub progresją choroby. Ostatnią aktualizację danych przeprowadzono 15 grudnia 2007 roku. Krzywe przeżycia oszacowano metodą Kaplana-Meiera, co umożliwiło wykorzystanie tzw. obserwacji uciętych. Analizowano przeżycia wolne od nawrotu choroby nowotworowej oraz przeżycia całkowite. Do porównania funkcji przeżycia w dwóch grupach zastosowano test log-rank (logarytmiczny rang). Analizę zależność pomiędzy czynnikami o istotnej znamienności statystycznej stwierdzonej w analizie jednoczynnikowej, tj. teście log-rank a czasem przeżycia wykonano przy użyciu modelu proporcjonalnego hazardu Coxa.

Za poziom istotności statystycznej przyjęto $P < 0,05$. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą komputera PC z oprogramowaniem STATISTICA 7.

4. WYNIKI

4.1. Analiza częstości występowania i rozmieszczenia mutacji w genie *TP53* z wykorzystaniem systemu drożdżowego w raku pęcherza moczowego

4.1.1. Analiza częstości występowania i rozmieszczenia mutacji w genie *TP53* w guzie oraz w komórkach z osadu moczu

Obecność funkcjonalnie istotnych mutacji w genie *TP53* wykazano w 16 z 61 (26%) guzów raka pęcherza oraz w 9 z 38 (24%) osadach moczu. Analiza komórek z osadu moczu umożliwiła detekcję mutacji w ośmiu z dziesięciu przypadków z mutacjami p53 wykrytymi w guzie (tab. 9). Częstość występowania mutacji *TP53* w guzach T2-T4 wyniosła 42% (13/31), a w guzach Ta/T1 10% (3/30). W tkance bez zmian nowotworowych nie wykazano mutacji w genie *TP53* (0/10).

W celu dokładnego określenia rodzaju mutacji oraz weryfikacji wyników otrzymanych metodą split-FASAY sekwencjonowano cDNA genu *TP53*. Materiał do sekwencjonowania otrzymano poprzez izolację plazmidowego DNA z kolonii drożdży o zabarwieniu czerwonym wskazującym na obecność mutacji w genie *TP53*. Amplifikacja cDNA genu *TP53* z wykorzystaniem zrekombinowanego plazmidu dostarczyła odpowiednią ilość materiału do sekwencjonowania. We wszystkich przypadkach określonych, jako pozytywne na podstawie analizy split-FASAY, sekwencjonowanie potwierdziło obecność mutacji w genie *TP53* (ryc. 11). Tabela 9 przedstawia typy mutacji zaobserwowane w badanej grupie 61 chorych na raka pęcherza moczowego. Łącznie w 16 guzach zidentyfikowano 22 mutacje genu *p53*. Analiza cDNA wykazała, że 91% (20/22) mutacji *p53* zlokalizowana jest w środkowej części genu (kodony 102-292). 56% (13/22) mutacji znajdowało się w obrębie domen konserwowanych ewolucyjnie, tj. domenie II (kodony 117-142), domenie III (kodony 171-181), domenie IV (kodony 234-258) oraz domenie V (kodony 270-286). Sześć z 22 mutacji (27%) wystąpiło w regionie odgrywającym kluczową rolę w oddziaływaniu białka p53 z DNA, określonym, jako pętla L3 oraz motywie LSH – pętla-kartka-helisa (*loop-sheet- α helix*) (tab.9) Ponadto, zidentyfikowano trzy mutacje (kodony 248, 273, 280) z siedmiu (kodony 120, 241, 248, 273, 276, 280, 283) zaangażowanymi w bezpośrednie oddziaływanie z DNA (ryc. 12). Sześć mutacji (130, 132, 175, 262, 270, 280) dotyczy kodonów w 100% konserwowanych ewolucyjnie u wszystkich gatunków, dla których dokonano analizy sekwencji DNA genu *TP53* [255]. Nie stwierdzono obecności mutacji w regionie odpowiadającym C-terminalnemu fragmentowi białka p53. Większość mutacji to mutacje punktowe typu tranzycji, ponadto wykazano obecność trzech mutacji typu nonsens oraz mutacji będącej wynikiem niewłaściwego składania mRNA (*splicing*).

Tabela 9. Charakterystyka mutacji w genie *TP53* u chorych z rakiem pęcherza moczowegoTable 9. Characteristics of the *TP53* mutations in patients with bladder cancer

Pacjent <i>Case</i>	Ekson <i>Exon</i>	Zamiana AA <i>AA substitution</i>	Zmiana zasady <i>Base change</i>	Mocz <i>Urine sample</i>	Domena ^c <i>Domain</i>	IARC ^d N = 1191 (%)
B26	4	S94Stop	C>A	to samo the same	Poza / out ^e	1 (0,08)
B33	4 5 7 ^a	S96F Y163C R248W	C>T A>G C>T	to samo the same	poza / out S4 L3 w LSH	3 (0,025) 10 (0,84) 23 (1,9)
B18	4	R110L	G>T	to samo the same	S1	6 (0,5)
B55	5	130 del C		to samo the same	L	1 (0,08)
B4	5	K132N	G>C	to samo the same	S2'	12 (1)
B51	5	C135Y	G>A	wt-p53	S2'	6 (0,5)
B35	5	W146Stop	G>A	ND NA	S3	7 (0,59)
B15	5 7 ^b	V157F Intron7/261	G>T 3 bp ins.	ND NA	S4 S9-S10	6 (0,5) 0
B25	5	174 del G –		174 del G R181C	L2 H1	2 (0,17) 0
B12	5	R175H	G>A	ND NA	L2	32 (2,7)
B39	5	E180K	G>A	ND NA	H1	4 (0,34)
B28	6	Y220C	A>G	to samo the same	L	21 (1,8)
B5	8	262 ins	3 bp ins.	to samo the same	L	1 (0,08)
B7	8	F270C	T>G	ND NA	S10 w LSH	1 (0,08)
B34	8	R273H –	G>A	- G279E	S10 w LSH H2 w LSH	(1,4) 3 (0,25)
B9	8	R280K G286Stop	G>A G>T	ND NA	H2 w LSH H2 w LSH	19 (1,6) 2 (0,17)

^a CpG, ^b mutacja w regionie składania, ^c lokalizacja mutacji na podstawie topologicznego schematu białka p53 wg Cho i wsp. [54], H – heliks; L – pętla; S – beta harmonijka;

^d częstość występowania mutacji w genie *TP53* w raku pęcherza moczowego odnotowana w bazie danych IARC (wersja R11, <http://www.iarc.fr/p53/> Oliver at al. [305]), ^e mutacja leżąca poza centralną, wiążącą się z DNA domeną białka p53, ND – niedostępny.

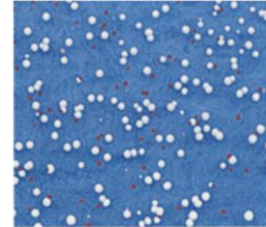
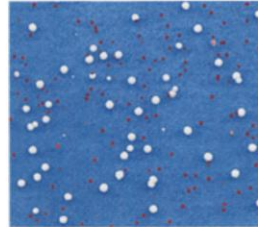
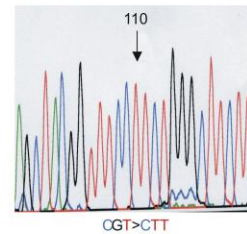
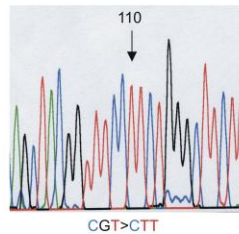
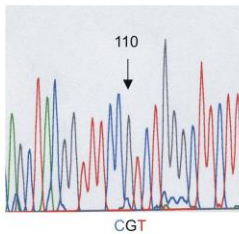
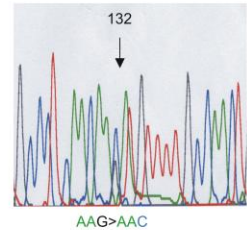
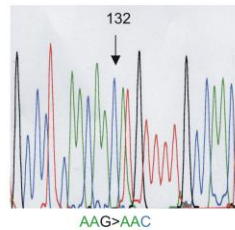
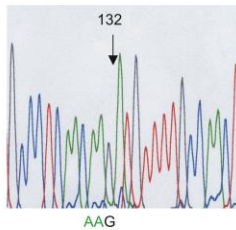
^a CpG, ^b splice, ^c localization of the mutant based on the topological diagram of the p53 protein according to Cho et al. [54], H – helix; L – loop; S – beta sheet, ^d incidence of the TP53 gene mutation in bladder cancer found in IARC database (R11 [http://www.iarc.fr/p53/Oliver at al. \[305\]](http://www.iarc.fr/p53/Oliver%20et%20al.%20%5B305%5D)), ^e mutation that lie outside the core p53 binding domain, NA – not available.

Mutacja typu "splice site" związana była z insercją 3 ostatnich nukleotydów intronu 7 do kodującej sekwencji eksonu 8 i wygenerowaniem kodonu stop. Interesującym jest wystąpienie w trzech przypadkach (B9, B15, B33) mutacji wielokrotnych w genie *TP53*, co jest zjawiskiem rzadkim aczkolwiek obserwowanym. Na uwagę zasługuje fakt, że 59% (13/22) mutacji *TP53* związanych jest z wywieraniem dominującego, negatywnego efektu na niezmutowane białko p53.

W trakcie badań przeanalizowano 12 guzów pod względem polimorfizmu kodonu 72. Obecność kodonu argininy stwierdzono w 75% (9/12) guzów z mutacjami w genie *TP53*. Wynik ten może być potwierdzeniem badań Marina i wsp. [253], z których wynika, że w procesie kancerogenezy dochodzi do preferencyjnej selekcji mutantów R72. Zaobserwowali oni, że zmutowane białko p53 zawierające argininę w pozycji 72 posiada wzmocnioną zdolność do łączenia się z białkiem p73 (homologiem białka p53) prowadząc w ten sposób do inaktywacji p73-zależnej apoptozy.

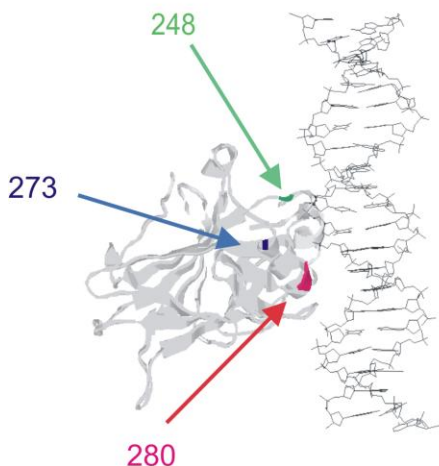
Przeprowadzona analiza osadów komórek z moczu w większości przypadków potwierdziła zmiany obserwowane w guzie. Jakkolwiek w jednym przypadku (B34) mutacja genu *TP53* zaobserwowana w guzie (R273H) różniła się od mutacji zaobserwowanej w osadzie komórek z moczu, pochodzącym od tego samego pacjenta (G279E). Ponadto w przypadku B25 analiza moczu wykazała obecność dodatkowej mutacji (R181C) niestwierdzonej na podstawie analizy guza. Tylko w jednym przypadku obecność mutacji w guzie nie została potwierdzona w osadzie komórek z moczu. Tym samym wyniki pracy wskazują, że system drożdżowy pozwalający na odróżnienie polimorfizmu od funkcjonalnie istotnych mutacji w genie *TP53* może być stosowany nie tylko do analizy mutacji *TP53* w guzie, ale również do analizy komórek z osadu moczu.

Analiza zależności między dostępnymi parametrami klinicznymi a obecnością mutacji w genie *TP53* wykazała istnienie zależności pomiędzy obecnością mutacji w genie *TP53* a wyższym stopniem zaawansowania wg UICC ($P = 0,007$; dwustronny test Fishera) oraz złośliwości wg WHO ($P < 0,001$; dwustronny test Fishera).

ATkanka prawidłowa
*Normal tissue*Guz
*Tumor*Komórki osadu moczu
Urine sediment**B****B18****B4**

Ryc. 11. Analiza mutacji w genie TP53. (A) Analiza funkcjonalna z wykorzystaniem systemu drożdżowego, (B) elektroferogram z sekwencjonowania cDNA pokazujący mutację CGT > CTT w kodonie 110, w guzie B18 i mutację AAG > AAC w kodonie 132, w guzie B4 oraz mutację wykrytą w osadzie komórek z moczu pochodzącym od tego samego chorego, co tkanka guza, tkanka prawidłowa była użyta, jako kontrola

Fig. 11. Mutational analysis of the TP53 gene. (A) yeast functional assay (b) electropherograms of cDNA sequencing showing CGT > CTT mutation at codon 110 in tumor B18 and AAG > AAC mutation at codon 132 in tumor B4, and the same mutation found in matched urine sediment, normal tissue was used as a control



Ryc. 12. Schemat struktury kompleksu pomiędzy centralną domeną ludzkiego białka p53 a DNA. Strzałki wskazują trzy reszty aminokwasowe R248, R273 i R280, które bezpośrednio oddziałują z DNA. Rycina została przygotowana w oparciu o narzędzia dostępne w bazie danych IARC TP53 (<http://www.p53.iarc.fr/StructureAnalysis.html>)

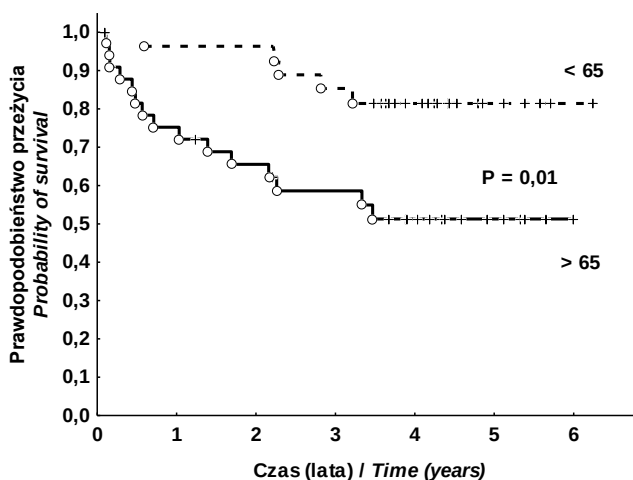
Fig. 12. Schematic model of the complex of human p53 DNA binding domain with DNA. The arrows indicate three amino acid residues R248, R273 and R280 responsible for interaction of the p53 protein with DNA. Picture was created using tools from IARC TP53 Database (<http://www.p53.iarc.fr/StructureAnalysis.html>)

4.1.2. Analiza przeżycia

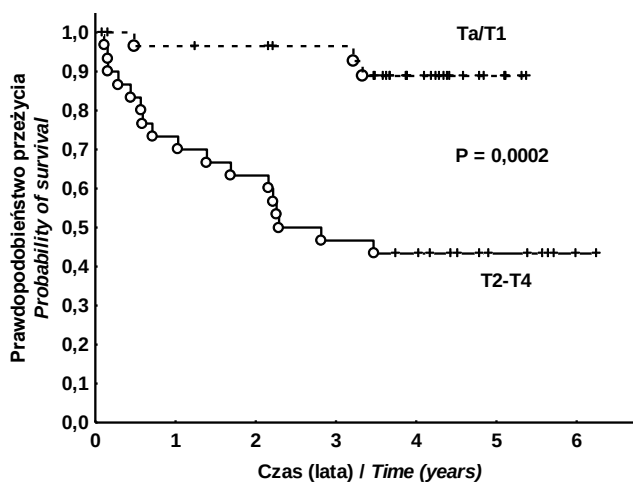
Badając zależności pomiędzy dostępnymi parametrami klinicznymi a przeżyciami 61 chorych na raka pęcherza moczowego w analizie jednoczynnikowej stwierdzono, że istotnymi czynnikami prognostycznymi są wiek po podziale badanych na dwie grupy – pacjentów młodszych (< 65 rż.) i starszych (≥ 65 rż.) ($P = 0,01$, test log-rank), stopień zaawansowania ($P = 0,0002$), stopień złośliwości ($P = 0,005$) oraz obecność mutacji w genie *TP53* ($P = 0,001$) (ryc. 13 i 14). Zgon z powodu raka pęcherza moczowego wystąpił w 45% (14/31) przypadków T2–T4 oraz w 3% (1/30) Ta/T1. W analizie wieloczynnikowej (model proporcjonalnego hazardu Coxa), po uwzględnieniu czynników ryzyka istotnych statystycznie w analizie jednoczynnikowej wiek (OR 5; 95%CI 1,5-15,7; $P = 0,01$), stopień zaawansowania (OR 5,4; 95%CI 1,5-19,4; $P = 0,01$) oraz stan genu *TP53* (OR 3,2; 95%CI 1,5-8,2; $P = 0,01$) okazały się niezależnymi czynnikami rokowniczymi mającymi wpływ na całkowity czas przeżycia.

Nawrót choroby zaobserwowano w przypadku 67% (20/30) guzów powierzchownych zaś wznowę lokalną lub rozsiew w 29% (9/31) guzów T2–T4. Podwyższony stopień złośliwości nowotworu związany był z krótszym czasem przeżycia wolnym od choroby nowotworowej w przypadku guzów Ta/T1 ($P = 0,006$, test log-rank).

A



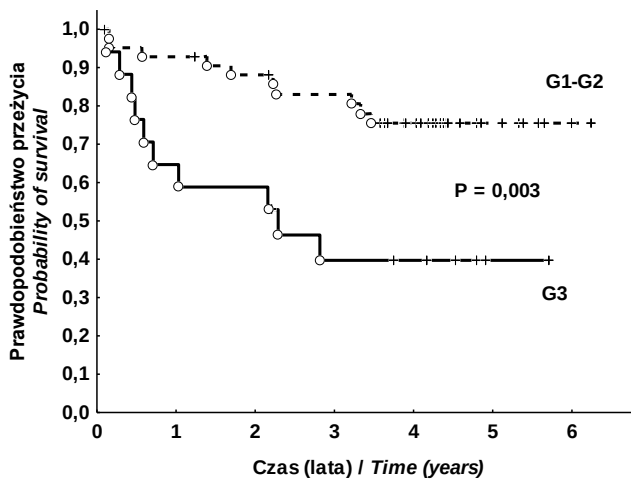
B



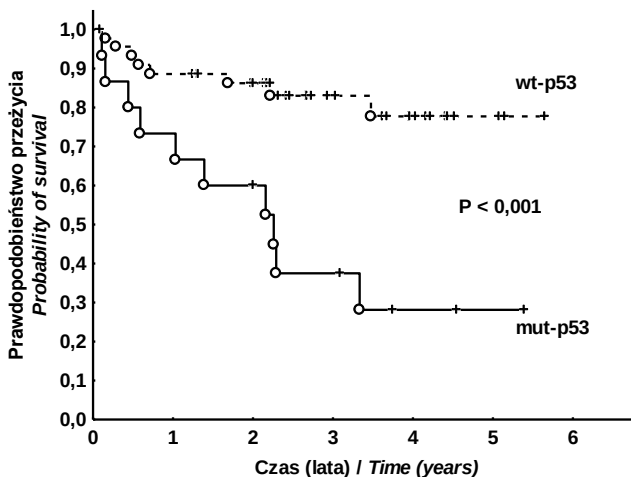
Ryc. 13. Krzywe przeżycia dla: A) grupy poniżej 65 i powyżej 65 roku życia; B) grupy z guzem powierzchownym (Ta/T1) i inwazyjnym (T2–T4). P = test log-rank

Fig. 13. Cancer specific overall survival for bladder cancer stratified by A) age <65 and ≥ 65 ; B) stage Ta/T1 and T2–T4. P = log-rank test

A



B



Ryc. 14. Krzywe przeżycia dla: A) grupy z guzem o stopniu złośliwości histologicznej G1-G2 i G3; B) grupy z mutacją w genie *TP53* (mut-p53) i bez mutacji w genie *TP53* (wt-p53). P = test log-rank

Fig. 14. Cancer specific overall survival for bladder cancer stratified by A) grade G1-G2 and G3; B) mutant *TP53* gene (mut-p53) and wild-type *TP53* gene (wt-p53). P = log-rank test

4.2. Analiza częstości występowania autoprzeciwciał anty-p53 w osoczu chorych na raka pęcherza moczowego w relacji z mutacją w genie *TP53* i wybranymi czynnikami klinicznymi

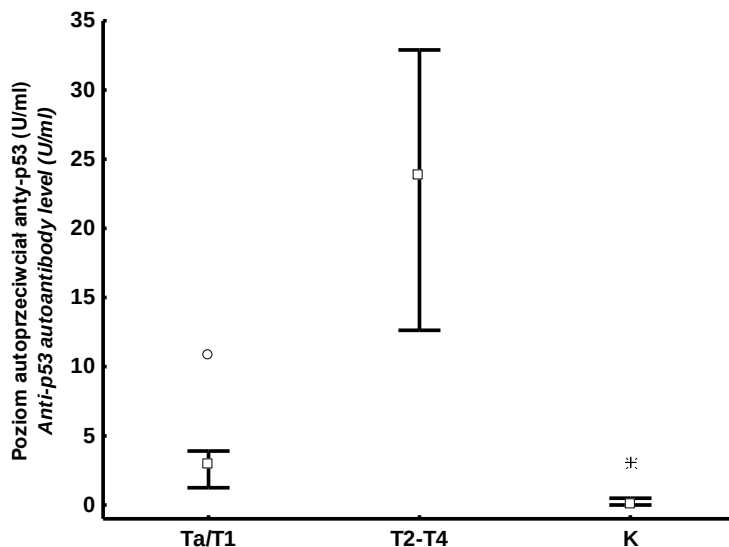
Częstość występowania przeciwciał anty-p53 w osoczu 61 chorych na raka pęcherza moczowego została określona na podstawie immunoenzymatycznego testu ELISA. Obecność autoprzeciwciał anty-p53 stwierdzono ogółem w 18% (11/61) przypadków. Częstość występowania autoprzeciwciał anty-p53 u chorych z guzem Ta/T1 wynosiła 23% (7/31), zaś w guzach T2–T4 13% (4/30) (tab. 7).

Tabela 7. Częstość występowania autoprzeciwciał anty-p53 w osoczu oraz mutacji w genie *TP53* u 61 chorych na raka pęcherza moczowego
Table 7. The frequency of anti-p53 antibodies in plasma and TP53 gene mutations in 61 patients with bladder cancer

Guz <i>Tumor</i>	Autoprzeciwciała anty-p53 <i>Anti-p53 antibodies</i>	Mutacje w genie <i>TP53</i> <i>TP53 mutations</i>
	Osocze Plasma	Guz Tumor
Ta/T1	7/30 (23%)	2/30 (7%)
T2–T4	4/31 (13%)	14/31 (45%)
Ogółem <i>Total</i>	11/61 (18%)	16/61 (26%)

Poziom autoprzeciwciał anty-p53 był znacznie wyższy w przypadku guzów T2–T4 (średnia 23,3 U/ml) w porównaniu z guzami Ta/T1 (średnia 3,7 U/ml) (ryc. 15). Pięć z jedenastu przypadków (45%) z autoprzeciwciałami anty-p53 miało mutacje w genie *TP53*, potwierdzając tym samym, że nie wszystkie mutacje w *TP53* indukują odpowiedź humoralną. Obecność autoprzeciwciał anty-p53 związana była z obecnością w genie *TP53* mutacji punktowych K132N, R110L, Y220C, R273H oraz w jednym przypadku mutacji kompleksowej S96F, Y163C, R248W. Progresja miała miejsce w 57% (4/7) guzów powierzchniowych, natomiast we wszystkich guzach naciekających doszło do wznowy lokalnej lub przerzutów odległych. Specyficzność testu określono na podstawie analizy osocza otrzymanego od 10 chorych z kamcią układu moczowego. Obecność anty-p53 stwierdzono w osoczu jednego chorego i tym samym specyficzność testu określono na 90%. W trakcie badań przeprowadzono również analizę osocza 8 chorych, u których wcześniej nie stwierdzono obecności autoprzeciwciał anty-p53, a którzy trafili do Kliniki Urologii GUMed z powodu nawrotu choroby. U żadnego z nich nie stwierdzono obecności autoprzeciwciał anty-p53. W wyniku prze-

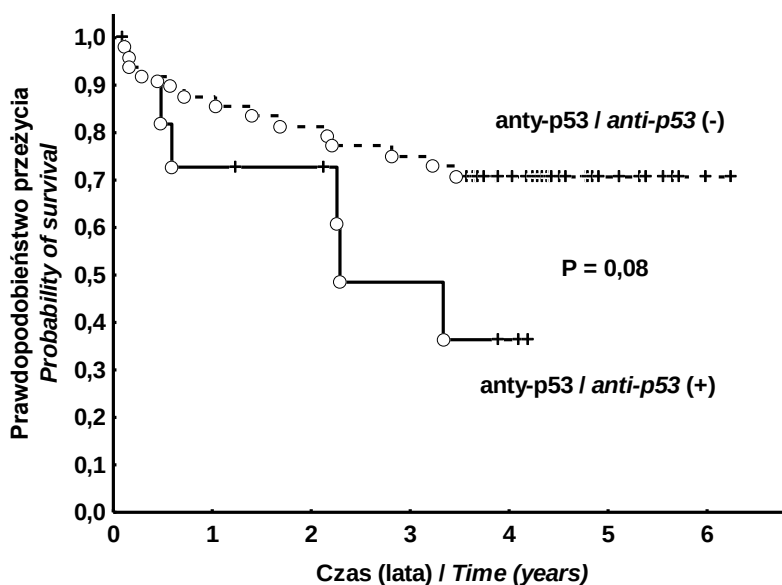
prorowadzonych analiz statystycznych nie wykazano istotnych statystycznie zależności pomiędzy obecnością autoprzeciwciał anti-p53 a stopniem zaawansowania i stopniem złośliwości histologicznej guza. Analiza Kaplan-Meiera nie wykazała istnienia zależności pomiędzy obecnością autoprzeciwciał anti-p53 a całkowitym czasem przeżycia ($P = 0,08$, test log-rank) (ryc. 16).



