

T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

( DOKTORA TEZİ )

HÜCRE BÜYÜMESİ İLE İLGİLİ mTOR SİNYAL  
YOLAĞINDA YER ALAN RHEB PROTEİNİNİN MESANE  
KANSERLİ HASTALARDA ARAŞTIRILMASI

HATİCE TIĞLI

DANIŞMAN  
PROF.DR.TURGUT ULUTİN

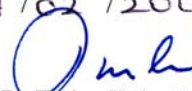
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
TIBBİ BİYOLOJİ PROGRAMI

İSTANBUL-2009

## TEZ ONAYI

Aşağıda tanıtımı yapılan tez, jüri tarafından başarılı bulunarak Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

17 / 02 / 2009

  
Prof. Dr. Emine Kökoğlu  
Enstitü Müdürü

Kurum : İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Program Adı : TIBBİ BİYOLOJİ  
Programın seviyesi : Yüksek Lisans  Doktora   
Anabilim Dalı : TIBBİ BİYOLOJİ  
Tez Sahibi : HATİCE TIĞLI  
Tez Başlığı : HÜCRE BÜYÜMESİ İLE İLGİLİ MTOR SİNYAL YOLAĞINDA YER  
ALAN RHEB PROTEİNİNİN MESANE KANSERLİ HASTALARDA ARAŞTIRILMASI.  
Sınav Yeri : İ.Ü CERRAHPAŞA TIP FAK TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
Sınav Tarihi : 12 / 02 / 2009

### Tez Sınav Jürisi

<u>Ünvanı</u> <u>Adı</u> <u>Soyadı</u> <u>Üniversitesi</u> , <u>Fakültesi</u> , <u>Anabilim Dalı</u>	
1. Prof. Dr. Turgut ULUTİN (Danışman)	İ.Ü Cerrahpaşa Tıp Fak. Tıbbi Biyoloji A.D 
2. Prof. Dr. Nejat DALAY	İ.Ü Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji A.D 
3. Prof. Dr. Nur BUYRU	İ.Ü Cerrahpaşa Tıp Fak. Tıbbi Biyoloji A.D 
4. Prof. Dr. Mehmet GÜRTEKİN	İ.Ü Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.D
5. Prof. Dr. Tuncay ALTUĞ	Bilim Üniversitesi Tıp Fak. Tıbbi Biyoloji A.D

**BEYAN**

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

Hatice Tıgılı



## İTHAF

Canım Oğlum, Sevgili Eşim, Sevgili Ailem ve tüm Sevdiklerime,

## TEŞEKKÜR

Cerrahpaşa Tıp Fakültesine adım attığım yıldan beri hocam olan danışmanım Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Turgut Ulutin'e bana her zaman gösterdiği anlayış, hoşgörü ve tezime yapmış olduğu katkılar için çok teşekkür ederim.

Sevgili hocam, bana bazen bir anne, bazen bir abla, bazen de bir arkadaş oldunuz. Bana her yönden yaptığınız katkılar bu satırlara sığamayacak kadar çok ve güzel Tam 10 yıl birlikte acı tatlı günler paylaştık. Sizin yanınızda olmak benim için büyük bir şanstı. Güçlü kişiliğiniz, tatlı sert haliniz, bilimselliğiniz ve dürüstlüğünüz her zaman bana örnek oldu. Akademik kişiliğime, tezime, hayat görüşlerime yaptığı tüm katkılar için güzel hocam Prof.Dr. Nur Buyru'ya sonsuz teşekkürler. Sizin hakkınız ödenmez...

Değerli Hocam Prof.Dr. Nejat Dalay'a tezime olan katkıları için,

Laboratuar arkadaşlarım; tez çalışmam süresince verdiğim tüm rahatsızlıklara rağmen her zaman yardımlarınızı esirgemedi beni hoşgörüle karşıladınız. Gönülümde her zaman ayrı bir yeri olan, tezimin gerek deney aşamasında, gerek yazım aşamasında sürekli yardımına başvurduğum zor anlarımda her daim desteğini hissettiğim çok sevdiğim canım arkadaşım, kardeşim Dr. Jülide Altınışık, MSc. Onur Baykara, MSc. Banu Tömekçe, MSc. Bülent Tekin, MSc. Ayda Tezol'a, MSc. Adayları Filiz Özdemir, Ebru Kenanlı, Seda Ekizoğlu'na, sıcak ve içten arkadaşlığını her zaman hissettiğim sevgili arkadaşım İlknur Beyazıt'a, Dr. Elif Yosunkaya'ya,

Tezin en önemli bölümlerinden olan hasta örneklerinin toplanmasında gösterdikleri çaba, titizlik ve tüm yardımları için Sayın Prof.Dr. Murat Tunç'a, Dr. Öner Şanlı'ya ve Dr. Fatih Akbulut'a, Op.Dr. Murat Baykal'a ve Dr. Şerife Başaran'a,

İyi ve kötü anlarımda benimle olup desteğini esirgemeyen canım arkadaşım MSc. S. Merve Aloğlu Şentürk'e,

Canım kardeşim, meslektaşım, sırdaşım, arkadaşım Dr. Hülya Tıǧlı'ya hem tezime yaptığı sonsuz katkılar için hem mesleğime, hem de hayatıma yaptığı tüm katkılar için, cici kardeşim Filizime her zaman yanımda olduğu için (ablan olduğum için çok şanslıyım), her zaman desteğini hissettiğim ablam Havva İrigül'e, tatlı yeğenlerim Rana ve Sena İrigül'e, Sevgili babam Mustafa Tıǧlı'ya, canım annem Fatma Tıǧlı'ya bana gösterdiğiniz sabır, içtenlik için, acı, tatlı günümde hep yanımda olduğunuz için çok teşekkür ederim.

Beni kendi kızlarından hiçbir zaman ayırmayan sevgili annem Mükerrerem Tıǧlı ve sevgili babam Vahit Tıǧlı'ya, ablalarım Fatma Sezer ve Nilgün Şener'e, cici yeğenlerim, Ayşegül ve Burcu Sezer'e, Selin ve Kaan Şener'e sabır ve anlayışla desteklerini hiçbir zaman benden esirgemedikleri için çok teşekkür ederim.

Canım oğlum, birtanem Mustafa Onur, tezimin yazım aşamasında bana çalışmam için pek fırsat vermesinde bana verdiğin enerji, neşe, sana duyduğum sevgi bana hep güç verdi. Sevgili eşim Hüseyin Tıǧlı'ya, tez çalışmam süresince birçok şeyi aksatmış olsamda bana sonsuz sabır gösterdiği için, her zaman yanımda olup, desteğini hissettirdiği için, benimle birlikte birçok zorluğa katlandığı için,

**SONSUZ TEŞEKKÜRLER...**

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: T-86/ 15122006

## İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI.....	İİ
BEYAN.....	İİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER.....	Vİİ
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ.....	Xİ
ÖZET.....	Xİİ
ABSTRACT.....	Xİİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Mesane Kanseri.....	4
2.1.1. Mesane Kanserinde Evreleme.....	5
2.1.2. Mesane Kanserinin Epidemiyolojisi.....	8
2.1.3. Mesane Kanserinde Risk Etmenleri.....	9
2.1.4. Mesane Kanserinde Koruyucu Etmenler.....	11
2.1.5. Mesane Kanserinde Tanı ve Tedavi.....	12
2.1.6. Mesane Kanserinin Moleküler Biyolojisi.....	13
2.2. mTOR( Mammalian Target of Rapamisin) Karmaşımı.....	15
2.2.1. mTOR Karmaşımı 1.....	16
2.2.2. mTORC2 Karmaşımı 2.....	16
2.2.3. mTOR Sinyal Yolağı.....	16
2.2.3.1. mTOR Sinyal Yolağında Rol Oynayan Rheb.....	20
2.2.4. mTOR Rheb ve Kanser.....	23
2.2.4.1. mTOR Engelleyicisi Rapamisin'in Kanser Tedavisinde Yeri.....	26
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	28
3.1. GEREÇ.....	28
3.1.1. Kimyasal Maddeler ve Malzemeler.....	28
3.1.2. Kullanılan Cihazlar.....	29

3.1.3. Tampon ve Çözeltiler.....	30
3.1.3.1. RNA Eldesinde Kullanılan Tampon ve Çözeltiler .....	30
3.1.3.2. cDNA Sentez Tepkimesinde Kullanılan Tampon .....	31
3.1.3.3. Agaroz ve Formaldehidli Jel Elektroforezi Tamponları .....	31
3.1.3.4. Kullanılan Jeller .....	32
3.1.3.5. LC h-G6PDH Housekeeping Gene Set Kitinde Bulunan Tamponlar.....	32
3.2. YÖNTEM .....	33
3.2.1. RNA Eldesi .....	33
3.2.2. Spektrofotometrik analiz.....	34
3.2.3. Formaldehidli Jelin Hazırlanması .....	34
3.2.4. cDNA Sentezi .....	34
3.2.5. Rheb Geni İfade Analizi .....	35
Gerçek Zamanlı PZR’de Kullanılan Primer Dizisi.....	36
Gerçek Zamanlı PZR’de Kullanılan Prob Dizisi .....	36
3.2.6. Verilerin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi .....	38
4. BULGULAR.....	39
4.1. RNA’ların Formaldehidli Jelde Görünümü .....	40
4.2. Rheb Geni İfade Değerleri.....	40
TARTIŞMA.....	52
KAYNAKLAR.....	56
ETİK KURUL KARARI.....	65
ÖZGEÇMİŞ.....	66



## TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Mesane Tümörlerinin TNM sınıflandırılması.....	7
Tablo 2-2: İnsanlarda görülen kanserlerde PI3K/Akt-mTOR yolundaki bozukluklar ...	25
Tablo 3-1: RNA izolasyonu.....	33
Tablo 3-2: cDNA Sentezi Tepkime Koşulları .....	34
Tablo 3-3: Rheb Primer ve Prob Dizileri.....	36
Tablo 3-4: Rheb Gen İfade Analizi için Tepkime Koşulları .....	36
Tablo 3-5: G6PDH Geni İfade Analizi için Tepkime Koşulları.....	37
Tablo 3-6:G6PDH ve Rheb Gen İfade Analizleri için Gerçek-Zamanlı PZR Koşulları	37
Tablo 4-1: Çalışmaya alınan hastaların tümör tipi histolojileri .....	39
Tablo 4-2: Rheb gen ifadesi düşük ve yüksek düzeyde olan hasta ve kontrol grubunun dağılımı .....	42
Tablo 4-3: Tümör ve normalde ortanca Rheb gen ifade düzeyleri.....	44
Tablo 4-4: Hastalara ait Rheb gen ifade düzeyleri ve klinik parametreler.....	44
Tablo 4-5: Kontrol grubuna ait Rheb gen ifade düzeyleri .....	46
Tablo 4-6 :Rheb gen ifadesi düşük ve yüksek düzeyde olan hastaların evre dağılımları	46
Tablo 4-7:Hastaların patolojik evrelerine göre Rheb gen ifade düzeyi ortanca değerleri .....	47
Tablo 4-8: Hastaların patolojik gradlarına göre Rheb gen ifade düzeyi ortanca değerleri .....	50
Tablo 4-9 :Hastaların yaşlarına göre Rheb gen ifade düzeyi ortanca değerleri.....	51

