

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

İNSAN PROSTAT KANSER PC-3 HÜCRE
HATTINDA TRPM2 İYON KANALININ
OTOFAJİK YOLAKLARDAKİ ROLÜNÜN
ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

AHMET TEKTEMUR

2015

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Mustafa KAPLAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Yüksek Lisans standartlarına uygun bulunmuştur.



Prof. Dr. Halit ELYAS

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Halit M. ELYAS



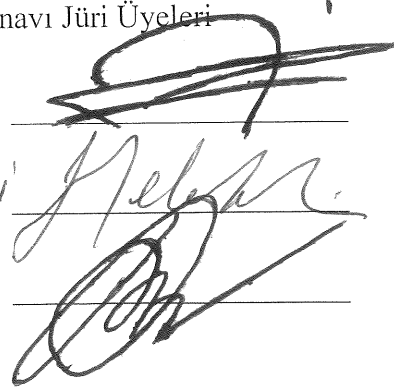
Danışman

Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Halit ELYAS

Doç. Dr. İbrahim TEKEDEBELİ

Doç. Dr. Ebru ÖNALAN



İTHAF SAYFASI

Sabredenlere...

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca desteğini esirgemeyen, tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Halit M. ELYAS'a, tezimin her aşamasındaki yardımlarından dolayı tez projesi yardımcı araştırmacısı Sayın Doç. Dr. Ebru ÖNALAN'a,

Tezimin deneysel kısmında bana laboratuvarlarının kapılarını açarak destek olan Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Sayın Yrd. Doç. Dr. Deniz EROL ve Yrd. Doç. Dr. Aşkın ŞEN'e, ayrıca bu laboratuvarlarda görevli değerli arkadaşlarım Esin ÖZ, Kezban ÇENESİZOĞLU ve Dilek BAY'a,

Deneysel aşamalarda desteklerini esirgemediklerinden dolayı İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'ndan Suat TEKİN ve Yavuz ERDEN'e,

Tez çalışmam boyunca desteğini esirgemeyen tez projesi yardımcı araştırmacısı sevgili arkadaşım Seda ÖZAYDIN'a,

Tezime sağladığı finansmandan dolayı Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (FÜBAP)'ne,

Son olarak eğitim hayatım boyunca manevi desteklerini her zaman hissettiğim aileme çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI	i
ONAY SAYFASI.....	ii
İTHAF SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
TABLolar LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	x
KISALTMALAR LİSTESİ.....	xiii
1. ÖZET	1
2. ABSTRACT.....	3
3. GİRİŞ	5
3.1. Prostat Bezi	9
3.1.1. Prostat Bezi Hastalıkları.....	11
3.1.1.1 Prostatit	11
3.1.1.2. Benign Prostat Hiperplazisi (BPH)	12
3.1.1.3. Prostat Kanseri (Pk)	13
3.1.1.3.1. Epidemiyolojisi	14
3.1.1.3.2. Etiyolojisi	15
3.1.1.3.2.1. Risk Faktörleri.....	15
3.1.1.3.2.1.1. Yaş	15
3.1.1.3.2.1.2. Irk	16
3.1.1.3.2.1.3. Aile Hikayesi.....	16
3.1.1.3.2.3.4. Diyet	16
3.1.1.3.2.1.5. Hormonlar	17
3.1.1.3.3. Patolojisi.....	18
3.1.1.3.4. Tespiti.....	18
3.1.1.3.5. Moleküler Patogenezi.....	20
3.1.1.3.5.1. Kalıtsal Prostat Kanseri	20

3.1.1.3.5.2. Sporadik Prostat Kanseri.....	21
3.1.1.3.5.2.1. Tümör Baskılayıcı Genler	21
3.1.1.3.5.2.2. Onkogenler	22
3.1.1.3.6. Metastazı	22
3.2. Hücre Ölüm Mekanizmaları.....	24
3.2.1. Apoptoz	24
3.2.2. Nekroz	25
3.2.3. Otofaji	26
3.2.3.1. Moleküler Mekanizması.....	29
3.2.3.2. Otofaji ve Kanser	35
3.2.3.3. Otofaji ve Prostat Kanseri	37
3.2.3.4. Otofaji, Ca^{+2} ve Ca^{+2} Geçirgen İyon Kanalları	38
3.3. TRP İyon Kanalları	42
3.3.1. TRPM İyon Kanalları.....	43
3.3.1.1. TRPM2 İyon Kanalı	44
3.3.1.1.1. Yapısı	44
3.3.1.1.2. Aktivasyonu ve Düzenlenmesi.....	46
3.3.1.1.3. Alternatif Splayzing İzofomları	50
3.3.1.2. TRPM2 ve Prostat Kanseri.....	50
3.3.1.3. TRPM2 ve Hücre Ölümü	51
3.4. Reaktif Oksijen Türleri (ROT)	52
3.4.1. ROT ve Prostat Kanseri	54
3.4.2. ROT ve Otofaji	55
3.4.3. ROT ve TRPM2	57
4. GEREÇ VE YÖNTEM.....	59
4.1. Hücre Kültürü.....	59
4.1.1. Gereçler	59
4.1.2. Hücre Hattı Seçimi ve Temini.....	60
4.1.3. Hücrelerin Beslenmesi	61
4.1.4. Hücrelerin Pasajlanması.....	61
4.1.5. Hücrelerin Dondurulması ve Çözdürülmesi.....	61
4.1.6. Hidrojen Peroksit Uygulaması	62

4.1.7. Otofaji İnhibitörü (3-MA) Uygulaması.....	62
4.1.8. Apoptoz İnhibitörü (z-Vad-fmk) Uygulanması	63
4.1.9. siRNA Uygulaması	63
4.1.10. Hücre Ölüm Analizi	64
4.1.10.1. Gereçler	64
4.1.10.2. Akridin Oranj (AO)-Etidyum Bromid (EB) ve Tripan Mavisi Boyamaları	64
4.1.11. Total RNA izolasyonu.....	65
4.1.11.1. Gereçler	65
4.1.11.2. Yöntem.....	66
4.1.12. Spektrofotometrik RNA Ölçümü	67
4.1.12.1. Gereçler	67
4.1.12.2. Yöntem.....	67
4.1.13. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi	67
4.1.13.1. Gereçler	67
4.1.13.2. Yöntem.....	67
4.1.14. Kantitatif Gerçek Zamanlı (Real Time)-Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile cDNA Çoğaltımı	69
4.1.15. İstatistiksel Analizler.....	71
5. BULGULAR.....	72
5.1. Hücre Sayımı Verilerinin Değerlendirilmesi	72
5.1.1. H ₂ O ₂ Konsantrasyon Farklılıklarının Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi	72
5.1.2. Tüm Grupların Hücre Canlılık Oranları.....	73
5.3. Kantitatif RT-PZR Verilerinin Değerlendirilmesi	75
5.3.1. Otofajik Yolağın İndüklenme Aşamasında Yer Alan Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeyleri	75
5.3.2. Otofajik Yolağın Nükleasyon Aşamasında Yer Alan Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeyleri	78
5.3.3. Otofajik Yolağın Uzama Aşamasında Yer Alan Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeyleri	85
5.3.4. Otofagozomun Tamamlanması ve Lizozom ile Birleşmesi Aşamasında Yer Alan Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeyleri	90
5.3.5. Apoptoz ile İlişkili Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeyleri	93

5.3.6. TRPM2 mRNA Ekspresyon Düzeyleri	97
5.3.6.1. Tüm Grupların TRPM2 mRNA Ekspresyon Düzeyleri.....	97
5.3.6.2. siRNA Verimlilik Oranı	98
5.3.7. Farklı H ₂ O ₂ Konsantrasyonlarının Otofajik Gen Ekspresyon Düzeyleri....	99
5.4. AO-EB Boyaması Verilerinin Değerlendirilmesi	100
6. TARTIŞMA	104
7. KAYNAKLAR	119
8. ÖZGEÇMİŞ.....	132

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1: Erkeklerde En Sık Görülen Kansere Tipleri.....	14
Tablo 2: cDNA Karışım Miktarı	68
Tablo 3: cDNA Sentezi için Uygulanan PZR Programı	68
Tablo 4: RT-PZR için Herbir Kuyucuğa Konan Bileşikler.....	70
Tablo 5: Uygulanan RT-PZR Programı	70

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Prostat Bezinin Konumu	9
Şekil 2: Prostat Bezinin Zonal Anatomisi.	10
Şekil 3: Otofajinin Çeşitleri	27
Şekil 4: Hücrenin Sağ kalımı ve Ölümünde Otofaji	28
Şekil 5: Otofaji Basamaklarının Şematik Gösterimi	29
Şekil 6: ULK1/2, ATG13, RB1CC1 ve C12orf44'ten oluşan İndükleme Kompleksi.....	30
Şekil 7: Class III PtdIns3K Kompleksi Aktivitesinin Düzenlenmesi.....	32
Şekil 8: ATG12-ATG5-ATG16L1 Konjugasyon Kompleksi.	33
Şekil 9: LC3 Konjugasyon Sistemi.	34
Şekil 10: Otofajinin Moleküler Mekanizması.	36
Şekil 11: Otofaji ve Kanseri Hücre Metabolizması.	37
Şekil 12: Otofajinin Kontrolünde Kalsiyum Ve Kalsiyuma Geçirgen İyon Kanalları.....	41
Şekil 13: TRPM2'nin Protein Yapısı ve Transmembran Topolojisi.....	45
Şekil 14: TRPM2 Aktivasyonu için Sinyal Mekanizmaları	49
Şekil 15: Tümörögenizde ROT ve Otofaji.....	56
Şekil 16: Oksidatif Stres Sensörü Olarak TRPM2 Kanalının Fonksiyonel Rolü..	57
Şekil 17: Doza Bağımlı H ₂ O ₂ Uygulamasının Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi.	72
Şekil 18: Yapılan Uygulamaların Canlılık Üzerine Etkisi	74
Şekil 19: Oluşturulan Gruplarda ULK1 Geninin RT-PZR Kat Artışı Grafiği.....	75
Şekil 20: Oluşturulan Gruplarda ULK2 Geninin RT-PZR Kat Artışı Grafiği.....	76
Şekil 21: Oluşturulan Gruplarda RB1CC1 Geninin RT-PZR Kat Artışı Grafiği..	77

Şekil 22: Oluşturulan Gruplarda PIK3C3 Geninin RT-PZR Kat Artışı Grafiği...	78
Şekil 23: Oluşturulan Gruplarda PIK3R4 Geninin RT-PZR Kat Artışı Grafiği...	79
Şekil 24: Oluşturulan Gruplarda AMBRA1 Geninin RT-PZR Kat Artışı Grafiği.	80
Şekil 25: Oluşturulan Gruplarda SH3GLB1 Geninin RT-PZR Kat Artışı Grafiği	81
Şekil 26: Oluşturulan Gruplarda UVRAG Geninin RT-PZR Kat Artışı Grafiği .	82
Şekil 27: Oluşturulan Gruplarda BECN1L1 Geninin RT-PZR Kat Artışı Grafiği	83
Şekil 28: Oluşturulan Gruplarda BECLIN1 Geninin RT-PZR Kat Artışı Grafiği	84
Şekil 29: Oluşturulan Gruplarda ATG12 Geninin RT-PZR Kat Artışı Grafiği ...	85
Şekil 30: Oluşturulan Gruplarda ATG5 Geninin RT-PZR Kat Artışı Grafiği.....	86
Şekil 31: Oluşturulan Gruplarda ATG16L1 Geninin RT-PZR Kat Artışı Grafiği.	87
Şekil 32: Oluşturulan Gruplarda MAPLC3-A Geninin RT-PZR Kat Artışı Grafiği	88
Şekil 33: Oluşturulan Gruplarda MAPLC3-B Geninin RT-PZR Kat Artışı Grafiği	89
Şekil 34: Oluşturulan Gruplarda LAMP1 Geninin RT-PZR Kat Artışı Grafiği	90
Şekil 35: Oluşturulan Gruplarda LAMP2 Geninin RT-PZR Kat Artışı Grafiği...	91
Şekil 36: Oluşturulan Gruplarda LAMP3 Geninin RT-PZR Kat Artışı Grafiği.....	92
Şekil 37: Oluşturulan Gruplarda BAX Geninin RT-PZR Kat Artışı Grafiği	93
Şekil 38: Oluşturulan Gruplarda BCL-2 Geninin RT-PZR Kat Artışı Grafiği.....	94
Şekil 39: Oluşturulan Gruplarda TP53 Geninin RT-PZR Kat Artışı Grafiği	95

Şekil 40: Oluşturulan Gruplarda TP73 Geninin RT-PZR Kat Artışı Grafiği	96
Şekil 41: Oluşturulan Gruplarda TRPM2 Geninin RT-PZR Kat Artışı Grafiği...	97
Şekil 42: siTRPM2 Uygulaması Sonucu TRPM2 mRNA Kat Artış Grafiği	98
Şekil 43: siTRPM2 Uygulamasının Verimlilik Yüzdesi Grafiği.....	98
Şekil 44: Doza Bağlı H ₂ O ₂ Uygulamasının Bazı Otofajik ve Apoptotik Gen Ekspresyonları Üzerine Etkisi.....	99
Şekil 45: Kontrol, Kontrol-siRNA ve TRPM2-siRNA Uygulanan PC-3 Hücrelerinin AO-EB Boyaması Öncesi İnverted Mikroskop ve AO-EB Boyaması Sonrası Floresan Mikroskop Görünümleri.....	100
Şekil 46. H ₂ O ₂ , TRPM2-siRNA+H ₂ O ₂ ve 3-MA Uygulanan PC-3 Hücrelerinin AO-EB Boyaması Öncesi İnverted Mikroskop ve AO-EB Boyaması Sonrası Floresan Mikroskop Görünümleri.....	101
Şekil 47. 3-MA+H ₂ O ₂ , TRPM2-siRNA+3-MA ve TRPM2-siRNA+3-MA+H ₂ O ₂ Uygulanan PC-3 Hücrelerinin AO-EB Boyaması Öncesi İnverted Mikroskop ve AO-EB Boyaması Sonrası Floresan Mikroskop Görünümleri.....	102
Şekil 48. z-VAD-fmk+H ₂ O ₂ , z-VAD-fmk+TRPM2-siRNA ve z-VAD-fmk+H ₂ O ₂ +TRPM2-siRNA Uygulanan PC-3 Hücrelerinin AO-EB Boyaması Öncesi İnverted Mikroskop ve AO-EB Boyaması Sonrası Floresan Mikroskop Görünümleri.....	103

KISALTMALAR LİSTESİ

3-MA	: 3-Metil Adenin
8-oxy-dG	: Oxidized DNA Adduct 8-Oxy-7,8,Dihydro-29-Deoxyguanosine
Actb	: Beta Aktin
ADPR	: Adenozin Difosforiboz
AKT	: Protein Kinaz B
AMACR	: A-Methyl Coenzyme A Racemase
AMBRA1	: Activating Molecule In Becn1-Regulated Autophagy Protein
AMP	: Adenozin Monofosfat
AMPK	: AMP-Activated Protein Kinaz
AMPKK	: AMPK Kinaz
AO	: Akridin Oranj
Apaf-1	: Apoptotik Peptidaz Aktive Edici Faktör 1
AR	: Androjen Reseptör
ATFB1	: Atrial Fibrillation Familial 1
ATG	: Autophagy-Related Genes (Otofaji İle İlişkili Genler)
ATP	: Adenozin Trifosfat
AUA	: Amerikan Üroloji Birliği
BAX	: BCL-2 Associated X Protein (BCL-2 İlişkili X Proteinini)
BCL-2	: B-Cell Cll/Lymphoma 2
BFP	: Mavi Flüoresan Protein
BPH	: Benign Prostat Hiperplazisi
Ca⁺²	: Kalsiyum İyonu
cADPR	: Siklik ADPR
CaM	: Kalmodulin

CAPB	: Capping Protein Subunit Beta
CDKN1B	: Cyclin-Dependent Kinase İnhibitor 1B
CDKN2A	: Cyclin-Dependent Kinase İnhibitor 2a
CHEK2	: Checkpoint Kinase 2
CRACs	: Ca ⁺² Release-Activated Ca ⁺² Channels
DISC	: Ölümü Uyaran Sinyal Kompleksini
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
DRE	: Dijital Rektal İnceleme
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
EAU	: Avrupa Üroloji Birliği
E-kaderin	: Epitelyal Kaderin
ELAC2	: Hereditary Prostate Cancer 2 (HPC2)/Elac Ribonuclease Z 2
EMT	: Epitelden Mezenkimale Geçiş
EO	: Etidyum Bromid
ER	: Endoplazmik Retikulum
Ero1	: ER Luminal Tiyol Oksidaz
FADD	: Ölüm Alanı İçeren Protein (Death Domain-Containing Protein)
FBS	: Fötal Sığır Serumı
FDA	: United States Food And Drug Administration
GAPDH	: Gliseraldehit 3-Fosfat Dehidrogenaz
GSK	: Gleason Skorlama Sistemi
GSTP1	: Glutasyon S-Transferaz Geni
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
HPC20	: Hereditary Prostate Cancer 20
HPCX	: Hereditary Prostate Cancer, X-Linked
HSD3B	: 3 Beta And Steroid Delta-Isomerase

KLF6	: Kruppel-Like Faktör 6
LAMP1	: Lysosomal-Associated Membrane Protein 1
LAMP2	: Lysosomal-Associated Membrane Protein 2
LAMP3	: Lysosomal-Associated Membrane Protein 3
MAP1LC3A	: Microtubule-Associated Protein 1 Light Chain 3 Alpha
MAP1LC3B	: Microtubule-Associated Protein 1 Light Chain 3 Beta
Mn-SOD	: Süperoksit Dismutaz
MSR1	: Macrophage Scavenger Receptor 1
MTORC1	: Mechanistic Target Of Rapamycin Complex 1
NAADP	: Nicotinic Acid-Adenine Dinucleotide Phosphate
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NBS1	: Nijmegen Breakage Syndrome 1 Protein
NKX3.1	: Nk Homeobox Family 3a
O₂⁻	: Süperoksit Anyon
OH[·]	: Hidroksil Radikal
PC-3	: İnsan Metastatik Prostat Kanseri Hücre Hattı
PCAP	: Predisposing For Prostate Cancer
PE	: Fosfotidiletanolamin
PECAM-1	: Platelet-Endotelial Hücre Adezyon Molekülü 1
PIK3C3	: Phosphoinositide-3-Kinase Class 3
PIK3R4	: Phosphoinositide-3-Kinase Regulatory Subunit 4
PIM1	: Pim-1 Proto-Oncogene Serine/Threonine Kinase
PIN	: Prostatic Intraepithelial Neoplasia
Pk	: Prostat Kanseri
PMCA	: Plasma Membrane Calcium Atpases
PSA	: Prostat Spesifik Antijen

PSCA	: Prostate Stem Cell Antigen
PtdIns3K	: Containing Class III Phosphatidylinositol 3-Kinase
PTEN	: Phosphatase And Tensin Homolog
Rb	: Retinoblastoma Geni
RB1CC1	: RB1-İnducible Coiled-Coil 1
RNA	: Ribonükleik Asit
RNASEL	: Ribonükleaz L
ROT	: Reaktif Oksijen Türleri
RT-PZR	: Real Time-Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SERCA	: Sarco-/Endoplasmic Reticular Calcium Atpase
SH3GLB1	: SH3-Domain GRB2-Like Endophilin B1
SOCE	: Store-Operated Calcium Channel Entry
SOD1	: Copper/Zinc Süperoksit Dismutaz
SOD2	: Manganez Süperoksit Dismutaz
TNF	: Tümör Nekrozis Faktör
TP53	: Tumor Protein P53
TP73	: Tumor Protein P73
TRP	: Transient Receptor Potential
TRPA	: Transient Receptor Potential Ankyrin
TRPC	: Transient Receptor Potential Canonical
TRPM	: Transient Receptor Potential Melastatin
TRPM	: Transient Receptor Potential Melastanin
TRPM2-SSF	: Transient Receptor Potential Melastanin-Striatum Shorter Form
TRPML	: Transient Receptor Potential Mucolipin
TRPP	: Transient Receptor Potential Polycystin
TRPV	: Transient Receptor Potential Vanilloid

UBL	: Ubiquitin-Like
ULK1	: Unc-51-like kinase 1
ULK2	: Unc-51-like kinase 2
UVRAG	: UV Radiation Resistance Associated Gene
VCAM-1	: Vasküler Hücre Adezyon Molekülü 1
VDR	: Vitamin-D Receptor
XO	: Ksantin Oksidaz
z-VAD-fmk	: Apoptoz İnhibitörü

1. ÖZET

Prostat kanseri, dünyada erkekler arasında önde gelen sağlık problemlerinden biridir. Son zamanlarda etyopatogenezinin otofajik yolların da katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Otofajinin kilit düzenleyicisi olarak tanımlanan hücre içi kalsiyum düzeyleri kalsiyum kanalları tarafından düzenlenmektedir. Bir kalsiyum kanalı olan TRPM2'nin oksidatif stres aracılı apoptozda görevlidir. Reaktif oksijen türlerinden biri olan H_2O_2 'in hem TRPM2'yi hem de otofajiyi aktive ettiği gösterilmesine rağmen oksidatif stress aracılı otofajik yollarda TRPM2'nin rolünün olup olmadığı bilinmemektedir. Bu çalışmada, prostat kanseri PC-3 hücre hattında, otofajik yollarda TRPM2'nin rolünün araştırılması amaçlanmıştır.

PC-3 hücre hattında, otofajik ve apoptotik yollar ve TRPM2'nin aktivasyonu için H_2O_2 uygulandı. TRPM2, otofajik ve apoptotik aktiviteler sırasıyla; siRNA, 3-MA ve z-VAD-fmk uygulamalarıyla engellendi. Yapılan her uygulama sonucunda TRPM2, otofaji ve apoptoz ile ilişkili genlerin mRNA ekspresyon profilleri kantitatif RT-PZR ile ortaya konuldu. Otofajik aktiviteyi belirlemek amacıyla AO-EB boyaması yapıldı.

H_2O_2 uygulamasının hücre canlılığını azalttığı ve z-VAD-fmk+ H_2O_2 uygulamasının, 3-MA+ H_2O_2 uygulamasına kıyasla daha fazla hücre ölümüne neden olduğu belirlendi. H_2O_2 uygulaması kaynaklı hücre ölümünün TRPM2-siRNA+ H_2O_2 uygulamasından az da olsa fazla olduğu tespit edildi. BAX ve TP73 gibi apoptotik genlerin ekspresyonlarının H_2O_2 , TRPM2-siRNA+ H_2O_2 , 3-MA+ H_2O_2 ve TRPM2-siRNA+3-MA+ H_2O_2 uygulamalarında kontrole kıyasla arttığı belirlendi. z-VAD-fmk+ H_2O_2 uygulamasının otofajik süreçlerde yer alan

genlerin ekspresyonlarını arttırdığı bulundu. TRPM2-siRNA+z-VAD-fmk+H₂O₂ uygulaması sonucu, otofajik gen ekspresyonlarının kontrole benzer olduğu belirlendi.

Verilerimiz, H₂O₂'in genel olarak hem otofajik hem de apoptotik yollar için aktivatör olduğunu ve bu etkisini TRPM2 aracılı olarak gerçekleştirdiğini göstermektedir. Ayrıca TRPM2-siRNA uygulamasının H₂O₂ indüklü otofajik yolları baskılarken apoptotik yolları aktive ettiğini vurgulamaktadır. Sonuç olarak; TRPM2'nin, otofajik yollarındaki rolünün tam olarak aydınlatılabilmesi için daha detaylı moleküler genetik çalışmalar yapılmalıdır.

Anahtar Kelimeler: Prostat Kanseri, Otofaji, TRPM2 iyon kanalı, H₂O₂, Apoptoz

2. ABSTRACT

THE INVESTIGATION OF TRPM2 ION CHANNEL'S ROLE ON AUTOPHAGIC PATHWAYS IN HUMAN PROSTATE CANCER PC-3 CELL LINE

Prostate cancer is one of the leading health problems among men in the world. Recently, it has been shown that also autophagic pathways are contribute to its ethiopathogenesis. Intracellular calcium levels described as key regulator of autophagy is regulated by calcium channels. TRPM2, a calcium channel, has function in oxidative stress mediated apoptosis. Although, it has been shown H₂O₂, one of reactive oxygen species, activates both TRPM2 and autophagy, it is not known whether TRPM2 has a role in oxidative stress-mediated autophagic pathways. In this study, it is aimed to investigate the role of TRPM2 on autophagic pathways in prostate cancer PC-3 cell line.

In PC-3 cell line, H₂O₂ was applied for activation of apoptotic and autophagic pathways and TRPM2. TRPM2, autophagic and apoptotic activites were blocked through siRNA, 3-MA and z-VAD-fmk, respectively. mRNA expression profiles of genes related with TRPM2, autophagy and apoptosis was demonstrated by quantitative RT-PCR. AO-EB staining was performed to determine the autophagic activity.

It was determined that H₂O₂ application led to decreased the cell viability and application of z-VAD-fmk+H₂O₂ caused more cell death compared to 3-MA+H₂O₂ application. It was detected that H₂O₂ application-induced cell death was slightly more than application of TRPM2-siRNA+H₂O₂. It was determined that the expressions of BAX and TP73 apoptotic genes were significantly

increased the exposure to H_2O_2 , TRPM2-siRNA+ H_2O_2 , 3-MA+ H_2O_2 , TRPM2-siRNA+3-MA+ H_2O_2 applications compared to control. It was found that the exposure to z-VAD-fmk+ H_2O_2 was increased expression of genes, involving in the autophagic process. It was detected that autophagic gene expressions in TRPM2-siRNA+z-VAD-fmk+ H_2O_2 application were similar to the control.

Our data suggest that, H_2O_2 , generally, is activator for both autophagic and apoptotic pathways and performs this effect as the TRPM2 mediated. Furthermore it emphasizes that while TRPM2-siRNA application suppressing H_2O_2 -induced autophagic pathways, activates apoptotic pathways. Consequently; in order to clarify the fully role of TRPM2 in the autophagic pathways, more detailed molecular genetic studies should be done.

Key Words: Prostate cancer, Autophagy, TRPM2 ion channel, H_2O_2 , Apoptosis

3. GİRİŞ

Temel işlevi semen üretimine yardımcı olmak olan prostat, her erkekte bulunan küçük bir salgı bezidir. İdrar torbasının hemen altında yer alan prostat bezi, idrarı, idrar torbasından penise ulaştıran idrar yolunu sarmaktadır (1). Ekzokrin bir bez olarak tüm memeli erkeklerinde korunmuştur. Bu durum bireyin hayatta kalması açısından çok önemli olmasa da türlerin üremesinde hayati bir rol oynamaktadır (2). Prostatta meydana gelen hastalıklar, benign (iyi huylu) (benign prostat hiperplazi, prostatit vb.) ve malign (kötü huylu) (prostat karsinomu) olmak üzere iki sınıfta incelenebilmektedir (3).

Prostat kanseri (Pk), dünya genelinde insanlarda erkek bireylerin kanser ilişkili ölümlerinin önde gelen nedenlerinden biridir ve erkeklerde en sık görülen ikinci kanser türüdür (4). Gelişiminde hormonal faktörlerin önemli olduğu bilinen Pk, genellikle 50 yaş üstü erkek bireylerde görülür (5). Lokal olarak düşük hızda gelişen ve ilerlemesi sıklıkla uzun yıllar alan bu hastalık sonuçta prostatın dışındaki komşu dokulara ya da kan aracılığıyla farklı dokulara geçiş yapabilmektedir (6). Özellikle yaşlı erkek bireyler arasında önemli bir sağlık tehdidi olan Pk için henüz çözüm sağlayacak bir tedavi geliştirilememiştir (7). Hastalığa bağlı değişiklikler, uygulanan tedaviler ve tedavilere bağlı yan etkiler psikolojik (anksiyete, depresyon vb.) ve işlevsel (cinsel işlev bozuklukları) bozukluklara yol açabilmektedir (8). Erken teşhis ve tedavi olanakları ile hastaların 5 yıllık sağ kalım olasılığı % 99'lara ulaşmaktadır (9). Genellikle 60-70 yaşlarında teşhis edilen (10) Pk'nin başlangıcı ve ilerlemesi ile ilgili birçok teori önerilmiş ve araştırılmış olsa da moleküler temeli tam olarak bilinmemektedir (11).

Pk ile ilgili yapılan birçok çalışmada Beclin 1 geninin bir allelinin eksik olduğunun gözlenmesi, otofajinin prostatta bir tümör baskılayıcı mekanizma olarak işlev görebileceğini düşündürmektedir (12). Otofaji, hücresel homeostazı korumak için; hasar görmüş organellerin, uzun ömürlü proteinlerin ve protein kümelerinin parçalanmasını ve geri dönüşümünü sağlayan hücresel katabolik bir işlevdir (13). Optimum büyüme koşulları altında hücreler, çeşitli uyaranlar ile hızlıca artan otofajinin, bazal seviyede kalmasını sağlarlar (14). Otofaji mekanizmalarında Autophagy-related genes (Atg) olarak adlandırılan otofaji ilişkili proteinler rol oynamaktadırlar (15). Atg proteinlerinin bir kısmı (Atg4, Atg13 vb.) ve çeşitli protein kompleksleri otofajik kesecik ve otofagozom oluşumunda yer alır (16). Otofaji sırasında, sitoplazmik içerikler otofagozom olarak adlandırılan çift katlı membran yapılar tarafından sarılır. Otofagozomlar, otolizozomları oluşturmak için ya endozomlarla ya da lizozomlarla kaynaşır ve olgunlaşır. Sonuçta, meydana gelen otolizozomun içeriği ile birlikte iç membranı, lizozomal enzimler tarafından parçalanır (17). Otofaji, hücre homeostazındaki temel rolüne ek olarak, çeşitli fizyolojik ve patofizyolojik fonksiyonları ile ya hücre adaptasyonu ve hayatta kalımı ya da bazı koşullar altında hücre ölümüne sebebiyet verir (14). Otofajik hücre ölümü, hücre canlılığının kaybedilinceye kadar sitoplazmanın otofagozom-lizozom bağımlı parçalanmasını içeren bir süreç anlamına gelir. Bu süreç; apoptoz ya da nekrozu içermez. Eğer otofaji düzenlenmesi bir hastalığın muhtemel tedavisi olarak araştırılıyorsa, otofajik hücrelerde yaşam ya da ölüm kararlarının ayrımının anlaşılması oldukça önemlidir (18). Otofaji düzenlenmesindeki bozuklukların, birçok fizyolojik işlevi

etkilediği bilinmektedir ve bu durum nörodejeneratif bozukluklar, kanser gibi çok sayıda hastalıkta vurgulanmıştır (14).

Hücrelerde otofagozomlar, endoplazmik retikulum (ER) ile golgi yapılarının aralarında bulunan ve memelilerde "otofaji oluşum merkezi" olarak adlandırılan yapılarda ortaya çıkarlar. Otofajik kesecik membranının kaynağı kesin olarak bilinmese de; bu zarın yeni sentezlendiği ya da endoplazmik retikulum, mitokondri dış membranı ve plazma membranından kaynaklanabileceği ileri sürölmektedir (16).

Kalsiyum pek çok hayati öneme sahip işlevi kontrol etmektedir (19). Hücre içi organellerin membranlarında ya da plazma membranında kalsiyuma geçirgen iyon kanallarının lokalize olduğu bilinmektedir (20,21). Mitokondri, ER, lizozom ve sitosoldeki kalsiyum düzeyleri, kalsiyuma geçirgen iyon kanalları tarafından düzenlenmektedir. Bu iyon kanallarının ekspresyonu ya da fonksiyonundaki değişimler, hücre içi kalsiyum konsantrasyonunu ve bunun sonucunda da kalsiyuma bağlı çoğalma, apoptoz ve otofaji gibi işlevleri etkilemektedir (22). Elde edilen son veriler ile hücre içi kalsiyum, hem bazal (23) hem de tetiklenmiş (24) otofajinin kilit bir düzenleyicisi olarak tanımlanmıştır. Kalsiyum homeostazını düzenleme mekanizmalarının bozulması, kanseri de içeren çok sayıdaki çeşitli ciddi patolojilere sebebiyet verebilmektedir (25).

Yapılan alışmalar, Transient Receptor Potential (TRP) iyon kanal ailesinin prostat karsinomu oluşumu sırasında kalsiyum homeostazının düzenlenmesinde önemli bir role sahip olduğunu göstermiştir (11). TRP iyon kanal ailesi üyeleri duyu algılama, çoğalma, hücre sağ kalımı ve ölümlünü içeren pek çok fizyolojik işlevde yer alır (26). Pk'nde, TRP ailesinin Melastanin (TRPM)

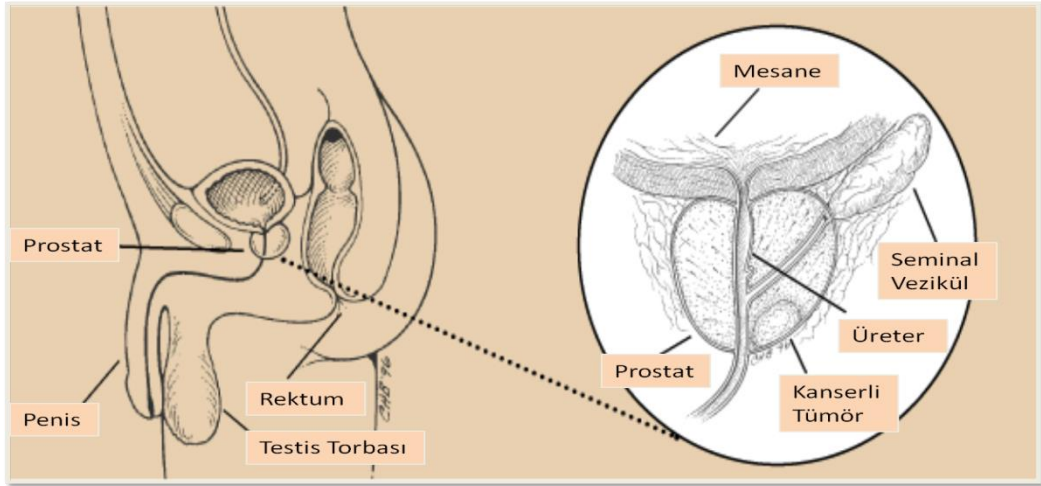
iyon kanal grubu üyelerinden bazılarının etkili rol oynadığı tespit edilmiştir (27). TRPM2, hem iyon kanalı hem de enzim olmak üzere iki fonksiyona sahip olmasından dolayı "chanzyme" (kanal ve enzim) olarak bilinmektedir. Çünkü TRPM2'nin karboksil ucu enzimatik olarak aktif olan adenosin difosforiboz (ADPR) hidrolaz bölgesi içermektedir (28). Hücre yüzeyinde kalsiyuma geçirgen bir kanal olarak fonksiyon gören TRPM2'nin lizozomal kalsiyum salınım kanalı olarak işlev gördüğü, lizozomal ve endozomal membranlarda hücre içinde lokalize olduğu gösterilmiştir (29). Pk'nde hücre çoğalması ile ilişkili olduğu saptanan TRPM2 (30); sitokinlerin üretimi, insülin salınımı, oksidatif stres ve apoptoz gibi çok sayıdaki fizyolojik işlevde yer alır. TRPM2'nin; ADPR, Hidrojen peroksit (H_2O_2), nicotinic acid-adenine dinucleotide phosphate (NAADP), pH ve sitosolik kalsiyum gibi çeşitli uyaranlar tarafından etkin hale getirildiği ve düzenlendiği gösterilmiştir (31).

TRPM2'nin, temel olarak plazma membranında eksprese olduğu ve oksidatif stresle tetiklenmiş hücre ölümünde kilit bir rol oynadığı gösterilmiştir (32). Oksidatif stres; DNA hasarını, kalsiyum iyonu (Ca^{+2}) hareketini, otofajiyi ve hücre ölümünü tetikler (33, 34). Oksidatif stres kaynaklarından olan Reaktif Oksijen Türleri (ROT), otofajik kesecik oluşumunda ve otofajinin hücre ölümü veya hayatta kalımı üzerindeki rolünün düzenlenmesinde etkilidir (35). ROT moleküllerinden olan H_2O_2 , TRPM2 iyon kanalı (36) ve otofaji (35) için indükleyicidir.

Çalışmamızda insan prostat kanseri hücre hattında (PC-3), TRPM2 iyon kanallarının inhibe edilmesinin otofajik yollara etkisinin olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

3.1. PROSTAT BEZİ

Prostat; tüm erkek memelilerde korunmuş, bireyin hayatta kalması için elzem olmayan ancak türlerin üremesinde hayati bir role sahip olan ekzokrin bir bezdir (2). Mesanenin hemen altında ve prostatik üretranın çevresinde yer alan prostat yaklaşık olarak 4 cm çapında ve 8-20 g ağırlığındadır (37). Boyutu yaşa bağlı olarak değişiklik göstermekle beraber genç erkek bireylerde yaklaşık olarak bir ceviz büyüklüğündeyken yaşlı erkek bireylerde daha büyük olabilmektedir. Büyümesi, testosteron gibi erkeklik hormonları (androjenler) olarak adlandırılan tarafından tetiklenmektedir (38).



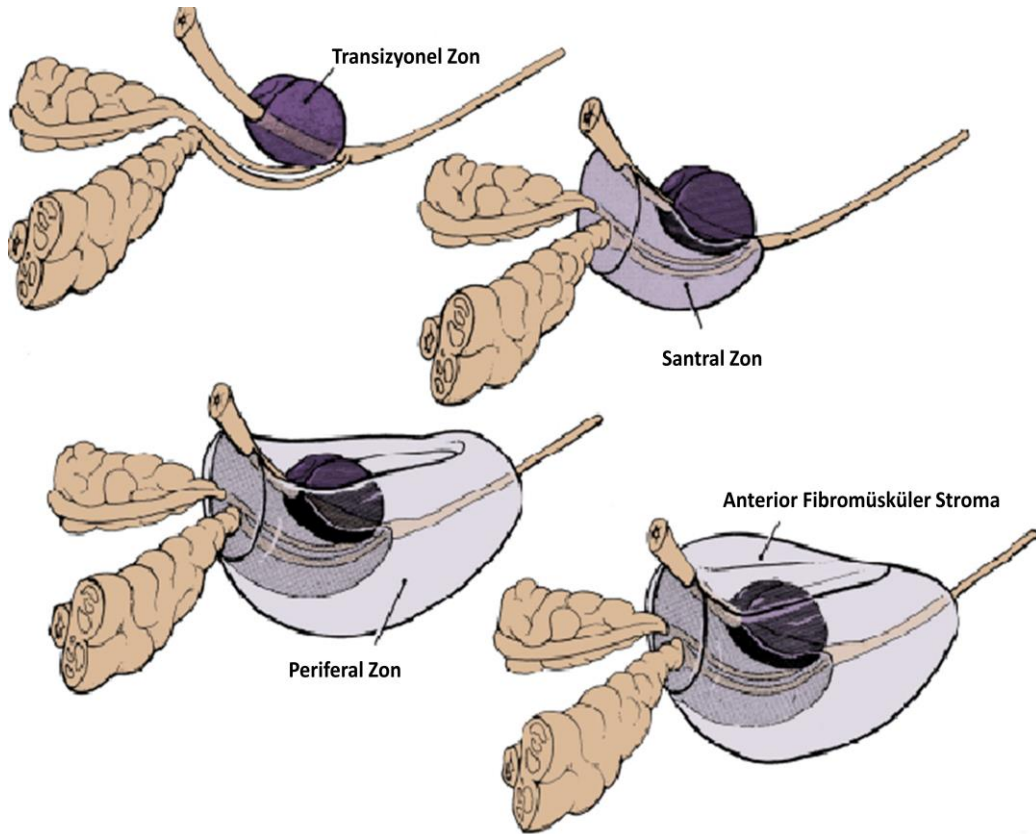
Şekil 1. Prostat Bezinin Konumu (38)

Ekzokrin bir bez olmasının yanı sıra mesanenin hemen altında üretrayı çevreleyen bir fibromusküler stroma organı olan prostat, seminal veziküller ile birlikte kapülasyonun (çiftleşme) emisyon fazı sırasında salınan insan seminal sıvısı ya da ejakülatın tamamını üretmektedir. Salınan prostat sıvısı; **sitrik asit, lipidler, proteolitik enzimler** (prostat spesifik antijen [PSA] gibi), **çinko** (50mg/100g kuru ağırlığı ile prostat tüm organlar içinde en yüksek çinko konsantrasyonuna sahip olandır) ve spermin hareketliliği ve sağ kalımı için elzem,

oositin doğal yollardan fertilize olmasını sağlamak için gerekli olan **asit fosfatazı** içermektedir (39).

Normal bir prostat bezi **anatomik olarak** üç farklı zona ayrılır. Bunlar;

- 1) Periferik Zona:** Prostat bezinin büyük kısmını oluşturmaktadır.
- 2) Santral Zona:** Prostat bezinin yaklaşık olarak %25'ini oluşturmaktadır.
- 3) Transizyonel Zona:** Prostatın bazal kısmını oluşturmakta ve genç erkek bireylerde prostat hacminin %5-10'unu oluşturan prostatik üretrayı sarmaktadır. Bu kısım yaşlı erkek bireylerde diğer yapıları ve üriner fonksiyonu tehlikeye sokan Benign Prostat Hiperplazisi (BPH)'nden sorumludur (40).



Şekil 2. Prostat Bezinin Zonal Anatomisi (41)

Prostat bezi **histolojik olarak** fibromusküler stroma ve glandüler yapılardan oluşmaktadır. Prostat bezinde temel olarak üç farklı tip hücre yer almaktadır (42). Bunlar;

1) Bazal Hücreler: Sekretuar hücreleri bazal membrandan ayıran küboidal ya da yassı şeklindeki bu hücreler karsinomlarda yer almadığından bunların biyopsilerde tanınması oldukça önemlidir (43).

2) Sekretuar Hücreler: Sitoplazmaları soluk ya da şeffaf olan, kolumnar şekilli, genellikle bazal yerleşimli tek tip nükleus içeren hücrelerdir (43).

3) Nöroendokrin Hücreler: Kromogranin gibi nöroendokrin belirleyiciler ile pozitif boyanarak görünür hale gelen, granüler eozinofilik sitoplazmalı hücrelerdir (44).

3.1.1. Prostat Bezi Hastalıkları

Prostat yıllar boyunca sadece sekretuar özelliği olan bir bez olarak görülerek ihmal edilmiştir. Ancak prostatın oldukça yüksek oranda sağlık ve ekonomik sorunlara yol açan prostat bezinin iltihabı (prostatit), BPH ve Pk olmak üzere başlıca üç hastalığı vardır (45).

