



T. C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MESANE KANSERLERİNDE *TRPM2* GEN EKSPRESYONU

Bio. Çağlar ATALAY

YÜKSEK LİSANS TEZİ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Beyhan CENGİZ

‘Bu tez Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından
T.F.10.14. no’lu proje ile desteklenmiştir.’

GAZİANTEP

2011



T. C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MESANE KANSERLERİNDE *TRPM2* GEN EKSPRESYONU

Bio. Çağlar ATALAY

YÜKSEK LİSANS TEZİ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Beyhan CENGİZ

‘Bu tez Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından
T.F.10.14. nolu proje ile desteklenmiştir.’

Gaziantep

2011

T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

MESANE KANSERLERİNDE TRPM2 GEN EKSPRESYONU

Çağlar ATALAY

Tez Savunma Tarihi: 18 KASIM 2011

Sağlık Bilimleri Enstitü Onayı

Prof. Dr. Mehmet TARAKÇIOĞLU
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu çalışmanın bir ‘Yüksek Lisans’ derecesi için uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.’

Prof. Dr. Cahit BAĞCI
Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımca okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Yrd. Doç. Dr. Beyhan CENGİZ
Tez Danışmanı

Bu tez tarafımca okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi
Prof. Dr. Cahit BAĞCI
Doç. Dr. M. Sakıp ERTURHAN
Yrd. Doç. Dr. Beyhan CENGİZ

İmzası

BEYAN

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

05/11/2011

Çağlar ATALAY

Önsöz

Çalışmamızda, Güneydoğu Anadolu Bölgesi'ndeki görülme sıklığı diğer bölgelerden daha fazla olan mesane kanserlerinde, bir tümör baskılayıcı gen olduğunu düşündüğümüz TRPM2 geninin etkilerini araştırdık. Bu çalışmada mesane kanseri tanısı konmuş 28 hastanın dokularında TRPM2 geninin ifade düzeylerini ölçerek, mesane kanseri ile TRPM2 geni arasındaki ilişkiyi bulmayı amaçladık.

Tez çalışmamız, Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından, GÜ-BAPYB-T.F.10.14. numaralı proje ile desteklenmiştir.

Gaziantep Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı'nda eğitimim süresince ve yaptığım çalışmalarında bana destek olan sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Beyhan CENGİZ' e teşekkür ederim.

Fizyoloji anabilim dalı başkanı Prof. Dr. Cahit BAĞCI ve diğer hocalarım Yrd. Doç. Dr. Şeniz DEMİRYÜREK ve Yrd. Doç. Dr. Tuncer DEMİR'e teşekkür ederim.

Çalışmayı destekleyen Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi'ne teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarında yardımlarını hiç esirgemeyen, onlarla çalışmaktan mutluluk duyduğum Fizyoloji anabilim dalı personeline ve değerli öğrenci arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Öğrencilik hayatım boyunca ve tüm çalışmalarım esnasında, her konuda destek ve katkılarını benden esirgemeyen, daima yanımda olan, canım eşime, sevgili anneme ve değerli kardeşlerime minnet duygularıyla şükranlarımı sunarım.

Çağlar ATALAY

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
Önsöz	i
İÇİNDEKİLER	ii
KISALTMALAR VE SİMGELER	iv
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	v
TABLolarIN LİSTESİ	vi
ÖZET	1
ABSTRACT	2
1. GİRİŞ ve AMAÇ	3
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Tümör Biyolojisi	4
2.1.1. Kanser hücrelerinin genel özellikleri	5
2.2. Hücre Siklusu	8
2.2.1. Hücre siklusunun kontrol mekanizmaları	9
2.3. Apoptosis	11
2.4. Kanser Genetik Arasındaki İlişki	14
2.4.1. Onkogenler	15
2.4.2. Tümör baskılayıcı genler	16
2.5. Mesane	16
2.5.1. Mesane anatomisi	16
2.5.2. Mesane histolojisi	17
2.6. Mesane Kanseri	20

2.6.1.	Mesane kanserlerinin tümör dereceleri	21
2.6.2.	Mesane kanserinin moleküler biyolojisi	24
2.6.3.	Karsinogenezin başlangıcı onkogenler ve kromozomal değişiklikler	25
2.6.4.	Mesane kanserlerinde tümör baskılayıcı genler	25
2.7.	TRP (Transient Receptor Potential)	26
2.7.1.	TRPM ailesi	27
2.7.1.1.	<i>TRPM1</i>	28
2.7.1.2.	<i>TRPM7</i>	28
2.7.1.3.	<i>TRPM2</i>	29
3.	GEREÇ ve YÖNTEM	32
3.1.	RNA İzolasyonu	32
3.2.	RNA Konsantrasyonun Hesaplanması	34
3.3.	cDNA Sentezi	34
3.4.	RT-PCR	35
4.	BULGULAR	37
5.	TARTIŞMA ve SONUÇ	43
6.	KAYNAKLAR	48
7.	ÖZGEÇMİŞ	57

KISALTMALAR VE SİMGELER

Apaf-1	Apoptotic protease activating factor-1
ADPR	Adenozin di-fosfat Riboz
Asp	Aspartik asit
C	Sistenin
CDK	Siklin bağımlı protein kinazlar
CDI	Siklin bağımlı kinaz inhibitörler
DISC	Death –Inducing Signaling Complex
DNaz	Deoksiribonükleaz
EDTA	Etilen diamin tetraasetik asit
FADD	FAS-associated death domain protein
H₂O₂	Hidrojen peroksit
ISUP	Uluslararası Üroloji Patoloji Topluluğu
KİDEM	Kanser İzlem ve Denetim Merkezi
LOH	Loss of Heterozygosity
MPF	M-phase / maturation promoting factor
pTNM	Pathological Tumor-Node-Metastasis
pp	Difosfat
ROS	Serbest oksijen radikalleri
TCC	Transitional cell carcinoma
THK	Transizyonel hücreli karsinoma
TNF	Tumor Necrosis Factor
TRAIL	TNF-related apoptosis inducing ligand
TUR	Trans üretral rezeksiyon
WHO	Dünya sağlık örgütü
µg	Mikrogram
µmol	Mikromol
kb	Kilobyte
Vb.	Ve benzeri

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

- Şekil 2.1.** Hücre döngüsü ve kontrol noktaları şeması
- Şekil 2.2.** Mesanenin anatomisi ve şekli
- Şekil 2.3.** Transizyonel hücrelerin basınç altındaki değişimleri
- Şekil 2.4.** Mesane duvarının histolojisi
- Şekil 2.5.** Mesane tümörlerinin moleküler yolakları
- Şekil 2.6.** *TRPM2* kanalının moleküler yapısı
- Şekil 2.7.** ADPR ve *TRPM2* kanal aktivasyonu ile oksidatif stres arasındaki ilişki
- Şekil 4.1.** Çalışılan hastalarda gözlemlenen ekspresyon düzeylerinin yüzde oranları

TABLoların LİSTESİ

Tablo 2.1.	WHO tarafından yapılan histopatolojik sınıflandırma
Tablo 2.2.	Mesane Tümörlerinin TNM sınıflandırılması
Tablo 3.1.	cDNA sentezi için kullanılan karışım içeriği
Tablo 3.2.	<i>TRPM2</i> genine ait uygun PCR sıcaklıkları
Tablo 3.3.	Çalışmada kullanılan gen bölgelerine ait primer dizi bilgileri
Tablo 3.4.	<i>TRPM2</i> genine ait RT-PCR için karışım içeriği
Tablo 4.1.	Normal mesane dokularındaki <i>TRPM2</i> ve <i>GADPH</i> genlerinin İmage-J programına göre kontrast değerleri
Tablo 4.2.	Tümörlü mesane dokularındaki <i>TRPM2</i> ve <i>GADPH</i> genlerinin İmage-J programına göre kontrast değerleri
Tablo 4.3.	Çalışılan hastalarda <i>TRPM2</i> ve <i>GAPDH</i> geninin gen ifade düzeyleri
Tablo 4.4.	<i>TRPM2</i> geninin ekspresyon düzeylerinin sayısal değer aralıkları
Tablo 4.5.	<i>TRPM2</i> gen ekspresyonu görülen hastaların ekspresyon düzeyleri

ÖZET

MESANE KANSERLERİNDE TRPM2 GEN EKSPRESYONU

Çağlar ATALAY

Yüksek Lisans Tezi

Gaziantep Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Fizyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Beyhan CENGİZ

Kasım 2011, Sayfa 57

Mesane kanserinin Güneydoğu Anadolu Bölgesi'ndeki görülme sıklığı, diğer bölgelerden daha yüksektir. Mesane kanserleri üzerine yapılan genomik görüntüleme çalışmalarında kromozom 21q bölgesinde ciddi kromozomal kayıplar gözlenmiştir. Bu lokusta yer alan genlerden bir tanesinin *TRPM2* geni olduğu görülmüştür. Bu çalışmalardan yola çıkarak, mesane kanseri ile *TRPM2* gen ifadeleri arasındaki ilişki çalışıldı. Bu çalışma; Gaziantep Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı'nda, mesane kanseri tanısı konmuş 28 hastadan, cerrahi olarak alınmış normal ve tümörlü dokular üzerine yapıldı. *TRPM2* geninin mRNA ekspresyonu için RT-PCR tekniği kullanıldı. Çalışma sonucunda *TRPM2* geninin mesane kanseri vakalarındaki ekspresyonunun çok az olduğu görüldü. 28 hastadan 22'sinde ekspresyon izlenmedi. 6 hastada az da olsa ekspresyon izlendi. Bu 6 hastadan 3'ünde düşük ekspresyon, 1'inde normal ekspresyon, 2'sinde ise yüksek ekspresyon görüldü. *TRPM2* gen ifade seviyesinin düşüklüğü, mesane kanseri dokularında hücre döngüsü ve çoğalma kontrolünün bozulmasıyla ve neticesinde apoptozisin çalışmaması ile kanser gelişimin ilişkili olabileceğini düşündürdü. *TRPM2* ve diğer TRPM ailesi üyelerinin hücre içi dağılımları ve mesane kanserli dokulardaki işlevlerinin ortaya çıkarılması, *TRPM2*'nin mesane kanseri gelişimindeki rolünün daha iyi anlaşılmasını sağlayacaktır.

Anahtar sözcükler: Apoptozis, Ekspresyon, Mesane kanseri, *TRPM2*

ABSTRACT

GENE EXPRESSION OF TRPM2 IN BLADDER CANCERS

Çağlar ATALAY

MSc. Thesis

University of Gaziantep, The Institute of Health Sciences

Department of Physiology

Thesis Advisor: Assist. Prof. Beyhan CENGİZ

November 2011, 57 Pages

The frequency of bladder cancer in the Southeast Anatolian Area is higher than the others. According to the genomic imaging studies related to the bladder cancer, it seems that there is a serious chromosomal losses in the 21q locus. It was observed that one of these genes in this locus is the *TRPM2* gene. Depending on these researches, the relationship between the *TRPM2* gene expressions in the bladder cancer was studied. This work, in the department of Urology in Faculty of Medicine in the University of Gaziantep, out of 28 diagnosed bladder cancer patients, normal and tumor tissues were taken via surgery. As for the mRNA expression of the *TRPM2* gene, RT-PCR technique and for the evaluation, agarose gel imaging system were used. In the cases of the *TRPM2* gene bladder cancer, much less expressions were observed. Out of 28 patients, expressions were not observed in 22 of them. Even if it was low, expressions were expected in 6 of them. In these patients, 3 of them showed low, 1 normal and 2 showed high expressions. The decrease of the expressions level of the *TRPM2* gene, the deterioration of the control of the cell cycle and proliferation in the bladder cancer tissues, and in the results, the non-operating apoptosis would be a result of the development of the cancer. The distribution of intracellular of *TRPM2* and other member of TRPM family and the revealing of the functions in the bladder cancer tissues would provide a better understanding of the development of *TRPM2* bladder cancer.

Key words: Apoptosis, Bladder cancer, Expression, *TRPM2*

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Mesane kanseri, tüm dünyada 7. en sık görülen kanserdir ve her yıl erkeklerde 260.000, kadınlarda ise 76.000 yeni olgu görülmektedir (1). Mesane kanseri, tüm dünyada kanserlerin %3,2'sini oluşturur ve erkeklerde kadınlara göre oldukça sık görülür (2,3). Bu fark büyük oranda sigara içimi ve mesleki nedenlerden kaynaklanmaktadır (1,4). Mesane tümörlerinin büyük bir kısmı 50 yaş üzerinde görülür fakat genç erişkinlerde ve çocuklarda da ortaya çıkabilir. Çocuklarda görülenler, genellikle düşük dereceli ve yavaş seyirli neoplaziler olmakla birlikte, nadiren agresif gidiş gösteren tümörler de bildirilmiştir (4). Malign mesane tümörlerinin yaklaşık %90'ı ürotelyal karsinomlardır. Geriye kalan %10'luk kısmını ise diğer karsinom tipleri, az sayıda sarkom ve nadir görülen çeşitli tümörler oluşturur (4).

Mesane kanserleri üzerine yapılan genomik görüntüleme çalışmalarında, kromozom 21q bölgesinde ciddi kromozomal kayıplar gözlenmiştir ve bu lokusta yer alan genlerden bir tanesinin *TRPM2* olduğu görülmüştür (5). Prostatta yapılan bir çalışmada, bu gen kimyasal ajanlarla susturulduğu zaman, hücre ömürlerinin uzadığı ispatlanmıştır. Yine aynı çalışmada, prostat kanseri hücre dizininde meydana gelen mutasyon veya mRNA ekspresyon azalmasına bağlı olarak, bu genin hastalığın seyri ile olan ilişkisi ispatlanmıştır (5).

Bu genin, özellikle H_2O_2 ile uyarıldığı zaman aktif hale geçtiği ve hücreye bol miktarda kalsiyum iyonunun girişini sağlayarak, hücreyi apoptoza götürdüğü görülmüştür (6). *TRPM2* gen ifade seviyesinin düşüklüğü, mesane kanserli dokularda hücre döngüsünün ve çoğalma kontrolünün bozulmasıyla apoptozisin çalışmaması nedeniyle kanser gelişiminin ilişkili olabileceğini düşündürmüştür. Bu çalışmalardan yola çıkarak, mesane kanserlerinde *TRPM2* gen ifadeleri incelenerek, kanser gelişimiyle *TRPM2* arasındaki ilişkinin ortaya konması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tümör Biyolojisi

Kanser, bastırılmamış hücre çoğalmasıyla karakterize, birçok hücre tipinde ve organda gelişebilen, çeşitli hastalıkların ortak adıdır (7). Kanser gelişimi, genellikle erişkinlerde sonradan kazanılmış bir genetik hastalıktır (7). Kanser gelişiminde genomik rol, 19. yüzyıl sonu ile 20. yüzyıl başında David Von Hanseemann ve Theodor Boveri'nin çalışmalarıyla ortaya konmuştur (8). Bu araştırmacılar, kanser hücrelerini mikroskop altında incelemiş, normal olmayan kromozom yapılarını görmüş ve kanserin kalıtsal materyaldeki değişimlerden kaynaklanan anormal klonlardan ileri geldiğini öne sürmüşlerdir (8). Bu düşünce, DNA'nın kalıtsal materyal olduğunu ve DNA hasarına neden olan kimyasal etkenlerin de aynı zamanda kansere neden olabileceği düşüncesini desteklenmiştir (9). Sonraki dönemde, kanser hücrelerindeki genetik değişimler yoğun olarak çalışılmış ve kronik miyeloid lösemide 9 ve 22'nci kromozomlar arasındaki translokasyon ortaya konulmuştur (8). Yapılan çalışmalarda, kanser hücrelerinden alınan total genomik DNA, normal NIH3T3 hücre hatlarına aktarılmış ve normal olan bu hücrelerde kanser geliştiği gösterilmiştir (8,10,11). Kanser dönüşümüne neden olan özgün DNA bölgesinin ayrıştırılması sonrasında, *HRAS* geninin 12. kodonunda bulunan glisin amino asidinin, valin amino asidine dönüşmesine neden olan G>T mutasyonu bulunmuştur (8,12,13). 1982 yılında yapılan bu çalışma, kanser gelişimde rol alan anormal genlerin ortaya konmasına yönelik diğer çalışmalar için de bir çıkır açmıştır (8). Vücutta bulunan diğer bütün hücreler gibi kanser hücreleri de, döllenmiş yumurtadan gelişen, aynı diploid genoma sahip tek hücreden köken almaktadırlar (7). Döllenmiş yumurtayla kıyaslandığında kanser hücrelerinde; kromatin yapısal değişimleri ve gen ifade seviyelerinin değişmesine neden olan epigenetik değişimlerin de olduğu görülmektedir. Ayrıca sitozinlerden metillenme gibi epigenetik etmenler kalıtsaldır ve anne hücreden yavru hücreye aktarılmaktadır (14,15). Kanser hücrelerinin gen ifadelerinin değişmesine neden olan epigenetik etmenler, tek başlarına kanser gelişimini başlatamayabilirler ancak, mevcut mutasyonların etkilerini güçlendirerek, onkogenik dönüşümün gerçekleşmesine katkıda bulunurlar (14).

Epigenetik düzenlemelerdeki kontrol kayıpları, neoplastik hastalıkların oluşması yönünde genetik mutasyonlara katkıda bulunmaktadır (14).