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: T Sınıflandırması.....	6
Şekil 2-2: mTOR'un Yapısı.....	15
Şekil 2-3 mTOR Sinyal Yolağı .....	17
Şekil 2-4: Büyüme Etmeni İle Tetiklenen mTOR Sinyal Yolağı.....	18
Şekil 2-5: mTOR ile p70S6K1 ve 4E-BP1'in düzenlenmesi.....	19
Şekil 2-6: mTOR sinyal yolağı ile etkinleşen hücre döngüsü .....	20
Şekil 2-7: Rheb geninin 7. kromozomdaki yeri .....	20
Şekil 2-8 GTP bağlı Rheb .....	21
Şekil 2-9 Rheb'in mTOR'a Etkisi .....	22
Şekil 2-10: Kanser hücrelerinde mTOR'un etkisi .....	24
Şekil 3-1: Lightcycler Cihazında Kullanılan Prob Sistemi.....	35
Şekil 4-1: RNA'ların formaldehidli jelde görünümü .....	40
Şekil 4-2: G6PDH Standartlarına ait floresan eğriler .....	41
Şekil 4-3: Rheb gen ifadesinin yüksek düzeyde ve düşük düzeydeki floresan diyagramı .....	42
Şekil 4-4: Örneklerin Rheb gen ifadeleri.....	43
Şekil 4-5: Tümör ve Normalde Rheb Gen İfade Düzeyi .....	44
Şekil 4-6: Hastaların patolojik evrelerine göre Rheb gen İfade düzeyi ortanca değerleri .....	47
Şekil 4-7: 1. ve 4. evre hastaların Rheb gen ifade düzeyi ortanca değerleri.....	48
Şekil 4-8: 2. ve 4. evre hastaların Rheb gen ifade düzeyi ortanca değerleri.....	48
Şekil 4-9: 3. ve 4. evre hastaların Rheb gen ifade düzeyi ortanca değerleri.....	49
Şekil 4-10: Hastaların patolojik gradlarına göre Rheb gen ifade düzeyi ortanca değerleri .....	50
Şekil 4-11: Hastaların yaşlarına göre Rheb gen ifade düzeyi ortanca değerleri.....	51

**SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ**

**AMP-** Adenozin Mono Fosfat

**ATP-** Adenozin Tri Fosfat

**EGF-** Epidermal Büyüme Etmeni

**eIF4E-** Ökaryotik Başlatıcı Etmen 4E

**FRET-** Floresan Rezonans Enerji Transferi

**FGF-** Fibroblast Büyüme Etmeni

**GTP-** Guanin Tri Fosfat

**HIF-1 $\alpha$ -** Hipoksi ile Uyarılan Etmen

**IGF-** İnsüline Benzer Büyüme Etmeni

**mTOR-** Memeli Rapamisin Hedefi

**NSAİ-** Steroid Olmayan Antiinflamatuvar İlaçlar

**PDGF-** Trombosit Kökenli Büyüme Etmeni

**PI3K-** Fosfotidil İnozitol 3 Kinaz

**PKB -** Protein Kinaz B

**pTEN-** Fosfataz ve Tensin'e Benzeyen Silici (*Phosphatase and tensin homologue deleted*)

**PZR-** Polimeraz Zincir Tepkimesi

**Rb-** Retinoblastoma

**Rheb-**“*Ras homology enriched in brain*”

**SPSS-** Sosyal Bilimler İçin İstatistik Paketi

**TCC-** Transizyonel Epitel Hücreli Kanser

**TSC1/TSC2 -** Tuberosiz Sklerozis Karmaşımı

**VEGF-**Vasküler Endotelyal Büyüme Etmeni

## ÖZET

Tigli, H. (2009). Hücre Büyümesi ile İlgili mTOR Sinyal Yolağında Yer Alan Rheb Proteininin Mesane Kanserli Hastalarda Araştırılması İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ABD/Doktora Tezi. İstanbul.

Rheb Ras'a benzer bir yapı gösteren GTP hidrolizleyebilen özellikte olup, hücre büyümesi ve hücre döngüsünün düzenlenmesinde rol alan önemli bir hücre membranı proteindir. Rheb proteini hücre büyümesinde önemli olan mTOR sinyal yolağını tetiklemektedir. Mesane kanserinin moleküler mekanizması üzerine birçok çalışma olmasına rağmen Rheb geni ile ilişkili çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamızda mesane tümör ve normal dokularında Rheb gen ifade düzeyinin mesane kanseri oluşum ve prognozundaki rolünün araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmamızda, 53 mesane tümörlü hasta ile bu hastaların normal mesane dokularına ait 23 örneğin Rheb gen ifade düzeyi uygun primer ve prob kullanılarak Gerçek Zamanlı PZR yöntemi ile araştırılmıştır. Rheb gen ifade düzeyi 53 mesane tümörünün 27'sinde (%53) yüksek olarak saptanırken, normal dokuların ise 16'sında (%70) Rheb gen ifade düzeyi yüksek olarak bulunmuştur. Ancak aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir. Rheb'e yönelik tedavilerden yarar görebilecek hastaları tespit edebilmek için Rheb gen ifadesinin nicel Gerçek Zamanlı PZR ile analizi uygun olabilir. Rheb geninin mesane kanserinin gelişim ve prognozundaki rolünün belirlenmesi için daha pek çok çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar Kelimeler : Rheb, mTOR, TSC1/TSC2, mesane kanseri, gen ifade analizi

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: T-86/15122006

## ABSTRACT

Tigli, H. (2009). İn Bladder Cancer The Investigation of Rheb Protein Associated with mTOR Signaling Pathway in Cell Growth. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Medical Biology. Doktora Tezi. İstanbul. Doktora Tezi. İstanbul.

Rheb proteins represent a novel and unique family of the Ras superfamily GTP-binding proteins. Biochemical studies establish that they bind and hydrolyze GTP. The function of Rheb has been studied in a number of organisms that point to the involvement of Rheb in cell growth and cell cycle progression. Rheb protein potentially enhances the activity of mTOR signaling pathway which play critical roles in regulating growth and cell cycle. There are many studies about molecular mechanisms of bladder cancer, but has not been published about Rheb gene expression in bladder cancer. The aim of this study is to search the incidence and the role of Rheb expression in diagnosis and prognosis of bladder cancer. Rheb gene expression levels were studied by Real Time quantitative PCR method using suitable primers and probes in 53 bladder cancer and 23 normal bladder samples. Rheb gene overexpression was detected in 27 of 53 (53%) bladder cancer samples, but in 16 of 23 (70%) normal bladder samples. However the difference was not statistically significant. Rheb gene expression detection by Real Time PCR which should be used to identify patients who might benefit from Rheb-targeted therapies. It needs to be warrant studies about the role of Rheb gene in bladder cancer development and prognosis.

Key Words: Rheb, mTOR, TSC1/TSC/2, bladder cancer, gen expression levels.

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No: T-86/15122006

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Mesane kanseri, Batı dünyasında erkeklerde prostat, akciğer ve kolon kanserlerini takiben en yaygın görülen dördüncü kanser türü olup kadınlar arasında ise sekizinci sırada yer almaktadır. Mesane kanseri görülme oranı erkeklerde kadınlara oranla üç kat daha fazladır. Mesane kanseri erkeklerdeki kanser ölümlerinin %2,9'unu, kadınlardaki kanser ölümlerinin ise %1,5'ini oluşturur.

Mesane kanserinin oluşum mekanizması çok basamaklı bir süreç göstermekte olup, viral ve kimyasal ajanları içeren bir takım etiyolojik etmenlerle de ilişkili olduğu gösterilmiştir. Onkojenik özelliklere sahip olan "Human papilloma virüs" bazı mesane kanserlerinin etiyolojisinde rol oynasa da mesane kanserlerinin çoğu çeşitli kimyasallara uzun süre maruz kalma nedeni ile ortaya çıkmaktadır. Sigarada ve aynı zamanda kimyasal endüstri çevresinde bulunan karsinojenlerin çoğu, özellikle aromatik aminler, mesane kanseri için büyük risk etmenidir. İçme suyundaki arsenik, klorlanmış içme suyu ve saç boyaları kullanımı mesane kanseri için diğer risk etmenleridir. Yapısında karsinojenleri içeren birçok bileşik ve bunların metabolitleri, üriner sistem yoluyla atıldığı için mesane kanseri gelişimi açısından diyetin de önemli olduğunu göstermektedir. Ayrıca kanser oluşumunda genetik etmenlerin de rol oynadığı bilinmekle birlikte mesane kanserine yol açan genetik olaylar tam olarak aydınlatılamamıştır. Ancak onkogenlerin etkinleşmesi ve tümör baskılayıcı genlerin etkinliğinin kaybolması gibi birçok mekanizmanın rolü olduğu düşünülmektedir. Örneğin 9. kromozomun uzun kolundaki genetik maddenin kaybı mesane tümörlerinin gelişiminde önemli rol oynamaktadır. Bu kayıp bölgede tümör baskılayıcı bir genin var olduğu düşünülmektedir. Mesane kanseri açısından diğer aday kromozomlar 5,11,13 ve 17. kromozomlardır. p53 (17.kromozomda) ve retinoblastoma geninin (13.kromozomda) mutasyon sonucu etkisizleşmesi, mutasyon sonucu c-ras protoonkogeninin etkinleşmesi mesane kanseri oluşumunda önemli rol oynamaktadır.

Rheb, Ras'a benzer bir yapı gösteren GTP hidrolizleyebilen hücre büyüme ve döngüsünün düzenlenmesinde rolü olan önemli bir hücre zar proteinidir. Rheb proteini hücre büyümesinde önemli olan mTOR sinyal yolağını tetiklemektedir. mTOR sinyal yolağı, memelilerde hücrelerin büyüme ve gelişimine göre, ortamdaki amino asit ve glukoz seviyeleri, büyüme etmenleri ve mitojenlerin uyarısı ile düzenlenmektedir.

İnsülin veya büyüme etmeni ile tetiklenen yolak PI3K'ı (Fosfotidil İnozitol 3 Kinaz) etkinleştirir. PI3K'ın etkinleşmesi PKB'nin (Protein kinaz B) etkinleşmesine yol açar. mTOR sinyal yolağını negatif yönde düzenleyen, tümör baskılayıcı bir protein olduğu düşünülen TSC1/TSC2 (Tuberosiz Sklerozis Kompleks); Rheb proteinini GTP bağlı konumdan GDP bağlı konuma getirerek Rheb proteinini etkisizleştirir. Hücrelerde TSC1/TSC2 etkinliği ortamdaki ATP (Adenozin Tri Fosfat), glukoz, amino asit ve büyüme etmenlerinin uyarısına bağlı olarak değişmektedir. Örneğin ortamdaki amino asit ve glukoz yeterli değilse hücre ATP seviyesi düşer ve bu durumda AMP (Adenozin Mono Fosfat) artarak AMPK'ı (Adenozin Mono Fosfat Kinaz) etkinleştirir. AMPK da TSC1/2 heterodimerini etkinleştirir. TSC1/2 de Rheb'i engelleyerek TOR sinyal yolağını negatif yönde etkiler. Eğer ortamda amino asit ve glukoz seviyesi yüksek ve büyüme etmeni uyarısı yeterli ise; hücre ATP seviyeleri yükselir ve AMP seviyesi de düşer. Bu durumda AMPK da TSC1/2'yi etkinleştiremez. PKB de Rheb'in engelleyicisi olan TSC1/TSC2'yi fosforilleyerek onların etkisizleşmesini sağlar. Rheb-GDP halinden Rheb-GTP haline dönüşerek Rheb-GTP mTOR'u etkinleştirir. mTOR S6 Kinaz ve 4E-BP1'i fosforiller. S6 kinazın fosforillenmesi ile ribozom biyogenezi ve protein yapımı artar. Çevirimsel Engelleyici 4E-BP1'in fosforillenmesi ile eIF4E etkinleşir genel olarak protein sentezi artar. Sonuçta özgün olarak Siklin A,B,E ve myc gibi bazı proteinlerin çevirimi artar. Bu proteinlerin seviyelerinin artışı da hücre bölünme hızını artırır.

Son yapılan çalışmalar, mTOR sinyalinin, apoptozu düzenlediğinden bir çok hastalık ile çoğu kanserde önemli olduğunu göstermektedir.

Çalışmadaki amacımız mesane kanserli 53 hastanın tümörlü doku örneklerinde, Rheb gen ifade düzeyinin nicel olarak incelenmesidir. Hastalara ait tümörlü dokuların etrafını çevreleyen, tümör hücresi saptanmamış dokular da kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Çalışmada Rheb geninin kopya sayısında, dolayısıyla ifadesindeki artış, normal ve tümörlü dokular arasında kıyaslanarak Rheb genindeki ifade artışının mesane kanseri oluşumundaki rolünü araştırmayı, böylece yeni tanı ve tedavi yöntemlerine ışık tutabilmeyi amaçlıyoruz. Gen ifade artışı olan ve olmayan hastalar, klinik bilgileri ve prognozları açısından karşılaştırılacak ve sonuçlar, SPSS istatistik paket programı kullanılarak değerlendirilecektir.