3.1.1.1. Prostatit

Bu terim genel olarak hem enfektif bir kökene sahip olduğu varsayılan akut ve kronik bakteriyel prostatiti hem de herhangi bir enfektif etkenin saptanamadığı, temeli bir çok faktöre dayanan ve vakaların büyük bir kısmında belirsiz olan “**prostatit sendromu**” terimini kapsamaktadır (46). 50 yaşın altındaki erkeklerde en yaygın ürolojik tanıyı temsil eden, çok sık görülen ve güçten düşüren bir hastalıktır. Yaygınlığı ve sağlık hizmet kaynaklarına olan olumsuz etkisine rağmen prostatitin etiyolojisi, tanısı ve tedavisi ile ilgili olarak

sahip olunan bilgiler çelişkilidir (47). En sık rastlanan inflamatuvar ürolojik hastalıklardan olan prostatit, etiyolojisine bağlı olarak tedavi edilebilmektedir (48).

3.1.1.2. Benign Prostat Hiperplazisi (BPH)

Prostatın transizyonel zonundaki düz kas ve epitel hücrelerinin artması ile karakterize edilen histolojik bir tanı olan BPH (49), ileri yaş erkeklerde idrar depolama, boşaltma, işeme sonrası semptomlara yol açan ve hastaların yaşam kalitesini azaltan bir hastalıktır (50). Erkeklerin yaşlanmayla birlikte en fazla karşılaştıkları hastalıklardan biri olan BPH, 60'lı yaşlardaki erkeklerin %50'sinde bulgu vermekte ve 70'li yaşlarda hastalığın prevalansı %80'e ulaşmaktadır (51). Amerikan Üroloji Birliği (AUA) ve Avrupa Üroloji Birliği (EAU)'ne göre BPH'nin tedavisi izlem, medikal tedavi, minimal invaziv cerrahi ve cerrahi tedavi olarak 4 başlık altında incelenmektedir (52). Tedavi secimi; hastanın tercihi yanı sıra tedavinin etkinliğine, etkinin başlangıç süresine ve giderilebilirliğine göre değişmektedir (53) BPH tedavisinde son zamanlarda medikal tedavi ve minimal invaziv cerrahi teknikler daha fazla tercih edilmektedir. Medikal tedavi etkinlik ve güvenilirlik açısından başarılı olmasına rağmen refrakter üriner retansiyon, mesane taşı, geçmeyen makroskopik hematuri (kanlı idrar) gibi durumların varlığında cerrahi tedavi yöntemleri tercih edilebilir (54).

3.1.1.3. Prostat Kanseri (Pk)

Trilyonlarca canlı hücreden oluşan vücudumuzda normal bir vücut hücresi düzenli bir şekilde büyür, yeni hücrelere ayrılır ve ölür. Bir bireyin hayatının erken yılları sırasında, normal hücreler kişinin büyümesini sağlamak için hızlı bir şekilde bölünür. Kişi olgunlaştığında ise çoğu hücre sadece yıpranmış, hasar görmüş ya da ölmekte olan hücrelerin yerini almak için bölünür. Kanser, vücudun herhangi bir bölümünde yer alan hücrelerin kontrol dışı büyümeye başlaması ile ortaya çıkar. Kanserin bir çok çeşidi vardır ancak bunların hepsi de bu anormal hücrelerin kontrol dışı büyümesinden kaynaklanmaktadır. Kanser hücreleri ölmezler bunun yerine büyümeyi ve yeni kanser hücrelerini oluşturmayı sürdürürler. Çoğu vakada bir tümör oluşturduğu gözlenen kanser hücreleri ayrıca normal hücrelerin yapamadığı diğer dokulara invazyonu (yayılım) da gerçekleştirebilirler (38).

Kanser, ekonomik olarak gelişmiş ülkelerde başlıca ölüm nedenlerindendir ve gelişmekte olan ülkelerdeki ölüm nedenlerinin ikinci sırasında yer almaktadır. Ekonomik olarak gelişen ülkelerde kanserin olumsuz sonuçları; sigara, fiziksel hareketsizlik ve batılı tarzı beslenmeyi içeren kanser ile ilişkili yaşam tarzı seçimlerinin benimsenmesinin yanı sıra nüfusun yaşlanması ve büyümesinin bir sonucu olarak artmaktadır (55).

Tablo 1. Erkeklerde En Sık Görülen Kansere Tipleri (56)

SIRA NO	TÜRKİYE	DÜNYA	IARC'A ÜYE 24 ÜLKE	AB (28 ÜLKE)	ABD
1	Akciğer	Akciğer	Prostat	Prostat	Prostat
2	Prostat	Prostat	Akciğer	Akciğer	Akciğer
3	Mesane	Kolorektal	Kolorektal	Kolorektal	Kolorektal
4	Kolorektal	Mide	Mide	Mesane	Mesane
5	Mide	Karaciğer	Mesane	Böbrek	Böbrek

Pk; lokal olarak yavaş bir hızda, genellikle yıllar boyunca sürecektir şekilde, gelişen sonunda da prostatın dışındaki komşu dokulara ya da kan yoluyla farklı dokulara göç ederek yayılabilen bir kanser türüdür (4). Günümüzde erkeklerin en önemli sağlık sorunlarından birini oluşturan Pk'nin Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından Dünya genelinde erkeklerde en sık tanı konulan ikinci kanser türü olduğu bildirilmektedir (57).

3.1.1.3.1. Epidemiyolojisi

Pk, her yıl bildirilen 899000 yeni olguyla (tüm kanserlerin %14'ü) erkeklerde en yaygın ikinci kanserdir (58). Ancak, Pk insidans oranı Avustralya ve Yeni Zelanda, Avrupa ve Kuzey Amerika gibi en yüksek insidans oranlarına sahip merkezlerde 25 kat değişiklik gösterir. İnsidans ayrıca Afrika kökenli, Karayipli, Güney Amerika ve Sahra altı Afrikalı populasyonlarda da yüksektir ve Güney-Orta Asya'da oldukça düşüktür (4.1/100000). 2008'de Pk'nden 258000 kişinin öldüğü tahmin edilmektedir ki böylece Pk erkekler arasında kanser nedenli ölümler arasında en yaygın altıncı sebep olmuştur. Erkeklerde Pk'ne bağlı kanser

ölümlerinin yüzdesi; Asya'da %0.6-%4.8, Kuzey, Orta ve Güney Amerika Avrupa ve Avustralya'da %9.7-%16 arasında değişiklik göstermektedir (59).

Ülkemizde Pk epidemiyolojisi anlamında yapılan ve ülkemizin tamamını kapsayan ilk ve tek çalışma; Üroonkoloji Derneği tarafından Temmuz 2008-Haziran 2009 tarihleri arasında 12 ilde gerçekleştirilen “ProstatTURK” Pk insidans çalışmasıdır. IX. Üroonkoloji Kongresi’nde sunulan verilere göre bu çalışma sonucunda bir yıl içerisinde 4150 yeni Pk saptanmış ve insidans 35/100.000 olarak hesaplanmıştır. 43.7/100.000 oranı ile ülkemizdeki en yüksek Pk insidansına sahip olan şehir İstanbul iken en düşük il 17.7/100.000 oranı ile Edirne olarak belirlenmiştir. Ülkemizde yaşayan kırk yaş altındaki erkek bireylerde insidans 1/100.000, 70 yaş üstünde ise 300/100.000 olarak saptanmıştır ve Pk'nin en sık görüldüğü yaş aralığı %21.32 ile 65-69 olarak tespit edilmiştir (60).

3.1.1.3.2. Etiyolojisi

Pk'nin etiyolojisi kesin olarak bilinmiyor olsa da pek çok faktörün tek başına ya da beraberce etki gösterebileceği tahmin edilmektedir (61).

3.1.1.3.2.1. Risk Faktörleri

3.1.1.3.2.1.1. Yaş

Pk için en önemli risk faktörü yaştır çünkü yaşlandıkça bu hastalığa yakalanma riski artmaktadır. Pk'nin 50 yaşın altındaki erkeklerde görülmesi oldukça nadir bir durumken örneğin Birleşik Krallıkta 2009-2011 yılları arasındaki tüm olguların yaklaşık üçte biri 75 yaşın üstündeki erkek bireylerde tespit edilmiş olması Pk ile yaş arasındaki ilişkiyi çok net biçimde ortaya koymaktadır (62).

3.1.1.3.2.1.2. Irk

Dünyada Pk için en yüksek insidans oranlarına Afrika kökenli Amerikalı erkekler sahiptir. Irka göre Pk riskindeki farklılıklar beslenme, tedaviye ulaşma, tedavi ve takip gibi çevresel faktörlerden ve androjen reseptör (AR) konusundaki mikrosatellitlerin polimorfik çeşitliliği gibi genetik faktörlerden de kaynaklanabilir (63).

3.1.1.3.2.1.3. Aile Hikayesi

Genel popülasyona kıyasla birinci dereceden yakınlarında Pk saptanmış olan bireylerde görülme ihtimali daha yüksektir. Bunu örnekle açıklayacak olursak; erkek kardeşi ya da babası Pk olan bir bireyin Pk'ne yakalanma riski %15 iken hem babası hem de erkek kardeşi Pk olan bir bireyde bu oran %30 olmaktadır. Ayrıca ailesinde meme kanseri bulunan bireylerin de Pk'ne yakalanma ihtimallerinin daha fazla olduğu bildirilmektedir. Erken yaşlarda ortaya çıkan kanserlerde ailesel etkinin fazla olduğu ancak ileri yaşlardakilerin sporadik olarak geliştiği belirtilmiştir. Buna dayanarak aile geçmişinde Pk olan erkeklerin erken yaşlarda (40-45 yaş) PSA taramalarına başlamaları önerilmektedir (61).

3.1.1.3.2.1.4. Diyet

Tüm dünyada latent Pk insidansı benzer olsa da klinik Pk'nin insidansı oldukça farklılık göstermektedir. Bu durumun ortaya çıkmasında diyet ve çevresel faktörlerin çok önemli olduklarına dair kanıtlar bulunmaktadır. Latent ya da histolojik karakterdeki kanserlerin klinik kansere dönüşümünde diyetin etkili olabileceği öne sürülmektedir (64). Diyet içerisindeki yağ tüketim miktarı, özellikle çoklu doymamış yağ tüketimi, ile Pk arasında bir ilişki olduğu gösterilmiştir. Bu şekilde beslenen erkeklerde seks hormonu düzeyinde artışların

meydana gelmesi bu durumun sebebi olması büyük ihtimaldir. Bunun yanı sıra bazı yağ asitleri ya da bunların metabolitlerinin prostat tümör hücrelerinin çoğalmasına yol açtığı ortaya konmuştur. Aşırı kalsiyumun da Pk gelişiminde rol oynadığı gösterilmiştir (65). Bu durumun hangi mekanizma aracılığı ile gerçekleştiği bilinmiyor olsa da, yüksek kalsiyum düzeylerinin D vitamini üretimini azaltarak hücre çoğalmasını tetikleyebileceği düşünülmektedir (64).

3.1.1.3.2.1.5. Hormonlar

Embriyonik gelişimi de dahil olmak üzere hayatın her döneminde hormona hassas olan prostat her tür hormondan etkilense de androjenler, prostatik hücre çoğalmasını ve gelişimini en fazla etkileyen hormonlardır. Pk ile androjen-östrojenler arasındaki ilişki 1941 yılında Huggins ve Hodges'in metastatik Pk'li bireylerde orşiektomi ve östrojen uygulamasının kanseri ve metastazları geriletliğini gösterdiklerinden beri bilinmektedir (66). Dolaşımda yer alan androjenler normal prostat gelişiminin yanı sıra BPH ve Pk oluşumunda da etkili olmaktadır. Kanser oluşumundaki görevleri tam olarak bilinmese de hücre büyüme ve bölünmesinde etkili oldukları düşünülmektedir. Kişiden kişiye değişiklik gösteren serum testosteron düzeyi ile Pk gelişme riski arasında bir ilişki saptanamamıştır. Bazı çalışmalarda kanser tanısı konulan hastalardaki düşük seviyedeki serum testosteron kötü prognostik faktör olarak belirtilmektedir. Androjenlerin Pk'nin ortaya çıkması, gelişmesi ve ilerlemesindeki rolleri tam olarak anlaşılamamış olmakla birlikte, malign dönüşümün gerçekleşmesinin ardından hücre aktivasyonu ve bölünmesinde önemli rollere sahip oldukları açıktır (61).

3.1.1.3.3. Patolojisi

Prostat karsinomlarının %95'ini neoplastik özellik kazanmış farklı paternler ortaya koyan asinoslardan oluşan adenokarsinomlar oluşturmaktadır. Prostat adenokarsinom tanısı öncelikle yapısal patern ve buna ek olarak hücrelerin sitolojik özelliklerine dayanarak konulur. Tümörlerde bazal hücre tabakasının olmayışı temel olarak ortak özelliktir. Işık mikroskopi çoğunlukla tanı için yeterli olabilmektedir. Kolay bir şekilde tespit edilebilen tümörlerin yanı sıra normal bezleri oldukça iyi bir şekilde taklit edebilen düşük dereceli tümörler ya da doğal yapısı hakkında herhangi bir belirti vermeyen yüksek dereceli tümörler de izlenebilir. Özellikle düşük dereceli tümörlerde immunohistokimyasal yöntemler kullanılarak bazal hücre tabakası olmayışının ortaya konması tanıya yardımcıdır. Prostat adenokarsinomlarının Atrofik varyant, Pseudohiperplastik Varyant, Köpüksü hücreler içeren Varyant, Taşlı Yüzük hücreli ve kolloid karsinom gibi değişik tipleri tanımlanmış olup bunlar genellikle tipik asiner karsinoma eşlik eder (67).

3.1.1.3.4. Tespiti

En sık tanı konulan non-kutanöz kanser olan Pk'nde genel ölüm oranları 1993'ten bu yana hastalığın erken safhalarda tespit edilmesindeki artışlar, cerrahi ve radyasyon terapileri gibi lokal tedavilerdeki ilerlemelerin bir araya gelmesiyle giderek azalmaktadır (68).

Pk'nin biyolojik potansiyelinin tespitinde en güçlü prognoz belirleyicisi olan Gleason Skorlama Sistemi (GSK) kullanılır. GSK, farklılaşmanın daha fazla ön planda olduğu bir 'primer evre' ve ikinci en yaygın paternin temel alındığı bir 'sekonder evre'ye göre hesaplanır. Primer evre tümörün agresifliğini

tanımlamaktadır. Gleason skoru 6 ya da daha küçük olan prostat kanserleri iyi prognozludur. 8-10 olan kanserler kötü prognoza sahiptir ve tekrarlanma riski oldukça yüksektir. Skoru 7 olan kanserler değişken prognoza sahiptir ve ara formda ele alınır (69).

PSA, ilk olarak 1971'de tanımlanan bir kallekrein-like proteazdır (70). Prostat epitelyal hücrelerinden salınan PSA, 19q13.3-13.4 numaralı kromozom üzerinde yer alan androjen yanıtı bir gen tarafından kodlanır (71). PSA'nın esas fonksiyonu kendisinin proteolitik aktivitesi aracılığıyla insan semeninin sıvılaşmasını sağlamaktır (72). PSA başlangıçta prostata özgü bir protein olarak düşünülmüştür ancak sonraki araştırmalar ile PSA'nın diğer bir dizi normal erkek dokularında ve hatta bazı kadın dokularında az miktarda salındığı gösterilmiştir. PSA, Pk hastalarının serumunda ilk olarak 1980 yılında tespit edilmiştir ve normal PSA serum konsantrasyon limitinin erkekler için 4 ng/ml olduğu daha sonra belirlenmiştir (73). PSA, şu anda Pk için uygun en iyi ve United States Food and Drug Administration (FDA) tarafından onaylanmış olan tek klinik belirteç durumundadır.

Pk taramasının yapılabildiği bir diğer yöntem de Dijital Rektal İnceleme (DRE)'dir (74). Anormal DRE verileri (palpasyonda nodül ya da sertlik hissedilmesi) Pk'ni destekler. PSA'nın >4 ng/mL olması genelde malignite lehine olsa da bu durum her zaman doğru değildir (75). Bu sebeple PSA değerleri 4-10 ng/mL arasında olduğunda hastalık yönetiminde zorluklar ortaya çıkmaktadır. Bu sorunu çözüme kavuşturmak amacıyla görüntüleme ve görüntüleme eşliğinde doku örnekleme gündeme gelmiştir. Pk'nde de görüntüleme yöntemleri hastanın risk sınıfına göre tespit edilir. Burada dikkate alınan hususlar; hastanın yaşı, DRE

bulguları, PSA düzeyi, Gleason skoru ve eğer daha önce yapılmış ise pozitif biyopsilerdir (69).

3.1.1.3.5. Moleküler Patogenezi

Pk'nin gelişimi ve ilerlemesine yol açan moleküler yolların tespiti bu tümörün heterojenitesi ve çok odaklılığından dolayı oldukça zor bir işlemdir. DNA mikroarray teknolojisi ve proteomiks uygulaması gibi yeni araştırma araçlarının ortaya çıkması Pk'nin başlangıcı, gelişimi ve ilerlemesi hakkındaki bilgilerimizi arttırabilir. Epidemiyolojik olarak Pk kalıtsal ve sporadik formlar olmak üzere iki gruba ayrılrsa da bu iki grubu moleküler düzeyde ayırt etmek imkansızdır (76).

3.1.1.3.5.1. Kalıtsal Prostat Kanseri

Yatkınlık gösteren genin Mendel kalıtım düzenine sahip olduğu ailesel Pk'nin bir alt tipidir ancak Pk'ne neden olan yüksek derecede penetran yatkın genler henüz tanımlanmamıştır (77). Buna karşın, birden çok genin prostat karsinogenezinde az ve orta derecelerde etkiye sahip oldukları düşünülmektedir (78). Pk riskinin % 42'den fazlası kalıtsal faktörlerden kaynaklanabilir (79). Kalıtımın üç tipi (otozomal dominant, resesif ve X'e bağlı) de bildirilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda kalıtımın otozomal dominant formu 85 yaşa kadar olan toplam Pk insidansının % 9'u olarak hesaplanmıştır (80). Diğer çalışmalarda, babası hasta olanlar ile karşılaştırıldığında erkek kardeşleri hasta olan erkek bireylerin Pk'ne yakalanma riskinin daha yüksek olduğunun tespit edilmesinden dolayı Pk için kalıtımın X'e bağlı ve resesif formları ima edilmiştir (81). Bu yüzden Pk'nin kalıtımına birden fazla genin katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Aile bazlı bağlantı analizine dayalı olarak; ribonükleaz L (RNASEL),

Predisposing For Prostate Cancer (PCAP), Hereditary Prostate Cancer, X-Linked (HPCX), capping protein subunit beta (CAPB), Hereditary Prostate Cancer 20 (HPC20), Hereditary Prostate Cancer 2 (HPC2)/elaC ribonuclease Z 2 (ELAC2), Hydroxy-Delta-5-Steroid Dehydrogenase, 3 Beta And Steroid Delta-Isomerase (HSD3B), macrophage scavenger receptor 1 (MSR1), nijmegen breakage syndrome 1 protein (NBS1), checkpoint kinase 2 (CHEK2) gibi Pk'ne yatkınlık gösteren bir çok gen tanımlanmıştır (82).

3.1.1.3.5.2. Sporadik Prostat Kanseri

Çoğu Pk sporadiktir. Hastalığın başlangıcı, gelişmesi ve yayılımında yer alan çeşitli moleküler yolları içerirler.

3.1.1.3.5.2.1. Tümör Baskılayıcı Genler

Normal bir tümör baskılayıcı gen, tümör hücrelerinin gelişimini inhibe eder. Başlangıçta böyle bir genin fonksiyonunu kaybetmesi her iki allelinde mutasyonu ya da delesyonuna bağlanmıştır (83) ancak sonradan epigenetik değişiklikleri içerecek şekilde revize edilmiştir. Bu epigenetik değişiklikler arasında; Gen promotorlarındaki CpG bölgelerinin Deoksiribo Nükleik Asit (DNA) metilasyonu aracılığıyla bir ya da her iki allelinin inaktivasyonu, kalıtsal downregüle fonksiyon, klonal bir biçimde bozulmuş fonksiyon yer alır (84). Bu yüzden, normal fonksiyondaki değişim mutasyon, promotorün metilasyonu ya da protein ürününün modifikasyonu aracılığıyla olabilir (85). Pk'nin gelişimi, progresyonu ve androjen-bağımsız fenotiplerin ortaya çıkmasında rolü olan çok sayıda tümör baskılayıcı gen tanımlanmıştır. Bunlar arasında; Tumor protein p53 (p53), Phosphatase and tensin homolog (PTEN), Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (CDKN1B), NK Homeobox Family 3A (NKX3.1), Retinoblastoma

geni (Rb), Glutasyon S-transferaz geni (GSTP1), Kruppel-like faktör 6 (KLF6), Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A (CDKN2A/p16), Atrial Fibrillation Familial 1 (ATFB1) ve Anneksinler yer almaktadır (82).

3.1.1.3.5.2.2. Onkogenler

Onkogenler, proto-onkogenlerde meydana gelen genetik hasardan köken alırlar. Proto-onkogenler, hücrelerin normal gelişimi ve çoğalmasına katılırlar. Genetik bir değişim (mutasyon, delesyon vb.) olması durumunda anormal hücre büyümesi ve onkogenik özelliklere yol açan yeni işlevler kazanırlar. Pk'nde rol oynadığı tespit edilen onkogenler arasında; B-Cell CLL/Lymphoma 2 (Bcl-2), Prostate stem cell antigen (PSCA), V-Ets Avian Erythroblastosis Virus E26 Oncogene Homolog (ERG) ve Ets Variant 1 (ETV1), Hepsin (HPN), Pim-1 proto-oncogene serine/threonine kinase (PIM1), A-Methyl Coenzyme A racemase (AMACR), Androgen receptor (AR), Vitamin-D receptor (VDR), büyüme faktörleri ve c-Kit/tyrosine kinase receptor yer almaktadır (82).

3.1.1.3.6. Metastazı

Metastatik ilerleyiş, Pk ile ilişkili morbidite ve mortalitenin büyük bir kısmına katkıda bulunur. Pk olan erkeklerin sadece % 4'ünde metastaz görülse de metastazların varlığı % 30 oranındaki beş yıllık sağ kalım ile birlikte zayıf bir prognoza işaret eder (86). Hastalığın ilerlemesi durumunda, kanser hücreleri ilk olarak bölgesel lenf bezlerine ve sonrasında öncelikle kemiğe yayılır. Kemiğe yayılan prostat kanseri hücreleri için gerçekleştirilen uzun gözlem eğilimi, klinik veriler ve otopsi çalışmaları ile desteklenmektedir. Örneğin, 1589 Pk hastasının yer aldığı yeni bir otopsi çalışmasında metastaz gösteren hastaların % 90'ında kemik tutulumu varken sadece % 10'unda karaciğer, akciğer, plevra ve adrenal

bez gibi kemikle ilgili olmayan kan yoluyla gerçekleşen metastazlar vardır (87). Ayrıca, omurga ve akciğer metastazları arasında ters bir ilişki belirlenmiştir. Bu durum bu iki metastaz modelinin bağımsız olabileceğini vurgulamaktadır (68).

Pk birçok moleküler mekanizmanın sonucu olarak oldukça yüksek bir metastaz yapma kapasitesine sahiptir. Tüm bu moleküler mekanizmalar kanserin lokal invazyonuna, migrasyonuna ve metastazların kemik, akciğer ya da karaciğer gibi belirli ikincil bölgelerde yerleşimine yol açar (87). Kanser ilerleyişinin erken safhaları hücre-hücre ve hücre-matriks bağlantılarının azalmasını kapsamaktadır. Bunun sonucunda malign hücreler hareketli hale gelir ve parçalayıcı enzimler aracılığıyla ekstraselüler matriksi yıkma yeteneği kazanırlar. Bu süreçte primer Pk'nde; hücre-hücre bağlantılarının kilit bir düzenleyicisi ve epitelden mezenkimale geçiş (EMT) için kritik öneme sahip bir transmembran glikoproteini olan epitelyal kaderin (E-kaderin)'in ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir. E-kaderinin azalması EMT'ye olanak sağlayarak hücre-hücre bağlantılarının kaybolmasına neden olur. Böylece Pk ilerler ve metastaz yapar. Ayrıca, genellikle kaderinler ile birlikte kompleks halde bulunan bir protein olan β -kateninin anormal sinyalizasyonunda, metastaz oluşumu için önemli bir basamak olan kaderin-katenin kompleksinin fonksiyon bozukluğu yüzünden Pk ilerleyişine katkıda bulunmaktadır. Sonrasında, hücre içi ikincil haberciler olan Ras ve diğer GTP-binding proteinleri aktive olarak malign hücre hareketini ve migrasyonunu teşvik eder. Solid bir tümör büyüdükçe, malign hücreler dolaşıma giriş yapar ve transendotelyal migrasyonu gerçekleştirecekleri ikincil bölgelerdeki endotelyal yüzeylere hızlı bir şekilde tutunurlar. Bu süreçte selektin, integrin, platelet-endotelyal hücre adezyon molekülü 1 (PECAM-1), vasküler hücre adezyon

molekölü 1 (VCAM-1) ve diğerk molekülleeri kapsayan çok sayıda bağılı etkileşim ortaya çıkar. İkincil bir bölgeye geçtikten sonra tümör hücreleri normal mikroçevreyi bozar ve metastazın yerleşmesini sağlar (88).

3.2. Hücre Ölüm Mekanizmaları

Düzenlenmiş hücre ölümü tüm hayvanlarda, embriyogenezden immüniteye kadar çok çeşitli biyolojik süreçlerde kilit roller oynamaktadır. Çok fazla ya da çok az hücre ölümü kanser, otoimmünite, nörodejenerasyon ve hasar oluşumunu içeren farklı patolojilerin temelini oluşturmaktadır (89). Hücre ölümünün farklı tipleri sıklıkla morfolojik kriterler ile tanımlanır ve apoptotik, nekrotik, otofajik ya da mitotik katastrof ile ilişkili olarak sınıflandırılır. Bunun yanı sıra hücre ölümü; proteazlar (kaspazlar, kalpainler, katepsinler ve transglutaminazlar) ve nükleazların farklı sınıflarını kapsayan enzimolojik kriterlere, işlevsel açılara (programlı ya da tesadüfen, fizyolojik ya da patolojik olarak) ya da immünolojik karakteristiklere (immünojenik ya da immünojenik olmayan) dayalı olarak belirlenir (90).

3.2.1. Apoptoz

İlk olarak Kerr ve arkadaşları tarafından tanımlanmış olan apoptoz ya da tip 1 programlı hücre ölümü (91), ölen hücrelerdeki; hücre büzüşmesi, nükleer yoğunlaşma ve parçalara ayrılma, hücre yüzeyinde çıkıntı oluşumu ve komşu hücrelere ya da ekstraselüler matrikse olan adezyonun kaybı gibi durumları içeren spesifik morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler ile karakterize edilir. Hücre ölümünün önemli bir tipi olan apoptoz, DNA hasarı tamir edilemez olduğu durumlarda ortaya çıkar. Apoptozun uyarılmasında ekstrinsik-ölüm reseptör yolağı ve intrinsik-mitokondriyal yolak olmak üzere iki ana yolak mevcuttur (92).

Ekstrinsik yolak, plazma membran ölüm reseptörü Fas (tümör nekroz reseptör 1 ve bunun akrabaları gibi benzer diğer reseptörler) ile kendisinin ekstraselüler ligandı olan Fas-L'nin bağlanması sonucunda tetiklenir. Ölüm uyarınları ortaya çıktığında Fas-L bir ölüm kompleksi oluşturmak için Fas ile birleşir. Fas/Fas L bileşimi, ölümü uyarı sinyali kompleksini (DISC) oluşturacak hale toplayarak ölüm alanı içeren protein (death domain-containing protein (FADD)) ve pro-kaspaz-8'e yardımcı olur. Sonuç olarak, protein kompleksi apoptotik sürecini yürütülmesinde sondan bir önceki enzim olan pro-kaspaz-3'ün tetiklenmesini başlatan kendi pro-kaspaz-8'ini aktive eder (91). İntrinsik yolak da apoptoza yol açar ancak mitokondriyal pro-enzimlerin kontrolü altında gerçekleşir. Hücrede hem bir ekstraselüler uyarı hem de intraselüler sinyaller ile apoptotik sürecin başlamış olması her iki durumda da dış mitokondriyal membrandan sitozole sitokrom c'nin salınmasına neden olur. Sitokrom c, kaspaz 9/3 sinyali kaskadını tetikleyen apoptozomu oluşturmak için Apoptotik Peptidaz Aktive Edici Faktör 1 (Apaf-1) ve pro-kaspaz 9 ile kompleks oluşturur (93).

3.2.2. Nekroz

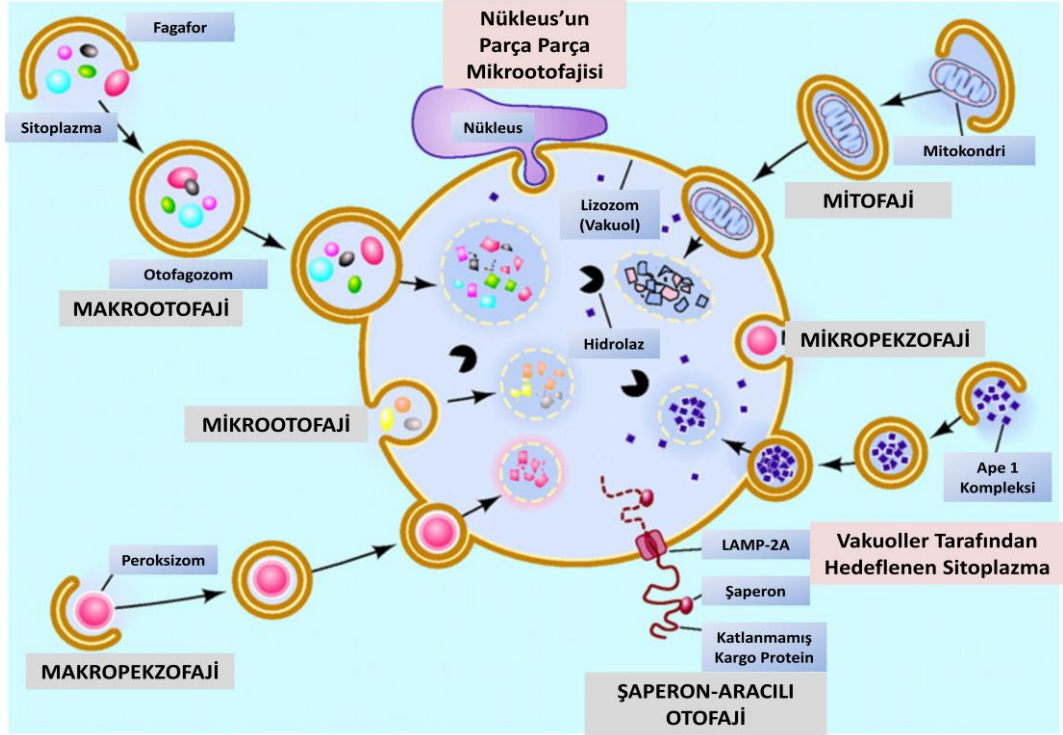
'Nekrotik hücre ölümü' ya da 'nekroz' morfolojik olarak hücre hacminde bir artış (onkoz), organellerin şişmesi, plazma membranında yırtılma ve ardından intraselüler içeriklerin kaybı ile karakterize edilir. Uzun bir zaman boyunca nekroz, hücre ölümünün sadece kontrolsüz, rastlantısal bir formu olarak kabul edilmiştir ancak nekrotik hücre ölümü yürütülmesinin bir dizi sinyal iletim yolu ve katabolik mekanizmalar aracılığıyla hassas bir şekilde düzenlenebileceğine dair veriler artmaktadır. Örneğin, ölüm alanı reseptörleri (TNFR1, Fas/CD95 ve TRAIL-R) ve Toll-like reseptörler (TLR3 ve TLR4)'in, özellikle de kaspaz

inhibitörlerinin varlığında, nekrozu ortaya çıkardığı gösterilmiştir. Çeşitli araçlar, organeller ve hücresel işlevler nekrotik hücre ölümü ile ilişkilendirilmiştir ancak bunların birbirleri ile aralarındaki ilişkinin nasıl olduğu hala belirsizliğini korumaktadır (16).

3.2.3. Otofaji

Otofaji, normal büyüme koşulları altında hücresel homeostazın sürdürülmesinde ve stres koşulları altında hücre canlılığının korunmasında kritik işlevlere sahip olan son derece korunmuş bir süreçtir. Hücresel kendi kendini yeme işlevi, sitoplazma ve organellerin otofagozomlar olarak adlandırılan çift kat membranlı veziküllerde tutulmasını, ardından lizozomlarda kargonun parçalanmasını içerir. Böylece yeni biyomoleküllerin sentezi için gerek duyulan enerjinin ve yapı taşlarının geri dönüşümü sağlanmış olur (94).

Otofajinin; makrotofaji, mikrotofaji ve şaperon aracılı otofaji olmak üzere tanımlanmış olan 3 farklı tipi vardır. Bunların tamamı sitozolik içeriklerin lizozomda proteolitik olarak parçalanmasını teşvik eder. Makrotofajide sitoplazmik kargo, otolizozomu oluşturmak için lizozom ile birleşen otofagozom olarak adlandırılan çift kat membran ile çevrili bir vezikül aracılığıyla lizozoma aktarılır. Bunun aksine mikrotofajide sitozolik içerikler lizozomal membranın invaginasyonu aracılığıyla doğrudan lizozomun kendisi tarafından alınır. Şaperon aracılı otofajide ise hedef proteinler, şaperon proteinleri (Hsc-70 gibi) ile kompleks bir şekilde lizozomal membrandan ayrılarak parçalanır. Hem makro hem de mikrotofajide büyük yapılar hem seçici hem de seçici olmayan mekanizmalar aracılığıyla kuşatılabilir (95).



Şekil 3: Otofajinin Çeşitleri (96).

Otofaji, yığın haldeki sitoplazmik materyallerin lizozomal olarak işlenmesine yol açacak şekilde seçici olmayan bir tarzda ya da mitokondri (mitofaji), ribozom (ribofaji) veya lipidler (lipofaji) gibi organeller ve/veya spesifik proteinlerin hedeflenerek parçalanmasını içerecek şekilde seçici tarzda olabilir. Son yıllarda seçici otofajiyi düzenleyen mekanizmalar yoğun araştırmaların odak noktası haline gelmiştir. Bazal otofajideki defektler protein agregatları ve hasarlı organellerin toksik birikimi ile sonuçlanırken stres aracılığıyla uyarılan otofajideki defektler esas olarak hücre canlılığını sınırlandırır. Her iki durumda da, olası genom bütünlük ve kararlılığındaki bozuklukların ardından kanser, yaşlanma, karaciğer bozuklukları ve nörodejenerasyon gibi etiyolojik olarak otofaji defektleri ile ilişkili problemlerin ortaya çıkmasıyla hücrel sıhhat tehlikeye atılır (94).

Genellikle stres koşullarına (besinsel, genotoksik, hipoksi vb.) yanıtta hücreler için bir sağ kalım mekanizması olarak görülen otofaji kontrolsüz olduğunda aşırı otofajinin tip 2 programlı hücre ölümüne sebep olduğu varsayılmaktadır (97). Artmış otofajik belirteçlere ve otofaji kökenli morfolojik özelliklere sahip pek çok ölen hücre örneği üzerinde yapılan incelemeler otofajik hücre ölüm önerisine yol açmıştır. Otofajinin besin yetersizliği ve artmış metabolik işlevlerin sebep olduğu hücresel stresin ardından aktive olan bir yolak olduğu düşünüldüğünde stresin ardından ölüme maruz kalan hücrelerin de otofaji özelliklerini göstermesi şaşırtıcı değildir. Shen ve Codongo (2012) hücre ölümünün otofaji tarafından gerçekleştiğinin belirlenebilmesi için şu üç kriterin yerine getirilmesinin gerektiğini öne sürmüşlerdir;

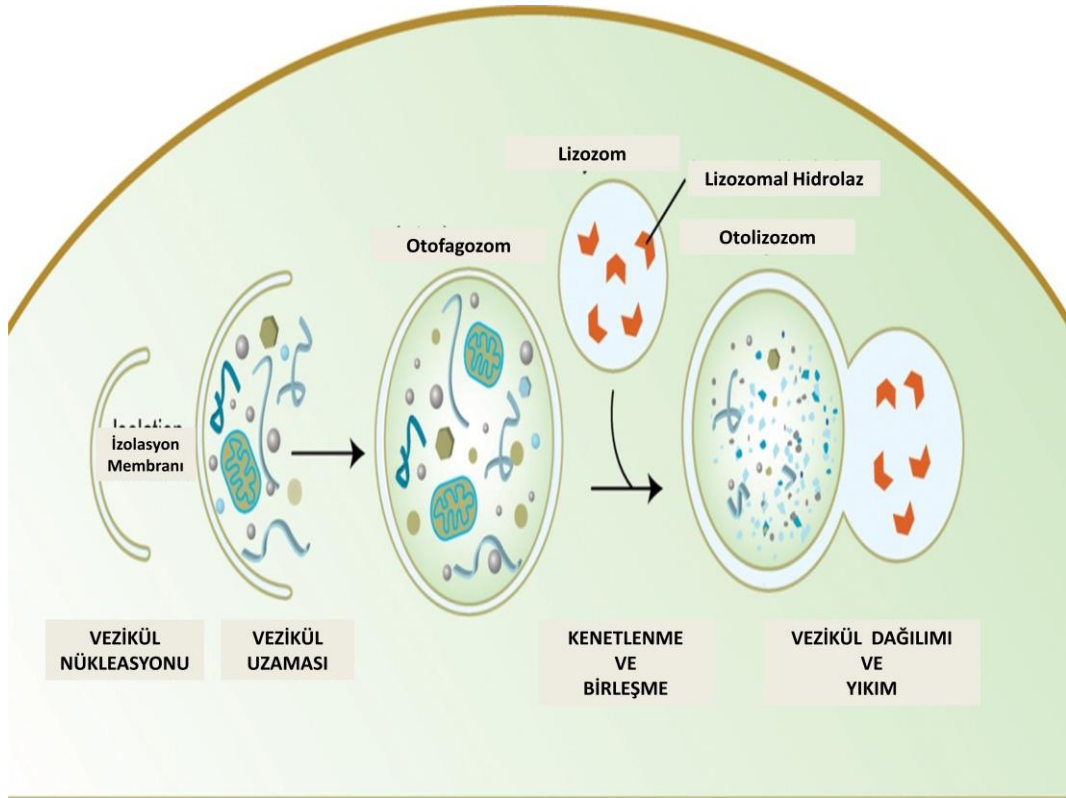
- 1) Hücre ölümü apoptozdan bağımsız olarak oluşmalıdır.
- 2) Sadece basit bir şekilde otofaji belirteçlerinde bir artış değil otofajik akışta da artış olmalıdır.
- 3) Genetik araçlar ya da kimyasal inhibitörler kullanılarak otofajinin baskılanması hücre ölümünü önlemelidir (98, 99).



Şekil 4: Hücrenin Sağ kalımı ve Ölümünde Otofaji (99)

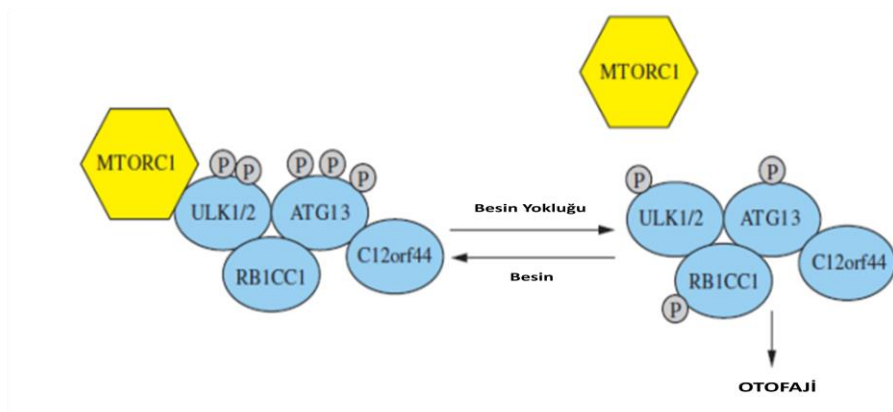
3.2.3.1. Moleküler Mekanizması

İlk çalışmalar, mayada otofajik kaskadın işlevsel yönetimi için zaruri olan birçok Atg'nin tanımlanmasını sağlamıştır. Çoğu maya Atg proteininin, memelilerde benzer şekildeki sıralı işlemlere katılan homologları vardır. Otofajinin başlangıcı fagoforlar olarak adlandırılan çift katlı membran yapılarının ortaya çıkması ile karakterize edilir. Bu fagoforlar uzar ve sitoplazmik materyali veziküller ya da otofagozomlar olarak çevreler. Ardından olgun otofagozomlar, otolizozomları oluşturmak için lizozomlar ile kaynaşır böylece kargonun parçalanmasına ve sitoplazmaya aminoasitler ve ATP'nin salınmasına yol açar (100).