Epigenetik etmenlerdeki değişimler, karmaşık ve dinamik olan değişimlerdir (14). Bunlar; DNA metilasyonu, nükleozom yeniden şekillenmesi, translasyon sonrası histon işlemleri, histon çeşitlerinin (varyant) oluşturulması ve kodlamayan RNA etkileri olarak adlandırılabilirler (14). Değişik histon çeşitlerinin oluşturulması gibi, kanser gelişiminde önemli rolü olan proteinlerin farklı kesilmesi ve eklenmesiyle, belli kanser türlerinde bazı çeşitlerinin daha fazla ifade edildiği görülmüştür (16,17). Bu durum, farklı kesip ekleme mekanizmalarının da kanser gelişiminde önemli rol oynadığını göstermektedir. Bazı kanser türlerinde, bu farklı kesilip eklenmiş yapılar, ilgili kanser tipi için belirteç olarak değerlendirilmektedir (17). Hücre nükleer genomundaki değişimlere ek olarak, yaklaşık 17 kb büyüklüğündeki mitokondri genomunda da mutasyonlar gerçekleşebilir (18). Kanser hücrelerindeki mitokondrilerde gerçekleşen somatik mutasyonlar rapor edilmiş olmakla birlikte, kanser gelişimindeki rolleri açık değildir (18).

2.1.1. Kanser hücrelerinin genel özellikleri

Kanser hücreleri, gerek hücresel düzeyde gerçekleşen değişimler, gerekse çevre ve bulundukları sistem içerisinde gerçekleşen değişimlerden kaynaklı olarak, normal eşdeğer hücrelerden farklı özelliklere sahiptir (19). Kanser hücrelerinde, hücrenin normal çoğalmasını, farklılaşmasını ve sağ kalımını düzenleyen mekanizmalarda anormallikler görülür. Bu normal olmayan durumlar, kanser hücrelerinin karakteristik özelliklerinin ortaya çıkma nedenidir (19,20).

Normal hücreler, büyüme faktörlerine bağlı olarak büyüme ve çoğalma faaliyetlerini gerçekleştirirken, ortamda bulunan büyüme faktörlerinin miktarına bağlı olarak belirli bir yoğunluğa erişinceye kadar çoğalırlar ve daha sonra hücre döngüsünün G₀ evresine girerler (19). Kanser hücreleri ise; yoğunluğa bağlı engellenmeden etkilenmeyip, normal hücreler gibi hücre döngüsünün G₀ evresinde durmak yerine, kontrolsüz *in vivo* çoğalma davranışlarını sürdürmeye devam ederler (19).

Kanser hücreleri, vücuttaki diğer normal hücelere göre, hücre dışı büyüme faktörlerine daha az ihtiyaç duyarlar (21). Bu özellikleri, tümör hücrelerinin hem *in vivo* hem de *in vitro* koşullarda kontrolsüz çoğalmalarını kolaylaştırmaktadır (14,19). Kanser hücrelerinin büyüme faktörlerine bağımlı olmaması; bazı durumlarda hücre içi uyarı sistemlerinde gerçekleşen anormalliklerden ve hücre çoğalmasını sağlayan uyarı yollarında görev yapan büyüme faktörü reseptörlerinin, Ras proteini veya protein kinazlar gibi başka proteinlerin kontrolsüz işlevlerinden kaynaklanmaktadır (14,19,22).

Kanser hücrelerindeki hücre-matriks ve hücre-hücre etkileşimleri de daha düzensizdir (19,21,23). Yüzey yapışma ve tutunma moleküllerinin ifadesindeki azalma nedeniyle, kanser hücrelerinin çoğunun tutunma yeteneği, normal hücelere kıyasla daha düşüktür (19,21,23). Karsinomların gelişmesinde, epitel hücrelerindeki başlıca tutunma molekülü olan E-kadherin'in ortadan kalkması, büyük önem taşımaktadır (19,23). Tutunma moleküllerinde gerçekleşen azalmaya bağlı olarak, diğer komşu hücreler ve doku bileşenleri tarafından, hücreler üzerinde gerçekleşen sınırlama kalkmakta ve bu durum, kanser hücrelerinin yayılma ve metastaz yapma yeteneklerini arttırmaktadır (19). Kanser hücrelerinin tutunma yeteneklerinin azalması, morfolojilerinin ve hücre iskeletlerinin de değişmesine yol açmaktadır (19). Tümör hücrelerinin çoğu, hücre dışı matrikse veya komşu hücelere tutunamadıkları için, normal hücelerden daha yuvarlaktırlar (19).

Hücre-hücre etkileşimleri açısından normal hücreler ile kanser hücreleri arasındaki en önemli farklardan biri, dokunma engellemesi kaybıdır (21,24). Hücre kültürü sırasında, normal fibroblastlar, kültür kabı üzerinde komşu hücelerden biri ile temas edinceye kadar ilerledikten sonra bu temasın etkisiyle hareketlerine son verirler. Ayrıca, hücreler birbirlerine tutunarak kültür kabı yüzeyinde düzenli olarak sıralanırlar (21,24). Tümör hücreleri ise, komşu hücelere temas ettikten sonra da hareketlerine devam ederler (21,24). Çoğalmalarına, yanlardaki hücrelerin üzerine çıkarak düzensiz, çok katlı kümeler oluşturacak şekilde devam ederler (21). Normal hücreler, hücre-hücre teması sonucunda sadece hareket etmeye değil çoğalmaya da son verirken, kanser hücreleri çoğalmayı engelleyen bu etkileşime duyarsızdırlar (21).

Kanser hücreleri, hücre dışı matriks bileşenlerini parçalayan ve böylece kanser hücrelerinin normal doku içine girmesini sağlayan ‘proteazlar’ salgırlar (25). Hücrelerden salgılanan kollojenaz, karsinomların bazal laminayı parçalayıp altındaki bağ dokusuna girebilmesi açısından önem taşır (25). Ayrıca, kanser hücreleri yeni kan damarlarının oluşumunu (anjyogenez) hızlandıran büyüme faktörleri de salgırlar (26). Tümör kitlesinde hücre sayısı 1 milyonu aştığında, hücrelere oksijen ve besin maddelerinin ulaşması ve tümörün büyümeye devam edebilmesi için yeni damarların oluşması gereklidir (19). Bu damarlar, tümör hücresi tarafından salgılanan ve çevre doku kılcal damar duvarındaki endotel hücrelerinin çoğalmasını uyaran, büyüme faktörlerine yanıt olarak ortaya çıkar. Böylece tümörün içine doğru uzanan yeni kılcal damarlar oluşur (26). Yeni damar oluşumu, hem tümör büyümesinde hem de bazı tümör hücrelerinin, tümör kitlesinden ayrılarak yeni kılcallara katılmasından dolayı, metastatik yayılımı da önemlidirler (26).

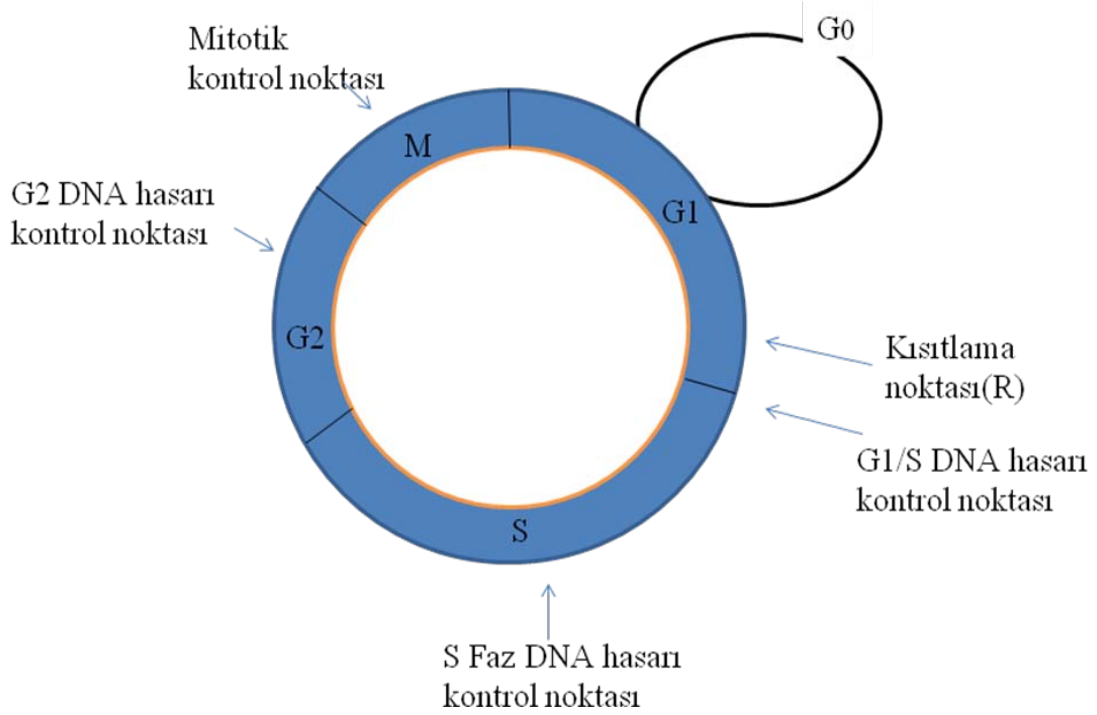
Kanser hücreleri, normal hücreler gibi farklılaşmayıp, kontrolsüz çoğalmalarıyla uyumlu olarak, farklılaşmanın erken aşamalarında kalırlar. Kandaki farklı hücrelerin tümü, kemik iliğindeki ortak bir kök hücreden köken alarak eritrosit, lenfosit, granülosit ve makrofajlara farklılaşırlar. Lösemi hücreleri ise, farklılaşmayıp olgunlaşmanın erken evrelerinden birindeki durumlarını koruyarak, bölünme ve çoğalma yeteneklerini sürdürürler (27).

Programlı hücre ölümü, birçok hücre türünde farklılaşmanın temel öğelerindendir (27). Kanser hücrelerinin çoğunda programlı hücre ölümü görülmediğinden, bu hücreler normal hücrelerden çok daha uzun yaşarlar. Kanser hücrelerinin programlı hücre ölümünden etkilenmemesi, tümör gelişimini önemli ölçüde hızlandırır (27). Normal hücrelerde, DNA hasarı gerçekleştiğinde programlı hücre ölümü başlatılır, ama kanser hücrelerinde bu durum gerçekleşmez. Kanser hücrelerinin programlı hücre ölümüne gidememesi, DNA hasarına yol açarak, etki eden kemoterapötik ilaçlara karşı direnç göstermelerine neden olur (27). Kanser hücreleri, programlı hücre ölümünden kaçışlarına ek olarak, ökaryotik kromozomların uçlarını kısaltmaktan koruyan telomeraz enziminin sentezi nedeniyle de sınırsız replikasyon yeteneğine sahiptirler (27).

Kanser gelişimine neden olan temel değişiklik, kanser hücrelerinin sürekli ve kontrolsüz olarak çoğalma isteğidir (19). Kanser hücreleri, hücrenin normal davranışlarını kontrol eden uyarılara, normal tepkiyi göstermek yerine, kontrolsüz biçimde çoğalır ve büyümelerini sürdürürler (27). Bu çoğalmaya bağlı olarak normal doku ve organları da istila ederek, sonunda tüm vücuda yayılırlar. Kanser hücrelerinde ortak olan özellik; çoğalmayı denetleyen mekanizmaların yani hücre döngüsünün kontrolünün ortadan kalkmasıdır. Bu durumun gelişmesinde çok hücreli sistemlerde biriken anomaliler önemli rol oynamaktadır (19).

2.2. Hücre Siklusu

Kanser hastalığının tanımındaki en temel nokta, hücrelerin normal büyüme/çoğalma kontrolü olmaksızın çoğalmalarıdır. Bölünen ve çoğalan bu hücreler, ya köken aldıkları noktada ya da yayılarak ulaştıkları diğer noktalarda, vücudun normal işlevlerini engellerler. Kanser hücrelerinin yeni damar oluşturma, metastaz yapma ve programlı hücre ölümünden kaçma gibi özellikleri de olmakla birlikte, kanser hastalığının temelinde sınırlandırılmayan hücre çoğalması yatmaktadır (28). Hücre çoğalması; hücrelerin hacim ve içerik olarak büyümeleri, DNA'larını iki katına çıkarmaları ve iki yavru hücre oluşturmaları şeklindeki sırayı takip eden döngüsel bir işlemdir. Bu döngü, hücrenin bölünme için gerekli hazırlığı yaptığı G_1 evresi, DNA'sını iki katına çıkardığı S evresi, bölünmeye hazırlandığı G_2 evresi ve genetik materyalin eşit şekilde dağıtılarak iki yavru hücrenin oluşturulduğu M evresinden oluşur (28). Hücresel çoğalmanın karmaşıklığı ve geri dönüşümsüz olması nedeniyle, hücre döngüsündeki evreler arasında kontrol noktaları vardır (Şekil 2.1.). Kontrol noktalarındaki en önemli özellik, bir evre bitmeden diğer evrenin başlatılmamasıdır (28).



Şekil 2.1. Hücre döngüsü ve kontrol noktaları şeması. Hücre döngüsü, DNA sentezinden önceki bir ara olan G_1 (gap), DNA'nın sentezlendiği S evresi, sentez sonrası ara; G_1 ve mitoz (M) evrelerinden oluşmaktadır. Geç G_1 , G_1 -S geçişi, S, geç G_2 ve mitozda hücre döngüsünün ilerlemesinin durdurulabileceği kontrol noktaları vardır (28).

2.2.1. Hücre siklusunun kontrol mekanizması

Hücre döngüsü, döngüye özgü bir takım proteinler olan siklinler, siklin-bağımlı serin/treonin protein kinazlar (CDK) ve siklin-bağımlı kinaz inhibitörleri (CDI) tarafından özgün olarak kontrol edilmektedir (28,29,30). Siklin, CDK ve CDI'ların düzeyleri hücre döngüsünün çeşitli aşamalarında farklılıklar gösterir ve karmaşık bir düzen içerisinde döngünün ilerlemesi sağlanır (28,29). CDK'lar kendi başlarına işlevsel değildir, siklin proteinleri ile birleşerek oluşan siklin-CDK kompleksleri varlığında işlev kazanırlar. Siklinler, bu komplekslerin düzenleyici alt üniteleri, CDK'lar ise katalitik alt üniteleridir (29). Siklinler (A, B₁, D ve E), hücre döngüsünün çeşitli evrelerinde döngüsel olarak bir taraftan sentezlenirken diğer taraftan da yıkılırlar. Bu proteinlerin yapım ve yıkım döngülerini vurgulamak amacıyla da 'siklinler' olarak adlandırılmışlardır (28,29).

Siklinler, periyodik yapım ve yıkımları ile ilişkili olan CDK (CDK2, CDK4, CDK5, CDK6, CDK7, CDK25)'ların işlevlerinin düzenlenmesini sağlarlar. CDK'ların işlevleri yalnızca siklinlerle düzenlenmemektedir, ayrıca özgün fosforilasyon defosforilasyona yol açan başka yollarla da düzenlenmektedir. CDI (p15, p18, p19 ve p27)'lar ise ya siklinlere, ya CDK'lara ya da siklin-CDK komplekslerine bağlanarak, CDK'ların işlevlerini engellerler. Siklinlerin hücrel derişimleri, transkripsiyon seviyesinde düzenlenmektedir. Yıkımları ise, ubiquitin metabolik yoluyla sağlanır (29). D tipi siklinler, (D1, D2 ve D3) başlama siklinleri olarak adlandırılır ve büyüme faktörleri veya mitojenlere yanıt olarak sentezlenirler. Mitojenler ortamdan uzaklaştırıldığında ise hızlıca yıkılırlar. Hangi tip siklin D'nin ifade edileceğı, doku tipine özgüdür. Örneğın, T lenfositlerde D3 tipi siklin ifade edilmektedir. D tipi siklinler, CDK4 ve CDK6'nın düzenlenmesinde rol alırlar (29). Siklin E, CDK2'nin düzenlenmesinde rol alır. G₁/S fazlarının sınırında geçici olarak sentezlenir ve hücre S fazına girdiğı anda hızlıca yıkılır (29). Siklin A ve B1, mitotik siklinlerdir. Siklin A, S fazı boyunca sentezlenir ve anafaz sırasında da yıkılır. Siklin A, CDK2 ile bileşim yapar ve bu bileşimin DNA replikasyonunda rol aldığı düşünölmektedir (29). Siklin B1, S fazının geç döneminde sentezlenir ve G2 fazından M fazına geçerken sentezi en üst seviyeye erişir, anafazda da yıkılır. Siklin B, CDK2 ile etkileşime girer ve oluşturdukları bileşim MPF (M-phase/maturation promoting factor) olarak da bilinir. Siklin B'nin anafazda yıkılmasıyla birlikte, hücre mitozdan çıkar ve G₁'e tekrar geri döner (29).