Mesane kanserinin moleküler mekanizması üzerine birçok çalışma olmasına karşın Rheb geni ve proteini ile ilişkili fazla çalışma bulunmamaktadır. Rheb geninin kanserdeki yerini araştıran çalışmalar genellikle çeşitli kanser hücre soyları ile yapılmıştır. Bu nedenle çalışmanın Rheb geninin mesane kanseri ile ilişkisini inceleyen az sayıdaki literatüre katkıda bulunacağı görüşündeyiz.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Mesane Kanseri

Mesane, idrar depolayan ve atılımını sağlayan organdır. Genitoüriner kanserler arasında mesane kanseri görülme sıklığı açısından ikinci sıradadır. Ortalama görülme yaşı 65 olup erkeklerde kadınlardan 3 kat daha fazla gözlenmektedir (Messing 2005 pp.2731-2785).

Mesane kanserli hastaların %85-90'ında kanlı idrar (hematüri) ilk gözlenen semptomdur. Hematüri genellikle ağrısız olmakla birlikte bazı hastalarda sık sık idrara çıkma, idrarını yetiştirememesi ve yanma gibi belirtiler de olabilir (Çıkılı ve Akbay 2007 pp. 320-321) . Mesane kanseri mesaneyi oluşturan hücrelerin kontrolsüz olarak çoğalmasındır. Eğer bu hücre çoğalması sadece mesanenin yüzey katmanı ile sınırlı ise buna yüzeysel mesane kanseri, hücre çoğalması derinleşip kas tabakasına geçerse bu da invaziv mesane kanseri olarak adlandırılır. Kas tabakasına geçmiş mesane kanseri çevre dokulara yayılabilir (Özcan 2000 pp. 143-147). Mesane kanserlerinin yaklaşık %70-80'i yüzeysel mesane tümörü olarak tespit edilirken geriye kalanı kasa invaziv tümörler olarak karşımıza çıkmaktadır. (Kırkalı ve ark. 2005).

Mesane kanserlerinin %98'i epitel kökenli ve bunların da çoğu transizyonel hücreli tüm mesane kanserlerinin %90'ı transizyonel hücreli karsinomlardır. Mesane kanserlerinin %5'ten azını yassı epitel hücreli kanserler, %1 kadarını da adenokarsinomlar oluşturur. Transizyonel hücreli kanserler de epitel kökenli olmakla birlikte, genellikle papiller özellik gösterirler (Caşkurlu 2007 pp.260-346). Mesanede selim tümörler nadir gözlenmekle birlikte bu tümör tipleri, leiomyomlar, miyomlar, fibromlar, anjiyomlar, miksomlar ve osteomlar olarak sayılabilir. Selim mesane tümörlerinin büyük bölümünü leiomyomlar oluşturur (Sundaram 1998).

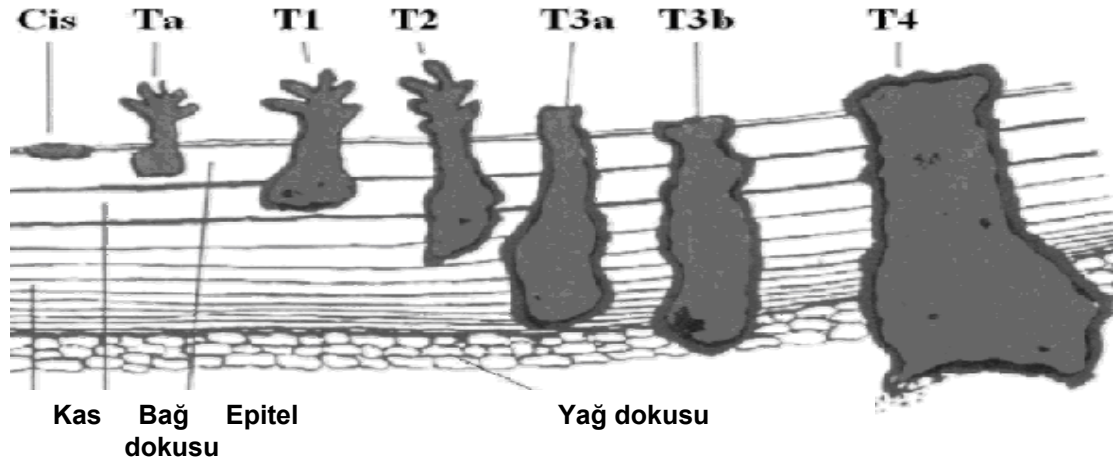
Tümör, belli bir süre sadece mesane lümenine doğru ilerleme gösterir. Bir sonraki aşama, tümörün dışı doğru, mesanenin kas tabakasına yayılmasıdır. Aynı zamanda, tümör lümeninde daha da büyür ve çevreye doğru yayılır. İlerleyen tümör, mesane duvarını aşarak peritona veya mesanenin dış tarafındaki diğer dokulara invaze olabilir (Reuter 2006). Tümör mukozada sınırlı olduğunda, uzak lenf düğümlerine veya uzak organlara metastaz, beklenen bir durum değildir. Ancak mesane duvarı kısı tutulduğunda, tümörlerin yaklaşık % 13'ü de lenf düğümlerine metastaz yapmış olur (Kırkalı ve ark. 2005).

Tümörün invazyonu, tekrarlama olasılığı ve progresyonu sıklıkla tümörün patolojik gradı ile yakın ilişkilidir. Düşük gradlı tümörde 10 yıl yaşama olasılığı %98 iken yüksek gradlı tümörlerde bu olasılık %35'tir (Yörükoğlu 2007 pp.281-293).

Mesane kanserinin patogenezi, çok basamaklı bir oluşum göstermekte olup, çevresel ve genetik etmenlerin etkisi altındadır. Mesane kanserlerinin çoğu karsinojen etkili kimyasallara uzun süre maruz kalındığında ortaya çıkmaktadır. Sigara kullanımı ve karsinojen içeren kimyasallara maruz kalınma en önemli risk etmenlerindedir. Mesane kanseri oluşumunda genetik etmenlerin de rol oynadığı açıktır. Bazı onkogenlerin etkinleşmesi ve tümör baskılayıcı genlerin etkinsizleşmesi gibi birçok mekanizmanın mesane kanseri oluşumunda rolü olduğu düşünülmektedir. Örneğin 9. kromozomun uzun ve kısa kolundaki genetik maddenin kaybı mesane tümörlerinin gelişiminde önemli rol oynamaktadır. Bu kayıp kısımlarda bazıs tümör baskılayıcı genlerin var olduğu düşünülmektedir (Cordon-Cardo 1998; Williams ve Stein 2004; Knowles 2006). Hücre döngüsü düzenlenmesinde etkili olan tümör baskılayıcı genlerinden olan p14ARF, p15, p16, DBC1 ve TSC1 9.kromozomda yerleşiktir (Williams ve Stein 2004; Knowles 2006). Mesane kanseri ile ilişkili olduğu düşünülen diğer kromozomlar 5,11,13 ve 17. kromozomlardır. p53 geninin (17. kromozomda) ve retinoblastoma genlerinin (13. kromozomda) mutasyon sonucu etkinsizleşmesi (Kayıgil 2007 pp. 282-313), c-ras protoonkogeninin de mutasyon sonucu etkinleşmesi mesane kanseri oluşumunda önemli rol oynamaktadır ( Olderoy ve ark. 1998).

### **2.1.1. Mesane Kanserinde Evreleme**

Mesane kanserinin klinik evrelemesi tümörün mesane duvarına invazyon derecesi ile belirlenir. Mesane duvarına invazyon derecesi için biyopside yapılan sistoskopik muayene önemlidir. Anestezi altında palpe edilen kitlenin büyüklük ve hareketliliği, mesane duvarına olan konumu, mesane dışında kitle olup olmadığı veya komşu organ invazyonu olup olmadığı incelenerek belirlenmektedir. Şekil 2-1'de TNM sınıflandırması gösterilmektedir.



Şekil 2-1: T Sınıflandırması- Schulz (2006)'dan

**Mesane tümörlerinin T sınıflandırılması (Primer Tümör):**

Tx: Bilinmeyen primer tümör

To: Saptanamayan primer tümör

Ta: İnvaziv olmayan papiller kanser

Tis: Karsinoma in situ

T1: Tümör subepiteliyal bağ dokusuna invaze olmuştur

T2: Tümör kas tabakasına invaze olmuştur

T2a: Tümör yüzeysel kas dokusuna invaze olmuştur

T2b: Tümör derin kas dokusuna invaze olmuştur

T3: Tümör perivezikal dokuya invaze olmuştur

T3a: Mikroskobik yayılım vardır

T3b: Makroskobik (ekstravezikal kitle) invazyon vardır

T4: Tümör prostat, uterus, vajina, pelvik duvar veya karın duvarına invaze olmuştur

T4a: Tümör prostat, uterus veya vajinaya invaze olmuştur

T4b: Tümör pelvik duvar veya karın duvarına invaze olmuştur

**Mesane tümörlerinin N sınıflandırılması (Lenf nodu tutulumuna göre) :**

Nx: Lenf nodu belirlenmemiştir

No: Bölgesel lenf nodu metastazı yoktur

N1: Tek bir lenf nodunda 2 cm'den küçük metastaz vardır

N2: Tek bir lenf nodunda 2-5 cm arasında ya da birden fazla lenf nodunda 5 cm'den küçük metastaz vardır

N3: 5 cm'den büyük lenf nodu metastazı vardır

**Mesane tümörlerinin M sınıflandırılması (Uzak metastaz durumuna göre):**

Mx: Uzak metastaz belirlenmemiştir

Mo: Uzak metastaz yoktur

M1: Uzak metastaz vardır

AJCC (American Joint Commission on Cancer)'nin mesane kanserleri için düzenlediği TNM evreleme sistemi (Tablo 2-1):

**Tablo 2-1: Mesane Tümörlerinin TNM sınıflandırılması**

Evre 0	Ta/Tis N0 M0
Evre I	T1 N0 M0
Evre II	T2a N0 M0, T2b N0 M0
Evre III	T3a,3b,4a N0 M0
Evre IV	T4b N0 M0 veya T N1, N2, N3, M0

(Schulz 2006)

### 2.1.2. Mesane Kanserinin Epidemiyolojisi

Mesane kanseri, batı dünyasında erkeklerde prostat, akciğer ve kolon kanserlerini takiben en sık görülen dördüncü kanser türüdür. Kadınlarda görülen kanser türleri arasında ise sekizinci sırada yer almaktadır (Jemal ve ark. 2004). Mesane kanseri görülme sıklığı erkeklerde kadınlara oranla üç kat fazladır (Parkin ve ark. 1999). Erkeklerde mesane kanserine olan bu eğilim; hormonal, genetik ve anatomik (prostat büyümesine bağlı yaşlı erkeklerdeki relatif idrar retansiyonu) etmenlerle açıklanabilir. Yapılan bazı hayvan deneyleri androjenik hormonlara maruz bırakılan farelerde, östrojenik hormonlara maruz bırakılanlara göre daha fazla mesane tümörü geliştiğini göstermektedir (Parkin ve ark. 2002).

Avrupa'da her yıl 136.000 yeni mesane kanseri teşhis edilmektedir. Avrupa ve Amerika'da erkeklerde görülen kanserlerin %5-10'unu mesane kanseri oluşturur (Franeкова ve ark. 2008). Mesane kanserinin 40 yaşından önce ortaya çıkması nadir olup genellikle 60 ile 80 yaş arasında ortaya çıkar (Özcan F. 2000 p.144). 75 yaşından genç erkeklerde mesane kanseri gelişme olasılığı %2-4 iken kadınlarda bu oran % 0,5-1'dir. Fakat mesane kanseri görülme sıklığı yaşla beraber her iki cinste de artmaktadır. Mesane kanseri erkeklerdeki kanser ölümlerinin %2,9'unu kadınlardaki kanser ölümlerinin ise %1,5'ini oluşturur (Kırkalı ve ark. 2005).