□ Mediana /Median ; — Zakres nieodstających / Non-outlier values range; ○ Odstające / Outliers; ✱ Ekstremalne / Extreme outliers

Ryc. 15. Autoprzeciwciała anti-p53 w osoczu chorych na raka pęcherza moczowego. Analizę immunoenzymatyczną wykonano przy użyciu testu Anti-P53 ELISAI. Osocze, w którym poziom autoprzeciwciał anti-p53 nie przekroczył 0,85 U/ml było klasyfikowane, jako negatywne, wynik mieszczący się w przedziale 0,85-1,15 U/ml wskazywał na przypuszczalną obecność autoprzeciwciał anti-p53 i wymagał powtórzenia, zaś wartości powyżej 1,15 U/ml były uznawane, jako pozytywne. Ta/T1 – guz powierzchniowy, T2-T4 – guz naciekający, K – grupa kontrolna

Fig. 15. Anti-p53 autoantibodies in the plasma of bladder cancer patients. Immunoenzymatic analysis was performed using Anti-P53 ELISAI. Plasma, where the prevalence of anti-p53 autoantibodies was lower than 0.85 U/ml was considered negative, the result in the range from 0.85 to 1.15 U/ml suggested putative presence of anti-p53 autoantibodies and required repetition, whereas the value over 1.15 U/ml was considered as positive. Ta/T1 – superficial tumor, T2-T4 – invasive tumor, K – control group



Ryc. 16. Krzywe przeżycia Kaplan-Meiera dla chorych na raka pęcherza moczowego, u których wykazano obecność (+) lub brak (-) autoprzeciwciał anty-p53

Fig. 16. Survival curves for bladder cancer patients with the presence (+) or absence (-) of anti-p53 autoantibodies

4.3. Ocena wartości rokowniczej metylacji regionu 5' genów *MLH1*, *MGMT* i *DAPK* u chorych na raka pęcherza moczowego

4.3.1. Analiza metylacji regionu 5' genu *MLH1*, *MGMT* i *DAPK* w guzie oraz komórkach z osadu moczu

Epigenetyczna modyfikacja DNA związana z metylacją reszt cytozyny w promotorowym regionie antyonkogenów jest obecnie uznana za alternatywny mechanizm inaktywacji genów w chorobach nowotworowych. Metylacji ulega cytozyna w dinukleotydowej sekwencji CpG. Celem badań była analiza hiper-metylacji promotorów dwóch genów związanych z naprawą DNA, tj. *MLH1* i metylotransferazy DNA O⁶-metyloguaniny (*MGMT*) oraz proapoptotycznej kinazy DAP w 47 guzach oraz osadach komórek z moczu pochodzących od 38 chorych na raka pęcherza moczowego z nabłonka przejściowego. Analiza DNA guza wykazała metylację regionu 5' genu *MLH1* w 19% (9/47) przypadków, *MGMT* w 34% (16/47) natomiast kinazy DAP w 45% (21/47) (tab. 8, ryc. 17).

Tabela 8. Jednoczynnikowa analiza metylacji *MLH1*, *MGMT* i *DAPK* w 47 rakach z nabłonka przejściowego pęcherza moczowego

Table 8. Univariate analysis of *MLH1*, *MGMT* and *DAPK* methylation in 47 transitional cell carcinoma of the bladder in relation to clinical data and the *TP53* gene status

Zmienna <i>Variable category</i>	Pacjenci <i>Patients no.</i>	<i>MLH1</i> (%)	P	<i>MGMT</i> (%)	P	<i>DAPK</i> (%)	P
	47	M 9 (19)		M 16 (34)		M 21 (45)	
Płeć <i>Sex</i> Kobiety <i>Female</i> Mężczyźni <i>Male</i>	8 39	2 (25) 7 (18)	0,7	4 (50) 12 (31)	1,0	4 (50) 17 (44)	0,23
Wiek <i>Age</i> < 65 ≥ 65	21 26	3 (14) 6 (23)	0,63	7 (33) 9 (35)	0,41	7 (33) 14 (54)	1.0
Stopień zaawansowania <i>Stage</i> Ta/T1 T2–T4	20 27	2 (10) 7 (26)	0,26	2 (10) 14 (52)	0,004	9 (45) 12 (44)	1.0
Stopień złośliwości <i>Grade</i> G1-G2 G3	31 16	3 (10) 6 (38)	0,045	8 (26) 8 (50)	0,11	17 (55) 4 (25)	0,067
(Ta/T1) R + R -	15 5	2 (13) 0 (0)	1,0	1 (7) 1 (20)	0,44	7 (47) 2 (40)	1.0
Stan genu <i>TP53</i> <i>TP53 status</i> <i>wt-p53</i> <i>mutant p53</i>	31 (66) 16 (34)	2 (6) 7 (44)	0,004	6 (19) 10 (63)	0,008	16 (52) 5 (31)	0,22

M, metylacja / *methylation*

R, wznowa / *recurrence*

P, poziom istotności / *significance level*



Ryc. 17. Analiza metylacji regionu 5' genów *MLH1*(*hMLH1*), *MGMT* i *DAPK*. Rycina przedstawia wybrane produkty reakcji PCR DNA zmodyfikowanego wodorosiarczynem sodu, które amplifikowano z wykorzystaniem starterów specyficznych dla metylowanych (M) i niemetylowanych (U) sekwencji DNA. Dodatnia (MET) i ujemna (L) kontrola metylowanej sekwencji to odpowiednio DNA z łożyska metylowany *in vitro* metylo-transferazą *SssI* i DNA z leukocytów. Ponadto pokazano wynik negatywnej kontroli PCR z H_2O (C(-)). W niektórych przypadkach obecność produktów sekwencji niemetylowanej łącznie z produktami sekwencji metylowanej jest wynikiem obecności komórek prawidłowych w analizowanych próbach nowotworowych. Bn – DNA wyizolowany z guza, BUn – DNA wyizolowany z komórek z osadu moczu pochodzących od tego samego chorego co guz

Fig. 17. Methylation analysis of 5' region *MLH1*(*hMLH1*), *MGMT* and *DAPK*. Figure shows selected PCR products of bisulfite-modified DNA that were amplified with methylation-specific primers (M) or unmethylation-specific primers (U). Positive (MET) and negative (L) controls of methylated sequence correspond respectively to the placental DNA, that was methylated *in vitro* by *SssI* methyltransferase, and DNA from leukocytes. In addition H_2O was used as a negative control for PCR (C(-)). In some cases the presence of PCR products of unmethylated sequences together with PCR products of methylated sequences was observed as a result of contamination of tumor samples with normal cells. Bn – DNA isolated from tumor sample, BUn – DNA isolated from matched urine sediment

W guzach Ta/T1 całkowita częstość hipermetylacji wyniosła 60% (12/20), a w guzach T2–T4 74% (20/27). Hipermetylację minimum dwóch regionów 5' zaobserwowano w 23% przypadków. Liczba metylowanych *loci* była zależna od stopnia zaawansowania nowotworu. Metylację więcej niż jednego regionu 5' zaobserwowano w 37% (10/27) przypadków z wysokim stopniem zaawansowania w porównaniu z 5% (1/20) guzów Ta/T1. Nie wykazano metylacji regionów 5' genu *MLH1* oraz *MGMT* w 14 próbach kontrolnych (6 tkanek bez zmian nowotworowych oraz 8 przypadków z łagodnym rozrostem stercza), jakkolwiek metylację

regionu 5' genu *DAPK* odnotowano w 29% (4/14) przypadków. Istotną statystycznie zależność zaobserwowano pomiędzy metylacją regionu 5' genu *MGMT* a stopniem zaawansowania nowotworu ($P = 0,004$, dwustronny test Fishera) oraz pomiędzy metylacją *MLH1* a stopniem złośliwości ($P = 0,045$, tab. 8).

W komórkach z osadu moczu dostępnych dla 38 chorych częstość metylacji regionu 5' genu *MLH1* wyniosła 16% (6/38), *DAPK* 24% (9/38), *MGMT* 26% (10/38) (tab. 9). Regionu 5' co najmniej jednego z trzech badanych genów był metylowany w 15% (2/13) guzów Ta/T1 oraz 60% (15/25) guzów T2–T4. Dwadzieścia pięć z trzydziestu dziewięciu (64%) metylacji zaobserwowanych w tkance guza zostało potwierdzonych w komórkach z osadu moczu (tab. 9). Nie wykazano metylacji w osadzie moczu, która byłaby nieobecna w materiale pochodzącym z guza wskazując tym samym, że analiza moczu nie dostarcza wyników fałszywie dodatnich.

Tabela 9. Profil metylacji genów *MLH1*, *MGMT* i *DAPK* w tkance guza i osadach komórek z moczu u 38 chorych na TCC

Table 9. Methylation patterns of the *MLH1*, *MGMT* and *DAPK* genes in tumor and urine samples from 38 TCC patients

Pacjent <i>Patient</i>	Stadium <i>Stage</i>	Stan metylacji / <i>Methylation status</i>					
		<i>MLH1</i>		<i>MGMT</i>		<i>DAPK</i>	
		Guz <i>Tumor</i>	Mocz <i>Urine</i>	Guz <i>Tumor</i>	Mocz <i>Urine</i>	Guz <i>Tumor</i>	Mocz <i>Urine</i>
B53	Ta	□	□	□	□	■	□
B64	Ta	□	□	□	□	■	□
B31	T1	□	□	□	□	■	□
B34	T1	■	■	□	□	■	■
B37	T1	□	□	□	□	■	□
B45	T1	□	□	□	□	□	□
B49	T1	□	□	□	□	□	□
B51	T1	□	□	□	□	□	□
B52	T1	□	□	□	□	■	■
B59	T1	□	□	□	□	□	□
B60	T1	■	□	□	□	□	□
B62	T1	□	□	□	□	■	□
B63	T1	□	□	□	□	□	□
B16	T2	□	□	□	□	■	□
B19	T2	■	□	□	□	■	□
B20	T2	□	□	□	□	□	□
B27	T2	□	□	□	□	■	■
B28	T2	■	□	■	■	□	□
B36	T2	□	□	□	□	■	■
B56	T2	□	□	□	□	□	□
B58	T2	□	□	■	■	□	□
B66	T2	□	□	■	■	■	□

Pacjent <i>Patient</i>	Stadium <i>Stage</i>	Stan metylacji / <i>Methylation status</i>					
		<i>MLH1</i>		<i>MGMT</i>		<i>DAPK</i>	
		Guz <i>Tumor</i>	Mocz <i>Urine</i>	Guz <i>Tumor</i>	Mocz <i>Urine</i>	Guz <i>Tumor</i>	Mocz <i>Urine</i>
B39	T3	□	□	■	□	■	■
B54	T3	□	□	□	□	□	□
B55	T3	□	□	□	□	□	□
B5	T3a	□	□	■	■	□	□
B8	T3a	□	□	□	□	■	■
B9	T3a	■	■	■	■	■	■
B10	T3b	□	□	■	■	□	□
B12	T3b	■	■	■	■	■	■
B14	T3b	□	□	■	■	■	■
B15	T3b	□	□	□	□	□	□
B18	T3b	■	■	■	■	□	□
B25	T3b	□	□	□	□	□	□
B30	T3b	□	□	□	□	■	□
B33	T3b	■	■	□	□	□	□
B35	T3b	□	□	■	□	□	□
B4	T4	■	■	■	■	□	□

4.3.2. Ocena obecności metylacji regionu 5' genów *MLH1*, *MGMT* i *DAPK* w relacji z mutacją w genie *TP53*

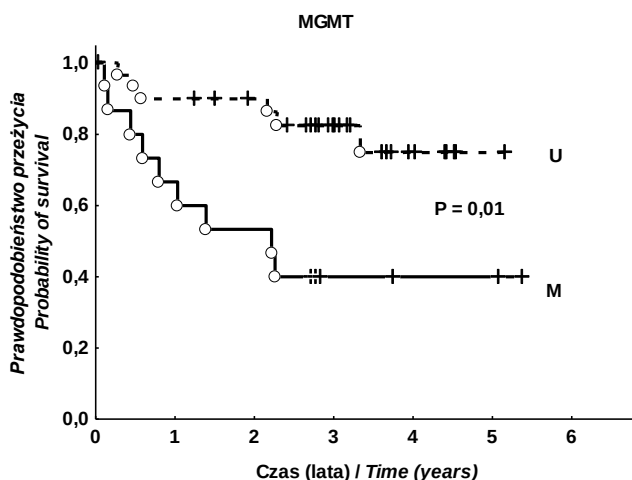
Siedem z szesnastu (44%) guzów z mutacją w genie *TP53* charakteryzowało się obecnością metylacji regionu 5' genu *MLH1* i tylko w dwóch przypadkach z 31 (6%) z niezmutowanym genem *TP53* zaobserwowano metylację regionu 5' *MLH1* (tab. 8). W 63% (10/16) przypadków mutacji w genie *TP53* towarzyszyła metylacja regionu 5' genu *MGMT* i tylko w 31% (5/16) metylacja regionu 5' genu *DAPK* (tab. 8). Metylacja minimum dwóch *loci* była istotnie statystycznie związana z obecnością mutacji w genie *TP53* ($P = 0,003$) wskazując tym samym, że wzrost liczby metylowanych *loci* może być markerem złej prognozy w raku pęcherza moczowego. Na uwagę zasługuje fakt, że w 5 z 6 przypadków z tranzycją G:C do A:T w genie *TP53* zaobserwowano również metylację regionu 5' genu *MGMT* co sugeruje, że epigenetyczna inaktywacja *MGMT* może być związana z tranzycją G do A w *TP53*. Dodatkowo zauważono wzrost ryzyka śmierci w przypadkach charakteryzujących się zarówno obecnością mutacji w genie *TP53*, jak i metylacją regionu 5' genu *MLH1*. W badanej grupie chorych było siedem takich przypadków i wszystkie zakończyły się zgonem odnotowanym przed końcem badań.

4.3.3. Analiza czasu wolnego od wznowy oraz czasu przeżycia

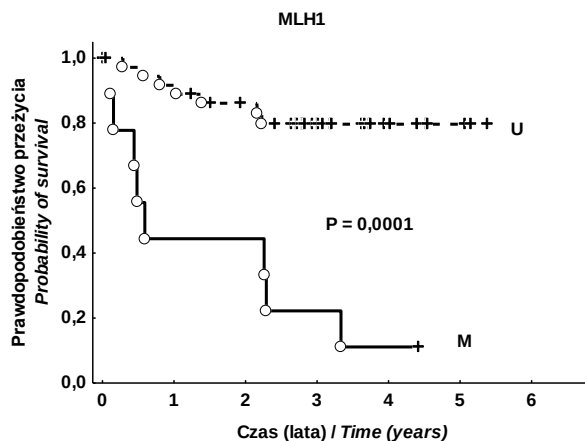
W czasie obserwacji wznowa wystąpiła u 15 (75%) chorych z guzem powierzchniowym natomiast w guzach inwazyjnych wznowę miejscową zaobserwowano u 3 (11%) chorych, a przerzut odległy u 5 (19%). Nie wykazano związku pomiędzy badanymi markerami a czasem wolnym od wznowy w poszczególnych podgrupach stratyfikowanych w zależności od stopnia zaawansowania guza. Metylacja regionu 5' genu *DAPK* typowana, jako marker zwiększonego ryzyka wznowy w guzach Ta/T1 była obserwowana w 7 (47%) przypadkach ze wznową oraz w 2 (40%) bez wznowy. Z tej grupy, 7 (78%) chorych z metylacją *DAPK* miało wznowę choroby w okresie 12 miesięcy (mediana 4 miesiące).

Całkowite przeżycie 5-letnie wyniosło 66%. Badając zależności pomiędzy dostępnymi cechami a czasem przeżycia 47 chorych na raka pęcherza moczowego w analizie jednoczynnikowej stwierdzono, że istotnymi czynnikami prognostycznymi są wiek ($P = 0,01$, test log-rank), stopień zaawansowania ($P < 0,0001$), stopień złośliwości ($P = 0,003$), metylacja regionu 5' genu *MLH1* ($P = 0,0001$) i *MGMT* ($P = 0,01$), zaś nieistotnym metylacja regionu 5 genu *DAPK* ($P = 0,7$) (ryc. 18). Ponadto, analiza przeżycia wykazała istnienie zależności pomiędzy skróconym czasem przeżycia a metylacją minimum dwóch genów ($P < 0,0001$). Badania te wskazują, że obecność hipermetylacji w regionie promotorowym może być wykorzystana, jako marker złej prognozy w raku pęcherza moczowego.

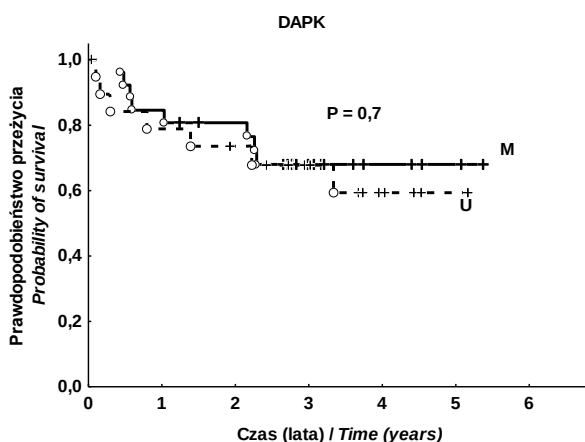
A)



B)



C)



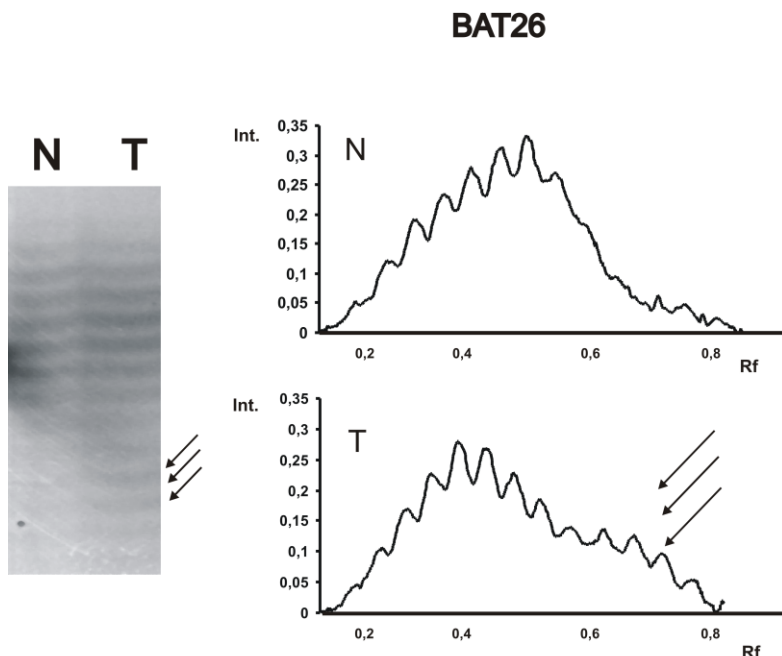
Ryc. 18. Wykres funkcji przeżycia chorych na raka pęcherza moczowego ze względu na metylację regionu 5' genów: A) *MGMT*, B) *MLH1*, C) *DAPK*. M – metylacja; U – brak metylacji

Fig. 18. Survival function for bladder cancer patients stratified by the presence of the methylation of the 5' region of genes: A) *MGMT*, B) *MLH1*, C) *DAPK*. M – methylated; U – unmethylated

Model proporcjonalnego hazardu Coxa pozwolił na identyfikację niezależnych czynników rokowniczych oraz porównanie siły ich działania. Po uwzględnieniu istotnych czynników ryzyka metylacja *MLH1* (OR 12; 95%CI 3,3-42; $P < 0,001$), stopień złośliwości (OR 27; 95%CI 5-150; $P < 0,001$) oraz wiek (OR 10; 95%CI 2-43; $P = 0,002$) okazały się niezależnymi czynnikami rokowniczym, które mają istotny wpływ na całkowity czas przeżycia.

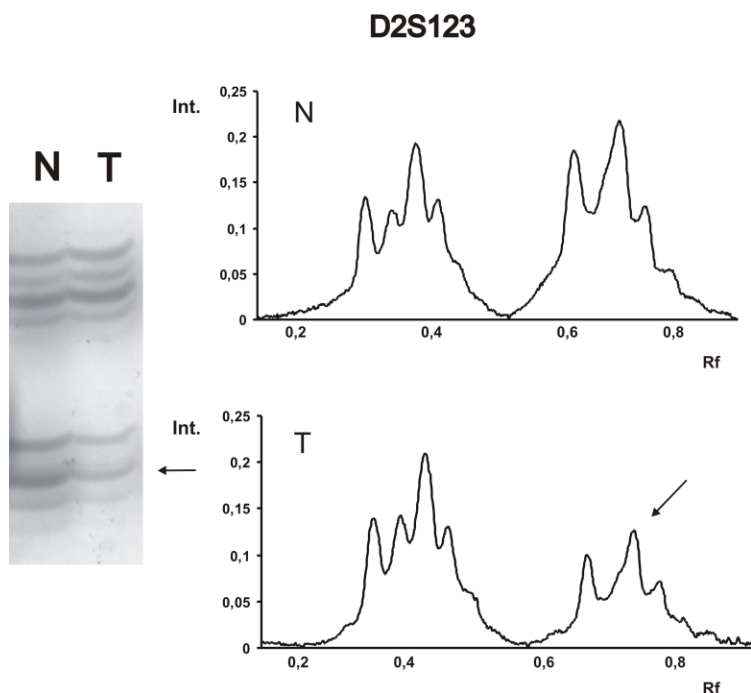
4.4. Analiza niestabilności genomowej w *locus* genu *MSH2* i *MLH1* w relacji do niestabilności mikrosatelitarnej w raku pęcherza moczowego

W celu określenia zależności pomiędzy stanem funkcjonalnym genów *MSH2* i *MLH1* a MSI w raku pęcherza moczowego przeprowadzono analizę mikrosatelitarną genomowego DNA wyizolowanego z 38 guzów pęcherza moczowego oraz 35 osadów komórek z moczu.



Ryc. 19. Detekcja MSI w chromosomie 2 na podstawie analizy DNA chorego na raka pęcherza moczowego. Rycina przedstawia zaburzenie mikrosatelitarne wykazane dla markera BAT26. T – DNA z tkanki guza; N – DNA prawidłowe, izo lowane z leukocytów pochodzących od tego samego chorego; strzałki wskazują dodatkowe prążki świadczące o obecności MSI. Int. – intensywność pikseli; Rf – współczynnik przesunięcia

Fig. 19. Detection of MSI on chromosome 2 in tumor DNA from patient with bladder cancer. Figure shows microsatellite alteration for marker BAT26. T – DNA from tumor tissue; N – Normal DNA isolated from corresponding leukocytes; arrows indicate additional bands demonstrating the presence of MSI. Int. – pixel intensity; Rf – Relative front



Ryc. 20. Detekcja LOH w chromosomie 2 na podstawie analizy DNA pacjenta chorego na raka pęcherza moczowego. Rycina przedstawia zaburzenie mikrosatelitarne wykazane dla markera D2S123. T – DNA z tkanki guza; N – DNA prawidłowe, izolowane z leukocytów pochodzących od tego samego chorego; strzałka wskazuje zredukowaną intensywność sygnału świadczącą o utracie jednego z alleli; Int. – intensywność pikseli; Rf – współczynnik przesunięcia

Fig. 20. Detection of LOH on chromosome 2 in tumor DNA from patient with bladder cancer. Microsatellite alteration was determined using marker D2S123. T – DNA from tumor tissue; N – Normal DNA isolated from corresponding leukocytes; arrow indicate reduced signal intensity from one of the alleles, suggesting loss of an allele in this sample; Int. – pixel intensity; Rf – Relative front

Do analizy niestabilności genomowej w *locus* genu *MSH2* (2p22-p21) i *MLH1* (3p21.3) wykorzystano trzy markery mikrosatelitarne BAT26 (2p16), D2S123 (2p16-p21) oraz D3S1611 (3p24.2-3p22). Zmiany mikrosatelitarne (LOH lub MSI) w regionach genów mutatorowych stwierdzono u 13% chorych (5/38). Niestabilność markera BAT26 lub D3S1611 zaobserwowano tylko w jednym przypadku (ryc. 19), zaś D2S123 był niestabilny w 3 przypadkach (ryc. 20).

Wszystkie zmiany mikrosatelitarne poza jednym przypadkiem zaobserwowano w guzach inwazyjnych (T2–T4). Tym samym niska częstość występowania defektów w systemie MMR tłumaczy sporadycznie obserwowaną obecność MSI, która na podstawie analizy z wykorzystaniem 12 markerów mikrosatelitarnych wynosiła 16% (6/38) w badanej grupie chorych.

Analiza komórek z osadu moczu z wykorzystaniem markerów BAT26, D2S123 oraz D3S1611 potwierdziła obecność tylko jednej zmiany mikrosatelitarnej w *locus* BAT26z pięciu zaobserwowanych w tkance nowotworowej.

5. DYSKUSJA

Pomimo, że gen *TP53* jest jednym z najczęściej analizowanych supresorów transformacji nowotworowej, wciąż niepoznana jest rola poszczególnych mutantów *TP53* w procesie nowotworzenia. Spektra mutacji w genie *TP53* różnią się w zależności od rodzaju nowotworu. Przykładem jest rak przełyku, w przypadku, którego spektrum mutacji w genie *TP53* jest inne dla raków o utkaniu płaskonabłonkowym (przewaga transwersji) i inne dla raków gruczołowych (dominują tranzykcje C do T w miejscach CpG), co sugeruje istotne różnice w etiologii i patogenezie tych nowotworów. Ponadto analiza mutacji w genie *TP53* ma znaczenie kliniczne, albowiem dostarcza informacji odnośnie ewolucji choroby nowotworowej i skuteczności zastosowanej terapii. Niezmiernie ważna jest analiza istotnych funkcjonalnie mutacji w genie *TP53*, gdyż ułatwia ona formowanie hipotez dotyczących zarówno mechanizmów utraty biologicznych aktywności białka p53, jak i czynników genetycznych leżących u podstaw transformacji nowotworowej. Najczęściej stosowaną metodą analizy genu *TP53* w raku pęcherza moczowego jest analiza immunohistochemiczna z wykorzystaniem monoclonalnych przeciwciał anty-p53. Pomimo wykazanych korelacji pomiędzy pozytywnym wynikiem barwienia immunohistochemicznego a obecnością mutacji w genie *TP53*, należy pamiętać, że metoda ta nie wykrywa delecji genu *TP53*, mutacji typu nonsens i przesunięcia ramki odczytu (*frame shift*) a także wykrywa prawidłową formę białka [121].

W przedstawionej rozprawie habilitacyjnej przeprowadzono analizę częstości występowania i rozmieszczenia mutacji w genie *TP53* z wykorzystaniem systemu drożdżowego w powierzchniowym oraz inwazyjnym raku pęcherza moczowego z nabłonka przejściowego. Dodatkowo obecność złuszczonych komórek nowotworowych w moczu umożliwiła ocenę przydatności systemu drożdżowego do nieinwazyjnej detekcji mutacji w genie *TP53* u chorych na raka pęcherza moczowego. Badania, których celem była identyfikacja mutantów *TP53* o transkrypcyjnie wyciszonym fenotypie są jednymi z pierwszych badań tego typu, przeprowadzonych dla raka pęcherza moczowego [346]. Zaletą tej metody jest odróżnienie funkcjonalnych mutacji od mutacji niemających istotnego wpływu na aktywność białka p53 i zmian polimorficznych, co nadaje większego znaczenia analizie korelacji z klasycznymi czynnikami predykcyjnymi.