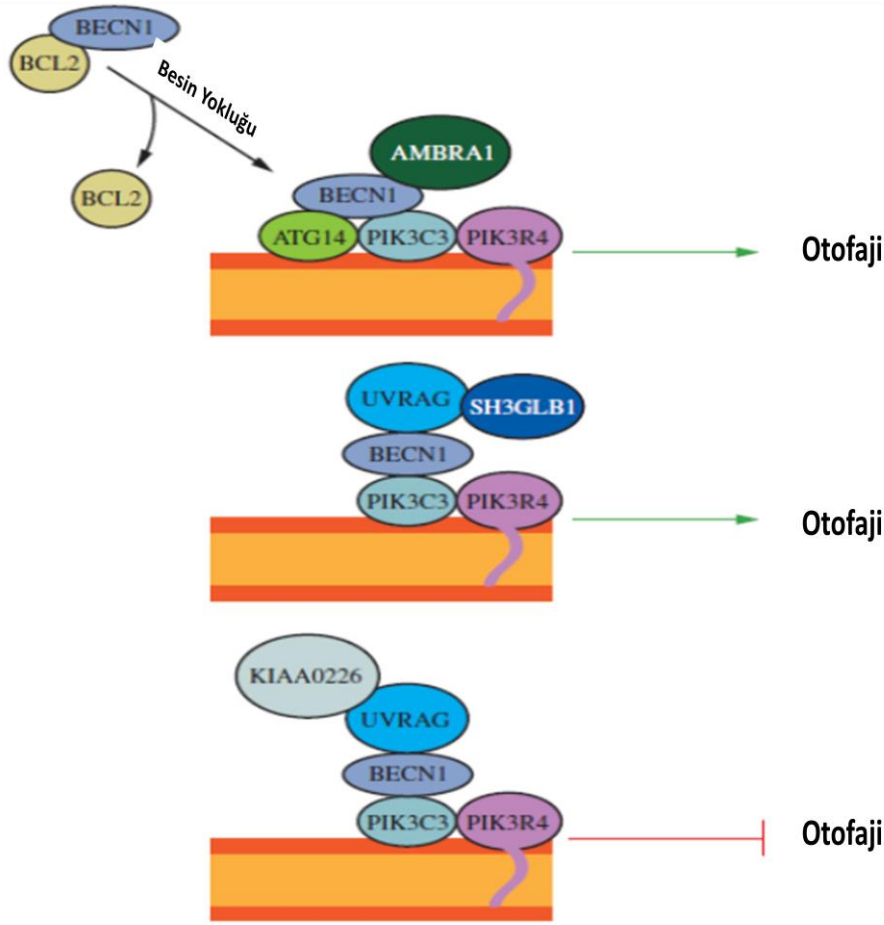
Şekil 5: Otofaji Basamaklarının Şematik Gösterimi (101)

İndüklenme: Mayalarda otofagozom oluşumunun indüklenmesi Atg1-Atg13-Atg17-Atg31-Atg29 kinaz kompleksi tarafından düzenlenmektedir (100). Memeli hücrelerinde bu kompleks; Atg1'in memelilerdeki homoloğu ULK1 ya da ULK2, Atg13'ün memelilerdeki homoloğu ATG13 ve otofajinin indüklenmesi için gerekli olan RB1-inducible coiled-coil 1(RB1CC1/FIP200)'den oluşmaktadır (102). Ayrıca bu kompleks içinde mayalardaki homoloğu bilinmeyen, otofaji için esansiyel olan, ATG13'e doğrudan bağlanan C12orf44/ATG101 yer almaktadır (103). Memeli ULK1/2-ATG13-RB1CC1 kompleksi sabittir ve besin durumuna bakılmaksızın oluşmaktadır (104). Ancak indükleme kompleksi ile mechanistic target of rapamycin complex 1 (MTORC1) arasındaki etkileşim besin durumuna göre etkilenmektedir (102). Besince zengin koşullar altında memeli hücrelerinde mTORC1, indükleme kompleksi ile birleşip ULK1/2 ve ATG13'ü fosforile ederek bunları inaktive eder (105). Ancak hücreler rapamisin ile muamele edildiğinde ya da besin yetersizliği olan koşullara maruz bırakıldığında MTORC1 ile indükleme kompleksi arasındaki etkileşim kaybolarak bu bölgelerdeki defosforilasyon ve otofajinin indüklenmesi ile sonuçlanır (104).



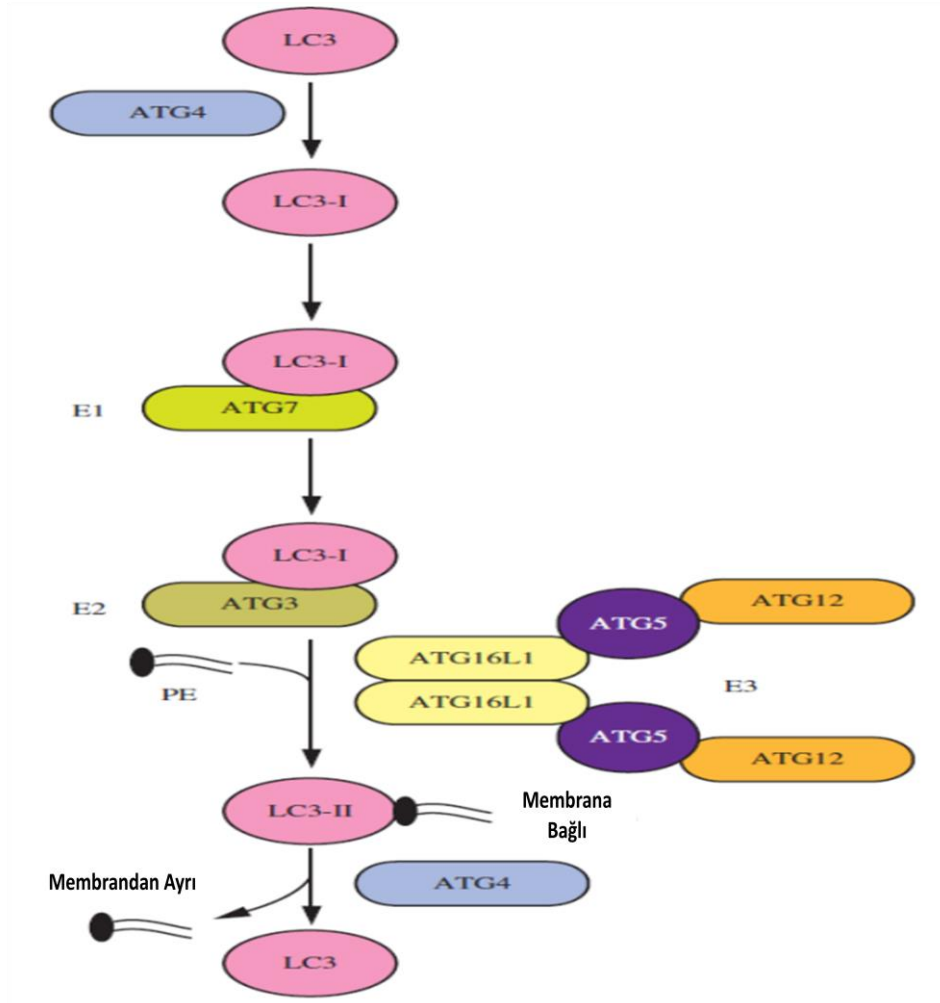
Şekil 6: ULK1/2, ATG13, RB1CC1 ve C12orf44'ten oluşan İndükleme Kompleksi (106)

Nükleasyon: Otofagozom oluşumu varsayılan bölgeye dahil olan bir sonraki kompleks ATG14-containing class III phosphatidylinositol 3-kinase (PtdIns3K) kompleksidir (107). PtdIns3K kompleksi hem mayalarda hem de memlilerde otofaji için gerekli olan PtdIns3P'yi oluşturur (108). Bu kompleks fagofor nükleasyonunda yer alır ve PIK3C3/VPS34, PIK3R4/p150 (Vps15 mayalarda) ve BECN1 (Vps30/Atg6 mayalarda)'den oluşur (109). PtdIns3K kompleksinin düzenlenmesi büyük çoğunlukla, otofaji için esansiyel olan BECN1 ile etkileşime giren proteinler aracılığıyla gerçekleşir (110). Antiapoptotik protein olan BCL2, BECN1'e bağlanarak BECN1'in PIK3C3 ile etkileşim kurmasını engeller ve böylece otofaji inhibe edilir (111). BECN1'e bağlanan bir diğer protein olan KIAA0226/Rubicon, UVRAG-aracılı PtdIns3K komplekslerinde PIK3C3 aktivitesini inhibe eder (112). PtdIns3K kompleksinin iki pozitif düzenleyicisi vardır. Bunlardan biri, doğrudan BECN1'e bağlanan AMBRA1 diğeri ise UVRAG aracılığıyla BECN1 ile etkileşim kuran ve membran kavisliğinin oluşumunda yer alabileceği düşünülen SH3GLB1/Bif-1'dir (113).



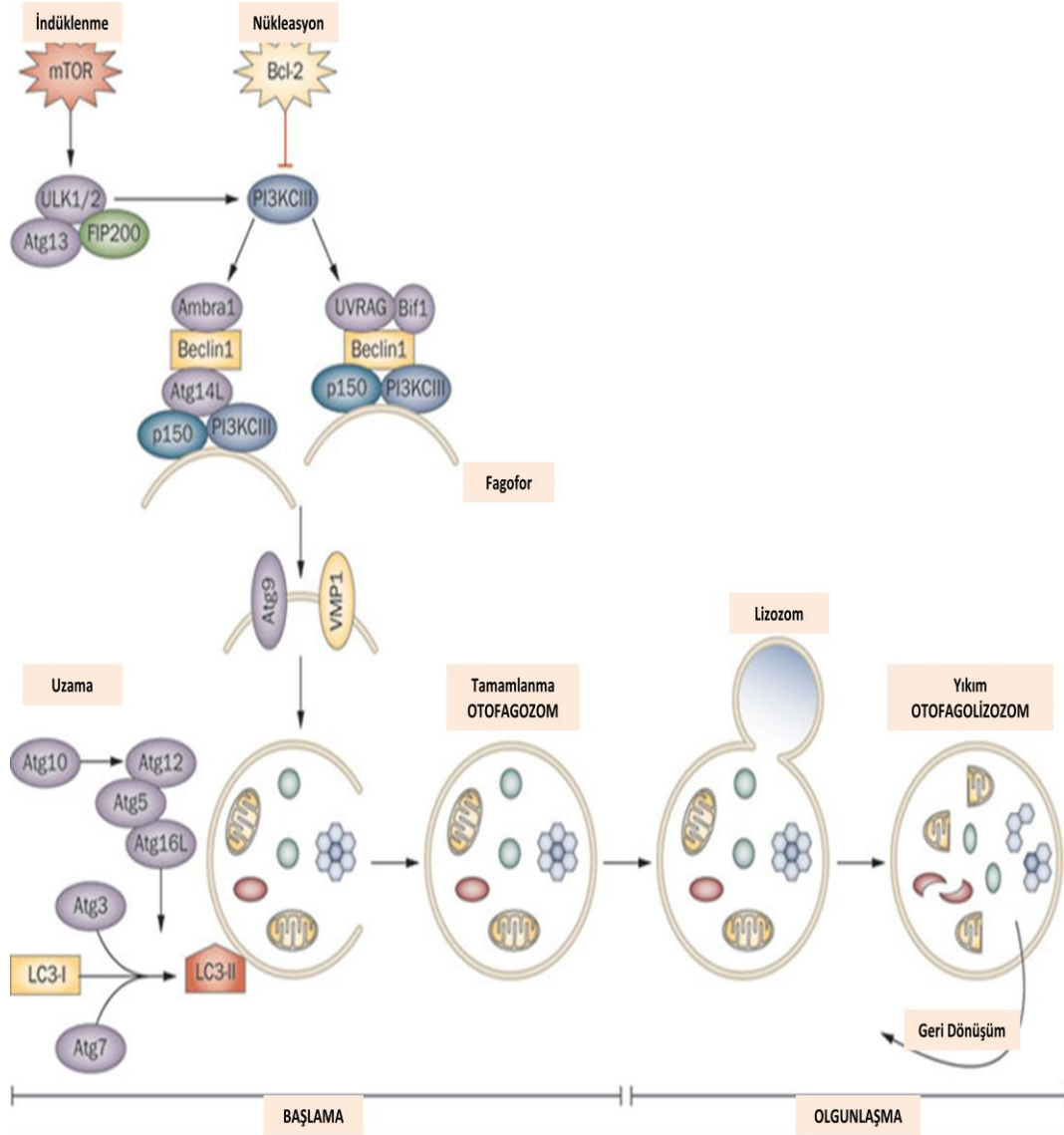
Şekil 7: Class III PtdIns3K Kompleksi Aktivitesinin Düzenlenmesi (106)

Uzama: Hem mayalarda hem de memelilerde, fagoforun genişlemesine katkıda bulunan ubiquitin-like (UBL) proteienleri içeren iki konjugasyon sistemi vardır (114). İlk sistem, Atg12-Atg5-Atg16L1 (Mayalarda Atg16) kompleksinin oluşumunu kapsamaktadır (115). Memelilerdeki Atg12-Atg5-Atg16L1 kompleksi fagofor membranı ile etkileşim halindedir ancak otofagozomun tamamlanmasının ardından ayrılmaktadır (116).



Şekil 9: LC3 Konjugasyon Sistemi (106)

Otofagozomun Tamamlanması ve Birleşme: Otofajinin en az anlaşılan basamağı belki de, genişleyen fagoforun sonuçta olgunlaşmak zorunda olması ve tam bir otofagozomu meydana getirmek için kapanması sırasında ve bir otolizozom oluşumunda otofagozomun hangi mekanizmalar aracılığıyla endozomlar ya da lizozomlar ile birleştiği konusudur. Otofagozomların lizozomlara doğru olan hareketi mikrotübüllere bağlıdır (117). Otofagozomların endozomlar ile bileşmesinde VTI1B yer alır (118). PtdIns3K kompleksi ile ilişkili olan UVRAG, lizozomlar ile birleşmeyi tetikleyen GTPase RAB7'yi aktive eder (119).

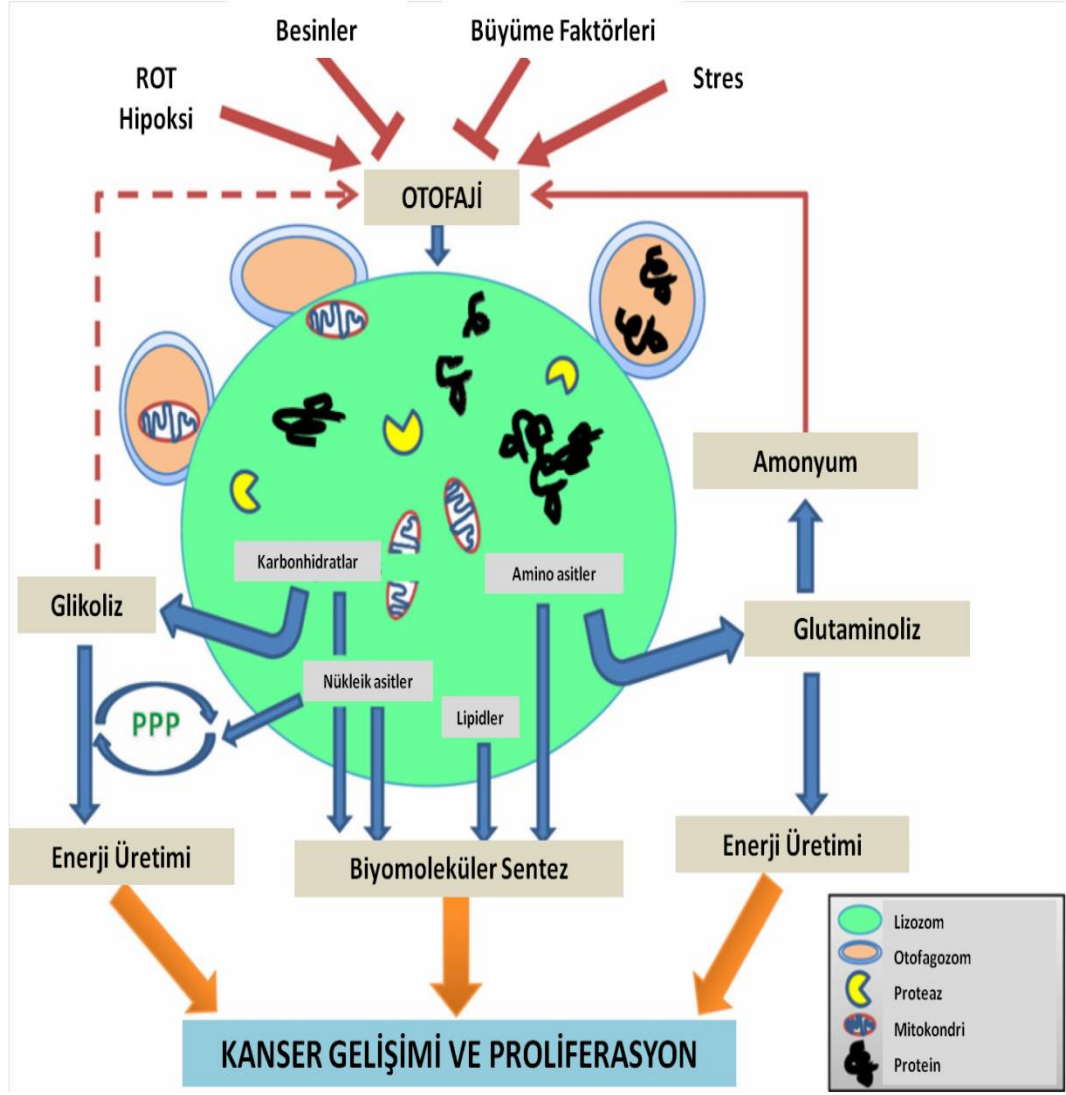


Şekil 10: Otofajinin Moleküler Mekanizması (120)

3.2.3.2. Otofaji ve Kanser

Genellikle bir hücrenin hayatta kalma mekanizması olarak kabul edilen otofaji bazal koşullar altında, hasar görmüş organelleri ve protein kümelerini elemine ederek hücrel homeostazın korunmasına yardımcı olur. Buna karşın stres koşulları altında otofaji, makromoleküllerden besin sağlayarak, enerji üreterek, tehlike potansiyeline sahip elementleri ortadan kaldırarak hücrenin hayatta kalmasını destekleyici sitoprotektif bir yanıt sağlar (13). Otofajinin

işleyişindeki bozukluklar birçok fizyolojik işlevi etkilemekte ve bu durum nörodejeneratif bozukluklar, kanser gibi çok sayıda hastalıkta vurgulanmaktadır (121). Kanser çalışmalarında elde edilen son bulgu özellikle tümör başlangıcının erken safhalarında otofajinin bir tümör baskılayıcı olarak işlev görebileceğini ortaya koymaktadır (122). Aslında birçok otofaji ilişkili protein (Beclin1, ATG5, ATG4c, ATG7) tümör baskılayıcı olarak gösterilmiştir. Bunların yanı sıra bazı yardımcı proteinlerin de (Bif1, UVRAG) bu özellikte olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, birkaç onkosupresor proteinin (DAPK, PTEN, TSC1/2, p53, LKB1) otofajiyi tetiklediği belirtilmiştir. Bunun yanında pek çok onkoproteinin ise (Bcl-2, AKT, class 1 PI3K) otofajiyi negatif olarak düzenlediği gösterilmiştir (123). Bunun aksine yerleşik tümörlerde, temel olarak hayatta kalma mekanizması olan otofaji; hipoksi ve besin yetersizliği ile karakterize edilen sert koşullar altında kanser hücrelerinin hayatta kalmasını destekleyici işlev görür (124). Aslında artan veriler, otofajinin genetik ya da kimyasal bir araçla inhibe edilmesinin, apoptotik hücre ölümünü hızlandırdığı ve birçok kanserde tümör hücrelerinin büyümesini inhibe ettiğini göstermektedir (125). Ayrıca artmış otofaji, kanser hücrelerinde radyasyon ve kemoterapiye yanıtta sıklıkla tespit edilmektedir (126). Dahası, otofaji, bazı kanserlerin tedaviye olan direncine katkıda bulunuyormuş gibi görünmektedir çünkü otofajinin inhibisyonu ile kemoterapi tedavilerine karşı tümör hücrelerinin hassaslaştığı gösterilmiştir (127). Bu yüzden, kemoterapiye ek olarak otofajinin inhibe edilmesi bazı kanserlerin tedavisinde umut vaat eden bir stratejidir (128).



Şekil 11: Otofaji ve Kanser Hücresi Metabolizması (94)

3.2.3.3. Otofaji ve Prostat Kanseri

Çoğu Pk'nde Beclin1 geninin allelik olarak delesyona uğramış olduğunun gözlenmesi, otofajinin prostatta bir tümör baskılayıcı mekanizma olarak işlev görebileceğini düşündürmüştür (12). Ayrıca epitelyal Pk hücrelerinde uygulanan ileri çalışmalar otofajinin stresler ile karşılaşan hücrelere sağ kalma mekanizması sağlayabileceği ve bu nedenle Pk'nde bir tümör teşvik edici mekanizmayı temsil edebileceği gösterilmiştir (129). Böylece otofaji inhibisyonu Pk hücrelerinin pro-apoptotik uyarılara karşı daha hassas hale gelmesinde faydalı olabilir. Otofaji

blokaının bu hücreleri Src tirozin kinaz inhibitörüne karşı daha hassas hale getirdiğı gösterilmiştir (97). Src kinaz kompleksi, AR'ü fosforile ederek nükleer translokasyonunu ve aktivasyonunu sağlar. Bu kinaz, kastrasyona dirençli hastalık durumunun gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır (130). Aslında Src'yi hedefleyen tirozin kinaz inhibitörleri, Pk hücrelerinin androjenden bağımsız olarak gelişimini inhibe edebilir ancak apoptozu önemli derecede teşvik etmez. Bu bağlamda otofaji blokajı tirozin kinaz inhibitörlerinin pro-apoptotik etkisini önemli derecede güçlendirmektedir (131). Kemoterapi ya da radyasyona maruz kalan kanser hücrelerinde otofajinin koruyucu etkisi genellikle Pk'nde terapötik direnci etkisizleştirmek için muhtemel bir klinik strateji olarak otofaji inhibisyonunun değerlendirilmesine yoğun ilgi oluşumuna yol açmıştır (132). Öte yandan androjen bağımsız Pk hücrelerinde otofaji indüklenmesinin hücreleri apoptotik uyarı ve radyasyona daha hassas hale getirebileceğı gösterilmiştir. Bu veriler, hücresel özelliklere bağılı olarak otofajinin indüklenmesi ya da inhibe edilmesinin Pk hastalarına terapötik faydalar sağlayabileceğini göstermektedir (6).

3.2.3.4. Otofaji, Ca^{+2} ve Ca^{+2} Geçirgen İyon Kanalları

Ca^{+2} hücre sağkalımı/ölümü süreçlerinin en önemli düzenleyicilerinden biridir. İkinci haberci olarak Ca^{+2} , enzimler, transkripsiyon faktörleri ya da moleküler şaperonlar gibi çeşitli düzenleyici proteinleri aktive ya da inaktive edebilir. Birçok araştırmacı tarafından kalsiyum homeostazındaki bozuklukların kanser hücrelerinde farklı tiplerdeki hücre ölümüne yol açtığı gösterilmiştir (133).

Hem bazal hem de indüklenmiş otofajinin kilit bir düzenleyicisi olarak belirlenen intraselüler kalsiyumun hangi mekanizmalar aracılığıyla otofajiyi kontrol ettiğine dair bugüne kadar elde edilen veriler oldukça çelişkilidir (122). Birçok çalışma grubu tarafından kalsiyumun otofaji üzerine inhibe edici etkileri olduğu bildirilmiş olmasına karşın bazıları tarafından kalsiyum için otofajiyi aktive edici mekanizmalar ileri sürülmüştür (134). Örneğin; D3 vitamini, Thapsigargin, ATP ve ionomycin gibi kalsiyum harekete geçirici ajanların, mTOR'u inhibe etmek için AMPK'yı doğrudan aktive eden, Ca^{+2} -activated kinaz CAMKK-beta'yı da içeren bir sinyal yolağı aracılığıyla otofajiyi uyardığı gösterilmiştir (24). Yine, LRRK2'nin NAADP reseptörlerini, özellikle de TPC2'yi, aktive etmesiyle asidik depolardan Ca^{+2} hareketine yol açan bunun sonucunda da ER'dan Ca^{+2} indüklü Ca^{+2} salınımını ve ardından CAMKK-beta/AMPK yolağı aktivasyonunu uyaran bir mekanizma ileri sürülmüştür (135). Otofaji üzerine Ca^{+2} 'nin uyarıcı etkisini destekleyen bir diğer bulgu kalsiyum fosfat çökeltisi halinde eksojen olarak sunulan kalsiyumun Beclin1, Atg5 ve PI3K sınıf III bağımlı olan otofajiyi indüklemesidir (136). Kalsiyumun otofajideki aktive edici rolü ile aynı doğrultuda Sakaki ve ark. protein kinaz C theta'nın Ca^{+2} bağımlı aktivasyonunun ER indüklü otofaji için gerekli olduğunu ancak açlık indüklü otofaji için gerekli olmadığını göstermişlerdir (137). Tam aksi şekilde, Khan ve ark. bazal otofajik akışın ER'dan salınan IP3R bağımlı Ca^{+2} tarafından negatif bir şekilde düzenleniyor olabileceğini öne sürmüşlerdir. Araştırmacılar, sitosolik Ca^{+2} artışının AMPK bağımsız yolak aracılığıyla artmış mTORC1 aktivitesini sağlamak için işlev gördüğünü düşündükleri bir mekanizma ileri sürmüşlerdir (138). Bu nedenle, patolojinin (kanser, nörodejeneratif bozukluklar,

inflamasyon vb.) yanı sıra Ca^{+2} sinyalinin konumsal ve zamansal parametrelerine, besin ve büyüme faktörü yeterliliğine bağlı olarak, kalsiyumun otofaji üzerine farklı düzenleyici etkilere sahip olması muhtemeldir (139).

Kalsiyum homeostazı birçok kalsiyum kanalı tarafından düzenlenmektedir. Plasma membrane calcium ATPases (PMCA)'lar plazma membranına yerleşiktir ve hücrenin dışına aktif bir şekilde Ca^{+2} pompalamaktadır. Ca^{+2} release-activated Ca^{+2} channels (CRACs)'da plazma membranına yerleşiktir ve store-operated calcium channel entry (SOCE)'e aracılık eder (140). CRAC'ler, IP3-R and RyR reseptörleri aracılığıyla oluşturulan kanallar ile ER'dan salınan Ca^{+2} tarafından aktive edilir. Sitoplazmadaki Ca^{+2} fazlası, ER'da yer alan bir membran pompası olan sarco-/endoplasmic reticular calcium ATPase (SERCA) aracılığıyla aktif bir şekilde ER'a geri taşınır. Ayrıca birçok voltaj-bağımlı kalsiyum kanalının da kalsiyum homeostazının düzenlenmesine katıldığı bildirilmiştir (133).

3.3. TRP İyon Kanalları

Çoğalmada artış, anormal farklılaşma ve ölüm olanağındaki bozulmadan kaynaklanan hücrelerin malign transformasyonu, kanser karakteristiği olan kontrolsüz genişleme ve invazyona dönüşebilen anormal doku gelişiminin ana sebebidir (141). Bu gibi bir transformasyon sıklıkla iyon kanal ekspresyonlarındaki değişiklikler ile birlikte seyreder ve sonuçta da bu kanalların yer aldığı hücresel yanıtların anormal ilerlemesi gerçekleşir. 60 yılı aşkın bir süre önce plazma membranı iyon kanallarına atfedilen ilk önemli rol, bunların hücresel elektrogenez ve elektriksel uyarılabilirliğe katılımıdır. Ancak sonraki bir çok çalışma, çoğalma, farklılaşma ve apoptoz gibi doku homeostazının sürdürülmesinde yer alan hayati öneme sahip neredeyse tüm temel hücresel davranışlarda iyon kanallarının katkısı kesin bir şekilde ortaya konmuştur (142). Bu hayati süreçlere iyon kanallarının katkıda bulunarak aracılık ettikleri ana mekanizmalar; esansiyel sinyalizasyon iyonlarının akışının sağlanması, hücre hacminin düzenlenmesi ve membran potansiyelinin sürdürülmesidir (143).

Kanser ilişkili hücre sinyal yollarının tamamında Ca^{+2} 'un rolü tartışmasızdır. Ca^{+2} homeostazındaki değişimler çoğalma artışını, farklılaşmanın uyarılmasını ya da apoptozu etkilemektedir. Birçok çalışmaya göre, TRP ailesindeki katyonik kanalları kalsiyum homeostazı ve hücre fizyopatolojisinin kilit oyuncular olabilir (11).

TRP iyon kanalları, yakın bir zamanda keşfedilen, ilkin mekanoreseptörler olarak tanımlanan seçici olmayan bir katyonik kanal süper ailesidir. Ağırlıklı olarak epitelial dokularda eksprese olan TRP kanalları kimyasal, mekaniksel ve termal uyarıları içeren pek çok fonksiyonu gerçekleştirmektedir ancak görevleri

sadece bunlarla da sınırlı değildir (144). Artan bildirilere göre, voltaj bağımlı olmayan katyonik kanalların TRP kanal ailesi, iyon homeostazında kilit oyuncularındır. Bütün TRP'ler, katyon seçici kanalları oluşturmak için homo ya da hetero-tetramerler olarak bir araya geldiği düşünülen altı adet transmembran alan içermektedir. İzofomları arasında farklı mono ve divalent katyonlar için geçirgenlik bakımından büyük oranda farklılıklar göstermelerine rağmen tüm TRP'ler katyon kanallarıdır. TRP kanallarının karakteristik özelliği çok çeşitli kimyasal ve mekaniksel uyaranlar tarafından aktive edilebilme yeteneğidir. TRP kanalları intra- ve ekstraselüler haberciler, kimyasal, mekanik ve ozmotik stres ve bazı muhtemel intraselüler Ca^{+2} depolarının doldurulması durumunu içeren geniş çaptaki uyaranlar tarafından aktive edilir. Böyle olunca da TRP'ler hücrenin polimodal moleküler sensörleri olarak öngörülebilir (145).

20 yıl önce ilk TRP kanalının klonlanmasından bu yana yaklaşık 30 TRP kanalı tanımlanmış olup bu kanallar canonical (TRPC), vanilloid (TRPV), melastatin (TRPM), mucolipin (TRPML), polycystin (TRPP) ve ankyrin (TRPA) transmembran proteinler olmak üzere altı farklı aile şeklinde sınıflandırılmıştır (146).

3.3.1. TRPM İyon Kanalları

Memeli TRPM ailesi sekiz üye içermektedir. TRPC'lere benzer şekilde TRPM proteinleri transmembran segmentler için bir TRP alanı C-terminaline sahiptir. Bu proteinlerin C terminali bölgelerinin total aminoasit uzunlukları (~1000-2000) ve dizileri oldukça fazla değişkenlik göstermektedir. Aminoasit dizilerindeki benzerliğe dayalı olarak bu proteinler TRPM1/3, TRPM4/5 ve TRPM6/7'den oluşan alt gruplara ayrılmaktadır. Birbirleri ile en yakın ilişkili

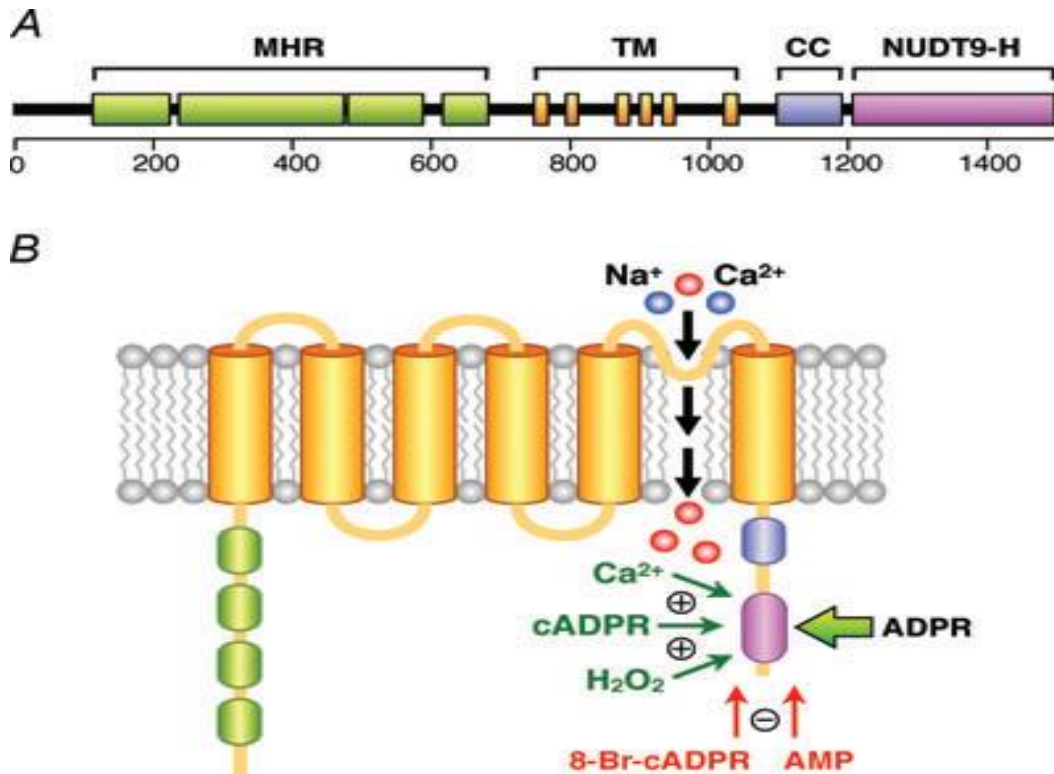
olmalarına rağmen TRPM2 ve TRPM8 herhangi bir alt gruba yerleştirilmemektedir. İlk tanımlanan memeli TRPM'si TRPM1'dir ve başlangıçta melastanın olarak isimlendirilmiştir. Bu kanalın ekspresyon düzeyleri bazı melanomik hücre hatlarında metastatik potansiyel ile ters orantılıdır. TRPM3, kültür hücrelerinde eksojen olarak eksprese edildiğinde yapısal olarak aktif bir Ca^{+2} ve Mn^{+2} geçirgen kanal oluşturmaktadır. TRPM4 ve TRPM5 voltaj modülasyonlu, Ca^{+2} ile aktive olan, monovalent katyon seçici kanallar olmalarından dolayı TRP süper ailesi arasında sıra dışı kanallardır. TRPM6 ve TRPM7 kanalları alışılmadık mimariye sahiptirler çünkü C terminallerindeki atipik protein kinaz alanları ile chanzyme'lerdir. TRPM8, ılık sıcaklıklar (<23–28°C), mentol, ökapitol ve isilin gibi serinlik hissini uyandıran bileşikler tarafından aktive olan, termal olarak düzenlenen bir kanaldır. TRPM2, intraselüler ADP-riboz, pirimidin nükleotidleri ve NAD tarafından aktive edilen, Ca^{+2} geçirgen, spesifik olmayan bir katyon kanalını oluşturmaktadır (147).

3.3.1.1. TRPM2 İyon Kanalı

3.3.1.1.1. Yapısı

TRPM2 (önceden LTRPC2 ya da TRPC7 olarak bilinen), tek bir C-terminal ADPR pirofosfataz alanına (Nudix-like domain ya da NUDT9 homology domain) sahip, seçici olmayan, Ca^{+2} 'una geçirgen, çok fonksiyonlu bir katyon kanalıdır (148). TRPM6/7 gibi, TRPM2; iyon kanalı ve C-terminal enzim alanı ikili fonksiyonundan dolayı “chanzyme” olarak bilinmektedir. İnsan TRPM2 geni, kromozom 21q22.3'te yer almakta olup, 32 ekzon içermekte ve yaklaşık 90 kb'lık bir alan kaplamaktadır (149). Öte yandan, fare TRPM2 geni; 34 ekzon içermekte ve yaklaşık 61 kb'lık bir alan kaplamaktadır (150). İnsan TRPM2 transkripti,

ortalama 6,5 kb olup tahmini moleküler kütlesi yaklaşık 170 kDa olan 1503 aminoasitlik (fare ve ratlarda 1507 aminoasitlik) bir protein kodlamaktadır (31). TRPM2 proteininin yapısı; intraselüler N ve C terminalleri tarafından sarılı 6 transmembran segment (S1-S6) ve S5 ile S6 arasında yer alan por oluşturan lob alanından oluşmaktadır (149). Ek olarak, TRPM2'nin N terminali 4 homolog alana ve kanal aktivasyonunun düzenlenmesinde rol oynayan bir kalmodulin (CaM) bağlayan IQ benzeri motife sahiptir (152). TRPM2'nin işlevi ya da ekspresyonunda TRPM Homoloji alanları (MHD)'nın önemi hala araştırma konusudur. Diğer yandan C terminali, bir TRP kutusu ve TRPM2'nin homo tetramerik düzeneği için kritik öneme sahip olabileceği düşünülen bir bobin-bobin alanı ihtiva etmektedir (28).



Şekil 13: TRPM2'nin Protein Yapısı ve Transmembran Topolojisi (28).

3.3.1.1.2. Aktivasyonu ve Düzenlenmesi

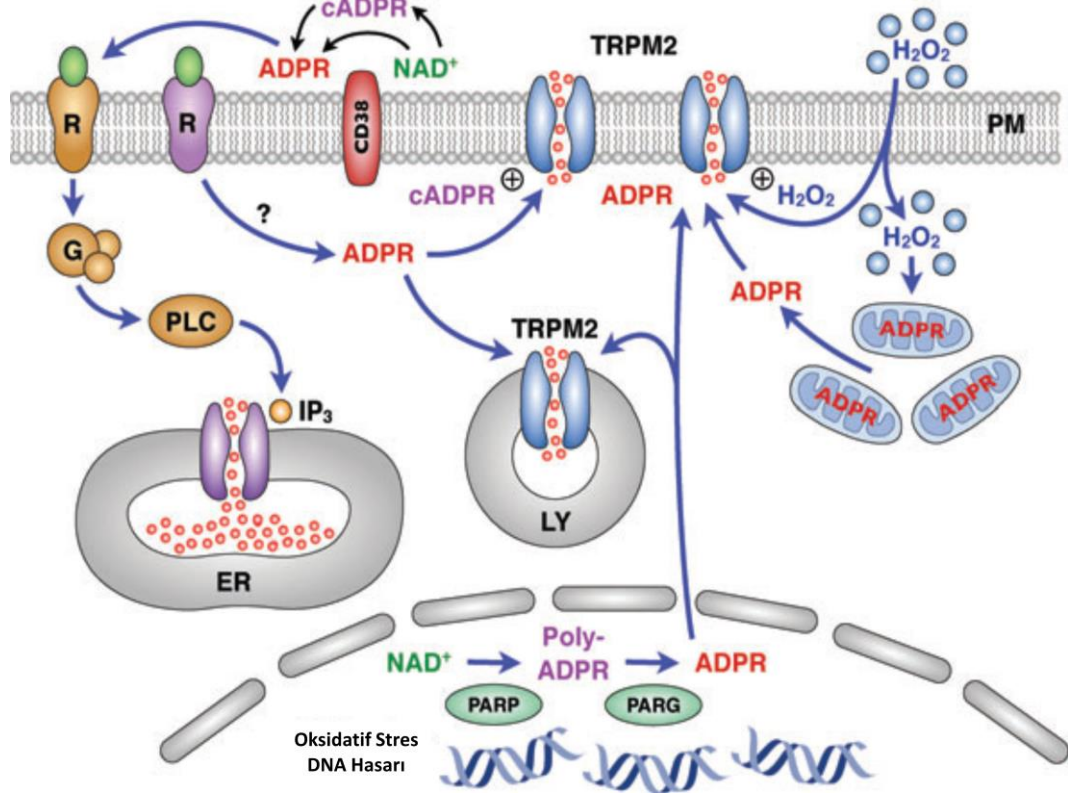
ADPR, TRPM2'nin birincil geçiş molekülü olarak kabul edilmektedir (153, 154). ADPR, TRPM2'nin C ucundaki Nudix-like alanına yüksek duyarlılıkla bağlanır ve bunu takiben riboz 5-fosfat ve AMP'ye hidrolize olur (155). TRPM2 enzimatik aktivitesinin fizyolojik rolü detaylı bir şekilde ortaya konulmamış olmasına rağmen, TRPM2'nin ADPR aracılı geçişini AMP'nin antagonize etmesinden dolayı, TRPM2 aktivitesi için enzimatik aktivitenin genellikle negatif feedback inhibisyonu sağlamak için işlev görebileceği varsayılmaktadır (156). ADPR'nin bağlanmasının ardından, TRPM2 kanalları açılacaktır ve sodyum (Na^+), potasyum (K^+) ve kalsiyum (Ca^{+2}) iyonlarının P_{Ca} : P_{Na} yaklaşık 0,3-0,9 olacak şekilde bir orandaki geçirgenlik ile hücre içine geçişine imkan sağlayacaktır (147). TRPM2 akımları, bir lineer akım voltajının (I-V) yaklaşık 0 mV ters bir potansiyel ile ilişkisiyle karakterize edilmektedir. Tek bir kanalın iletkenliği olağandışı uzun süreli açık olma ile birkaç saniye aralığında yaklaşık 60 pS'dir (151).

ADPR aracılığıyla TRPM2'den geçiş hem inhibe edici hem de kolaylaştırıcı olağanüstü bir şekilde düzenleyici mekanizmalara tabidir. Negatif düzenleyiciler içerisinde AMP ve protonlar yer almaktadır buna karşın kolaylaştırma ise Ca^{+2} , hidrojen peroksit (H_2O_2), siklik ADPR (cADPR) ve nikotinik asit adenin dinükleotid fosfat (NAADP) aracılığıyla gözlenmektedir. Bu düzenleyicilerin bazılarının etkilerinin doğrudan kanal proteinine olduğu buna karşın diğerlerinin ise dolaylı gerçekleştiği düşünülmektedir (28).

Ekstraselüler Ca^{+2} ve intraselüler Ca^{+2} TRPM2 kanallarının tam aktivasyonunda da kritik bir role sahiptir. İntraselüler Ca^{+2} , kanalın ADPR'ye olan hassasiyetini arttırarak TRPM2 aktivasyonunu kolaylaştırmaktadır. Ca^{+2} 'den tamamen yoksun durumda ADPR tek başına katyon akımlarını indükleyemez ve Ca^{+2} akımlarına olanak sağlamak için en az 30 nM internal Ca^{+2} gerekmektedir. Ancak bu kolaylaştırma işlevi Mg^{+2} , Ba^{+2} ya da Zn^{+2} tarafından taklit edilememektedir. Öte yandan TRPM2 aktivasyonunda 200 μM 'lık eksternal Ca^{+2} , 1 mM'lık Ca^{+2} 'den çok daha etkilidir (157). 10 μM ADPR varlığında Ca^{+2} 'nin $\text{EC}_{50}=17 \mu\text{M}$ ya da $\text{EC}_{50}=0,5 \mu\text{M}$ olacak şekilde doza bağımlı olarak kanalı doğrudan yönlendirdiği ileri sürülmektedir. Mekanizma hala tam olarak bilinmiyor olmasına rağmen, CaM ile TRPM2'in IQ-like motifinin ya da diğer intraselüler bölgelerinin Ca^{+2} 'ye bağlı olarak birleşmesinden dolayı meydana gelen konformasyonel değişiklikten kaynaklandığı düşünülmektedir (158). Ancak diğer araştırmalarda Ca^{+2} indüklü aktivasyon gözlenmemiştir ve yüksek konsantrasyonlardaki Ca^{+2} , ADPR üretimine ya da mitokondriden ADPR salınımına yol açarak aktivasyona neden olduğu düşünülmektedir (28).