Mesane kanseri görülme oranında şimdiye kadar nedeni tam olarak anlaşılamasa da ırksal farklılıklar sözkonusudur. Yüksek riskli toplumlar; Amerikalı Latin ırktan olmayan beyazlar ve Batı Avrupalılar'dır. Bu toplumlarda yılda 40/100.000 mesane kanseri tanısı konurken Asya'lılarda (Çin'liler, Japon'lar ve Hindistan'lılar dahil) 3-7/100.000 tanı konur (Parkin ve ark. 2002). Mesane kanseri Amerika'lı beyaz erkeklerde Amerika'lı siyah erkeklerdekinden iki kat ve Amerika'lı beyaz kadınlardakinden Amerika'lı siyah kadınlardan 1,5 kat daha fazladır. Irklar arasındaki farklar ve aynı ırktakiler arasındaki kişisel farklılıkların, kanser öncüllerinin karsinojenlere dönüşümü, karsinojenlerin zehirsizleştirilmesi ve kişilerin DNA onarım kapasiteleri gibi karsinogenezin değişik aşamalarındaki farklılıklardan kaynaklanabileceği düşünülmektedir (Prout ve ark. 2004).

### 2.1.3. Mesane Kanserinde Risk Etmenleri

Mesane kanseri için en iyi belirlenmiş risk etmeni sigara alışkanlığıdır. Sigara içenlerde mesane kanseri olma oranı sigara içmeyenlere göre 4 kat artmaktadır. Sigara içme süresi, içilen sigaranın sayısı ve dumanın inhalasyon miktarına bağlı olarak mesane kanseri görülme oranı değişmektedir. Mesane kanseri olma olasılığı sigarayı bırakmış olanlarda, aktif olarak içmeye devam edenlere göre azalmıştır (Zeegers ve ark. 2002). Sigara içenlerde görülen mesane kanserinden sorumlu belirli bir kimyasal madde tanımlanmamıştır. Sigara içenlerin idrarlarında saptanan nitrozaminler, 2-naftilamin, 4-aminobifenil ve artmış olan üriner triptofan metabolitlerinin bu etkiye neden olduğu düşünülmektedir (Johansson ve Cohen 1997).

Mesane, idrar deposu işlevi görme özelliğinden dolayı potansiyel karsinojenlere ve toksik maddelere daha uzun süre maruz kalmaktadır. Gelişmekte olan ülkelerde ve tüm dünyada endüstrileşmenin artması ile birlikte daha çok çevresel karsinojenlere maruz kalma mesane kanseri görülme sıklığını da arttırmaktadır (Cohen ve ark. 2000).

Meslek, ilk tespit edilen ve ikinci derecede önemli bir risk etmenidir. Mesleki maruziyetlerin bütün mesane kanserlilerin %20 kadarında rol oynadığı düşünülmektedir. Mesane kanseri riskinin artmış olduğu düşünülen meslekler; oto sanayi işçileri, boyacılar, kamyon şoförleri, matkap operatörleri, deri işçileri, metal işçileri, tornacılar ve organik kimyasallar içeren mesleklerde çalışanlar, kuru temizleme işçileri, kağıt sanayi çalışanları, halat ve sicim yapım işçileri, diş teknisyenleri, berber ya da güzellik uzmanları, doktor, giyim sanayi çalışanları ve tesisatçılardır. Bir çok meslek grubunda mesane kanseri görülme sıklığı artmakla birlikte bu meslek gruplarında daha sık gözlenmektedir (Kırkalı ve ark. 2005). Mesane kanserine neden olan karsinojenlerin çoğu aromatik aminlerdir. Mesane kanseri için karsinojen olduğu gösterilen kimyasallar; 2-naftilamin, 4-aminobifenil, 4-nitrobifenil, 4-4-diaminobifenil (benzidin) ve 2-amino-1-naftol; yanıcı gazlar ve kömür tozu, klorize alifatik hidrokarbonlar; kimyasal boyalarda ve lastik tekstil sanayinde kullanılan akrolen gibi aldehitlerdir. Bu kimyasallara yukarıda bahsedilen meslek gruplarındaki kişilerin daha fazla maruz kalmaları nedeniyle bu kişilerde mesane kanseri görülme sıklığı artmaktadır (Steineck ve ark. 1990).

Kronik idrar yolu enfeksiyonları; özellikle *şistozoma hematobium* enfeksiyonları, yassı hücreli mesane kanseri gelişimine neden olabilir. Mısır'da erkeklerde şistozomiazis yaygın olarak gözlenirken yassı hücreli mesane kanseri de o bölgede en sık görülen kanser tipidir. Şistozomiazisli erkeklerde TCC (Transizyonel epitel hücreli mesane kanseri) riski de artmıştır. Ayrıca spinal kord yaralanmalı hastalarda da uzun süre kalıcı kateterle takip edildiklerinden, kronik sistit oluşması nedeniyle mesane kanser riski artmaktadır. Sistitle uyarılmış mesane kanserleri ana etken ne olursa olsun genellikle uzun süreli ciddi enfeksiyonlarla ilişkilidir. Kanser oluşum mekanizmalarının tam olarak anlaşılmasına rağmen, normal üriner içeriğin parazit ya da mikroplar tarafından metabolize edilmesi sonucunda oluşan nitrit ve n-nitroso bileşiklerinin oluşumuyla ilgili olabileceği düşünülmektedir ( Kırkalı ve ark. 2005).

Mesane kanseri riski ile yapay tatlandırıcı (sakarın ve siklamat gibi) kullanımı arasında hayvan modellerinde yakın ilişki olduğu gösterilmesine rağmen, hayvanlarda bulunan bazı özel biyolojik mekanizmaların insanlarda bulunmaması nedeniyle epidemiyolojik çalışmalarda insanlarda tutarlı bir pozitif birliktelik gösterilememiştir. Sturgeon ve arkadaşlarının mesane kanserli hastalarda yaptığı bir çalışmada, yüksek dozda yapay tatlandırıcı alanlarda mesane kanseri gelişme riskinde artış tespit edilmiştir (Sturgeon ve ark. 1994; Kırkalı ve ark. 2005).

Özellikle lenfoproliferatif ve miyeloproliferatif hastalıkların tedavisinde kullanılan siklofosamid mesane kanseri görülme oranını 9 kata kadar arttırmaktadır. Siklofosamidin ürüner metaboliti olan akroleinin mesane kanseri oluşumundan sorumlu olduğu düşünülmektedir. Siklofosamid mesane epitelinde hücrel anomalilere yol açarak, mesane mukozasında akut toksisite gösterir (Kırkalı ve ark. 2005)

Radyoterapi mesane kanseri için bilinen bir risk etmenidir. Serviks ya da over kanseri nedeniyle radyoterapi görmüş kadınlarda yalnız cerrahi tedavi gören kadınlara oranla mesane kanseri gelişme oranı 2-4 kat artmıştır. Bu hastalara radyoterapi ile beraber kemoterapi tedavisi de uygulandığında mesane kanseri gelişme sıklığı daha da artmaktadır (Kaldor ve ark. 1995).

#### 2.1.4. Mesane Kanserinde Koruyucu Etmenler

Mesane kanserinden korunma yollarından biri fazla sıvı tüketimidir. Bu yolla idrar miktarının artacağı ve karsinojen maddelerin idrardaki yoğunluklarının azalacağı ve ürotelyumla olan temas süresinin kısılacağı düşünülmüştür. 48.000 erkeği 10 yıllık bir süreçle takip eden Sağlık Profesyonelleri takip çalışması sıvı alımının mesane kanseri riskiyle ters orantılı olduğunu göstermiştir. Günde 6 bardaktan daha fazla su içen erkeklerin, günde sadece bir fincan su içen erkeklere göre mesane kanserine yakalanma sıklığında % 50 azalma olduğu tespit edilmiştir (Michaud ve ark. 1999).

Yüksek kalorili diyet ile beslenme sonucunda mesane kanseri görülme sıklığında artış olduğu gösterilmiştir. Kalori alımının insülin benzeri büyüme etmeni yoluyla tümör oluşumunu etkilediği sanılmaktadır. Bir kontrollü olgu çalışmasında IGF-1 (İnsüline Benzer Büyüme Etmeni) seviyeleri yüksek olan hastalarda mesane kanseri gelişiminin üç kat daha fazla olduğu ortaya konulmuştur (Zhao ve ark. 2003).

Bir çok çalışma yağlı diyet tüketiminin oksidatif stres ve serbest radikal oluşumu yoluyla kanser gelişmesine yol açtığını göstermektedir. İspanya’da yapılan çok merkezli ve olgu kontrollü çalışmada, doymuş yağların fazla miktarda alınmasıyla mesane kanseri riskinin önemli ölçüde arttığı gösterilmiştir. Diyetle alınan yağ miktarının azaltılması mesane kanseri ve diğer kanserlerin gelişme riskini azaltmak için potansiyel bir metod olarak önerilebilir (Steinmaus ve ark. 2000).

Yapılan bazı çalışmalarda, yüksek oranda meyve ve sebze içeren diyetle beslenen hastalarda mesane kanseri görülme sıklığının azaldığı gösterilmiştir (Steinmaus ve ark. 2000; Zeegers ve ark. 2004). Japonya’da atom bombasından kurtulan 39.000 kişide yapılan prospektif bir çalışmada, düzenli meyve ve sebze tüketiminin mesane kanseri oranını %50 azalttığı gösterilmiştir. Bu çalışmalar daha detaylı incelendiğinde sebzelerin meyvelerden daha koruyucu olduğu ve bu koruyuculuğun sigara içmeyenlerde daha etkili olduğu belirtilmektedir (Nagano ve ark. 2000).

Epidemiyolojik çalışmalar yeşil çay tüketimi ile mesane kanseri arasında ters yönde bir ilişki olduğunu göstermektedir. *In vitro* mesane modellerinde yeşil çay polifenollerinin mesane kanserine yol açan nitrozaminleri ve kromozom hasarını azaltarak karsinogenezi engellediği gösterilmiştir (Bianchi ve ark. 2000).



C vitamini bir antioksidan ve serbest radikal temizleyicisidir. C vitamininin DNA hasarına yol açan serbest radikalleri sınırladığı düşünülmektedir (Cohen ve ark. 2000). İnsanlar üzerinde yapılan bazı çalışmalar C vitamininin mesane kanseri gelişimine karşı koruyucu bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir (Leppert ve ark. 2006)

NSAİ ilaçlar, araşidonik asitten prostaglandin sentezini katalizleyen siklooksijenazların etkili baskılayıcılarıdır. NSAİ ilaçların çeşitli tümörlerde hücrel olaylara karıştığı ya da onlara etki ettiği gösterilmiştir. NSAİ ilaçların düzenli kullanılmasıyla mesane kanserinin önlenebileceği düşünülmektedir (Demirel 2007 pp. 331-345).

### **2.1.5. Mesane Kanserinde Tanı ve Tedavi**

Mesane kanserinde en sık görülen semptom ağrısız hematürüdür. Mikroskopik veya makroskopik hematüri hastaların yaklaşık %85'inde görülür. Daha az sıklıkla dizüri, sık idrara çıkma gibi semptomlar da gözlenebilir (Guimaraes ve Harisinghani 2005).

Mesane kanseri tanısında birçok görüntüleme ve tanı yöntemi kullanılmaktadır. Bu yöntemler; İntravenöz Ürografi (IVU), Ultrasonografi (USG), Bilgisayarlı Tomografi (BT), Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG), Sistoskopi, Mesane tümörlerinin rezeksiyonu, Mikroskopik sitoloji, Flowsitometri, Mesane tümör markerleri olarak sayılabilir (Özcan 2000 pp. 143-147).

Mesane kanseri tedavisinde kullanılan yöntemleri de sıralayacak olursak: Yüzeysel mesane tümörlerinde; Transüretral rezeksiyon (TUR), Lazer uygulaması, Adjuvan tedaviler ( Kemoterapi ve İmmünoterapi), İnvaziv mesane tümörlerinde ise; Radikal sistektomi, Parsiyel sistektomi, Radyoterapi, Radyosyana duyarlılığı artırıcı kemoterapi+radyoterapi yöntemleri kullanılmaktadır (Özkan ve Yalçın 2007 pp.324-331).