Metoda split-FASAY wykazała obecność mutacji w 42% guzów naciekających (T2–T4) oraz w 39% osadów komórek z moczu pochodzących od chorych na raka pęcherza moczowego. W odróżnieniu do badań przeprowadzonych przez Curigliano i wsp. [65], gdzie obecność mutacji w genie *TP53* zaobserwowano w 41% guzów T1 stosując elektroforezę w gradiencie czynnika denaturującego, system drożdżowy wykazał obecność mutacji *TP53* tylko w 10% guzów powierzchniowych (Ta/T1). Różnica ta jest najprawdopodobniej wynikiem zastosowania odmiennej metody analizy, która identyfikuje tylko funkcjonalne muta-

cje *TP53*. Na szczególną uwagę zasługuje wykonana w pracy analiza komórek z osadu moczu, która w pojedynczych przypadkach wykazała istnienie dodatkowych mutacji *TP53* niezaobserwowanych w przypadku tkanki nowotworowej. Mutacje te mogą być wynikiem zmian w górnych drogach moczowych lub poliklonalnej ekspansji nowotworu. Pomimo dominującej w raku pęcherza moczowego koncepcji klonalności [362] istnieją badania dostarczające dowodów na istnienie poliklonalności zwłaszcza w początkowych stadiach rozwoju tego nowotworu [309]. W jednym przypadku mutacja *TP53* obecna w guzie powierzchniowym nie została wykazana w komórkach z osadu moczu pochodzących od tego samego chorego. Nieobecność mutacji w tym przypadku może być związana z brakiem komórek nowotworowych w moczu, wysokim stosunkiem komórek prawidłowych do nowotworowych jak również obecnością heterogennych klonów w guzie i osadzie moczu. Wysoka (80%) zgodność pomiędzy analizą mutacji *TP53* w guzie jak i komórkowych osadach moczu, porównywalna z 84% częstością w badaniach Prescott i wsp. [317] i znacznie wyższa w porównaniu z 25% częstością zaobserwowaną przez Dahse i wsp. [67] wskazuje, że analiza komórek z osadu moczu może być równie efektywna jak analiza tkanki nowotworowej. Wymaga ona jednak dalszych badań oraz udoskonalenia metody izolacji RNA z komórek z osadu moczu.

W wyniku przeprowadzonych w czasie realizacji rozprawy habilitacyjnej badań po raz pierwszy odnotowano wystąpienie mutacji (intron 7/kodon 261), związanej z insercją trzech nukleotydów intronu 7 do eksonu 8 i powstaniem kodonu stop, mogącego indukować rozpad mRNA [252]. Mutacje nonsensowne zaobserwowano jeszcze w trzech przypadkach, co sugeruje, że w badanej grupie chorych może mieć miejsce translacyjna represja lub degradacja mRNA. Możliwość detekcji mutacji związanych z represją translacji podkreśla przewagę systemu drożdżowego nad analizą immunologiczną [280]. Zaobserwowane mutacje w genie *TP53* zlokalizowane są w czterech z pięciu wysoce konserwowanych ewolucyjnie regionach genu *TP53* obejmujących między innymi regiony związane bezpośrednio lub pośrednio z oddziaływaniem białka p53 z DNA, to jest regiony L2, L3 oraz LSH. W regionach tych zlokalizowano 8 z 22 mutacji w genie *TP53*, które tak jak w pracy Skaug i wsp. [367], związane są ze zwiększoną agresywnością nowotworu będącą najprawdopodobniej wynikiem dominującego, negatywnego wpływu mutacji na biologiczną funkcję białka p53. W badanej grupie chorych mutacje endogenne były rzadkością, tylko w jednym przypadku w dwunukleotydzie CpG zaobserwowano tranzycję C → T, zlokalizowaną w pozycji 248, sugerującą spontaniczną deaminację 5-metylocytozyny. Przewaga mutacji egzogennych może być wynikiem ekspozycji na takie czynniki kancerogenne, jak składniki dymu papierosowego w tym aminy aromatyczne, które w ponad 50% przypadków odpowiedzialne są za rozwój raka pęcherza moczowego. Szczególnie kancerogeny zawarte w dymie papierosowym zostawiają charakterystyczny ślad w postaci mutacji w genie *TP53* [16]. W badanej grupie chorych w dwóch przypadkach zaobserwowano transwersję G→T w

pozycji 157 i 273 genu *TP53*, która mogła powstać w wyniku działania czynnika kancerogennego zawartego w dymie papierosowym [75].

Stosując metodę split-FASAY wykazano, że umożliwia ona identyfikację kilku mutacji występujących równocześnie w obrębie jednego genu. W badanej grupie chorych mutacje wielokrotne wystąpiły w trzech przypadkach. Były to głównie mutacje punktowe. W dwóch przypadkach B15 i B9 druga mutacja była mutacją nonsensowną wywołującą przedwczesne zakończenie translacji. Obecność mutacji wielokrotnych opisano także w pracy Taylor i wsp. [385], którzy w jednym przypadku zaobserwowali obecność pięciu mutacji *TP53* w czterech kodonach (89, 101, 132 i 214). W tym szczególnym przypadku obecność mutacji wielokrotnej związana była najprawdopodobniej z ciągłą ekspozycją na aminy aromatyczne. Autorzy tej pracy nie obserwują jednak istotnej różnicy w częstości występowania mutacji wielokrotnych pomiędzy osobami narażonymi i nienarażonymi na działanie czynników kancerogennych.

Funkcjonalne białko p53 jest niezbędnym czynnikiem umożliwiającym właściwą odpowiedź komórki na zastosowaną terapię, tj. decyduje w wielu przypadkach o jej skuteczności. Założeniem chemioterapii, jak i radioterapii jest doprowadzenie do śmierci komórki w wyniku indukcji apoptozy jako odpowiedzi na uszkodzenie DNA. Sukces terapii opartych na tym założeniu zależy w dużej mierze od obecności aktywnego białka p53 będącego odbiorcą sygnałów uszkodzenia DNA. Nieaktywne funkcjonalnie mutanty białka p53 związane są między innymi z opornością na cisplatynę, doxorubicynę czy 5-fluorouracyl. Poznanie funkcjonalnych mutacji w genie *TP53* może mieć nie tylko aspekt prognostyczny, ale i predykcyjny. Wciąż aktualne jest pytanie, w jaki sposób można wykorzystać stan genu *TP53* w podejmowaniu decyzji terapeutycznych zarówno w powierzchownym, jak i naciekającym raku pęcherza moczowego? Ponieważ mutacje *TP53* w powierzchownym raku pęcherza moczowego są zjawiskiem stosunkowo rzadkim wydaje się, że w tym typie nowotworu stan genu *TP53* nie ułatwi podjęcia decyzji terapeutycznych. Zgola odmiennie wygląda sprawa nowotworów naciekających, gdzie częstość występowania mutacji *TP53* jest stosunkowo wysoka i wynosi średnio 50%. Guzy naciekające pęcherza moczowego charakteryzują się wysoką częstością progresji po zastosowanej cystektomii, dlatego zastosowanie skutecznej chemioterapii neoadjuwantowej może znacznie zmniejszyć ryzyko progresji i wydłużyć czas przeżycie. Fakt ten podkreśla jak istotnym jest analiza stanu genu *TP53*, a zwłaszcza analiza funkcjonalna. Dodatkowym atutem tego rodzaju analizy jest możliwość wykorzystania do badań komórek z osadu moczu, co zostało wykazane w niniejszej pracy. Ponadto na wynik analizy nie wpływa obecność komórek prawidłowych zawsze obecnych w analizowanym materiale. Analiza sekwencyjna DNA potwierdziła dodatkowo wyniki otrzymane metodą split-FASAY, wykazując tym samym wiarygodność systemu drożdżowego. Otrzymane wyniki pokazują, że metoda split-FASAY jest stosunkowo szybką i niezawodną procedurą pozwalającą na odróżnienie polimorfizmu od funkcjonalnie istotnych mutacji.

W guzach naciekających stopień zaawansowania oraz zaangażowanie węzłów chłonnych są jak dotąd najbardziej zmiennymi statystycznie predyktorami czasu przeżycia [13, 89]. W przypadku guzów naciekających radykalna cystektomia jest terapią standardową, jakkolwiek ostatnio wzrasta zainteresowanie terapią oszczędzającą pęcherz, która uzupełniona chemioterapią i/lub radioterapią może być alternatywą w stosunku do cystektomii [162]. Naciekający guz pęcherza moczowego związany jest ze złym rokowaniem. W przypadku 50% chorych po cystektomii dochodzi do przerzutów lokalnych lub odległych. Połowa chorych umiera w ciągu 3 lat od wykonanej cystektomii. Powszechnie akceptowana jest teoria, która odpowiedzialność za tak dużą śmiertelność łączy z obecnością klinicznie niewykrywalnych mikroprzerzutów, istniejących już w trakcie pierwszej diagnozy. W takich przypadkach potrzebna jest nie tylko skuteczna (bardziej agresywna) terapia, ale również markery, które w sposób niezawodny mogłyby wytypować grupę chorych o krótszym czasie przeżycia. Opinie badaczy, co do rokowniczego znaczenia mutacji w genie *TP53* są podzielone. Dominuje pogląd, że obecność mutacji w genie *TP53* wiąże się z niepomyślnym rokowaniem. W ramach realizowanych badań w grupie 61 chorych na raka pęcherza moczowego, analiza wieloczynnikowa skorygowana pod względem wieku i stopnia zaawansowania wykazała, że obecność mutacji w genie *TP53* jest niezależnym czynnikiem rokowniczym i wiąże się z około trzykrotnym wzrostem prawdopodobieństwa zgonu.

Po raz pierwszy obecność autoprzeciwciał anti-p53 u myszy z chemicznie indukowaną transformacją nowotworową została zaobserwowana w 1979 roku [74]. W 1982 roku Crawford i wsp. [63] odnotowali humoralną odpowiedź immunologiczną skierowaną przeciwko białku p53 u 9% kobiet z rakiem piersi. Późniejsze badania wykazały obecność autoprzeciwciał anti-p53 w surowicy ok. 26% chorych na różne typy nowotworów w tym raka okrężnicy, piersi, wątroby, jajnika, płuca oraz w chłoniakach [41, 48, 69, 212, 347, 359]. Badania korelacji pomiędzy obecnością mutacji, akumulacją białka p53 a obecnością autoprzeciwciał anti-p53 skupiają uwagę wielu badaczy. Wiadomym jest, że obecność mutacji nie wpływa na położenie immunogennych domen białka p53. W pracy Schlichtholz i wsp. [345] wykazano, że immunogenne domeny białka zlokalizowane są na jego N- i C-końcowym odcinku, a więc poza regionem często ulegającym mutacjom, czyli regionem *hot-spot*. Obserwacje te dotyczyły szerokiej grupy chorych głównie z rakiem piersi lub rakiem płuca oraz zwierząt immunizowanych ludzkim, prawidłowym białkiem p53. Ponadto wykazano istnienie korelacji pomiędzy obecnością mutacji w genie *TP53*, a obecnością autoprzeciwciał anti-p53 w surowicy chorych na różne typy nowotworów [372]. Mechanizm autoimmunizacji nie jest poznany. Dominuje hipoteza zakładająca, że indukcja odpowiedzi immunologicznej jest wynikiem przełamania tolerancji na skutek akumulacji immunogennego białka, uwolnionego z komórki w wyniku nekrozy lub białka prezentowanego na powierzchni komórki. Ze względu na wysoką częstość występowania mutacji w genie *TP53* w raku pęcherza moczowego

wego postanowiono sprawdzić częstość występowania autoprzeciwciał anti-p53 w tej grupie chorych.

W niniejszej pracy analizę obecności autoprzeciwciał anti-p53 przeprowadzono u 61 chorych na raka pęcherza moczowego, u których wcześniej wykonano analizę obecności funkcjonalnych mutacji w genie *TP53* z wykorzystaniem systemu drożdżowego. Autoprzeciwciała anti-p53 zaobserwowano w 18% (11/61) przypadków. Częstość występowania autoprzeciwciał anti-p53 była znacznie wyższa w guzach Ta/T1 i wynosiła 23% (7/31) w porównaniu z 13% w przypadku guzów T2–T4. Wyniki te są zgodne z badaniami wykazującymi częstość występowania autoprzeciwciał anti-p53 w raku pęcherza moczowego w granicach od 12 do 33% [143, 279]. W 55% przypadków mutacjom w genie *TP53* nie towarzyszyła obecność autoprzeciwciał anti-p53 w osoczu chorych na raka pęcherza moczowego. Nie jest to zaskoczeniem, albowiem tylko 30 do 50% nowotworów z mutacjami w genie *TP53* indukuje odpowiedź humoralną anti-p53. Pomimo, że mutacje genu *TP53* wpływają na stabilizację i tym samym nadekspresję białka p53, Davidoff i wsp. [69] w swoich badaniach wykazali, że tylko nowotwory, w których stwierdzono obecność kompleksu p53 z białkiem szoku termicznego hsp 70 indukuje odpowiedź immunologiczną. Obserwacja ta może tłumaczyć niską częstość występowania autoprzeciwciał anti-p53 u pacjentów z nadekspresją białka p53. W wynikach pracy na uwagę zwraca stosunkowo wysoka częstość występowania autoprzeciwciał anti-p53 w guzach powierzchniowych, gdzie w sześciu z siedmiu przypadków obecność autoprzeciwciał anti-p53 nie wiązała się z obecnością funkcjonalnych mutacji w *TP53*. Możliwym jest, że zastosowana metoda analizy mutacji pozwoliła na identyfikację tylko funkcjonalnie istotnych mutacji w genie *TP53*, co nie wyklucza obecności mutacji strukturalnych, niemających wpływu na funkcję białka p53, ale indukujących odpowiedź immunologiczną. Obecność autoprzeciwciał anti-p53 bez towarzyszącej jej mutacji w genie *TP53* jest zjawiskiem rzadkim, jakkolwiek spotykanym [422]. W czterech spośród siedmiu przypadków z guzem Ta/T1 i autoprzeciwciałami anti-p53 doszło do progresji. Także we wszystkich guzach naciekających zaobserwowano wznowę lokalną lub obecność przerzutów odległych. Dodatkowo wykazano istotną statystycznie zależność pomiędzy obecnością autoprzeciwciał anti-p53 a skróconym czasem przeżycia. Tym samym badania te potwierdzają wyniki pracy Morita i wsp. [279], którzy analizując grupę 100 chorych wykazali istnienie korelacji pomiędzy obecnością autoprzeciwciał anti-p53 a akumulacją białka p53 oraz skróconym czasem przeżycia. W grupie kontrolnej obecność autoprzeciwciał anti-53 wykryto w jednym przypadku, co obniżyło specyficzność testu do 90%. Obecność autoprzeciwciał anti-p53 w surowicy lub osoczu osób bez choroby nowotworowej jest zjawiskiem niezwykle rzadkim. Przeprowadzone ostatnio badania Muller i wsp. [282] na 436 osobowej grupie kontrolnej wykazały 100% specyficzność testu do detekcji autoprzeciwciał anti-p53. Dodatkowo obecność autoprzeciwciał anti-p53 u osób, u których początkowo nie stwierdzono klinicznych objawów choroby

nowotworowej, a która ujawniła się po kilkunastu miesiącach, wskazała na możliwość wykorzystania analizy serologicznej do wczesnej diagnostyki [245, 391]. W przedstawionej pracy utrata kontaktu z pacjentem o pozytywnym wyniku uniemożliwiła dalszą analizę. Interesującym byłoby także wykonanie powtórnej analizy serologicznej u chorych, u których stwierdzono obecność autoprzeciwciał anty-p53 przed jakąkolwiek terapią. Analiza ta umożliwiłaby ocenę zależności pomiędzy poziomem autoprzeciwciał anty-p53 a skutecznością zastosowanej terapii. Obserwowana w pracy niska częstość występowania autoprzeciwciał anty-p53 w guzach naciekających pęcherza moczowego oraz brak korelacji ze standardowymi parametrami klinicznymi dyskwalifikuje je, jako marker diagnostyczny, aczkolwiek na uwagę zasługuje możliwość zastosowania ich w prognostyce, zwłaszcza w przypadku guzów powierzchownych. Potrzebne są dalsze badania, które wyjaśniłyby dokładnie mechanizm autoimmunizacji i tym samym pozwoliłyby na zrozumienie immunogenego statusu białka p53 w raku pęcherza moczowego.

Mutacje, utrata heterozygotyczności, oraz wyciszenie transkrypcji genów poprzez metylację sekwencji promotora są zaliczane do głównych czynników inaktywujących supresory transformacji nowotworowej. Hipermetylacja promotora i tym samym utrata funkcji genu, często obserwowana w chorobach nowotworowych, dotyczy głównie genów biorących udział a naprawie DNA, regulacji cyklu komórkowego, apoptozie, angiogenezie, różnicowaniu, transformacji i transdukcji sygnału. Celem badań była analiza profilu metylacji DNA w raku pęcherza moczowego. W badaniach zastosowano technikę, która umożliwiła analizę metylacji wybranej sekwencji w oparciu o modyfikację DNA wodorosiarczynem sodu. W badanej grupie chorych, metylacja regionu 5' genu *DAPK* wystąpiła najczęściej, bo aż u 45% chorych, co mieści się w obserwowanych granicach od 4% do 58% [45, 257]. Kinaza DAP jest zależną od wapnia kinazą serynowo-treoninową odgrywającą istotną rolę w regulacji apoptozy [105]. Wyciszenie ekspresji genu *DAPK* na skutek metylacji sekwencji promotora obserwowane jest w wielu rodzajach nowotworów [97]. W przeprowadzonych badaniach wysoka częstość metylacji regionu 5' genu *DAPK* wykazała trend statystyczny w kierunku asocjacji z wyższym stopniem złośliwości ($P = 0,067$) oraz brak istotnej statystycznie zależności pomiędzy metylacją *DAPK* a zwiększonym ryzykiem wystąpienia wznowy. Warto jednak podkreślić, że u 7 (78%) z 9 chorych na powierzchownego rak pęcherza moczowego z metylacją *DAPK* doszło do wznowy, co jest zgodne z obserwacją Tada i wsp.[383], którzy zaobserwowali wznowę u 14 (88%) z 16 chorych z metylacją *DAPK*. Tym samym wykazany w pracy brak istotności statystycznej może być wynikiem zbyt mało licznej grupy z guzem Ta/T1. Specyficzność analizy metylacji genu *DAPK* wyniosła 71% w porównaniu ze 100% specyficznością analizy metylacji genu *MLH1* i *MGMT*. Nie wyklucza to jednak *DAPK*, jako markera prognostycznego, albowiem obecność metylacji regionu 5' genu *DAPK* zaobserwowano w dwóch tkankach pochodzących z prawidłowego histologicznie marginesu guza, co może być w tym

przypadku związane ze zmianami przednowotworowymi. Metylację *DAPK* wykazano również w dwóch z ośmiu prób pochodzących z grupy kontrolnej, tym samym byłoby niezwykle istotnym zbadanie, czy obecność metylacji regionu 5' genu *DAPK* w prawidłowym nabłonku dróg moczowych związana jest z większym ryzykiem zachorowania na raka pęcherza moczowego.

Metylotransferaza DNA O⁶-metyloguaniny (*MGMT*) odpowiedzialna jest za przenoszenie grup metylowych z metyloguaniny na grupę cysteinową w centrum aktywnym enzymu, czego konsekwencją jest inaktywacja, ubikwitynacja i degradacja enzymu. Epigenetyczne wyciszenie ekspresji genu *MGMT* poprzez metylację jego promotora związane jest ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia mutacji indukowanej czynnikami alkilującymi [98]. Aktywność *MGMT* chroni cząsteczkę DNA przed tranzycjami G:C do A:T [285], dlatego też inaktywacja genu *MGMT* związana jest między innymi z mutacjami w genie *K-ras*, jak i *TP53* w raku okrężnicy [100, 101]. Dane dotyczące metylacji regionu 5' genu *MGMT* w raku pęcherza moczowego są dosyć rozbieżne i mieszczą się w granicach od 2 do 53% [169, 257]. W przedstawionej pracy metylację *MGMT* wykazano w 34% przypadków. Ponadto 83% (10/12) metylacji *MGMT* w guzie została również zaobserwowana w komórkach z osadu moczu. Obecność metylacji regionu 5' genu *MGMT* u 5 z 6 chorych z mutacją typu tranzycji w genie *TP53* wskazuje, że epigenetyczna inaktywacja genu *MGMT* może być związana z mutacją G:C > A:T w genie *TP53*. Dominująca obecność metylacji *MGMT* w guzach T2–T4 oraz obecność mutacji w genie *TP53* w 63% przypadków z metylacją *MGMT* wskazuje, że metylacja *MGMT* jest zjawiskiem późnym w rozwoju raka pęcherza moczowego.

W komórce prawidłowej na straży integralności genomu stoi system naprawy nieprawidłowo sparowanych nukleotydów (MMR), który jest odpowiedzialny za utrzymanie prawidłowej sekwencji zasad w DNA poprzez usuwanie z DNA błędów replikacyjnych. Rezultatem inaktywacji genów systemu MMR jest pojawienie się fenotypu mutatorowego i wysoka niestabilność mikrosatelitarna. Metylacja regionu 5' genu *MLH1* jest zjawiskiem częstym w nowotworach sporadycznych charakteryzujących się obecnością MSI [112, 160]. W przypadku raka pęcherza moczowego, pomimo dużych rozbieżności, powszechnie przyjętym jest, że częstość występowania MSI nie jest wysoka [133, 392], co jest zgodne między innymi z obserwowaną w pracy niską (19%) częstością metylacji regionu 5' genu *MLH1*. Jest to wynik znacznie wyższy w porównaniu z 1% w pracy Catto i wsp. [43] i podobny do 13% zaobserwowanych przez Tada i wsp. [383] w guzie powierzchownym.

W niniejszej pracy po raz pierwszy wykazano znamiennej statystycznie zależność pomiędzy metylacją *MLH1* a obecnością mutacji w genie *TP53* ($P = 0,004$) w raku pęcherza moczowego. Zarówno białko *MLH1*, jak i *p53* odpowiedzialne są za utrzymanie integralności genomu w obecności czynników indukujących uszkodzenie DNA. Utrata ich funkcji prowadzi bardzo często do spadku wrażliwości komórki na czynniki chemioterapeutyczne. Lin i wsp. [231]

wykazali, że brak aktywności MMR i p53 w linii komórkowej raka okrężnicy powoduje 4,8-krotny wzrost rozwoju oporności na cisplatynę. Cisplatyna jest jednym z najczęściej stosowanych chemioterapeutyków w leczeniu chorób nowotworowych w tym raka pęcherza moczowego. Efektywność terapii jest wysoka, aczkolwiek w niektórych przypadkach dochodzi do chemiooporności [361]. Mechanizm, który hamuje przekazanie sygnału o uszkodzeniu DNA i indukcję apoptozy związany jest z nadekspresją genu *ERBB2*, aktywacją szlaku PI3-K/AKT, utratą funkcji genu *TP53*, nadekspresją anty-apoptotycznego białka bcl-2 oraz interferencją z aktywacją kaspaz [361]. Cytotoksyczne działanie cisplatyny polega na aktywacji białka p53 regulującego ekspresję genów związanych z zahamowaniem cyklu komórkowego i indukują apoptozy. Również system MMR jest zaangażowany w rozpoznawanie wewnątrzniowych GpG adduktów cisplatyny [83]. Oporność na cisplatynę związana jest między innymi z inaktywacją systemu naprawy DNA, najczęściej w wyniku mutacji w genach *MLH1* i *MSH2* lub hipermetylacji regionów promotorowych tych genów [108, 400]. Dysfunkcja genu *TP53* w takich nowotworach prowadzi do zwiększonej chemiooporności na cisplatynę [164]. Dlatego tak ważnym jest dokładna analiza typu mutacji w genie *TP53*, czego potwierdzeniem są wykonane w pracy analizy, które wykazały obecność co najmniej trzech mutacji genu *TP53* związanych z opornością na cisplatynę R273H, R248W, R175H. Dodatkowo przypadki te charakteryzowały się metylacją regionu 5' genu *MLH1*. Połączenie analizy genu *TP53* z analizą metylacji regionu 5' genu *MLH1* wydaje się być szczególnie interesujące. W siedmiu przypadkach naciekających guzów raka pęcherza moczowego zaobserwowano zarówno mutacje w genie *TP53*, jak i metylację regionu 5' genu *MLH1*. Nowotwory te charakteryzowały się agresywnością oraz 100% śmiertelnością. Ponieważ białka MLH1, jak i p53 odpowiedzialne są za utrzymanie integralności genomu w obecności czynników indukujących uszkodzenie DNA, utrata ich funkcji prowadzi bardzo często do spadku wrażliwości komórki na czynniki chemioterapeutyczne, dlatego stan tych genów może mieć istotne znaczenie w doborze skutecznej terapii. Tym samym zaobserwowana w pracy „śmiertelna koegzystencja” mutacji w genie *TP53* oraz metylacji regionu 5' genu *MLH1* zasługuje na kontynuację i dalsze badania, które umożliwiłyby wytypowanie grupy pacjentów o szczególnie złym rokowaniu, wymagających zastosowania kompleksowych metod terapeutycznych.

Zainteresowanie wykorzystaniem markerów metylacji do analizy płynów ustrojowych takich jak surowica, osocze lub mocz sukcesywnie wzrasta. Chan i wsp. [45] wykazali w komórkach z osadu moczu obecność metylacji genów *DAPK*, *RARβ*, *CDH1* i *CDKN2A* odpowiednio u 46%, 68%, 59% i 14% chorych. Ponadto czułość analizy metylacji (91%) była wyższa, niż czułość badania cytologicznego osadu moczu (46%) [45]. Wysoka czułość oraz istnienie korelacji ze spektrum metylacji w tkankach guza czyni analizę komórek z osadu moczu użytecznym narzędziem w nieinwazyjnej diagnostyce raka pęcherza moczowego [86]. W przedstawionej pracy metylację regionów 5' genów *MGMT*, *DAPK*

i *MLH1* w komórkach z osadu moczu wykazano u 26%, 24% oraz 16% chorych. W guzach T2–T4 metylacje zidentyfikowane w tkankach guza były w 73% potwierdzone w komórkach z osadu moczu tego samego chorego. W przypadku guzów Ta/T1 tylko 33% metylacji w tkankach guza było następnie wykazanych w komórkach z osadu moczu. Jest to prawdopodobnie związane z mniejszą ilością komórek nowotworowych w moczu u chorych z guzem Ta/T1, w porównaniu z guzem T2–T4. Dodatkowo obecność dużej ilości komórek prawidłowych w moczu może wpływać na niską czułość tego typu analizy w guzach Ta/T1. W tym celu należałoby zwiększyć czułość metody głównie poprzez selekcję komórek i izolację wyłącznie nowotworowego DNA. Innym rozwiązaniem jest zastosowanie techniki umożliwiającej ilościową analizę metylacji, takiej jak „Methylight”, która wydaje się być atrakcyjną alternatywą dla analizy komórek z osadu moczu [89].