TRPM2 kanallarının aktivasyon mekanizmaları hala belirsiz olsa da, H_2O_2 ve oksijen-nitrojen türlerini üreten diğer ajanlar tarafından da aktive edilebilmektedir (159). Geçiş mekanizmasının esasen H_2O_2 'nin mitokondriden ADPR salınımı yapma yeteneğine dayandığını ortaya koymaktadır (160). Yine, H_2O_2 aracılı TRPM2 akımlarının mitokondri içindeki ADPR konsantrasyonunun azaltılmasıyla baskılanabildiği gösterilmiştir (161). Bu hipoteze karşıt olarak, Nudix alanından yoksun olan bir TRPM2 varyantı H_2O_2 'ye yine de yanıt vermektedir (32). Oksidatif stres altında bir diğer ADPR kaynağı nükleustur.

Nükleusta ADPR üretimi, DNA hasarı tarafından PARP-1/PARG yolağı aktivasyonunu içermektedir. PARP-1 hasarlı DNA'ya bağlanır ve NAD⁺'ın nicotinamid ve ADPR'ye ayrılmasını katalizler (162). Daha sonra ADPR, DNA tamir mekanizmalarını aktive eden çeşitli nükleer proteinlere polimerleşir. Serbest PARG tarafından ADPR polimerlerinin parçalanmasını takiben serbest ADPR oluşturulur. PARP inhibitörleri tarafından oksidatif stres TRPM2 aracılı Ca⁺² yanıtın baskılanması, H₂O₂ etkisinin serbest ADPR üretiminde yer aldığını akla getirmektedir (163). Ayrıca, PARP'tan yoksun olan TRPM2 eksprese eden DT40 hücreleri oksidatif strese bağlı Ca⁺² yanıtları göstermemektedir (164). İlginç olarak, TRPM2 sayesinde H₂O₂ aracılı Ca⁺² akışı deneyler oda sıcaklığında gerçekleştiğinde olumsuz bir şekilde etkilenmekte ve 37°C'de tekrar düzelmektedir (165). Dahası, rat insülinoma RIN-5F hücrelerinde 35°C'den yüksek olan sıcaklıkların TRPM2 kanallarını aktive ettiği ya da bunların ADPR ya da cADPR tarafından aktivasyonunu kolaylaştırdığı gösterilmiştir (166). Ancak TRPM2'nin sıcaklığa bağlı olarak düzenlenmesinde yer alan mekanizmalar daha detaylı bir şekilde çalışılmalıdır (28).



Şekil 14: TRPM2 Aktivasyonu için Sinyal Mekanizmaları (28).

TRPM2'nin en yüksek eksprese edildiği yer beyindir ancak kemik iliği, dalak, kalp, karaciğer ve akciğer gibi diğer dokularda ve pankreatik β hücreleri, endotelial hücreler, mikroglialar, nöronlar, kardiyomiyositler, immün hücreler vb. gibi farklı hücre tiplerinde de tespit edilmiştir (28).

Aslen bir plazma membran kanalı olarak tanımlanmış olmasına rağmen şimdilerde TRPM2'nin pankreatik β hücrelerinde bir lizozomal Ca^{+2} salınımı yapan kanal olarak işlev de gördüğü keşfedilmiştir (29). Lizozomlarda olmasa da TRPV1, TRPC5, TRPC3, TRPM8, TRPML1-3 ve TRPM7 gibi diğer TRP kanalları için de intraselüler lokalizasyonlar bildirilmiştir. TRPM2 ve çeşitli diğer TRP kanallarının hücresel lokalizasyonunu belirleyen faktörler ve bu hücresel lokalizasyonların özel bir hücresel işlev sağlayıp sağlamadığı araştırılmaktadır (28).

3.3.1.1.3. Alternatif Splicing İzoformları

TRPM2'nin tam uzunluktaki izoformunun yanı sıra bir kaç alternatif splicing izoformu bildirilmiştir. TRPM2'nin tanımlanan ilk iki splicing tipi TRPM2-ΔC ve TRPM2-ΔN'dir. TRPM2-ΔC, C-terminalin ADPR bağlanma bölgesi içerisinde 34 aminoasitlik (T1292–L1325) bir uzantıdan yoksundur. TRPM2-ΔC, ADPR'ye duyarlı değildir ancak H₂O₂ tarafından aktive olabilmektedir. Bu durum H₂O₂ aracılığıyla doğrudan TRPM2 aktivasyonu hipotezini desteklemektedir (36). TRPM2-ΔN, N-terminalde 20 aminoasitlik (K538–Q557) bir delesyon gösterir ve ne ADPR ne de H₂O₂ tarafından aktive edilebilir. Üçüncü tipi N-terminal ucundan ilk 214 rezidüsü kesik olan öncelikle striatumda tespit edildiği için striatum shorter form (TRPM2-SSF) olarak isimlendirilen formdur. TRPM2-SSF kanalının aktivitesi TRPM2'ye kıyasla belirgin şekilde düşüktür (150). Bir diğer izoform olan TRPM2-S, oldukça kısa bir tiptir ve merkez bölgede eksikliği vardır (161). TRPM2-S ile TRPM2'nin birlikte eksprese olması fonksiyonel TRPM2 kanalının ekspresyonunu azaltmaktadır. TRPM2 alternatif splicing izoformlarının ekspresyonu TRPM2 kanalının farklı dokularda, hücrelerde ve fizyolojik/fizyopatolojik durumlarda düzenlenmesi için adaptif mekanizmaları temsil edebilir (167).

3.3.1.2. TRPM2 ve Prostat Kanseri

Son zamanlarda insan prostat hücrelerindeki TRPM2 varlığı lazer ile mikrodiseksiyon yapılmış tümörlü epitelde kantitatif RT-PCR kullanılarak gösterilmiştir. Analizler, cerrahi örneklerin mikrodisekte edilmiş uygun benign hücrelere kıyasla malign epitel hücrelerin % 75'inde TRPM2 transkriptlerinin yüksek ekspresyonunu ortaya koymuştur. Ayrıca, LNCaP ve PC-3 hücrelerinde de

TRPM2 RNA'sı tespit edilmiştir. PC-3 hücrelerinde TRPM2, nükleer ekspresyonunun olmadığı benign hücre hatlarının aksine sadece plazma membranı ve sitosolde değil aynı zamanda nükleusta da eksprese edildiği gösterilmiştir. En önemlisi de TRPM2 ayrıca lizozomlarda da eksprese edilmektedir. Bu açıdan lizozomal Ca^{+2} salınımı yapan kanal olarak işlev görmesi muhtemeldir. Dahası, PC-3 hücrelerinde TRPM2'nin siRNA aracılığıyla knockdown edilmesi hücre gelişimini inhibe etmektedir ancak bu durumun benign prostat hücrelerinde gerçekleşmemesi, TRPM2'nin Pk hücre çoğalması için esansiyel olduğunu düşündürmektedir (27).

3.3.1.3. TRPM2 ve Hücre Ölümü

TRPM2 insan beyni, lenfositleri ve monositlerinden klonlanmaktadır (151). TRPM2, H_2O_2 ve reaktif oksijen türlerini üreten diğer ajanlar tarafından aktive edilmekte ve aktivasyonu intraselüler serbest kalsiyum (Ca^{+2}) konsantrasyonunda bir artış ile sonuçlanmaktadır (36). TRPM2'nin HEK293 hücrelerindeki heterolog ekspresyonu, Ca^{+2} yükselmesi ile ilişkili olan H_2O_2 -indüklü hücre ölümüne hassasiyet sağlamaktadır. Dahası, endojen TRPM2 ekspresyonunun rat insülinoma RIN-5F ve monosit U937 hücrelerinde baskılanması Ca^{+2} akımında ve H_2O_2 ya da tümör nekrozis faktör (TNF) tarafından indüklenen hücre ölümünde önemli derecede bir azalmaya sebep olmuştur (158). Bu veriler, oksidatif stresi takiben hücre ölümüne aracılık eden H_2O_2 tarafından aktive edilen kalsiyuma geçirgen endojen bir kanal olarak TRPM2'nin fizyolojik rolünü güçlü bir şekilde desteklemektedir. Zhang ve arkadaşları yaptıkları çalışmada (2003), insan hematopoietik hücrelerinde, tahmin edilen altı C-terminal transmembran alanın dört tanesinden ve kalsiyuma geçirgen

putatif por bölgesinden yoksun olan TRPM2'nin kesik bir izoformunu tespit etmişlerdir. TRPM2'nin bu kısa formunun (TRPM2-S) tam uzunluktaki (TRPM2-L) ile doğrudan ilişkili olduğu belirlenmiştir. Dijital bir video görüntüleme sistemi kullanılarak, sadece transfekte edilmiş TRPM2-S eksprese eden 293T hücreleri yeşil flüoresan protein (GFP) varlığı ile ve transfekte edilmiş TRPM2-L eksprese eden hücreler mavi flüoresan proteinin (BFP)'nin saptanması ile tanımlanmıştır. Çalışmada Ca^{+2} eş zamanlı olarak Fura Red flüoresan ile ölçülerek, TRPM2-L aracılığıyla TRPM2-S'in H_2O_2 -indüklü kalsiyum akışını baskılama yeteneği gösterilmiştir. Ayrıca TRPM2-S, TRPM2-L aracılı H_2O_2 tarafından indüklenen hücre ölümüne olan hassasiyeti inhibe etmiştir. Bu veriler, TRPM2-S ile TRPM2-L arasındaki ilişkinin oksidatif strese hücresel yanıtın yanı sıra kanal aktivitesinin düzenlenmesi için de önemli bir mekanizma olduğunu düşündürmektedir (161).

3.4. Reaktif Oksijen Türleri (ROT)

Reaktif oksijen türleri (ROT); süperoksit anyon ($O_2^{\cdot -}$) ve hidroksil radikal ($OH^{\cdot}$) gibi aşırı derecede reaktif serbest oksijen radikalleri ve hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi stabil, radikal olmayan oksidantları kapsayan bir molekül ailesidir. ROT hücrelerde oksijen metabolizması aracılığıyla üretilir ve yüksek seviyeye ulaştıklarında aktif bir şekilde fagositler içinde mikrobiyal eliminasyona katılarak ve genomik istikrarsızlığa katkıda bulunarak yıkıcı moleküller olarak işlev görürler. Böylece hücre ölümü ve/veya tümörögenез gerçekleşir. Ancak son dönemde daha düşük fizyolojik seviyelerdeki ROT; kinaz ile çalışan yolları düzenleyen, bunun sonrasında da büyüme faktörleri, besin yetersizliği ya da hipoksi gibi eksternal uyaran ya da zorluklara hücresel yanıtları oluşturmada aracılık eden intraselüler sinyal iletim molekülleri olarak tanımlanmıştır (168).

Mitokondriler, intraselüler ROT'nin ana kaynağıdır çünkü oksidatif fosforilasyondan sızan elektronlar ve α -gliserofosfat dehidrogenaz, α -ketoglutarat dehidrogenaz gibi enzimatik kompleksler oksijen varlığında kısa ömürlü süperoksit anyonlarını üretirler. Bu anyonlar mitokondriyal matrikste yerleşik bir protein olan süperoksit dismutaz (Mn-SOD) tarafından nispeten daha stabil ve membranı geçebilen hidrojen peroksite hızlı bir şekilde dönüştürülür (169). Peroksizomlar gibi diğer organellerin yanı sıra ROT'nin diğer önemli intraselüler kaynakları arasında nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) oksidazları, ksantin oksidaz (XO), ER luminal tiyol oksidaz (Ero1) ve myeloperoksidaz gibi enzimler yer almaktadır (170).

Fizyolojik düzeylerde ROT, redoks sensitif sistein rezidülerinin oksidasyonu ve sinyal kaskadlarını negatif olarak düzenleyen fosfatazlarda meydana gelen inhibisyon sayesinde sinyal molekülleri olarak işlev görür, buna karşın aşırı ROT, hücrelerde oksidant ile antioksidant yanıtlar arasında bir dengesizlik oluşturur. Böylece meme, akciğer, karaciğer ve prostat kanserleri gibi birçok malignansinin patogenezinde etiyolojik olarak rol oynayan oksidatif stres ortaya çıkar (171). Anormal derecede yüksek ROT seviyeleri; nüklear ve mitokondrial DNA, proteinler ve lipidlerin oksidasyonu ile sonuçlanarak bunların yapısında ve işlevinde bozulmalar meydana getirir ve tümörü teşvik eden protein ve/ve ya yolakların anormal ekspresyon ve düzenlenmesine yol açar (172). Gerçekten de meme kanseri hastalarından alınan plazma örneklerinde normal kontrol örnekleri ile kıyaslandığında daha yüksek seviyede, bir lipid peroksidasyon belirteci olan, malondialdehit gözlenmiştir (173). Buna karşın olarak, insan meme kanseri hücre hatlarında, antioksidant enzimler olan

copper/zinc süperoksit dismutaz (SOD1) ve manganez süperoksit dismutaz (SOD2)'ın overekspresyonu ksenograft tümör gelişimini baskılamıştır (174) ve PyMT farelerde katalazın transgenik overekspresyonu tümör invazifliğini ve metastazını azaltmıştır (175).

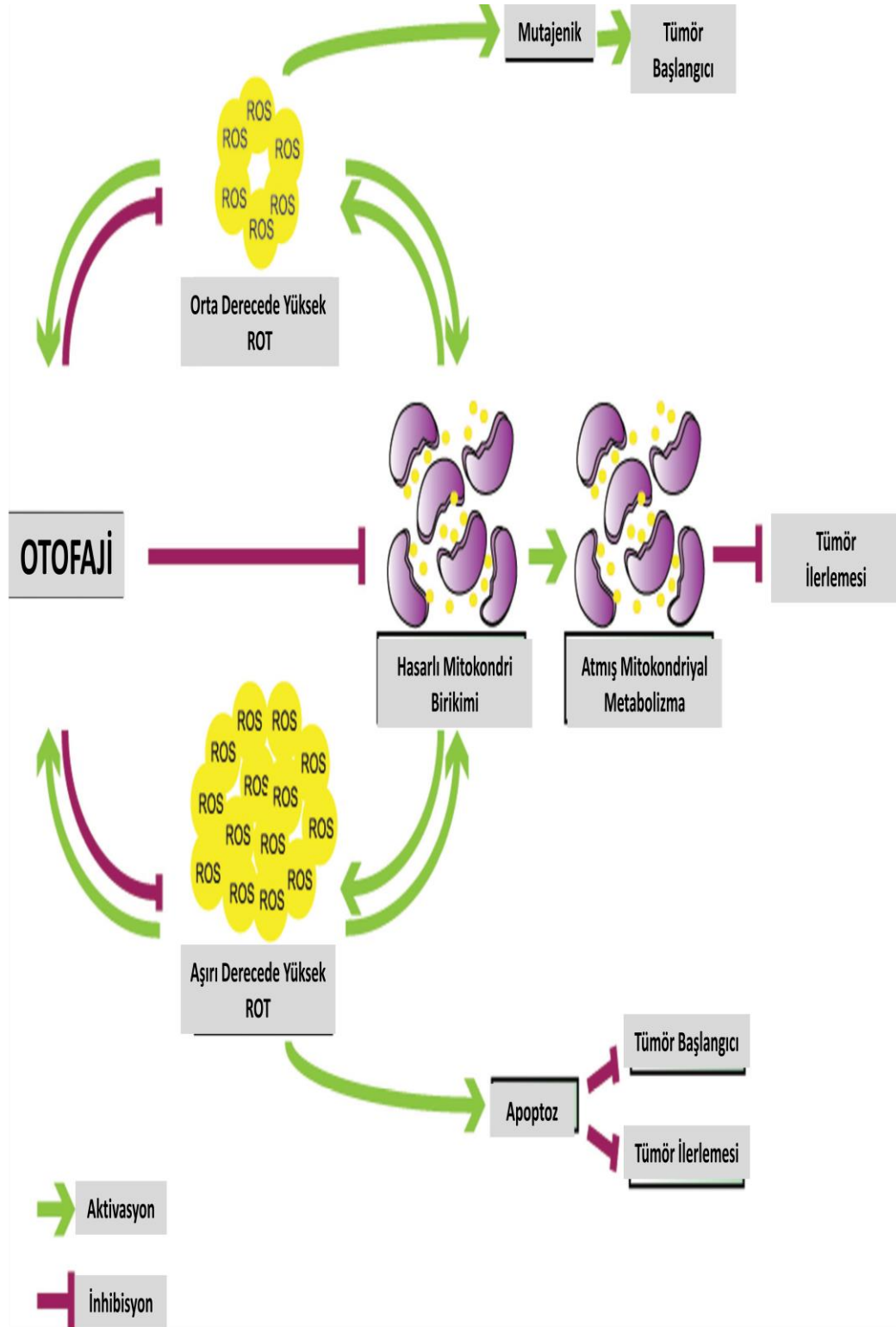
3.4.1. ROT ve Prostat Kanseri

Son 10 yıldır Pk riski ile oksidatif stres arasında bir ilişki olduğu kabul edilmektedir. Epidemiyolojik, deneysel ve klinik çalışmalar Pk'nin gelişimi ve ilerlemesinde oksidatif stresin bir rolü olduğunu net bir şekilde ortaya koymaktadır (176). Oksidatif stres; lipidlerin, proteinlerin ve DNA'nın toplu hasarına yol açan reaktif oksijen türleri (ROT) ve ROT'nin hücresel düzeylerini kontrol eden detoksifikasyon enzimlerinin dengesizliğinden kaynaklanmaktadır. Muhtemelen inflamasyon hormonal deregülasyon, diyet ve/veya GSTP1'in susturulması gibi epigenetik modifikasyonların bir sonucu olarak prostat, oksidatif strese karşı oldukça duyarlı gibi görünmektedir. Oksidatif stres ile Pk başlangıcı arasındaki bağlantıya dair bulgular, insan prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) ve Pk'nde azalan ana antioksidan enzimleri bununla birlikte oxidized DNA adduct 8-oxy-7,8-dihydro-29-deoxyguanosine (8-oxy-dG)'de tesadüfi bir artışı gösteren ilişkili çalışmaları kapsamaktadır. Ayrıca, APE genindeki polimorfizmler artan Pk riski ile ilişkili iken kilit enzimlerin redoks kontrolünde ve baz eksizyon tamirinde yer alan çok fonksiyonlu bir enzim olan APE/Ref1 Pk'nde upregüle olmuştur. Benzer şekilde, genetik olarak tasarlanmış fare Pk modellerinde kanserin ilerlemesi ile birlikte oksidatif strese yanıt yollarında karışıklıklar gözlenmiştir. İlginç bir şekilde fare prostatında Nkx3.1 homeobox geninin fonksiyonunun kaybı oksidatif hasara yanıt genlerinde deregüle ekspresyona ve PIN başlangıcı ile

ilişkili olan 8-oxy-dG düzeylerinde artışa yol açmaktadır. Pk hücre hatlarında NKX3.1 homeobox geni fonksiyonundaki artış DNA hasarına karşı koruma sağladığı gösterilmiştir (177).

3.4.2. ROT ve Otofaji

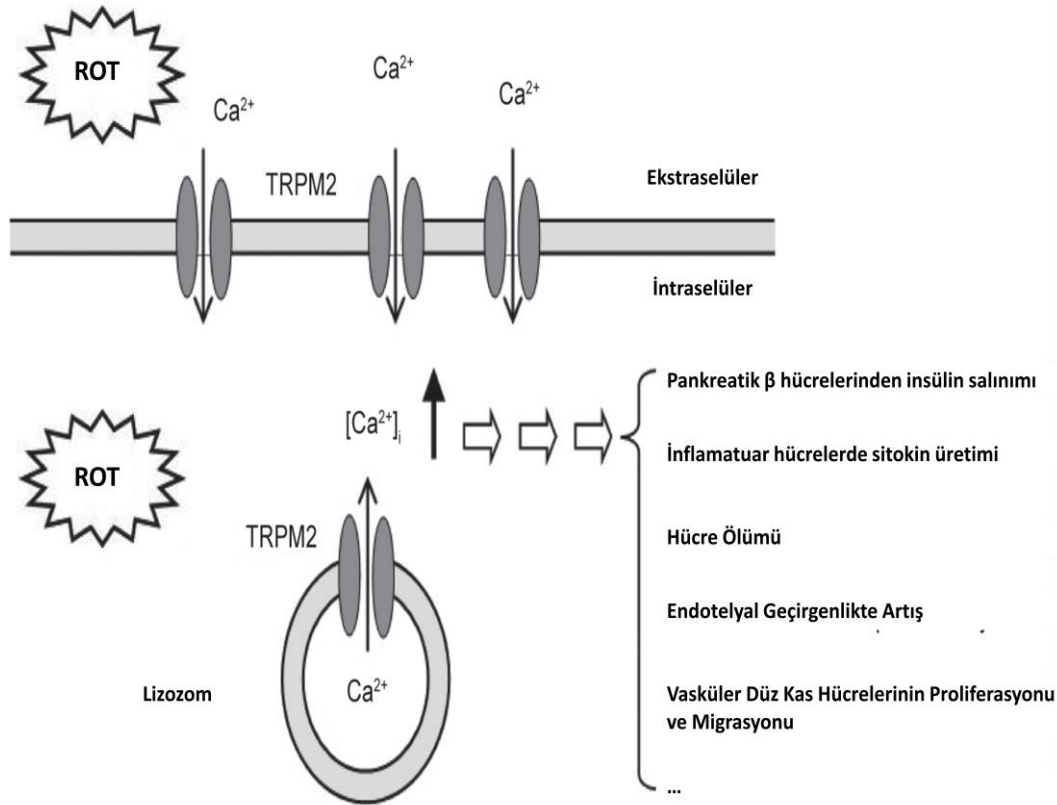
Artmış ROT düzeylerinin, hücrelerde otofajiyi uyardıkları gösterilmiştir. Özel koşullar altında besin yetersizliğini takiben otofajinin uyarılması, Atg8 proteinin olgunlaşması ve delipidasyonunda yer alan bir enzim olan Atg4'ü oksidize eden H_2O_2 'nin üretimini gerektirmektedir. Bu oksidizasyon modifikasyonu özellikle Atg4'ün delipidasyon aktivitesini inaktive ederek LC3-ilişkili otofagozomların oluşumunda artışa yol açar. Dolaylı bir yolla, ROT, AMP-activated protein kinaz (AMPK) aracılığıyla otofajiyi düzenleyebilir. Aslında, oksijen ve besin yetersizliği AMP:ATP birikimini ve mTORC1'in inhibisyonu ve otofaji indüklenmesine yol açan AMPK'nın aktivasyonunu indükler. AMPK ayrıca besin yetersizliğine bağlı otofajinin uyarılması için aktivasyonu gerekli olan ULK1/ATG1'i fosforile ederek otofajiyi düzenler. AMPK, oksidatif strese hassastır ve kendi aktivasyonuna ve otofajinin dolaylı uyarılmasına yol açan H_2O_2 birikimini takiben upstream AMPK kinaz (AMPKK) tarafından fosforile edilebilir. ROT ayrıca kanser hücrelerinde otofaji gen ekspresyonlarının uyarılmasına yol açan NF- κ B gibi transkripsiyon faktör aktivitelerinin düzenlenmesi aracılığıyla otofajiyi düzenleyebilir (151).



Şekil 15: Tümörögenizde ROT ve Otofaji (178)

3.4.3. ROT ve TRPM2

TRPM2, oksidatif stresin iyi belirlenmiş bir hücresel sensörüdür. H_2O_2 , çeşitli hücre tiplerinde TRPM2 aktivasyonunu ve ardından Ca^{+2} artışını indüklemektedir. H_2O_2 tarafından TRPM2 aktivasyonu türü uzun zamandır tartışılmaktadır ve artan kanıtlar H_2O_2 'nin TRPM2 kanalını ya doğrudan ya da dolaylı olarak aktive edebileceğini akla getirmektedir. Oksidatif stresin ADPR oluşumunu indüklediği iyi bir şekilde bilinmektedir. Bu yüzden, H_2O_2 -indüklü TRPM2 aktivasyonu çoğunlukla ADPR'nin oluşumu ile açıklanmaktadır. Ancak, H_2O_2 TRPM2'yi doğrudan aktive edebilir. TRPM2 splays türü olan TRPM2- ΔC ADPR'ye karşı duyarlı değildir ama yine de H_2O_2 'ye yanıt verir ki bu sebeple H_2O_2 'nin TRPM2 üzerine doğrudan etkisi akla gelir (167).



Şekil 16: Oksidatif Stres Sensörü Olarak TRPM2 Kanalının Fonksiyonel Rolü (167)

TRPM2 iyon kanalının, plazma membranının yanı sıra lizozomal ve endozomal membranlarda da yer aldığı bilinmekte ve otolizozom oluşumunda otofaji ile endozom/lizozom ilişkisi belirtilmektedir. Otofajik kesecik membranının kaynağının kesin olarak bilinmemesi ve bu membranın yeni sentezlendiği ya da endoplazmik retikulum, mitokondri dışı membranı veya plazma membranından kaynaklanabileceği ihtimali TRPM2 iyon kanalını içerebileceğini akla getirmektedir. Ayrıca TRPM2 ve otofaji için H₂O₂'nin indükleyici olduğu bildirilmektedir. Bu bilgiler, TRPM2'nin otofaji mekanizmasında yer alabileceğini düşündürmektedir. Bu sebeple çalışmamızda insan prostat kanseri hücre hattında (PC-3), TRPM2 iyon kanallarının inhibe edilmesinin otofajik yollara etkisinin olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

4. GEREÇ VE YÖNTEM

4.1. Hücre Kültürü

4.1.1. Gereçler

- Biyogüvenlik Kabini (NÜVE)
- Derin Dondurucu (-86) (NUAIRE)
- İnverted Faz kontrast (Floresans Ataçmanlı) Işık mikroskobu (NIKON)
- Karbondioksitli İnkübatör (NÜVE)
- Hücre Sayım Cihazı (BIO-RAD)
- Vorteks (LAB NET)
- Santrifüj Cihazı
- Sıvı Azot Tankı (İnternational Cryogenics. Inc.)
- Mikropipet (Eppendorf)
- 25/75 cm² Flask (NEST)
- 6/12/24/96 Kuyucuklu Plate (COSTAR)
- Falkon Tüp (CORNING)
- Thoma Lamı (ISOLAB)
- Hücre Sayım Slide (BİO-RAD)
- 10/20/200/1000 µl Mikropipet Ucu (AXYGEN)
- Pastör Pipet
- 500/1000/1500 µl Ependorf Tüp
- 2 ml Kriyo Tüp
- RPMI 1640 (LONZA (Kat. No:BE12-918F))
- OPTI-MEM (GİBCO (Kat. No: 31985-062))

- DMEM (PAN BIOTECH (Kat. No: P04-03588))
- H₂O₂ (SIGMA (Kat. No: SZBE0090V))
- Fötal Sığır Serumı (SIGMA (Kat. No: 080M3397))
- L-Glutamin (SIGMA Kat. No: RNBB7408))
- PBS (Fisher Bioreagents (Kat. No: 135974))
- %0,25 Trypsin-EDTA Solüsyonu (SIGMA (Kat. No: 11G804))
- Antibiyotik (Biological Industries (Kat. No: 030321B))
- DMSO
- Steril Su
- TRPM2 siRNA (Qiagen)
- Hiperfect Transfektan (Qiagen)
- Etil alkol
- 3-MA (SIGMA (Kat. No: M9281))
- z-VAD-fmk (ABCAM Biochemicals (Kat. No: AB120382))

4.1.2. Hücre Hattı Seçimi ve Temini

İnsan prostat kanseri çalışmalarında genellikle DU145, LNCaP ve PC-3 hücre hatları kullanılmaktadır. Bu hücre hatları metastatik özellikleri bakımından karşılaştırıldıklarında PC-3 hücre hattının diğerlerine kıyasla daha yüksek seviyede metastaz yapma özelliğine sahip olduğunun belirtilmesinden dolayı çalışmamızda PC-3 hücre hattı kullanılmıştır.

Çalışmada kullanılan androjen-bağımsız insan prostat kanseri hücre hattı PC-3 İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Süleyman SANDAL'dan temin edilmiştir.

4.1.3. Hücrelerin Beslenmesi

PC-3 hücreleri, %10 FBS, %1 antibiyotik ve %1 L-glutamin ilave edilen RPMI 1640 besiyeri içeren 25 ve 75 cm²'lik flasklerde CO₂'li etüvde 37 °C'de çoğaltıldı. Her gün canlılık, çoğalma ve enfeksiyon bakımından inverted mikroskop kullanılarak değerlendirilen flasklardaki besiyeri her 2-3 günde bir değiştirildi.

4.1.4. Hücrelerin Pasajlanması

Inverted mikroskop altında değerlendirilen flasklardaki yüzeye tutunmuş olan hücre yoğunluğunun %90-100 olduğu tespit edildiğinde flask içindeki besiyeri döküldü ve flask yüzeyine tutunmuş olan hücreler serbest hale gelmeleri için 4 ml tripsin-EDTA ile muamele edildi. 5 dk 37°C'de inkübe edildikten sonra inverted mikroskop altında hücrelerin flask yüzeyinden ayrılıp ayrılmadıkları kontrol edildi. Flask içinde serbest hale geldikleri tespit edilen hücrelere 4 ml besiyeri ilave edilerek tripsin-EDTA'nın olumsuz etkisi nötralize edildi. Falcon tüplere aktarılan bu karışım 2300g'de 3 dk santrifüj edildi ve süpernatant kısım dökülerek yerine taze besiyeri eklendi. Flask içerisine aktarılmadan önce homojen bir süspansiyon oluşması için vorkteks yapıldı ve hücreler iki farklı flaskta aktarıldı.

4.1.5. Hücrelerin Dondurulması ve Çözdürülmesi

Hücrelerin dondurulması için flask içindeki besiyeri dökülerek hücreler 4 ml tripsin-EDTA ile muamele edildi. 5 dk 37°C'de inkübe edildikten sonra flask içinde serbest hale geldikleri tespit edilen hücrelere 4 ml besiyeri ilave edildi. Falcon tüplere aktarılan bu karışım 2300g'de 3 dk santrifüj edildi. Süpernatant kısım atıldıktan sonra elde edilen hücre pelleti üzerine %70 oranında DMEM,

%20 oranında FBS ve %10 oranında DMSO içeren solüsyon ilave edildi. Kriyo tüplere bu karışımdan 1'er ml aktararak aşamalı olarak (oda sıcaklığı/+4°C/-20°C/-80°C) soğutulup, -80°C'de derin dondurucuda muhafaza edildi.

Donmuş olarak saklanan hücrelerin çözündürülmesi dondurma işleminin aksi yönde aşamalı olarak gerçekleştirildi. -80°C derin dondurucudaki hücreler çıkarılarak -20, +4 ve oda sıcaklığı ve ardından 37°C'ye ısıtılmış besiyeri ilave edilerek flasklara ekildi.

4.1.6. Hidrojen Peroksit Uygulaması

6'lık platelere 2×10^5 hücre/ml olacak şekilde 20 ml hücre ekimi yapılarak hücreler CO₂'li etüvde 37 °C'de 24 saat inkübe edildi. 24. saatte her bir dozdan 3 tekrarlı olacak şekilde platelerdeki kuyucuklara farklı dozlarda H₂O₂ ilave edildi. CO₂'li etüvde 37 °C'de 1 saat bekletildikten sonra 1 ml tripsin-EDTA ile muamele edilerek hücreler tutundukları yüzeyden kaldırıldı ve falkon tüplerine aktarıldı. 2300g'de 3 dk santrifüj edildikten sonra dipteki hücre pelletine dikkat gösterip üst faz dökülerek 3 ml PBS eklendi ve pastör pipeti ile pipetleme yapıldı. Tekrar 2300g'de 3 dk santrifüj edildikten sonra üst faz döküldü ve falkon tüpleri -80°C'de saklandı.

4.1.7. Otofaji İnhibitörü (3-MA) Uygulaması

6'lık platelere 2×10^5 hücre/ml olacak şekilde 20 ml hücre ekimi yapılarak CO₂'li etüvde 37 °C'de 24 saat inkübe edildi. 23. saatte platelerdeki kuyucuklara 3 tekrarlı olacak şekilde 40 nM 3-MA ilave edildi. CO₂'li etüvde 37 °C'de 2 saat bekletildikten sonra 1 ml tripsin-EDTA ile muamele edilerek hücreler yapıştıkları yüzeyden kaldırıldı ve falkon tüplerine aktarıldı. 2300g'de 3 dk santrifüj edildikten sonra dipteki hücre pelletine dikkat gösterip üst faz dökülerek 3 ml PBS

eklendi ve pastör pipeti ile pipetleme yapıldı. Tekrar 2300g'de 3 dk santrifüj edildikten sonra üst faz döküldü ve falkon tüpleri -80°C'de saklandı.

4.1.8. Apoptoz İnhibitörü (z-Vad-fmk) Uygulanması

6'lık platelere 2×10^5 hücre/ml olacak şekilde 20 ml hücre ekimi yapılarak CO₂'li etüvde 37 °C'de 24 saat inkübe edildi. 23. saatte platelerdeki kuyucuklara 3 tekrarlı olacak şekilde 10 nM z-Vad-fmk ilave edildi. CO₂'li etüvde 37 °C'de 2 saat bekletildikten sonra 1 ml tripsin-EDTA ile muamele edilerek hücreler yapışıkları yüzeyden kaldırıldı ve falkon tüplerine aktarıldı. 2300g'de 3 dk santrifüj edildikten sonra dipteki hücre pelletine dikkat gösterip üst faz dökülerek 3 ml PBS eklendi ve pastör pipeti ile pipetleme yapıldı. Tekrar 2300g'de 3 dk santrifüj edildikten sonra üst faz döküldü ve falkon tüpleri -80°C'de saklandı.

4.1.9. siRNA Uygulaması

Transfeksiyon işlemi gerçekleştirilmeden önceki gün 6'lık plate'lere her bir kuyucukta 2×10^5 hücre/ml olacak şekilde 20 ml ekim yapılarak CO₂'li etüvde 37 °C'de 24 saat inkübe edildi. Besin ortamı değiştirilerek kuyucuk başına 2.3 ml DMEM eklendi. 10 µM'lık siRNA'dan 9 µl alınarak 100 µl OptiMEM içerisinde seyreltildi. Seyreltilmiş siRNA üzerine 12 µl HiPerFect eklendi ve 3 kez 1'er saniye vortekslenerek karıştırıldı. Lipozomların oluşumu için oda sıcaklığında 5-10 dk inkübe edildikten sonra bu karışım pipetaj yapılmadan hücreler üzerine damla damla olacak şekilde eklendi ve plate hafifçe karıştırıldı. CO₂'li etüvde 37 °C'de inkübe edildi ve transfeksiyon işleminden 24 saat sonra besiyeri değiştirildi. siRNA transfeksiyon işlemi toplamda 48 saat sürdürüldü.

4.1.10. Hücre Ölüm Analizi

4.1.10.1. Gereçler

- Akridin-Oranj Boyası
- Etidyum Bromid Boyası
- Tripan Mavisı Boyası
- Falkon Tüp
- Ependorf Tüp
- Santrifüj Cihazı
- Flouresan Mikroskop
- Mikropipet
- Mikropipet Ucu
- PBS
- Lam
- Lamel
- Fotoğraf Makinesi
- Hücre Sayım Cihazı
- Hücre Sayım Slide

4.1.10.2. Akridin Oranj (AO)-Etidyum Bromid (EB) ve Tripan Mavisı

Boyamaları

Hücre ölümü, plazma membranının Akridin Oranj (AO)-Etidyum Bromid (EO) ya da tripan mavisine karşı geçirgenliğinin ölçülmesi ile değerlendirildi. Hücre süspansiyonu bir ependorf tüp içerisinde 2300g'de 3 dk santrifüj edildi. Süpernatant kısım uzaklaştırıldı ve hücre pelleti 100-300 µl PBS ile yeniden süspansiyon haline getirildi. Hücreler PBS içerisinde 5 µl AO (100 µg/ml) ve EB

(100 µg/ml) kokteyli ile boyandı. Lam üzerine 10 µl süspansiyon konularak üzeri bir lamel ile kapatıldı ve hücreler flouresan mikroskop altında incelendi. EB'e karşı geçirgen olmayan canlı hücreler AO'a karşı geçirgendir ve AO, asidik karakterdeki yapıları kırmızıya boyar. Ölü hücreler ise hem AO'a hem de EB'e karşı geçirgendir ve EB, DNA'yı kırmızıya boyar. Bu kırmızıya boyanma, sitoplazmada otolizozomların AO boyamasından farklıdır. Her uygulama için en az 200 hücre sayıldı.

Ayrıca hücre ölümü tripan mavisini kullanarak Bio-Rad TC20 otomatik hücre sayım cihazı ile de değerlendirildi. Özetle, bir Falcon tüp içerisinde santrifüj edilen hücre süspansiyonundan süpernatant kısım uzaklaştırılarak hücre pelleti 0,2-0,5 ml PBS ile yeniden süspansiyon haline getirildi. 10 µl hücre süspansiyonu ile 10 µl tripan mavisini bir ependorf tüp içerisinde iyice pipetaj yapılarak karıştırıldı. Tripan mavisini hücreler için toksik olduğundan karıştırma işlemi yapıldıktan sonraki 5 dk. içerisinde karışımdan 10 µl alınarak hücre sayım slide'ına konuldu ve otomatik hücre sayım cihazında ölçüm tamamlandı.

4.1.11. Total RNA izolasyonu

4.1.11.1. Gereçler

- TRI-Reagent (MRC gene)
- PBS (Invitrogen)
- Etil Alkol (Pharmco)
- İzopropil alkol (Fisher Scientific)
- Kloroform (Fisher Scientific)
- Nükleaz İçermeyen Steril Su (Gibco)
- RNase ZAP™ (Ambion)

- 15 mL Falcon Tüp (Corning)
- 1,5 mL Ependorf Tüp
- 10CC şırınga (Genject)
- 18G şırınga iğnesi (Genject)
- Santrifüj Cihazı
- Vorteks
- Mikropipet
- Mikropipet Ucu

4.1.11.2. Yöntem

Flasklardan alınan PC-3 hücreleri 15 ml'lik falcon tüplerine aktarıldı ve 5 ml PBS ilave edilerek yıkama işlemi gerçekleştirildi. 2300g'de 3 dakika santrifüj işlemi ardından pellet oluşturan hücrelerin üstünde kalan sıvı kısım dikkatli bir şekilde dökülerek PBS ile yıkama işlemi bir kez daha tekrar edildi. Elde edilen hücre pelleti 1,5 ml'lik ependorf tüplerine aktarıldıktan sonra 1 ml Trizol ilave edilerek 18 gauge enjektör ile pellet parçalandı ve 5 dk. oda sıcaklığında inkübe edildi. 200 µl kloroform (Trizol hacminin 1/5'i kadar) ilave edilerek 30 saniye vorteks yapıldı ve 2-3 dk. oda sıcaklığında bekletildi. +4 °C'de 10000 g'de 20 dk. santrifüj edildikten sonra en üstteki sıvı kısım yeni ependorf tüplere aktarıldı. Eldeki sıvı kısım ile eşit hacimde izopropanol eklenerek vorteks yapıldı ve 10 dk. oda sıcaklığında bekletildi. RNA pelleti için +4 °C'de 10000 g'de 20 dk. santrifüj edildi ve üstteki sıvı kısım uzaklaştırıldıktan sonra 1 ml. %75'lik etanol ile yıkama işlemi gerçekleştirildi. +4 °C'de 10000 g'de 5 dk. santrifüj işleminin ardından bu yıkama işlemi tekrarlandı ve etanol tamamen uzaklaştırıldıktan sonra 30 µl Nükleaz-free su eklenerek kullanılabilecek kadar -80°C'de saklandı.

4.1.12. Spektrofotometrik RNA Ölçümü

4.1.12.1. Gereçler

- BioSpec-nano (Shimadzu) cihazı
- Mikropipet
- Mikropipet Ucu
- Nükleaz İçermeyen Steril Su

4.1.12.2. Yöntem

İşleme geçmeden önce DNAaz-RNAaz içermeyen steril su ile kör ölçüm yapıldı. BioSpec-nano (Shimadzu) cihazının ölçüm alanına 1 µl RNA konularak RNA miktarı ng/µl olarak ölçüldü. Bu işlem her bir örnek için tekrarlandı.

4.1.13. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

4.1.13.1. Gereçler

High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kiti (Applied Biosystems)(10xRT Buffer, 25xdNTP mix, 10xRT Random Primers ve Multiscribe™ Reverse Transcriptase)

PCR Cihazı

500/1500 µl Ependorf Tüp

Nükleaz İçermeyen Steril Su

4.1.13.2. Yöntem

500 µl hacimli ependorf tüplerde toplamda 20 µl hacimde gerçekleştirilen cDNA sentezi için RNA örneklerinden 10 µl kullanılırken 2 µl 10xRT Buffer, 0,8 µl 25xdNTP mix, 2 µl 10xRT Random Primers, 1 µl Multiscribe™ Reverse Transcriptase ve 4,2 µl nükleaz-free su kullanıldı. Termal döngü cihazına

yerleştirilen örnekler; 25 °C'de 10 dk, 37 °C'de 120 dk, 85 °C'de 5 dk ve 4 °C'de ∞ olacak şekilde cihazda bekletilerek sonunda oluşan cDNA örnekleri -20 °C'de saklandı.

Tablo 2: cDNA Karışım Miktarı

BİLEŞİK	HACİM (µl)
10x RT Tamponu	2.0
25x dNTP Karışımı (100mM)	0.8
Multiscribe™ Reverse Transkriptaz	1.0
10x RT Random Primer	2.0
Nükleaz İçermeyen H ₂ O	4.2
Karışımın Toplamı	10.0

Tablo 3: cDNA Sentezi için Uygulanan PZR Programı

	1. BASAMAK	2. BASAMAK	3. BASAMAK	4. BASAMAK
SICAKLIK	25 °C	37 °C	85 °C	4 °C
SÜRE	10 dk	120 dk	5 dk	∞

4.1.14. Kantitatif Gerçek Zamanlı (Real Time)-Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile cDNA Çoğaltımı

Revers transkripsiyon sonucunda elde edilen cDNA'lar spesifik primerlerin varlığında Real Time-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR) ile çoğaltıldı. Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH (Qiagen (Kat. No: OT00079247))), TRPM2 (Qiagen (Kat. No: QT01870407)), Realtimeprimers Otofaji Panelinde yer alan Beta aktin (Actb), Microtubule-associated protein 1 light chain 3 alpha (MAP1LC3A), Microtubule-associated protein 1 light chain 3 beta (MAP1LC3B), BCL-2 associated X protein (BAX), B-cell CLL/lymphoma 2 (Bcl-2), Autophagy/beclin-1 regulator 1 (AMBRA1), ATG12, ATG16L1, ATG5, BECLIN1, BECN1L1, Lysosomal-associated membrane protein 1 (LAMP1), Lysosomal-associated membrane protein 2 (LAMP2), Lysosomal-associated membrane protein 3 (LAMP3), Phosphoinositide-3-kinase class 3 (PIK3C3), Phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 4 (PIK3R4), RB1-inducible coiled-coil 1 (RB1CC1), SH3-domain GRB2-like endophilin B1 (SH3GLB1), Tumor protein p53 (TP53), Tumor protein p73 (TP73), Unc-51-like kinase 1 (ULK1), Unc-51-like kinase 2 (ULK2) ve UV radiation resistance associated gene (UVRAG) genlerinin ekspresyonları belirlendi. Gen ekspresyonları arasındaki farklılıkların hesaplanmasında $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu kullanıldı.

siRNA susturma yüzdesinin hesaplanmasında aşağıdaki hesaplama metodu kullanıldı.

$$\Delta\Delta CT \text{ Değeri} = \Delta CT \text{ siRNA} - \Delta CT \text{ Kontrol}$$

$$\text{Kat Değişimi} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

$$\text{Susturma Yüzdesi} = 100 \times (1 - \text{Kat Değişimi})$$

Üç tekrarlı olarak gerçekleştirilen kantitatif RT-PZR yönteminde plate hazırlanırken her bir kuyucuğa 1 µl cDNA örneği konuldu. Her bir örnek için 2 µl qPCR mix, 1 µl primer ve 6 µl DNAaz ve RNAaz içermeyen steril su ilave edildi.