Hücre döngüsünde rol alan proteinler, protein-protein etkileşimleriyle birbirlerinin işlevlerini düzenlemektedirler. CDK'lar, siklinlerle etkileşerek işlev kazanırken, CDI'lar, CDK'ların işlevlerini engellerler. İşlev kazanan CDK'lar, substratları fosforilleyerek işlevsel hale getirirler. Etkilenen substratın durumuna göre, hücre döngüsü ya durur ya da bir sonraki aşamaya geçer. Örneğın, *pRb* hücre bölünmesi ve farklılaşmasının kontrolünde anahtar rol oynamaktadır (28,29,30). Farklılaşmasını tamamlamış, dinlenme durumundaki veya yaşlı 'senesence' hücrelerde *pRb* ifade edilir ve defosforile halde bulunur. *pRb*, normal işlevi gereğı, hücre döngüsünü G₁ fazının sonunda bulunan bir kontrol noktasında (G₁/S kontrol noktası) durdurur (28,29,30). *pRb*, hücre döngüsü üzerindeki bu engelleyici etkisini, bir transkripsiyon faktörü ailesi olan E2F ailesini bağlayarak gerçekleştirir. E2F ailesinin engellenmesiyle, hücre bir

sonraki faz olan S fazına geçemeyeceğinden, döngü durur. G_0 evresindeki bir hücre, bölünme uyarısı aldığı anda ise, hipofosforile durumda olan *pRb*, CDK'ların etkisiyle fosforillenir ve M evresine kadar fosforile durumda kalır. Fosforile durumdaki *pRb*, E2F ailesini bağlayamayacağından E2F serbest kalır ve hücre G_1 'den S evresine geçer. E2F ailesi, S evresine girişi sağlayan DNA polimeraz α , myc ve timidin kinaz gibi bir takım düzenleyici proteinlerin gen ifadelerini olumlu yönde etkiler (28,29,30).

Sonuç olarak, CDK'ların işlev kazanmaları ya da engellenmeleri, *pRb* ve E2F üzerinden hücre döngüsünün ilerlemesine ya da durmasına neden olmaktadır (28,29).

2.3. Apoptozis

Programlı hücre ölümü, erişkin dokularının korunmasında ve embriyo gelişiminde anahtar rol oynayan, normal fizyolojik bir olaydır. Erişkinlerde programlanmış hücre ölümü, hücre çoğalmasının dengelenmesi ve dokulardaki hücre sayısının korunmasında önemlidir. Gelişim sırasında birçok dokuda istenmeyen hücrelerin elenmesinde, programlı hücre ölümü anahtar rol oynamaktadır. Programlı hücre ölümü, hasarlı veya tehlike oluşturabilecek olan hücrelerin ortadan kaldırılmasını sağlayarak, bir savunma sistemi de oluşturur. Örneğin, virüsle bulaşmış hücreler sıklıkla programlı hücre ölümüne girerler. Böylece yeni virüs taneciklerinin oluşumu engellenmiş ve virüsün konak organizma içinde yayılımı sınırlandırılmış olur (31). DNA hasarı gibi durumlar da, programlı hücre ölümünü uyarır. Örneğin, kanser gelişimine yol açabilecek hasarlı DNA'ları taşıyan hücreler, programlı hücre ölümüyle ortadan kaldırılırlar (31).

Programlı hücre ölümü 'apoptozis' ilk defa 1972 yılında tanımlanmış olup, dokulardaki hücre azalmalarından sorumlu ve yapısal olarak özgün olan bir hücre ölüm tipidir. Programlı hücre ölümü, dokularda gelişen bir diğer ölüm şekli olan nekrozisten birçok özelliği açısından farklı olan bir hücre ölüm şeklidir. Programlı hücre ölümünün özgün olması, nekrozisla karşılaştırıldığında daha iyi anlaşılabilir (29). Nekrozda, hücre içine aşırı sıvı girmesi sonucu hücreler şişerken, programlı hücre ölümünde hücreler tam tersine küçülür. Nekrozda, kromatin yapısı hemen hemen normal hücredekine benzer görünürken, programlı hücre ölümünde, kromatin yapısı çekirdek zarının çevresinde toplanarak yoğunlaşır. Nekrotik hücrelerde plazma zarının bütünlüğünü

kaybederek, hücre içeriğinin dışarı çıkmasıyla enflamasyon gelişir. Programlı hücre ölümünde ise, hücre zarı bir bütündür, hücre zarında küçük cepçikler oluşur. Daha sonra bu yapılardan makrofajlar ve komşu hücreler tarafından fagosit edilen, farklı miktarlarda hücre içeriği olan ‘apoptotik cisimcikler’ gelişir. Programlı hücre ölümünde görülen bir diğer değişiklik de, plazma zarının iç yüzünde bulunan fosfotidil serin molekülünün erken evrede zarın dış yüzüne geçmesiyle komşu hücre ve makrofajlar tarafından bu hücrelerin tanınmasında rol oynamasıdır (29).

Programlı hücre ölümünün en özgün yönlerinden biri, DNA’nın DNaz tarafından nükleozomlar arasından kesilmesiyle, 170-200 baz çiftlik ya da katları şeklinde DNA parçacıklarının oluşturulmasıdır. Bu durum, agaroz jel elektroforezinde merdiven görüntüsü oluşmasına neden olmaktadır (29).

Programlı hücre ölüm mekanizmasının anlaşılmasına yönelik veriler, *C. Elegans*’ın gelişimi sırasında gerçekleştirilen çalışmalardan elde edilmiştir. Normal nematod gelişimi sırasında, toplam 1090 vücut hücresinin 131’inin programlı hücre ölümüyle ortadan kaldırıldığı bildirilmiştir. Programlı hücre ölümünde *ced-3* ve *ced-4* olarak adlandırılan iki gen gereklidir ve bu genlerden herhangi birisinin işlevi engellenecek olursa, normal programlı hücre ölümü gerçekleşmeyeceği bildirilmiştir. Diğer bir gen olan *ced-9* ise, programlı hücre ölümünü engellemektedir ve bu gende gerçekleşecek olan bir işlev kaybı, normalde sağ kalacak olan hücrelerin de ölmesine neden olmaktadır. Memelilerde de *ced-3*, *ced-4* ve *ced-9* ile ilişkili genler tanımlanmıştır (31). Bu genlerin kodladığı proteazlar, aktif bölgelerinde sistenin (C) içerdikleri ve substratlarını aspartik asitten (Asp) sonra kestikleri için ‘kaspaz’lar olarak tanımlanmışlardır (31,32). Kaspazlar, işlevsiz öncüller olarak sentezlenirler ve genellikle diğer kaspazlar tarafından katalizlenen proteolitik kesim ile işlev kazanırlar. (31,33). Başlatıcı kaspazın işlev kazanmasıyla, aşağı yöndeki diğer kaspazlar da işlev kazanırlar ve böylece hücre ölümünü sağlayan bir zincirleme tepkime başlatılmış olur (29,33).

Nematodlardaki *ced-4*’ün, memelilerdeki eş yapısı Apaf-1 (Apoptotic Protease Activating Factor-1) olarak adlandırılan bir protein kodlamaktadır ve bu protein kaspazlara bağlanarak kaspazların işlev kazanmalarına neden olmaktadır. *Ced-9*,

nematodlarda kaspazların işlevlerini engelleyen bir protein kodlar, memelilerde ise bu durum Bcl-2 ailesi olarak adlandırılan bir protein ailesi tarafından düzenlenmektedir (32,33). Bcl-2 ailesi, geniş bir aile olup Bax, Bad, Bid, Bcl-X5 gibi bir kısım üyeleri programlı hücre ölümünü olumlu etkilerken, Bcl-2, Bcl-X1 gibi bazı üyelerinin de programlı hücre ölümünü olumsuz etkilediği bildirilmiştir (33). Bcl-2 ailesinin üyeleri kendi aralarında eş-ikili ya da farklı ikili yapılar oluştururlar (31,33). Bir hücrenin yaşayabilirlik durumu, bu ailenin programlı hücre ölümünü özendiren üyeleri ile programlı hücre ölümünü engelleyen üyelerinin nisbi oranına bağlıdır (29,31). Bcl-2/Bax oranı, bazı hematolojik kanserlerde belirteç olarak değerlendirilmektedir (29). Bcl-2 proteini, özellikle mitokondri dış zarında bulunmaktadır ve mitokondriye iyon giriş-çıkışının düzenlenmesinde rol almaktadır (31,32). Bax proteini ise, sitoplazmada bulunmakta ve programlı hücre ölümü uyarısı oluşmasında önemli rol oynamaktadır (29,33). Programlı hücre ölümü, başlangıç noktaları göz önüne alındığında iki farklı yolak olarak incelenebilir (32).

Bu yolaklardan ilki 'intrinsic' ya da mitokondriyal yolak olarak adlandırılır ve bu yolakta mitokondri anahtar rol oynar. Bu yolaktaki başlangıç uyaranlar henüz tam olarak aydınlatılmamış olmakla birlikte, Bcl-2 protein ailesinin öncü- ve ters- apoptotik üyeleri arasındaki dengenin bozulması, bu yolağın başlamasında etkin rol oynamaktadır (29,32).

Programlı hücre ölümündeki yolaklardan ikincisi ise 'ekstrinsic' yolak olarak adlandırılır ve hücre yüzeyindeki farklı apoptotik reseptörlerle düzenlenir (32). Bu reseptörler, TNF-, FAS- ve TRAIL-(TNF-related apoptosis inducing ligand) gibi Tümör Nekrozis Faktör (TNF) süper ailesinin üyeleridir. Bu reseptörlerin hepsinde, hücre içinde yerleşik olan ve 'death domain' olarak adlandırılan ortak bir yapı bulunmaktadır. TNF- α , FAS-L veya TRAIL gibi bir uyarının hücre dışından ilgili reseptörlere bağlanması, DISC (Death-Inducing Signaling Complex) olarak adlandırılan ve bu reseptörlerdeki 'death domain'lerin çevresinde FADD (FAS-associated death domain protein), pro-kaspaz-8 ve pro-kaspaz-10'un birleşerek meydana getirdiği yapının oluşumuna neden olmaktadır (33).

Tip 1 olarak adlandırılan hücrelerde işlev kazanan kaspaz, doğrudan diğer kaspazları etkilemekte ve programlı hücre ölümünü başlatmaktadır. Tip 2 olarak adlandırılan hücrelerde ise mitokondrinin etkisi gereklidir. Tip 2 hücrelerde, aktifleşen kaspaz-8, Bcl-2 ailesinden Bid proteinin yalnızca BH3 bölgesini keser ve işlev kazanan Bid de mitokondri içerisine girerek, programlı hücre ölümünün devam etmesi için gerekli diğer bileşenlerinin salınımını uyarır. Böylece programlı hücre ölümü, dışardan gelen uyarı ile başlar, mitokondrinin de etkisiyle gerçekleştirilmiş olur (32,33).

2.4. Kanser Genetik Arasındaki İlişki

Kanser genleri, ilk olarak kansere neden olan virüslerden türeyen genlerin tanımlanmasıyla ortaya konulmuş ve bu genlerin hücre dönüşümünü baskın (dominant) bir tarzda gerçekleştirdikleri bulunmuştur. Bu genler, tümör gelişimine yol açtıkları için ‘onkogen’ler olarak isimlendirilmişlerdir. Kansere neden olan genlerin bulunması, kanseri engelleyen genlerin de olabilirliğini düşündürmüştür (34).

Somatik hücre melezleme çalışmaları, tümör baskılayıcı genlerin varlığını ortaya koymuştur. Aynı çalışmalar, tümör baskılayıcı genlerin çekinik genler olduklarını ve kötü huylu oluşum için, hücredeki işlevlerinin tamamen ortadan kalkmasının gerektiğini düşündürmüştür (34). 1969 yılında gerçekleştirilen bir seri somatik hücre melezleme çalışması A9 hücrelerinin, kötü huylu dönüşümü gerçekleşmiş olan hücrelerdeki tümör gelişimini baskıladıklarını göstermiştir (34,35). Knudson, gerçekleştirdiği çalışmalar ile insan tümör baskılayıcı genlerin varlığını doğrulamış ve tümör gelişimi için ‘two hit’ olarak adlandırılan bir model önermiştir (34,36,37).

Knudson, tek taraflı (unilateral) ve çift taraflı (bilateral) retinablastom hastalarında gerçekleştirdiği karşılaştırma çalışmaları sonucunda, baskın olan kalıtsal retinablastom ile kalıtsal olmayan retinablastom arasında, mekanik bir ilişkinin olduğu şeklindeki ilk hipotezini öne sürmüştür (34).

Kalıtsal formda ilk mutasyonun kalıtsal olarak aktarıldığını ve diğer mutasyonun da somatik hücrelerde oluşarak, genellikle çift taraflı retinablastom gelişimini başlattığını öne sürmüştür. Kalıtsal olmayan ve genellikle tek taraflı olan formda ise, retinablastom gelişmeden önce somatik hücrelerde iki mutasyonun gerçekleşmesi gerektiğini ifade etmiştir. 1986 yılında *Rb* geninin klonlanması, Knudson'un bu hipotezini doğrulamıştır. Heterozigotluk kaybı (Loss of Heterozygosity; LOH) çalışmaları, *Rb* geninin hem kalıtsal hem de kalıtsal olmayan retinablastomlarda ve diğer tümörlerde, her iki allelde de mutasyon taşıdıklarını ortaya koymuştur. Bu bulgu, tümör baskılayıcı genlerin kanser gelişiminde çekinik genler olduklarının ve iki allelin de mutasyona uğraması durumunda kanser geliştiği inancını pekiştirmiştir (34).

Li ve Fraumeni 1969 yılında rabdomiyosarkom, osteosarkom ve meme kanserinin kadınlarda ailesel olarak kalıtıldığını tanımlamışlardır (34).

Yapılan çalışmalarla, Li-Fraumeni sendromunun *TP53* geninin mutasyonu sonucunda oluştuğu ortaya konulmuştur (34,38). Birçok tümörde de, *TP53* geninin iki kopyasının mutasyona uğramış olduğunun belirlenmesinden sonra, tümör baskılayıcı genlerin 'two hit' modeliyle işlevlerini kaybettikleri, tümör biyolojisinde, temel bir inanç olmuştur (34).

2.4.1 Onkogenler

Onkogenler, protoonkogenlerden köken alırlar ve hücrelerin büyümesi lehine faaliyet gösteren genlerdir. Bu genlerde gerçekleşen nokta mutasyonu, translokasyon ve gen çoğalması (amplifikasyonu) hücre replikasyonunun sürekli hale gelmesine neden olur. Onkojen aracılı hücre çoğalması olabilmesi için, allellerden yalnızca bir kopyasının mutasyona uğramış olması yeterlidir (39). Örneğin, *Ras* geninin 12. 13. ve 61. kodonlarında gerçekleşen mutasyonlar, Ras protein ürününün sürekli olarak çoğalma uyarısı oluşturmaya neden olur ve böylece hücre dönüşüm özelliği kazanır (40).

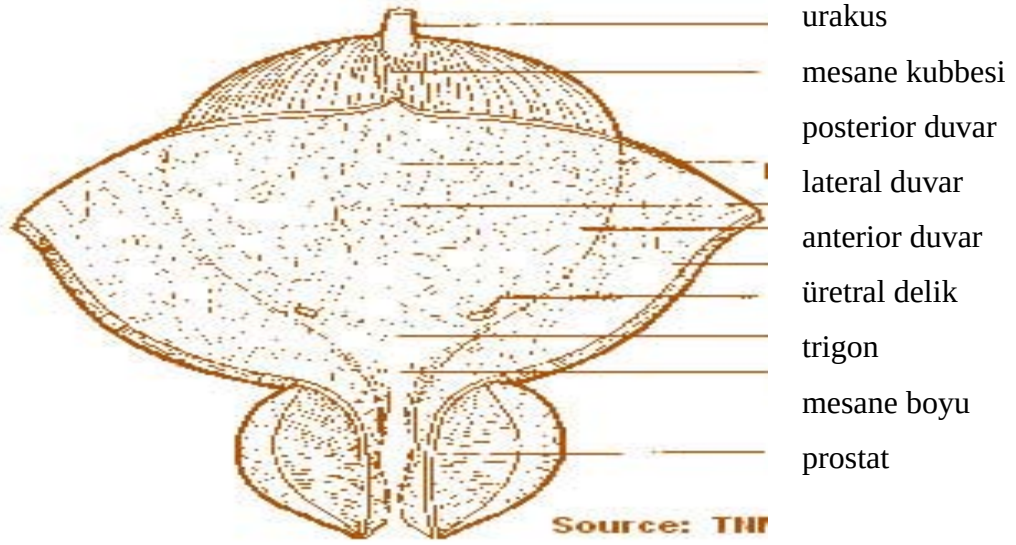
2.4.2 Tümör baskılayıcı genler

Tümör baskılayıcı genler, hücre döngüsünün düzenlenmesi, hücre yaşlanması, DNA tamir mekanizması, uyarı iletimi ve programlı hücre ölümü gibi hücresel faaliyetlerini düzenleyen genleri kodlamaktadırlar (14,41,42). Ayrıca tümör baskılayıcı proteinler, dışarıdan gelen sinyallerin hücre içine taşınmasında, genetik ve metabolik hasarlarda duyarlılık oluşturma ya da cevap vermede, düzenleyici diğer proteinlerin hücre içindeki yerlerinin belirlenmesinde, nükleus veya sitoplazmadaki diğer enzimlerin faaliyetlerini düzenlemek için kinaz işlevi göstermede ve hücre yaşamasını, büyümesini kontrol eden genlerin düzenlenmesinde rol alan transkripsiyon faktörlerinin düzenlenmesinde de rol almaktadırlar (8,14,42). Tümör baskılayıcı genler, 3 sınıfa ayrılabilir. Bunlar; *Tp53* ve *p16* gibi karsinogenezin erken döneminde mutasyona uğrayanlar, *BRCA2* gibi hücrenin genomik bütünlüğünün sağlanmasında görev alanlar ve *LOX* geni gibi tümörle doğrudan ilişkili olmayıp da tümörün içinde mikro çevre üzerine etkili olan genlerdir (39,43).