Analizy epigenetyczne otwierają nowy rozdział w prognosyce chorób nowotworowych. Badania Maruyama i wsp. [256] wykazały, że metylacja promotora genu *CDH1* oraz *FHIT* u chorych na raka pęcherza moczowego związana jest z krótszym czasem przeżycia. Również wyniki przedstawionych w pracy badań wykazały, że metylacja regionu 5' genu *MLH1* jest niezależnym czynnikiem prognostycznym wpływającym na skrócenie czasu przeżycia chorych na raka pęcherza moczowego.

Ze względu na rolę, jaką odgrywa system MMR w procesie nowotworzenia oraz zaobserwowaną w pracy tendencję do współistnienia mutacji w genie *TP53* z metylacją sekwencji 5' genu *MLH1*, która to metylacja wykazuje istotny statystycznie związek z wyższym stopniem złośliwości, na uwagę zasługuje analiza zaburzeń w sekwencjach mikrosatelitarnych w *loci* genów *MLH1* i *MSH2*. Markery BAT26, D2S123 oraz D3S1611 zostały wybrane do oceny defektów w systemie MMR [25]. Badania te prowadzono równolegle do badań nad oceną profilu zmian mikrosatelitarnych (MSI/LOH) z wykorzystaniem 9 markerów mikrosatelitarnych D8S133 (8p21.3-8q11.1), D9S2171 (9p21), D9S273 (9p21-9q21), D9S252 (9q13-9q21), D9S242 (9q32-9q33), D12S81 (12q21), Rb1.20 (13q14.3), TP53 (17p13.1) D18S34 (18q12.2-18q12.3) w tej samej grupie chorych [392]. Uzyskane wyniki (13%) w przeciwieństwie do wyników Christensen i wsp. [55] nie potwierdzają wysokiej (46-100%) częstości występowania zaburzeń w sekwencjach mikrosatelitarnych genów *MLH1* i *MSH2* w raku pęcherza moczowego. Również metylacja sekwencji 5' genu *MLH1* (19%) nie jest zjawiskiem częstym, co także zostało wykazane w niniejszej pracy. Tym samym niska częstość występowania defektów w systemie MMR tłumaczy zaobserwowaną w tej grupie chorych niską (16%) częstość występowania MSI, która jest porównywalna z częstością obserwowaną w przypadku innych raków sporadycznych, w tym w raku okrężnicy (15%) [396]. We wszystkich przypadkach z MSI stwierdzono albo obecność zmiany mikrosatelitarnej w *locus* jednego z badanych genów mutatorowych, albo metylację sekwencji 5' genu *MLH1*. Metylację *MLH1* zaobserwowano w trzech z sześciu przypadków z MSI. Zastanawiającym

jest fakt, że nie wszyscy chorzy z epimutacją (metylacją *MLH1*) lub niestabilnością w genach mutatorowych charakteryzowali się obecnością MSI, co mogłoby sugerować, że inaktywacja genów MMR nie musi zawsze prowadzić do MSI w raku pęcherza moczowego. Zdecydowanie dominuje w tym nowotworze niestabilność chromosomowa, czego dowodem jest obecność LOH zaobserwowana ogólnie u 71% chorych. Częstość LOH w guzach Ta/T1 wynosiła 75%, zaś w guzach T2–T4 69% i charakteryzowała się 100% specyficznością [392]. Zgodnie z powszechnie przyjętą koncepcją zakładającą, że w raku pęcherza moczowego zmiany mikrosatelitarne występują najczęściej w chromosomie 9 [198], badania przeprowadzone w tej samej grupie chorych, która została użyta w rozprawie habilitacyjnej potwierdziły wysoką częstość LOH/MSI w chromosomie 9 sugerując inaktywację takich genów jak *p16INK4A* (9p21), *PTCH* (9q22) i *DBC1* (9q33) [392].

Wykorzystanie markerów mikrosatelitarnych do nieinwazyjnej analizy komórek z osadu moczu stanowi od dawna przedmiot intensywnych badań. Mao i wsp. [251] analizując osady moczu potwierdzili obecność zmian mikrosatelitarnych obserwowanych w materiale pobranym bezpośrednio z guza u 95% chorych. Zgoła odmienne wyniki zostały opublikowane przez Fornari i wsp. [114], którzy potwierdzili obecność LOH tylko w 49% nowotworów T1–T4. Równoległa analiza mikrosatelitarna badanej w niniejszej pracy grupy chorych, wykazała obecność LOH/MSI w komórkach z osadu moczu u 46% chorych [392].

Analiza komórek z osadu moczu z wykorzystaniem markerów BAT26, D2S123 oraz D3S1611 potwierdziła obecność tylko jednej zmiany mikrosatelitarnej z pięciu zaobserwowanych w tkance guza zostało, co nie jest wynikiem satysfakcjonującym. Wynik ten wskazuje, że zmniejszona czułość analizy osadów moczu w porównaniu z analizą tkanki nowotworowej jest najprawdopodobniej związana z obecnością w moczu nie tylko komórek nowotworowych, ale również prawidłowych i zapalnych. Komórki nowotworowe powinny stanowić, co najmniej 10% całkowitej liczby komórek w próbce [300]. Nie bez znaczenia pozostaje także czułość zastosowanej metody. Analiza porównawcza trzech metod powszechnie stosowanych do analizy zmian mikrosatelitarnych wykazała, że metoda oparta na fluorescencji jest bardziej czuła od autoradiografii oraz metody wykorzystującej barwienie żeli srebrem [56]. Tym samym wyniki te wskazują, że analiza mikrosatelitarna DNA izolowanego z komórek z osadu moczu stanowi interesującą alternatywę dla analizy tkanki nowotworowej, jakkolwiek ze względu na niższą czułość oraz rozbieżności spotykane w literaturze wymaga ona dalszych badań i standaryzacji.

Wyniki przedstawione w rozprawie habilitacyjnej dostarczają szeregu informacji odnośnie podłoża genetycznego, jak i epigenetycznego raka pęcherza moczowego. Mają one znaczenie dla nauk podstawowych dostarczając nowych danych dotyczących mutacji w genie *TP53*, albowiem po raz pierwszy odnotowano wystąpienie mutacji (intron 7/kodon 261), związanej z insercją trzech nukleotydów intronu 7 do eksonu 8 i powstaniem kodonu

stop. Nową, oryginalną obserwacją jest wykazanie istotnej statystycznie zależności pomiędzy metylacją regionu 5' genu *MLH1* a obecnością mutacji w genie *TP53* mogącej mieć istotne znaczenie rokownicze w raku pęcherza moczowego. Uzyskane wyniki dowodzą również, że wykorzystanie systemu drożdżowego może odgrywać istotną rolę w określaniu funkcjonalnego stanu białka p53 zarówno w tkankach nowotworowych, jak i w komórkach z osadu moczu. Wykazują niską częstość występowania autoprzeciwciał anty-p53 u chorych na raka pęcherza moczowego oraz brak niestabilności mikrosatelitarnej w *loci* genów *MLH1* i *MSH2*. Podkreślają wagę zmian epigenetycznych i wykazują, że metylacja regionu 5' genów związanych z naprawą DNA zwłaszcza genu *MLH1* jest niezależnym czynnikiem prognostycznym.

6. WNIOSKI

Na podstawie przeprowadzonych badań i po analizie statystycznej uzyskanych wyników można wysnuć następujące wnioski:

1. Badanie obecności mutacji w genie *TP53* metodą split-FASAY umożliwia: a) analizę materiału pobranego bezpośrednio z guza; b) analizę komórek z osadu moczu w przypadku chorych na raka pęcherza moczowego. Obecność funkcjonalnych mutacji w genie *TP53* jest związana z wyższym stopniem zaawansowania i złośliwości oraz jest niezależnym czynnikiem prognostycznym w odniesieniu do czasu przeżycia w analizie wieloczynnikowej.
2. W około 45% przypadków obecność autoprzeciwciał anti-p53 jest związana z obecnością funkcjonalnej mutacji w genie *TP53*. Brak zależności pomiędzy obecnością autoprzeciwciał anti-p53 a stopniem zaawansowania i stopniem złośliwości nowotworu uniemożliwia wykorzystanie autoprzeciwciał anti-p53, jako czynnika rokowniczego w raku pęcherza moczowego.
3. Metylacja regionu 5' genu *MGMT* wykazuje związek z krótszym czasem przeżycia w analizie jednoczynnikowej, zaś metylacja regionu 5' genu *MLH1* jest istotnym, niezależnym czynnikiem prognostycznym. Obecność mutacji w genie *TP53* w połączeniu z metylacją regionu 5' genu *MLH1* wskazuje na wysokie ryzyko zgonu. Metylacja regionu 5' genu *DAPK* nie wykazuje związku z całkowitym czasem przeżycia oraz ryzykiem wystąpienia wznowy w raku pęcherza moczowego.
4. Zaburzenia w sekwencjach mikrosatelitarnych w *loci* genów *MLH1* i *MSH2* są zjawiskiem rzadkim w raku pęcherza moczowego. Brak zaburzeń mikrosatelitarnych w genach poreplikacyjnego systemu naprawy błędnie sparowanych zasad oraz niska częstość metylacji regionu 5' genu *MLH1* tłumaczy niską częstość występowania MSI w raku pęcherza moczowego.
5. Czulość analizy metylacji i analizy mikrosatelitarnej komórek z osadu moczu jest mniejsza niż czulość analizy materiału pochodzącego z tkanki nowotworowej.

7. STRESZCZENIE

Rak pęcherza moczowego jest jednym z najczęściej spotykanych nowotworów układu moczowego. Obecnie trwają intensywne badania zmierzające do poznania genetycznych oraz epigenetycznych mechanizmów rozwoju tego nowotworu.

Celem rozprawy habilitacyjnej było: a) zbadanie częstości i rozmieszczenia mutacji funkcjonalnych w genie *TP53* z wykorzystaniem systemu drożdżowego (metoda split-FASAY) w powierzchniowym oraz inwazyjnym raku pęcherza moczowego z nabłonka przejściowego w połączeniu z wybranymi czynnikami klinicznymi; b) zbadanie częstości występowania autoprzeciwciał anti-p53 w osoczu chorych na raka pęcherza moczowego w relacji z mutacją w genie *TP53* i wybranymi czynnikami klinicznymi; c) określenie wartości rokowniczej metylacji regionów 5' genów związanych z naprawą DNA (*MLH1* i *MGMT*) oraz apoptozą (*DAPK*); d) zbadanie niestabilności genomowej w loci genów *MLH1* i *MSH2* w relacji do niestabilności mikrosatelitarnej w raku pęcherza moczowego; e) porównanie czułości stosowanych metod oznaczania zmian genetycznych i epigenetycznych w materiale tkankowym pobranym z guza z czułością analizy komórek z osadu moczu.

Badania przeprowadzono na grupie 61 chorych z rakiem pęcherza moczowego. Materiał do badań stanowiła: a) "tkanka nowotworowa" pobrana z guza; b) krew obwodowa; c) komórki z osadu moczu. Jako grupę kontrolną wykorzystano tkankę bez zmian nowotworowych otaczającą guz od 10 chorych na raka pęcherza moczowego, tkankę oraz komórki z osadu moczu otrzymane od 10 osób leczonych z powodu łagodnego rozrostu stercza oraz krew obwodowa pobrana od 10 osób z kamicą układu moczowego.

Zastosowany w rozprawie habilitacyjnej system drożdżowy umożliwił ocenę częstości występowania mutacji w genie *TP53* oraz odróżnienie polimorfizmu od istotnych funkcjonalnie mutacji. Obecność mutacji *TP53* stwierdzono w 42% guzów naciekających (T2–T4). Tylko 10% guzów Ta/T1 charakteryzowało się obecnością mutacji *TP53*. Analiza komórek z osadu moczu chorych na raka pęcherza moczowego wykazała obecność mutacji *TP53* w 80% przypadków z mutacjami *TP53* w tkance nowotworowej. W wyniku przeprowadzonych badań po raz pierwszy stwierdzono obecność mutacji (intron 7/kodon 261), związanej z insercją trzech nukleotydów intronu 7 do eksonu 8 i powstaniem kodonu stop. Mutacje nonsensowne stwierdzono jeszcze w trzech przypadkach. Osiem z dwudziestu dwóch mutacji w genie *TP53* wykazało związek ze zwiększoną złośliwością nowotworu. Stosując metodę split-FASAY wykazano, że umożliwia ona identyfikację kilku mutacji występujących równocześnie w obrębie jednego genu. W badanej grupie chorych mutacje wielokrotne wystąpiły w trzech przypadkach i były to głównie mutacje punktowe. Przeprowadzone analizy statystyczne potwierdziły istnienie zależności pomiędzy obecnością mutacji w genie *TP53* a wyższym stopniem zaawansowania i złośliwości oraz krótszym czasem

przeżycia. Funkcjonalne białko p53 jest niezbędnym czynnikiem umożliwiającym właściwą odpowiedź komórki na zastosowaną terapię i tym samym decyduje w wielu przypadkach o jej skuteczności. Nieaktywne mutanty *TP53* związane są między innymi z opornością na cisplatynę, doxorubicynę czy 5-fluorouracyl, tym samym poznanie funkcjonalnych mutacji w genie *TP53* może mieć nie tylko aspekt prognostyczny, ale i predykcyjny.

Stosując test ELISA, dokonano oceny częstości występowania autoprzeciwciał anti-p53 w osoczu chorych na raka pęcherza moczowego. Autoprzeciwciała anti-p53 stwierdzono w 18% przypadków. Częstość występowania autoprzeciwciał anti-p53 była znacznie wyższa w guzach Ta/T1 i wynosiła 23% w porównaniu z 13% w przypadku guzów T2–T4. W 55% przypadków mutacja w genie *TP53* nie była związana z obecnością autoprzeciwciał anti-p53 w osoczu chorych na raka pęcherza moczowego. Sugeruje to, że nie wszystkie mutacje generują odpowiedź humoralną skierowaną przeciwko białku p53. W grupie kontrolnej obecność autoprzeciwciał anti-53 wykryto w jednym przypadku.

W celu ustalenia profilu metylacji genów *MLH1*, *MGMT* i proapoptotycznej kinazy DAP zastosowano technikę, która umożliwiła analizę metylacji wybranej sekwencji 5' genu w oparciu o modyfikację DNA wodorosiarczynem sodu. W badanej grupie chorych metylację regionu 5' genu *MLH1* zaobserwowano u 19% chorych, *MGMT* u 34% a *DAPK* u 45%. W guzach Ta/T1 częstość hipermetylacji wyniosła 60% a w guzach T2–T4 74%. Hipermetylację minimum dwóch regionów 5' zaobserwowano w 23% przypadków. Liczba metylowanych loci była zależna od stopnia zaawansowania nowotworu. Metylację więcej niż jednego regionu 5' zaobserwowano w 37% przypadków z wysokim stopniem zaawansowania w porównaniu z 5% guzów Ta/T1. W komórkach z osadu moczku metylację regionu 5' genu *MLH1* zaobserwowano u 16% chorych, *DAPK* u 24%, a *MGMT* u 26%. Metylacja regionu 5' co najmniej jednego z trzech badanych genów wyniosła 24% w przypadku guzów Ta/T1 oraz 60% w przypadku guzów T2–T4. Dwadzieścia pięć z trzydziestu dziewięciu (64%) metylacji zaobserwowanych w tkance guza zostało potwierdzonych w komórkach z osadu moczku. Specyficzność analizy metylacji genu *DAPK* była na poziomie 71% w porównaniu ze 100% specyficznością analizy metylacji genów *MLH1* i *MGMT*. W odróżnieniu od ogólnie panującego poglądu, zgodnie, z którym metylacja regionu 5' genu *DAPK* jest związana z ryzykiem wystąpienia wznowy, nie wykazano istnienia statystycznej zależności pomiędzy tymi dwoma czynnikami. Dominująca obecność metylacji *MGMT* w guzach T2–T4 oraz obecność mutacji w genie *TP53* w 63% przypadków z metylacją *MGMT* wskazuje, że metylacja *MGMT* jest zjawiskiem późnym w rozwoju raka pęcherza moczowego. Znamiennej statystycznie zależność wykazano pomiędzy metylacją regionu 5' genu *MLH1* a wyższym stopniem złośliwości i obecnością mutacji w genie *TP53*, jak również zaobserwowano, że metylacja regionu 5' genu *MLH1* jest niezależnym czynnikiem rokowniczym w raku pęcherza moczowego.

W celu oceny udziału genów *MLH1* i *MSH2* w rozwoju raka pęcherza mo-

czowego przeprowadzono analizę zaburzeń w sekwencjach mikrosatelitarnych, w loci genów *MLH1* i *MSH2*. Wyniki badań wskazują na niską (13%) częstość zaburzeń mikrosatelitarnych w genach *MLH1* i *MSH2*. Tym samym niska częstość występowania defektów w systemie MMR tłumaczy zaobserwowaną w badanej grupie chorych niską (16%) częstość występowania MSI. Nie wszyscy chorzy na raka pęcherza moczowego z metylacją sekwencji 5' genu *MLH1* lub niestabilnością w genach mutatorowych charakteryzowali się obecnością MSI, co może sugerować, że inaktywacja genów MMR nie zawsze prowadzi do niestabilności mikrosatelitarnej w raku pęcherza moczowego. Zdecydowanie dominuje w tym nowotworze niestabilność chromosomowa. Analiza komórek z osadu moczu charakteryzowała się znacznie mniejszą czułością w porównaniu z analizą tkanki guza.

Przeprowadzone badania umożliwiły porównanie jednego z najistotniejszych defektów genowych, jakim jest mutacja w genie *TP53* ze zmianami epigenetycznymi. Analiza istotnych funkcjonalnie mutacji w genie *TP53* w połączeniu z określeniem częstości występowania autoprzeciwiał anty-p53, określeniem profilu metylacji genów *MGMT*, *MLH1* i *DAPK* oraz analizą mikrosatelitarną loci genów *MLH1* i *MSH2* pozwoliły na ocenę istniejących pomiędzy tymi zjawiskami zależności oraz umożliwiły wytypowanie niezależnych markerów definiujących prognozę kliniczną w przypadku raka pęcherza moczowego.

8. SUMMARY

Bladder cancer is one of most common cancers of the urinary system. Currently, intensive research is carried out aimed at understanding genetic and epigenetic mechanisms of tumor development.

The aim of a postdoctoral thesis was: a) to investigate the frequency and location of functional mutations in the *TP53* gene using the yeast system (split-FASAY method) in superficial and invasive transitional cell carcinoma of the bladder in relation to chosen clinical parameters; b) to investigate the frequency of anti-p53 autoantibodies in the plasma of bladder cancer patients in relation to the presence of the *TP53* gene mutation and to chosen clinical parameters; c) to examine the prognostic value of methylation of the 5' regions of genes connected with the DNA repair, i.e., *MLH1* and *MGMT* and apoptosis (DAPK); d) to investigate the genomic instability at loci *MLH1* and *MSH2* in relation to microsatellite instability in cancer of the urinary bladder; e) to compare the sensitivity of applied methods used to detect genetic and epigenetic changes in tumor tissue with the sensitivity of methods when urine sediment was used as a sample material.

The study was performed on the tumor tissue, peripheral blood, and urine sediment from 61 bladder cancer patients. As the control group the surrounding tumor free tissue from 10 bladder cancer patients was used together with non-tumor tissue and urine sediment from 10 patients with benign prostate hyperplasia and blood from 10 patients with lithiasis of the urea system.

The yeast system applied at the postdoctoral work allowed to evaluate the frequency of the *TP53* gene mutation and to distinguish the polymorphism from functionally important mutation. The *TP53* gene mutations were found in 42% of muscle invasive (T2–T4) tumors, and only in 10% of non-invasive Ta/T1 stage tumors. In normal bladder tissue, the *TP53* mutations were not found. In 80% of the cases, the *TP53* mutations found in tumor tissue were re-detected in urine sediment; thus, yeast has proven to be a useful system for the functional evaluation of the *TP53* gene status in urine sediments.

In this study for the first time, the presence of the splice site mutation at intron 7/codon 261 that generated a new stop codon as a result of inclusion of the last 3 bp of intron 7 into the exon 8 was reported. Premature stop codons were observed in three more cases. Eight of twenty two mutations in the *TP53* gene showed an association with increased aggressiveness of cancer. Using functional assay in yeast it was demonstrated that this method allows the identification of multiple mutations in a single gene in a single patient's cDNA sample. Three multiple mutations found in the study group were predominantly point mutations. The presence of the *TP53* gene mutation was associated with the higher tumor stage, grade and shorter survival of bladder cancer patients. The *TP53* gene status is an essential factor in therapy guidance as there is a trend toward worse response for mutant *TP53* carrying cancers. The presence of the relation-

ship between *TP53* functional status and response to DNA-damaging treatment indicates that the analysis characterizing *TP53* inactivating mutations can have not only a prognostic, but also predictive value.

ELISA test was used to assess the presence of anti-p53 autoantibodies in the plasma of bladder cancer patients. Anti-p53 autoantibodies were found in 18 % of cases. The frequency of anti-p53 autoantibodies in Ta/T1 stage tumors was much higher (23%) compared with 13% in case of T2–T4 tumors. In 55% cases the presence of autoantibodies didn't correlate with the *TP53* gene mutation suggesting, that not all mutations induce the humoral response directed against the p53 protein. In the control group anti-p53 autoantibodies were detected in one case.

A method that is based on the modification of DNA by sodium bisulfite was used to assess the methylation of the 5' regions of DNA repair genes *MLH1*, *MGMT*, and pro-apoptotic DAP-kinase. In the examined group of patients the overall methylation frequency in tumor tissue was 19% for *MLH1*, 34% for *MGMT*, and 45% for *DAPK*. In Ta/T1 tumors, the overall methylation was 60% and in T2–T4 tumors it was 74%. Hypermethylation of the minimum of two loci was observed in 23% of cases. The number of methylated loci was dependent on the stage of tumors. Methylation in more than one gene was detected in 37% of high-stage tumors comparing to only 5% in case of superficial Ta/T1 tumors. In urine sediment, the frequency of 5' region methylation was 16% for *MLH1*, 23% for *DAPK*, and 26% for *MGMT*. Methylation of the 5' region at least one of the three tested genes was found in 24% of Ta/T1 tumors and in 60% of T2–T4 tumors. Twenty five of thirty nine (64%) methylations were re-detected in urine sediments. The specificity of 5' region methylation of the *DAPK* gene was 71% compared with 100% for *MLH1* and *MGMT*. It does not exclude the *DAPK* gene as a prognostic marker because the presence of the *DAPK* 5' region methylation in two adjacent nonmalignant tissues may represent premalignant modification. In contrast to the general view, according to which methylation of the 5' region of *DAPK* gene is connected with a high recurrence rate a statistically significant association between these two parameters was not found. Dominating presence of the *MGMT* methylation in T2–T4 tumors and the presence of the mutation in the *TP53* gene in 63% cases with the *MGMT* methylation show that the *MGMT* methylation is a late phenomenon in the development of bladder cancer. *MLH1* methylation was significantly associated with high-grade tumors and the presence of the *TP53* gene mutation. Moreover it was shown that the methylation of the 5' region of *MLH1* gene is an independent prognostic marker for outcome in bladder cancer.

In order to assess the role of *MLH1* and *MSH2* in the development of bladder cancer the analysis of microsatellite alterations in loci *MLH1* and *MSH2* were performed. The results show low (13%) frequency of microsatellite alteration in *MLH1* and *MSH2* genes. Thus, the low frequency of defects in the MMR system explains the low (16%) frequency of MSI in the study group. Moreover, not all

patients with either 5' region methylation of *MLH1* gene or instability in the mutator genes were characterized by the presence of MSI what may suggest that inactivation of MMR genes is not always responsible for microsatellite instability observed in cancer of the bladder. Definitely in this cancer a loss of heterozygosity is found more often than MSI. The analysis of urine sediments was much less sensitive in comparison with the analysis of tumor tissue.

The present study allowed to compare one of the most substantial gene defects that is a mutation in the *TP53* with the epigenetic alterations. The analysis of functionally essential mutation in the *TP53* gene in combination with determination of the frequency of anti-p53 antibodies, determination of the methylation status of *MGMT*, *MLH*, *DAPK* genes and microsatellite analysis at loci *MLH1* and *MSH2* allowed to estimate the presence of association between these events and enabled to mark out independent markers defining the clinical prognosis in case of bladder cancer patients.

9. PIŚMIENNICTWO

1. Aaltonen L.A., Peltomaki P., Leach F.S., Sistonen P., Pylkkanen L., Mecklin J.P., Jarvinen H., Powell S.M., Jen J., Hamilton S.R., .: Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 1993, 260, 5109, 812-816.
2. Agazie Y.M., Movilla N., Ischenko I., Hayman M.J.: The phosphotyrosine phosphatase SHP2 is a critical mediator of transformation induced by the oncogenic fibroblast growth factor receptor 3. *Oncogene* 2003, 22, 44, 6909-6918.
3. Alfano D., Iaccarino I., Stoppelli M.P.: Urokinase signaling through its receptor protects against anoikis by increasing BCL-xL expression levels. *J.Biol.Chem.* 2006, 281, 26, 17758-17767.
4. Allard P., Fradet Y., Tetu B., Bernard P.: Tumor-associated antigens as prognostic factors for recurrence in 382 patients with primary transitional cell carcinoma of the bladder. *Clin.Cancer Res.* 1995, 1, 10, 1195-1202.
5. Andl C.D., Mizushima T., Nakagawa H., Oyama K., Harada H., Chruma K., Herlyn M., Rustgi A.K.: Epidermal growth factor receptor mediates increased cell proliferation, migration, and aggregation in esophageal keratinocytes in vitro and in vivo. *J.Biol.Chem.* 2003, 278, 3, 1824-1830.
6. Appella E., Anderson C.W.: Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *Eur.J.Biochem.* 2001, 268, 10, 2764-2772.
7. Aveyard J.S., Skilleter A., Habuchi T., Knowles M.A.: Somatic mutation of PTEN in bladder carcinoma. *Br.J.Cancer* 1999, 80, 5-6, 904-908.
8. Badawi A.F., Mostafa M.H., Probert A., O'Connor P.J.: Role of schistosomiasis in human bladder cancer: evidence of association, aetiological factors, and basic mechanisms of carcinogenesis. *Eur.J.Cancer Prev.* 1995, 4, 1, 45-59.
9. Baffa R., Gomella L.G., Vecchione A., Bassi P., Mimori K., Sedor J., Calviello C.M., Gardiman M., Minimo C., Strup S.E., McCue P.A., Kovatich A.J., Pagano F., Huebner K., Croce C.M.: Loss of FHIT expression in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Am.J.Pathol.* 2000, 156, 2, 419-424.
10. Balana C., Ramirez J.L., Taron M., Roussos Y., Ariza A., Ballester R., Sarries C., Mendez P., Sanchez J.J., Rosell R.: O6-methyl-guanine-DNA methyltransferase methylation in serum and tumor DNA predicts response to 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea but not to temozolamide plus cisplatin in glioblastoma multiforme. *Clin Cancer Res.* 2003, 9, 4, 1461-1468.