Tablo 4: RT-PZR için her bir kuyucuğa konan bileşikler

BİLEŞİKLER	HACİM (µl) x ÖRNEK SAYISI
cDNA	1.0
qPCR Mix	2.0
Primer	1.0
Su	6.0
Toplam	10

Gen ekspresyon düzeyleri Applied Biosystems 7500 Real Time PCR sistemi ile belirlendi. Çalışmada kontrol gen (housekeeping) olarak GAPDH ve beta-aktin kullanıldı. Isı koşulları 1 kez 95 °C'de 15 dk ve 40 kez 95 °C'de 15 sn-60 °C'de 30 sn-72 °C'de 30 sn olacak şekilde ayarlandı.

Tablo 5: Uygulanan RT-PZR Programı

DÖNGÜ BASAMAĞI	SICAKLIK	SÜRE	DÖNGÜ SAYISI
BAŞLANGIÇ AKTİVASYONU	95 °C	15 dk	1
DENATÜRASYON	95 °C	15 sn	40
ANNEALİNG	60-65 °C	30 sn	
UZAMA	72 °C	30 sn	

4.1.15. İstatistiksel Analizler

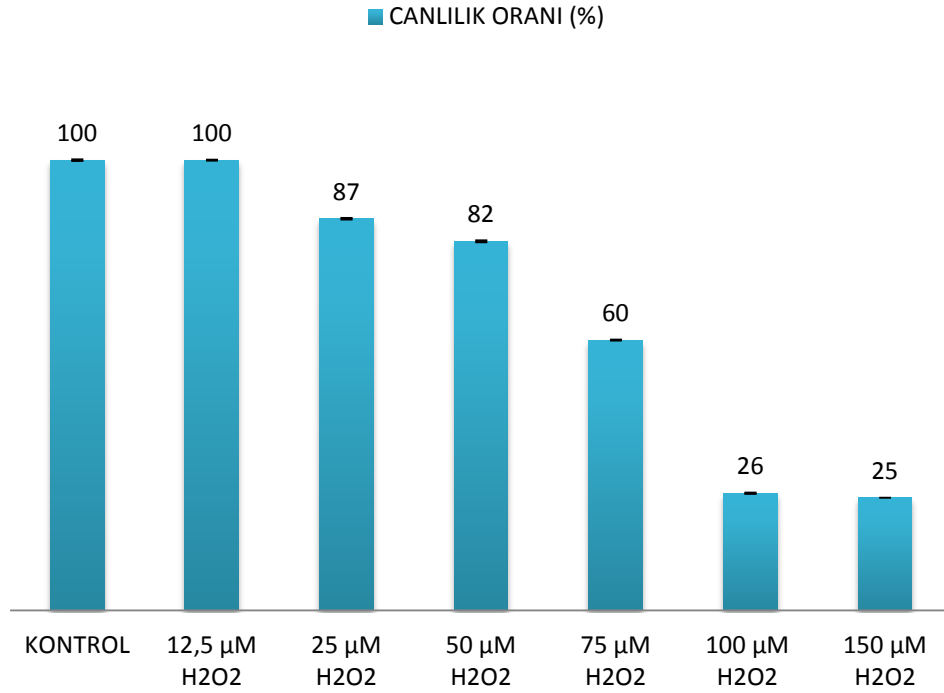
Tüm istatistiksel analizler için IBM SPSS Statistics programı 22. sürüm paket programı kullanıldı. Hücre sağkalım verilerinin gruplar arasındaki karşılaştırılmasında ki-kare testi uygulandı. RT-PZR parametrelerinin gruplar arasında karşılaştırılmasında kat artışı kullanıldı. 1 kat artış değeri istatistiksel açıdan anlamlı kabul edildi.

5. BULGULAR

5.1. Hücre Sayımı Verilerinin Değerlendirilmesi

5.1.1. H₂O₂ Konsantrasyon Farklılıklarının Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

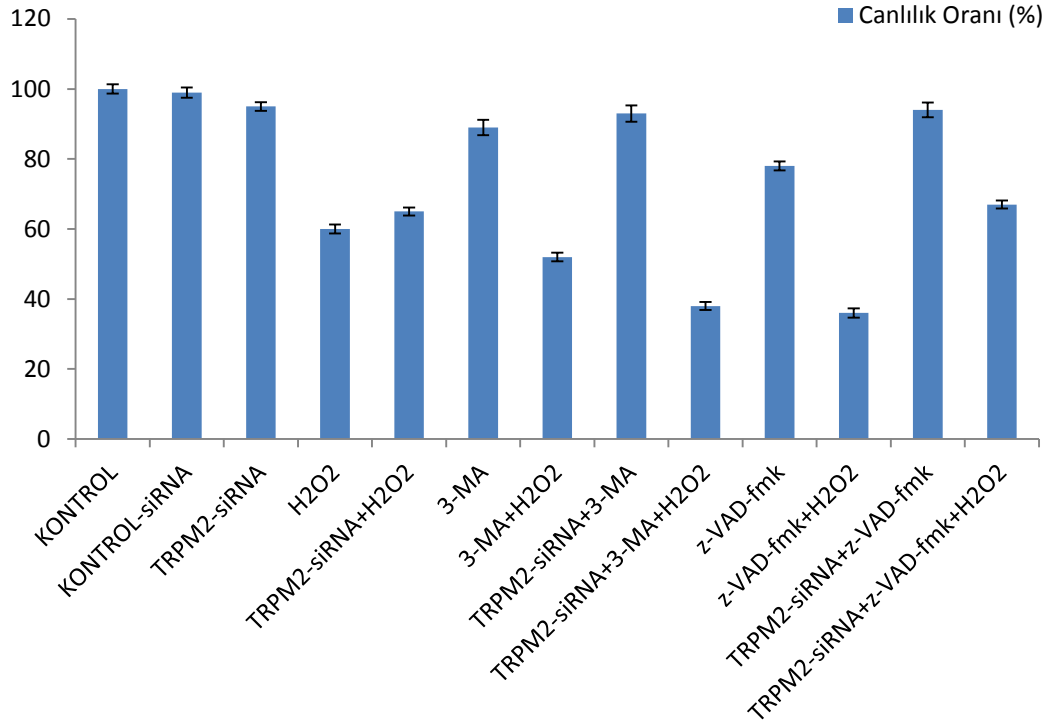
Tripan mavisi ile yapılan boyama sonucunda hem hücre sayım cihazı hem de thoma lamı ile mikroskop altında yapılan hücre sayımından elde edilen verilere göre; hücrelere uygulanan H₂O₂ konsantrasyon miktarı arttıkça hücre canlılığının azaldığı tespit edildi (Şekil 17).



Şekil 17. Doza Bağımlı H₂O₂ Uygulamasının Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

5.1.2. Tüm Grupların Hücre Canlılık Oranları

Çalışmamızda PC-3 hücre hattında; hiçbir uygulama yapılmayan **Kontrol Grubu**, 48 saat boyunca Kontrol-siRNA'ya maruz bırakılan **Kontrol-siRNA Grubu**, 48 saat boyunca TRPM2'ye spesifik siRNA'ya maruz bırakılan **TRPM2-siRNA Grubu**, 1 saat boyunca H₂O₂'ye maruz bırakılan **H₂O₂ Grubu**, 48 saat boyunca TRPM2'ye spesifik siRNA ve 1 saat boyunca H₂O₂'ye maruz bırakılan **TRPM2-siRNA+H₂O₂ Grubu**, 2 saat boyunca 3-MA'ya maruz bırakılan **3-MA Grubu**, 2 saat boyunca 3-MA ve 1 saat boyunca H₂O₂'ye maruz bırakılan **3-MA+H₂O₂ Grubu**, 48 saat boyunca TRPM2'ye spesifik siRNA ve 2 saat boyunca 3-MA'ya maruz bırakılan **TRPM2-siRNA+3-MA Grubu**, 48 saat boyunca TRPM2'ye spesifik siRNA, 2 saat boyunca 3-MA ve 1 saat boyunca H₂O₂'ye maruz bırakılan **TRPM2-siRNA+3-MA+H₂O₂ Grubu**, 2 saat boyunca z-VAD-fmk'ya maruz bırakılan **z-VAD-fmk Grubu**, 2 saat boyunca z-VAD-fmk ve 1 saat boyunca H₂O₂'ye maruz bırakılan **z-VAD-fmk+H₂O₂ Grubu**, 48 saat boyunca TRPM2'ye spesifik siRNA ve 2 saat boyunca z-VAD-fmk'ya maruz bırakılan **TRPM2-siRNA+z-VAD-fmk Grubu**, 48 saat boyunca TRPM2'ye spesifik siRNA, 2 saat boyunca z-VAD-fmk ve 1 saat boyunca H₂O₂'ye maruz bırakılan **TRPM2-siRNA+z-VAD-fmk+H₂O₂ Grubu** olmak üzere 13 farklı grup oluşturuldu.



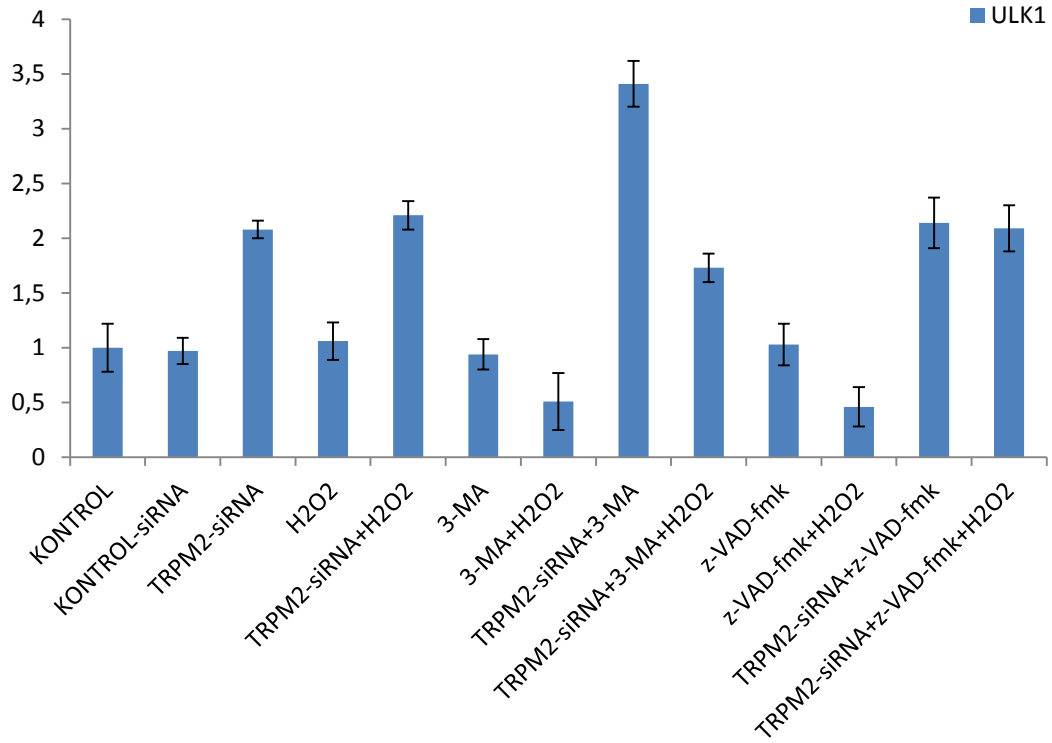
Şekil 18. Yapılan Uygulamaların Canlılık Üzerine Etkisi

Tripan mavisi ile yapılan boyama sonucunda hem hücre sayım cihazı hem de thoma lamı ile mikroskop altında yapılan hücre sayımından elde edilen verilere göre; H₂O₂ uygulaması yapılan tüm gruplarda önemli derecede hücre ölümü gerçekleştiği tespit edildi (Şekil 18).

5.3. Kantitatif RT-PZR Verilerinin Değerlendirilmesi

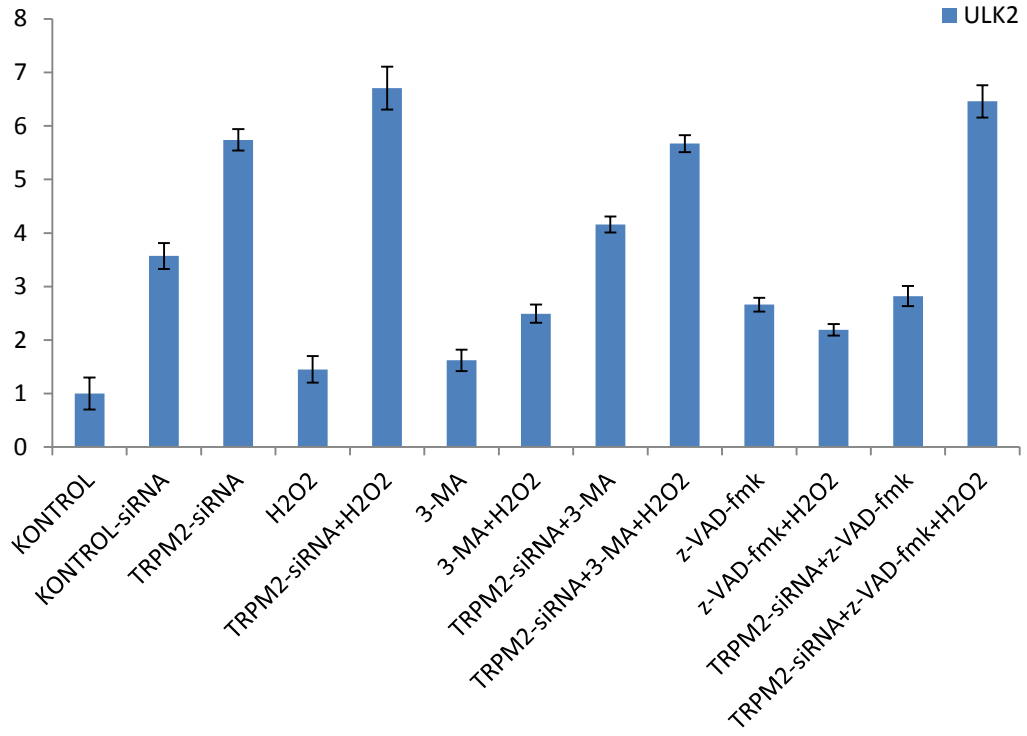
5.3.1. Otofajik Yolağın İndüklenme Aşamasında Yer Alan Genlerin

mRNA Ekspresyon Düzeyleri



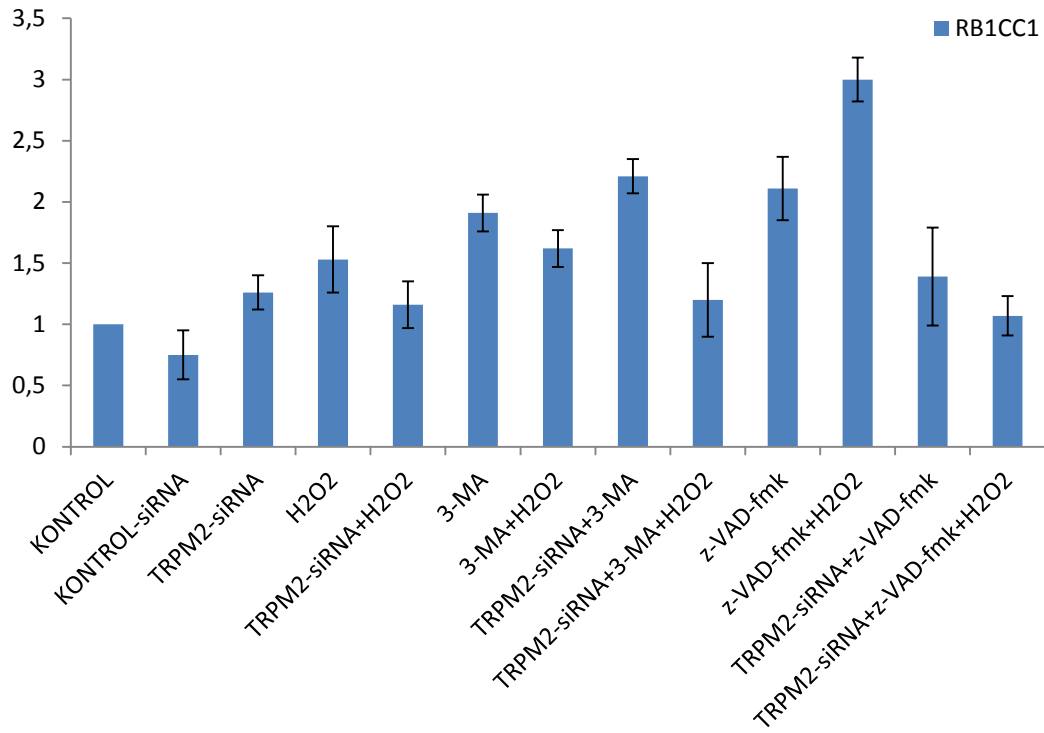
Şekil 19. Oluşturulan Gruplarda ULK1 Geninin RT-PZR Kat Artışı Grafiği

Kantitatif Real Time-Polimeraz Zincir Reaksiyon Analizi bulgularına göre; ULK1 gen ekspresyonunun kontrol grubuna kıyasla TRPM2-siRNA, TRPM2-siRNA+H₂O₂, TRPM2-siRNA+3-MA+H₂O₂, TRPM2-siRNA+z-VAD-fmk+H₂O₂, TRPM2-siRNA+3-MA ve TRPM2-siRNA+z-VAD-fmk gruplarında istatistikî olarak anlamlı düzeyde arttığı belirlendi (Şekil 19).



Şekil 20. Oluşturulan Gruplarda ULK2 Geninin RT-PZR Kat Artışı Grafiği

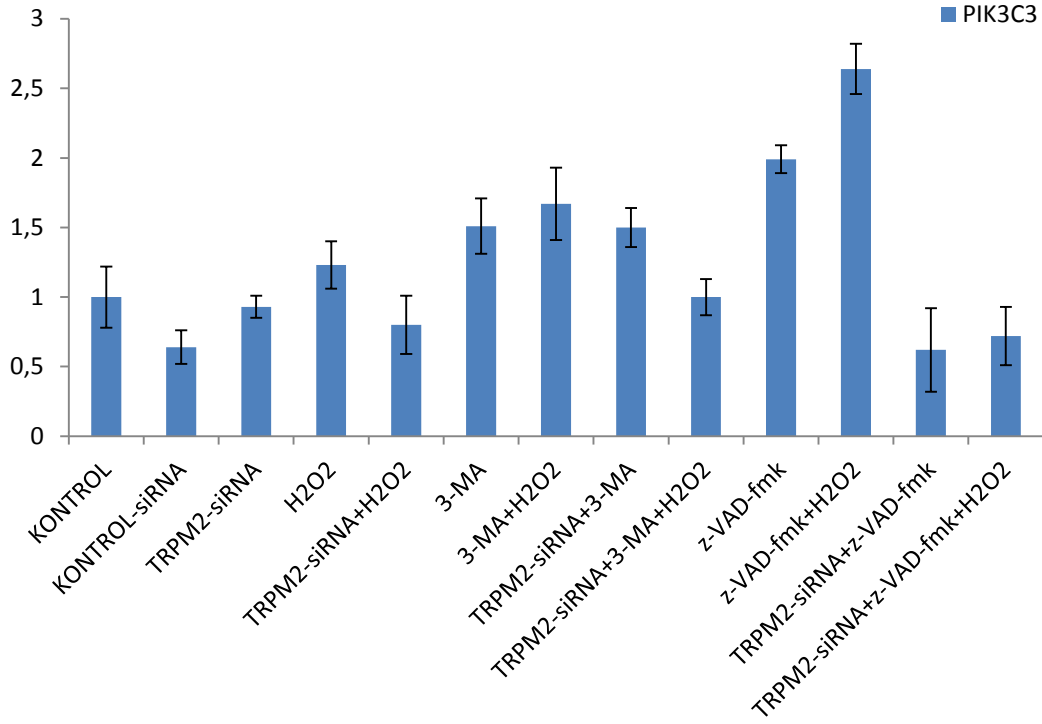
ULK2'nin; TRPM2-siRNA, TRPM2-siRNA+H₂O₂, 3-MA+H₂O₂, TRPM2-siRNA+3-MA+H₂O₂, z-VAD-fmk+H₂O₂, TRPM2-siRNA+z-VAD-fmk+H₂O₂, Kontrol-siRNA, TRPM2-siRNA+3-MA, z-VAD-fmk ve TRPM2-siRNA+z-VAD-fmk gruplarındaki gen ekspresyonunun kontrole kıyasla istatistikî olarak anlamlı düzeyde arttığı tespit edildi (Şekil 20).



Şekil 21. Oluşturulan Gruplarda RB1CC1 Geninin RT-PZR Kat Artışı Grafiği

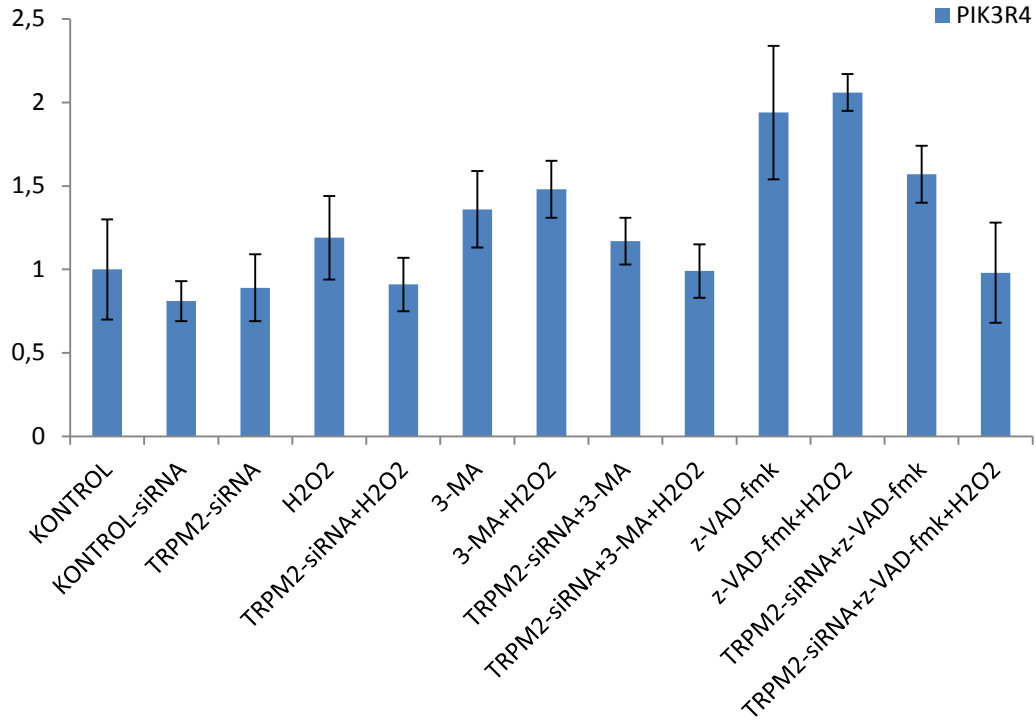
RB1CC1 gen ekspresyonunun kontrol grubuna kıyasla z-VAD-fmk+H₂O₂, TRPM2-siRNA+3-MA ve z-VAD-fmk gruplarında istatistikî olarak anlamlı düzeyde arttığı belirlendi (Şekil 21).

5.3.2. Otofajik Yolağın Nükleasyon Aşamasında Yer Alan Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeyleri



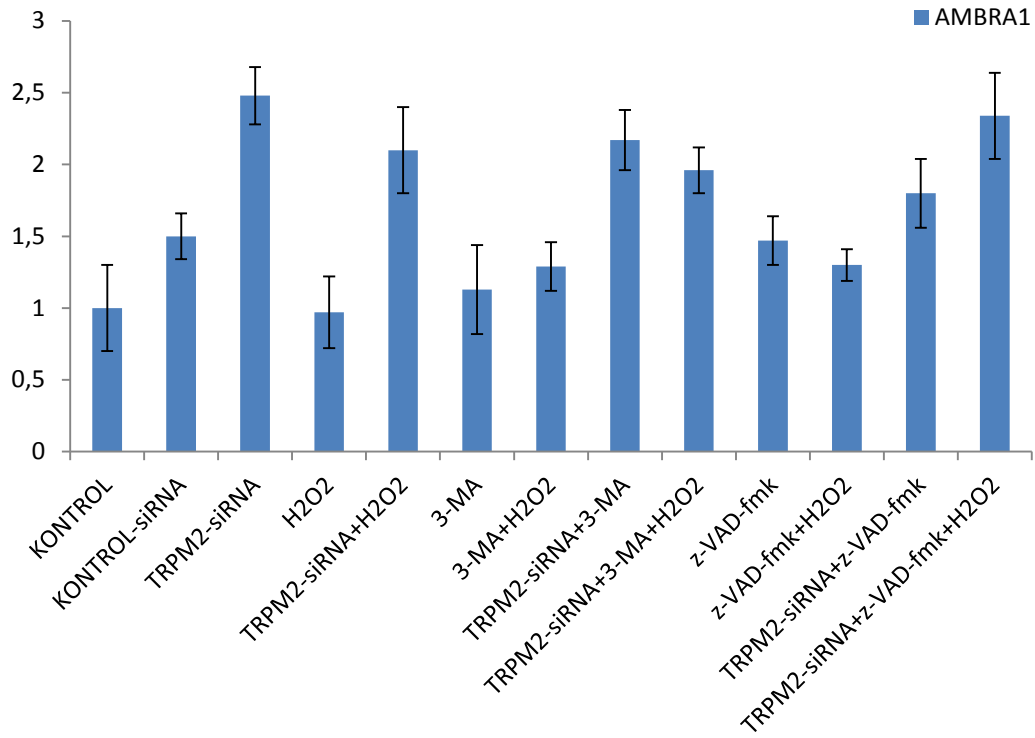
Şekil 22. Oluşturulan Gruplarda PIK3C3 Geninin RT-PZR Kat Artışı Grafiği

Kontrol grubuna kıyasla PIK3C3 gen ekspresyonundaki artışın yalnızca z-VAD-fmk+H₂O₂ ve z-VAD-fmk gruplarında istatistikî olarak anlamlı düzeyde olduğu belirlendi (Şekil 22).



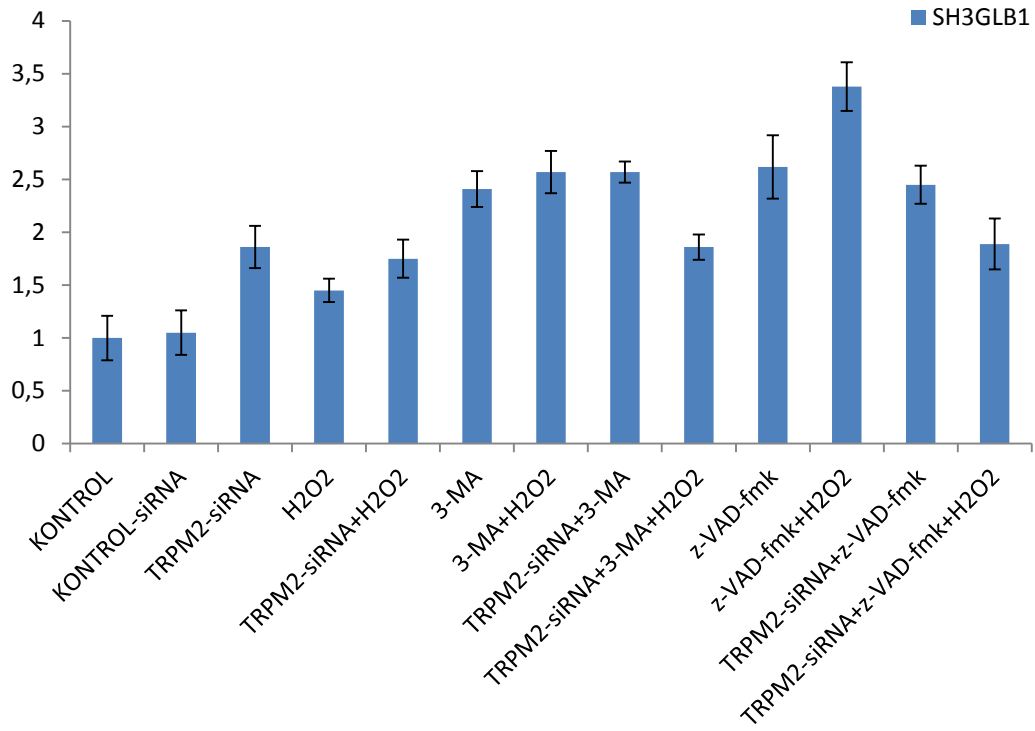
Şekil 23. Oluşturulan Gruplarda PIK3R4 Geninin RT-PZR Kat Artışı Grafiği

PIK3R4'ün kontrol grubuna kıyasla sadece z-VAD-fmk+H₂O₂ ve z-VAD-fmk gruplarındaki gen ekspresyonu artışının istatistikî olarak anlamlı düzeyde olduğu belirlendi (Şekil 23).



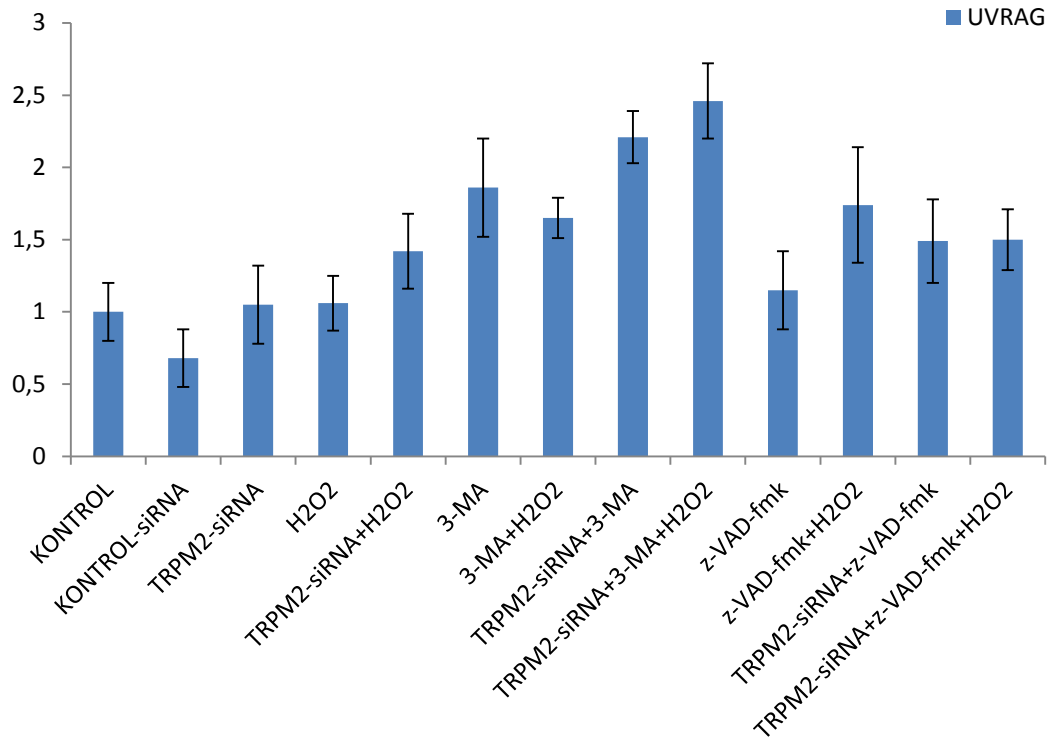
Şekil 24. Oluşturulan Gruplarda AMBRA1 Geninin RT-PZR Kat Artışı Grafiği

AMBRA1'in gen ekspresyonundaki artışın kontrol grubuna kıyasla TRPM2-siRNA, TRPM2-siRNA+H₂O₂, TRPM2-siRNA+3-MA+H₂O₂, TRPM2-siRNA+z-VAD-fmk+H₂O₂ ve TRPM2-siRNA+3-MA gruplarında istatistikî olarak anlamlı düzeyde olduğu belirlendi (Şekil 24).



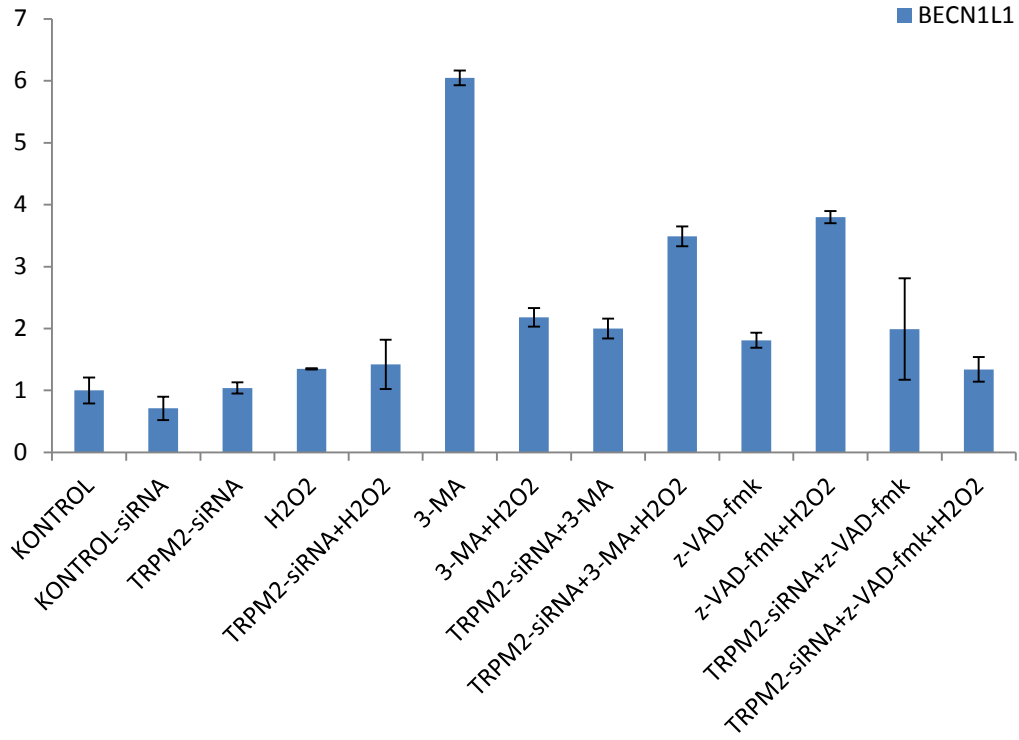
Şekil 25. Oluşturulan Gruplarda SH3GLB1 Geninin RT-PZR Kat Artışı Grafiği

Kontrol grubuna göre SH3GLB1 gen ekspresyonu artışının istatistikî olarak anlamlı düzeyde olduğu gruplar; 3-MA+H₂O₂, z-VAD-fmk+H₂O₂, TRPM2-siRNA+3-MA, 3-MA, z-VAD-fmk ve TRPM2-siRNA+z-VAD-fmk olarak belirlendi (Şekil 25).



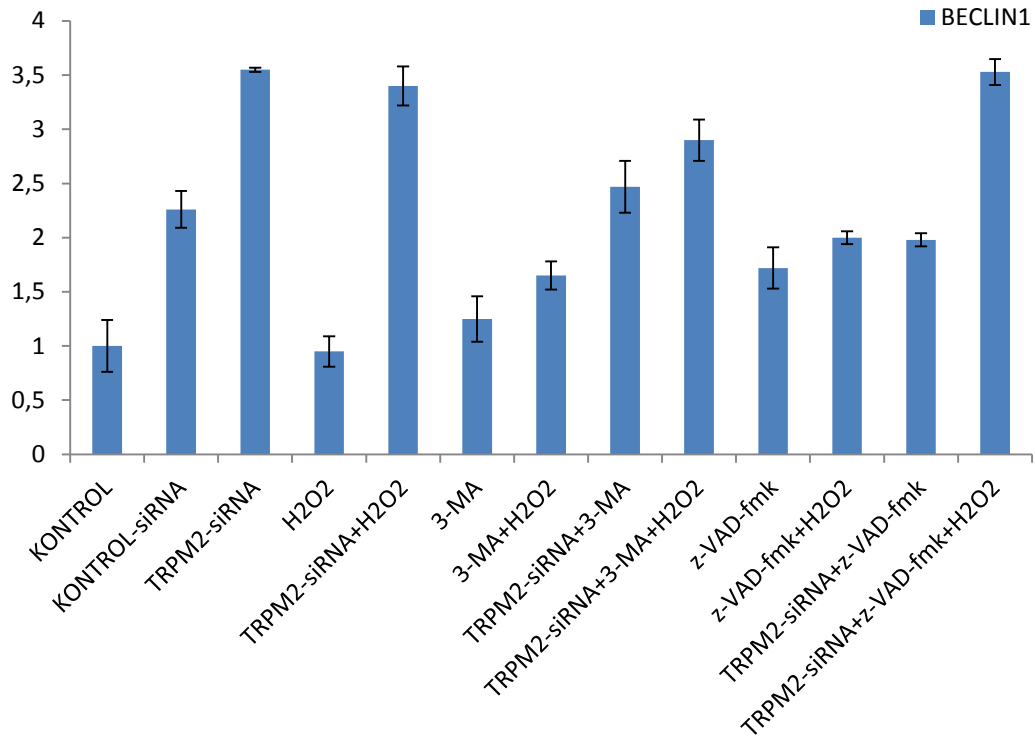
Şekil 26. Oluşturulan Gruplarda UVRAG Geninin RT-PZR Kat Artışı Grafiği

UVRAG gen ekspresyonunun kontrol grubuna kıyasla yalnızca TRPM2-siRNA+3-MA+H₂O₂ ve TRPM2-siRNA+3-MA gruplarında istatistikî olarak anlamlı düzeyde arttığı tespit edildi (Şekil 26).



Şekil 27. Oluşturulan Gruplarda BECN1L1 Geninin RT-PZR Kat Artışı Grafiği

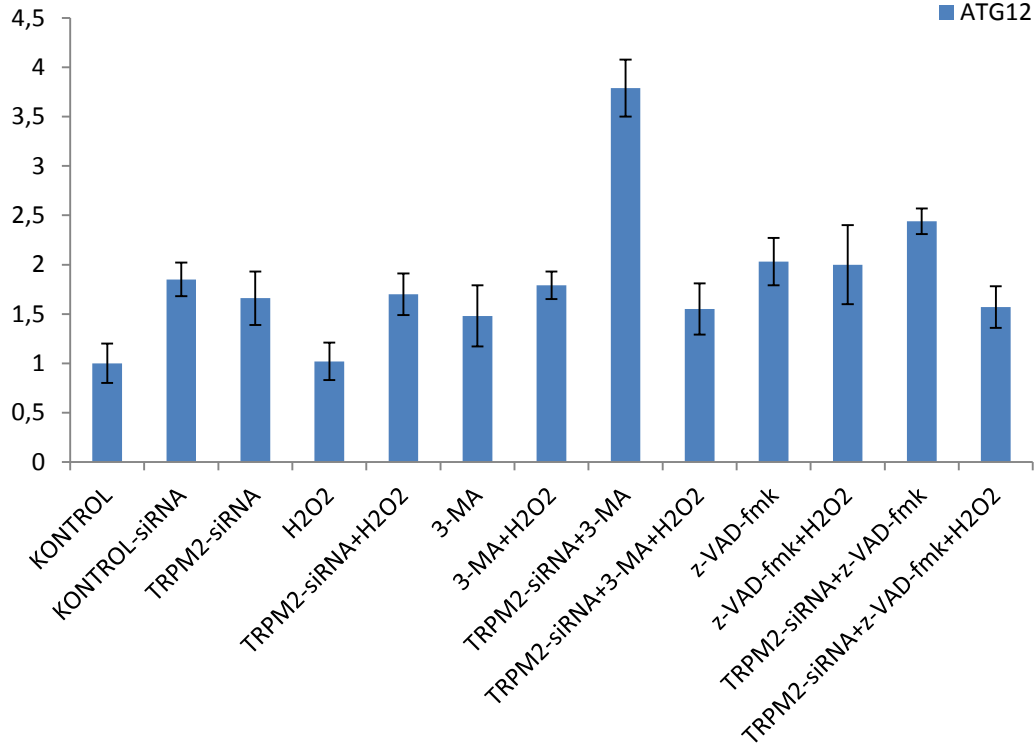
BECN1L1'in gen ekspresyonunda kontrol grubuna kıyasla TRPM2-siRNA+3-MA+H₂O₂, 3-MA+H₂O₂, z-VAD-fmk+H₂O₂, TRPM2-siRNA+3-MA, 3-MA ve TRPM2-siRNA+z-VAD-fmk gruplarında istatistikî olarak anlamlı düzeyde bir artış belirlendi (Şekil 27).