2.5. Mesane

2.5.1 Mesanenin anatomisi ve fizyolojisi

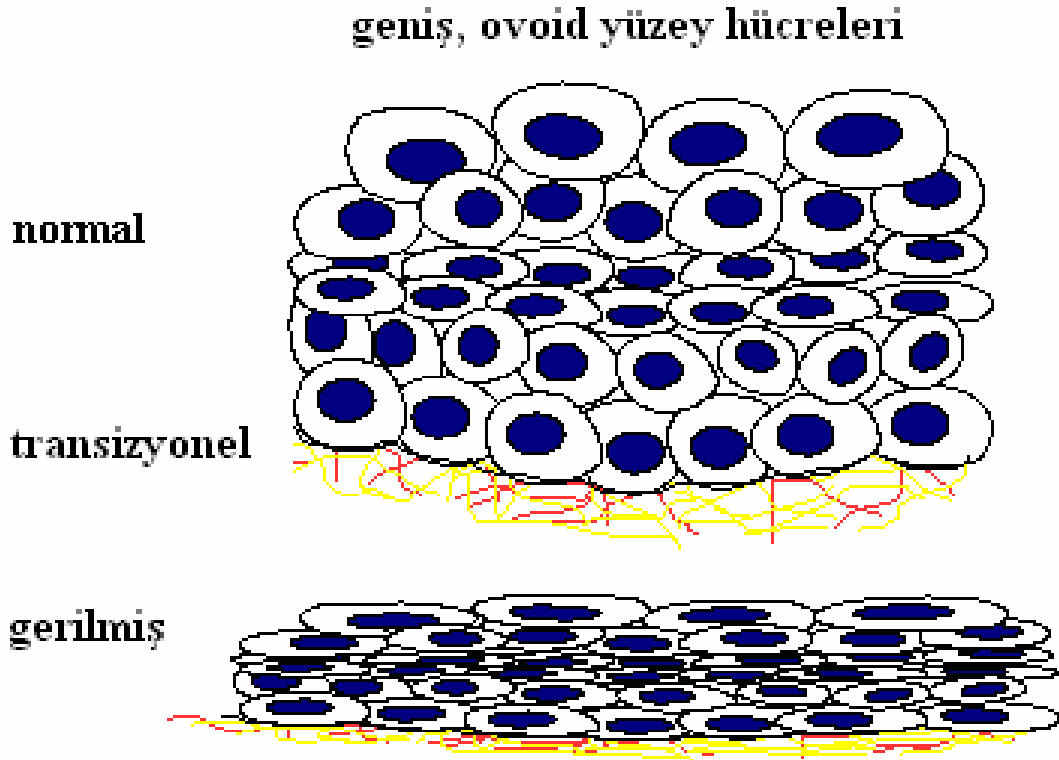
Mesane, pubik kemiğin hemen arkasında, karnın en aşağı noktasındaki pelvisin ortasında yer alan müsküler bir organdır. Çok önemli 2 görevi vardır. Bunlardan ilki; üreterler aracılığı ile böbreklerden gelen idrarı yaklaşık 500 ml hacme kadar, içerisinde belirgin bir basınç artışı olmadan ve idrarın içinde erimiş durumda bulunan katı maddelerde bir çökeltme olmadan depolamaktır. İkincisi ise; idrar belirli bir hacme ulaştığında oluşan idrar yapma refleksi sonucu ani bir basınç artışı ile depolanmış olan bu idrarı istemli olarak dışarı pompalamaktır (44).



Şekil 2.2. Mesanenin anatomisi ve şekli

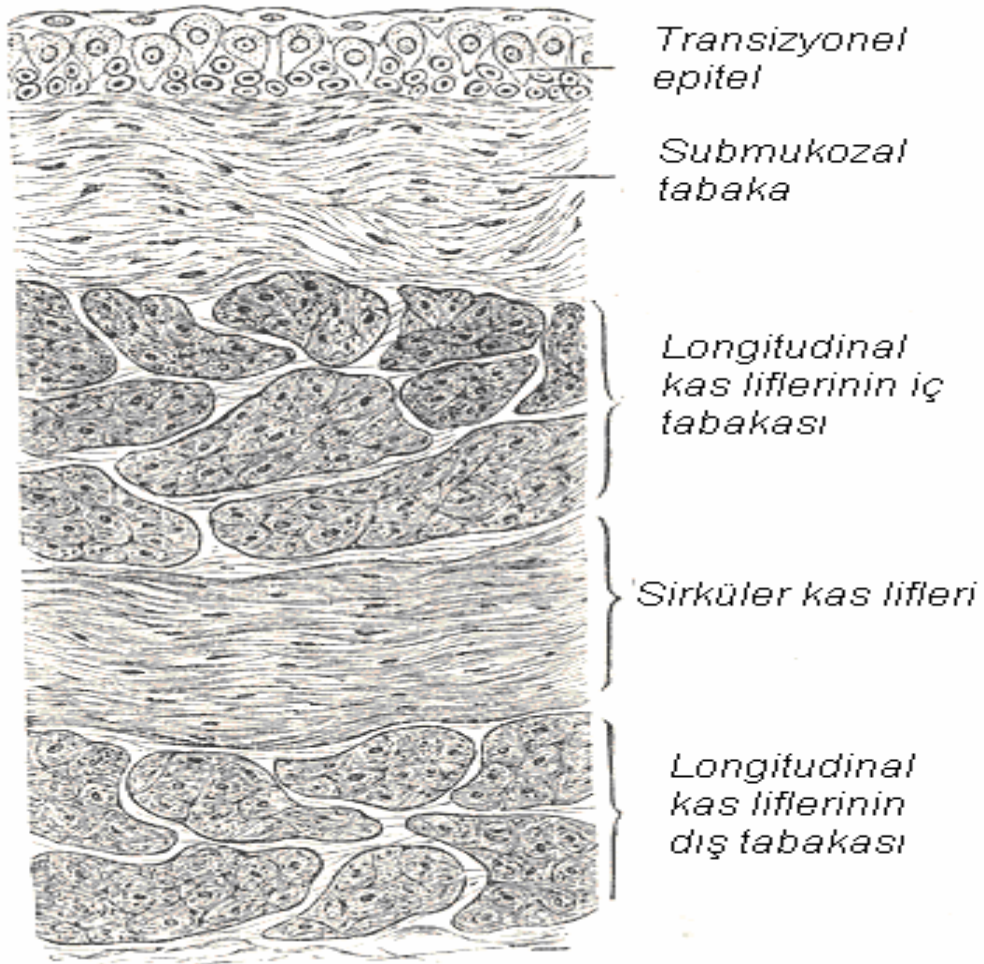
2.5.2 Mesanenin histolojisi

Mesane mukozası, değici epitel ve gevşekten sıkıya doğru değişen bağ dokusunun yaptığı lamina propriadan oluşur. Mesanenin çevresindeki lamina propriayı, örgü biçimde yoğun düz kas tabakası sarar. Mesane gevşek iken, epitelyum 5-6 sıra hücreden oluşur; yüzeydeki hücreler yuvarlaktır ve lümene uzanır. Bu hücreler genellikle poliploid ve çift çekirdekli. Epitel gerildiğinde, epitelin kalınlığı 3-4 hücre sırasından oluşur ve yüzeydeki hücreler yassılaşır (44).



Şekil 2.3. Transizyonel hücrelerin basınç altındaki değişimleri

Değişken epitelin yüzeyindeki hücrelerin kalın plaklardan oluşan özel bir membranı bulunur. Bu plaklar, idrarla doku sıvıları arasında ozmotik bariyeri oluşturduğu düşünülen, daha ince bir membranın yaptığı dar şeritlere bölünür. Mesane kasıldığında, membran ince bölümlerden katlanır ve kalın plaklar, içi şeklinde sitoplazmik veziküller oluşturacak şekilde içeri çöker. Bu veziküller, boş mesanenin yüzeyinde bulunan hücrelerin sitoplazması içinde bu kalın plakların yerleştiği depolar olarak iş görürken, dolu mesanede artan hücre yüzeyine yayılırlar (44).



Şekil 2.4. Mesane duvarının histolojisi

Mesanedeki kas lifleri mesane boyuna ulaşıncaya dek her yöne dağılırlar. Burada 3 ayrı tabaka seçilir: erkeklerde mesane boyunun distalinde yer alan içteki longitudinal tabaka, prostatik üretra ve prostat parankimi çevresinde sirküler hale geçer. Dişilerde dış açılışa (metausa) dek uzanır. Bu kas lifleri, gerçek üretral sfinkteri oluşturur. Orta tabaka, erkekte prostat sonuna dek devam ederken; dişide dış üretra metausuna dek ilerler (44).

2.6. Mesane Kanseri

Mesane kanseri görülme sıklığı bakımından, Amerika Birleşik Devletleri'nde erkeklerde görülen kanserler içerisinde 4. kadınlarda ise 9. sıradadır (44). Türkiye'de görülme sıklığı KİDEM (Kanser İzlem ve Denetim Merkezi) çalışmalarına göre akciğer kanserinden sonra 2. sırada, ürogenital kanserler arasında ise erkeklerde ilk sıradadır.

Yeni tanı konan olguların % 74' ü yüzeysel, % 18' i lokal ileri evre ve % 18' i de uzak metastaz yapmış durumdadır (45). İlk tanıda kas invazyonu bulunmayan (Ta, T1 evre) hastalarda, primer tedavi seçeneği olan transüretral rezeksiyon (TUR) sonrası uygulanan ek tedavilere rağmen, % 30-85 nüks olasılığı vardır. Buna ek olarak, % 10-15 olguda da zaman içerisinde kas tutulumu gerçekleşebilir (45,46). Kas invazyonu gelişen hastalarda, evre ilerlediği için ideal tedavi olarak radikal cerrahi gündeme gelmektedir. Mesane kanseri, erkeklerde kadınlara göre 2,5 kat daha fazla görülür ve ortalama görülme yaşı erkeklerde 69, kadınlarda ise 71 olarak saptanmıştır (44,47).

Mesane tümörlerinin % 90'ından fazlası, en iç tabaka olan mukozayı oluşturan ve değişici epitel adı verilen özel hücre yapısındaki atipik değişikliklerden kaynaklanır. Bu tip tümörler, erken safhalarda bu tabakada sınırlı kalırlar ve değişici epitel hücreli kanserler (transizyonel hücreli karsinoma: THK) olarak adlandırılırlar. Bunların dışında, nadiren de olsa mesanenin diğer tabakalarından kaynaklanan farklı tümörler gelişebilir. Bu lezyonlar, genellikle papiller özellik gösterir ve mesane içerisinde yer işgal eden lezyonlardır (48).

Daha az oranda ise 'ülser lezyonlar' şekilde olabilirler. Ülserleşmiş yapıda olan tümörler, daha agresif olma eğilimindedir. Kanser, belli bir süre sadece mesane lümenine doğru ilerleme gösterir. Bir sonraki aşama, kanserin dışarı doğru, mesanenin kas tabakasına yayılmasıdır. Aynı zamanda, kanser lümende daha da büyür ve çevreye doğru yayılır. İlerleyen kanser, mesane duvarını aşarak peritonu veya mesanenin dış tarafındaki diğer dokuları invaze edebilir. Kanser mukozayla sınırlı kaldığında, uzak lenf düğümlerine veya daha öteye metastaz yapması beklenen bir durum değildir. Ancak mesane duvarı kası tutulduğunda, kanserlerin yaklaşık % 13'ü de lenf düğümlerine metastaz yapmış olur (48).

Mesane tümörlerinde tedavinin şeklini belirleyen en önemli faktör, tümörün derinliğinin hangi tabakaya kadar ulaştığıdır. Sayısı ve büyüklüğü ne olursa olsun, tümör ya da tümörlerin derinliği mukoza tabakasını geçmiyorsa, bu tip tümörler ‘yüzeysel tümörler’ olarak sınıflandırılırlar. Tedavileri de genellikle mesanenin yerinde bırakılıp, tümörün kapalı yolla çıkartılması (tümör rezeksiyonu) şeklindedir. Nüks oranı % 40–80 arasında değişmektedir. Bu tip tümörler tamamen çıkarılsa da zaman içerisinde mesanenin farklı bölgelerinden nüks görülebileceği için, mesane içine koruyucu ilaç tedavileri uygulanabilmektedir. Tümör ya da tümörlerin sayısı ve büyüklüğü ne olursa olsun, derinliği mukoza tabakasını geçmiş ve kas dokusunu invaze etmişse, bunlar ‘derin ya da invaziv tümörler’ olarak sınıflandırılırlar. Tedavide; mesanenin ve çevresindeki prostat rahim gibi komşu organ ve dokuların çıkarılması gerekir. Aksi takdirde tümör hücreleri çok kısa sürede kan ve lenf damarları yolu ile başka organlara yayılırlar. Bu tip tümörlerde bir başka tedavi seçeneği de radyoterapidir. Bu tedavilere ek olarak invaziv ve metastatik mesane tümörlerinde kemoterapi uygulamaları da gerekebilir (48).

2.6.1. Tümör dereceleri

Mesane kanseri için yaygın kabul gören tek bir dereceleme sistemi yoktur. Genelde kullanılan sistemler, tümör hücresindeki anaplazi derecesine göre düzenlenmiştir (49,50). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından yapılan histopatolojik sınıflandırma (Tablo 2.1.) dünyanın hemen her tarafında kullanılmaktadır.

PTNM patoloji sınıflandırması;

- G;** Histopatolojik evre belirlemesi,
- Gx;** Farklılaşma evresi değerlendirilemiyor,
- G1;** İyi farklılaşmış,
- G2;** Orta derecede farklılaşmış,
- G3-4;** İyi farklılaşmamış / farklılaşmamış.

Tablo 2.1. WHO tarafından yapılan histopatolojik sınıflandırma

Primer Tümör (T)

- Tx:** Bilinmeyen primer tümör,
To: Saptanamayan primer tümör,
Ta: İnvaziv olmayan papiller karsinom,
Tis: Karsinoma in situ,
T1: Subepitelial bağ dokusuna invaze tümör,
T2: Kasa invaze tümör,
T2a: Tümör yüzeysel kas dokusuna invaze (iç yarı),
T2b: Tümör derin kas dokusuna invaze (dış yarı),
T3: Tümör perivezikal dokuya invaze,
T3a: Mikroskobik,
T3b: Makroskobik (ekstravezikal kitle),
T4: Tümör komşu organlara invaze,
T4a: Tümör prostat, uterus veya vajinaya invaze,
T4b: Tümör pelvis ve / veya karın duvarına invaze,

Bölgesel Lenf Nodları (N)

- Nx:** Bilinmeyen lenf nodu metastazı,
No: Bölgesel lenf nodu metastazı yok,
N1: Tek bir lenf nodunda 2 cm' den küçük metastaz,
N2: Tek bir lenf nodunda 2-5 cm arasında ya da birden fazla lenf nodunda <5 cm olmayan metastaz,
N3: 5 cm< lenf nodu metastazı,

Uzak Metastaz (M)

- Mx:** Bilinmeyen uzak metastaz,
Mo: Uzak metastaz yok,
M1: Uzak metastaz var,

Tablo 2.2. Mesane Tümörlerinin TNM sınıflandırılması

Tümör derecesi ve evresi arasında, belirgin bir ilişki bulunmaktadır. İyi ve orta diferansiye tümörlerin çoğu yüzeysel iken, kötü diferansiye tümörler invaziv olma eğilimindedirler (52). Sitogenetik ve moleküler verilere göre düşük dereceli (iyi ve orta diferansiye) tümörlerle, yüksek dereceli (kötü diferansiye) tümörlerin orijini farklıdır. Düşük dereceli tümörler, kromozom 9'da bir veya daha fazla tümör supressor gen kaybederken, yüksek dereceli tümörlerde p53, pRb ve p16 kromozom anormallikleri görülmektedir (50,53).

WHO ve Uluslararası Ürolojik Patoloji Topluluğu (ISUP), 1988 yılında yapılan konferansta, genel kabul görececek bir sınıflandırma sistemi geliştirilmesini amaçlamış ve bu konferans sonrasında bu tümörlerin 'papiller ürotelyal neoplazmlar' olarak sınıflanmasına karar verilmiştir (54).

'Papilloma' (derece 0); normal mesane mukozası ile çevrili fibrovasküler çekirdekli papiller lezyondur (55,56). Ürotelyal tümörlerden farklı olarak histolojik anormallik yoktur ve endoskopik rezeksiyondan sonra tekrarlamaz. Tek lezyon olarak saptandığında, benign kabul edilir ancak sıklıkla yüksek dereceli ürotelyal tümörlerle birlikte görüldüğü unutulmamalıdır (55).

İyi diferansiye (derece 1) tümörler; mukozayla sınırlı olduklarında WHO ve ISUP tarafından düşük malignite potansiyeli olan papiller ürotelyal tümörler olarak tanımlanmışlardır (54). Bununla birlikte, sıklıkla tekrarlamakta hatta nüksler daha yüksek histolojik derece ve evrede olabilmektedir (55). Yüksek dereceli tümörlerle birlikte bulunabilmesi ve derece 2 tümörlerle benzer prognostik özellikler göstermesi nedeniyle dikkatle izlenmelidirler (55).