11. Baldin V., Lukas J., Marcote M.J., Pagano M., Draetta G.: Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes Dev.* 1993, 7, 5, 812-821.
12. Bartlett J.M., Watters A.D., Ballantyne S.A., Going J.J., Grigor K.M., Cooke T.G.: Is chromosome 9 loss a marker of disease recurrence in transitional cell carcinoma of the urinary bladder? *Br.J.Cancer* 1998, 77, 12, 2193-2198.
13. Bassi P., Ferrante G.D., Piazza N., Spinadin R., Carando R., Pappagallo G., Pagano F.: Prognostic factors of outcome after radical cystectomy for bladder cancer: a retrospective study of a homogeneous patient cohort. *J.Urol.* 1999, 161, 5, 1494-1497.
14. Becker K.F., Atkinson M.J., Reich U., Becker I., Nekarda H., Siewert J.R., Hofler H.: E-cadherin gene mutations provide clues to diffuse type gastric carcinomas. *Cancer Res.* 1994, 54, 14, 3845-3852.
15. Bellmunt J., Hussain M., Dinney C.P.: Novel approaches with targeted therapies in bladder cancer. Therapy of bladder cancer by blockade of the epidermal growth factor receptor family. *Crit Rev.Oncol.Hematol.* 2003, 46 Suppl, S85-104.
16. Bernardini S., Adessi G.L., Chezy E., Billerey C., Carbillet J.P., Bittard H.: Influence of cigarette smoking on P53 gene mutations in bladder carcinomas. *Anticancer Res.* 2001, 21, 4B, 3001-3004.
17. Bernardini S., Fauconnet S., Chabannes E., Henry P.C., Adessi G., Bittard H.: Serum levels of vascular endothelial growth factor as a prognostic factor in bladder cancer. *J.Urol.* 2001, 166, 4, 1275-1279.
18. Berrozpe G., Miro R., Caballin M.R., Salvador J., Egozcue J.: Trisomy 7 may be a primary change in noninvasive transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer Genet.Cytogenet.* 1990, 50, 1, 9-14.
19. Bestor T.H.: Gene silencing. Methylation meets acetylation. *Nature* 1998, 393, 6683, 311-312.
20. Billerey C., Chopin D., Aubriot-Lorton M.H., Ricol D., Gil Diez d.M., Van Rhijn B., Bralet M.P., Lefrere-Belda M.A., Lahaye J.B., Abbou C.C., Bonaventure J., Zafrani E.S., van der K.T., Thiery J.P., Radvanyi F.: Frequent FGFR3 mutations in papillary non-invasive bladder (pTa) tumors. *Am.J.Pathol.* 2001, 158, 6, 1955-1959.
21. Blagosklonny M.V., Pardee A.B.: The restriction point of the cell cycle. *Cell Cycle* 2002, 1, 2, 103-110.
22. Blasi F.: Urokinase and urokinase receptor: a paracrine/autocrine system regulating cell migration and invasiveness. *Bioessays* 1993, 15, 2, 105-111.
23. Blasi F., Carmeliet P.: uPAR: a versatile signalling orchestrator. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 2002, 3, 12, 932-943.
24. Bochner B.H., Cote R.J., Weidner N., Groshen S., Chen S.C., Skinner D.G., Nichols P.W.: Angiogenesis in bladder cancer: relationship be-

- tween microvessel density and tumor prognosis. *J.Natl.Cancer Inst.* 1995, 87, 21, 1603-1612.
25. Boland C.R., Thibodeau S.N., Hamilton S.R., Sidransky D., Eshleman J.R., Burt R.W., Meltzer S.J., Rodriguez-Bigas M.A., Fodde R., Ranzani G.N., Srivastava S.: A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res.* 1998, 58, 22, 5248-5257.
 26. Bonnal C., Ravery V., Toubanc M., Bertrand G., Boccon-Gibod L., Henin D., Grandchamp B.: Absence of microsatellite instability in transitional cell carcinoma of the bladder. *Urology* 2000, 55, 2, 287-291.
 27. Bowman T., Broome M.A., Sinibaldi D., Wharton W., Pledger W.J., Sedivy J.M., Irby R., Yeatman T., Courtneidge S.A., Jove R.: Stat3-mediated Myc expression is required for Src transformation and PDGF-induced mitogenesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2001, 98, 13, 7319-7324.
 28. Brandeis M., Ariel M., Cedar H.: Dynamics of DNA methylation during development. *Bioessays* 1993, 15, 11, 709-713.
 29. Bravaccini S., Sanchini M.A., Granato A.M., Gunelli R., Nanni O., Amadori D., Calistri D., Silvestrini R.: Urine telomerase activity for the detection of bladder cancer in females. *J.Urol.* 2007, 178, 1, 57-61.
 30. Bringuier P.P., Umbas R., Schaafsma H.E., Karthaus H.F., Debruyne F.M., Schalken J.A.: Decreased E-cadherin immunoreactivity correlates with poor survival in patients with bladder tumors. *Cancer Res.* 1993, 53, 14, 3241-3245.
 31. Bromberg J., Darnell J.E., Jr.: The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene* 2000, 19, 21, 2468-2473.
 32. Bunz F., Dutriaux A., Lengauer C., Waldman T., Zhou S., Brown J.P., Sedivy J.M., Kinzler K.W., Vogelstein B.: Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science* 1998, 282, 5393, 1497-1501.
 33. Buschhausen G., Wittig B., Graessmann M., Graessmann A.: Chromatin structure is required to block transcription of the methylated herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1987, 84, 5, 1177-1181.
 34. Cahill D.P., Kinzler K.W., Vogelstein B., Lengauer C.: Genetic instability and darwinian selection in tumours. *Trends Cell Biol.* 1999, 9, 12, M57-M60.
 35. Cairns P., Polascik T.J., Eby Y., Tokino K., Califano J., Merlo A., Mao L., Herath J., Jenkins R., Westra W., .: Frequency of homozyg-

- ous deletion at p16/CDKN2 in primary human tumours. *Nat.Genet.* 1995, 11, 2, 210-212.
36. Cairns P., Shaw M.E., Knowles M.A.: Initiation of bladder cancer may involve deletion of a tumour-suppressor gene on chromosome 9. *Oncogene* 1993, 8, 4, 1083-1085.
 37. Cairns P., Tokino K., Eby Y., Sidransky D.: Homozygous deletions of 9p21 in primary human bladder tumors detected by comparative multiplex polymerase chain reaction. *Cancer Res.* 1994, 54, 6, 1422-1424.
 38. Cameron E.E., Bachman K.E., Myohanen S., Herman J.G., Baylin S.B.: Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nat.Genet.* 1999, 21, 1, 103-107.
 39. Cantley L.C., Auger K.R., Carpenter C., Duckworth B., Graziani A., Kapeller R., Soltoff S.: Oncogenes and signal transduction. *Cell* 1991, 64, 2, 281-302.
 40. Cappellen D., De Oliveira C., Ricol D., de Medina S., Bourdin J., Sastre-Garau X., Chopin D., Thiery J.P., Radvanyi F.: Frequent activating mutations of FGFR3 in human bladder and cervix carcinomas. *Nat.Genet.* 1999, 23, 1, 18-20.
 41. Caron d.F., Gruel N., Venot C., Debussche L., Conseiller E., Dureuil C., Teillaud J.L., Tocque B., Bracco L.: Restoration of transcriptional activity of p53 mutants in human tumour cells by intracellular expression of anti-p53 single chain Fv fragments. *Oncogene* 1999, 18, 2, 551-557.
 42. Catlett-Falcone R., Landowski T.H., Oshiro M.M., Turkson J., Levitzki A., Savino R., Ciliberto G., Moscinski L., Fernandez-Luna J.L., Nunez G., Dalton W.S., Jove R.: Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity.* 1999, 10, 1, 105-115.
 43. Catto J.W., Azzouzi A.R., Rehman I., Feeley K.M., Cross S.S., Amira N., Fromont G., Sibony M., Cussenot O., Meuth M., Hamdy F.C.: Promoter hypermethylation is associated with tumor location, stage, and subsequent progression in transitional cell carcinoma. *J.Clin.Oncol.* 2005, 23, 13, 2903-2910.
 44. Chan M.W., Chan L.W., Tang N.L., Lo K.W., Tong J.H., Chan A.W., Cheung H.Y., Wong W.S., Chan P.S., Lai F.M., To K.F.: Frequent hypermethylation of promoter region of RASSF1A in tumor tissues and voided urine of urinary bladder cancer patients. *Int.J.Cancer* 2003, 104, 5, 611-616.
 45. Chan M.W., Chan L.W., Tang N.L., Tong J.H., Lo K.W., Lee T.L., Cheung H.Y., Wong W.S., Chan P.S., Lai F.M., To K.F.: Hypermethylation of multiple genes in tumor tissues and voided urine in urinary bladder cancer patients. *Clin.Cancer Res.* 2002, 8, 2, 464-470.

46. Chang L.L., Yeh W.T., Yang S.Y., Wu W.J., Huang C.H.: Genetic alterations of p16INK4a and p14ARF genes in human bladder cancer. *J.Urol.* 2003, 170, 2 Pt 1, 595-600.
47. Chapman E.J., Harnden P., Chambers P., Johnston C., Knowles M.A.: 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, 16, 5740-5747.
48. Charuruks N., Tangkijvanich P., Voravud N., Chatsantikul R., Theamboonlers A., Poovorawan Y.: Clinical significance of p53 antigen and anti-p53 antibodies in the sera of hepatocellular carcinoma patients. *J.Gastroenterol.* 2001, 36, 12, 830-836.
49. Chen G., Lin M.S., Li R.C.: Expression and prognostic value of proliferating cell nuclear antigen in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Urol.Res.* 1997, 25, 1, 25-30.
50. Chen R.Z., Pettersson U., Beard C., Jackson-Grusby L., Jaenisch R.: DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates. *Nature* 1998, 395, 6697, 89-93.
51. Cheng H.L., Liu H.S., Lin Y.J., Chen H.H., Hsu P.Y., Chang T.Y., Ho C.L., Tzai T.S., Chow N.H.: Co-expression of RON and MET is a prognostic indicator for patients with transitional-cell carcinoma of the bladder. *Br.J.Cancer* 2005, 92, 10, 1906-1914.
52. Cheng H.L., Trink B., Tzai T.S., Liu H.S., Chan S.H., Ho C.L., Sidransky D., Chow N.H.: Overexpression of c-met as a prognostic indicator for transitional cell carcinoma of the urinary bladder: a comparison with p53 nuclear accumulation. *J.Clin.Oncol.* 2002, 20, 6, 1544-1550.
53. Cheng J.C., Weisenberger D.J., Gonzales F.A., Liang G., Xu G.L., Hu Y.G., Marquez V.E., Jones P.A.: Continuous zebularine treatment effectively sustains demethylation in human bladder cancer cells. *Mol.Cell Biol.* 2004, 24, 3, 1270-1278.
54. Cho Y., Gorina S., Jeffrey P.D., Pavletich N.P.: Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science* 1994, 265, 5170, 346-355.
55. Christensen M., Jensen M.A., Wolf H., Orntoft T.F.: Pronounced microsatellite instability in transitional cell carcinomas from young patients with bladder cancer. *Int.J.Cancer* 1998, 79, 4, 396-401.
56. Christensen M., Sunde L., Bolund L., Orntoft T.F.: Comparison of three methods of microsatellite detection. *Scand.J.Clin.Lab Invest.* 1999, 59, 3, 167-177.
57. Cimmino A., Calin G.A., Fabbri M., Iorio M.V., Ferracin M., Shimizu M., Wojcik S.E., Aqeilan R.I., Zupo S., Dono M., Rassenti L., Alder H., Volinia S., Liu C.G., Kipps T.J., Negrini M., Croce C.M.: miR-15

- and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2005, 102, 39, 13944-13949.
58. Coogan C.L., Estrada C.R., Kapur S., Bloom K.J.: HER-2/neu protein overexpression and gene amplification in human transitional cell carcinoma of the bladder. *Urology* 2004, 63, 4, 786-790.
59. Coombs L.M., Pigott D.A., Eydmann M.E., Proctor A.J., Knowles M.A.: Reduced expression of TGF beta is associated with advanced disease in transitional cell carcinoma. *Br.J.Cancer* 1993, 67, 3, 578-584.
60. Cordon-Cardo C.: Cell cycle regulators as prognostic factors for bladder cancer. *Eur.Urol.* 1998, 33 Suppl 4, 11-12.
61. Cordon-Cardo C., Dalbagni G., Saez G.T., Oliva M.R., Zhang Z.F., Rosai J., Reuter V.E., Pellicer A.: p53 mutations in human bladder cancer: genotypic versus phenotypic patterns. *Int.J.Cancer* 1994, 56, 3, 347-353.
62. Cordon-Cardo C., Wartinger D., Petrylak D., Dalbagni G., Fair W.R., Fuks Z., Reuter V.E.: Altered expression of the retinoblastoma gene product: prognostic indicator in bladder cancer. *J.Natl.Cancer Inst.* 1992, 84, 16, 1251-1256.
63. Crawford L.V., Pim D.C., Bulbrook R.D.: Detection of antibodies against the cellular protein p53 in sera from patients with breast cancer. *Int.J.Cancer* 1982, 30, 4, 403-408.
64. Crippa M.P.: Urokinase-type plasminogen activator. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 2007, 39, 4, 690-694.
65. Curigliano G., Ferretti G., Flamini G., Goldhirsch A., de Braud F., Calabro M.G., Mandalà M., Nole F., De Pas T., D'Addessi A., Cittadini A.: Diagnosis of T1 bladder transitional cell carcinoma by denaturing gradient gel electrophoresis urinalysis. *Anticancer Res.* 2001, 21, 4B, 3015-3020.
66. Czerniak B., Cohen G.L., Etkind P., Deitch D., Simmons H., Herz F., Koss L.G.: Concurrent mutations of coding and regulatory sequences of the Ha-ras gene in urinary bladder carcinomas. *Hum.Pathol.* 1992, 23, 11, 1199-1204.
67. Dahse R., Utting M., Werner W., Schimmel B., Claussen U., Junker K.: TP53 alterations as a potential diagnostic marker in superficial bladder carcinoma and in patients serum, plasma and urine samples. *Int.J.Oncol.* 2002, 20, 1, 107-115.
68. Datta J., Ghoshal K., Sharma S.M., Tajima S., Jacob S.T.: Biochemical fractionation reveals association of DNA methyltransferase (Dnmt) 3b with Dnmt1 and that of Dnmt 3a with a histone H3 methyltransferase and Hdac1. *J.Cell Biochem.* 2003, 88, 5, 855-864.

69. Davidoff A.M., Iglehart J.D., Marks J.R.: Immune response to p53 is dependent upon p53/HSP70 complexes in breast cancers. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1992, 89, 8, 3439-3442.
70. Davis D.W., Inoue K., Dinney C.P., Hicklin D.J., Abbruzzese J.L., McConkey D.J.: Regional effects of an antivascular endothelial growth factor receptor monoclonal antibody on receptor phosphorylation and apoptosis in human 253J B-V bladder cancer xenografts. *Cancer Res.* 2004, 64, 13, 4601-4610.
71. de Ruijter A.J., van Gennip A.H., Caron H.N., Kemp S., van Kuilenburg A.B.: Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem.J.* 2003, 370, Pt 3, 737-749.
72. Degregori J.: The genetics of the E2F family of transcription factors: shared functions and unique roles. *Biochim.Biophys.Acta* 2002, 1602, 2, 131-150.
73. Del Senno L., Maestri I., Piva R., Hanau S., Reggiani A., Romano A., Russo G.: Differential hypomethylation of the c-myc protooncogene in bladder cancers at different stages and grades. *J.Urol.* 1989, 142, 1, 146-149.
74. DeLeo A.B., Jay G., Appella E., Dubois G.C., Law L.W., Old L.J.: Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1979, 76, 5, 2420-2424.
75. Denissenko M.F., Pao A., Tang M., Pfeifer G.P.: Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53. *Science* 1996, 274, 5286, 430-432.
76. DeRisi J., Penland L., Brown P.O., Bittner M.L., Meltzer P.S., Ray M., Chen Y., Su Y.A., Trent J.M.: Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nat.Genet.* 1996, 14, 4, 457-460.
77. Dimova D.K., Dyson N.J.: The E2F transcriptional network: old acquaintances with new faces. *Oncogene* 2005, 24, 17, 2810-2826.
78. Dinney C.P., Bielenberg D.R., Perrotte P., Reich R., Eve B.Y., Bucana C.D., Fidler I.J.: Inhibition of basic fibroblast growth factor expression, angiogenesis, and growth of human bladder carcinoma in mice by systemic interferon-alpha administration. *Cancer Res.* 1998, 58, 4, 808-814.
79. Doherty S.C., McKeown S.R., McKelvey-Martin V., Downes C.S., Atala A., Yoo J.J., Simpson D.A., Kaufmann W.K.: Cell cycle checkpoint function in bladder cancer. *J.Natl.Cancer Inst.* 2003, 95, 24, 1859-1868.
80. Dominguez G., Carballido J., Silva J., Silva J.M., Garcia J.M., Mendez J., Provencio M., Espana P., Bonilla F.: p14ARF promoter hy-

- permethylation in plasma DNA as an indicator of disease recurrence in bladder cancer patients. *Clin.Cancer Res.* 2002, 8, 4, 980-985.
81. Domon B., Aebersold R.: Mass spectrometry and protein analysis. *Science.* 2006, 312, 5771, 212-217.
 82. Dovedi S.J., Kirby J.A., Atkins H., Davies B.R., Kelly J.D.: Cyclooxygenase-2 inhibition: a potential mechanism for increasing the efficacy of bacillus calmette-guerin immunotherapy for bladder cancer. *J.Urol.* 2005, 174, 1, 332-337.
 83. Duckett D.R., Drummond J.T., Murchie A.I., Reardon J.T., Sancar A., Lilley D.M., Modrich P.: Human MutS α recognizes damaged DNA base pairs containing O6-methylguanine, O4-methylthymine, or the cisplatin-d(GpG) adduct. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1996, 93, 13, 6443-6447.
 84. Duesberg P., Li R., Fabarius A., Hehlmann R.: The chromosomal basis of cancer. *Cell Oncol.* 2005, 27, 5-6, 293-318.
 85. Duesberg P., Rasnick D.: Aneuploidy, the somatic mutation that makes cancer a species of its own. *Cell Motil.Cytoskeleton* 2000, 47, 2, 81-107.
 86. Dulaimi E., Uzzo R.G., Greenberg R.E., Al Saleem T., Cairns P.: Detection of bladder cancer in urine by a tumor suppressor gene hypermethylation panel. *Clin.Cancer Res.* 2004, 10, 6, 1887-1893.
 87. Dyrskjot L., Ostensfeld M.S., Bramsen J.B., Silahatoglu A.N., Lamy P., Ramanathan R., Fristrup N., Jensen J.L., Andersen C.L., Zieger K., Kauppinen S., Ulhoi B.P., Kjems J., Borre M., Orntoft T.F.: Genomic profiling of microRNAs in bladder cancer: miR-129 is associated with poor outcome and promotes cell death in vitro. *Cancer Res.* 2009, 69, 11, 4851-4860.
 88. Dyrskjot L., Zieger K., Kruhoffer M., Thykjaer T., Jensen J.L., Primdahl H., Aziz N., Marcussen N., Moller K., Orntoft T.F.: A molecular signature in superficial bladder carcinoma predicts clinical outcome. *Clin.Cancer Res.* 2005, 11, 11, 4029-4036.
 89. Eads C.A., Danenberg K.D., Kawakami K., Saltz L.B., Blake C., Shibata D., Danenberg P.V., Laird P.W.: MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Res.* 2000, 28, 8, E32.
 90. Eads C.A., Danenberg K.D., Kawakami K., Saltz L.B., Danenberg P.V., Laird P.W.: CpG island hypermethylation in human colorectal tumors is not associated with DNA methyltransferase overexpression. *Cancer Res.* 1999, 59, 10, 2302-2306.
 91. Ehrlich M., Gama-Sosa M.A., Huang L.H., Midgett R.M., Kuo K.C., McCune R.A., Gehrke C.: Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. *Nucleic Acids Res.* 1982, 10, 8, 2709-2721.

92. Eissa S., Swellam M., Ali-Labib R., Mansour A., El Malt O., Tash F.M.: Detection of telomerase in urine by 3 methods: evaluation of diagnostic accuracy for bladder cancer. *J.Urol.* 2007, 178, 3 Pt 1, 1068-1072.
93. el Deiry W.S.: Regulation of p53 downstream genes. *Semin.Cancer Biol.* 1998, 8, 5, 345-357.
94. Erbersdobler A., Kaiser H., Friedrich M.G., Henke R.P.: Numerical aberrations of chromosome 8 and allelic loss at 8p in non-muscle-invasive urothelial carcinomas of the urinary bladder. *Eur.Urol.* 2000, 38, 5, 590-596.
95. Esrig D., Elmajian D., Groshen S., Freeman J.A., Stein J.P., Chen S.C., Nichols P.W., Skinner D.G., Jones P.A., Cote R.J.: Accumulation of nuclear p53 and tumor progression in bladder cancer. *N.Engl.J.Med.* 1994, 331, 19, 1259-1264.
96. Esrig D., Spruck C.H., III, Nichols P.W., Chaiwun B., Steven K., Groshen S., Chen S.C., Skinner D.G., Jones P.A., Cote R.J.: p53 nuclear protein accumulation correlates with mutations in the p53 gene, tumor grade, and stage in bladder cancer. *Am.J.Pathol.* 1993, 143, 5, 1389-1397.
97. Esteller M., Corn P.G., Baylin S.B., Herman J.G.: A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res.* 2001, 61, 8, 3225-3229.
98. Esteller M., Hamilton S.R., Burger P.C., Baylin S.B., Herman J.G.: Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer Res.* 1999, 59, 4, 793-797.
99. Esteller M., Herman J.G.: Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. *J.Pathol.* 2002, 196, 1, 1-7.
100. Esteller M., Risques R.A., Toyota M., Capella G., Moreno V., Peinado M.A., Baylin S.B., Herman J.G.: Promoter hypermethylation of the DNA repair gene O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase is associated with the presence of G:C to A:T transition mutations in p53 in human colorectal tumorigenesis. *Cancer Res.* 2001, 61, 12, 4689-4692.
101. Esteller M., Toyota M., Sanchez-Cespedes M., Capella G., Peinado M.A., Watkins D.N., Issa J.P., Sidransky D., Baylin S.B., Herman J.G.: Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is associated with G to A mutations in K-ras in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res.* 2000, 60, 9, 2368-2371.
102. Fadl-Elmula I., Gorunova L., Mandahl N., Elfving P., Lundgren R., Mitelman F., Heim S.: Karyotypic characterization of urinary bladder

- transitional cell carcinomas. *Genes Chromosomes.Cancer* 2000, 29, 3, 256-265.
103. Fan T., Yan Q., Huang J., Austin S., Cho E., Ferris D., Muegge K.: Lsh-deficient murine embryonal fibroblasts show reduced proliferation with signs of abnormal mitosis. *Cancer Res.* 2003, 63, 15, 4677-4683.
 104. Feber A., Clark J., Goodwin G., Dodson A.R., Smith P.H., Fletcher A., Edwards S., Flohr P., Falconer A., Roe T., Kovacs G., Dennis N., Fisher C., Wooster R., Huddart R., Foster C.S., Cooper C.S.: Amplification and overexpression of E2F3 in human bladder cancer. *Oncogene* 2004, 23, 8, 1627-1630.
 105. Feinstein E., Druck T., Kastury K., Berissi H., Goodart S.A., Overhauser J., Kimchi A., Huebner K.: Assignment of DAP1 and DAPK--genes that positively mediate programmed cell death triggered by IFN-gamma--to chromosome regions 5p12.2 and 9q34.1, respectively. *Genomics* 1995, 29, 1, 305-307.
 106. Fields S., Jang S.K.: Presence of a potent transcription activating sequence in the p53 protein. *Science* 1990, 249, 4972, 1046-1049.
 107. Fingert H.J., Chang J.D., Pardee A.B.: Cytotoxic, cell cycle, and chromosomal effects of methylxanthines in human tumor cells treated with alkylating agents. *Cancer Res.* 1986, 46, 5, 2463-2467.
 108. Fink D., Zheng H., Nebel S., Norris P.S., Aebi S., Lin T.P., Nehme A., Christen R.D., Haas M., MacLeod C.L., Howell S.B.: In vitro and in vivo resistance to cisplatin in cells that have lost DNA mismatch repair. *Cancer Res.* 1997, 57, 10, 1841-1845.
 109. Firestine S.M., Misialek S., Toffaletti D.L., Klem T.J., Perfect J.R., Davisson V.J.: Biochemical role of the *Cryptococcus neoformans* ADE2 protein in fungal de novo purine biosynthesis. *Arch.Biochem.Biophys.* 1998, 351, 1, 123-134.
 110. Fitzgerald J.M., Ramchurren N., Rieger K., Levesque P., Silverman M., Libertino J.A., Summerhayes I.C.: Identification of H-ras mutations in urine sediments complements cytology in the detection of bladder tumors. *J.Natl.Cancer Inst.* 1995, 87, 2, 129-133.
 111. Flaman J.M., Frebourg T., Moreau V., Charbonnier F., Martin C., Chappuis P., Sappino A.P., Limacher I.M., Bron L., Benhattar J., .: A simple p53 functional assay for screening cell lines, blood, and tumors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1995, 92, 9, 3963-3967.
 112. Fleisher A.S., Esteller M., Wang S., Tamura G., Suzuki H., Yin J., Zou T.T., Abraham J.M., Kong D., Smolinski K.N., Shi Y.Q., Rhyu M.G., Powell S.M., James S.P., Wilson K.T., Herman J.G., Meltzer S.J.: Hypermethylation of the hMLH1 gene promoter in human gastric cancers with microsatellite instability. *Cancer Res.* 1999, 59, 5, 1090-1095.