Şekil 28. Oluşturulan Gruplarda BECLIN1 Geninin RT-PZR Kat Artışı Grafiği

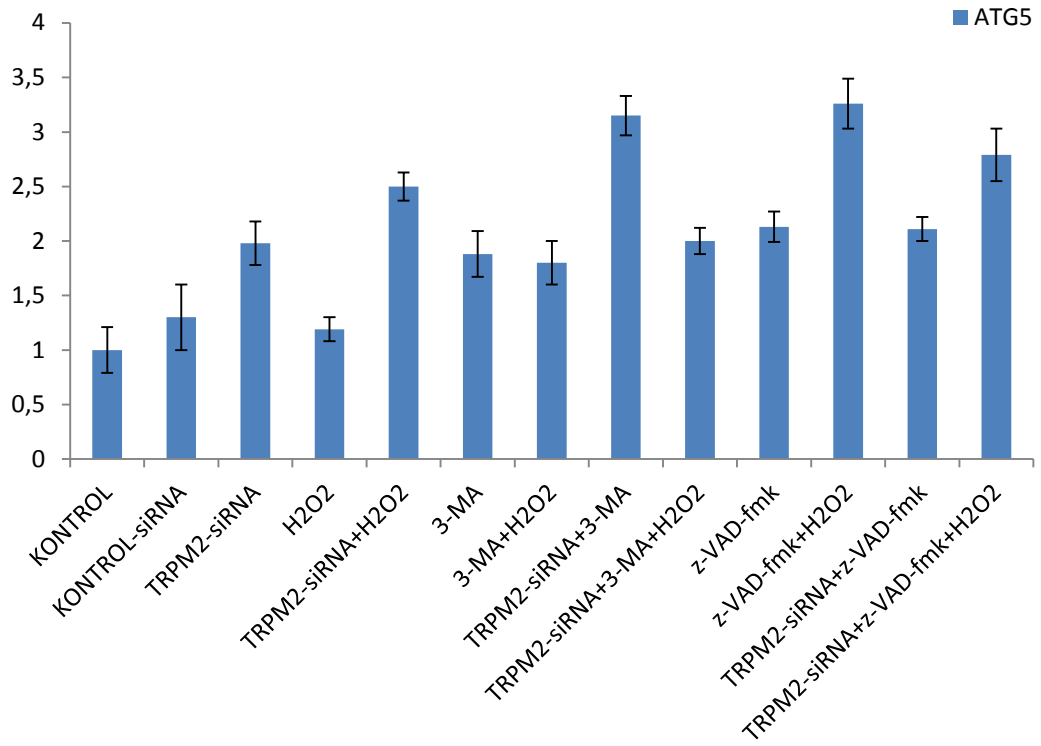
BECLIN1'in gen ekspresyonundaki artış kontrol grubuna kıyasla Kontrol-siRNA, z-VAD-fmk+H₂O₂ ve tüm TRPM2-siRNA uygulanan gruplarda istatistikî açıdan anlamlı olarak belirlendi (Şekil 28).

5.3.3. Otofajik Yolağın Uzama Aşamasında Yer Alan Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeyleri



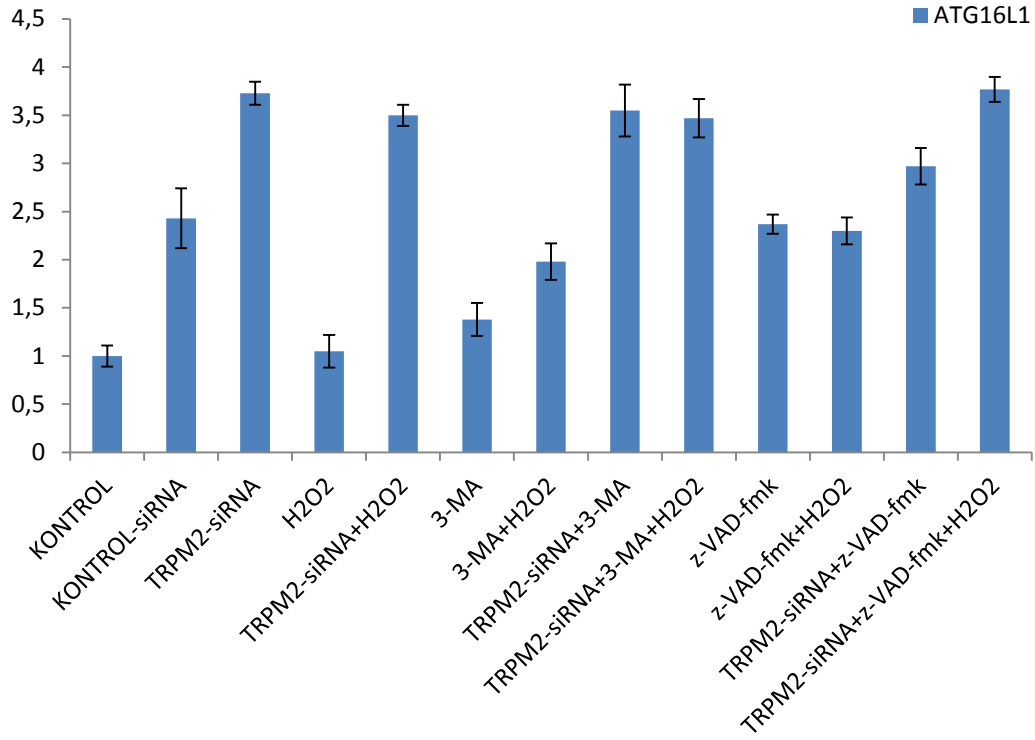
Şekil 29. Oluşturulan Gruplarda ATG12 Geninin RT-PZR Kat Artışı Grafiği

ATG12'nin gen ekspresyonundaki artışın kontrol grubuna kıyasla z-VAD-fmk+H₂O₂, TRPM2-siRNA+3-MA, z-VAD-fmk ve TRPM2-siRNA+z-VAD-fmk gruplarında istatistikî olarak anlamlı düzeyde olduğu belirlendi (Şekil 29).



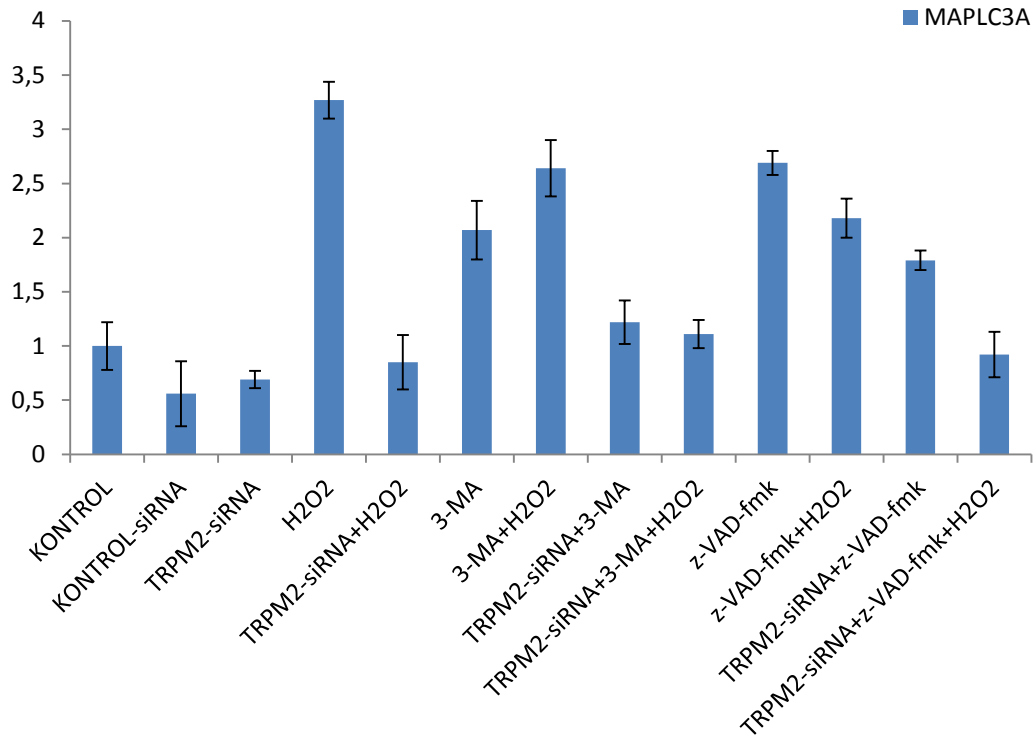
Şekil 30. Oluşturulan Gruplarda ATG5 Geninin RT-PZR Kat Artışı Grafiği

ATG5'in gen ekspresyonundaki artışın kontrol grubuna göre TRPM2-siRNA, TRPM2-siRNA+H₂O₂, TRPM2-siRNA+3-MA+H₂O₂, z-VAD-fmk+H₂O₂, TRPM2-siRNA+z-VAD-fmk+H₂O₂, TRPM2-siRNA+3-MA, z-VAD-fmk ve TRPM2-siRNA+z-VAD-fmk gruplarında istatistikî olarak anlamlı düzeyde olduğu belirlendi (Şekil 30).



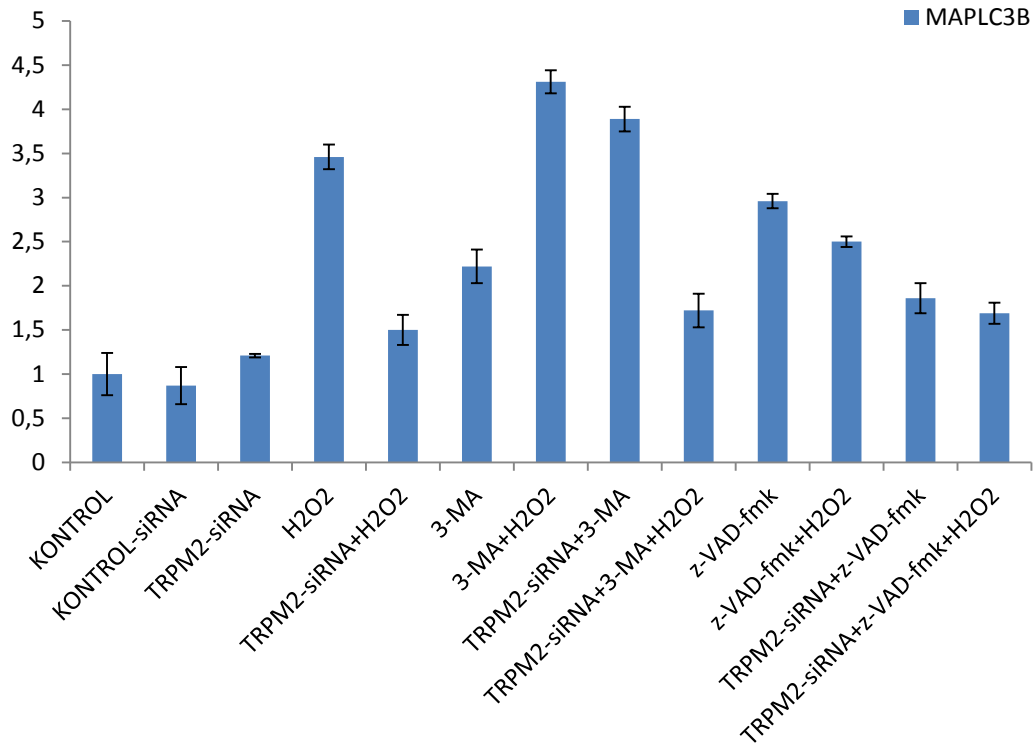
Şekil 31. Oluşturulan Gruplarda ATG16L1 Geninin RT-PZR Kat Artışı Grafiği

ATG16L1'in kontrol grubuna kıyasla Kontrol-siRNA, z-VAD-fmk+H₂O₂, 3-MA+H₂O₂, z-VAD-fmk ve tüm TRPM2-siRNA uygulanan gruplarda istatistikî olarak anlamlı düzeyde arttığı tespit edildi (Şekil 31).



Şekil 32. Oluşturulan Gruplarda MAPLC3A Geninin RT-PZR Kat Artışı Grafiği

MAPLC3A'nın kontrole kıyasla H_2O_2 , 3-MA+ H_2O_2 , z-VAD-fmk+ H_2O_2 , 3-MA ve z-VAD-fmk gruplarındaki gen ekspresyon artışının istatistikî olarak anlamlı düzeyde olduğu tespit edildi (Şekil 32).

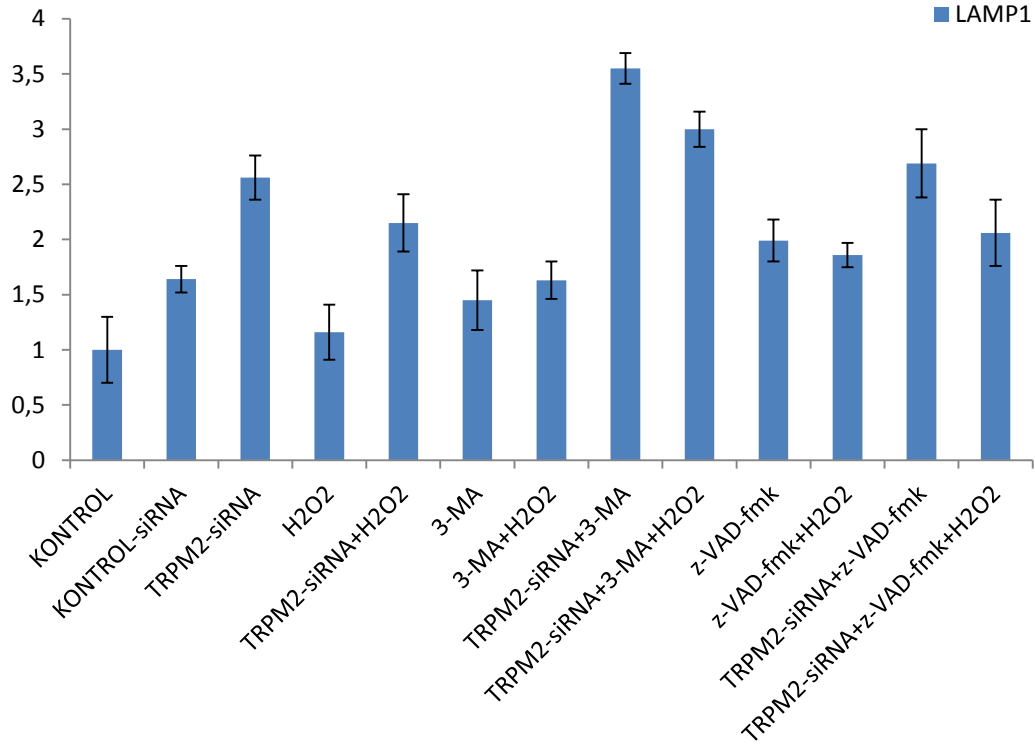


Şekil 33. Oluşturulan Gruplarda MAPLC3B Geninin RT-PZR Kat Artışı Grafiği

MAPLC3B gen ekspresyon artışının kontrole kıyasla H_2O_2 , 3-MA+ H_2O_2 , z-VAD-fmk+ H_2O_2 , TRPM2-siRNA+3-MA, 3-MA ve z-VAD-fmk gruplarında istatistikî olarak anlamlı düzeyde olduğu tespit edildi (Şekil 33).

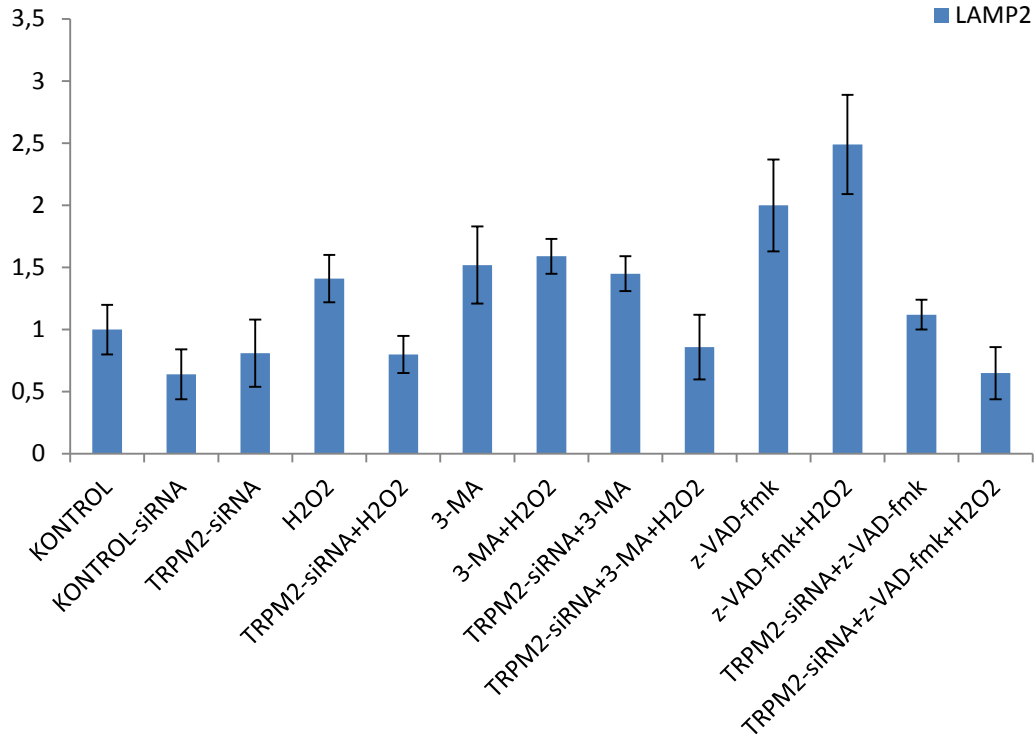
5.3.4. Otofagozomun Tamamlanması ve Lizozom ile Birleşmesi

Aşamasında Yer Alan Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeyleri



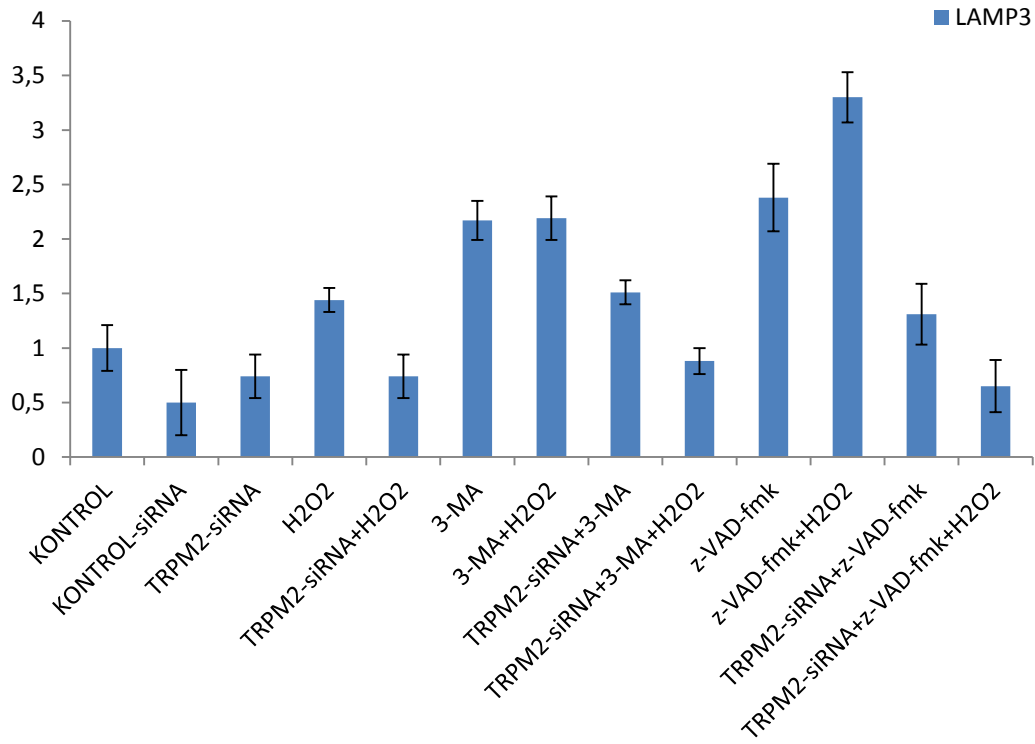
Şekil 34. Oluşturulan Gruplarda LAMP1 Geninin RT-PZR Kat Artışı Grafiği

LAMP1'in kontrole kıyasla TRPM2-siRNA, TRPM2-siRNA+H₂O₂, TRPM2-siRNA+3-MA+H₂O₂, TRPM2-siRNA+z-VAD-fmk+H₂O₂, TRPM2-siRNA+3-MA, z-VAD-fmk ve TRPM2-siRNA+z-VAD-fmk gruplarındaki gen ekspresyon artışının istatistikî olarak anlamlı düzeyde olduğu tespit edilmiştir (Şekil 34).



Şekil 35. Oluşturulan Gruplarda LAMP2 Geninin RT-PZR Kat Artışı Grafiği

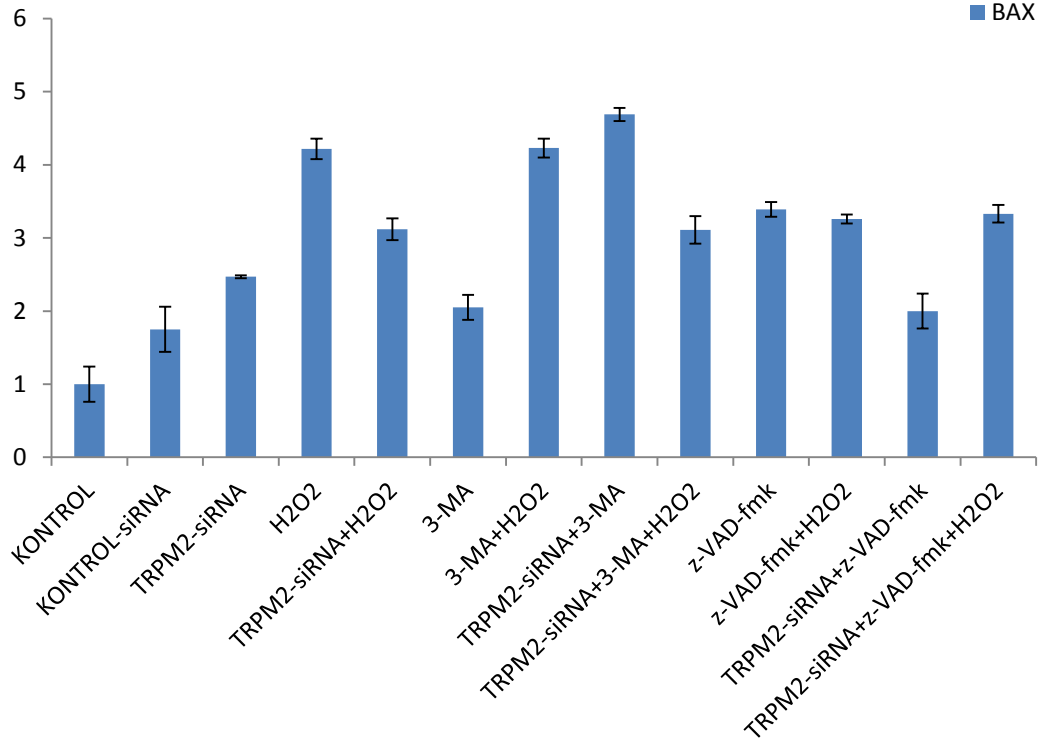
LAMP2 gen ekspresyon artışının kontrol grubuna göre yalnızca z-VAD-fmk ve z-VAD-fmk+H₂O₂ gruplarında istatistikî olarak anlamlı düzeyde olduğu tespit edilmiştir (Şekil 34).



Şekil 36. Oluşturulan Gruplarda LAMP3 Geninin RT-PZR Kat Artışı Grafiği

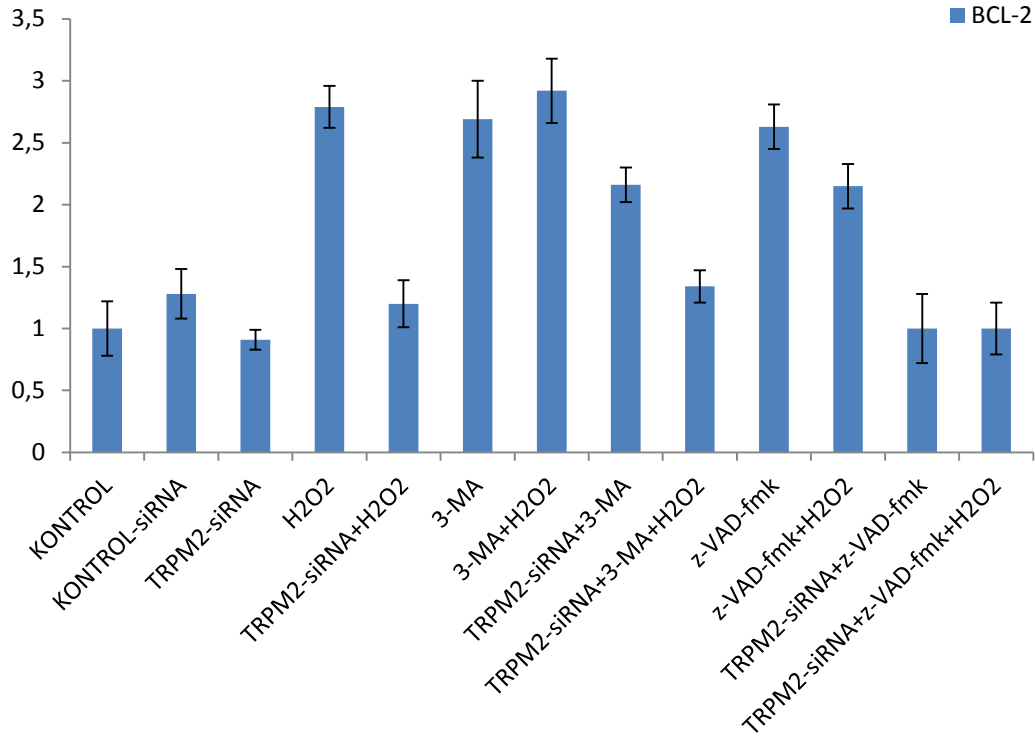
LAMP3'ün kontrole kıyasla 3-MA, 3-MA+H₂O₂, z-VAD-fmk ve z-VAD-fmk+H₂O₂ gruplarındaki gen ekspresyon artışının istatistikî olarak anlamlı düzeyde olduğu tespit edilmiştir (Şekil 36).

5.3.5. Apoptoz ile İlişkili Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeyleri



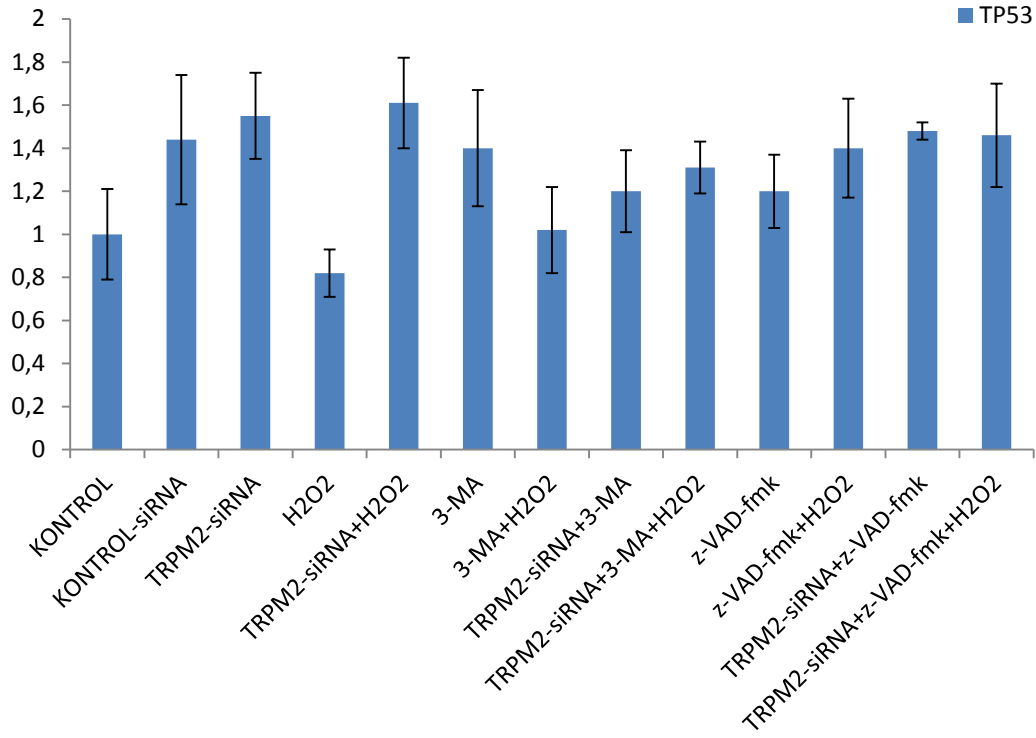
Şekil 37. Oluşturulan Gruplarda BAX Geninin RT-PZR Kat Artışı Grafiği

BAX gen ekspresyonunun kontrol grubuna kıyasla Kontrol-siRNA grubu dışındaki tüm gruplarda istatistikî olarak anlamlı düzeyde arttığı belirlendi (Şekil 37).



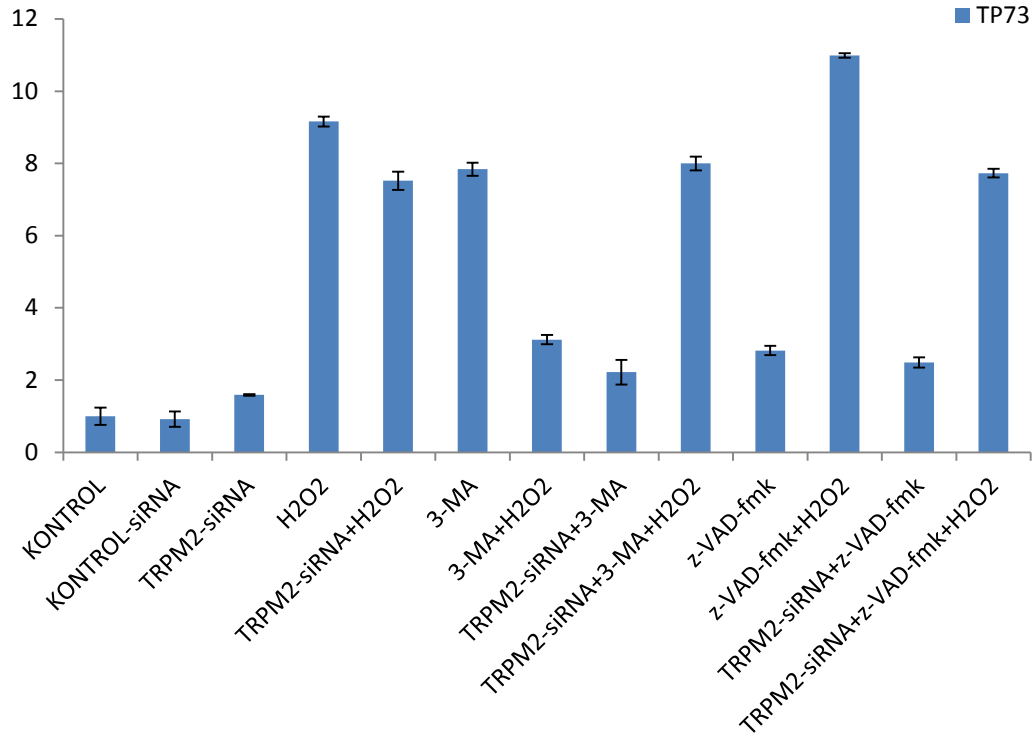
Şekil 38. Oluşturulan Gruplarda BCL-2 Geninin RT-PZR Kat Artışı Grafiği

BCL-2'nin kontrol grubuna kıyasla H_2O_2 , 3-MA+ H_2O_2 , z-VAD-fmk+ H_2O_2 , TRPM2-siRNA+3-MA, 3-MA ve z-VAD-fmk gruplarında gen ekspresyonunun istatistikî olarak anlamlı düzeyde arttığı belirlendi (Şekil 38).



Şekil 39. Oluşturulan Gruplarda TP53 Geninin RT-PZR Kat Artışı Grafiği

TP53'ün gen ekspresyonunda meydana gelen değişikliklerin kontrol grubuna kıyasla hiçbir grupta istatistikî açıdan önemli olmadığı tespit edildi (Şekil 39).



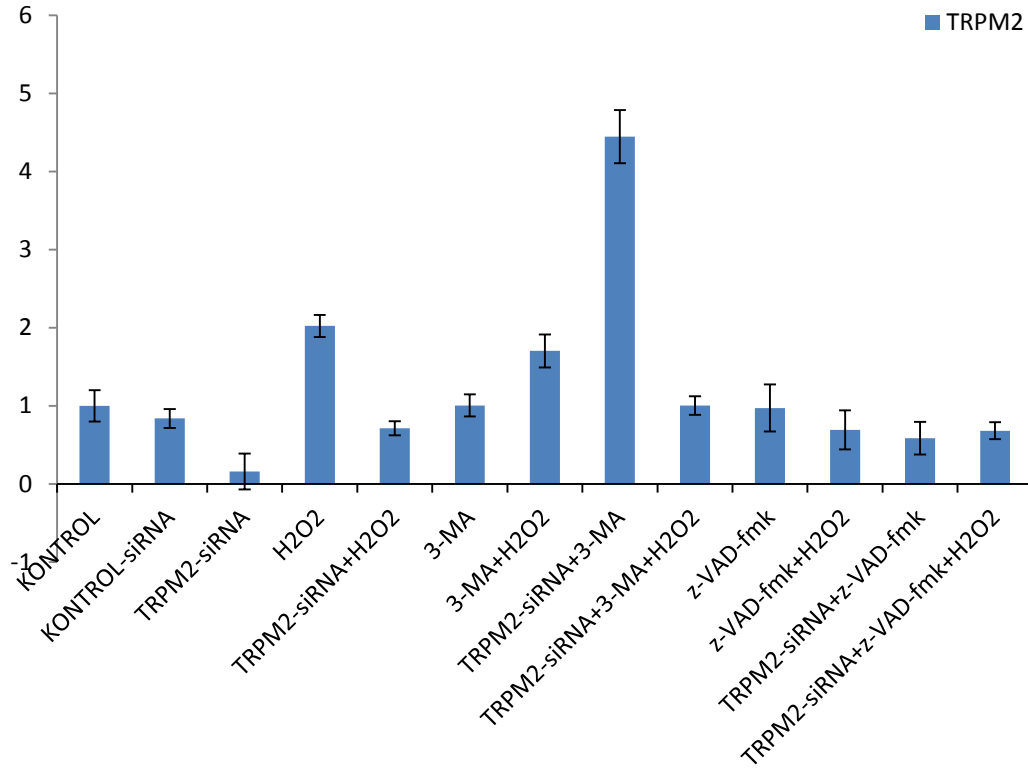
Şekil 40. Oluşturulan Gruplarda TP73 Geninin RT-PZR Kat Artışı Grafiği

TP73'ün kontrol grubuna kıyasla gen ekspresyonunda meydana gelen artışların Kontrol-siRNA ve TRPM2-siRNA dışındaki tüm gruplarda istatistikî açıdan anlamlı düzeyde olduğu belirlendi (Şekil 40).

5.3.6. TRPM2 mRNA Ekspresyon Düzeyleri

5.3.6.1. Tüm Grupların TRPM2 mRNA Ekspresyon Düzeyleri

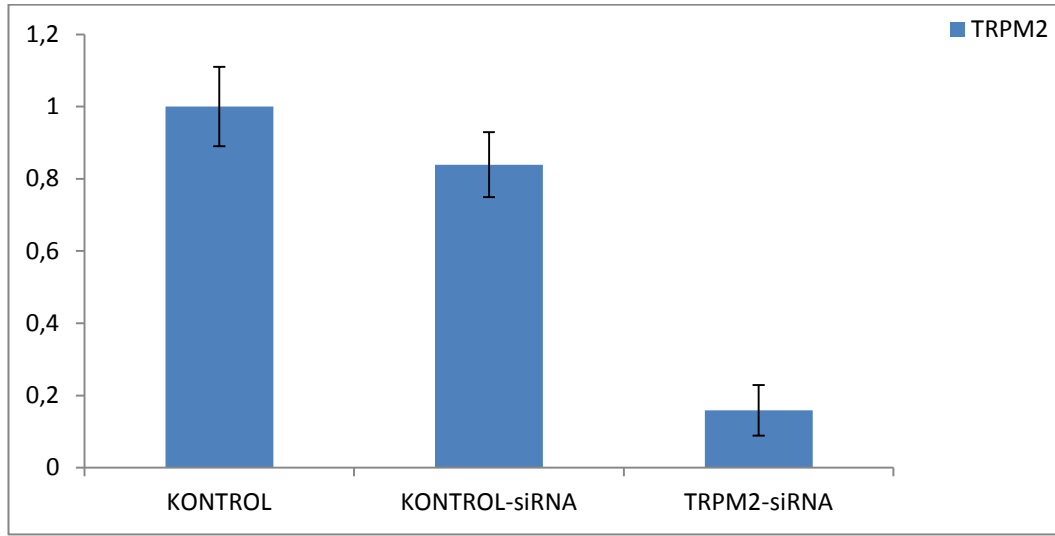
Kantitatif Real Time PCR Analizi bulgularına göre, TRPM2 gen ekspresyon düzeyinin siRNA grubunda önemli miktarda azaldığı buna karşın H₂O₂ grubunda önemli derecede arttığı belirlendi (Şekil 41).



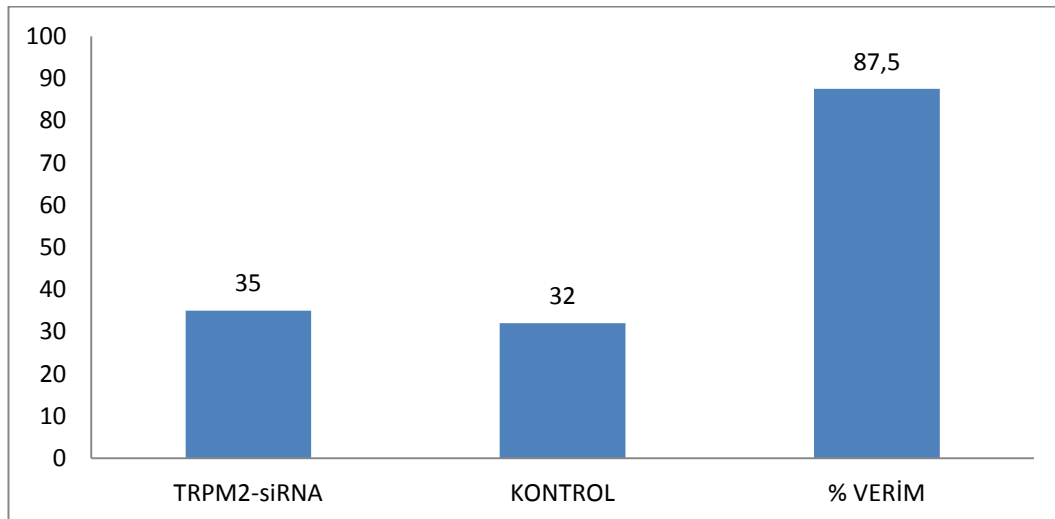
Şekil 41. Oluşturulan Gruplarda TRPM2 Geninin RT-PZR Kat Artışı Grafiği

5.3.6.2. siRNA Verimlilik Oranı

Kantitatif Real Time PCR Analizi bulgularına göre, TRPM2 gen ekspresyon düzeyinin siRNA uygulanan grupta kontrol grubuna kıyasla önemli derecede azaldığı tespit edildi. Elde edilen bu bulgular siRNA'nın susturma yüzdesinin hesaplanmasında kullanıldı ve %87,5 susturma yüzdesi elde edildi (Şekil 42, 43).



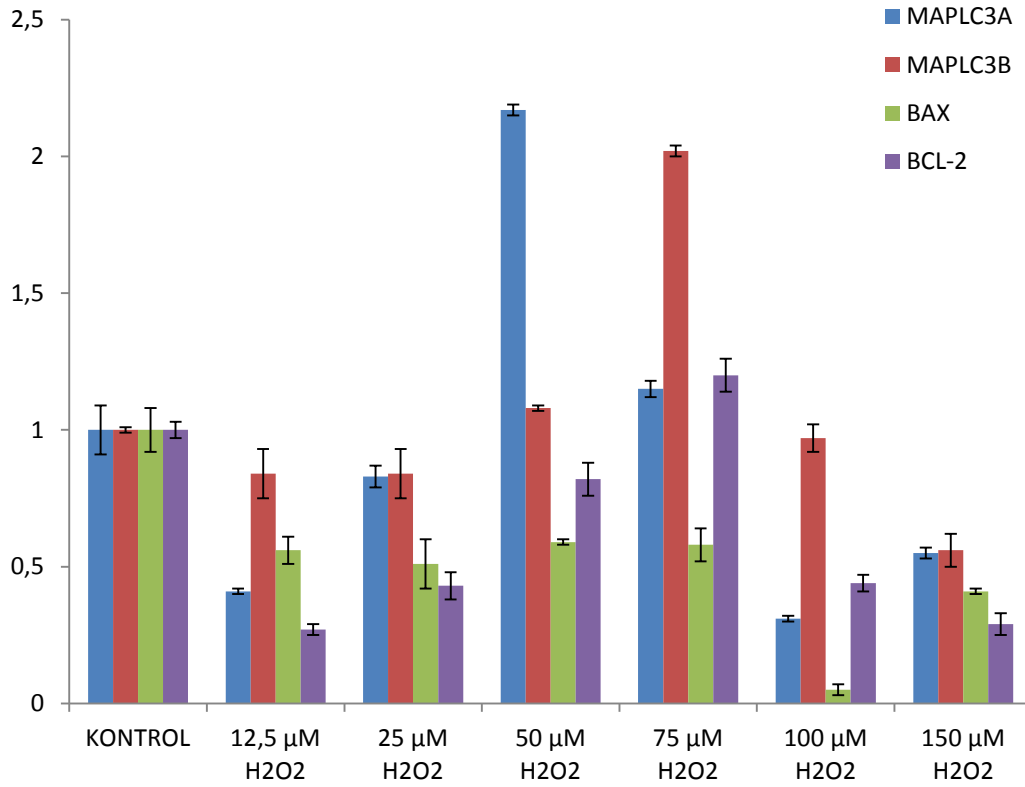
Şekil 42. TRPM2-siRNA Uygulaması Sonucu TRPM2 mRNA Kat Artış Grafiği



Şekil 43. TRPM2-siRNA Uygulamasının Verimlilik Yüzdesi Grafiği

5.3.7. Farklı H₂O₂ Konsantrasyonlarının Otofajik Gen Ekspresyon Düzeyleri

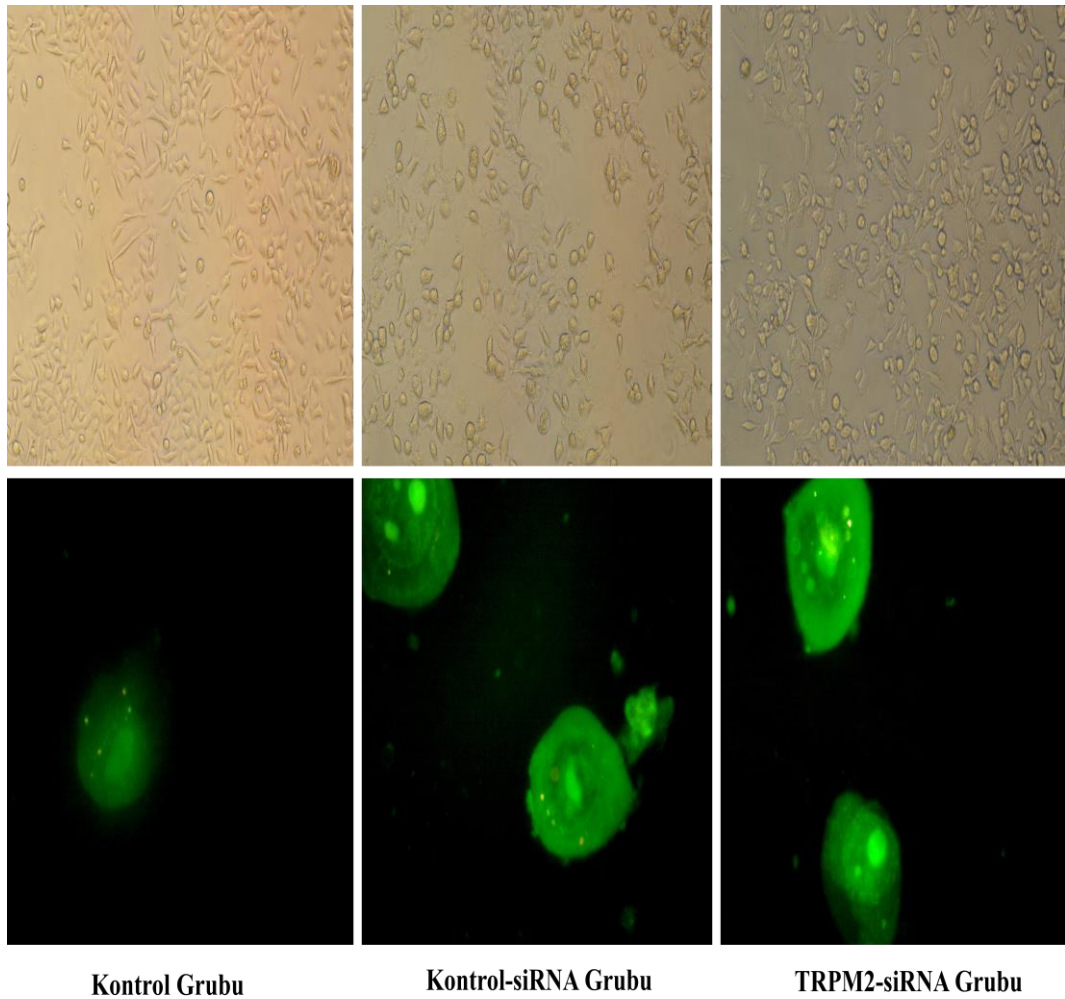
Doza bağlı H₂O₂ uygulamalarının otofaji ve apoptoz belirteçleri olan genlerin ekspresyonları üzerine olan etkilerini belirlemek için yapılan RT-PZR analizi sonucunda, 75 µM'lık H₂O₂ uygulamasının otofajinin en önemli belirteçlerinden biri olan MAPLC3B gen ekspresyonunda önemli derecede bir artış sağladığı belirlendi (Şekil 44).