### 2.1.6. Mesane Kanserinin Moleküler Biyolojisi

Kanser hücreleri, apoptozdan kaçabilme, anjiyogenezi arttırma, kendine büyüme sinyalleri gönderebilme, büyüme sinyallerine duyarsız kalma, sınırsız eşleşme potansiyeli, doku invazyon yeteneği ve metastaz yapabilme özellikleri ile normal hücrelerden farklıdır (Hanahan ve Weinberg 2000 ).

Mesane kanserinin TCC tipinde moleküler ve genetik değişiklikler birbiriyle ilişkili 2 ana sınıfa ayrılabilir. Bunlardan birincisi karsinogenez sürecini başlatan kromozomal değişiklikler, ikincisi ise hücre döngüsü düzeninin değişmesi ve normal apoptotik sürecin bozulmasıyla tümör gelişimidir (Reuter 2006).

Mesane kanseri ile ilgili deneysel çalışmalarda, karsinojenlerin genomik DNA üzerinde oluşturduğu mutasyonlar onkogenlerde etkinleşmeye, tümör baskılayıcı genlerde ise etkisizleşmeye neden olur. Karsinojenlerin tümör baskılayıcı genlerde delesyon, amplifikasyon ve allel kaybına neden oldukları gösterilmiştir. Tespit edilen 40 farklı onkogenden ras, myc, c-abl, erb, K-sam, sis ve gip ailesine ait olanların çeşitli mutasyonlarla etkinleşerek insanlarda mesane kanseri gelişimine neden oldukları saptanmıştır. Bu onkogenlerin içinde ras; mesane, akciğer, kolon ve meme kanserlerinin yaklaşık %15'inden sorumlu tutulmaktadır (Luis ve ark. 2007). H-ras, K-ras ve N-ras genlerinden birinde 12, 13, 61 numaralı kodonlarda meydana gelen mutasyon ras protoonkogenlerini etkinleştirir. Her ras geninin farklı kanser türlerinde etkinleştiği gösterilmiştir. Örneğin akciğer, pankreas ve kolon adenokarsinomlarında K-ras geni mutasyonları bulunurken miyeloid lösemide N-ras geni mutasyonlarının daha sık olduğu gözlenmiştir. Mesane ve böbrek kanserlerinde ise H-ras geni mutasyon sonucu etkinleşmiştir (Williams ve Stein 2004).

Hücrel protoonkogenlerin etkinleşmesinde en sık rol oynayan mekanizmalar; tek nokta mutasyonları, gen amplifikasyonları, translokasyonlar, insersiyonlar ve delesyonlardır (Hanahan ve Weinberg 2000). Çeşitli çevresel karsinojen etkisi ile H-ras geninde ortaya çıkan mutasyonlar mesane kanserinin etiyolojisinde rol oynamaktadır. H-ras onkogeninin aşırı ifade edilmesinin mesane kanseri ile ilgili olduğu düşünülmektedir (Fontana ve ark. 1996).

c-myc gen ailesini kapsayan kromozomal translokasyon ve gen amplifikasyonu gende yeni bir düzenlenmeye yol açarak hücrel çoğalmayı arttırmaktadır. c-myc

onkogeninin aşırı ifade edilmesinin mesane kanseri ile ilgili olduğu düşünülmektedir (Williams ve Stein 2004).

Genetik analizler sonucunda tümör baskılayıcı genlerin yer aldığı çeşitli kromozom bölgelerindeki delesyonlar (3p, 4p, 8p, 9p, 9q, 11p, 13q, 17p ve 18q) veya amplifikasyonlar da (5p ve 20q) mesane kanseri oluşumunda önemli rol oynamaktadır (Sandberg ve Berger 1994). Mesane, kolon, özefagus, karaciğer, meme, akciğer ve beyin tümörlerinde p53 mutasyonları gözlenmektedir (Cote ve ark. 1998). Mesane kanserlerinin de yaklaşık %33'ünün p53 mutasyonu içerdiği ve p53 geninin 5. 6. ve 8. ekzonlarında meydana gelen bu mutasyonların, genin etkisizleşmesine neden olduğu görülmüştür. (Fauceglia ve ark. 2006). Rb geni de mesane kanseri gelişiminde önemli rol oynayan genlerden biridir. Rb geninin mutasyon ya da delesyon yoluyla etkisizleşmesi ile hücreler G1'den S evresine daha kolay geçer, bu da kontrolsüz hücre çoğalmasını tetikler. Rb geninin mutasyonları, kasa invaziv ve ileri evre mesane kanserli hastalarda daha sık gözlenmekle birlikte, mesane tümörlerinde bu mutasyonlara %25-30 oranında rastlanmaktadır (Shariat ve ark. 2004).

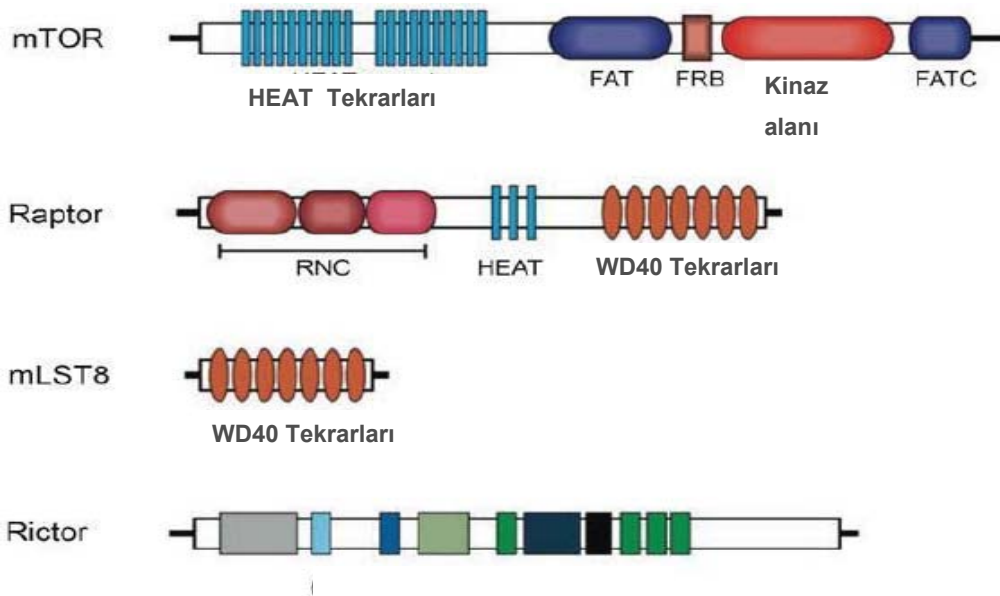
Arilaminlerin zehirsizleştirilmesinde, bireyler arasında yavaş ve hızlı zehirsizleştirme özelliğine sahip fenotip bulunmaktadır. Ve buna bağlı olarak yavaş zehirsizleştirme yapan bireylerin arilaminlere maruz kalmaları durumunda mesane kanseri görülme olasılığı prokarsinojenleri zehirsizleştiremediklerinden dolayı daha yüksektir. (Messing 2005 pp.2731-2784). Birçok çevresel karsinojen başlangıçta kimyasal olarak etkisizdir ve metabolik olarak etkinleşmesi gerekmektedir. Karsinojenlerin metabolik olarak etkinleşmesi ve zehirsizleştirilmesi arasındaki dengenin kanser gelişiminde önemli olduğu düşünülmektedir. Mesane kanseri için özellikle önemli bir risk etmeni olan arilaminleri metabolize etme ve zehirsizleştirme tepkimelerinde görev alan CYP 1,2,3 (sitokrom P450 ailesi), NAT1, NAT2 (N-asetil transferazlar), GSTM1, GSTT1 (Glutatyon-S-transferazlar) genleri çeşitli polimorfizmler bulunan genlerdir (Franekova ve ark. 2008). Bu polimorfizmlerden dolayı arilaminlerin zehirsizleştirilmesinde kişiden kişiye farklılık ortaya çıkmakta ve bireyler arasında mesane kanser gelişimi açısından bulunan bu polimorfizmlerin önemli katkılar olduğu öne sürülmektedir.

Hücre büyümesinde önemli rolü olan mTOR sinyal yolağının etkinleşmesi ile tetiklenen, önemli bir hücre içi sinyal ileti yolu olan PI3K yolağında birçok kanser

türünde aksaklık bulunmuştur (Vivanco ve Sawyers 2002). mTOR sinyal yolağının etkinleşmesinde kilit rol alan Rheb proteini Ras'a benzer yapı gösteren, Ras ailesine aday, GTP bağlayabilen ve hidrolizleyebilen özellikte önemli bir hücre zar proteinidir (Basso ve ark. 2005). Son yıllarda Rheb'in bir protoonkogen olduğu düşünülmektedir. Mesane kanserindeki rolü henüz tam açıklığa kavuşmasa da Rheb geninin aşırı ifade edilmesinin kanserleşmede önemli rolü olduğu düşünülmektedir (Holland ve ark 2004).

## 2.2. mTOR( Mammalian Target of Rapamisin) Karmaşımı

mTOR, serin treonin kinaz özelliğine sahip olup hücre zarında yerleşim gösteren karmaşık bir proteindir (Virgilio ve Loewith 2006). mTOR proteini 2549 amino asitten ve korunmuş 7 yapısal bölgeden oluşur. mTOR proteini mayalardan ökaryotlara kadar yapısı fazla değişmeden korunarak gelmiştir (Bjornsti ve Houghton 2004). Şekil 2-2'de mTOR'un yapısı görülmektedir.



Şekil 2-2: mTOR'un Yapısı- Yang, (2007)'dan

mTOR proteini mTOR Karmaşımı 1, (mTOR C1) ve mTOR Karmaşımı 2 (mTORC2) olmak üzere iki karmaşımdan oluşur (Long ve ark. 2005).

### **2.2.1. mTOR Karmaşımı 1**

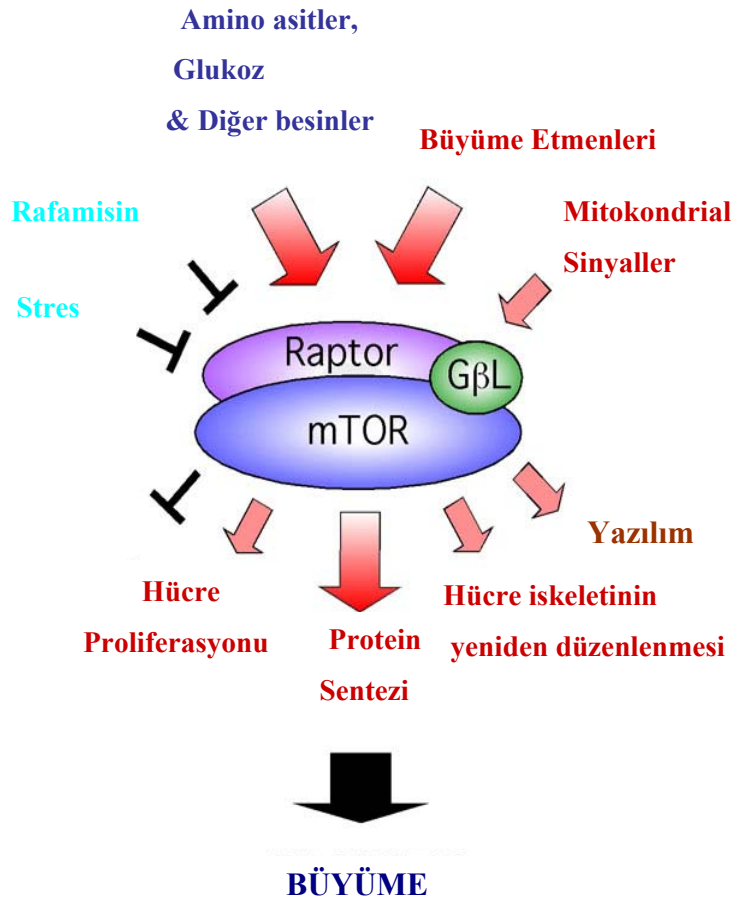
mTORC1, Raptor ve Lst8/GβL diye adlandırılan iki proteinden oluşmaktadır. mTOR proteini rapamisin adlı antifungal ilacın hedefi olması ve bu ilaçla etkisiz hale gelebildiği için bu adı almıştır. Rapamisin, mTORC1'de yer alan raptor proteinine bağlanarak mTOR'un etkisizleşmesini sağlar (Guertin ve Sabatini 2005; Long ve ark. 2005). 150 kDa büyüklüğünde bir protein olan raptor substratlara bağlanma özelliği olmasına rağmen mTORC2'nin böyle bir özelliği bulunmamaktadır. Literatürlerde mTOR olarak adı geçen mTORC1'dir (Sarbasov ve ark. 2005).