113. Fontana D., Bellina M., Scoffone C., Cagnazzi E., Cappia S., Cavallo F., Russo R., Leonardo E.: Evaluation of c-ras oncogene product (p21) in superficial bladder cancer. *Eur.Urol.* 1996, 29, 4, 470-476.
114. Fornari D., Steven K., Hansen A.B., Vibits H., Jepsen J.V., Poulsen A.L., Schwartz M., Horn T.: New evaluation of plasma DNA microsatellite analysis in patients with TCC of the urinary bladder. *Anticancer Res.* 2004, 24, 3a, 1733-1736.
115. Fradet Y., Tardif M., Bourget L., Robert J.: Clinical cancer progression in urinary bladder tumors evaluated by multiparameter flow cytometry with monoclonal antibodies. *Laval University Urology Group. Cancer Res.* 1990, 50, 2, 432-437.
116. Freedman D.A., Wu L., Levine A.J.: Functions of the MDM2 oncoprotein. *Cell Mol.Life Sci.* 1999, 55, 1, 96-107.
117. Friedrich M.G., Chandrasoma S., Siegmund K.D., Weisenberger D.J., Cheng J.C., Toma M.I., Huland H., Jones P.A., Liang G.: Prognostic relevance of methylation markers in patients with non-muscle invasive bladder carcinoma. *Eur.J.Cancer* 2005, 41, 17, 2769-2778.
118. Friedrich M.G., Weisenberger D.J., Cheng J.C., Chandrasoma S., Siegmund K.D., Gonzalgo M.L., Toma M.I., Huland H., Yoo C., Tsai Y.C., Nichols P.W., Bochner B.H., Jones P.A., Liang G.: Detection of methylated apoptosis-associated genes in urine sediments of bladder cancer patients. *Clin.Cancer Res.* 2004, 10, 22, 7457-7465.
119. Frommer M., McDonald L.E., Millar D.S., Collis C.M., Watt F., Grigg G.W., Molloy P.L., Paul C.L.: A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1992, 89, 5, 1827-1831.
120. Funk W.D., Pak D.T., Karas R.H., Wright W.E., Shay J.W.: A transcriptionally active DNA-binding site for human p53 protein complexes. *Mol.Cell Biol.* 1992, 12, 6, 2866-2871.
121. Gao J.P., Uchida T., Wang C., Jiang S.X., Matsumoto K., Satoh T., Minei S., Soh S., Kameya T., Baba S.: Relationship between p53 gene mutation and protein expression: clinical significance in transitional cell carcinoma of the bladder. *Int.J.Oncol.* 2000, 16, 3, 469-475.
122. Garcia d.M., X, Torregrosa A., Munoz J., Castellsague X., Condom E., Vigues F., Arance A., Fabra A., Germa J.R.: Prognostic value of the expression of E-cadherin and beta-catenin in bladder cancer. *Eur.J.Cancer* 2000, 36, 3, 357-362.
123. Gardiner-Garden M., Frommer M.: CpG islands in vertebrate genomes. *J.Mol.Biol.* 1987, 196, 2, 261-282.
124. Giaccia A.J., Kastan M.B.: The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. *Genes Dev.* 1998, 12, 19, 2973-2983.

125. Gibas Z., Gibas L.: Cytogenetics of bladder cancer. *Cancer Genet.Cytogenet.* 1997, 95, 1, 108-115.
126. Gibbons R.J., McDowell T.L., Raman S., O'Rourke D.M., Garrick D., Ayyub H., Higgs D.R.: Mutations in ATRX, encoding a SWI/SNF-like protein, cause diverse changes in the pattern of DNA methylation. *Nat.Genet.* 2000, 24, 4, 368-371.
127. Glas A.S., Roos D., Deutekom M., Zwinderman A.H., Bossuyt P.M., Kurth K.H.: Tumor markers in the diagnosis of primary bladder cancer. A systematic review. *J.Urol.* 2003, 169, 6, 1975-1982.
128. Glaser K.B., Staver M.J., Waring J.F., Stender J., Ulrich R.G., David-
sen S.K.: Gene expression profiling of multiple histone deacetylase (HDAC) inhibitors: defining a common gene set produced by HDAC inhibition in T24 and MDA carcinoma cell lines. *Mol.Cancer Ther.* 2003, 2, 2, 151-163.
129. Goddard J.C., Sutton C.D., Jones J.L., O'Byrne K.J., Kockelbergh R.C.: Reduced thrombospondin-1 at presentation predicts disease progression in superficial bladder cancer. *Eur.Urol.* 2002, 42, 5, 464-468.
130. Goelz S.E., Vogelstein B., Hamilton S.R., Feinberg A.P.: Hypomethylation of DNA from benign and malignant human colon neoplasms. *Science* 1985, 228, 4696, 187-190.
131. Gohji K., Nomi M., Niitani Y., Kitazawa S., Fujii A., Katsuoka Y., Nakajima M.: Independent prognostic value of serum hepatocyte growth factor in bladder cancer. *J.Clin.Oncol.* 2000, 18, 16, 2963-2971.
132. Gonzalez-Zulueta M., Bender C.M., Yang A.S., Nguyen T., Beart R.W., Van Tornout J.M., Jones P.A.: Methylation of the 5' CpG island of the p16/CDKN2 tumor suppressor gene in normal and transformed human tissues correlates with gene silencing. *Cancer Res.* 1995, 55, 20, 4531-4535.
133. Gonzalez-Zulueta M., Ruppert J.M., Tokino K., Tsai Y.C., Spruck C.H., III, Miyao N., Nichols P.W., Hermann G.G., Horn T., Steven K., .: Microsatellite instability in bladder cancer. *Cancer Res.* 1993, 53, 23, 5620-5623.
134. Grandori C., Eisenman R.N.: Myc target genes. *Trends Biochem.Sci.* 1997, 22, 5, 177-181.
135. Gray S.G., Ekstrom T.J.: The human histone deacetylase family. *Exp.Cell Res.* 2001, 262, 2, 75-83.
136. Griffith J.D., Comeau L., Rosenfield S., Stansel R.M., Bianchi A., Moss H., de Lange T.: Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* 1999, 97, 4, 503-514.
137. Griffiths T.R., Brotherick I., Bishop R.I., White M.D., McKenna D.M., Horne C.H., Shenton B.K., Neal D.E., Mellon J.K.: Cell adhesion molecules in bladder cancer: soluble serum E-cadherin correlates with predictors of recurrence. *Br.J.Cancer* 1996, 74, 4, 579-584.

138. Griffiths-Jones S., Grocock R.J., van Dongen S., Bateman A., Enright A.J.: miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res.* 2006, 34, Database issue, D140-D144.
139. Grignon D.J., Sakr W., Toth M., Ravery V., Angulo J., Shamsa F., Pontes J.E., Crissman J.C., Fridman R.: High levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) expression are associated with poor outcome in invasive bladder cancer. *Cancer Res.* 1996, 56, 7, 1654-1659.
140. Grossfeld G.D., Ginsberg D.A., Stein J.P., Bochner B.H., Esrig D., Groshen S., Dunn M., Nichols P.W., Taylor C.R., Skinner D.G., Cote R.J.: Thrombospondin-1 expression in bladder cancer: association with p53 alterations, tumor angiogenesis, and tumor progression. *J.Natl.Cancer Inst.* 1997, 89, 3, 219-227.
141. Grossman H.B., Lee C., Bromberg J., Liebert M.: Expression of the alpha6beta4 integrin provides prognostic information in bladder cancer. *Oncol.Rep.* 2000, 7, 1, 13-16.
142. Guan K.P., Ye H.Y., Yan Z., Wang Y., Hou S.K.: Serum levels of endostatin and matrix metalloproteinase-9 associated with high stage and grade primary transitional cell carcinoma of the bladder. *Urology* 2003, 61, 4, 719-723.
143. Gumus E., Erdamar S., Demirel G., Horasanli K., Kendirci M., Miroglu C.: Association of positive serum anti-p53 antibodies with poor prognosis in bladder cancer patients. *Int.J.Urol.* 2004, 11, 12, 1070-1077.
144. Habuchi T., Ogawa O., Kakehi Y., Ogura K., Koshiba M., Hamazaki S., Takahashi R., Sugiyama T., Yoshida O.: Accumulated allelic losses in the development of invasive urothelial cancer. *Int.J.Cancer* 1993, 53, 4, 579-584.
145. Habuchi T., Takahashi T., Kakinuma H., Wang L., Tsuchiya N., Satoh S., Akao T., Sato K., Ogawa O., Knowles M.A., Kato T.: Hypermethylation at 9q32-33 tumour suppressor region is age-related in normal urothelium and an early and frequent alteration in bladder cancer. *Oncogene* 2001, 20, 4, 531-537.
146. Hammond S.M., Bernstein E., Beach D., Hannon G.J.: An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 2000, 404, 6775, 293-296.
147. Hanahan D., Weinberg R.A.: The hallmarks of cancer. *Cell* 2000, 100, 1, 57-70.
148. Harper J.W., Adami G.R., Wei N., Keyomarsi K., Elledge S.J.: The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 1993, 75, 4, 805-816.
149. Harrington L.: Biochemical aspects of telomerase function. *Cancer Lett.* 2003, 194, 2, 139-154.

150. Harris H., Miller O.J., Klein G., Worst P., Tachibana T.: Suppression of malignancy by cell fusion. *Nature* 1969, 223, 5204, 363-368.
151. Harris S.L., Levine A.J.: The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene* 2005, 24, 17, 2899-2908.
152. Hart K.C., Robertson S.C., Kanemitsu M.Y., Meyer A.N., Tynan J.A., Donoghue D.J.: Transformation and Stat activation by derivatives of FGFR1, FGFR3, and FGFR4. *Oncogene* 2000, 19, 29, 3309-3320.
153. Hartmann A., Schlake G., Zaak D., Hungerhuber E., Hofstetter A., Hofstaedter F., Knuechel R.: Occurrence of chromosome 9 and p53 alterations in multifocal dysplasia and carcinoma in situ of human urinary bladder. *Cancer Res.* 2002, 62, 3, 809-818.
154. Hasui Y., Marutsuka K., Asada Y., Osada Y.: Prognostic value of urokinase-type plasminogen activator in patients with superficial bladder cancer. *Urology* 1996, 47, 1, 34-37.
155. Hasui Y., Marutsuka K., Suzumiya J., Kitada S., Osada Y., Sumiyoshi A.: The content of urokinase-type plasminogen activator antigen as a prognostic factor in urinary bladder cancer. *Int.J.Cancer* 1992, 50, 6, 871-873.
156. Hay N., Sonenberg N.: Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev.* 2004, 18, 16, 1926-1945.
157. Hein D.W., Doll M.A., Fretland A.J., Leff M.A., Webb S.J., Xiao G.H., Devanaboyina U.S., Nangju N.A., Feng Y.: Molecular genetics and epidemiology of the NAT1 and NAT2 acetylation polymorphisms. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 2000, 9, 1, 29-42.
158. Heney N.M., Ahmed S., Flanagan M.J., Frable W., Corder M.P., Hafermann M.D., Hawkins I.R.: Superficial bladder cancer: progression and recurrence. *J.Urol.* 1983, 130, 6, 1083-1086.
159. Herman J.G., Graff J.R., Myohanen S., Nelkin B.D., Baylin S.B.: Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1996, 93, 18, 9821-9826.
160. Herman J.G., Umar A., Polyak K., Graff J.R., Ahuja N., Issa J.P., Markowitz S., Willson J.K., Hamilton S.R., Kinzler K.W., Kane M.F., Kolodner R.D., Vogelstein B., Kunkel T.A., Baylin S.B.: Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1998, 95, 12, 6870-6875.
161. Herr H.W., Badalament R.A., Amato D.A., Laudone V.P., Fair W.R., Whitmore W.F., Jr.: Superficial bladder cancer treated with bacillus Calmette-Guerin: a multivariate analysis of factors affecting tumor progression. *J.Urol.* 1989, 141, 1, 22-29.
162. Herr H.W., Bajorin D.F., Scher H.I.: Neoadjuvant chemotherapy and bladder-sparing surgery for invasive bladder cancer: ten-year outcome. *J.Clin.Oncol.* 1998, 16, 4, 1298-1301.

163. Higashi N., Kunimoto H., Kaneko S., Sasaki T., Ishii M., Kojima H., Nakajima K.: Cytoplasmic c-Fos induced by the YXXQ-derived STAT3 signal requires the co-operative MEK/ERK signal for its nuclear translocation. *Genes Cells* 2004, 9, 3, 233-242.
164. Hirose Y., Berger M.S., Pieper R.O.: p53 effects both the duration of G2/M arrest and the fate of temozolomide-treated human glioblastoma cells. *Cancer Res.* 2001, 61, 5, 1957-1963.
165. Hiyama K., Hirai Y., Kyoizumi S., Akiyama M., Hiyama E., Piatyszek M.A., Shay J.W., Ishioka S., Yamakido M.: Activation of telomerase in human lymphocytes and hematopoietic progenitor cells. *J.Immunol.* 1995, 155, 8, 3711-3715.
166. Hoffman C.S., Winston F.: A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* 1987, 57, 2-3, 267-272.
167. Hollstein M., Sidransky D., Vogelstein B., Harris C.C.: p53 mutations in human cancers. *Science* 1991, 253, 5015, 49-53.
168. Hopman A.H., Moesker O., Smeets A.W., Pauwels R.P., Vooijs G.P., Ramaekers F.C.: Numerical chromosome 1, 7, 9, and 11 aberrations in bladder cancer detected by in situ hybridization. *Cancer Res.* 1991, 51, 2, 644-651.
169. Hoque M.O., Begum S., Topaloglu O., Chatterjee A., Rosenbaum E., Van Criekinge W., Westra W.H., Schoenberg M., Zahurak M., Godman S.N., Sidransky D.: Quantitation of promoter methylation of multiple genes in urine DNA and bladder cancer detection. *J.Natl.Cancer Inst.* 2006, 98, 14, 996-1004.
170. Hornigold N., Devlin J., Davies A.M., Aveyard J.S., Habuchi T., Knowles M.A.: Mutation of the 9q34 gene TSC1 in sporadic bladder cancer. *Oncogene* 1999, 18, 16, 2657-2661.
171. Hung R.J., Boffetta P., Brennan P., Malaveille C., Hautefeuille A., Donato F., Gelatti U., Spaliviero M., Placidi D., Carta A., Scotto d.C., Porru S.: GST, NAT, SULT1A1, CYP1B1 genetic polymorphisms, interactions with environmental exposures and bladder cancer risk in a high-risk population. *Int.J.Cancer* 2004, 110, 4, 598-604.
172. IARC (1987). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Overall Evaluations of Carcinogenicity: An Updating of IARC Monographs . Volumes 1 to 42. Supplement 7, IARC, Lyon. 1987.
173. Iguchi-Ariga S.M., Schaffner W.: CpG methylation of the cAMP-responsive enhancer/promoter sequence TGACGTCA abolishes specific factor binding as well as transcriptional activation. *Genes Dev.* 1989, 3, 5, 612-619.
174. Ihle J.N.: The Stat family in cytokine signaling. *Curr.Opin.Cell Biol.* 2001, 13, 2, 211-217.

175. Iliopoulos D., Guler G., Han S.Y., Johnston D., Druck T., McCorkell K.A., Palazzo J., McCue P.A., Baffa R., Huebner K.: Fragile genes as biomarkers: epigenetic control of WWOX and FHIT in lung, breast and bladder cancer. *Oncogene* 2005, 24, 9, 1625-1633.
176. Inoue K., Perrotte P., Wood C.G., Slaton J.W., Sweeney P., Dinney C.P.: Gene therapy of human bladder cancer with adenovirus-mediated antisense basic fibroblast growth factor. *Clin.Cancer Res.* 2000, 6, 11, 4422-4431.
177. Iorio M.V., Ferracin M., Liu C.G., Veronese A., Spizzo R., Sabbioni S., Magri E., Pedriali M., Fabbri M., Campiglio M., Menard S., Palazzo J.P., Rosenberg A., Musiani P., Volinia S., Nenci I., Calin G.A., Querzoli P., Negrini M., Croce C.M.: MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res.* 2005, 65, 16, 7065-7070.
178. Ishioka C., Frebourg T., Yan Y.X., Vidal M., Friend S.H., Schmidt S., Iggo R.: Screening patients for heterozygous p53 mutations using a functional assay in yeast. *Nat.Genet.* 1993, 5, 2, 124-129.
179. Itoh M., Murata T., Suzuki T., Shindoh M., Nakajima K., Imai K., Yoshida K.: Requirement of STAT3 activation for maximal collagenase-1 (MMP-1) induction by epidermal growth factor and malignant characteristics in T24 bladder cancer cells. *Oncogene* 2006, 25, 8, 1195-1204.
180. J.Ferlay, F. Bray P. Pisani and D. M. Parkin. GLOBOCAN 2002 Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide; IARC Cancer-Base No. 5, version 2.0; IARCPress, Lyon, 2004.
181. Jaenisch R.: DNA methylation and imprinting: why bother? *Trends Genet.* 1997, 13, 8, 323-329.
182. Jenuwein T., Allis C.D.: Translating the histone code. *Science* 2001, 293, 5532, 1074-1080.
183. Jin S., Levine A.J.: The p53 functional circuit. *J.Cell Sci.* 2001, 114, Pt 23, 4139-4140.
184. Jones J.S.: DNA-based molecular cytology for bladder cancer surveillance. *Urology* 2006, 67, 3 Suppl 1, 35-45.
185. Jones P.A., Laird P.W.: Cancer epigenetics comes of age. *Nat.Genet.* 1999, 21, 2, 163-167.
186. Jones P.L., Veenstra G.J., Wade P.A., Vermaak D., Kass S.U., Landsberger N., Strouboulis J., Wolffe A.P.: Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat.Genet.* 1998, 19, 2, 187-191.
187. Jones R.G., Plas D.R., Kubek S., Buzzai M., Mu J., Xu Y., Birnbaum M.J., Thompson C.B.: AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. *Mol.Cell.* 2005, 18, 3, 283-293.

188. Jones S.N., Roe A.E., Donehower L.A., Bradley A.: Rescue of embryonic lethality in Mdm2-deficient mice by absence of p53. *Nature* 1995, 378, 6553, 206-208.
189. Juttermann R., Li E., Jaenisch R.: Toxicity of 5-aza-2'-deoxycytidine to mammalian cells is mediated primarily by covalent trapping of DNA methyltransferase rather than DNA demethylation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1994, 91, 25, 11797-11801.
190. Kamai T., Takagi K., Asami H., Ito Y., Oshima H., Yoshida K.I.: Decreasing of p27(Kip1) and cyclin E protein levels is associated with progression from superficial into invasive bladder cancer. *Br.J.Cancer* 2001, 84, 9, 1242-1251.
191. Kanayama H.: Matrix metalloproteinases and bladder cancer. *J.Med.Invest* 2001, 48, 1-2, 31-43.
192. Karam J.A., Fan J., Stanfield J., Richer E., Benaim E.A., Frenkel E., Antich P., Sagalowsky A.I., Mason R.P., Hsieh J.T.: The use of histone deacetylase inhibitor FK228 and DNA hypomethylation agent 5-azacytidine in human bladder cancer therapy. *Int.J.Cancer* 2007, 120, 8, 1795-1802.
193. Kawamoto K., Enokida H., Gotanda T., Kubo H., Nishiyama K., Kawahara M., Nakagawa M.: p16INK4a and p14ARF methylation as a potential biomarker for human bladder cancer. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 2006, 339, 3, 790-796.
194. Kendall S.D., Linardic C.M., Adam S.J., Counter C.M.: A network of genetic events sufficient to convert normal human cells to a tumorigenic state. *Cancer Res.* 2005, 65, 21, 9824-9828.
195. Kern S.E., Kinzler K.W., Bruskin A., Jarosz D., Friedman P., Prives C., Vogelstein B.: Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein. *Science* 1991, 252, 5013, 1708-1711.
196. Kim N.W., Piatyszek M.A., Prowse K.R., Harley C.B., West M.D., Ho P.L., Coviello G.M., Wright W.E., Weinrich S.L., Shay J.W.: Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994, 266, 5193, 2011-2015.
197. Kimura F., Florl A.R., Seifert H.H., Louhelainen J., Maas S., Knowles M.A., Schulz W.A.: Destabilization of chromosome 9 in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Br.J.Cancer.* 2001, 85, 12, 1887-1893.
198. Knowles M.A.: The genetics of transitional cell carcinoma: progress and potential clinical application. *BJU.Int.* 1999, 84, 4, 412-427.
199. Knowles M.A.: Molecular subtypes of bladder cancer: Jekyll and Hyde or chalk and cheese? *Carcinogenesis* 2006, 27, 3, 361-373.
200. Knowles M.A.: Molecular pathogenesis of bladder cancer. *Int.J.Clin.Oncol.* 2008, 13, 4, 287-297.

201. Knowles M.A., Elder P.A., Williamson M., Cairns J.P., Shaw M.E., Law M.G.: Allelotype of human bladder cancer. *Cancer Res.* 1994, 54, 2, 531-538.
202. Knowles M.A., 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, 22, 7652-7656.
203. Knowles M.A., Williamson M.: Mutation of H-ras is infrequent in bladder cancer: confirmation by single-strand conformation polymorphism analysis, designed restriction fragment length polymorphisms, and direct sequencing. *Cancer Res.* 1993, 53, 1, 133-139.
204. Kononen J., Bubendorf L., Kallioniemi A., Barlund M., Schraml P., Leighton S., Torhorst J., Mihatsch M.J., Sauter G., Kallioniemi O.P.: Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat.Med.* 1998, 4, 7, 844-847.
205. Koop S., Khokha R., Schmidt E.E., MacDonald I.C., Morris V.L., Chambers A.F., Groom A.C.: Overexpression of metalloproteinase inhibitor in B16F10 cells does not affect extravasation but reduces tumor growth. *Cancer Res.* 1994, 54, 17, 4791-4797.
206. Korkolopoulou P., Christodoulou P., Kapralos P., Exarchakos M., Bisbiroula A., Hadjiyannakis M., Georgountzos C., Thomas-Tsagli E.: The role of p53, MDM2 and c-erb B-2 oncoproteins, epidermal growth factor receptor and proliferation markers in the prognosis of urinary bladder cancer. *Pathol.Res.Pract.* 1997, 193, 11-12, 767-775.
207. Korkolopoulou P., Christodoulou P., Konstantinidou A.E., Thomas-Tsagli E., Kapralos P., Davaris P.: Cell cycle regulators in bladder cancer: a multivariate survival study with emphasis on p27Kip1. *Hum.Pathol.* 2000, 31, 6, 751-760.
208. Kornberg R.D., Lorch Y.: Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell* 1999, 98, 3, 285-294.
209. Kotake T., Saiki S., Kinouchi T., Shiku H., Nakayama E.: Detection of the c-myc gene product in urinary bladder cancer. *Jpn.J.Cancer Res.* 1990, 81, 12, 1198-1201.
210. Kraemer K., Fuessel S., Schmidt U., Kotzsch M., Schwenzer B., Wirth M.P., Meyer A.: Antisense-mediated hTERT inhibition specifically reduces the growth of human bladder cancer cells. *Clin.Cancer Res.* 2003, 9, 10 Pt 1, 3794-3800.
211. Kruger S., Mahnken A., Kausch I., Feller A.C.: P16 immunoreactivity is an independent predictor of tumor progression in minimally invasive urothelial bladder carcinoma. *Eur.Urol.* 2005, 47, 4, 463-467.

-
212. Labrecque S., Naor N., Thomson D., Matlashewski G.: Analysis of the anti-p53 antibody response in cancer patients. *Cancer Res.* 1993, 53, 15, 3468-3471.
 213. Lachner M., Jenuwein T.: The many faces of histone lysine methylation. *Curr.Opin.Cell Biol.* 2002, 14, 3, 286-298.
 214. Lachner M., O'Carroll D., Rea S., Mechtler K., Jenuwein T.: Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* 2001, 410, 6824, 116-120.
 215. Laird P.W., Jackson-Grusby L., Fazeli A., Dickinson S.L., Jung W.E., Li E., Weinberg R.A., Jaenisch R.: Suppression of intestinal neoplasia by DNA hypomethylation. *Cell* 1995, 81, 2, 197-205.
 216. Laird P.W., Jaenisch R.: DNA methylation and cancer. *Hum.Mol.Genet.* 1994, 3 Spec No, 1487-1495.
 217. Lamm D.L.: Long-term results of intravesical therapy for superficial bladder cancer. *Urol.Clin.North Am.* 1992, 19, 3, 573-580.
 218. Leaman D.W., Leung S., Li X., Stark G.R.: Regulation of STAT-dependent pathways by growth factors and cytokines. *FASEB J.* 1996, 10, 14, 1578-1588.
 219. Lee C.C., Yamamoto S., Morimura K., Wanibuchi H., Nishisaka N., Ikemoto S., Nakatani T., Wada S., Kishimoto T., Fukushima S.: Significance of cyclin D1 overexpression in transitional cell carcinomas of the urinary bladder and its correlation with histopathologic features. *Cancer* 1997, 79, 4, 780-789.
 220. Lee M.G., Kim H.Y., Byun D.S., Lee S.J., Lee C.H., Kim J.I., Chang S.G., Chi S.G.: Frequent epigenetic inactivation of RASSF1A in human bladder carcinoma. *Cancer Res.* 2001, 61, 18, 6688-6692.
 221. Leib-Mosch C., Haltmeier M., Werner T., Geigl E.M., Brack-Werner R., Francke U., Erfle V., Hehlmann R.: Genomic distribution and transcription of solitary HERV-K LTRs. *Genomics* 1993, 18, 2, 261-269.
 222. Lengauer C., Kinzler K.W., Vogelstein B.: Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 1998, 396, 6712, 643-649.
 223. Levine A.J.: p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997, 88, 3, 323-331.
 224. Levine A.J., Momand J., Finlay C.A.: The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 1991, 351, 6326, 453-456.
 225. Li B., Kanamaru H., Noriki S., Yamaguchi T., Fukuda M., Okada K.: Reciprocal expression of bcl-2 and p53 oncoproteins in urothelial dysplasia and carcinoma of the urinary bladder. *Urol.Res.* 1998, 26, 4, 235-241.
 226. Li E., Bestor T.H., Jaenisch R.: Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 1992, 69, 6, 915-926.