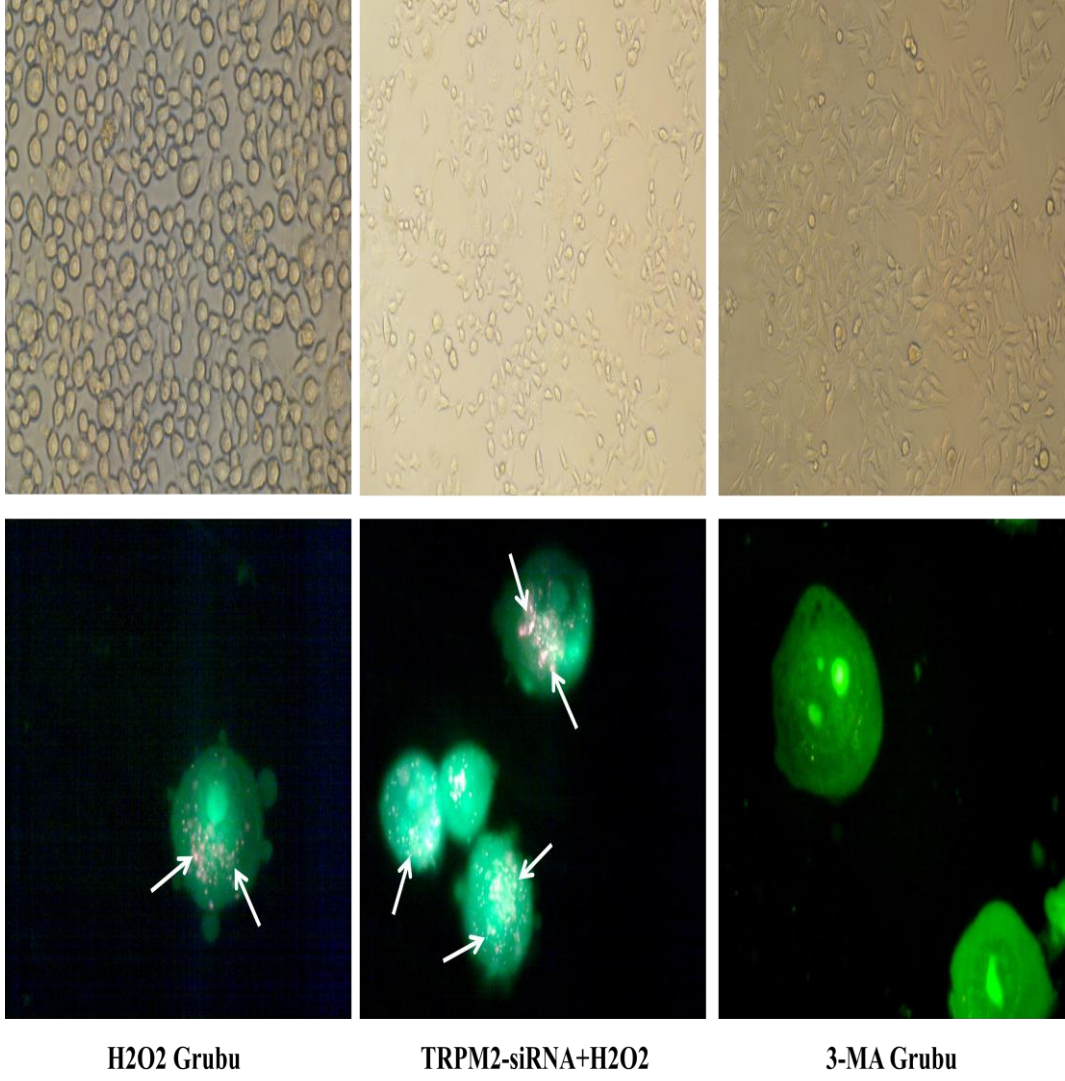
Şekil 44. Doza Bağlı H₂O₂ Uygulamasının Bazı Otofajik ve Apoptotik Gen Ekspresyonları Üzerine Etkisi

5.4. AO-EB Boyaması Verilerinin Değerlendirilmesi

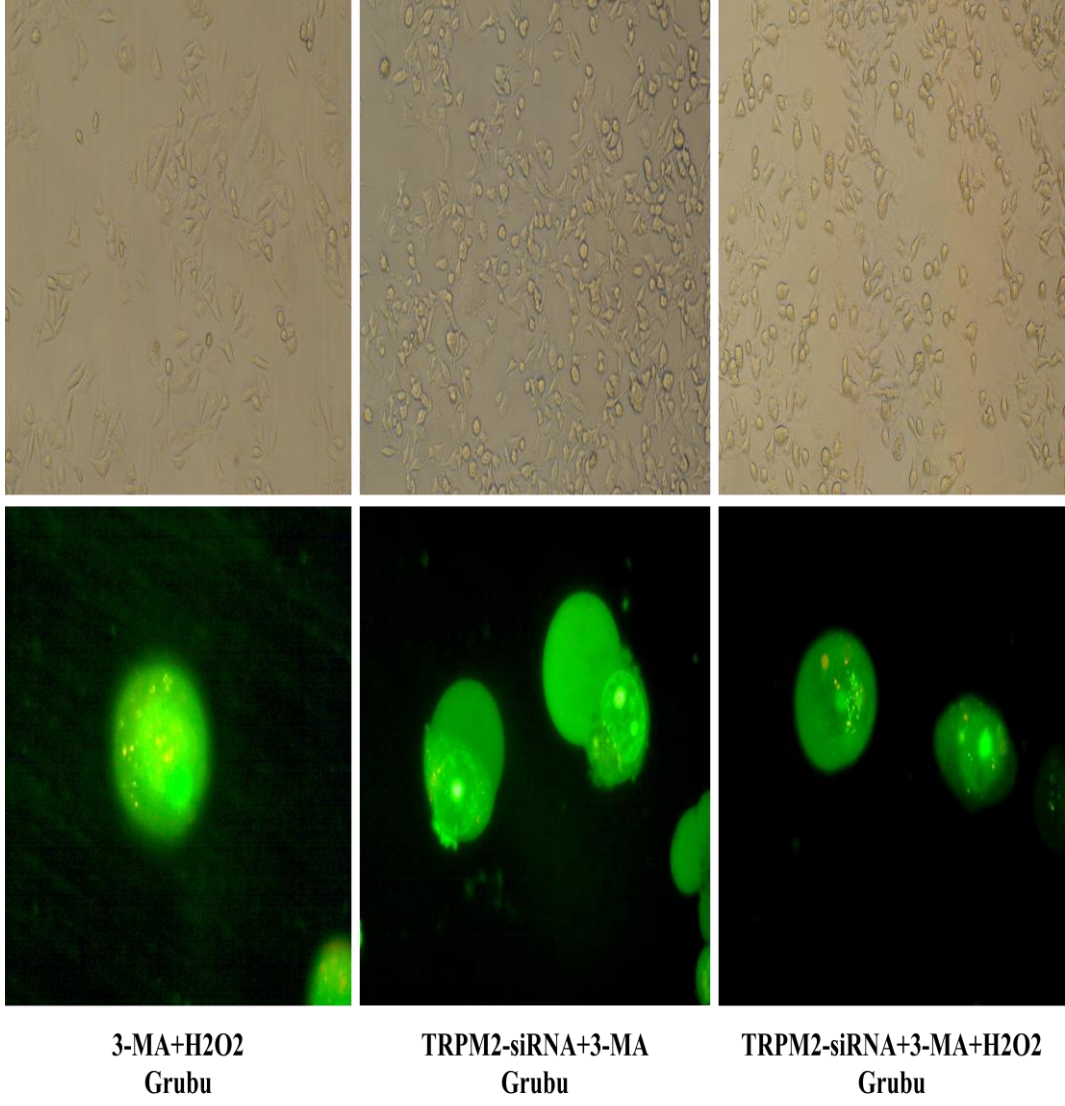
Oluşturulan tüm grupların AO-EB boyaması yapılmadan önce inverted mikroskop (100 kat büyütme) ve AO-EB boyaması yapıldıktan sonra floresan mikroskop (400 kat büyütme) görüntülerinin değerlendirilmesi sonucunda H_2O_2 uygulaması yapılan tüm gruplarda otofajinin arttığı gözlemlendi. Şekiller üzerinde yer alan ok işaretleri otofajinin olduğu bölgeleri göstermektedir (Şekil 45, 46, 47, 48).



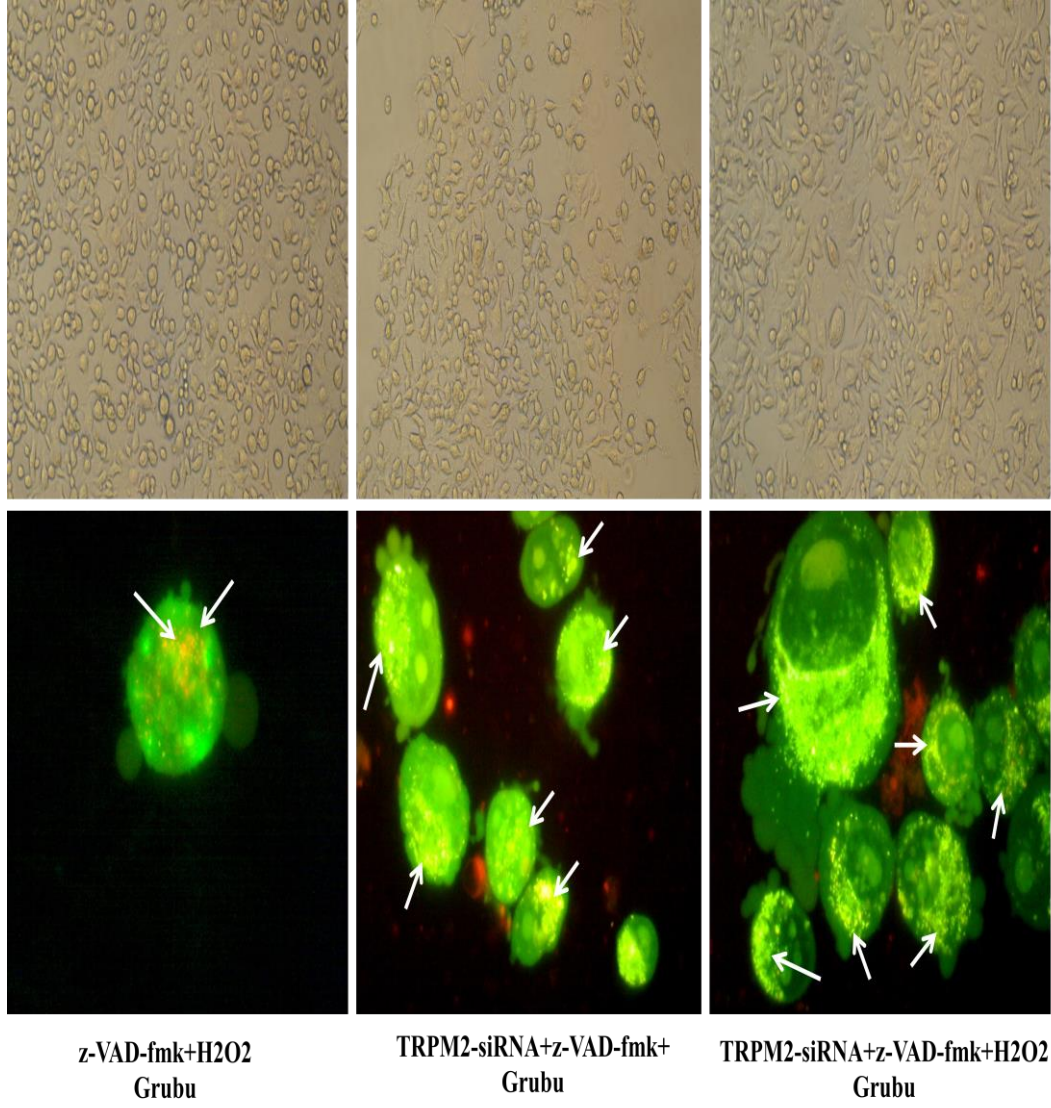
Şekil 45. Kontrol, Kontrol-siRNA ve TRPM2-siRNA Uygulanan PC-3 Hücrelerinin AO-EB Boyaması Öncesi İnverted Mikroskop ve AO-EB Boyaması Sonrası Floresan Mikroskop Görünümleri



Şekil 46. H_2O_2 , TRPM2-siRNA+ H_2O_2 ve 3-MA Uygulanan PC-3 Hücrelerinin AO-EB Boyaması Öncesi İnverted Mikroskop ve AO-EB Boyaması Sonrası Floresan Mikroskop Görünümleri



Şekil 47. 3-MA+H₂O₂, TRPM2-siRNA+3-MA ve TRPM2-siRNA+3-MA+H₂O₂ Uygulanan PC-3 Hücrelerinin AO-EB Boyaması Öncesi İnverted Mikroskop ve AO-EB Boyaması Sonrası Floresan Mikroskop Görünümleri



Şekil 48. z-VAD-fmk+H₂O₂, z-VAD-fmk+TRPM2-siRNA ve z-VAD-fmk+H₂O₂+TRPM2-siRNA Uygulanan PC-3 Hücrelerinin AO-EB Boyaması Öncesi İnverted Mikroskop ve AO-EB Boyaması Sonrası Floresan Mikroskop Görünümleri

6. TARTIŞMA

Dünyada erkek bireylerin sağlığını tehdit eden başlıca hastalıklardan biri olmasına rağmen metastatik Pk için tedavi seçenekleri oldukça sınırlıdır. Bu sebeple hastalığın gelişimi ve ilerlemesinin altında yatan moleküler mekanizmaların iyi bir şekilde anlaşılması elzemdir (179). Son çalışmalarda elde edilen bulgular TRP iyon kanal süper ailesinin prostat karsinogenezi sırasında kalsiyum homeostazının düzenlenmesinde önemli bir rolü olduğunu ortaya koymaktadır (11). X Zeng ve ark 2010 yılında gerçekleştirdikleri çalışmada; Pk hücre hatlarında (DU-145, LNCap ve PC-3) TRPM2 mRNA ekspresyonunu değerlendirmek amacıyla RT-PZR analizi uygulamışlar ve değerlendirilen tüm hücre hatlarında net bir TRPM2 PZR ürün bandı elde ettiklerini bildirmişlerdir (30). Sikka C ve ark 2005 yılında çeşitli prostat ve Pk hücre hatları kullanarak yaptıkları çalışmada, tüm Pk hücre hatlarında TRPM2 transkriptlerinin normal prostat epiteli ya da BPH hücrelerine kıyasla 4-10 kat arasında olacak şekilde aşırı derecede eksprese olduğunu göstermişlerdir. Yaptıkları çalışmada TRPM2'nin normal ya da benign epitelyal hücrelere kıyasla Pk hücrelerinde seçici olarak eksprese olduğu ilk kez ortaya konmuştur. Böylece TRPM2 kanalının Pk başlangıcı ve ilerlemesinde kilit bir rol oynayabileceği öngörülmüştür (180). Yaptığımız çalışma sonucunda elde ettiğimiz veriler, PC-3 hücre hattı üzerinde TRPM2 transkriptlerinin varlığını desteklemektedir. TRPM2 kanalının Pk ilerlemesinde ve hücre ölümündeki rolü bilinmemektedir. Sonuç olarak bu hücre hattının kanser ilerlemesinin altında yatan TRPM2 mekanizmasının çalışılması için uygun bir model olacağı düşünülmüştür.

Kanser hücreleri artan metabolik stres ve çoğalma kapasitesi nedeniyle normal hücrelerden daha yüksek düzeylerde ROT üretirler (181). ROT'nin kanser başlangıcı ve ilerlemesinde, DNA hasarında, genetik istikrarsızlıkta, hücre hasarda, ilaç duyarlılığına değişimde ve hücre ölümünde yer aldığı bilinmektedir. Kanser hücreleri ROT'ni tolere edilebilir seviyelerde tutmak için manganaz-superoksit dismutaz (SOD), katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzimlerle ROT'ni elimine ettikleri bir antioksidan sisteme sahiptir (182). Böylece kanser hücreleri yüksek endojen ROT düzeylerinden dolayı oksidatif strese karşı daha hassas olabilir ve hücre ölümünü tetiklemek için seçici bir mekanizma sunabilir (183). Qian WANG 2014 yılında PC-3 hücre hatları üzerinde yaptığı çalışmada; H₂O₂ uygulamasının hücre ölümünü artırdığını ve TRPM2 inhibisyonunun H₂O₂ tarafından uyarılan hücre ölümünü önemli derecede azalttığını tespit etmiştir (184). Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular; H₂O₂ uygulamasının hücre canlılığını önemli derecede azalttığını, apoptotik yolların baskılanıp H₂O₂ uygulaması yapıldığında (z-VAD-fmk+H₂O₂ Grubu) meydana gelen hücre ölüm oranının (% 64) otofajik yolların baskılanarak H₂O₂ uygulaması yapılması (3-MA+H₂O₂ Grubu) sonucunda oluşan hücre ölümünden (% 48) daha fazla olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar, H₂O₂'in hem apoptotik hem de otofajik hücre ölümünü indüklediğini ortaya koyabilir.

TRPM2 inhibisyonunun hücreleri oksidatif stres indüklü hücre ölümünden koruduğu yaygın olarak kabul edilmektedir (185). PC-3 hücreleri gibi insan prostat kanseri hücreleri oksidatif strese karşı duyarlıdır ve TRPM2 bu hücrelerde eksprese olmaktadır (30). TRPM2, oksidatif stres ile aktive olan ve hücre ölümüne yatkınlığı sağlayan Ca⁺²'na geçirgen bir kanaldır (186). Oksidatif stres

sırasında sitozolde oluşturulan H_2O_2 , nükleus ve mitokondride ADP-riboz oluşumunu uyararak TRPM2 kanallarının açılmasını sağlamaktadır (187). Böylece TRPM2 kanalları oksidatif stres tarafından uyarılan Ca^{+2} girişi sinyalizasyonuna ve dolayısıyla Ca^{+2} bağımlı hücresel işlevlere katılabilir (158). Birçok araştırmacı tarafından nükleus ve mitokondrilerde ADP-riboz oluşumunun uyarılmasında H_2O_2 'in dolaylı bir etkinliği olduğunun gösterilmesine rağmen miyeloid hücreler için TRPM2 üzerine H_2O_2 'in doğrudan agonist bir etkisinin olduğu öngörülmektedir (32). Cladue M. Hecquet ve ark 2008 yılında yaptıkları çalışmada; endotelial hücrelerde, TRPM2'nin eksprese olduğunu göstererek endotelial geçirgenlikteki H_2O_2 indüklü artışa TRPM2'nin Ca^{+2} akışını aktive etmesiyle aracılık ettiğini tespit etmişlerdir (188). TRPM2 aracılı Ca^{+2} akışının sitokin üretimi ve endotelial bariyer fonksiyon bozukluğunun yanı sıra ROT tarafından uyarılan hücre ölümünde de kritik bir öneme sahip olduğu belirtilmiştir. Ancak TRPM2'nin intraselüler Ca^{+2} salınımına aracılık eden bir Ca^{+2} kanal formu olduğuna dair veriler artmaktadır. Pankreatik beta hücrelerinde TRPM2 kanalı Ca^{+2} 'na geçirgen bir hücre yüzeyi kanalı olmasının yanı sıra lizozomal bir Ca^{+2} salım kanalı olarak da faaliyet göstermekte ve her ikisi de ROT tarafından uyarılan hücre ölümüne katkıda bulunmaktadır. Jie Zou ve ark 2013 yılında yaptıkları çalışmada makrofaj hücrelerinde H_2O_2 'in biyolojik olarak uygun konsantrasyonlarına erken yanıt sırasında TRPM2'nin Ca^{+2} sinyalizasyonuna ve hücre ölümüne aracılık etmesindeki desteği ve mekanizmaların araştırılmasını amaçlamışlar ve sonuçta TRPM2 kanalının hücre ölümü üzerindeki rollerini belirlemişlerdir (186). Yaptığımız çalışmada, TRPM2 mRNA ekspresyonunun kontrol grubuna kıyasla, H_2O_2 grubunda (1,023 kat artma) istatistiki olarak

anlamli düzeyde artmiş olduğunun gözlenmesi, TRPM2'nin, H₂O₂ tarafından indüklendiğini ortaya koyabilir. Ayrıca, TRPM2 mRNA ekspresyon düzeyinin, z-VAD-fmk+H₂O₂ grubuna kıyasla 3-MA+H₂O₂ grubunda (1,011 kat artma) istatistiki olarak anlamli düzeyde yüksek olması TRPM2'nin apoptotik yollara pozitif şekilde aracılık ettiğini ancak otofajik yollarda negatif bir düzenleyici olarak işlev görebileceğini düşündürmektedir.

Otofaji ile hücre ölümü arasındaki moleküler bağlantılar hakkında çok az bilgi mevcuttur (189). Philippe Wyrsh ve ark 2012 yılında oksidatif stres sonuçlarının düzenlenmesinde rol alan iki enzim (PARP1 ve PARP2)  zerinde yaptıkları çalışmada oksidatif stresin bu iki enzimin faaliyeti sonucu TRPM2 kanallarını aktive ettiğini göstermişlerdir. Bu Ca⁺² kanalı, plazma membranları ve lizozomlarda faaliyet göstermektedir. Aşırı hücresel Ca⁺² yüklenmesinin sağ kalımdan, otofaji ve hücre ölümüne kadar pek çok sitotoksik stres yanıtlarına neden olduğu iyi bir şekilde ortaya konmuştur (34). Wang Q 2014'te yaptığı çalışmanın sonucunda elde ettiği tüm verilerin, TRPM2 eksprese eden PC-3 hücrelerinde H₂O₂'in apoptozu indüklediğini fakat otofajiyi inhibe ettiğini gösterdiğini belirtmiştir. Ayrıca, TRPM2'nin inhibe edildiği PC-3 hücre hatlarında hücrelerin sağkalım için otofajiyi indüklediğini bildirmiştir. Sonuç olarak; ROT'nin TRPM2 aracılığıyla Ca⁺² akımını tetiklemesinin oksidatif stres altında hücrenin apoptoz ya da otofajiye yönelmesini belirlediğine dair ipucu verebileceğini öngörmüştür (184). Çalışmamızda; TRPM2'nin, H₂O₂ aracılığıyla (H₂O₂ Grubu) hücre canlılığını önemli derecede azalttığı (% 40) ve siRNA aracılığıyla susturulması sonucunda (TRPM2-siRNA+ H₂O₂ Grubu) hücre canlılığını önemli derecede olmasa da arttırdığı tespit edilmiştir. Elde edilen bu

veriler, TRPM2'nin, H₂O₂ aracılı hücre ölümünde yer aldığını gösterebilir. Ayrıca, TRPM2-siRNA+3-MA grubu ile TRPM2-siRNA+z-VAD-fmk grubu arasında hücre canlılığı açısından önemli bir fark gözlenmemesi ve her ikisinde de hücre canlılığının yüksek seviyede olduğunun belirlenmesi, TRPM2'nin susturulması durumunda apoptotik ve otofajik ölümün engellenmiş olabileceğini ifade edebilir.

ULK1 ve homoloğu olan ULK2, otofajinin indüklenmesinde yer alan kilit moleküllerdir. Otofajinin indüklenmesinde ULK'nın rolü tam olarak belirlenememiş olmasına rağmen, ULK1'in otofagozomların öncül formları olan fagoforların oluşumunu düzenlemek için, otofaji indüklenmesinde bir diğer kilit aracı olan PIK3C3 ile etkileşim kurduğu gösterilmiştir (190). W Gao ve ark 2011'de yaptıkları çalışmada, ULK1 ve ULK2'yi, tümör baskılayıcı p53'ün kesin birer transkripsiyonel hedefi olduğunu göstermiştir. DNA hasarına yanıtta p53'ün, ULK1/2 transkripsiyon düzeylerini arttırdığını ve devamlı otofajiyi başlattığını öne süren bu araştırmacılar, böyle bir senaryoda otofaji indüklenmesinin artmış apoptotik olmayan hücre ölümüne yol açtığını belirtmişlerdir. p53'e ek olarak bazı başka transkripsiyon faktörleri de ULK2 ekspresyonunun artmasında önemli olabilir. p53'ün iki homoloğu olan p63 ve p73 bunlara örnek olarak verilebilir. DNA hasarına yanıt sırasında ULK kinazların p63/p73 tarafından da düzenlenebilmesi olası bir durumdur (191). Çalışmamızda, ULK1 mRNA ekspresyon düzeyinin kontrol grubuna kıyasla, TRPM2-siRNA (1,08 kat artma) ve TRPM2-siRNA+H₂O₂ (1,21 kat artma) gruplarında istatistikî olarak anlamlı bir artış gösterdiği ancak H₂O₂ grubunda (0,06 kat artma) kontrole kıyasla anlamlı bir farklılık göstermediği tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, ULK1 ile TRPM2 arasında

mRNA düzeyinde, otofaji ile TRPM2 arasındakine benzer şekilde, ters yönlü bir ilişki olduğunu göstermektedir. Çalışmamızda ayrıca, ULK2 mRNA ekspresyonunda kontrol grubuna göre, TRPM2-siRNA (4,74 kat artma) ve TRPM2-siRNA+H₂O₂ (5,71 kat artma) gruplarında istatistikî olarak anlamlı bir artış saptanırken, H₂O₂ grubunda (0,45 kat artma) ise istatistikî açıdan anlamlı olmayan bir artışın meydana geldiği belirlenmiştir. Bu sonuçlar, ULK2 ile TRPM2 arasında ters orantı olduğunu ortaya koymaktadır.

RB1CC1; hücre gelişimi, bölünmesi, göçü, otofaji ve apoptozu koordineli olarak düzenlemek için birçok sinyal yolağı ile etkileşim halindedir. Meme kanserinde bir tümör baskılayıcı protein olarak da işlev gördüğü belirtilen RB1CC1, otofagozom oluşumunun başlaması için gerekli olan esansiyel bir kinazdır. Otofajide, ULK1'in stabilitesi ve fosforilasyonu için gereklidir (192). Tokuhiko Chano ve ark 2010'da yaptıkları çalışmada, RB1CC1'in muhtemel bir aracı olarak RB1 ve p53 yolakları ile bağlantı kurduğunu, p53 ile bir kompleks oluşturarak RB1 yolağını genel olarak hızlandırdığını göstermişlerdir (193). Eugenia Morselli ve ark 2011 yılında yaptıkları çalışmada, p53'ün RB1CC1 ile doğrudan bağlantı kurmasının otofajik mekanizmayı bloke ettiğini göstermişlerdir (192). Yaptığımız çalışmada, RB1CC1 mRNA ekspresyonu kontrol grubuna kıyasla, TRPM2-siRNA (0,26 kat artma), TRPM2-siRNA+H₂O₂ (0,16 kat artma) ve H₂O₂ (0,53 kat artma) gruplarında istatistikî olarak anlamlı bir farklılık göstermediği saptanmıştır. Bu sonuçlar, RB1CC1 ile TRPM2 arasında bir bağlantı olmadığını düşündürmektedir.

Otofaji düzenlenmesinde, mTOR'a ek olarak PI-3 kinazlar da önemli rollere sahiptir. mTOR'u aktive eden sınıf I PI-3 kinaz otofoji üzerinde negatif bir etkiye sahiptir. Mayalardaki Vps34'ün homoloğu olan Sınıf III PI-3 kinaz, otofagozomların oluşumunda Atg protein komplekslerinin birleşmesi için PI-3-P'yi oluşturur. Otofajik proteinlerin artması hücrelerde otofajik süreçleri aktive eder ya da hızlandırır (194). PIK3C3, fosfoinositid'leri fosforile ederek, veziküler akış için gerekli olan Fosfoinositid-3-Fosfat (PI3P)'ı oluşturur. Memeli hücrelerinde, özellikle hücre hatlarında PIK3C3 çalışılmış ve endositik akışı, fagozom olgunlaşmasını ve otofagozom oluşumunu düzenlediği tespit edilmiştir (195). Çalışmamızda, PIK3C3 ve PIK3R4 mRNA ekspresyonlarının kontrol grubuna kıyasla TRPM2-siRNA (0,07 kat azalma / 0,11 kat azalma) , H₂O₂ (0,23 kat artma / 0,19 kat artma) ve TRPM2-siRNA+H₂O₂ (0,2 kat azalma / 0,09 kat azalma) gruplarında istatistikî olarak anlamlı bir farklılık göstermediği belirlenmiştir. Bu sonuçlar, TRPM2'nin, PIK3C3 ve PIK3R4 ile bir ilişki içerisinde olmayabileceğini ortaya koymaktadır.

BECLIN 1, otofajide merkezi bir role sahiptir. BECLIN 1 etkileşimli bir protein olan AMBRA1, BECLIN 1 bağımlı otofajiyi pozitif bir şekilde düzenlemektedir. AMBRA1'in fare embriyolarındaki fonksiyonel eksikliği, otofajinin azlığı (bozukluğu) ile ilişkili olan nöroepitelyal hiperplaziye ve aşırı apoptotik hücre ölümüne sebebiyet vermiştir. AMBRA1, otofaji başlangıcının düzenlenmesinde hayati öneme sahip bir faktör olarak tanımlanabilir. Bir anti-apoptotik faktör olan BCL-2'nin aşırı ekspresyonu, çoğu apoptoz indükleyicisine karşı koruyucu bir etki başlatır. Flavie Strappazzon ve ark 2011 yılında yaptıkları çalışmada, AMBRA1 ve BCL-2'nin BECLIN 1'e aynı bölge üzerinden

bağlandığını bu yüzden AMBRA1'in BECLIN 1'e bağlanmak için BCL-2 ile yarıştığını göstermişlerdir (196). AMBRA1'in ekspresyonundaki azalma, rapamisinin düzeyi ve besin yokluğu ile indüklenen otofajide önemli düzeyde bir düşüşe yol açarken, AMBRA1'in aşırı ekspresyonu bazal ve rapamisin indüklü otofajiyi artırmaktadır (197). Çalışmamızdaki RT-PZR sonuçlarına göre, AMBRA1 mRNA ekspresyonunun kontrole kıyasla, TRPM2-siRNA (1,48 kat artma) ve TRPM2-siRNA+H₂O₂ (1,1 kat artma) gruplarında istatistikî açıdan anlamlı bir artış gösterdiği ancak H₂O₂ grubunda (0,03 kat azalma) meydana gelen değişimin istatistikî olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, TRPM2 ile AMBRA1 arasında ters orantı olduğunu ortaya koymaktadır.

Son zamanlarda, SH3GLB1'in de otofajik sürece dahil olduğu belirlenmiştir. SH3GLB1'in, besin yetersizliği kaynaklı otofajinin tetiklenmesi için, ATG9 akışını düzenlediği ve otofajik donör membranlarının parçalanmasına aracılık ettiği öngörülmektedir (198). Çalışmamızın verileri, SH3GLB1 mRNA ekspresyonunun kontrol grubuna göre, TRPM2-siRNA (0,86 kat artma), TRPM2-siRNA+H₂O₂ (0,75 kat artma) ve H₂O₂ grubunda (0,45 kat artma) gruplarında istatistikî açıdan anlamlı olmayan artışların meydana geldiği belirlenmiştir. Bu sonuçlar, TRPM2'nin SH3GLB1 ile bir ilişki içerisinde olmayabileceğini akla getirmektedir.

UVRAG, otofaji bağımlı ya da bağımsız yollar aracılığıyla kanser hücrelerinde tümör baskılayıcı aktivite göstermektedir. Açık bir şekilde, memeli hücrelerinde UVRAG, BECLIN 1 kompleksinin aktivasyonu yoluyla otofagozom oluşumunu ve otofagozom olgunlaşmasını başlatır. Hücrelerde UVRAG ekspresyonunun baskılanması, otofajik akışı ya da otofagozom oluşumunu

etkilememektedir. UVRAG tarafından tetiklenen otofagozom olgunlaşması ve endositik akış BECLIN 1'den bağımsızdır. Bu bulgular, UVRAG'ın, otofaji süreci ve membran akışının düzenlenmesinde bilinmeyen bazı rolleri olduğunu ortaya koymaktadır. BECLIN 1 ya da PIK3C3'ün yokluğu, besin yetersizliği tarafından indüklenen otofajide UVRAG protein düzeylerini azaltmaktadır (197). Çalışmamızda, UVRAG mRNA ekspresyonunun kontrole kıyasla, TRPM2-siRNA (0,05 kat artma), H₂O₂ (0,06 kat artma) ve TRPM2-siRNA+H₂O₂ (0,42 kat artma) gruplarında istatistikî açıdan anlamlı bir farklılık göstermediği saptanmıştır. Bu sonuçlar, TRPM2'nin UVRAG ile bir ilişkisinin olmadığını işaret edebilir.

BECLIN 1, çok fonksiyonlu bir protein olup BCL-2 bağlanma özelliğine sahiptir. Özellikle otofaji ve apoptozun düzenlenmesinde önemli roller üstlenmektedir (199). BECLIN1'in PIK3C3 ile etkileşimi, PI3P oluşumunu katalizlemek için gereklidir. Diğer taraftan BECLIN1, BCL-2 ile birleşip mitokondriden BAX'ın ayrılmasına neden olarak apoptozu indüklemektedir. BECLIN 1; ubikütinasyon, epigenetik susturma, mikroRNA düzenlenmesi ve özellikle fosforilasyon olmak üzere pek çok düzeyde düzenlenebilmektedir (200). Fosforile BECLIN 1, BCL-2 ile birleşir sonuçta BAX salınımını gerçekleştirerek apoptoza neden olur. BECLIN 1'in, VPS34/PIK3C3 ile birleşmesiyle oluşan kompleksin ise otofajik yolları aktive ettiği gösterilmiştir (201). Çalışmamızda, BECLIN 1 mRNA ekspresyonunun kontrole grubuna göre, TRPM2-siRNA (2,55 kat artma) ve TRPM2-siRNA+H₂O₂ (2,4 kat artma) gruplarındaki artışın istatistikî olarak anlamlı olduğu ancak H₂O₂ grubunda (0,05 kat azalma) anlamlı bir farklılık göstermediği belirlenmiştir. Bu sonuçlar, TRPM2 ile BECLIN 1 arasında mRNA

düzeyinde ters yönlü bir ilişkinin olduğunu ifade edebilir. Bu çalışmada elde ettiğimiz veriler aynı zamanda, BECN1L1 mRNA ekspresyonunun kontrole kıyasla, TRPM2-siRNA (0,04 kat artma), H₂O₂ (0,35 kat artma) ve TRPM2-siRNA+H₂O₂ (0,42 kat artma) gruplarında istatistikî açıdan anlamlı bir farklılık göstermediğini ortaya koymuştur. Bu sonuçlar, TRPM'nin BECN1L1 ile bir ilişkisinin olmadığı şeklinde yorumlanabilir.

ATG12, hem otofagozom oluşumunu başlatarak hem de bazı BCL-2 ailesi üyelerine bağlanıp inaktif hale getirmek suretiyle apoptozu doğrudan düzenleyerek iki farklı şekilde hizmet edebilmektedir (202). Çalışmamızda elde ettiğimiz veriler, ATG12 mRNA ekspresyonunun kontrole kıyasla, TRPM2-siRNA (0,66 kat artma), H₂O₂ (0,02 kat artma) ve TRPM2-siRNA+H₂O₂ (0,7 kat artma) gruplarında gösterdiği farklılıkların istatistikî olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, TRPM2 ile ATG12 arasında mRNA düzeyinde bir ilişkinin olmadığı şeklinde yorumlanabilir.

ATG5, otofagozom uzamasında yer almasından dolayı otofaji için gerekli olan merkezi bir düzenleyicidir. ATG5'in zorunlu ekspresyonu hem in vivo hem de in vitro olarak tümör hücrelerini anti kanser ilaç uygulamalarına karşı hassas hale getirmektedir. Buna karşın siRNA aracılığıyla inhibe edilmesi kemoterapiye karşı kısmi bir direnç oluşmasına neden olmaktadır (203). Dong-Yun Ouyang ve ark 2013 yılında insan prostat kanseri hücreleri üzerinde yaptıkları çalışmada, VPA (anti kanser etkilere sahip bir histon deasetilaz inhibitörü) uygulanmasıyla LNCap ve PC-3 hücrelerinde otofajinin indüklendiğini ancak DU145 hücrelerinde ise engellendiğini gözlemlemişlerdir. ATG5'in, LNCAP ve PC3 hücrelerinde tespit edildiği ancak DU145 hücrelerinde ATG5 mRNA alternatif splicelerinin

fonksiyonel olmayan kesik ürünlere yol açmasından dolayı ATG5 eksik olduğu belirlenmiştir. Wild tip ATG5 geninin DU145 hücrelerine transfekte edilmesinin ardından hücrelerde otofaji sağlandığı tespit edilmiştir (204). Yaptığımız çalışmada, ATG5 mRNA ekspresyonunun kontrole göre, TRPM2-siRNA (0,98 kat artma) ve TRPM2-siRNA+H₂O₂ (1,5 kat artma) gruplarında istatistikî açıdan anlamlı derecede arttığı ancak H₂O₂ grubundaki (0,19 kat artma) farklılığın istatistikî olarak anlamsız olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar, TRPM2 ile ATG5 arasında mRNA düzeyinde ters yönlü bir ilişkinin olduğunu ifade edebilir.

Temel otofaji proteinlerinden biri olan ATG16'nın, izolasyon membranının genişlemesinde görev aldığı gösterilmiştir. ATG16, otofaji mekanizmasının iki ubiquitin benzeri protein konjugasyon sistemlerinden birinin bir parçasıdır ve ATG12-ATG5 konjugatı ile kovalent olmayan bir şekilde bağlantılıdır. Fare embriyonik fibroblastlarında, bir ATG16 üyesi olan ATG16L1 eksikliği, ATG12-ATG5 konjugatının izolasyon membranına katılım işlevini bozar ve LC3 içindeki PE bağlantısının kaybı ile sonuçlanır (205). Çalışmamızda, ATG16L1 mRNA ekspresyonunun kontrole kıyasla, TRPM2-siRNA (2,73 kat artma) ve TRPM2-siRNA+H₂O₂ (2,5 kat artma) gruplarında meydana gelen artışın istatistikî olarak anlamlı olduğu ancak H₂O₂ grubundaki (0,05 kat artma) farklılığın anlamlı olmadığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, TRPM2 ile ATG16L1 arasında mRNA düzeyinde ters yönlü bir ilişkinin olduğunu düşündürmektedir.

MAPLC3 (LC3), memeli hücrelerinde yaygın bir şekilde bulunur ve otofagozomların oluşumu için esansiyeldir. Besin yetersizliğine bağlı olarak indüklenen otofajide, LC3 ekspresyonu artmaktadır. Bu yüzden otofaji için spesifik bir belirteç olarak kullanılmaktadır (206). Memeli hücrelerinde LC3'ün;

LC3A, LC3B ve LC3C olmak üzere 3 izoformu bulunmaktadır ancak LC3B diğer iki izoforma kıyasla daha sık bir şekilde otofaji belirteci olarak kullanılmaktadır (204). Shuhua Wu ve ark. 2015'te yaptıkları çalışmada, LC3'ün, kolorektal kanser dokularında kanserli olmayanlara kıyasla hem mRNA hem de protein düzeyindeki ekspresyonunun önemli derecede artmış olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca, kanser hücrelerinde otofajik aktivite ya da otofaji potansiyelinin arttığını göstermişlerdir (206). Bu çalışmada elde ettiğimiz verilere göre, MAPLC3A ve MAPLC3B mRNA ekspresyonlarının kontrole kıyasla, TRPM2-siRNA (0,31 kat azalma / 0,21 kat artma) ve TRPM2-siRNA+H₂O₂ (0,15 kat azalma / 0,5 kat artma) gruplarında istatistikî açıdan anlamlı farklılık göstermediği ancak H₂O₂ grubunda (2,27 kat artma / 2,46 kat artma) anlamlı bir artış gösterdiği belirlenmiştir. Bu sonuçlar, MAPLC3A ve MAPLC3B'nin, TRPM2 ve H₂O₂ ile doğrusal bir ilişki içerisinde olduklarını göstermektedir.