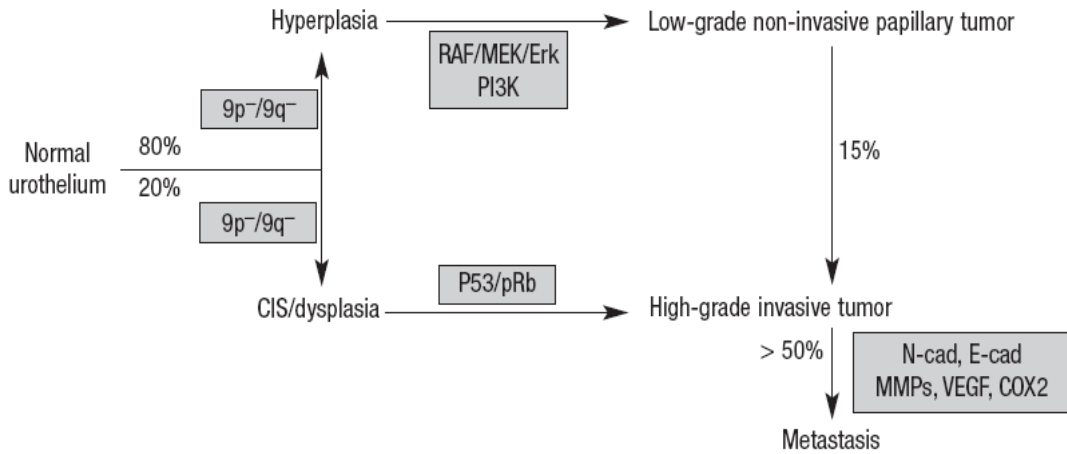
Orta derece diferansiye (derece 2) tümörler; WHO ve ISUP tarafından düşük dereceli ürotelyal karsinom olarak tanımlanmıştır (55).

Kötü diferansiye (derece 3) tümörler; WHO ve ISUP tarafından yüksek dereceli ürotelyal karsinom olarak tanımlanmıştır. Düşük dereceli lezyonlara göre çok fazla progresyon riski vardır, aynı zamanda bu olgularda eş zamanlı invaziv hastalık görülme riski de fazladır (55).

2.6.2. Mesane kanserinin moleküler biyolojisi

Mesane kanserinde papiller ve non-papiller olmak üzere en az iki yolak olduğu düşünülmektedir (Şekil 2.5.). Papiller lezyonlar, hiperplazik ürotelyumdan meydana gelirken, invaziv tümörler displazik ürotelyumdan meydana gelir. Papiller tümörler genellikle RAF/MEK/ERK ve PIK3CA yolağındaki genlerin değişimi ile alakalıdır. Non-papiller invaziv tümörler ise p53 ve pRb yolağındaki değişimlerle alakalıdır. Her iki yolağın da başlangıcında 9. Kromozomda meydana gelen değişimler olduğu düşünülmektedir (58).

Düşük dereceli mesane kanserli hastaların yaklaşık %80'i süperfisyal mukoza ile sınırlıdır. Bu yüzeysel tümörlerin tekrarlama riski, %70'lerdedir. Bunların da yaklaşık %30'u, daha yüksek dereceye ve evreye ilerleme gösterir. Tüm mesane kanserli hastaların %15-30 kadarı başta kasa invaziv özellik gösterir ve bunların da yaklaşık %50'si 2 yıl içinde metastatik olarak nükseder (59).



Şekil 2.5. Mesane tümörlerinin moleküler yolları

2.6.3. Karsinogenezin başlangıcı onkogenler ve kromozomal değişiklikler

Mesane kanserindeki DNA değişiklikleri, sitogenetikten heterozigotluğun kaybına (LOH) kadar pek çok yönden çalışılmıştır. DNA değişikliklerinin mutasyonlar, translokasyonlar, allel kaybı gibi pek çok nedeni olabileceği düşünülmüştür. Bu değişimlerin sentezlenen protein ürünlerini de değiştirebileceği bildirilmiştir (58).

Moleküler onkolojideki ilk çalışmalar, onkogenler üzerine yoğunlaşmıştır. Onkogenler, normal hücresel genlerdir, fakat normal gen ürününün aşırı ekspresyonu veya protein ürününün değişmiş fonksiyonu, malign fenotip ve tümör oluşumuna yol açabilmektedir. Normal gen ürününün aşırı ekspresyonu, genellikle güçlü bir promotorun olduğu gen bölgesindeki kromozomal translokasyon veya gen amplifikasyonu ile gerçekleşmektedir. Mutasyona uğramış protein ürününün ekspresyonu, malign fenotipin aktivasyonuna da yol açabilmektedir (60).

2.6.4. Mesane kanserlerinde tümör baskılayıcı genler

Moleküler teknikler kullanılarak son yıllarda yapılan kapsamlı araştırmalar, farklı kromozomlarda birkaç anahtar tümör baskılayıcı genin bulunmasını sağlamıştır. Yüksek dereceli, kas invazyonu yapan mesane kanserlerinde kromozom 3 ve 8'in kısa kollarında delesyonlar tespit edilmiştir. 8p delesyonları, yüzeysel transizyonel hücre karsinomunda hiç görülmezken, invaziv TCC (Transitional Cell Carcinoma)'nin %50'sinden fazlasında gözlenmiştir. Kromozom 8'in kısa kolundaki heterozigotluğun kaybı, aynı zamanda TCC'nin yüksek derece ve evreleriyle de alakalı olduğunu düşündürmektedir (59).

Mesane kanserinde bulunan en önemli kromozomal delesyonlar, kromozom 9, 13 ve 17'dedir. Bunlardan kromozom 13'teki retinoblastoma (*Rb*), kromozom 17'deki *p53* ve kromozom 9'daki *p21* tümör baskılayıcılarıyla alakalıdır. Kromozom 9'daki delesyonlar, TCC'de en çok görülen kromozom anormallikleri olup ve her aşama ve evredeki TCC'nin %50'sinden fazlasında bulunur. Kasa invaziv mesane tümörlerinde, diğer kromozomal değişiklikler görülse de, Ta ve T1 tümörlerinin çok azında kromozom 9 haricinde değişiklikler görülür (59).

Bu durum, kromozom 9 genlerindeki inaktivasyonun, mesane kanseri gelişiminin ilk aşamalarıyla alakalı olduğu hipotezini desteklemektedir. Kromozom 9'daki delesyonların çoğu, özellikle kompleks genomik bir bölge olan 9p21'de (INK4A/ARF ve INK4B) bulunmuştur. Bu bölge, negatif hücre döngüsü regülatörleri ve potansiyel tümör baskılayıcılar olan üç farklı proteini p16, p14ARF ve p15'i kodlamaktadır (59).

Tümör baskılayıcıları etkileyen diğer iki önemli kromozomal değişim, p53 ve Rb gen bölgelerindedir. Yüksek dereceli mesane TCC'nda, kromozom 17p'de LOH yüksek frekanslarda görülmektedir. *Rb* geni ise, ilk izole edilen tümör baskılayıcı genidir. *p53* gibi, *Rb* geninin de mesane kanseri progresyonunda önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. *Rb* gen mutasyonları, mesane tümörlerinin %25-30'unda tespit edilmiştir. Ancak *Rb*'de yanlış anlamlı mutasyonlar nadirdir ve mutasyona hassas bölgeler bulunamamıştır (59).

2.7. TRP (Transient Receptor Potential)

Transient Receptor Potential (TRP) kanalları ilk olarak 1998 yılında *Drosophila* türü sirke sineklerinin göz hücrelerinde bulunmuştur (61).

1. TRP cononcial (TRPC) 7 farklı alt kanal;

TRPC1, TRPC2, TRPC3, TRPC4, TRPC5, TRPC6, TRPC7

2. TRP vanilloid (TRPV) 6 farklı alt kanal;

TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPV5, TRPV6

3. TRP polycystein (TRPP) 3 farklı alt kanal;

TRPP1, TRPP2, TRPP3

4. TRP mucolipin (TRPML) 3 farklı alt kanal;

TRPML1, TRPML2, TRPML3

5. TRP ankyrin (TRPA) 1 farklı alt kanal;

TRPA1

6. TRP NOMPC (TRPN) 1 farklı alt kanal;

TRPN1

7. TRP melastatin (TRPM) 8 farklı alt kanal;

TRPM1, TRPM2, TRPM3, TRPM4, TRPM5, TRPM6, TRPM7, TRPM8 olmak üzere 7 alt tipinin varlığı ispatlanmıştır (61). Bu iyon kanallarının çoğunluğu sodyum ve kalsiyum'a aynı anda geçirgen, yani tek bir iyon kanalına seçici olmayan iyon kanallarıdır. Fakat bazı istisnaları vardır. Bunlardan;

- *TRPM4* ve *TRPM5*; monovalant katyonlara,
- *TRPM6* ve *TRPM7*; magnezyum'a
- *TRPV5* ve *TRPV6*; kalsiyum'a
- *TRPV1, TRPM6* ve *TRPP3*; hidrojen'e oldukça geçirgendir (62).

TRP kanallarının ; Kalsiyum ikinci mekanizmada önemli rol oynadığı (63), Pek çok hücre fonksiyonlarında hücre ölümüne duyarlı oldukları (64), Uyarılamayan hücrelerdeki katyon akışı ile ilgili ve kalsiyum geçirgenliğinde etkili oldukları (65), Genel olarak voltajdan bağımsız oldukları (66), Hücre proliferasyonu, fertilite ve his-hassasiyet ile ilgili birçok fonksiyonlarının da olduğu bildirilmiştir (67).

2.7.1. TRPM (transient receptor potential melastatin)

TRPM (Transient Receptor Potential Protein, Melastatin subfamily), TRP kanallarından ilk tanımlanan üye olup, melastatin bir tümör baskılayıcı protein olarak bildirilmiştir (69). TRPM familyasının alt üyeleri;

TRPM1, TRPM2, TRPM3, TRPM4, TRPM5, TRPM6, TRPM7 ve *TRPM8* 'dir (70,71).

TRPM'nin alt üyeleri başlıca 4 grupta sınıflandırılabilir;

1. Birinci grupta *TRPM1* ve *TRPM3* yer almaktadır. *TRPM1*'i aktive eden bilinmemekle beraber, *TRPM3*'ün ise kalsiyum ile aktive olduğu bildirilmiştir.
2. İkinci grupta *TRPM6* ve *TRPM7* yer almaktadır. *TRPM6* ve *TRPM7*'nin COOH-terminal serin/treonin ile aktive olduğu bildirilmiştir.
3. Üçüncü grupta *TRPM4* ve *TRPM5* yer almaktadır. *TRPM4* ve *TRPM5*'in kalsiyum'a geçirgen olmadığı bildirilmiştir.
4. Dördüncü grupta *TRPM2* ve *TRPM8* yer almaktadır. *TRPM2*'nin NUDT9 ucinun ADP-Riboz, oksidatif stres ve ısı ile aktive olduğu; *TRPM8*'in ise soğuk reseptörüyle aktive olduğu bildirilmiştir (70,71).

2.7.1.1. TRPM1

TRPM familyasının ilk ifade edilen üyesi, bir tümör baskılayıcı protein olan melastatin1 (*TRPM1*)'dir. (69) *TRPM1*'in melanositlerdeki ifadesi, melanomanın agresifliği ve metastazın gerçekleşmesi ile ters kolerasyonlu olarak ifade edilmiştir (61).

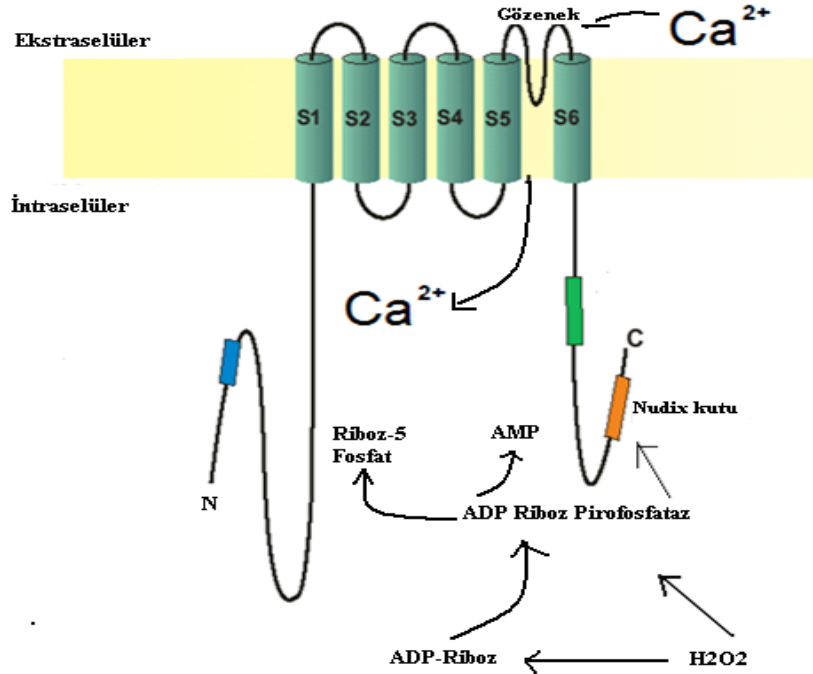
2.7.1.2. TRPM7

TRPM7'nin, kalsiyum ve magnezyum'a bağlı metal iyonlarının geçirgenliğinde anlamlı bir etki gösterdiği ve bu yüzden iyonların dokulardaki dağılımında önemli rolü olduğu düşünülmektedir. Buna ilaveten, *TRPM7*'nin, I_{OGD} tarafından uyarılan anoksik nöral ölümlere neden olduğu sanılmaktadır. Bu olgunun da; uzun süreli oksijen-glukoz yetersizliği olduğu zaman oluşan, aktif iyon akışından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Bu çalışma aynı zamanda nöronlarda Ca^{2+} ve Mg^{2+} 'un düşük seviyelerinin *TRPM7*/ I_{OGD} akımına oranını arttırdığını göstermiştir. Ca^{2+} ve Mg^{2+} dan eksik bir çevre ile ALS-G (Amyotrophic lateral sclerosis) ve PD-G (Parkinsonism

dementia complex) hastalık insidansı arasında kurulan bağlantı göz önüne alındığında, *TRPM7*'nin bu ilişkiye dahil olup olmadığı merak konusudur (72).

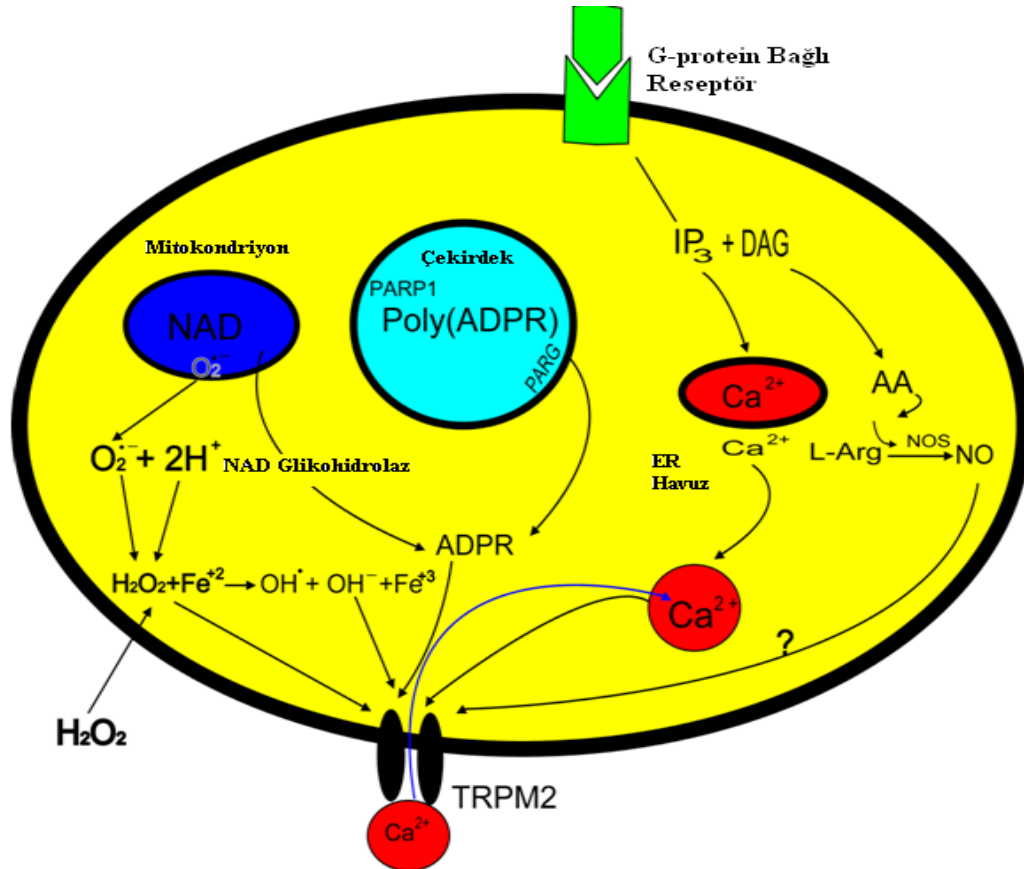
2.7.1.3. *TRPM2*

TRPM2, TRPM ailesinin ikinci üyesi olarak tanımlanmıştır (73,74). *TRPM2* katyon kanallarında da diğer iyon kanallarında olduğu gibi 6 segment bulunmaktadır ve iyon akışı 5. ve 6. segmentler arasından gerçekleşmektedir (62). Kanalin N ve C olmak üzere iki ucu bulunmaktadır. Yakın zamanda yapılan çalışmalar, N-terminal bölgeyi kapsayan bir düzenleyici alan proteininin çevirilmesi ile iyon akışının da çevirilebileceğini önermektedir. *TRPM2*'nin C ucuna 'nudix domain' denilmektedir. Bu uçta ADPR pirofosfataz enzimi bulunmaktadır. Bu enzim, ADPR'dan AMP ve Ribose 5-fosfat oluşumunu katalizlemektedir (75).