227. Li M., Gu F.L., Li W.B., Song Y.S., Zhou A.R., Guo Y.L.: Introduction of wild-type p53 gene downregulates the expression of H-ras gene and suppresses the growth of bladder cancer cells. *Urol.Res.* 1995, 23, 5, 311-314.
228. Lianes P., Orlow I., Zhang Z.F., Oliva M.R., Sarkis A.S., Reuter V.E., Cordon-Cardo C.: Altered patterns of MDM2 and TP53 expression in human bladder cancer. *J.Natl.Cancer Inst.* 1994, 86, 17, 1325-1330.
229. Liebert M., Washington R., Stein J., Wedemeyer G., Grossman H.B.: Expression of the VLA beta 1 integrin family in bladder cancer. *Am.J.Pathol.* 1994, 144, 5, 1016-1022.
230. Lin T., Dong W., Huang J., Pan Q., Fan X., Zhang C., Huang L.: MicroRNA-143 as a tumor suppressor for bladder cancer. *J.Urol.* 2009, 181, 3, 1372-1380.
231. Lin X., Howell S.B.: DNA mismatch repair and p53 function are major determinants of the rate of development of cisplatin resistance. *Mol.Cancer Ther.* 2006, 5, 5, 1239-1247.
232. Lindblom A., Tannergard P., Werelius B., Nordenskjold M.: Genetic mapping of a second locus predisposing to hereditary non-polyposis colon cancer. *Nat.Genet.* 1993, 5, 3, 279-282.
233. Lipponen P., Aaltoma S., Kosma V.M., Ala-Opas M., Eskelinen M.: Expression of CD44 standard and variant-v6 proteins in transitional cell bladder tumours and their relation to prognosis during a long-term follow-up. *J.Pathol.* 1998, 186, 2, 157-164.
234. Lipponen P., Eskelinen M.: Expression of epidermal growth factor receptor in bladder cancer as related to established prognostic factors, oncoprotein (c-erbB-2, p53) expression and long-term prognosis. *Br.J.Cancer* 1994, 69, 6, 1120-1125.
235. Lipponen P.K.: Over-expression of p53 nuclear oncoprotein in transitional-cell bladder cancer and its prognostic value. *Int.J.Cancer* 1993, 53, 3, 365-370.
236. Lipponen P.K.: Expression of c-myc protein is related to cell proliferation and expression of growth factor receptors in transitional cell bladder cancer. *J.Pathol.* 1995, 175, 2, 203-210.
237. Lipponen P.K., Eskelinen M.J.: Reduced expression of E-cadherin is related to invasive disease and frequent recurrence in bladder cancer. *J.Cancer Res.Clin.Oncol.* 1995, 121, 5, 303-308.
238. Llopis J., Alcaraz A., Ribal M.J., Sole M., Ventura P.J., Barranco M.A., Rodriguez A., Corral J.M., Carretero P.: p53 expression predicts progression and poor survival in T1 bladder tumours. *Eur.Urol.* 2000, 37, 6, 644-653.
239. Loeb L.A.: Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer Res.* 1991, 51, 12, 3075-3079.

-
240. Loeb L.A., Loeb K.R., Anderson J.P.: Multiple mutations and cancer. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2003, 100, 3, 776-781.
 241. Logothetis C.J., Xu H.J., Ro J.Y., Hu S.X., Sahin A., Ordonez N., Benedict W.F.: Altered expression of retinoblastoma protein and known prognostic variables in locally advanced bladder cancer. *J.Natl.Cancer Inst.* 1992, 84, 16, 1256-1261.
 242. Lotan Y., Roehrborn C.G.: Sensitivity and specificity of commonly available bladder tumor markers versus cytology: results of a comprehensive literature review and meta-analyses. *Urology* 2003, 61, 1, 109-118.
 243. Lothe R.A.: Microsatellite instability in human solid tumors. *Mol.Med.Today* 1997, 3, 2, 61-68.
 244. Lowe S.W., Sherr C.J.: Tumor suppression by Ink4a-Arf: progress and puzzles. *Curr.Opin.Genet.Dev.* 2003, 13, 1, 77-83.
 245. Lubin R., Zalcman G., Bouchet L., Tredanel J., Legros Y., Cazals D., Hirsch A., Soussi T.: Serum p53 antibodies as early markers of lung cancer. *Nat.Med.* 1995, 1, 7, 701-702.
 246. MacLeod A.R., Szyf M.: Expression of antisense to DNA methyltransferase mRNA induces DNA demethylation and inhibits tumorigenesis. *J.Biol.Chem.* 1995, 270, 14, 8037-8043.
 247. Maheswaran S., Englert C., Bennett P., Heinrich G., Haber D.A.: The WT1 gene product stabilizes p53 and inhibits p53-mediated apoptosis. *Genes Dev.* 1995, 9, 17, 2143-2156.
 248. Mahlknecht U., Hoelzer D.: Histone acetylation modifiers in the pathogenesis of malignant disease. *Mol.Med.* 2000, 6, 8, 623-644.
 249. Mak J.: RNA interference: more than a research tool in the vertebrates' adaptive immunity. *Retrovirology.* 2005, 2, 1, 35.
 250. Malmstrom P.U., Busch C., Norlen B.J.: Deletion of ABH blood group isoantigen and prognosis in patients with transitional cell bladder carcinoma. *Scand.J.Urol.Nephrol.Suppl* 1988, 110, 205-211.
 251. Mao L., Schoenberg M.P., Scicchitano M., Erozan Y.S., Merlo A., Schwab D., Sidransky D.: Molecular detection of primary bladder cancer by microsatellite analysis. *Science* 1996, 271, 5249, 659-662.
 252. Maquat L.E.: Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 2004, 5, 2, 89-99.
 253. Marin M.C., Jost C.A., Brooks L.A., Irwin M.S., O'Nions J., Tidy J.A., James N., McGregor J.M., Harwood C.A., Yulug I.G., Vousden K.H., Allday M.J., Gusterson B., Ikawa S., Hinds P.W., Crook T., Kaelin W.G., Jr.: A common polymorphism acts as an intragenic modifier of mutant p53 behaviour. *Nat.Genet.* 2000, 25, 1, 47-54.
 254. Marks P.A., Richon V.M., Miller T., Kelly W.K.: Histone deacetylase inhibitors. *Adv.Cancer Res.* 2004, 91, 137-168.

255. Martin A.C., Facchiano A.M., Cuff A.L., Hernandez-Boussard T., Olivier M., Hainaut P., Thornton J.M.: Integrating mutation data and structural analysis of the TP53 tumor-suppressor protein. *Hum.Mutat.* 2002, 19, 2, 149-164.
256. Maruyama R., Sugio K., Yoshino I., Maehara Y., Gazdar A.F.: Hypermethylation of FHIT as a prognostic marker in nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* 2004, 100, 7, 1472-1477.
257. Maruyama R., Toyooka S., Toyooka K.O., Harada K., Virmani A.K., Zochbauer-Muller S., Farinas A.J., Vakar-Lopez F., Minna J.D., Sgallowsky A., Czerniak B., Gazdar A.F.: Aberrant promoter methylation profile of bladder cancer and its relationship to clinicopathological features. *Cancer Res.* 2001, 61, 24, 8659-8663.
258. Mayo L.D., Donner D.B.: A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2001, 98, 20, 11598-11603.
259. Mayo L.D., Donner D.B.: The PTEN, Mdm2, p53 tumor suppressor-oncoprotein network. *Trends Biochem.Sci.* 2002, 27, 9, 462-467.
260. Mayo L.D., Turchi J.J., Berberich S.J.: Mdm-2 phosphorylation by DNA-dependent protein kinase prevents interaction with p53. *Cancer Res.* 1997, 57, 22, 5013-5016.
261. McGarvey T.W., Kariko K., Barnathan E.S., Thomas J., Malkowicz S.B.: The expression of urokinase-related genes in superficial and invasive transitional cell carcinoma. *Int.J.Oncol.* 1998, 12, 1, 175-180.
262. McGarvey T.W., Maruta Y., Tomaszewski J.E., Linnenbach A.J., Malkowicz S.B.: PTCH gene mutations in invasive transitional cell carcinoma of the bladder. *Oncogene* 1998, 17, 9, 1167-1172.
263. Meek D.W.: Multisite phosphorylation and the integration of stress signals at p53. *Cell Signal.* 1998, 10, 3, 159-166.
264. Mellon J.K., Lunec J., Wright C., Horne C.H., Kelly P., Neal D.E.: C-erbB-2 in bladder cancer: molecular biology, correlation with epidermal growth factor receptors and prognostic value. *J.Urol.* 1996, 155, 1, 321-326.
265. Mellon K., Wright C., Kelly P., Horne C.H., Neal D.E.: Long-term outcome related to epidermal growth factor receptor status in bladder cancer. *J.Urol.* 1995, 153, 3 Pt 2, 919-925.
266. Messing E.M.: Clinical implications of the expression of epidermal growth factor receptors in human transitional cell carcinoma. *Cancer Res.* 1990, 50, 8, 2530-2537.
267. Messing E.M.: Growth factors and bladder cancer: clinical implications of the interactions between growth factors and their urothelial receptors. *Semin.Surg.Oncol.* 1992, 8, 5, 285-292.
268. Migaldi M., Sgambato A., Garagnani L., Ardito R., Ferrari P., De Gaetani C., Cittadini A., Trentini G.P.: Loss of p21Waf1 expression is

- a strong predictor of reduced survival in primary superficial bladder cancers. *Clin.Cancer Res.* 2000, 6, 8, 3131-3138.
269. Miyake H., Eto H., Arakawa S., Kamidono S., Hara I.: Over expression of CD44V8-10 in urinary exfoliated cells as an independent prognostic predictor in patients with urothelial cancer. *J.Urol.* 2002, 167, 3, 1282-1287.
270. Miyake H., Hara I., Gohji K., Yoshimura K., Arakawa S., Kamidono S.: Expression of basic fibroblast growth factor is associated with resistance to cisplatin in a human bladder cancer cell line. *Cancer Lett.* 1998, 123, 2, 121-126.
271. Miyake H., Hara I., Yamanaka K., Gohji K., Arakawa S., Kamidono S.: Overexpression of Bcl-2 enhances metastatic potential of human bladder cancer cells. *Br.J.Cancer* 1999, 79, 11-12, 1651-1656.
272. Miyake H., Yamanaka K., Muramaki M., Hara I., Gleave M.E.: Therapeutic efficacy of adenoviral-mediated p53 gene transfer is synergistically enhanced by combined use of antisense oligodeoxynucleotide targeting clusterin gene in a human bladder cancer model. *Neoplasia.* 2005, 7, 2, 171-179.
273. Miyamoto H., Kubota Y., Noguchi S., Takase K., Matsuzaki J., Moriyama M., Takebayashi S., Kitamura H., Hosaka M.: C-ERBB-2 gene amplification as a prognostic marker in human bladder cancer. *Urology* 2000, 55, 5, 679-683.
274. Miyamoto H., Shuin T., Ikeda I., Hosaka M., Kubota Y.: Loss of heterozygosity at the p53, RB, DCC and APC tumor suppressor gene loci in human bladder cancer. *J.Urol.* 1996, 155, 4, 1444-1447.
275. Miyamoto H., Shuin T., Torigoe S., Iwasaki Y., Kubota Y.: Retinoblastoma gene mutations in primary human bladder cancer. *Br.J.Cancer* 1995, 71, 4, 831-835.
276. Mizutani Y., Yoshida O., Bonavida B.: Prognostic significance of soluble Fas in the serum of patients with bladder cancer. *J.Urol.* 1998, 160, 2, 571-576.
277. Monier F., Mollier S., Guillot M., Rambeaud J.J., Morel F., Zaoui P.: Urinary release of 72 and 92 kDa gelatinases, TIMPs, N-GAL and conventional prognostic factors in urothelial carcinomas. *Eur.Urol.* 2002, 42, 4, 356-363.
278. Moore L.E., Pfeiffer R.M., Poscablo C., Real F.X., Kogevinas M., Silverman D., Garcia-Closas R., Chanock S., Tardon A., Serra C., Carrato A., Dosemeci M., Garcia-Closas M., Esteller M., Fraga M., Rothman N., Malats N.: Genomic DNA hypomethylation as a biomarker for bladder cancer susceptibility in the Spanish Bladder Cancer Study: a case-control study. *Lancet Oncol.* 2008, 9, 4, 359-366.
279. Morita T., Tachikawa N., Kumamaru T., Nukui A., Ikeda H., Suzuki K., Tokue A.: Serum anti-p53 antibodies and p53 protein status in the

- sera and tumors from bladder cancer patients. *Eur.Urol.* 2000, 37, 1, 79-84.
280. Muhlrads D., Parker R.: Recognition of yeast mRNAs as "nonsense containing" leads to both inhibition of mRNA translation and mRNA degradation: implications for the control of mRNA decapping. *Mol.Biol.Cell* 1999, 10, 11, 3971-3978.
281. Muller M.: Telomerase: its clinical relevance in the diagnosis of bladder cancer. *Oncogene* 2002, 21, 4, 650-655.
282. Muller M., Meyer M., Schilling T., Ulsperger E., Lehnert T., Zentgraf H., Stremmel W., Volkmann M., Galle P.R.: Testing for anti-p53 antibodies increases the diagnostic sensitivity of conventional tumor markers. *Int.J.Oncol.* 2006, 29, 4, 973-980.
283. Munro N.P., Cairns D.A., Clarke P., Rogers M., Stanley A.J., Barrett J.H., Harnden P., Thompson D., Eardley I., Banks R.E., Knowles M.A.: Urinary biomarker profiling in transitional cell carcinoma. *Int.J.Cancer* 2006. 119, 11, 575-584.
284. Nakagawa T., Kanai Y., Ushijima S., Kitamura T., Kakizoe T., Hirohashi S.: DNA hypermethylation on multiple CpG islands associated with increased DNA methyltransferase DNMT1 protein expression during multistage urothelial carcinogenesis. *J.Urol.* 2005, 173, 5, 1767-1771.
285. Nakamura M., Watanabe T., Yonekawa Y., Kleihues P., Ohgaki H.: Promoter methylation of the DNA repair gene MGMT in astrocytomas is frequently associated with G:C --> A:T mutations of the TP53 tumor suppressor gene. *Carcinogenesis* 2001, 22, 10, 1715-1719.
286. Nakopoulou L., Gakiopoulou H., Zervas A., Giannopoulou I., Constantinides C., Lazaris A.C., Liapis H., Kyriakou G., Dimopoulos C.: MMP-3 mRNA and MMP-3 and MMP-1 proteins in bladder cancer: a comparison with clinicopathologic features and survival. *Appl.Immunohistochem.Mol.Morphol.* 2001, 9, 2, 130-137.
287. Nan X., Meehan R.R., Bird A.: Dissection of the methyl-CpG binding domain from the chromosomal protein MeCP2. *Nucleic Acids Res.* 1993, 21, 21, 4886-4892.
288. Naot D., Sionov R.V., Ish-Shalom D.: CD44: structure, function, and association with the malignant process. *Adv.Cancer Res.* 1997, 71, 241-319.
289. Narayan A., Ji W., Zhang X.Y., Marrogi A., Graff J.R., Baylin S.B., Ehrlich M.: Hypomethylation of pericentromeric DNA in breast adenocarcinomas. *Int.J.Cancer* 1998, 77, 6, 833-838.
290. Neal D.E., Marsh C., Bennett M.K., Abel P.D., Hall R.R., Sainsbury J.R., Harris A.L.: Epidermal-growth-factor receptors in human bladder cancer: comparison of invasive and superficial tumours. *Lancet* 1985, 1, 8425, 366-368.

291. Neal D.E., Mellon K.: Epidermal growth factor receptor and bladder cancer: a review. *Urol.Int.* 1992, 48, 4, 365-371.
292. Neal D.E., Sharples L., Smith K., Fennelly J., Hall R.R., Harris A.L.: The epidermal growth factor receptor and the prognosis of bladder cancer. *Cancer* 1990, 65, 7, 1619-1625.
293. Neuhausen A., Florl A.R., Grimm M.O., Schulz W.A.: DNA methylation alterations in urothelial carcinoma. *Cancer Biol.Ther.* 2006, 5, 8, 993-1001.
294. Newman A.J., Jr., Carlton C.E., Jr., Johnson S.: Cell surface A, B, or O(H) blood group antigens as an indicator of malignant potential in stage A bladder carcinoma. *J.Urol.* 1980, 124, 1, 27-29.
295. Nguyen M., Watanabe H., Budson A.E., Richie J.P., Folkman J.: Elevated levels of the angiogenic peptide basic fibroblast growth factor in urine of bladder cancer patients. *J.Natl.Cancer Inst.* 1993, 85, 3, 241-242.
296. Nishikura K.: A short primer on RNAi: RNA-directed RNA polymerase acts as a key catalyst. *Cell* 2001, 107, 4, 415-418.
297. O'Brien T., Cranston D., Fuggle S., Bicknell R., Harris A.L.: Different angiogenic pathways characterize superficial and invasive bladder cancer. *Cancer Res.* 1995, 55, 3, 510-513.
298. O'Brien T., Cranston D., Fuggle S., Bicknell R., Harris A.L.: Two mechanisms of basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis in bladder cancer. *Cancer Res.* 1997, 57, 1, 136-140.
299. O'Brien T.S., Fox S.B., Dickinson A.J., Turley H., Westwood M., Moghaddam A., Gatter K.C., Bicknell R., Harris A.L.: Expression of the angiogenic factor thymidine phosphorylase/platelet-derived endothelial cell growth factor in primary bladder cancers. *Cancer Res.* 1996, 56, 20, 4799-4804.
300. Oda S., Oki E., Maehara Y., Sugimachi K.: Precise assessment of microsatellite instability using high resolution fluorescent microsatellite analysis. *Nucleic Acids Res.* 1997, 25, 17, 3415-3420.
301. Oeggerli M., Schraml P., Ruiz C., Bloch M., Novotny H., Mirlacher M., Sauter G., Simon R.: E2F3 is the main target gene of the 6p22 amplicon with high specificity for human bladder cancer. *Oncogene* 2006, 25, 49, 6538-6543.
302. Oeggerli M., Tomovska S., Schraml P., Calvano-Forte D., Schafroth S., Simon R., Gasser T., Mihatsch M.J., Sauter G.: E2F3 amplification and overexpression is associated with invasive tumor growth and rapid tumor cell proliferation in urinary bladder cancer. *Oncogene* 2004, 23, 33, 5616-5623.
303. Ogishima T., Shiina H., Breault J.E., Terashima M., Honda S., Enoki-da H., Urakami S., Tokizane T., Kawakami T., Ribeiro-Filho L.A., Fujime M., Kane C.J., Carroll P.R., Igawa M., Dahiya R.: Promoter

- CpG hypomethylation and transcription factor EGR1 hyperactivate heparanase expression in bladder cancer. *Oncogene*. 2005, 24, 45, 6765-6772.
304. Okano M., Bell D.W., Haber D.A., Li E.: DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 1999, 99, 3, 247-257.
305. Olivier M., Eeles R., Hollstein M., Khan M.A., Harris C.C., Hainaut P.: The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users. *Hum.Mutat.* 2002, 19, 6, 607-614.
306. Olumi A.F., Tsai Y.C., Nichols P.W., Skinner D.G., Cain D.R., Bender L.I., Jones P.A.: Allelic loss of chromosome 17p distinguishes high grade from low grade transitional cell carcinomas of the bladder. *Cancer Res.* 1990, 50, 21, 7081-7083.
307. Ornitz D.M., Itoh N.: Fibroblast growth factors. *Genome Biol.* 2001, 2, 3, Reviews 3005.1
308. Otto T., Birchmeier W., Schmidt U., Hinke A., Schipper J., Rubben H., Raz A.: Inverse relation of E-cadherin and autocrine motility factor receptor expression as a prognostic factor in patients with bladder carcinomas. *Cancer Res.* 1994, 54, 12, 3120-3123.
309. Paiss T., Wöhr G., Hautmann R.E., Mattfeldt T., Müller M., Haeussler J., Vogel W.: Some tumors of the bladder are polyclonal in origin. *J.Urol.* 2002, 167, 2 Pt 1, 718-723.
310. Palit V., Phillips R.M., Puri R., Shah T., Bibby M.C.: Expression of HIF-1 α and Glut-1 in human bladder cancer. *Oncol.Rep.* 2005, 14, 4, 909-913.
311. Parsons R., Li G.M., Longley M.J., Fang W.H., Papadopoulos N., Jen J., De La C.A., Kinzler K.W., Vogelstein B., Modrich P.: Hypermutability and mismatch repair deficiency in RER+ tumor cells. *Cell* 1993, 75, 6, 1227-1236.
312. Pfister C., Larue H., Moore L., Lacombe L., Veilleux C., Tetu B., Meyer F., Fradet Y.: Tumorigenic pathways in low-stage bladder cancer based on p53, MDM2 and p21 phenotypes. *Int.J.Cancer* 2000, 89, 1, 100-104.
313. Pollack A., Wu C.S., Czerniak B., Zagars G.K., Benedict W.F., McDonnell T.J.: Abnormal bcl-2 and pRb expression are independent correlates of radiation response in muscle-invasive bladder cancer. *Clin Cancer Res.* 1997, 3, 10, 1823-1829.
314. Potocnik U., Glavac D., Golouh R., Ravnik-Glavac M.: Causes of microsatellite instability in colorectal tumors: implications for hereditary non-polyposis colorectal cancer screening. *Cancer Genet.Cytogenet.* 2001, 126, 2, 85-96.

315. Pouyssegur J., Dayan F., Mazure N.M.: Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature* 2006, 441, 7092, 437-443.
316. Pradhan S., Bacolla A., Wells R.D., Roberts R.J.: Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. I. Expression, purification, and comparison of de novo and maintenance methylation. *J.Biol.Chem* 1999, 274, 46, 33002-33010.
317. Prescott J.L., Montie J., Pugh T.W., McHugh T., Veltri R.W.: Clinical sensitivity of p53 mutation detection in matched bladder tumor, bladder wash, and voided urine specimens. *Cancer* 2001, 91, 11, 2127-2135.
318. Presti J.C., Jr., Reuter V.E., Galan T., Fair W.R., Cordon-Cardo C.: Molecular genetic alterations in superficial and locally advanced human bladder cancer. *Cancer Res.* 1991, 51, 19, 5405-5409.
319. Qu G., Dubeau L., Narayan A., Yu M.C., Ehrlich M.: Satellite DNA hypomethylation vs. overall genomic hypomethylation in ovarian epithelial tumors of different malignant potential. *Mutat.Res.* 1999, 423, 1-2, 91-101.
320. Ravery V., Colombel M., Popov Z., Bastuji S., Patard J.J., Bellot J., Abbou C.C., Fradet Y., Chopin D.K.: Prognostic value of epidermal growth factor-receptor, T138 and T43 expression in bladder cancer. *Br.J.Cancer* 1995, 71, 1, 196-200.
321. Ravery V., Grignon D., Angulo J., Pontes E., Montie J., Crissman J., Chopin D.: Evaluation of epidermal growth factor receptor, transforming growth factor alpha, epidermal growth factor and c-erbB2 in the progression of invasive bladder cancer. *Urol.Res.* 1997, 25, 1, 9-17.
322. Razin A., Cedar H.: DNA methylation and gene expression. *Microbiol.Rev* 1991, 55, 3, 451-458.
323. Renan M.J.: How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data. *Mol.Carcinog.* 1993, 7, 3, 139-146.
324. Reznikoff C.A., Sarkar S., Julicher K.P., Burger M.S., Puthenveetil J.A., Jarrard D.F., Newton M.A.: Genetic alterations and biological pathways in human bladder cancer pathogenesis. *Urol.Oncol.* 2000, 5, 5, 191-203.
325. Ribeiro-Filho L.A., Franks J., Sasaki M., Shiina H., Li L.C., Nojima D., Arap S., Carroll P., Enokida H., Nakagawa M., Yonezawa S., Dahiya R.: CpG hypermethylation of promoter region and inactivation of E-cadherin gene in human bladder cancer. *Mol.Carcinog.* 2002, 34, 4, 187-198.
326. Richon V.M., Sandhoff T.W., Rifkind R.A., Marks P.A.: Histone deacetylase inhibitor selectively induces p21WAF1 expression and gene-

- associated histone acetylation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2000, 97, 18, 10014-10019.
327. Richter J., Wagner U., Kononen J., Fijan A., Bruderer J., Schmid U., Ackermann D., Maurer R., Alund G., Knonagel H., Rist M., Wilber K., Anabitar M., Hering F., Hardmeier T., Schonenberger A., Flury R., Jager P., Fehr J.L., Schraml P., Moch H., Mihatsch M.J., Gasser T., Kallioniemi O.P., Sauter G.: High-throughput tissue microarray analysis of cyclin E gene amplification and overexpression in urinary bladder cancer. *Am.J.Pathol.* 2000, 157, 3, 787-794.
328. Rieger-Christ K.M., Lee P., Zagha R., Kosakowski M., Moinzadeh A., Stoffel J., Ben Ze'ev A., Libertino J.A., Summerhayes I.C.: Novel expression of N-cadherin elicits in vitro bladder cell invasion via the Akt signaling pathway. *Oncogene* 2004, 23, 27, 4745-4753.
329. Rodriguez A., Griffiths-Jones S., Ashurst J.L., Bradley A.: Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res.* 2004, 14, 10A, 1902-1910.
330. Romanov G.A., Vanyushin B.F.: Methylation of reiterated sequences in mammalian DNAs. Effects of the tissue type, age, malignancy and hormonal induction. *Biochim.Biophys.Acta* 1981, 653, 2, 204-218.
331. Ross R.K., Jones P.A., Yu M.C.: Bladder cancer epidemiology and pathogenesis. *Semin.Oncol.* 1996, 23, 5, 536-545.
332. Roth S.Y., Denu J.M., Allis C.D.: Histone acetyltransferases. *Annu.Rev.Biochem.* 2001, 70, 81-120.
333. Saetta A.A., Goudopoulou A., Korkolopoulou P., Voutsinas G., Thomas-Tsagli E., Michalopoulos N.V., Patsouris E.: Mononucleotide markers of microsatellite instability in carcinomas of the urinary bladder. *Eur.J.Surg.Oncol.* 2004, 30, 7, 796-803.
334. Saika T., Tsushima T., Nasu Y., Kumon H., Ohmori H.: Epidermal growth factor in urine from patients with bladder cancer. *Urol.Res.* 2000, 28, 4, 230-234.
335. Saito S., Hata M., Fukuyama R., Sakai K., Kudoh J., Tazaki H., Shimizu N.: Screening of H-ras gene point mutations in 50 cases of bladder carcinoma. *Int.J.Urol.* 1997, 4, 2, 178-185.
336. Sanchez-Carbayo M., Socci N.D., Charytonowicz E., Lu M., Prystowsky M., Childs G., Cordon-Cardo C.: Molecular profiling of bladder cancer using cDNA microarrays: defining histogenesis and biological phenotypes. *Cancer Res.* 2002, 62, 23, 6973-6980.
337. Sanchez-Carbayo M., Socci N.D., Lozano J.J., Li W., Charytonowicz E., Belbin T.J., Prystowsky M.B., Ortiz A.R., Childs G., Cordon-Cardo C.: Gene discovery in bladder cancer progression using cDNA microarrays. *Am.J.Pathol.* 2003, 163, 2, 505-516.