Çalışmamızda, LAMP1 mRNA ekspresyonunun kontrol grubuna göre, TRPM2-siRNA (1,56 kat artma) ve TRPM2-siRNA+H₂O₂ (1,15) gruplarında istatistikî olarak anlamlı düzeyde arttığı ancak H₂O₂ grubunda (0,16 kat artma) anlamlı bir farklılık göstermediği saptanmıştır. Bu sonuçlar, TRPM2 ile LAMP1 arasında mRNA düzeyinde ters yönlü bir ilişkinin olduğunu ifade edebilir.

Bu çalışmada, LAMP2 ve LAMP3 mRNA ekspresyonlarının kontrole kıyasla, TRPM2-siRNA (0,19 kat azalma / 0,26 kat azalma), H₂O₂ (0,41 kat artma / 0,44 kat artma) ve TRPM2-siRNA+H₂O₂ (0,2 kat azalma / 0,26 kat azalma) gruplarında istatistikî açıdan anlamlı bir farklılık göstermediği tespit edilmiştir. Bu sonuç, TRPM2'nin LAMP2 ve LAMP3 ile bir ilişkisinin olmadığı şeklinde yorumlanabilir.

Tümör baskılayıcı P53 ailesi; p53, p63 ve p73'ü kapsayan birbiriyle ilişkili üç proteini içermektedir. Wild tip P53 bir transkripsiyon faktörü olup hücre döngüsünün durması ve apoptozda görevli genlerin uyarılmasında görevlidir. P53 ailesinin diğer üyesi olan P73; P53'e benzer fonksiyonlara sahiptir ve hem G1'de hücre döngüsünün durmasını hem de apoptozu uyarmaktadır. BCL-2 ailesinin üyeleri mitokondrial membran geçirgenliğinin düzenlenmesinde ve apoptozda kritik role sahip olan mitokondrial membranda kanallar oluşturulmasında görevlidirler. Proapoptatik bir gen olan BAX mitokondriden sitoplazmaya geçerek sitokrom c salınmasını sağlar. H₂O₂, BAX'ın sitoplazmadan mitokondriye translokasyonuna ve sitokrom c' nin salınmasına neden olmaktadır. Böylece H₂O₂'in indüklediği stres, apoptotik hücre ölümüne yol açmaktadır (207). Hücrelerde apoptoz, P53'ten bağımsız olarak, P73'ün transkripsiyonel artışıyla da indüklenebilmektedir. P73'ün indüklediği apoptozda; BAX, Puma ve Noxa olarak bilinen proapoptotik genler aracısıdır. Singh M ve ark, HeLa hücrelerinde yaptıkları çalışmada, H₂O₂'in mitokondriyal yolak aracılığıyla apoptozu indüklediğini belirlemişlerdir (208). Çalışmamızda, BAX mRNA ekspresyonunun kontrol grubuna göre, TRPM2-siRNA (1,47 kat artma), H₂O₂ (3,22 kat artma) ve TRPM2-siRNA+H₂O₂ (2,12 kat artma) gruplarında istatistiki olarak anlamlı derecede arttığı belirlenmiştir. Ancak, H₂O₂ grubundaki BAX mRNA ekspresyonunun TRPM2-siRNA grubuna kıyasla istatistikî açıdan anlamlı düzeyde artış göstermesi TRPM2 ve H₂O₂'nin BAX ile pozitif bir ilişki içinde olduğunu ortaya koymaktadır. Ayrıca, BCL-2 mRNA ekspresyonunun kontrole kıyasla, TRPM2-siRNA (0,09 kat azalma) ve TRPM2-siRNA+H₂O₂ (0,2 kat artma) gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermediği ancak

H₂O₂ grubunda (1,79 kat artma) anlamlı düzeyde arttığı bulunmuştur. Bu sonuçlar, BCL-2'nin, TRPM2 ve H₂O₂ ile doğrusal bir ilişki içerisinde olduğunu göstermektedir. Çalışmamızda, TP53 mRNA ekspresyonunun kontrole göre, TRPM2-siRNA (0,55 kat artma), H₂O₂ (0,18 kat azalma) ve TRPM2-siRNA+H₂O₂ (0,61 kat artma) gruplarında istatistiki olarak anlamlı bir farklılık göstermediği tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, TP53 ile TRPM2 arasında mRNA düzeyinde net bir ilişkinin olmadığı şeklinde yorumlanabilir. Son olarak, TP73 mRNA ekspresyonunun kontrole kıyasla, H₂O₂ (8,16 kat artma) ve TRPM2-siRNA+H₂O₂ (6,52 kat artma) gruplarında istatistiki açıdan anlamlı derecede artış gösterdiği TRPM2-siRNA grubunda (0,59 kat artma) ise anlamlı bir farklılık göstermediği tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, TP73'ün TRPM2 ve H₂O₂ ile pozitif bir ilişki içerisinde olduğu şeklinde yorumlanabilir.

Sonuç olarak; ROT'nin, TRPM2 aracılığıyla, hücrenin apoptoz ya da otofajiye yönelmesini belirlediğine dair ipucu verebileceği öngörülmektedir. TRPM2 iyon kanalının, hücre ölümü üzerindeki rolü belirlenmiş olup bu kanala spesifik olarak geliştirilecek aktivatörler, TRPM2'in aracılık ettiği apoptozun artırılmasının hedeflendiği kanser tedavilerinde yararlı olacaktır. TRPM2-siRNA uygulaması, açık bir şekilde, otofajik yollarda görevli olan genlerin sentezlerini artırmaktadır. Bu veri, TRPM2 baskılanmasının bir taraftan apoptozu engelleyip diğer taraftan otofajik mekanizmaları aktive edebileceğini göstermektedir. Ayrıca, kanserde, hem hücrenin sağ kalımı hem de ölümüne yol açabilecek şekilde iki farklı işlev gösterebileceği belirlenen otofajinin, TRPM2 ile ilişkili olduğunun belirlenmesi, TRPM2'yi hedef alarak otofajinin inhibe edilmesi ya da aşırı

arttırılması sağlanıp hücrenin otofajik ölümüne yol açacak kanser tedavilerinin geliştirilmesine katkıda bulunabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Tanagho EA, McAninch JW. Genel Üroloji. 14. Baskı. Nobel Tıp Kitabevleri, 1999.
2. Huggins C. The Physiology of the Prostate Gland. *Physiol Rev.* 1945; 25: 281-295.
3. Kosova F, Arı Z. Prostat Kanseri ve Apoptozis İlişkisi. *Klinik ve Deneysel Araştırmalar Dergisi* 2011; 2 (1): 124-131.
4. Borley N, Feneley MR. Prostate Cancer: Diagnosis and Staging. *Asian J Androl* 2009; 11(1): 74-80.
5. Akdaş A, Çevik İ. BPH-Benign Prostat Hiperplazisi. Ankara: Hekimler Yayın Birliği, 1996.
6. Ziparo E, Petrunaro S, Marini ES, et al. Autophagy in Prostate Cancer and Androgen Suppression Therapy. *Int J Mol Sci* 2013; 14(6): 12090-106.
7. Abbas A, Gupta S. The role of histone deacetylases in prostate cancer. *Epigenetics* 2008; 3(6): 300-309.
8. Steineck G, Helgesen F, Adolfsson J, et al. Quality of Life after Radical Prostatectomy or Watchful Waiting. *N Engl J Med* 2002; 347(11): 790-796.
9. Badger TA, Segrin C, Figueredo AJ, et al. Psychosocial interventions to improve quality of life in prostate cancer survivors and their intimate or family partners. *Qual Life Res* 2011; 20(6): 833-844.
10. Verhoeven DT, Goldbohm RA, van Poppel G, Verhagen H, van den Brandt PA. Epidemiological Studies on Brassica Vegetables and Cancer Risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1996; 5(9): 733-748.
11. Prevarskaya N, Flourakis M, Bidaux G, Thebault S, Skryma R. Differential role of TRP channels in prostate cancer. *Biochem Soc Trans.* 2007; 35.Pt 1: 133-5.
12. Aita VM, Liang XH, Murty VV, et al. Cloning and genomic organization of Beclin 1, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 17q21. *Genomics* 1999; 59(1): 59-65.
13. Ravikumar B, Sarkar S, Davies JE, et al. Regulation of Mammalian Autophagy in Physiology and Pathophysiology. *Physiol Rev* 2010; 90(4): 1383-1435.
14. Shintani T, Klionsky DJ. Autophagy in Health and Disease: A Double-Edged Sword. *Science* 2004; 306(5698): 990-995.
15. Xie Z, Klionsky DJ. Autophagosome formation: core machinery and adaptation. *Nat Cell Biol* 2007; 9: 1102-1109.
16. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death & Differentiation* 2009; 16.1: 3-11.
17. Chen Y, Klionsky DJ. The Regulation of Autophagy-Unanswered Questions. *J Cell Sci* 2011; 124: 161-170.
18. Füllgrabe J, Klionsky DJ, Joseph B. The return of nucleus: transcriptional and epigenetic control of autophagy. *Mol Cell Biol* 2014; 15: 65-74.

19. Monteith GR, McAndrew D, Faddy HM, Roberts-Thomson SJ. Calcium and Cancer: Targeting Ca²⁺ Transport. *Nat Rev Cancer* 2007; 7(7): 519-530.
20. Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL, et al. Calcium Signalling: Dynamics, Homeostasis and Remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4(7): 517-529.
21. Rizzuto R, De Stefani D, Raffaello A, Mammucari C. Mitochondria as Sensors and Regulators of Calcium Signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012; 13(9): 566-578.
22. Flourakis M, Prevarskaya N. Insights into Ca²⁺ Homeostasis of Advanced Prostate Cancer Cells. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1793(6): 1105-1109.
23. Cárdenas C, Miller RA, Smith I, et al. Essential Regulation of Cell Bioenergetics by Constitutive InsP3 Receptor Ca²⁺ Transfer to Mitochondria. *Cell* 2010; 142(2): 270-283.
24. Høyer-Hansen M, Bastholm L, Szyniarowski P, et al. Control of Macroautophagy by Calcium, Calmodulin-Dependent Kinase Kinase-Beta, and Bcl-2. *Mol Cell* 2007; 25(2): 193-205.
25. Prevarskaya N, Skryma R, Shuba Y. Ion Channels and the Hallmarks of Cancer. *Trends Mol Med* 2010; 16(3): 107-121.
26. Harteneck C, Plant TD, Schultz G. From worm to man: three subfamilies of TRP channels. *Trends Neurosci* 2000; 23(4): 159-166.
27. Van Haute C, De Ridder D, Nilius B. TRP Channels in Human Prostate. *Scientific World Journal* 2010; 10: 1597-1611.
28. Sumoza-Toledo A, Penner R. TRPM2: a multifunctional ion channel for calcium signalling. *J Physiol* 2011; 589: 1515-1525.
29. Lange I, Yamamoto S, Partida-Sanchez S, et al. TRPM2 functions as a lysosomal Ca²⁺-release channel in beta cells. *Sci Signal* 2009; 2(71): ra23.
30. Zeng X, Sikka SC, Huang L, et al. Novel Role for the Transient Receptor Potential Channel TRPM2 in Prostate Cancer Cell Proliferation. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2010; 13(2): 195-201.
31. Jiang LH, Yang W, Zou J, Beech DJ. TRPM2 channel properties, functions and therapeutic potentials. *Expert Opin Ther Targets* 2010; 14: 973-988.
32. Zhang W, Chu X, Tong Q, et al. A novel TRPM2 isoform inhibits calcium influx and susceptibility to cell death. *J Biol Chem* 2003; 278: 16222-16229.
33. Blenn C, Wyrsh P, Bader J, Bollhalder M, Althaus FR. Poly-(ADP-ribose) glycohydrolase is an upstreamregulator of Ca²⁺ fluxes in oxidative cell death. *Cell Mol Life Sci* 2011; 68: 1455-1466.
34. Wyrsh P, Blenn C, Bader J, Althaus FR. Cell death and autophagy under oxidative stress: roles of poly(ADP-Ribose) polymerases and Ca(2+). *Mol Cell Biol* 2012; 32 (17): 3541-3553.
35. Scherz-Shouval R, Shvets E, Fass E, et al. Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *EMBO J* 2007; 26 (7): 1749-1760.

36. Wehage E, Eisfeld J, Heiner I, et al. Activation of the cation channel long transient receptor potential channel 2 (LTRPC2) by hydrogen peroxide. Asplice variant reveals a mode of activation independent of ADP-ribose. *J Biol Chem* 2002; 277(26): 23150–23156.
37. Aktümsek A. *Anatomi ve Fizyoloji-İnsan Biyolojisi*. 8. Basım, Ankara: Nobel, 2014.
38. <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003072-pdf.pdf>
39. Pennefather JN, Lau WA, Mitchelson F, Ventura S. The autonomic and sensory innervation of the smooth muscle of the prostate gland: a review of pharmacological and histological studies. *J Auton Pharmacol* 2000 20, 193–206.
40. Kirby RS, Christmas TJ, Brawer M. Prostate cancer. In: *Anatomical and pathological considerations*. Mosby Times Mirror International 1998; 2-21.
41. http://www.aboutcancer.com/zonal_anatomy_0608.jpg
42. Petersen RO, Sesterhenn IA, Davis CJ. Prostate. *Urologic Pathology*. 3rd ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2009. p.451-559.
43. Rosai J. Male reproductive system. Rosai and Ackerman's *Surgical Pathology*. 9th ed. Vol 1. Elsevier; 2004. p.1361-411.
44. Montironi R, Lopez-Beltran A, Cheng L, Scarpelli M. Cervical-type squamous metaplasia and myoepithelial cell differentiation in stromal tumor of the prostate. *Am J Surg Pathol* 2011; 35(11): 1752-4.
45. Sezer K. *Prostat ve Hastalıkları*. Ankara: Hacettepe Üni. Yayınları 1991: 11-97.
46. Nehaber KG, Bishop MC, Bjerkund TE, Johansen H. European Association of Urology. *EAU Guidelines* 2010; 89-95.
47. Magri V, Perletti G, Bartoletti R, et al. Critical issues in chronic prostatitis. *Arch Ital Urol Androl* 2010; 82(2): 75-82.
48. Canatan H, Halifeoğlu İ, Gürsu MF, ve ark. Serum leptin düzeylerinin prostat kanserli ve benign prostat hiperplazili hastalarda ve sağlıklı kontrollerde (genç ve yaşlı) saptanması. *Fırat Tıp Dergisi* 2004; 9.4: 112-115.
49. Lee C, Kozlowski J, Grayhack J. Intrinsic and extrinsic factors controlling benign prostatic growth. *Prostate* 1997; 31(2): 131-8.
50. Andersson KE. Storage and voiding symptoms: Pathophysiologic aspects. *Urology* 2003; 62(5 Suppl 2): 3-10.
51. Kumar VL, Dewan S. Alpha adrenergic blockers in the treatment of benign hyperplasia of the prostate. *Int Urol Nephrol* 2000; 32(1): 67-71.
52. Oelke M, Bachmann A, Descaseaud A, et al. European Association of Urology, *Guidelines on the Treatment of Non-neurogenic Male LUTS*, 2011.
53. Hutchison A, Farmer R, Verhamme K, Berges R, Navarrete RV. The efficacy of drugs for the treatment of LUTS/BPH, a study in 6 European countries *Eur Urol* 2007; 51(1): 207-15.

54. Başok E, Tokuç R. Benign prostat hiperplazisi tedavisinde minimal invaziv yöntemler medikal tedavinin yerini alabilir mi? Üroonkoloji Bülteni Aralık 2009; 38-43.
55. Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics. CA: a cancer journal for clinicians 2011; 61.2: 69-90.
56. Gültekin M. ve Boztaş G. Türkiye Kanseri İstatistikleri. 2014.
57. Donkena KV, Young CYF. Vitamin D, Sunlight and prostate cancer risk. Adv Prev Med 2011; 281863.
58. Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. Int J Cancer 2010; 127: 2893–917.
59. Sim HG, Cheng CW. Changing demography of prostate cancer in Asia. Eur J Cancer 2005; 41: 834–45.
60. Zorlu F. IX. Üroonkoloji Kongresi webcast. 4-8 Kasım 2008, Ankara.
61. Anafarta K, Arıkan N, Bedük Y. Temel Üroloji. 4. Baskı, Ankara: 2011.
62. <http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/type/prostate-cancer/about/prostate-cancer-risks-and-causes>
63. Bostwick DG, Burke HB, Djakiew D, et al. Human prostate cancer risk factors. Cancer. 2004 Nov 15;101(10 Suppl):2371-490.
64. Reiter RE, de Kernion J. Prostat kanserinin epidemiyolojisi, etiyolojisi ve önlenmesi. Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED, Wein AJ, editörler. Campbell Üroloji. 8. Baskı, Ankara:Güneş kitabevi; 2005. p.3003-24.
65. Türkeri L. Prostat kanseri için koruyucu beslenme özellikleri ‘chemoprevention-gıda’. Üroonkoloji Bülteni 2005;1:16-22.
66. Huggins C, Hodges C.V. Studies on prostatic cancer. Cancer research 1941; 1: 297.
67. Taştekin E, Sarıkaş N. Prostat Kanseri Patolojisi. Türkiye Klinikleri Journal of Urology Special Topics, 2014; 7.4: 23-34.
68. Thobe MN, Clark RJ, Bainer RO, Prasad SM, Rinker-Schaeffer CW. From Prostate to Bone: Key Players in Prostate Cancer Bone Metastasis. Cancers 2011; 3: 478-493.
69. Gençhellaç H, Kırıcı MY. Prostat Kanseri Tanısında Görüntüleme Yöntemleri. Türkiye Klinikleri Journal of Urology Special Topics 2014; 7.4: 46-55.
70. Hara M, Koyanagi Y, Inoue T, Fukuyama T. Physico-chemical characteristics of “y-seminoprotein,” an antigenic component specific for human seminal plasma. Jpn J Legal Med 1971; 25: 322–4.
71. Riegman PH, Vlietstra RJ, Klaassen P, et al. The prostate-specific antigen gene and the human glandular kallikrein-1 gene are tandemly located on chromosome 19. FEBS Lett 1989; 247:123–6.
72. Dawson NA, Vogelzang NJ, editors. Prostate cancer. New York: Wiley-Liss, Inc.; 1994.
73. Myrtle JF, Klimley PG, Ivor LP, Bruni JF. Clinical utility of prostate specific antigen (PSA) in the management of prostate cancer. In: Advances in cancer diagnostics. San Diego, CA: Hybritech Inc 1986; 1–4.

74. Crawford ED, Barqawi A. Targeted focal therapy: a minimally invasive ablation technique for early prostate cancer. *Oncology* 2007; 21 (1): 27-32.
75. Thompson IM, Ankerst DP, Chi C, et al. Operating characteristics of prostate-specific antigen in men with an initial PSA level of 3.0 ng/ml or lower. *JAMA* 2005; 294(1): 66-70.
76. Carter BS, Bova GS, Beaty TH, et al. Hereditary prostate cancer: epidemiologic and clinical features. *J Urol* 1993; 150(3): 797-802.
77. Hughes C, Murphy A, Martin C, Sheils O, O'Leary J. Molecular pathology of prostate cancer. *J Clin Pathol* 2005; 58(7): 673-84.
78. Narod SA, Dupont A, Cusan L, et al. The impact of family history on early detection of prostate cancer. *Nat Med* 1995; 1(2): 99-101.
79. Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK, et al. Environmental and heritable factors in the causation of cancer analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N Engl J Med* 2000; 343(2): 78-85.
80. Gronberg H, Damber L, Damber JE, Iselius L. Segregation analysis of prostate cancer in Sweden: support for dominant inheritance. *Am J Epidemiol* 1997; 146(7): 552-7.
81. Monroe KR, Yu MC, Kolonel LN, et al. Evidence of an X-linked or recessive genetic component to prostate cancer risk. *Nat Med* 1995; 1(8): 827-9.
82. Evangelos Mazaris, Alexios Tsiotras. Molecular Pathways in Prostate Cancer. *Nephro Urol Mon.*2013;5(3):792-800.
83. Knudson AG Jr. Genetic predisposition to cancer. *Cancer Detect Prev* 1984; 7(1): 1-8.
84. Jones PA, Laird PW. Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet* 1999; 21(2): 163-7.
85. Bookstein R, Totowa NJ. Tumor suppressor genes in prostate cancer. In: Bookstein R, Totowa NJ, editors. *Prostate cancer: biology genetics and the new therapeutics*. Humana Press; 2001. pp. 61-93.
86. National Cancer Institute, Surveillance Research Program, Cancer Statistics Branch. Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program Populations (1969-2007), In November 2009 edition; 2010.
87. Bubendorf L, Schopfer A, Wagner U, et al. Metastatic patterns of prostate cancer: An autopsy study of 1,589 patients. *Hum Pathol* 2000; 31: 578-583.
88. Clarke NW, Hart CA, Brown MD. Molecular mechanisms of metastasis in prostate cancer. *Asian J Androl* 2009; 11(1): 57-67.
89. Tait SWG, Ichim G, Green DR. Die another way–non-apoptotic mechanisms of cell death. *Journal of cell science* 2014; 127.10: 2135-2144.
90. Duprez L, Wirawan E, Berghe TV, Vandenabeele P. Major cell death pathways at a glance. *Microbes and Infection* 2009; 11.13: 1050-1062.
91. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-257.

92. Eum KH, Lee M. Crosstalk between autophagy and apoptosis in the regulation of paclitaxel-induced cell death in v-Ha-ras transformed fibroblasts. *Mol Cell Biochem* 2011; 348: 61-68.
93. Ghobrial IM, Witzig TE, Adjei AA. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *Cancer J Clin* 2005; 55: 178-194.
94. Lozy F, Karantza V. Autophagy and cancer cell metabolism. In: *Seminars in cell & developmental biology*. Academic Press 2012; 395-401.
95. Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol* 2010; 221(1): 3–12.
96. Grasso S, Gómez-Martínez Á, Tristante E, et al. *Cell Death and Cancer, Novel Therapeutic Strategies*. 2012. INTECH Open Access Publisher.
97. Kung HJ. Targeting tyrosine kinases and autophagy in prostate cancer. *Horm Cancer* 2011; 2: 38–46.
98. Shen HM, Codogno P. Autophagic cell death: Loch Ness monster or endangered species? *Autophagy* 2011; 7: 457–465.
99. Denton D, Nicolson S, Kumar S. Cell death by autophagy: facts and apparent artefacts. *Cell Death and Differentiation* 2012; 19: 87–95
100. He C, Klionsky DJ. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet* 2009; 43: 67–93.
101. Meléndez A, Levine B. Autophagy in *C. elegans*. 2005.
102. Hosokawa N, Hara T, Kaizuka T, et al. Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol Biol Cell* 2009; 20: 1981–1991.
103. Hosokawa N, Sasaki T, Iemura S, et al. Atg101, a novel mammalian autophagy protein interacting with Atg13. *Autophagy* 2009; 5: 973–979.
104. Jung CH, Jun CB, Ro SH, et al. ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol Biol Cell* 2009; 20: 1992–2003.
105. Ganley IG, Lamdu H, Wang J, et al. ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *J Biol Chem* 2009; 284: 12297–12305.
106. Parzych KR, Klionsky DJ. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid Redox Signal* 2014; 20(3): 460-73.
107. Itakura E, Mizushima N. Characterization of autophagosome formation site by a hierarchical analysis of mammalian Atg proteins. *Autophagy* 2010; 6: 764–776.
108. Burman C, Ktistakis NT. Regulation of autophagy by phosphatidylinositol 3-phosphate. *FEBS Lett* 2010; 584: 1302–1312.
109. Kihara A, Noda T, Ishihara N, Ohsumi Y. Two distinct Vps34 phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in autophagy and carboxypeptidase Y sorting in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 2001; 152: 519–530.

110. Liang XH, Jackson S, Seaman M, et al. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* 1999; 402: 672–676.
111. Liang XH, Kleeman LK, Jiang HH, et al. Protection against fatal Sindbis virus encephalitis by beclin, a novel Bcl-2-interacting protein. *J Virol* 1998; 72: 8586–8596.
112. Matsunaga K, Saitoh T, Tabata K, et al. Two Beclin 1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages. *Nat Cell Biol* 2009; 11: 385–396.
113. Takahashi Y, Coppola D, Matsushita N, et al. Bif-1 interacts with Beclin 1 through UVRAG and regulates autophagy and tumorigenesis. *Nat Cell Biol* 2007; 9: 1142–1151.
114. Weidberg H, Shvets E, Shpilka T, et al. LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis. *EMBO J* 2010; 29: 1792–1802.
115. Kim J, Dalton VM, Eggerton KP, Scott SV, Klionsky DJ. Apg7p/Cvt2p is required for the cytoplasm-to-vacuole targeting, macroautophagy, and peroxisome degradation pathways. *Mol Biol Cell* 1999; 10: 1337–1351.
116. Mizushima N, Kuma A, Kobayashi Y, et al. Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. *J Cell Sci* 2003; 116: 1679–1688.
117. Monastyrska I, Rieter E, Klionsky DJ, Reggiori F. Multiple roles of the cytoskeleton in autophagy. *Biol Rev Camb Philos Soc* 2009; 84: 431–448.
118. Atlashkin V, Kreykenbohm V, Eskelinen E-L, et al. Deletion of the SNARE vti1b in mice results in the loss of a single SNARE partner, syntaxin 8. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 5198–5207.
119. Jager S, Bucci C, Tanida I, et al. Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles. *J Cell Sci* 2004; 117: 4837–4848.
120. Janku F, McConkey DJ, Hong DS, Kurzrock R. Autophagy as a target for anticancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol* 2011; 8(9): 528–39.
121. Choi AM, Ryter SW, Levine B. Autophagy in human health and disease. *N Engl J Med* 2013; 368: 651–662.
122. White E. Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer* 2012; 12: 401–410.
123. Kondratskyi A, Yassine M, Kondratska K et al. Calcium-permeable ion channels in control of autophagy and cancer. *Frontiers in physiology* 2013; 4: 272.
124. Degenhardt K, Mathew R, Beaudoin B, et al. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell* 2006; 10: 51–64.
125. Takamura A, Komatsu M, Hara T, et al. Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors. *Genes Dev* 2011; 25: 795–800.
126. Kondo Y, Kanzawa T, Sawaya R, Kondo S. The role of autophagy in cancer development and response to therapy. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 726–734.

127. Selvakumaran M, Amaravadi RK, Vasilevskaya IA, O'dwyer PJ. Autophagy inhibition sensitizes colon cancer cells to antiangiogenic and cytotoxic therapy. *Clin Cancer Res* 2013; 19: 2995–3007.
128. Amaravadi RK, Lippincott-Schwartz J, Yin XM et al. Principles and current strategies for targeting autophagy for cancer treatment. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 654–666.
129. Dalby KN, Tekedereli I, Lopez-Berestein G, Ozpolat B. Targeting the prodeath and prosurvival functions of autophagy as novel therapeutic strategies in cancer. *Autophagy* 2010; 6: 322–329.
130. Guo Z, Dai B, Jiang T, et al. Regulation of androgen receptor activity by tyrosine phosphorylation. *Cancer Cell* 2006; 10: 309–319.
131. Wu Z, Chang PC, Yang JC, et al. Autophagy blockade sensitizes prostate cancer cells towards Src family kinase inhibitors. *Genes Cancer* 2010; 1: 40–49.
132. Bristol ML, Emery SM, Maycotte P et al. Autophagy inhibition for chemosensitization and radiosensitization in cancer: Do the preclinical data support this therapeutic strategy? *J Pharmacol Exp Ther* 2013; 344: 544–552.
133. Kania E, Pająk B, Orzechowski A. Calcium homeostasis and ER stress in control of autophagy in cancer cells. *Biomed Res Int.* 2015; 2015: 352794.
134. Parys JB, Decuypere JP, Bultynck G. Role of the inositol1,4,5-trisphosphate receptor/Ca²⁺ release channel in autophagy. *Cell Commun Signal* 2012; 10: 17.
135. Gomez-Suaga P, Luzon-Toro B, Churamani D, et al. Leucine-rich repeat kinase 2 regulates autophagy through a calcium-dependent pathway involving NAADP. *Hum Mol Genet* 2012; 21: 511–525.
136. Gao W, Ding WX, Stolz DB, Yin XM. Induction of macroautophagy by exogenously introduced calcium. *Autophagy* 2008; 4: 754–761.
137. Sakaki K, Wu J, Kaufman RJ. Protein kinase C θ is required for autophagy in response to stress in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 2008; 283: 15370–15380.
138. Khan MT, Joseph SK. Role of inositoltrisphosphate receptors in autophagy in DT40 cells. *J Biol Chem* 2010; 285: 16912–16920.
139. Decuypere JP, Bultynck G, Parys JB. A dual role for Ca²⁺ in autophagy regulation. *Cell Calcium* 2011a; 50: 242–250.
140. K. Abdelmohsen, S. Srikantan, K. Tominaga et al. Growth inhibition by miR-519 via multiple p21-inducing pathways. *Molecular and Cellular Biology* 2012; 32(13): 2530–2548.
141. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144: 646–674.
142. Schonherr R. Clinical relevance of ion channels for diagnosis and therapy of cancer. *The Journal of membrane biology* 2005; 205: 175–184.

143. Chaffer CL, Weinberg RA. A perspective on cancer cell metastasis. *Science* New York NY 2011; 331: 1559-1564.
144. Clapham DE, Runnels LW, Strubing C. The TRP ion channel family. *Nat Rev Neurosci* 2001; 2: 387-396.
145. Clapham DE. TRP channels as cellular sensors. *Nature* 2003; 426: 517-524.
146. Gkika D, Prevarskaya N. TRP channels in prostate cancer: the good, the bad and the ugly? *Asian J Androl* 2011;13(5):673-6.
147. Venkatachalam K, Montell C. TRP channels. *Annu Rev Biochem* 2007 76, 387–417.
148. Sano Y, Inamura K, Miyake A, et al. Immunocyte Ca^{2+} influx system mediated by LTRPC2. *Science* 2001; 293: 1327–1330.
149. Nagamine K, Kudoh J, Minoshima S, et al. Molecular cloning of a novel putative Ca^{2+} channel protein (TRPC7) highly expressed in brain. *Genomics* 1998; 54: 124–131.
150. Uemura T, Kudoh J, Noda S, Kanba S, Shimizu N. Characterization of human and mouse TRPM2 genes: identification of a novel N-terminal truncated protein specifically expressed in human striatum. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 328(4): 1232–1243.
151. Perraud AL, Fleig A, Dunn CA, et al. ADP-ribose gating of the calcium-permeable LTRPC2 channel revealed by Nudix motif homology. *Nature* 2001; 411: 595–599.
152. Tong Q, Zhang W, Conrad K, et al. Regulation of the transient receptor potential channel TRPM2 by the Ca^{2+} sensor calmodulin. *J Biol Chem* 2006; 281: 9076–9085.
153. Fleig A, Penner R. Emerging roles of TRPM channels. *Novartis Found Symp* 2004a; 258: 248–258.
154. Fleig A, Penner R. The TRPM ion channel subfamily: molecular, biophysical and functional features. *Trends Pharmacol Sci* 2004b; 25: 633–639.
155. Bessman MJ, Frick DN, O’Handley SF et al. The MutT proteins or “Nudix” hydrolases, a family of versatile, widely distributed, “housecleaning” enzymes. *J Biol Chem* 1996; 271: 25059–25062.
156. Kolisek M, Beck A, Fleig A, Penner R. Cyclic ADP-ribose and hydrogen peroxide synergize with ADP-ribose in the activation of TRPM2 channels. *Mol Cell* 2005; 18: 61–69.
157. Starkus J, Beck A, Fleig A, Penner R. Regulation of TRPM2 by extra- and intracellular calcium. *J Gen Physiol* 2007; 130: 427–440.
158. Du J, Xie J, Yue L. Intracellular calcium activates TRPM2 and its alternative spliced isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009a; 106: 7239–7244.
159. Hara Y, Wakamori M, Ishii M, et al. LTRPC2 Ca^{2+} -permeable channel activated by changes in redox status confers susceptibility to cell death. *Mol Cell* 2002; 9: 163–173.
160. Ayub K, Hallett MB. The mitochondrial ADPR link between Ca^{2+} store release and Ca^{2+} influx channel openin in immune cells. *FASEB J* 2004; 18: 1335–1338.

161. Perraud AL, Takanishi CL, Shen B, et al. Accumulation of free ADP-ribose from mitochondria mediates oxidative stress-induced gating of TRPM2 cation channels. *J Biol Chem* 2005; 280: 6138–6148.
162. Fauzee NJ, Pan J, Wang YL. PARP and PARG inhibitors: new therapeutic targets in cancer treatment. *Pathol Oncol Res* 2010; 16: 469–478.
163. Fonfria E, Marshall IC, Benham CD, et al. TRPM2 channel opening in response to oxidative stress is dependent on activation of poly(ADP-ribose) polymerase. *Br J Pharmacol* 2004; 143: 186–192.
164. Buelow B, Song Y, Scharenberg AM. The Poly(ADP-ribose) polymerase PARP-1 is required for oxidative stress-induced TRPM2 activation in lymphocytes. *J Biol Chem* 2008; 283: 24571–24583.
165. Hermosura MC, Cui AM, Go RC, et al. Altered functional properties of a TRPM2 variant in Guamanian ALS and PD. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 18029–18034.
166. Togashi K, Hara Y, Tominaga T, et al. TRPM2 activation by cyclic ADP-ribose at body temperature is involved in insulin secretion. *EMBO J* 2006; 25: 1804–1815.
167. Ru X, Yao X. TRPM2: a multifunctional ion channel for oxidative stress sensing. *Sheng Li Xue Bao* 2014; 66(1): 7-15.
168. Gough DR, Cotter TG. Hydrogen peroxide: a Jekyll and Hyde signalling molecule. *Cell Death Dis* 2011; 2: e213.
169. Marchi S, Giorgi C, Suski JM, et al. Mitochondria-ros crosstalk in the control of cell death and aging. *J Signal Transduct* 2012; 329-635.
170. Fransen M, Nordgren M, Wang B, Apanasets O. Role of peroxisomes in ROS/RNS-metabolism: implications for human disease. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1822: 1363–1373.
171. Thapa D, Ghosh R. Antioxidants for prostate cancer chemoprevention: challenges and opportunities. *Biochem.Pharmacol.*2012; 83: 1319–1330.
172. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 2006; 160: 1–40.
173. Sener DE, Gonenc A, Akinci M, Torun M. Lipid peroxidation and total antioxidant status in patients with breast cancer. *Cell Biochem Funct* 2007; 25: 377–382.
174. Weydert CJ, Waugh TA, Ritchie JM, et al. Overexpression of manganese or copper-zinc superoxide dismutase inhibits breast cancer growth. *Free Radic Biol Med* 2006; 41: 226–237.
175. Goh J, Enns L, Fatemie S, et al. Mitochondrial targeted catalase suppresses invasive breast cancer in mice. *BMC Cancer* 2011; 11: 191.
176. Khandrika L, Kumar B, Koul S, Maroni P, Koul HK. Role of Oxidative Stress in Prostate Cancer. *Cancer Lett* 2009 September 18; 282(2): 125–136.

177. Shen M.M, Abate-Shen C. Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges. *Genes Dev* 2010 Sep 15;24(18):1967-2000.
178. Kongara S, Karantza V. The interplay between autophagy and ROS in tumorigenesis. *Frontiers in oncology* 2012; 2.
179. Zhang L, Barritt GJ. Evidence that TRPM8 is an androgen-dependent Ca²⁺ channel required for the survival of prostate cancer cells. *Cancer Res* 2004 Nov 15; 64(22): 8365-73.
180. Sikka SC, Zeng X, Jia D, Abdel-Mageed A, Li M. Selective expression of novel TRPM2 calcium channel in human prostate cancer. *Proc Amer Assoc Cancer Res* 2005; 46.
181. Trachootham D, Zhou Y, Zhang H, et al. Selective killing of oncogenically transformed cells through a ROS-mediated mechanism by beta-phenylethyl isothiocyanate. *Cancer Cell* 2006; 10: 241–252.
182. Pelicano H, Carney D, Huang P. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resist Update* 2004; 7: 97–110.
183. Chen Y, McMillan-Ward E, Kong J, Israels SJ, Gibson SB. Oxidative stress induces autophagic cell death independent of apoptosis in transformed and cancer cells. *Cell Death Differ* 2008 Jan; 15(1): 171-82.
184. Wang Q. Mechanistic Study of the Transient Receptor Potential Melastatin 2 (TRPM2)-Ca²⁺ Signaling in ROS Induced Switch between Apoptosis and Autophagy. Ph.D Thesis The University of Hong Kong October 2014.
185. Miller BA. Inhibition of TRPM2 function by PARP inhibitors protects cells from oxidative stress-induced death. *Br J Pharmacol* 2004; 143(5): 515-516.
186. Zou J, Ainscough JF, Yang W, et al. A differential role of macrophage TRPM2 channels in Ca²⁺ signaling and cell death in early responses to H₂O₂. *Am J Physiol Cell Physiol* 2013 Jul 1; 305(1): C61-9.
187. Kühn FJ, Heiner I, Lückhoff A. TRPM2: a calcium influx pathway regulated by oxidative stress and the novel second messenger ADP-ribose. *Pflügers Arch* 2005; 451: 212–219.
188. Hecquet CM, Ahmmed GU, Vogel SM, Malik AB. Role of TRPM2 channel in mediating H₂O₂-induced Ca²⁺ entry and endothelial hyperpermeability. *Circ Res* 2008 Feb 15; 102(3): 347-55.
189. Green DR, Galluzzi L, Kroemer G. Mitochondria and the autophagy-inflammation-cell death axis in organismal aging. *Science* 2011; 333: 1109–1112.
190. Jung CH, Seo M, Otto NM, Kim DH. ULK1 inhibits the kinase activity of mTORC1 and cell proliferation. *Autophagy* 2011; 7(10): 1212-1221.
191. Gao W, Shen Z, Shang L, Wang X. Upregulation of human autophagy-initiation kinase ULK1 by tumor suppressor p53 contributes to DNA-damage-induced cell death. *Cell Death & Differentiation* 2011; 18(10): 1598-1607.

192. Morselli E, Shen S, Ruckenstein C, et al. p53 inhibits autophagy by interacting with the human ortholog of yeast Atg17, RB1CC1/FIP200. *Cell Cycle* 2011; 10(16): 2763-2769.
193. Chano T, Ikebuchi K., Ochi Y, et al. RB1CC1 activates RB1 pathway and inhibits proliferation and cologenic survival in human cancer. *PLoS One* 2010; 5(6): 11404.
194. Toepfer N, Childress C, Parikh A, Rukstalis D, Yang W. Atorvastatin induces autophagy in prostate cancer PC3 cells through activation of LC3 transcription. *Cancer biology & therapy* 2011; 12(8): 691-699.
195. Willinger T, Flavell RA. Canonical autophagy dependent on the class III phosphoinositide-3 kinase Vps34 is required for naive T-cell homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2012; 109(22); 8670-8675.
196. Strappazzon F, Vietri-Rudan M, Campello S, et al. Mitochondrial BCL-2 inhibits AMBRA1-induced autophagy. *The EMBO journal* 2011; 30(7): 1195-1208.
197. Kang R, Zeh HJ, Lotze MT, Tang D. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death & Differentiation* 2011; 18(4): 571-580.
198. Khan MM, Strack S, Wild F, et al. Role of autophagy, SQSTM1, SH3GLB1, and TRIM63 in the turnover of nicotinic acetylcholine receptors. *Autophagy* 2014; 10(1): 123-136.
199. Wirawan E, Lippens S, Vanden Berghe T, et al. Beclin1: a role in membrane dynamics and beyond. *Autophagy* 2012; 8(1): 6-17.
200. Kim J, Kim YC, Fang C, et al. Differential regulation of distinct Vps34 complexes by AMPK in nutrient stress and autophagy. *Cell* 2013; 152(1-2): 290-303.
201. Maejima, Y., S. Kyo, P. Zhai, et al. Mst1 inhibits autophagy by promoting the interaction between Beclin1 and Bcl-2. *Nat Med* 2013; 19(11): 1478-1488.
202. Hayat MA (ed.). *Autophagy: Cancer, Other Pathologies, Inflammation, Immunity, Infection, and Aging: Volume 3-Role in Specific Diseases*. Academic Press, 2013.
203. Ge J, Chen Z, Huang J, et al. Upregulation of Autophagy-Related Gene-5 (ATG-5) Is Associated with Chemoresistance in Human Gastric Cancer. *PLoS One* 2014; 9(10).
204. Ouyang DY, Xu LH, He XH, et al. Autophagy is differentially induced in prostate cancer LNCaP, DU145 and PC-3 cells via distinct splicing profiles of ATG5. *Autophagy* 2013; 9(1): 20-32.
205. Xiong Q, Ünal C, Matthias J, Steinert M, Eichinger L. The phenotypes of ATG9, ATG16 and ATG9/16 knock-out mutants imply autophagy-dependent and-independent functions. *Open biology* 2015; 5(4): 150008.
206. Wu S, Sun C, Tian D, et al. Expression and clinical significances of Beclin1, LC3 and mTOR in colorectal cancer. *International journal of clinical and experimental pathology* 2015; 8(4): 3882.
207. Singh M, Sharma H, Singh N. Hydrogen peroxide induces apoptosis in HeLa cells through mitochondrial pathway. *Mitochondrion* 2007 Dec; 7(6): 367-73.

208. Roos WP, Kaina B. DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol Med* 2006 Sep; 12(9): 440-50.

8. ÖZGEÇMİŞ

02.07.1986 tarihinde İstanbul’da doğdum. 2004 yılında Esenler İbrahim Turhan Lisesi (YDA)'nden mezun olarak aynı yılın Eylül ayında Fırat Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde öğrenim hayatımı devam ettirdim. 2008 yılında lisans eğitimimi tamamlayıp 2008 yılı güz döneminde Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimime başladım. 2011'in Ocak ayında yüksek lisansımı tamamladıktan sonra 2013 Ocak ayında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'na ÖYP Araştırma Görevlisi olarak başladı. 2013 Güz yarıyılından bu yana Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıp Programı Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimime devam etmekteyim.