Şekil 2.6. *TRPM2* kanalının moleküler yapısı

TRPM2'nin varlığı ağırlıklı olarak beyinde ispatlanmasına rağmen, aynı zamanda kemik iliği, dalak, kalp, lökosit, karaciğer ve akciğeri de kapsayan diğer birçok dokuda da saptanabilir. 2001'li yılların başında Perraud ve arkadaşları tarafından *TRPM2* kanallarının ADPR tarafından aktive olabildikleri ilk defa gösterilmiştir (76). 2002 yılında Aachen Tıp Fakültesi Fizyoloji Enstitüsündeki Lückhoff'un grubu ile Japonya'dan Hara ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarda *TRPM2* kanallarının oksidatif stressle aktive olabileceğini ispatlamıştır (77,78,79,80). Daha sonraları yapılan çalışmalarda, araştırmacılar etki mekanizmasının doğrudan ve dolaylı yolları konusunda iki gruba ayrılmışlardır. Bir kısım araştırmacılar, oksidatif stresin mitokondriden ADPR üretimini artırdığını ve ADPR'nin *TRPM2* kanallarını açtığını öne sürmüşlerdir (81). Diğer bir kısım araştırmacılar ise; hem oksidatif stresin hem de ADPR'nin birbirinden bağımsız olarak kanalları açabildiklerini bildirmişlerdir (77,78,82).



Şekil 2.7. ADPR ve *TRPM2* kanal aktivasyonu ile oksidatif stres arasındaki ilişki

İntrasellüler adenine 5'-diphosphoribose (ADPR), Ca^{2+} akışını uyararak *TRPM2*'yi aktive eder. *TRPM2*'nin C ucu, NUDT9-H'a bağlanarak etkisini gösterir. Bu etki, NUDT9 ve ADPR hidrolaz arasındaki anlamlı ilişkiden kaynaklanmaktadır (78,82,83). Hücre içi Ca^{2+} 'un ADPR ile perdelenen hücrelere karşı hassasiyeti vardır ve bu kanalın aktivasyonu için pozitif geribildirim sağlar. (72). *TRPM2*'nin oksidatif stres, hidrojen peroksit (H_2O_2) ya da tümör nekrozis faktör α (TNF α) ile Ca^{2+} akışını uyardığı birçok çalışmada rapor edilmiştir (78).

TRPM2'nin farklı aktivasyon özelliklerine göre üç fizyolojik varyantı tespit edilmiştir; *TRPM2-S*, *TRPM2-ΔN*, *TRPM2-ΔC*

TRPM2-S, *TRPM2*'nin N ucu ve *TRPM2*'nin uzunluğu boyunca doğrudan etkileşimiyle kalsiyum girişini inhibe etmekten ibaret olan kısa bir *TRPM2* varyantıdır (60).

TRPM2-ΔN, *TRPM2*'nin N ucundaki 20 amino asidin silinmesi ve H_2O_2 ya da ADPR'ye yanıt vermemesinden dolayı, *TRPM2-ΔN* mutasyonunu düşündüren, dominant kanaldaki akışı bozan veya yüzeyi ile müdahaleyle akışkanlığı sağlayan bir sistemdir (78).

Buna karşılık *TRPM2-ΔC*, *TRPM2*'nin C ucundaki NUDT9'da oluşan CAP etki alanında 34 amino asidi silerek, CAP etkiyi ADPR için CORE etki yaparak yakınlığını arttırmaktadır. Bu veriler, oksidan stresin *TRPM2*'yi aktive ettiğini düşündürmektedir. NUDT9-H etki ya da ADPR etkisi içermeyen bu mekanizma net değildir. *TRPM2*'nin aktivasyonu Hidrojen peroksit veya TNF α 'm ya da her ikisinin etkilerinin kalsiyum girişi ve hücre ölümüne duyarlılıklarıyla alakalı olduğu bildirilmiştir. *TRPM2*'nin aktivitesinin durdurulması; ya antisens yapıları ile baskılanması ya da bağlı varyantları dominant olarak negatif inhibe etmesiyle olmaktadır. *TRPM2* fonksiyonlarının inhibisyonu, oksidan stres ve muhtemelen diğer olumsuz uyaranlara karşı, potansiyel *in vivo* ölüm hücrelerini korumak için bir yaklaşım olarak kabul edilmiştir, ancak selektif inhibitörler henüz tesbit edilememiştir (77,58).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalında mesane kanseri tanısı konmuş 28 hastadan cerrahi olarak alınan, normal ve tümörlü dokular üzerine yapılmıştır. Çalışmanın birinci basamağı olarak, 5 ay süre ile örnekler toplanmış ve gerekli sayıya ulaşılmıştır.

3.1. RNA izolasyonu

Mesane kanseri tanısı konmuş ve cerrahi işlem sonrası mesane dokusu alınmış hasta dokuları, sıvı azotta saklandı. RNA elde edilmesi aşamasında, dokuların parçalanması ve homojenizasyonu için QIAGEN® TissueLyser LT (100–240 V, 50/60 Hz) sistemi (Katalog no. 85600) ve izolasyonu için ise ROCHE® High Pure RNA Tissue Kit (Katalog no. 12 033 674 001) kullanıldı.

Dokuların parçalanması ve homojenizasyonu için şu işlemler yapıldı:

1. 2 ml'lik mikrosantrifüj tüplerin her birine bir adet çelik boncuk konuldu ve 15 dakika boyunca -80 °C' de bekletildi.
2. 15 dakika sonunda ortalama miktarı 30 mg olan doku örnekleri, 15 dakika boyunca soğutulmuş mikrosantrifüj tüplerin içerisine konuldu ve 15 dakika daha -80 °C' de bekletildi.
3. Soğutulan mikrosantrifüj tüplere konulan dokular, oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi.
4. İnkübasyon sonrası, her tüpe doku büyüklüğüne göre QIAzol Lysis Reagent konuldu.
5. Daha sonra tüpler TissueLyser LT adaptörüne yerleştirildi ve adaptörün kapağı kapatıldı.
6. TissueLyser LT sistemi 50 Hz'de 2–5 dakika boyunca çalıştırıldı.
7. Homojenizasyon süresi, dokunun parçalanma durumuna göre ayarlandı, daha sonra RNA izolasyonuna geçildi.

Homojenizasyonu sağlanan dokuların izolasyon aşamaları ise şu şekilde yapıldı:

1. Homojenizasyonu yapılan doku parçaları, nükleazlardan arındırılmış 1,5' luk ependorf tüplerine aktarıldı.
2. 2 dakika boyunca maksimum hızda santrifüj edildi ve santrifüj sonrası, sadece supernatant kısmı pipet yardımı ile dikkatli bir şekilde alındı.
3. Santrifüj aşamasından sonra, üstteki süpernatant kısmı yeni 1,5' luk ependorf tüplerine aktarıldı. Üzerine 200 µl %96'lık ethanol eklenerek, pipet yardımı ile tam olarak karışımı sağlandı.
4. Her bir örnek, filtreli tüp üzerine konuldu ve 30 saniye 13.000xg'de santrifüj edildi.
5. Santrifüj sonrasında filtreli tüp üzerine 90 µl DNase Incubation Buffer (1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, 10 mM MnCl₂, pH 7.0) ve 10 µl DNase I ile hazırlanan çözelti eklendi ve 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
6. 500 µl Yıkama Tamponu I (Wash Buffer I) (5 M guanidine-HCl, 20 mM Tris-HCl, pH 6,6) filtreli tüp üzerine konuldu ve 15 saniye 8.000xg'de santrifüj edildi.
7. Santrifüj sonrası filtreli tüp üzerine 500 µl Yıkama Tamponu II (Wash Buffer II) (20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH 7.5) eklenerek 15 saniye 8000xg'de santrifüj edildi.
8. Daha sonra 300 µl yıkama Tamponu II (20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH 7.5)'den eklendi ve 13.000xg'de 2 dakika santrifüj edildi.
9. Filtreli tüpler 1,5 ml'lik steril bir tüple birleştirildi ve filtreli tüpün üzerine 100 µl Süzme Tamponu (Nuclease-free, sterile, double distilled water) eklendi.
10. 1 dakika 8.000xg'de santrifüjden sonra RNA'lar filtreli tüpten alınarak ependorf tüpü içerisine kondu.
11. Elde edilen RNA ependorf tüp içerisinde -80° C de saklandı.

3.2. RNA Konsantrasyonunun Hesaplanması

RNA'nın miktarı ve saflığını belirlemek amacıyla 995µl distile su + 5 µl RNA olacak şekilde vortekslenerek karıştırıldı ve spektrofotometrede 260 nm dalga boyunda optik dansite ölçülerek hesaplandı.

3.3. cDNA Sentezi

Gerçekleştirilen çalışmada cDNA'lar, cDNA PCR Kit (Katalog No. 11483188 001) kullanılarak sentezlenmiştir. Kullanılan Kit, Avian myeloblastosis Virüs'den elde edilmiş olan AMV Revers Transkriptaz enzimi ve iki çeşit primer ihtiva etmektedir. Random primer olarak adlandırılan primerler, RNA'lara rastgele bağlanarak cDNA sentezini gerçekleştirmekteyken, oligo-dT olarak adlandırılan primer mRNA'ların 3'-uçlarındaki çoklu-Adeninlere bağlanarak cDNA sentezini gerçekleştirmektedirler. mRNA'nın bütün halde cDNA'sının sentezlenebilmesi için Random primerleri kullanılmıştır. PCR koşulları ve PCR karışımı, kullanılan Kit'de belirtildiği şekilde yapılmıştır.

Karışım	Miktar(µl)
10X Buffer RT	2
MgCl ₂	4
Deoksinukleotid	2
Random-dT Primer (10µM)	2
RNase inhibitör (10ünite/µl)	1
AMV Transcriptase	0,8
RNase Free Water	*
cDNA	*
Toplam	20

Tablo 3.1. cDNA sentezi için kullanılan karışım içeriği

Thermal cyclers koşulları;

25° C'de 10 dk	42° C'de 60 dk
99° C'de 5 dk	+4° C'de 5 dk

Tablo 3.2. *TRPM2* genine ait uygun PCR sıcaklıkları

GEN	Dizi	Tm (°C)	UZUNLUK (bp)
<i>TRPM-2</i>	F: 5'- CACGTGAATGCCCCGGCACCT -3'	69,3	620
	R: 5'- ACGGCCACCGTCTCGATCCA-3'	69,1	

Tablo 3.3. Çalışmada kullanılan gen bölgelerine ait primer dizi bilgileri

3.4. RT-PCR

RT-PCR aşamasından önce analizi yapılacak genlerin primerlerinin dizaynı sonucunda elde edilen %GC, Tm (Melting Temperature-Erime sıcaklığı) ve gene ait baz uzunluk değerleri göz önünde bulundurularak, her gen bölgesine özgü optimum PCR şartları belirlendi. Buna göre gene ait PCR koşulları aşağıda gösterilmiştir.

<u>Karışım</u>	<u>Miktar (µl)</u>
dH ₂ O	17,3
10x buffer	2,0
MgCl ₂	1,5
dNTPs	2,5
Forward	0,3
Revers	0,3
Taq DNA Polimeraz	0,1
cDNA	1,0
<u>Toplam</u>	<u>25</u>

Tablo 3.4. *TRPM2* genine ait RT-PCR için karışım içeriği

TRPM2 genine ait toplam 25 µl RT-PCR reaksiyonu aşağıdaki koşullarda gerçekleştirildi;

94 °C’de 3 dk	
94 °C’de 45 s	} 35 döngü
71 °C’de 20s	
72 °C’de 45 s	
72° C’de 3 dk	

RT-PCR sonucu çalışılan tüm örnek gruplarına ve gen bölgelerine ait PCR ürünleri, %2’lik agaroz jelde yürütüldü. Elektroforez sonucu elde edilen jel görüntüleri, dijital ortama aktarıldı ve Image-J programı kullanılarak, çalışılan genlerin ekspresyon düzeyleri ölçüldü.

4. BULGULAR

Gerçekleştirilen bu çalışma, tümör baskılayıcı bir gen olduğu düşünülen *TRPM2* geninin gen ifade seviyesinin mesane kanserlerinde tanımlanması amacıyla düzenlenmiştir. Mesane kanseri üzerine yapılan genomik görüntüleme çalışmalarında kromozom 21q bölgesinde ciddi kromozomal kayıplar gözlenmiştir. Bu lokusta yer alan genlerden birinin de *TRPM2* geni olduğu önceden bildirilmiştir (72). Benzer şekilde prostatta yapılan bir çalışmada da, bu genin kimyasal ajanlarla susturulduğu zaman, hücre ömürlerinin uzadığı ispatlanmıştır. Yine aynı çalışmada prostat kanseri hücre dizininde bu genlerde meydana gelen mutasyon veya mRNA ekspresyon azalmasına bağlı olarak hastalığın seyri ile olan ilişkisi ispatlanmıştır (84). *TRPM2* geninin, özellikle Hidrojen peroksit ile uyarıldığı zaman aktif hale geçtiği ve hücreye bol miktarda kalsiyum iyonunun girişini sağlayarak da hücreyi apoptoza götürdüğü görülmüştür (72). Yapılan bu çalışmalardan yola çıkarak, mesane kanserlerindeki *TRPM2* gen ifadelerini araştırıp, kanser gelişimi ile bu geninin ekspresyonu arasındaki ilişkiyi incelenmeyi amaçladık. Çalışma, Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı'nda mesane kanseri tanısı konmuş 28 hastadan cerrahi işlemler sonucu alınmış normal ve tümörlü dokuları üzerine yapılmıştır. Bu amaçla dokulardan DNA ve RNA elde edilmiştir. Elde edilen RNA'lardan oluşturulan cDNA'lar, *TRPM2* gen ifade düzeyinin belirlenmesinde kullanılmıştır.

Çalışmada, *TRPM2*'nin gen ifade düzeyleri *GAPDH* genine göre cDNA, PCR ışık parlaklığının mukayesesi ile yapılmıştır. Aynı koşullarda *GAPDH* geninin de PCR'ları yapılmış aynı agaroz jelde yürütülmüş, *TRPM2* geninin ve *GAPDH* geninin normal ve tümörlü dokularda yapılan PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüleri elde edilmiştir. *TRPM2* ve *GAPDH* genlerinin agaroz jelde belirlenen bantlarının alanları ve bu bantların parlaklıkları Image-J adlı program vasıtasıyla değerlendirilmiştir. Sonuçta *TRPM2*'den elde edilen veriler, *GAPDH*'den elde edilen verilerle karşılaştırılmıştır.

NORMAL DOKULAR			
HASTA NO	DOKU NO	<i>TRPM2</i> DEĞERİ	<i>GAPDH</i> DEĞERİ
1	25N	4732	51468
2	27N	0	14711
3	41N	0	31294
4	43N	0	19676
5	59N	3626	30479
6	61N	0	30570
7	65N	0	31454
8	75N	26917	34502
9	78N	0	28764
10	80N	0	31010
11	100N	0	31314
12	102N	0	32303
13	104N	3128	25833
14	106N	3533	16883
15	108N	0	30481
16	116N	0	5235
17	118N	0	27597
18	124N	0	24960
19	139N	0	31540
20	177N	0	2970
21	185N	0	30793
22	187N	0	15257
23	209N	0	82793
24	211N	0	32425
25	223N	0	6750
26	267N	1626	24769
27	269N	0	19612
28	408N	0	26162

Tablo 4.1. Normal mesane dokularındaki *TRPM2* ve *GAPDH* geninin İmage-J programına göre kontrast değerleri.

Tabloda, çalışmamızda kullandığımız 28 hastadan cerrahi işlemler sonucunda çıkarılmış normal mesane dokularındaki, *TRPM2* geni ve *GAPDH* geninin agaroj jelde belirlenen bantlarının alanları ve bu bantların parlaklıklarının oluşturduğu kontrast sayesinde Image-J adlı program vasıtasıyla yapılan ölçümler gösterilmiştir.

TÜMÖRLÜ DOKULAR			
HASTA NO	DOKU NO	<i>TRPM2</i> EKSPRESYON	<i>GAPDH</i> EKSPRESYONU
1	26T	3063	31261
2	28T	0	19773
3	42T	0	24387
4	44T	0	31890
5	60T	24719	32952
6	62T	0	29347
7	66T	0	29659
8	76T	0	34266
9	79T	0	24366
10	81T	0	31700
11	101T	0	27908
12	103T	0	33163
13	105T	1762	26958
14	107T	0	29716
15	109T	0	26183
16	117T	0	31749
17	119T	15756	29514
18	125T	0	31626
19	140T	0	2979
20	178T	0	29908
21	186T	0	30754
22	188T	0	32183
23	210T	0	30127
24	212T	0	5043
25	224T	0	50356
26	268T	15768	32424
27	270T	18162	32706
28	409T	0	29554

Tablo 4.2. Tümörlü mesane dokularındaki *TRPM2* ve *GAPDH* geninin İmage-J programına göre kontrast değerleri.

Tabloda, çalışmamızda kullandığımız 28 hastadan cerrahi işlemler sonucunda çıkarılmış tümörlü mesane dokularındaki, *TRPM2* geni ve *GAPDH* geninin agaroj jelde belirlenen bantlarının alanları ve bu bantların parlaklıklarının oluşturduğu kontrast sayesinde Image-J adlı program vasıtasıyla yapılan ölçümler gösterilmiştir.