### **2.2.2. mTORC2 Karmaşımı 2**

Aktin hücre iskeletinin düzenlenmesinden sorumlu olan mTORC2 ise Rictor ve Lst8/GβL adlı iki proteinden oluşmaktadır (Hara ve ark. 2002).

### **2.2.3. mTOR Sinyal Yolağı**

mTOR sinyal yolağı memelilerde, organizmanın büyüme ve gelişmesine göre, ortamdaki amino asit, glukoz, kolesterol, demir seviyeleri, IGF (İnsüline benzer büyüme etmeni), EGF (Epidermal Büyüme Etmeni), VEGF (Vasküler Endotelial Büyüme Etmeni), PDGF (Trombosit Kökenli Büyüme Etmeni), stres, hipoksi, DNA hasarı, ısı şoku, ozmotik stres, oksidatif stres ve mitojenler ile düzenlenmektedir (Crespo ve Hall 2002; Garami ve ark. 2003; Huang ve Houghton 2003). Şekil 2-3de mTOR sinyal yolağı görülmektedir.

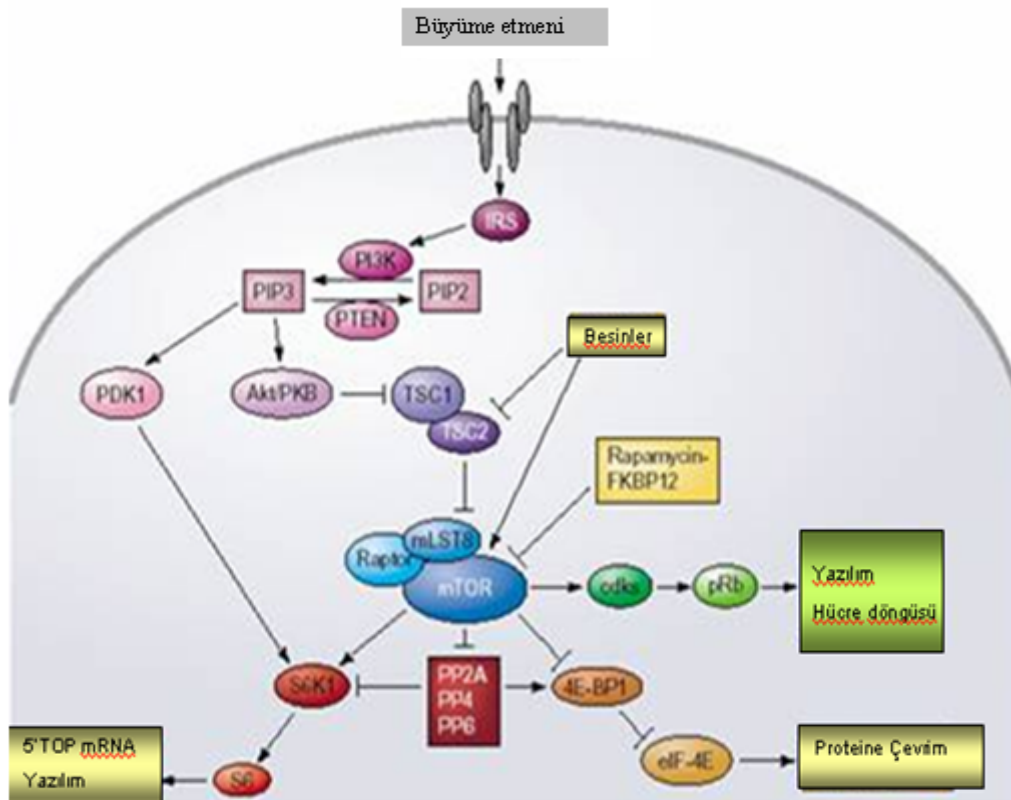


Şekil 2-3 mTOR Sinyal Yolağı (<http://www.wi.mit.edu/news/archives/2003/img/mtor.jpg>)

Normal hücrelerde mTOR sinyal yolağı, herhangi bir büyüme etmeninden almış olduğu sinyal veya glukoz ve amino asit seviyeleri ile düzenlenmektedir. Büyüme etmenlerinden biri tarafından sinyal yolağı etkinleştiginde; PI3K'ı etkinleşir. PI3K'nın tetiklenmesi PKB'nin etkinleşmesine PKB de Rheb'in engelleyicisi olan TSC1/TSC2'yi fosforilleyerek onların etkisizleşmesine neden olur (Kwiatkowski 2003; Aspuria ve Tamanoi 2004). Rheb-GDP/Rheb-GTP haline dönüşerek, Rheb-GTP mTOR'u etkinleştirir. mTOR Kinaz (S6K) ve 4EBP'i fosforiller. Fosforillendiği zaman S6 kinaz etkinleşerek, 5'TOP mRNA'ların yazılımını uyarır, böylece ribozom biyogenezi artar (Buerger ve ark. 2006). Çevirimsel Engelleyici 4E-BP1'in fosforillenecek engellenmesi ile eIF4E etkinleşir. Ökaryotik başlatıcı etmen eIF4E, 4E ile bağlanan proteini (4E-BP) etkisizleştirerek, 4E'nin serbest hale gelmesini sağlar. Etkinleşen 4E de ribozomal proteinlerin çevirimini uyarır ve protein çevirimi artar ( Sarbassov ve ark 2005).

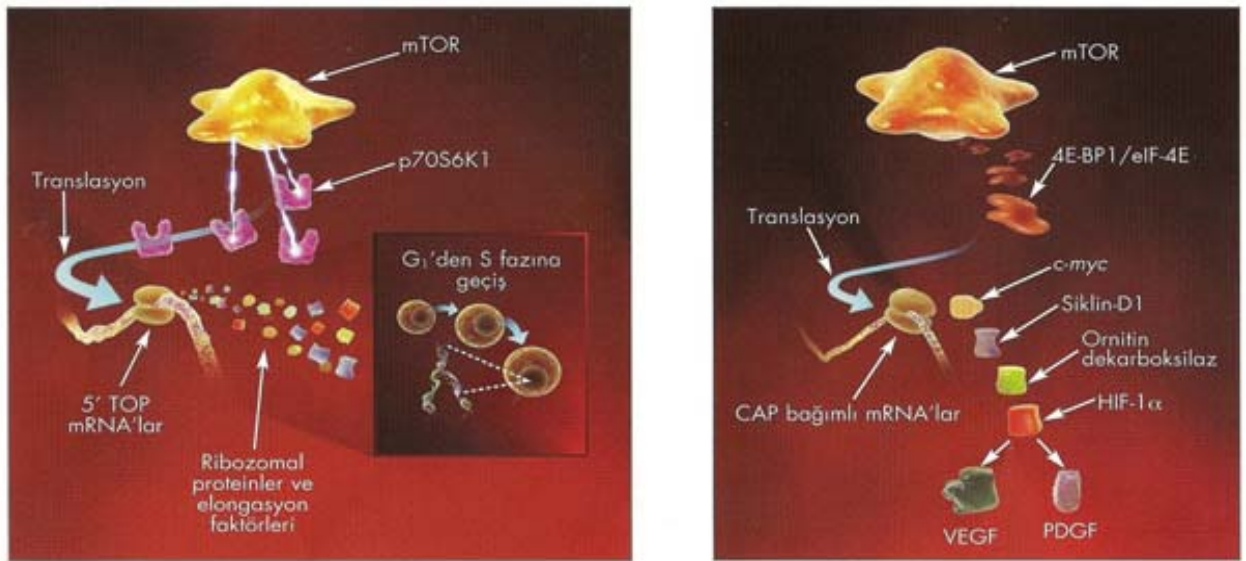
5'TOP mRNA'lar, hücredeki RNA miktarının %20'sini oluşturur ve proteine çevirim işlevinde etkilidirler. 4E proteini de, bu mesajların yazılımında etkili olduğundan sonuçta protein sentezi artar (Sekulic ve ark. 2000; Nicholson ve Anderson 2002).

mTOR sinyal yolağının etkinleşmesi çeşitli proteinlerin sentezinin artışına neden olur. mTOR'un etkinleşmesi ile hücre döngüsü düzenleyicisi olan Siklin D1'in (Nelsen ve ark. 2003); anjiyogeneze yol açan HIF-1 $\alpha$  ve HIF-2  $\alpha$  (Land ve Tee 2007); hücrelerin sağkalımında görevli P21 ve survivin (Ku ve ark. 2004); besinlerin hücre içine alınmasında ve taşınmasında görevli GLUT1 ve LAT proteinlerinin sentezi artar (Taha ve ark. 1999). Örneğin, sentezi artan proteinlerden olan survivin apoptoz önleyici bir proteindir. Mesane kanserli hastaların dokularında yapılan immünohistokimyasal ve RT-PZR çalışmalarında survivin ifadesinin artmış olduğu gösterilmiştir. Survivin aynı zamanda mesane kanserli hastaların tanısında tümör belirteci olarak kullanılmaktadır (Schultz ve ark. 2003; Ku ve ark. 2004). Ayrıca mesane tümörlerinde Siklin D1'in de sentezinin artmış olduğu gösterilmiştir (Lee ve ark. 1997). Büyüme etmeni ile tetiklenen mTOR yolağı Şekil 2-4'de görülmektedir.



Şekil 2-4: Büyüme Etmeni İle Tetiklenen mTOR Sinyal Yolağı Huang (2003)'dan

Hücre döngüsünde artan Siklin D1 CDK4,6 (Siklin bağlı kinaz) ile birleşerek, hücre döngüsünde G1'den S'e geçişi dolayısıyla DNA eşlenmesi ve hücre sayısının artmasını sağlamaktadır (Edinger ve Thompson 2003). Şekil 2-5'de mTOR ile p70S6K1 ve 4E-BP1'in düzenlenmesi görülmektedir

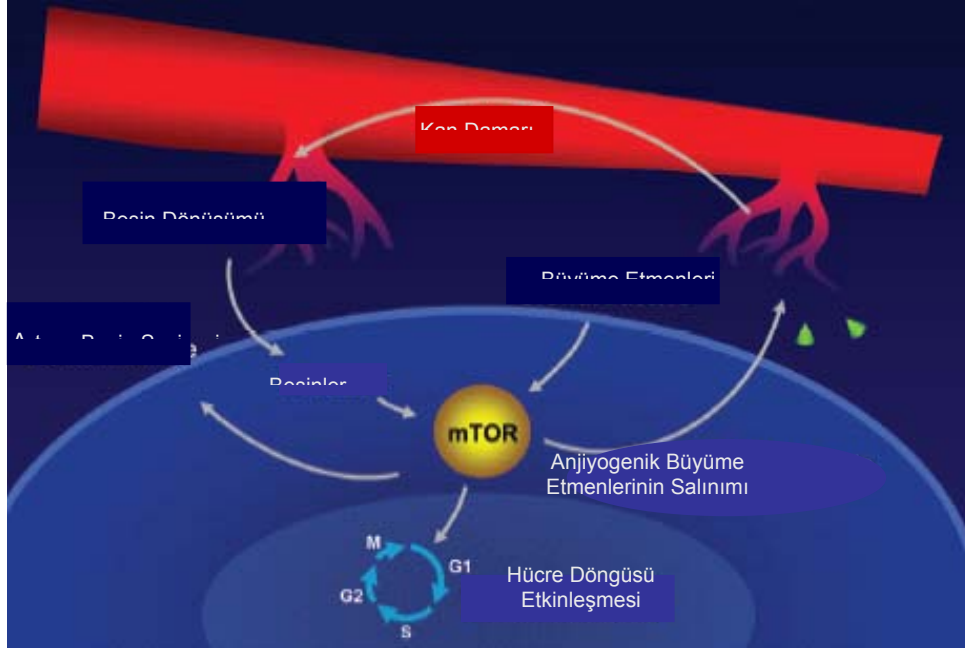


**Şekil 2-5: mTOR ile p70S6K1 ve 4E-BP1'in düzenlenmesi Adjei (2005)'den**

Bu yolağı etkisizleştiren proteinler TSC1(Hamartin), TSC2 (Tuberin) ve pTEN'dir (Phosphatase and tensin homologue deleted ). TSC1 ve TSC2, Rheb'in Rheb-GDP halinde kalmasını sağlayarak Rheb'in mTOR'u etkinleştirmesini engellerler. pTEN ise fosfataz özelliği ile bu etkinliği sağlar (Dancey 2005).