-
338. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1977, 74, 12, 5463-5467.
339. Santini V., Kantarjian H.M., Issa J.P.: Changes in DNA methylation in neoplasia: pathophysiology and therapeutic implications. *Ann.Intern.Med.* 2001, 134, 7, 573-586.
340. Sardi I., Bartoletti R., Occhini I., Piazzini M., Travaglini F., Guazzelli R., Montali E.: Microsatellite alterations in superficial and locally advanced transitional cell carcinoma of the bladder. *Oncol.Rep.* 1999, 6, 4, 901-905.
341. Saretzki G.: Telomerase inhibition as cancer therapy. *Cancer Lett.* 2003, 194, 2, 209-219.
342. Sato K., Moriyama M., Mori S., Saito M., Watanuki T., Terada K., Okuhara E., Akiyama T., Toyoshima K., Yamamoto T.,.: An immunohistologic evaluation of C-erbB-2 gene product in patients with urinary bladder carcinoma. *Cancer* 1992, 70, 10, 2493-2498.
343. Scacheri P.C., Rozenblatt-Rosen O., Caplen N.J., Wolfsberg T.G., Umayam L., Lee J.C., Hughes C.M., Shanmugam K.S., Bhattacharjee A., Meyerson M., Collins F.S.: Short interfering RNAs can induce unexpected and divergent changes in the levels of untargeted proteins in mammalian cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2004, 101, 7, 1892-1897.
344. Schaaf A., Sagi S., Langbein S., Trojan L., Alken P., Michel M.S.: Cytotoxicity of cisplatin in bladder cancer is significantly enhanced by application of bcl-2 antisense oligonucleotides. *Urol.Oncol.* 2004, 22, 3, 188-192.
345. Schlichtholz B., Legros Y., Gillet D., Gaillard C., Marty M., Lane D., Calvo F., Soussi T.: The immune response to p53 in breast cancer patients is directed against immunodominant epitopes unrelated to the mutational hot spot. *Cancer Res.* 1992, 52, 22, 6380-6384.
346. Schlichtholz B., Presler M., Matuszewski M.: Clinical implications of p53 mutation analysis in bladder cancer tissue and urine sediment by functional assay in yeast. *Carcinogenesis* 2004, 25, 12, 2319-2323.
347. Schlichtholz B., Tredaniel J., Lubin R., Zalcman G., Hirsch A., Soussi T.: Analyses of p53 antibodies in sera of patients with lung carcinoma define immunodominant regions in the p53 protein. *Br.J.Cancer* 1994, 69, 5, 809-816.
348. Schwartzmann G., Schunemann H., Gorini C.N., Filho A.F., Garbino C., Sabini G., Muse I., DiLeone L., Mans D.R.: A phase I trial of cisplatin plus decitabine, a new DNA-hypomethylating agent, in patients with advanced solid tumors and a follow-up early phase II evaluation in patients with inoperable non-small cell lung cancer. *Invest New Drugs* 2000, 18, 1, 83-91.

349. Seifert H.H., Schmiemann V., Mueller M., Kazimirek M., Onofre F., Neuhausen A., Florl A.R., Ackermann R., Boecking A., Schulz W.A., Grote H.J.: In situ detection of global DNA hypomethylation in exfoliative urine cytology of patients with suspected bladder cancer. *Exp.Mol.Pathol.* 2007, 82, 3, 292-297.
350. Serrano M., Hannon G.J., Beach D.: A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 1993, 366, 6456, 704-707.
351. Sgambato A., Migaldi M., Faraglia B., De Aloysio G., Ferrari P., Ardito R., De Gaetani C., Capelli G., Cittadini A., Trentini G.P.: Cyclin D1 expression in papillary superficial bladder cancer: its association with other cell cycle-associated proteins, cell proliferation and clinical outcome. *Int.J.Cancer* 2002, 97, 5, 671-678.
352. Shariat S.F., Ashfaq R., Karakiewicz P.I., Saeedi O., Sagalowsky A.I., Lotan Y.: Survivin expression is associated with bladder cancer presence, stage, progression, and mortality. *Cancer* 2007, 109, 6, 1106-1113.
353. Shariat S.F., Matsumoto K., Kim J., Ayala G.E., Zhou J.H., Jian W., Benedict W.F., Lerner S.P.: Correlation of cyclooxygenase-2 expression with molecular markers, pathological features and clinical outcome of transitional cell carcinoma of the bladder. *J.Urol.* 2003, 170, 3, 985-989.
354. Shariat S.F., Monoski M.A., Andrews B., Wheeler T.M., Lerner S.P., Slawin K.M.: Association of plasma urokinase-type plasminogen activator and its receptor with clinical outcome in patients undergoing radical cystectomy for transitional cell carcinoma of the bladder. *Urology* 2003, 61, 5, 1053-1058.
355. Shay J.W., Bacchetti S.: A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur.J.Cancer* 1997, 33, 5, 787-791.
356. Sherr C.J., Roberts J.M.: Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev.* 1995, 9, 10, 1149-1163.
357. Shetty S., Rao G.N., Cines D.B., Bdeir K.: Urokinase induces activation of STAT3 in lung epithelial cells. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 2006, 291, 4, L772-L780.
358. Shiina H., Igawa M., Shigeno K., Yamasaki Y., Urakami S., Yoneda T., Wada Y., Honda S., Nagasaki M.: Clinical significance of mdm2 and p53 expression in bladder cancer. A comparison with cell proliferation and apoptosis. *Oncology* 1999, 56, 3, 239-247.
359. Shiota G., Ishida M., Noguchi N., Oyama K., Takano Y., Okubo M., Katayama S., Tomie Y., Harada K., Hori K., Ashida K., Kishimoto Y., Hosoda A., Suou T., Kanbe T., Tanaka K., Nosaka K., Tanida O., Kojo H., Miura K., Ito H., Kaibara N., Kawasaki H.: Circulating p53

- antibody in patients with colorectal cancer: relation to clinicopathologic features and survival. *Dig.Dis.Sci.* 2000, 45, 1, 122-128.
360. Sibley K., Stern P., Knowles M.A.: Frequency of fibroblast growth factor receptor 3 mutations in sporadic tumours. *Oncogene* 2001, 20, 32, 4416-4418.
361. Siddik Z.H.: Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 2003, 22, 47, 7265-7279.
362. Sidransky D., Frost P., Von Eschenbach A., Oyasu R., Preisinger A.C., Vogelstein B.: Clonal origin bladder cancer. *N.Engl.J.Med.* 1992, 326, 11, 737-740.
363. Sidransky D., Von Eschenbach A., Tsai Y.C., Jones P., Summerhayes I., Marshall F., Paul M., Green P., Hamilton S.R., Frost P., .: Identification of p53 gene mutations in bladder cancers and urine samples. *Science* 1991, 252, 5006, 706-709.
364. Simon R., Struckmann K., Schraml P., Wagner U., Forster T., Moch H., Fijan A., Bruderer J., Wilber K., Mihatsch M.J., Gasser T., Sauter G.: Amplification pattern of 12q13-q15 genes (MDM2, CDK4, GLI) in urinary bladder cancer. *Oncogene* 2002, 21, 16, 2476-2483.
365. Sims R.J., III, Chen C.F., Santos-Rosa H., Kouzarides T., Patel S.S., Reinberg D.: Human but not yeast CHD1 binds directly and selectively to histone H3 methylated at lysine 4 via its tandem chromodomains. *J.Biol.Chem.* 2005, 280, 51, 41789-41792.
366. Sims R.J., III, Nishioka K., Reinberg D.: Histone lysine methylation: a signature for chromatin function. *Trends Genet.* 2003, 19, 11, 629-639.
367. Skaug V., Ryberg D., Kure E.H., Arab M.O., Stangeland L., Myking A.O., Haugen A.: p53 mutations in defined structural and functional domains are related to poor clinical outcome in non-small cell lung cancer patients. *Clin.Cancer Res.* 2000, 6, 3, 1031-1037.
368. Skinner D.G., Stein J.P., Lieskovsky G., Skinner E.C., Boyd S.D., Figueroa A., Jones P., Cote R., Groshen S.: 25-year experience in the management of invasive bladder cancer by radical cystectomy. *Eur.Urol.* 1998, 33 Suppl 4, 25-26.
369. Skopelitou A., Hadjiyannakis M., Dimopoulos D., Kamina S., Krikoni O., Alexopoulou V., Rigas C., Agnantis N.J.: p53 and c-jun expression in urinary bladder transitional cell carcinoma: correlation with proliferating cell nuclear antigen (PCNA) histological grade and clinical stage. *Eur.Urol.* 1997, 31, 4, 464-471.
370. Slaton J.W., Millikan R., Inoue K., Karashima T., Czerniak B., Shen Y., Yang Y., Benedict W.F., Dinney C.P.: Correlation of metastasis related gene expression and relapse-free survival in patients with locally advanced bladder cancer treated with cystectomy and chemotherapy. *J.Urol.* 2004, 171, 2 Pt 1, 570-574.

371. Sobin L.H., Fleming I.D.: TNM Classification of Malignant Tumors, fifth edition (1997). Union Internationale Contre le Cancer and the American Joint Committee on Cancer. *Cancer* 1997, 80, 9, 1803-1804.
372. Soussi T., Legros Y., Lubin R., Ory K., Schlichtholz B.: Multifactorial analysis of p53 alteration in human cancer: a review. *Int.J.Cancer* 1994, 57, 1, 1-9.
373. Southgate J., Trejdosiewicz L.K., Smith B., Selby P.J.: Patterns of splice variant CD44 expression by normal human urothelium in situ and in vitro and by bladder-carcinoma cell lines. *Int.J.Cancer* 1995, 62, 4, 449-456.
374. Spruck C.H., III, Ohneseit P.F., Gonzalez-Zulueta M., Esrig D., Miyao N., Tsai Y.C., Lerner S.P., Schmutte C., Yang A.S., Cote R., ..: Two molecular pathways to transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer Res.* 1994, 54, 3, 784-788.
375. Stanbridge E.J.: Suppression of malignancy in human cells. *Nature* 1976, 260, 5546, 17-20.
376. Stehelin D., Varmus H.E., Bishop J.M., Vogt P.K.: DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature* 1976, 260, 5547, 170-173.
377. Stein J.P., Ginsberg D.A., Grossfeld G.D., Chatterjee S.J., Esrig D., Dickinson M.G., Groshen S., Taylor C.R., Jones P.A., Skinner D.G., Cote R.J.: Effect of p21WAF1/CIP1 expression on tumor progression in bladder cancer. *J.Natl.Cancer Inst.* 1998, 90, 14, 1072-1079.
378. Stoeber K., Halsall I., Freeman A., Swinn R., Doble A., Morris L., Coleman N., Bullock N., Laskey R.A., Hales C.N., Williams G.H.: Immunoassay for urothelial cancers that detects DNA replication protein Mcm5 in urine. *Lancet* 1999, 354, 9189, 1524-1525.
379. Stoler D.L., Chen N., Basik M., Kahlenberg M.S., Rodriguez-Bigas M.A., Petrelli N.J., Anderson G.R.: The onset and extent of genomic instability in sporadic colorectal tumor progression. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1999, 96, 26, 15121-15126.
380. Strathdee G.: Epigenetic versus genetic alterations in the inactivation of E-cadherin. *Semin.Cancer Biol.* 2002, 12, 5, 373-379.
381. Suwa Y., Takano Y., Iki M., Takeda M., Asakura T., Noguchi S., Masuda M.: Cyclin D1 protein overexpression is related to tumor differentiation, but not to tumor progression or proliferative activity, in transitional cell carcinoma of the bladder. *J.Urol.* 1998, 160, 3 Pt 1, 897-900.
382. Suzuki K., Morita T., Tokue A.: Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) expression predicts lymph node metastasis of transitional cell carcinoma of the bladder. *Int.J.Urol.* 2005, 12, 2, 152-158.
383. Tada Y., Wada M., Taguchi K., Mochida Y., Kinugawa N., Tsuneyoshi M., Naito S., Kuwano M.: The association of death-associated pro-

- tein kinase hypermethylation with early recurrence in superficial bladder cancers. *Cancer Res.* 2002, 62, 14, 4048-4053.
384. Taddei I., Piazzini M., Bartoletti R., Dal Canto M., Sardi I.: Molecular alterations of E-cadherin gene: possible role in human bladder carcinogenesis. *Int.J.Mol.Med.* 2000, 6, 2, 201-208.
385. Taylor J.A., Li Y., He M., Mason T., Mettlin C., Vogler W.J., Maygarden S., Liu E.: p53 mutations in bladder tumors from arylamine-exposed workers. *Cancer Res.* 1996, 56, 2, 294-298.
386. Teng L., Specht M.C., Barden C.B., Fahey T.J., III: Antisense hTERT inhibits thyroid cancer cell growth. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 2003, 88, 3, 1362-1366.
387. Tetsu O., McCormick F.: Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 1999, 398, 6726, 422-426.
388. Thøgersen V.B., Jørgensen P.E., Sørensen B.S., Bross P., Ørntoft T., Wolf H., Nexø E.: Expression of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor in human bladder cancer. *Scand.J.Clin.Lab Invest* 1999, 59, 4, 267-277.
389. Thorne A.W., Kmiecik D., Mitchelson K., Sautiere P., Crane-Robinson C.: Patterns of histone acetylation. *Eur.J.Biochem.* 1990, 193, 3, 701-713.
390. Tomlinson I., Sasieni P., Bodmer W.: How many mutations in a cancer? *Am.J.Pathol.* 2002, 160, 3, 755-758.
391. Trivers G.E., De Benedetti V.M., Cawley H.L., Caron G., Harrington A.M., Bennett W.P., Jett J.R., Colby T.V., Tazelaar H., Pairolero P., Miller R.D., Harris C.C.: Anti-p53 antibodies in sera from patients with chronic obstructive pulmonary disease can predate a diagnosis of cancer. *Clin.Cancer Res.* 1996, 2, 10, 1767-1775.
392. Turyn J., Matuszewski M., Schlichtholz B.: Genomic instability analysis of urine sediment versus tumor tissue in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Oncol.Rep.* 2006, 15, 1, 259-265.
393. Tuschl T., Zamore P.D., Lehmann R., Bartel D.P., Sharp P.A.: Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes Dev.* 1999, 13, 24, 3191-3197.
394. Uchida T., Minei S., Gao J.P., Wang C., Satoh T., Baba S.: Clinical significance of p53, MDM2 and bcl-2 expression in transitional cell carcinoma of the bladder. *Oncol.Rep.* 2002, 9, 2, 253-259.
395. Uchida T., Wada C., Ishida H., Wang C., Egawa S., Yokoyama E., Kameya T., Koshiha K.: p53 mutations and prognosis in bladder tumors. *J.Urol.* 1995, 153, 4, 1097-1104.
396. Umar A., Boland C.R., Terdiman J.P., Syngal S., de la C.A., Ruschhoff J., Fishel R., Lindor N.M., Burgart L.J., Hamelin R., Hamilton S.R., Hiatt R.A., Jass J., Lindblom A., Lynch H.T., Peltomäki P., Ramsey S.D., Rodriguez-Bigas M.A., Vasen H.F., Hawk E.T., Barrett J.C.,

- Freedman A.N., Srivastava S.: Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J.Natl.Cancer Inst.* 2004, 96, 4, 261-268.
397. Underwood M., Bartlett J., Reeves J., Gardiner D.S., Scott R., Cooke T.: C-erbB-2 gene amplification: a molecular marker in recurrent bladder tumors? *Cancer Res.* 1995, 55, 11, 2422-2430.
398. Ura K., Kurumizaka H., Dimitrov S., Almouzni G., Wolffe A.P.: Histone acetylation: influence on transcription, nucleosome mobility and positioning, and linker histone-dependent transcriptional repression. *EMBO J.* 1997, 16, 8, 2096-2107.
399. Vageli D., Kiaris H., Delakas D., Anezinis P., Cranidis A., Spandidos D.A.: Transcriptional activation of H-ras, K-ras and N-ras proto-oncogenes in human bladder tumors. *Cancer Lett.* 1996, 107, 2, 241-247.
400. Vaisman A., Varchenko M., Umar A., Kunkel T.A., Risinger J.I., Barrett J.C., Hamilton T.C., Chaney S.G.: The role of hMLH1, hMSH3, and hMSH6 defects in cisplatin and oxaliplatin resistance: correlation with replicative bypass of platinum-DNA adducts. *Cancer Res.* 1998, 58, 16, 3579-3585.
401. Valenzuela M.T., Galisteo R., Zuluaga A., Villalobos M., Nunez M.I., Oliver F.J., Ruiz de Almodovar J.M.: Assessing the use of p16(INK4a) promoter gene methylation in serum for detection of bladder cancer. *Eur.Urol.* 2002, 42, 6, 622-628.
402. van Rhijn B.W., Lurkin I., Radvanyi F., Kirkels W.J., van der Kwast T.H., Zwarthoff E.C.: The fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) mutation is a strong indicator of superficial bladder cancer with low recurrence rate. *Cancer Res.* 2001, 61, 4, 1265-1268.
403. Veltman J.A., Fridlyand J., Pejavar S., Olshen A.B., Korkola J.E., DeVries S., Carroll P., Kuo W.L., Pinkel D., Albertson D., Cordon-Cardo C., Jain A.N., Waldman F.M.: Array-based comparative genomic hybridization for genome-wide screening of DNA copy number in bladder tumors. *Cancer Res.* 2003, 63, 11, 2872-2880.
404. Verdone L., Caserta M., Di Mauro E.: Role of histone acetylation in the control of gene expression. *Biochem.Cell Biol.* 2005, 83, 3, 344-353.
405. Vertino P.M., Yen R.W., Gao J., Baylin S.B.: De novo methylation of CpG island sequences in human fibroblasts overexpressing DNA (cytosine-5-)-methyltransferase. *Mol.Cell Biol.* 1996, 16, 8, 4555-4565.
406. Vihinen P., Kahari V.M.: Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and therapeutic targets. *Int.J.Cancer* 2002, 99, 2, 157-166.
407. Vivanco I., Sawyers C.L.: The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat.Rev.Cancer* 2002, 2, 7, 489-501.

408. Vogelstein B., Kinzler K.W.: Cancer genes and the pathways they control. *Nat.Med.* 2004, 10, 8, 789-799.
409. Vousden K.H.: p53: death star. *Cell* 2000, 103, 5, 691-694.
410. Wada T., Louhelainen J., Hemminki K., Adolfsson J., Wijkstrom H., Norming U., Borgstrom E., Hansson J., Sandstedt B., Steineck G.: Bladder cancer: allelic deletions at and around the retinoblastoma tumor suppressor gene in relation to stage and grade. *Clin.Cancer Res.* 2000, 6, 2, 610-615.
411. Wada T., Louhelainen J., Hemminki K., Adolfsson J., Wijkstrom H., Norming U., Borgstrom E., Hansson J., Steineck G.: The prevalence of loss of heterozygosity in chromosome 3, including FHIT, in bladder cancer, using the fluorescent multiplex polymerase chain reaction. *BJU.Int.* 2001, 87, 9, 876-881.
412. Wadhwa P., Goswami A.K., Joshi K., Sharma S.K.: Cyclooxygenase-2 expression increases with the stage and grade in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Int.Urol.Nephrol.* 2005, 37, 1, 47-53.
413. Wallrath L.L.: Unfolding the mysteries of heterochromatin. *Curr.Opin.Genet.Dev.* 1998, 8, 2, 147-153.
414. Wang D.S., Rieger-Christ K., Latini J.M., Moinzadeh A., Stoffel J., Pezza J.A., Saini K., Libertino J.A., Summerhayes I.C.: Molecular analysis of PTEN and MXI1 in primary bladder carcinoma. *Int.J.Cancer* 2000, 88, 4, 620-625.
415. Wang X., Ohnishi K., Takahashi A., Ohnishi T.: Poly(ADP-ribosylation) is required for p53-dependent signal transduction induced by radiation. *Oncogene* 1998, 17, 22, 2819-2825.
416. Wang Y., Geer L.Y., Chappay C., Kans J.A., Bryant S.H.: Cn3D: sequence and structure views for Entrez. *Trends Biochem.Sci.* 2000, 25, 6, 300-302.
417. Waridel F., Estreicher A., Bron L., Flaman J.M., Fontollet C., Monnier P., Frebourg T., Iggo R.: Field cancerisation and polyclonal p53 mutation in the upper aero-digestive tract. *Oncogene* 1997, 14, 2, 163-169.
418. Watt R.A., Shatzman A.R., Rosenberg M.: Expression and characterization of the human c-myc DNA-binding protein. *Mol.Cell Biol.* 1985, 5, 3, 448-456.
419. Watters A.D., Ballantyne S.A., Going J.J., Grigor K.M., Bartlett J.M.: Aneusomy of chromosomes 7 and 17 predicts the recurrence of transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *BJU.Int.* 2000, 85, 1, 42-47.
420. Watters A.D., Latif Z., Forsyth A., Dunn I., Underwood M.A., Grigor K.M., Bartlett J.M.: Genetic aberrations of c-myc and CCND1 in the development of invasive bladder cancer. *Br.J.Cancer* 2002, 87, 6, 654-658.

421. Wei C.L., Wu Q., Vega V.B., Chiu K.P., Ng P., Zhang T., Shahab A., Yong H.C., Fu Y., Weng Z., Liu J., Zhao X.D., Chew J.L., Lee Y.L., Kuznetsov V.A., Sung W.K., Miller L.D., Lim B., Liu E.T., Yu Q., Ng H.H., Ruan Y.: A global map of p53 transcription-factor binding sites in the human genome. *Cell*. 2006, 124, 1, 207-219.
422. Wild C.P., Ridanpaa M., Anttila S., Lubin R., Soussi T., Husgafvel-Pursiainen K., Vainio H.: p53 antibodies in the sera of lung cancer patients: comparison with p53 mutation in the tumour tissue. *Int.J.Cancer* 1995, 64, 3, 176-181.
423. Williamson M.P., Elder P.A., Shaw M.E., Devlin J., Knowles M.A.: p16 (CDKN2) is a major deletion target at 9p21 in bladder cancer. *Hum.Mol.Genet.* 1995, 4, 9, 1569-1577.
424. Wilson M.J., Shivapurkar N., Poirier L.A.: Hypomethylation of hepatic nuclear DNA in rats fed with a carcinogenic methyl-deficient diet. *Biochem.J.* 1984, 218, 3, 987-990.
425. Wilson V.L., Jones P.A.: Inhibition of DNA methylation by chemical carcinogens in vitro. *Cell* 1983, 32, 1, 239-246.
426. Witjes J.A.: Bladder carcinoma in situ in 2003: state of the art. *Eur.Urol.* 2004, 45, 2, 142-146.
427. Wolffe A.P., Matzke M.A.: Epigenetics: regulation through repression. *Science* 1999, 286, 5439, 481-486.
428. Wu J., Issa J.P., Herman J., Bassett D.E., Jr., Nelkin B.D., Baylin S.B.: Expression of an exogenous eukaryotic DNA methyltransferase gene induces transformation of NIH 3T3 cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1993, 90, 19, 8891-8895.
429. Wu T.T., Chen J.H., Lee Y.H., Huang J.K.: The role of bcl-2, p53, and ki-67 index in predicting tumor recurrence for low grade superficial transitional cell bladder carcinoma. *J.Urol.* 2000, 163, 3, 758-760.
430. Wu X., Bayle J.H., Olson D., Levine A.J.: The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev.* 1993, 7, 7A, 1126-1132.
431. Xu H.J., Cairns P., Hu S.X., Knowles M.A., Benedict W.F.: Loss of RB protein expression in primary bladder cancer correlates with loss of heterozygosity at the RB locus and tumor progression. *Int.J.Cancer* 1993, 53, 5, 781-784.
432. Xu H.J., Zhou Y., Seigne J., Perng G.S., Mixon M., Zhang C., Li J., Benedict W.F., Hu S.X.: Enhanced tumor suppressor gene therapy via replication-deficient adenovirus vectors expressing an N-terminal truncated retinoblastoma protein. *Cancer Res.* 1996, 56, 10, 2245-2249.
433. Yamaguchi A., Tamatani M., Matsuzaki H., Namikawa K., Kiyama H., Vitek M.P., Mitsuda N., Tohyama M.: Akt activation protects hippocampal neurons from apoptosis by inhibiting transcriptional activity of p53. *J.Biol.Chem.* 2001, 276, 7, 5256-5264.

-
434. Yates D.R., Rehman I., Abbod M.F., Meuth M., Cross S.S., Linkens D.A., Hamdy F.C., Catto J.W.: Promoter hypermethylation identifies progression risk in bladder cancer. *Clin.Cancer Res.* 2007, 13, 7, 2046-2053.
 435. Yates D.R., Rehman I., Meuth M., Cross S.S., Hamdy F.C., Catto J.W.: Methylation analysis: a prospective study of bladder cancer patients and age stratified benign controls. *Oncogene* 2006, 25, 13, 1984-1988.
 436. Yin W., Chen N., Zhang Y., Zeng H., Chen X., He Y., Wang X., Zhou Q.: Survivin nuclear labeling index: a superior biomarker in superficial urothelial carcinoma of human urinary bladder. *Mod.Pathol.* 2006, 19, 11, 1487-1497.
 437. Yuan Z.M., Huang Y., Ishiko T., Nakada S., Utsugisawa T., Shioya H., Utsugisawa Y., Yokoyama K., Weichselbaum R., Shi Y., Kufe D.: Role for p300 in stabilization of p53 in the response to DNA damage. *J.Biol.Chem.* 1999, 274, 4, 1883-1886.
 438. Zhang Z., Karam J., Frenkel E., Sagalowsky A., Hsieh J.T.: The application of epigenetic modifiers on the treatment of prostate and bladder cancer. *Urol.Oncol.* 2006, 24, 2, 152-160.
 439. Zhao R., Gish K., Murphy M., Yin Y., Notterman D., Hoffman W.H., Tom E., Mack D.H., Levine A.J.: Analysis of p53-regulated gene expression patterns using oligonucleotide arrays. *Genes Dev.* 2000, 14, 8, 981-993.