HASTA NO	<i>TRPM2</i> mRNA gen ifade değeri	<i>GAPDH</i> mRNA gen ifade değeri
1	1,065704223	0,607387114
2	YOK	1,344096255
3	YOK	0,779286764
4	YOK	1,620756251
5	6,305536337	1,081137833
6	YOK	0,959993458
7	YOK	0,942932536
8	0	0,993159817
9	YOK	0,847100542
10	YOK	1,022250887
11	YOK	0,891230759
12	YOK	1,026622914
13	0,539791864	1,043548949
14	0	1,760113724
15	YOK	0,858994127
16	YOK	6,064756447
17	YOK	1,069464072
18	YOK	1,267067308
19	YOK	0,09445149
20	YOK	10,07003367
21	YOK	0,998733478
22	YOK	2,10939241
23	YOK	0,36388342
24	YOK	0,155528142
25	YOK	7,460148148
26	7,407948465	1,309055674
27	YOK	1,667652458
28	YOK	1,129653696

Tablo 4.3. Çalışılan hastalarda *TRPM2* ve *GAPDH* geninin gen ifade düzeyleri.

Yukarıdaki tabloda ise, çalışılan hastalardaki *TRPM2* ve *GAPDH* gen ifade düzeyleri karşılaştırılmıştır.

Bu işlemin gerçekleştirilmesi sırasında dikkat edilmesi gereken noktalar sırası ile şunlardır;

1. Aynı hastaya ait olan dokular (tümörlü ve normal dokular) bir biri ile kıyaslanacağından deney boyunca aynı anda çalışılmalıdır.
2. Çalışma mRNA'dan yapılacağından dolayı büyük bir titizlikle çalışılmalıdır.
3. Her örneğin *TRPM2* gen mRNA ekspresyonu için RT-PCR yapılmalıdır.
4. House keeping gen olarak kullanılan *GAPDH* de aynı örnekte RT-PCR olarak çalışılmalıdır.
5. Sonuçların kıyaslanması sırasında, image-J'de agaroz jel görüntülerindeki doğru bantların kontrastlarının ölçülmesi ile elde edilen değerlerin doğruluğu için her örnek çifti aynı anda yapılmalıdır.
6. mRNA ekspresyon değeri; elde edilen ölçüm değerlerinin aşağıdaki formülde yerine konarak hesaplanmıştır.
7. Çıkan sonuçların değerlendirmesinde ise; normal (0,75-1,25), düşük (0-0,75) ve yüksek (>1,25) parametreleri kullanılmıştır.

$$\text{mRNA ekspresyon değeri} = \frac{(\text{Tümörlü TRPM2} / \text{Normal TRPM2})}{(\text{Tümörlü GAPDH} / \text{Normal GAPDH})}$$

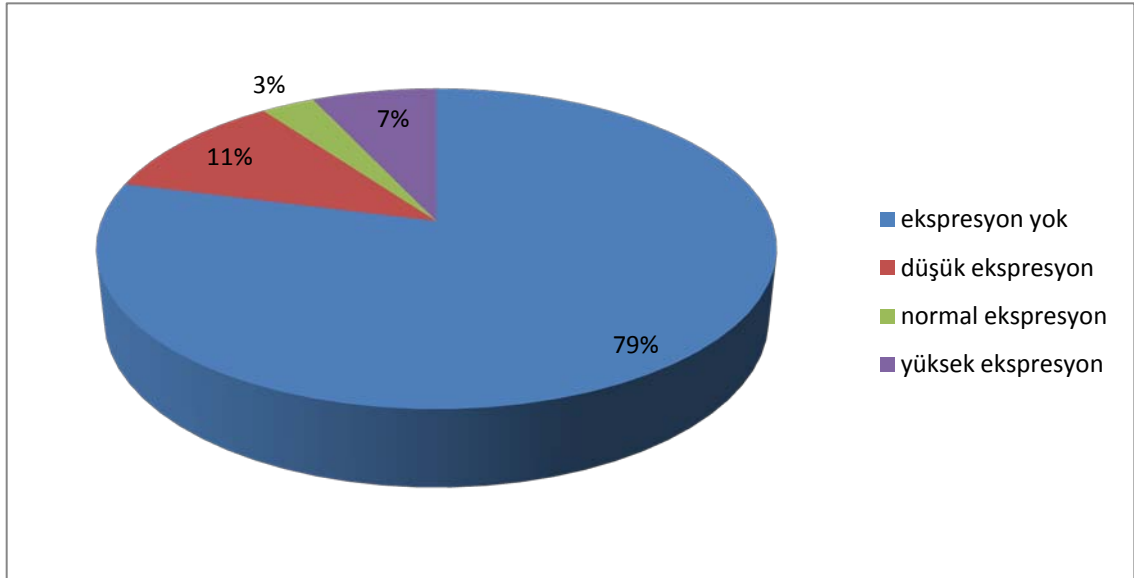
DÜŞÜK	NORMAL	YÜKSEK
0-0,75	0,75-1,25	>1,25

Tablo 4.4. *TRPM2* geninin ekspresyon düzeylerinin sayısal değer aralıkları

Yukarıdaki ifadeye göre ve elde edilen verilerin hesaplanması sonucunda ekspresyon gözlenen 6 hastanın ekspresyon düzeyleri;

No;	Hasta no;	mRNA gen ifade değeri;	Ekspresyon düzeyi;
1	1	1,065704223	NORMAL
2	5	6,305536337	YÜKSEK
3	8	0	DÜŞÜK
4	13	0,539791864	DÜŞÜK
5	14	0	DÜŞÜK
6	26	7,407948465	YÜKSEK

Tablo 4.5. *TRPM2* gen ekspresyonu görülen hastaların ekspresyon düzeyleri



Şekil 4.1. Çalışılan hastalarda gözlemlenen ekspresyon düzeylerinin yüzde oranları

Çalışma sonunda 28 hastadan 22'sinde hiç ekspresyon görülmedi. Ekspresyon görülen 6 hastadan 3'ünde düşük ekspresyon (%11), 1'inde normal ekspresyon (%3), 2'sinde ise yüksek ekspresyon (%7) görüldü. *TRPM2* geninin gen ifade değeri sonuçlarına göre; mesane kanserlerinde eksprese olma oranı %21'dir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Yeni tanı konan mesane kanseri olguların %74'ünün yüzeysel, %18'inin lokal ileri evre ve %18'inin uzak metastaz yapmış durum oldukları bildirilmiştir (39). İlk tanıda kas invazyonu bulunmayan hastalarda, primer tedavi seçeneği olan transüretral rezeksiyon (TUR) sonrası uygulanan ek tedavilere rağmen, %35 - %85 arasında nüks olasılığının olduğu bildirilmiştir. Buna ek olarak %10 - %15 olguda da zaman içerisinde kas tutulumu gerçekleşmiştir (39,40). Tüm bu veriler ışığında yapılan değerlendirmeler sonunda kas invazyonu gelişen hastalarda, evre ilerlediği için ideal tedavi olarak radikal tedavi gündeme gelmektedir (39).

Mesane kanserlerinde papiller ve non-papiller olmak üzere en az iki yolak olduğu düşünülmektedir (Şekil 1.4.). Papiller lezyonlar hiperplazik ürotelyumdan meydana gelirken, invaziv tümörler, displazik ürotelyumdan meydana gelir. Papiller tümörlerin, genellikle RAF/MEK/ERK ve PIK3CA yolağındaki genlerin değişimi ile alakalı olduğu bildirilmiştir (77). Non-papiller invaziv tümörler ise; p53 ve pRb yolağındaki değişimlerle alakalıdır. Her iki yolağın da başlangıcında 9. kromozomda değişimler olduğu düşünülmektedir (77).

Mesane kanserlerindeki DNA değişiklikleri, sitogenetikten heterozigotluğun kaybına (LOH) kadar, pek çok yönden çalışılmıştır. Ve DNA değişikliklerinin mutasyonlar, translokasyonlar, allel kaybı gibi birçok nedeni olabileceği düşünülmektedir. Bu değişimlerin ise, sentezlenen protein ürünlerini değiştirebileceği kanısı ağır basmaktadır.

Onkogenlerin, normal hücrel genler olduğu bilinmektedir. Fakat normal gen ürününün aşırı ekspresyonu veya protein ürününün değişmiş fonksiyonunun, malign fenotip ve tümör oluşumuna yol açabileceği düşünülmüştür. Normal gen ürününün aşırı ekspresyonu, genellikle güçlü bir promotorun olduğu gen bölgesindeki kromozomal

translokasyon veya gen amplifikasyonu ile gerçekleşmektedir. Aynı zamanda mutasyona uğramış protein ürününün ekspresyonunun malign fenotipin aktivasyonuna da yol açtığı bilinmektedir.

Moleküler teknikler kullanılarak son yıllarda yapılan kapsamlı araştırmalar, farklı kromozomlarda birkaç anahtar tümör baskılayıcı genin bulunmasını sağlamıştır. Yüksek dereceli kas invazyonu yapan mesane kanserlerinde kromozom 3 ve 8'in kısa kollarında delesyonlar tespit edilmiştir. Yüzeysel transizyonel hücre karsinomunda hiç delesyon görülmezken, invaziv TCC (Transitional Cell Carcinoma) nin % 50'den fazlasında 8p delesyonları gözlenmiştir. Kromozom 8'in kısa kolundaki heterozigotluk kaybının, aynı zamanda TCC'nin yüksek dereceleriyle alakalı olduğu düşünülebilir.

Mesane kanserlerinde bulunan en önemli kromozomal delesyonlar; kromozom 9, 13 ve 17'dedir. Kromozom 13'dekinin retinoblastoma (*Rb*), kromozom 17 'dekinin *p53*, kromozom 9'dakinin ise *p21* tümör baskılayıcılarıyla ilgili olduğunu söylenebilir.

Yüzeysel ve kasa invaziv TCC'nin, mesanede hem histolojik olarak hem de klinik olarak da birbirinden farklı davrandığı bilinmektedir. Bu bulgulara dayanarak mesane kanserinin, kanser oluşumu için çoklu genetik yollara sahip olduğu söylenebilir (78).

Daha önceki yapılmış olan çalışmaları da dikkate aldığımızda hem kromozom 9, hem kromozom 13, hem de kromozom 17'nin yanı sıra kromozom 21q bölgesinde de ciddi kromozomal kayıpların izlendiği bildirilmiştir. *TRPM2*'nin ise 21q bölgesinde yer aldığı bilinmektedir. Aynı şekilde Prostatta da yapılan bir çalışmada, bu gen kimyasal ajanlarla susturulduğu zaman, hücre ömürlerinin uzadığı ispatlanmıştır. Prostat kanseri hücre dizinindeki bu değişiklikler, bu genlerde meydana gelen mutasyon veya mRNA ekspresyon azalmasına bağlı olarak, hastalığın seyri ile olan ilişkisini destekler niteliktedir.

TRPM (transient receptor potential protein, melastatin) TRP kanallarının ilk tanımlanan üyesi olup, melastatin bir tümör baskılayıcı protein olarak ifade edilmiştir (66).

TRPM2, *TRPM5*, *TRPM7* ve *TRPM8*'in de dahil olduğu grubun yapılan çalışmalarda hücre çoğalması ve hayatta kalmasında önemli rol aldığı görülmüştür (58).

TRPM ailesinin de ilk ifade edilen yesi, bir tümör baskılayıcı protein olan melastatin *TRPM1*'dir (66). *TRPM1*'in melanositlerdeki ifadesinde, melanoma vakalarındaki matastazın yavaşlamasına katkıda bulunduğu bildirilmiştir. TRPM ailesinin bir başka yesi *TRPM7*, kalsiyum ve magnezyum'a bağlı metal iyonlarının geçirgenliğinde anlamlı bir etki gösterdiğinden dolayı, iyonların hücre içi ve hücre dışı düzenlenmesinde önemli rolü olduğu dşnlmektedir. Buna ek olarak I α GD tarafından uyarılan anoksik nöral ölümlere, *TRPM7*'nin neden olduğu sanılmaktadır. Buradan yola çıkarak uzun süreli oksijen-glukoz yetersizliği olduğu zaman oluşan aktif iyon akışınının, anoksik nöral ölümlere neden olduğu düşünülebilir (72). Ayrıca *TRPM7*'nin kalsiyum ile birlikte, meme kanseri vakalarında kanserin gelişimini engelleyici bir etkiye sahip olduğu da ortaya konmuştur (85). Pankreas kanserli hücreler üzerine yapılan bir çalışmada, *TRPM7* geninin pankreas hücrelerinde bölünmeyi ve çoğalmayı kontrol edici bir rolü olduğu da ortaya konmuştur (86). Çoğalma ve bölünmedeki bu etkin rol, genin pankreas hücrelerinde proliferasyona karşı cevap oluşturduğu düşüncesini güçlendirmiştir.

Bu ailenin bir başka yesi olan *TRPM8*'in ise prostat kanseri hücrelerinde hücre içi ve hücre dışı düzenlenmeyi sağladığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (88). Bu çalışmadan yola çıkarak prostat kanserli hastalarda, *TRPM8* geninin kötü prognozu gösteren bir belirleyici olarak kabul edilebileceği düşüncesini gündeme getirebiliriz.

TRPM2 geninin ise prostat kanserlerindeki ifadesinde, hücre bölünmesinde enzimatik görevleri olduğu ispatlanmıştır (89). *TRPM2* geninin özellikli bir nükleer protein olmasının yanı sıra hücre bölünmesini kontrol edici, durdurucu bir etkiye de sahip olduğu, prostat kanserlerinde yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (89). Bu alışmalar, *TRPM2* geninin mRNA ekspresyonunu durdurduğunu, bunu yaparken de normal hücrelerin zarar görmesini engellediğini düşündürmüştür. Diğer taraftan ise prostat kanser hücrelerinin büyümesini büyük oranda inhibe ettiğini göstermiştir.

TRPM2 geninin mesane kanserli hücrelerdeki ekspresyonu dikkate alındığında, diğer TRPM ailesi üyelerinden çok da farklı olmadığı, doku ve hücre bazında bazı kritik noktalarda farklı yollar izlediği ancak temelde aynı prensiplerle etki mekanizmasını gösterdiğini söyleyebiliriz.

Yüzeysel ve kasa invaziv TCC'nin, mesane dokularında histolojik olarak birbirinden farklı olduğunu ve klinik olarak da değişkenlikler gösterdiğini düşündüğümüzde, *TRPM2*'nin bu iki mesane kanseri çeşidinde farklı davrandığını ve etki mekanizmalarının ayrı olduğunu düşünebiliriz. Bu bulgulara dayanarak mesane kanserinde, kanser oluşumu için çoklu genetik yolların olabileceğini söyleyebiliriz.

Yaptığımız tüm çalışmalar neticesinde, *TRPM2* geninin diğer TRPM ailesi üyeleri kadar eksprese olamadığını gördük. Bu durum dokuların farklı olması ve hücre çeşitliliği ile açıklanabilir. Ancak bir hayli yüksek çıkan (%77) eksprese olamama yüzdesi; mesane kanserli dokularda *TRPM2* geninin etkinliğinin, hangi mekanizmalarla engellendiği sorusunu karşımıza çıkarmaktadır. Bu sorunun bir başlangıç noktası olarak düşünülerek, ileriki çalışmalara ışık tutacak nitelikte olabileceğini de dikkate aldığımızda en kısa zamanda elde edilecek verilerin ortaya konarak mesane kanserinin tedavisinde etkili bir rol alacağı muhtemeldir. Bu bağlamda ekspresyonun olmamasını epigenetik faktörlere de bağlamamızın hiçbir sakıncası yoktur.

Epigenetik faktörlerin de yeterince aktif olmamasına bağlı olarak bir miktar (%21) ekspresyon gözledik. Ekspresyonun varlığı bizlere, *TRPM2* geninin mesane dokularında kansere karşı bir etkileşim mekanizması içinde etkin rol oynadığını gösterdi.

Ekspresyon değerinin 0.75'den düşük çıkması, açık ve net olarak ekspresyonun azaldığı ve kanser gelişiminin başladığını gerçeğini kanıtlamaktadır.

0.75 ile 1.25 arasında çıkan ekspresyon değerleri *TRPM2* geni için normal ekspresyon değerleridir. Bu değerler, hastalarda *TRPM2*'nin etkili olmadığını, etkenin farklı bir yoldan apoptozisi engellemiş olabileceğini düşündürdü.

Ekspresyon değerleri 1.25'den büyük çıkan hastalarda ise yüksek ekspresyon düzeyi gerçekleşmiş oldu. Bu düzeyde ekspresyon gözlenen hastalarda üretilen mRNA'nın yüzde kaçının proteine dönüştüğü büyük bir soru işareti olarak karşımıza çıkmaktadır.

TRPM2 kanalları, hem oksidatif stress hem de ADPR ile aktive olabilmektedir. Günümüzde bu kanalları kapatan bir kanal blokeri bulunmamaktadır. Mevcut kalsiyum kanal blokerleri de bu kanalları bloke edememektedir. *TRPM2* kanallarını bloke eden kimyasal ve ilaçların en yakın zamanda bulunması, birçok hastalığın tedavisinde fayda sağlayacaktır. Mesane kanserlerinde *TRPM2* geninin ekspresyon mekanizmanın daha iyi anlaşılabilmesi için bazı epigenetik çalışmalarla bu verilerin desteklenmesi, ileriki çalışmalarda planlanmaktadır. Bu konunun araştırılması ve açığa çıkarılması için yeni yaklaşımlar yapılmasını tavsiye edebiliriz.