Şekil 2-6'da mTOR sinyal yolağı ile etkinleşen hücre döngüsü görülmektedir.



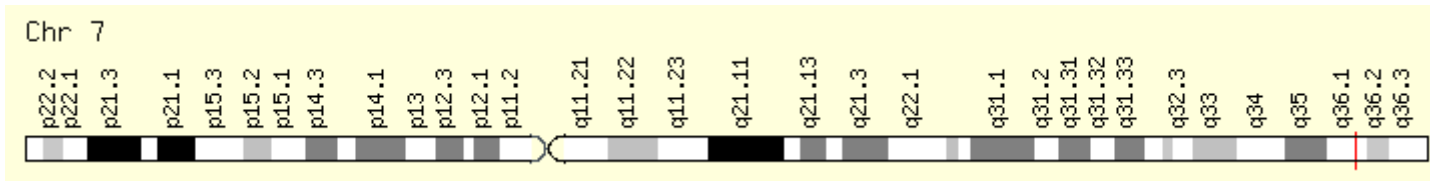


**Şekil 2-6: mTOR sinyal yoluyla etkinleşen hücre döngüsü**

([http://www.targetmtor.com/pdfs/Why\\_mTOR\\_in\\_Renal\\_Cell\\_Carcinoma.pdf](http://www.targetmtor.com/pdfs/Why_mTOR_in_Renal_Cell_Carcinoma.pdf))

### **2.2.2.1.2.2.3.1. mTOR Sinyal Yolağında Rol Oynayan Rheb ( Ras homologue enriched in brain)**

Rheb (Ras homology enriched in brain) proteinleri Ras'a benzer yapı gösteren, Ras ailesine aday, GTP bağlayabilen ve hidrolizleyebilen önemli bir hücre zar proteinidir. Rheb geni 7q36'da yerleşik olup 8 ekzondan oluşmaktadır. Rheb proteini 20-30 kDa büyüklüğündedir (Basso ve ark. 2005). Rheb mRNA uzunluğu ise 1376 bp olmakla birlikte Rheb proteini 184 amino asitten oluşmaktadır. Şekil 2-7'de Rheb geninin 7. kromozomdaki yeri görülmektedir.



**Şekil 2-7: Rheb geninin 7. kromozomdaki yeri**

(<http://www.genecards.org/pics/loc/GC07M150794.RHEB.png>)

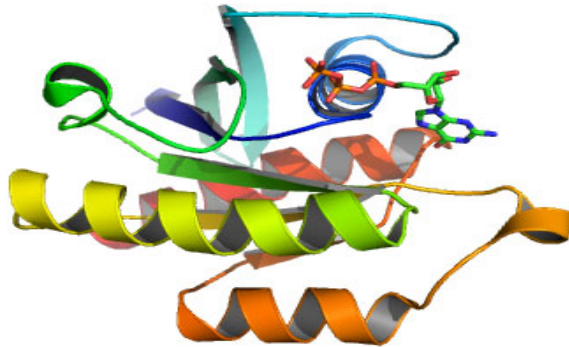
Şekil 2-7'de Rheb geninin 7. kromozomdaki yeri kırmızı çizgi ile belirtilmiştir.

Rheb proteinleri tıpkı bir düğme gibi iş görür ve GTP bağlı etkin ve GDP bağlı etkin olmayan olarak iki formları vardır. Hücrede iki sınıf sinyal proteini Rheb'in etkin ve etkin olmayan dönüşmesini düzenler.

1-GAP (GTPaz etkinleştirilen protein) Rheb'e bağlı GTP'nin hidroliz hızını arttırmaları. Bu şekilde Rheb etkin olmayan hale gelir.

2- GNRF (Guanin Nükleotid Serbestleştirme Etmeni) GDP'yi GTP 'ye çevirir ve sonuçta sitozolden GTP alınır böylece Rheb etkinleşir (Findlay ve ark. 2005).

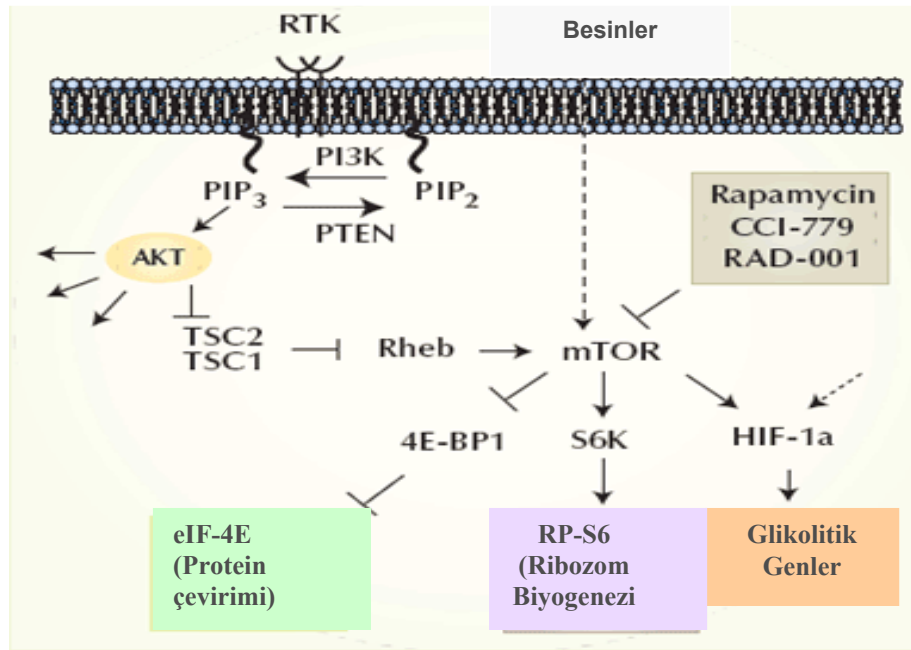
Tüm monomerik GTPazlar gibi Rheb proteinleri de hücre zarının sitoplazmik yüzeyine karboksil (C) ucunda oluşan farnesillenme sayesinde tutunur. C ucunda kovalent bağlı fenil içerirler. Farnesillenme olayı farnesil transferaz enzimi tarafından yapılmaktadır (Basso ve ark. 2005). Rheb proteini GTP hidrolizleyebilen özelliği ile hücre büyümesi, hücre gelişimi ve hücre döngüsünün düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır (Aspuria ve Tamanoi 2004). Şekil 2-8'da Rheb-GTP görülmektedir



**Şekil 2-8 GTP bağlı Rheb** (<http://drugdiscoveryopinion.com/images/rheb.jpg>)

Rheb proteini hücre büyümesinde önemli olan mTOR sinyal yolağının tetiklenmesinde kilit rol oynamaktadır. Rheb GTP bağlı olduğunda mTOR sinyal yolağını tetiklemektedir. TSC1 ve TSC2, Rheb'in Rheb-GDP halinde kalmasını sağlayarak Rheb'in mTOR'u etkinleştirmesini engellerler. TSC1/TSC2 tümör baskılayıcı gen ailesine ait olup Rheb'i GTP bağlı konumdan GDP bağlı konuma getirerek onu negatif yönde etkilemektedir. TSC1/TSC2 Rheb'i bu şekilde engelleyerek TOR sinyal yolağını da negatif yönde düzenlemektedir (Inoki ve ark 2003; Zhang ve ark. 2003). Hücrelerde TSC1/TSC2 etkinliği ortamdaki ATP (Adenozin Tri Fosfat)

enerji seviyesi, glukoz amino asit seviyesi ve büyüme etmenlerinin uyarısına bağlı olarak değişmektedir. Örneğin ortamdaki amino asit ve glukoz yeterli değilse hücre ATP seviyeleri düşer ve bu durumda AMP (Adenozin Mono Fosfat ) artar AMP de AMPK'ı (Adenozin Mono Fosfat Kinaz) etkinleştirir. AMPK da TSC1/TSC2 heterodimerini etkinleştirir. TSC1/TSC2 Rheb-GTP'yi Rheb-GDP haline getirerek Rheb'i engellerler. Bu şekilde mTOR sinyal yolağını da negatif yönde düzenlemektedir. Eğer ortamda amino asit ve glukoz seviyesi yüksek ve büyüme etmeni uyarısı yeterli ise; hücre ATP enerji seviyeleri yükselir ve AMP seviyesi de düşer. Bu durumda AMPK da TSC1/TSC2'yi etkinleştiremez. Etkin olmayan TSC1/TSC2 Rheb'i engelleyemez ve Rheb-GTP mTOR sinyal yolağını etkinleştirir (Hara ve ark. 2002, Nobokuni ve ark. 2005). Rheb'in mTOR'a etkisi Şekil 2-9'da görülmektedir.



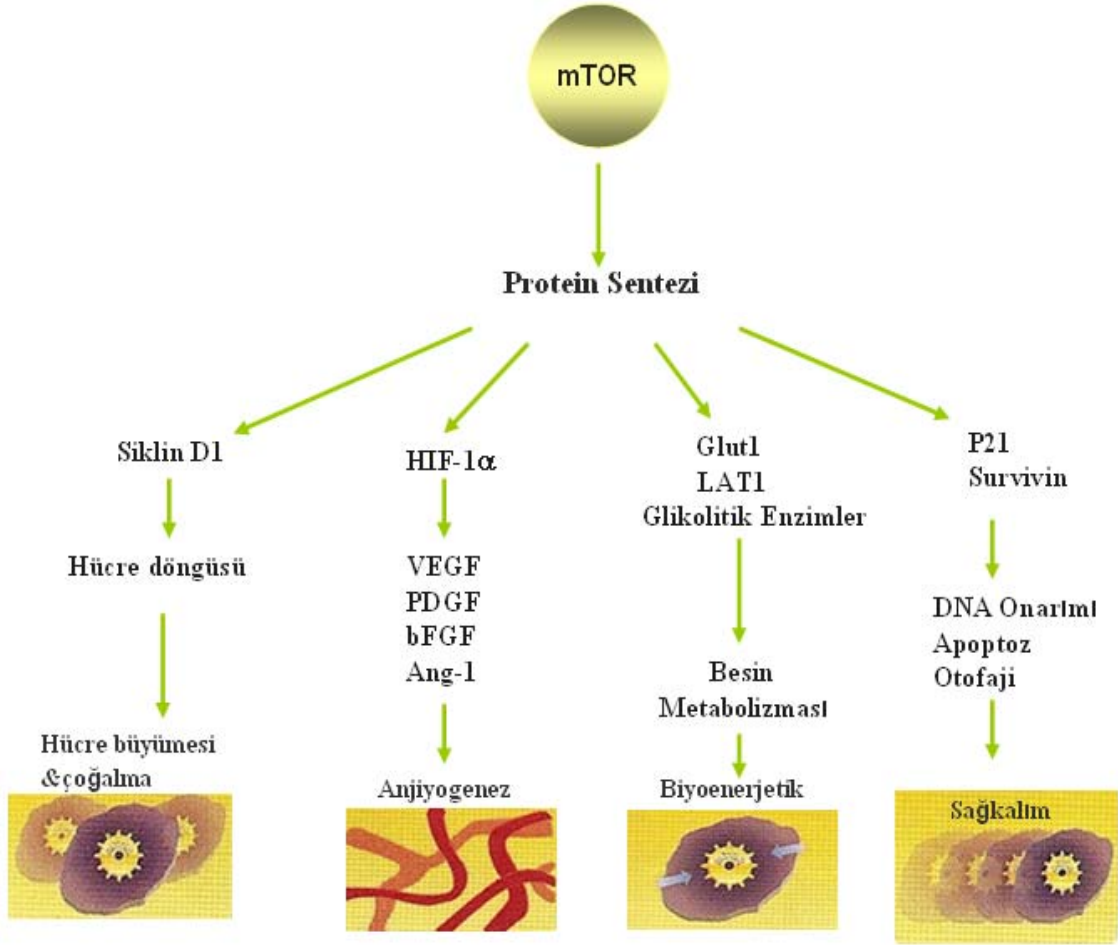
**Şekil 2-9** Rheb'in mTOR'a Etkisi

(<http://www.medscape.com/content/2004/00/48/13/481328/art-nm481328.fig1.gif>)