6. KAYNAKLAR

- 1- Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA (eds). World Health Organisation Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumors of the Urinary System and Male Genital Organs. IARC Pres: Lyon 2004: 93-124
- 2- Forsythe JA, Jiang B, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, et al. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by-hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 4604-4613
- 3- Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, Lim M, Hilton DA, Zagzag D, et al. Overexpression of HIF-1 α in common human cancers and their metastases. *Cancer Res* 1999; 59: 5830-5835
- 4- Reuter V. The Urethelial Tract : Renal pelvis, Ureter, Urinary Bladder, And Urethra. In: Carter D, Greenson JK, Oberman HA, Reuter V, Stoler MH. Sternberg's Diagnostic Surgical Patology (4th ed.) Philadelphia, Lipincott Williams and Wilkins, 2004: 2035-2074
- 5- Valero M, Morenilla-Palao C, Belmonte C, Viana F. Pharfacological and functional properties of TRPM8 channels in prostate tumor cells. *Pflugers Arch.* 461(1): 99-114, 2011.
- 6- Fonfria E, Marshall IC, Boyfield I, Skaper SD, Hughes JP, Owen DE, Zhang W, Miller BA, Benham CD, McNulty S. Amyloid β -peptide(1–42) and hydrogen peroxide-induced toxicity are mediated by TRPM2 in rat primary striatal cultures. *J Neurochem* 95: 715–723, 2005.
- 7- Cell Biology and Cancer. Video discovery, Inc. Development Team (National Institues of Health), 1999.
- 8- Stratton MR, Campell PJ, Futreal PA, The Cancer Genome. *Nature*, 2009, 458;9, 719-724.

- 9- Loeb LA, Haris CC, Advances in chemical carcinogenesis: a historical review and prospective. *Cancer Research* 2008, 68: 6863-6872.
- 10- Krontiris TG, Cooper GM, Transforming activity of human tumor DNAs, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1981, 78:1181-1184.
- 11- Shih C, Padhy LC, Murray M, Weinderg RA, Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into Mouse fibroblasts, 1981, *Nature*, 290: 261-264.
- 12- Reddy EP, Reynolds RK., Santos E, Barbacid M, A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties by the T24 human bladder carcinoma oncogene. 1982, *Nature*, 300:149-152.
- 13- Tabin CJ, Mechanism of activation of a human oncogene. 1982, *Nature*, 300: 143-149.
- 14- DeVita V. Hellman S. Rosenberg S. A. *Cancer*, Lippincott Williams and Wilkins, 2001, 77-119.
- 15- Talbot SJ, Crawford DH, Viruses and tumours-an update. *Eur. J. Cancer*, 2004, 40: 1998-2005.
- 16- Venables JP, Aberrant and alternative splicing in cancer. *Cancer Research*, 2004, 64: 7647-7654.
- 17- Brinkman BMN, Splice variants as cancer biomarkers. *Clinical Biochemistry*, 2004, 37: 584-597.
- 18- Duccase M, Brown MA, Epigenetic aberrations and cancer. *Molecular Cancer*, 2006, 5/60: 1-10.
- 19- Kouzarides T, Chromatin modifications and their function. *Cell*, 2007, 128: 693-705.
- 20- <http://e-articles.info/e/a/title/DEVELOPMENT-OF-CANCER-AND-CHARACTERISTICS-OF-CANCER-CELLS/> (14.11.2009).
- 21- <http://www.microbiologyprocedure.com/viruses-and-cancer/characteristics-of-cancer-cells.htm> (14.11.2009).

- 22- Pedraza-Farina LG, Mechanisms of Oncogenics Cooperation in Cancer Initiation and Metastasis. *Yale Journal of Biology and Medicine*, 2006, 79: 95-103.
- 23- Shiozaki H, Oka H, Inoue M, Tamura S, Monden M, E-cadherin mediated adhesion system in cancer cells. *Cancer*, 77: 8, 1605-1613, 1998.
- 24-<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=mboc4&part=A4313&rendertype=figure&id=A4313> (14.11.2009).
- 25- Liotta LA, Stetler-Stevenson WG, Metallo proteinases and cancer invasion. *Semin. Cancer Biol.* 12,99-106, 1990.
- 26- Carmeliet P, Jain RK, Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 407, 249-257, 2000.
- 27- Schulz WA, *Molecular Biology of Human Cancers*, Springer, 11-17, 2007.
- 28- Garret MD, Cell Cycle control and cancer. *Current Science*, 2001,81 (5): 515-522
- 29- <http://biyokimya.uludag.edu.tr/CellCycleApoptosis.pdf> (29.01.2010).
- 30- Krug U, Ganser A, Koeffler HP, Tumor suppressor genes in normal and malignant hematopoiesis. *Oncogene*, 2002, 21: 3475-3495.
- 31- Cooper GM, Hausman RE, *Hücre moleküler yaklaşımlar*, 2006, İzmir Tıp Kitap Evi, 579-582.
- 32- Hamacher R, Schmid RM, Saur D, Schneider G, Apoptotic pathways in pancreatic ductal adenocarcinomas. *Molecular Cancer*, 2008, 7(64): 1-10.
- 33- Westphal S, Kalthoff H, Apoptosis: targets in pancreatic cancer. *Molecular Cancer*, 2003, 2(6): 1-14.
- 34- Payne SR, Kemp CJ, Tumor suppressor genetics, *Carcinogenesis*, 2005, 26(12): 2031-2045.
- 35- Harris H, Miller OJ, Klein G, Worst P, Tachibana T, Suppression of malignancy by cell fusion, *Nature*, 1969, 223, 363-368.

- 36- Knudson AG, Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1971, 68: 820-823.
- 37- Comings DE, A general theory of carcinogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70: 3324-3328.
- 38- Lee HP, Tumor suppressor genes: a newer a for molecular genetic studies of cancer. Breast cancer Research and Treatment, 1991, 19: 3-13.
- 39- Vimalachandran D, Genetics and prevention of pancreatic cancer, Cancer Control, 2004, 11: 1, 6-14.
- 40- Sers C, Emmenegger U, Husmann K, Bucher K, Andres AC, Schafer R, Growth-inhibitory Activity and Down regulation of the Class II Tumor-suppressor Gene *H-rev107* in Tumor Cell Lines and Experimental Tumors. The journal of Cell Biology, 1997, 136 (4): 935-944.
- 41- Yeo CJ, Tumor suppressor genes: a short rewiev .Surgery, 1999,125 (4):363-366.
- 42- Doğan AL, Güç D, Sinyal iletim mekanizmaları ve kanser. Hacettepe Tıp Dergisi, 2004, 35, 34-42.
- 43- Erler JT, Bennewith KL, Nicolau M, Dörnhöfer N, Kong C, Le QT, Chi JA, Jeffrey SS, Giaccia AJ, Lyslyoxidase is essential for hypoxia-induced metastasis. Nature, 2006, 440(27): 1222-1226.
- 44- Greenlee RT, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 2000. CA Cancer J Clin. 2000; 50: 7-33.
- 45- Konety BR, Williams RD. Super ficial transitional (Ta/T1/CIS) cell carcinoma of the bladder. BJU Int. 2004; 94: 18-21.
- 46- Kiemeney LA, Witjes JA, Heijbroek RP, Verbeek AL, DebruyneFM.Predictability of recurrent and progressive disease in in dividuall patients with primary superficial bladder cancer. J Urol. 1993; 150: 60-4.
- 47- Lynch CF, Cohen MB. Cancer. 1995; 75: 316–29.

- 48- Eble JN, Young RH. Carcinoma of the urinary bladder: a review of its diverse morphology. *Semin Diagn Pathol* 1997; 14: 98-108.
- 49- Koss LG, Tiamson EM, Robbins MA. Mapping cancerous and precancerous bladder changes. A study of the urothelium in ten surgically removed bladders. *JAMA*. 1974; 227:281-6.
- 50- Messing EM. Urothelial Tumors of the Urinary Tract. *Campell's Urology* 8 the dition. Elsevier Science, New York (USA), 2002; 2732-2784.
- 51- American Joint Commission on Cancer/Union Internationale Contra Cancre,1997.
- 52- Lee R, Droller MJ. The natural history of bladder cancer. Implications for therapy.1: *Urol Clin North Am*. 2000; 27: 1-13.
- 53- Knowles MA, Elder PA, Williamson M, Cairns JP, Shaw ME, LawMG. Allelotype of human bladder cancer. *Cancer Res*. 1994; 15;54: 531-8.
- 54- Epstein JI, Amin MB, Reuter VR, Mostofi FK. The World Healt Organization/International Society of Urological Pathology consensus, classification of urothelial (transitionalcell) neoplasms of the urinary bladder. Bladder Consensus Conference Committee. *Am J Surg Pathol*. 1998; 22: 1435-48.
- 55- Cheng L, Neumann RM, Bostwick DG. Papillary urothelial neoplasms of low malignant potential. Clinical and biologic implications. *Cancer*. 1999; 86: 2102-8.
- 56- Prout GR Jr, Barton BA, Griffin PP, Friedell GH. Treated history of non invasivegrade 1 transitional cell carcinoma. The National Bladder Cancer Group. *J Urol*. 1992; 148:1413-9.
- 57- TMN atlas, 3rd eddition, 2nd revision.
- 58- Luis, N.M., Lopez-Knowles, E., Real, F.X., "Molecular biology of bladder cancer", *Clin. Transl. Oncol.*, 2007; 9 ;5-12.
- 59- Williams, S.G. Stein, J.P. "Molecular pathways in bladder cancer", *Urol. Res.*, 2004; 32; 373-385.

- 60- Zhang, W., Chu, X., Tong, Q., Cheung, J.Y., Conrad, K., Masker, K. & Miller, B.A. (2003). A novel TRPM2 isoform inhibits calcium influx and susceptibility to cell death. *J. Biol. Chem.*, 278, 16222–16229.,
- 61- Clapham, D.E. (2003). TRP channels as cellular sensors. *Nature*, 426, 517-524.
- 62- Nilius, B. Owsianik, G. Voets, T. Peters, J.A. Transient Receptor Potential cation channels in disease. *Physiol Rev.* 87, 165-217, 2007.
- 63- Berridge, M.J. Lipp, P. & Bootman, M.D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 1, 11-21.
- 64- Harteneck, C. Plant, T.D. & Schultz, G. (2000). From worm to man: three subfamilies of TRP channels. *Trends Neurosci.* 23, 159-166.
- 65- Montell, C. (2001). Physiology, phylogeny, and functions of the TRP superfamily of cation channels. *Sci. STKE*, RE1.
- 66- Montell, C. Birnbaumer, L. & Flockerzi, V. (2002). The TRP channels, a remarkably functional family. *Cell*, 108, 595-598.
- 67- Alexander S.P.H. Mathie, A. & Peters, J.A. (2004). Guide to Receptors and Ion Channels. *Br. J. Pharmacol.*, 141 (Suppl. 1), S1-S126.
- 68- Duncan, L.M. Deeds, J. Hunter, J. Shao, J. Holmgren, L.M. Woolf, E.A., Tepper, R.I., & Shyjan, A.W. (1998). Down-regulation of the novel gene melastatin correlates with potential for melanoma metastasis. *Cancer Res.*, 58, 1515-1520.
- 69- Yee NS, Zhou W, Liang IC. Transient receptor potential ion channel Trpm7 regulates exocrine pancreatic epithelial proliferation by Mg²⁺-sensitive Socs3a signaling in development and cancer. *Dis Model Mech.* 4(2): 240-54, 2011.
- 70- Miller, B.A. The role of TRP channels in oxidative stress-induced cell death. *J. Membr. Biol.* 209, 31- 41, 2006.
- 71- Birnbaumer, L. The TRPC class of ion channels: a critical review of their roles in slow, sustained increases in intracellular Ca(2+) concentrations. *Annu Rev. Pharmacol. Toxicol.* 49, 395–426, 2009.

- 72- Mchugh, D., Flemming, R., Xu, S.Z., Perraud, A.L. & Beech, D.J. (2003). Critical intracellular Ca^{2+} dependence of transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) cation channel activation. *J. Biol. Chem.*, 278, 11002-11006.
- 73- Nagamine, K., Kudoh, J., Minoshima, S., Kawasaki, K., Asakawa, S., Ito, F. & Shimizu, N. (1998). Molecular cloning of a novel pupative Ca^{2+} channel protein (TRPC7) highly expressed in brain. *Genomics*, 54, 124-131.
- 74- Sano, Y., Inamura, K., Miyake, A., Mochizuki, S., Yokoi, H., Matsushime, H. & Furuichi, K. (2001). Immunocyte Ca^{2+} influx system mediated by LTRPC2. *Science*, 293, 1327-1330.
- 75- Clapham, D.E. Snapshot: mammalian TRP channels. *Cell*. 129, 220, 2007.
- 76- Perraud, A.L., Fleig, A., Dunn, C.A., Bagley, L.A., Launay, P., Schmitz, C., Stokes, A.J., Zhu, Q., Bessman, M.J., Penner, R., Kinet, J.P., Scharenberg, A.M. ADP-ribose gating of the calcium-permeable LTRPC2 channel revealed by Nudix motif homology. *Nature*. 411, 595–599, 2001.
- 77- Hara, Y., Wakamori, M., Ishii, M., Maeno, E., Nishida, M., Yoshida, T., Yamada, H., Shimizu, S., Mori, E., Kudoh, J., Shimizu, N., Kurose, H., Okada, Y., Imoto, K. & Mori, Y. (2002). LTRPC2 Ca^{2+} -permeable channel activated by changes in redox status confers susceptibility to cell death. *Mol. Cell*, 9, 163-173.
- 78- Wehage, E., Eissfeldt, J., Heiner, I., Jungling, E., Zitt, C. & Luckhoff, A., (2002). Activation of the cation channel long transient receptor potential channel 2 (LTRPC2) by hydrogen peroxide. A splice variant reveals a mode of activation independent of ADP-ribose. *J. Biol. Chem.*, 277, 23150-23156.
- 79- Naziroglu, M., Lückhoff, A. Effects of antioxidants on calcium influx through TRPM2 channels in transfected cells activated by hydrogen peroxide. *Journal of the Neurological Sciences*. 15, 152-158, 2008.
- 80- Naziroglu, M., Lückhoff, A. A calcium influx pathway regulated separately by oxidative stress and ADP-ribose in TRPM2 channels: Single channel events. *Neurochem. Res.* 33, 1256-1262, 2008.

- 81- Perraud, A.L., Takanishi, C.L., Shen, B., Kang, S., Smith, M.K., Schmitz, C., Knowles, H.M., Ferraris, D., Li, W., Zhang, J., Stoddard, B.L., Scharenberg, A.M. Accumulation of free ADP-ribose from mitochondria mediates oxidative stress-induced gating of TRPM2 cation channels. *J. Biol. Chem.* 280, 6138–6148, 2005.
- 82- Naziroglu, M. New molecular mechanisms on the activation of TRPM2 channels by oxidative stress and ADP-ribose. *Neurochem. Res.* 32, 1990-2001, 2007.
- 83- Heiner, I., Eisfeld, J., Halaszovich, C.R., Wehage, E., Jungling, E., Zitt, C. & Luckhoff, A. (2003). Expression profile of the transient receptor potential (TRP) family in neutrophil granulocytes: evidence for currents through LTRPC2 induced by ADP-ribose and NAD. *Biochem. J.*, 371, 1045-1053.
- 84- Perraud, A.L., Schmitzh, C. & Scharenberg, A.M. (2003). TRPM2 Ca²⁺ permeable cation channels: from gene to biological function. *Cell Calcium*, 33, 519-531.
- 85- Aarts M, Iihara K, Wei WL, Xiong ZG, Arundine M, Cerwinski W, MacDonald JF, Tymianski M. A key role for TRPM7 channels in anoxic neuronal death. *Cell* 115: 863–877, 2003.
- 86- Bidaux G, Roudbaraki M, Merle C, Crepin A, Delcourt P, Slomianny C, Thebault S, Bonnal JL, Benahmed M, Cabon F, Mauroy B, Prevarskaya N. Evidence for specific TRPM8 expression in human prostate secretory epithelial cells: functional androgen receptor requirement. *Endocr Relat Cancer* 12: 367–382, 2005.
- 87- Prawitt D, Enklaar T, Klemm G, Gartner B, Spangenberg C, Winterpacht A, Higgins M, Pelletier J, Zabel B. Identification and characterization of MTR1, a novel gene with homology to melastatin (MLSN1) and the trp gene family located in the BWS-WT2 critical region on chromosome 11p15.5 and showing allele-specific expression. *Hum Mol Genet* 9: 203–216, 2000.
- 88- Tsavaler L, Shapero MH, Morkowski S, Laus R. Trp-p8, a novel prostate-specific gene, is up-regulated in prostate cancer and other malignancies and shares high homology with transient receptor potential calcium channel proteins. *Cancer Res* 61: 3760–3769, 2001.

89- Zhang W, Hirschler-Laszkiewicz I, Tong Q, Conrad K, Sun SC, Penn L, Barber DL, Stahl R, Carey DJ, Cheung JY, Miller BA. TRPM2 is an ion channel that modulates hematopoietic cell death through activation of caspases and PARP cleavage. *Am J Physiol Cell Physiol* 290: C1146–C1159, 2006.

7. ÖZGEÇMİŞ

Çağlar ATALAY, 1982 yılında Kayseri'nin Bünyan ilçesinde doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimi Kayseri'de tamamlayarak 1999 yılında Melikgazi İmam Hatip Lisesinden mezun oldu. 2004 yılında Kayseri Erciyes Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümünü bitirdi. 2008 yılında Gaziantep Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Fizyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa başladı ve halen aynı bölümde eğitim hayatına devam etmektedir. İki yıllık evli ve yabancı dili İngilizcedir.