#### 2.2.3.2.2.4. mTOR Rheb ve Kanser

mTOR sinyal yolunun, birçok kanser türünde önemli etkisi olduğu bilinmektedir. mTOR temel olarak hücre çoğalması, hücre büyümesi ve hücre sağkalımında rol oynar (Bjornsti ve Houghton 2004; Janus ve ark. 2005). mTOR, fosfotidil 3-kinaz (PI3K) ile ilişkili bir serin treonin kinazdır (Janus ve ark. 2005). Hücre bulunduğu ortamda besin maddelerinin ve büyüme etmenlerinin miktarının arttığı algılandığında mTOR sinyal yolu etkinleşir (Huang ve Houghton 2003). mTOR etkinleştiğinde yazılım sürecini başlatan p70S6K1 ve 4EBP fosforillenir. 4EBP' nin fosforillenerek engellenmesi ile eIF4E etkinleşir. Etkin hale gelen 4E de proteinlerin çevirimini uyarır ve çeşitli proteinlerin sentezi artar. Sonuç olarak, 4EBP1 ve p70S6K1 yolları aracılığıyla, mTOR hücre döngüsünü G1'den S evresine geçirecek olan mRNA'ların yazılımı düzenlenmektedir (Hay ve Sonenberg 2004; Adjei ve Hidalgo 2005).

mTOR sinyal yolağının aşırı etkinleşmesi hem yeni tümör hücrelerinin oluşmasını hem de oluşan tümör hücrelerinin devamını sağlar. Oluşan tümör hücrelerinin devamı için de gerekli proteinlerin sentezi sağlanmaktadır. HIF-1 $\alpha$  (Hipoksi ile uyarılmış etmen 1- $\alpha$ ) proteininin sentezinin artması ile VEGF, PDGF, FGF, Ang-1 etmenleri etkinleşir ve anjiogenez artırılarak kanser hücrelerinin beslenmesi sağlanır. Glut1, LAT1, Glikolitik enzimlerin sentezinin artmasıyla kanser hücrelerine besin taşınımını sağlayarak kanser hücrelerinin beslenmesi sağlanır. P21 ve Survivin'in sentezinin artmasıyla da kanser hücrelerinin sağkalımı sağlanır (Powis ve Kirkpatrick 2004; Vaupel 2004). (Şekil 2-10).



Şekil 2-10: Kanser hücrelerinde mTOR'un etkisi –Land (2007)'dan.

mTOR sinyal yolağının etkinleşmesiyle sayısız proteinin sentezi artabilir. Sentezlenen proteinlerin, büyüme etmenleri, onkoproteinler veya hücre döngüsünü düzenleyen proteinler olması mTOR'un önemini ortaya koymaktadır. Bu protein seviyelerinin artışı da hücre bölünme hızını artırmaktadır. Örneğin, sentezlenen proteinin EGF (Epidermal Büyüme Etmeni) olduğu varsayılırsa hücre, sürekli bir büyüme sinyali uyarısı ile tetiklenir. Ortamda yüksek seviyede büyüme etmeni bulunursa bu uyarı tekrarlanır ve hücrede kontrolsüz bir şekilde büyür ve çoğalır (Mita ve ark. 2003). Kontrolsüz hücre çoğalması ve farklılaşması da kanserleşmeye neden olabilmektedir (Bjornsti ve Houghton 2004).

mTOR yolağının düzenli işleyişinin bozulması; örneğin pTEN'in mutasyona uğrayarak tümör baskılayıcı özelliğini kaybetmesi, TSC1 veya TSC2'de bir mutasyon oluşması ile Rheb'in aşırı etkinleşmesi gibi birçok nedenle karsinogenez tetiklenebilir (Rosner ve ark. 2006). İnsanlarda görülen çeşitli kanserlerde PI3K/Akt-mTOR yolundaki bozukluklar Tablo 2-2'de görülmektedir.

**Tablo 2-2: İnsanlarda görülen kanserlerde PI3K/Akt-mTOR yolundaki bozukluklar**

<b>Bozukluk</b>	<b>İşlev</b>	<b>Tümörler</b>
<b>Büyüme etmen reseptörleri (EGFR, PDGR, IGFR, IL-2)</b>	Onkogen	Akciğer, mesane, over, endometrium, serviks, prostat karsinomları, glioma, lenfoma
<b>PI3K</b>	Onkogen	Over
<b>PTEN</b>	Tümör baskılayıcı gen	Böbrek hücreli karsinom, prostat, endometrium, meme kanserleri, melanom, glioblastoma, karaciğer, sindirim sistemi, akciğer, tiroid, lenfoid
<b>Akt (Protein Kinaz B)</b>	Onkogen	Meme, gastrik, over, pankreas, prostat karsinomları
<b>eIF-4E</b>	Onkogen	Meme, mesane, baş ve boyun karsinomları, lenfoma
<b>Siklin D</b>	Onkogen	Mantle hücreli lenfoma, meme, baş ve boyun karsinomları
<b>P16</b>	Tümör baskılayıcı gen	Ailesel melanom, pankreas karsinomları

Mesane kanserli hastaların %12 'sinde TSC1 mutasyonu tespit edilmiştir (Luis ve ark. 2007, Adachi ve ark. 2003). TSC1'de mutasyon olduğunda Rheb'i engelleyemez ve Rheb aşırı ifade edilebilir. TSC mutasyonları gözlenen kişilerde bazı habis ve selim tümörlerin oluşumu gözlenmiştir (Luis ve ark. 2007).

Son yapılan çalışmalar, mTOR sinyalinin apoptozu düzenlediğini, çoğu kanserde ve bir çok hastalıkta önemli olduğunu göstermektedir (Holland ve ark. 2004).

Rheb geninin aşırı ifade edilmesi hücre döngüsünde S evresinin uzamasına G2/M'e geçişin kolaylaşmasına, G1 evresinin kışalmasına yol açarak hücre bölünme hızını arttırmaktadır. Bu da kontrolsüz hücre çoğalmasını sağlayarak kanserleşmeye neden olabilmektedir (Holland ve ark. 2004).

#### **2.2.3.1.2.2.4.1. mTOR Engelleyicisi Rapamisin'in Kanser Tedavisinde Yeri**

mTOR'un PI3K sinyal iletim yolunu etkinleştirerek, hücrel katabolizma, anabolizma, çoğalma, hücre döngüsü kontrolü, anjiyogenez ve apoptozda temel bir düzenleyici olduğu yaygın oranda kabul görmüştür. Bu nedenlerden dolayı mTOR kanser tedavi ilaçlarının ve maddelerin hedefi olmaktadır (Bjornsti ve Houghton 2004).

Rapamisin; antifungal etkili, organ transplantasyonlarında bağışıklık sistemini baskılayıcı olarak da kullanılan bir ilaçtır (Kahan ve ark. 1991; Inoki ve ark. 2005).

mTOR proteini rapamisin adlı antifungal ilacın hedefidir ve bu ilaçla etkisiz olabilmektedir. Rapamisin MTORC1'de yer alan raptor proteinine bağlanarak mTOR'un etkisiz hale gelmesini sağlamaktadır. Rapamisin'in bu etkisinin yapılan bazı çalışmalarda kanser tedavisinde kullanılabileceği düşünülmüştür. Nitekim Zeng ve arkadaşlarının yaptığı klinik çalışmalar doğrultusunda, rapamisin ve türevlerinin mTOR'u engellenmesi ile etkili bir kanser tedavisi yapılabileceği düşünülmektedir (Chen ve Fang 2002; Zeng ve ark. 2007).

Kanser hücrelerinde, mTOR'un engellenmesi hücre döngüsünü düzenleyici genleri engelleyebilir ve hücre sağkalımı ile ilişkili olan anjiyogenik büyüme faktörlerinin aşırı mRNA ifadesini engelleyebilir. Dolayısıyla bu durumun kanser tedavisinde önemli bir gelişme olduğu düşünülmektedir (Hudson ve ark. 2002; Hay ve Sonenberg 2004;).

Ulusal Kanser Enstitüsü tarafından insan kanser hücre soylarında rapamisin kansere karşı ajan olarak kullanılmış ve birçok tip kanser hücre soylarında kansere karşı etkisi gösterilmiştir. Rapamisin'in, mTOR sentez artışı görülen tümörlerde de tümör karşıtı etki gösterdiği bildirilmektedir (Sekulic ve Hudson ve ark.2000; Nicholson ve Anderson 2002).



### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. GEREÇ

Çalışmamızda İ.Ü. Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı ve Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi Üroloji Servisi'ne 2006- 2008 tarihleri arasında mesane kanseri tanısı ile başvurmuş, ameliyatına karar verilmiş hastalardan alınan tümör ve normal doku örnekleri kullanılmıştır. Hastalardan ameliyat sırasında alınan tümör ve normal doku örnekleri buz içinde çalışmanın yapılacağı İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Moleküler Genetik Laboratuvarına nakledilerek sıvı azot içerisinde saklanmıştır. Ortalama yaşları 64 ( $\pm 17$ ), 50'si erkek 3'ü kadın olan 53 mesane kanserli hastanın (aile hikayeleri gözetilmeksizin) tümör dokularında ve 23'ünün peritümöral normal dokularında hücre büyümesi ile ilgili mTOR yolağında yer alan Rheb geninin nicel ifade düzeyleri belirlenmiştir. Çalışma İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurul'unun 7.12.2006 tarih ve sayılı kararı ile uygun görülmüştür.

#### 3.1.1. Kimyasal Maddeler ve Malzemeler

Agaroz (Sigma-ALMANYA), Borik Asit (Applichem-ALMANYA), Bromofenol mavisi (Amresco-ABD), Deoksiribonukleotidtrifosfatlar (Roche-ALMANYA), Dietilpirokarbonat (DEPC) (Sigma-ALMANYA), DNA marker (MBI Fermentas-LİTVANYA), DNase1 (Promega-ABD), Etanol Absolü (Riedel de Haen-ALMANYA), Etidyum Bromür (Merck-ALMANYA), Etilendiamin tetraasetikasit (EDTA) (Sigma-ALMANYA), Fenol (Amresco-ABD), Formaldehit (Carlo Erba-FRANSA), Hibridizasyon Probları (TIB-MOLBIOL), Primerler (Fermentas- Amerika), Sodyum Asetat ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ) (Sigma-ALMANYA), Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) (Sigma-ALMANYA), Sodyum Hidroksit (NaOH) (Sigma-ALMANYA), Sodyum Klorür (NaCl) (Sigma-ALMANYA), Sukroz (Sigma-ALMANYA), Tris bazı (Sigma-ALMANYA),

- **h-G6PDH Housekeeping Gen Set** (h-G6PDH Tespit Karışımı-10X, MgCl<sub>2</sub>-25mM, h-G6PDH Standart1,2,3,4,5) (Roche-ALMANYA).
- **Fast Start DNA Master Hibridizasyon Prob Kiti** (Light Cycler Fast Start Enzim, Light Cycler Fast Start Reaksiyon Karışımı HybProb, MgCl<sub>2</sub>-25mM) (Roche-ALMANYA)
- **SV Total RNA İzolasyon Sistemi** (Nükleazsız su, RNA Parçalama Tamponu, RNA Sulandırma Tamponu, MnCl<sub>2</sub>, 0,9M, Yellow Core Tamponu, DNaz I, RNA Yıkama Tamponu, Spin Kolon, Elüsyon tüpleri, DNase Durdurma Tamponu, β-merkaptto etanol (Promega-ABD).
- **cDNA Sentez Kiti** (Ters Transkriptaz Tepkime Tamponu 5X, RNaz inhibitör 40U/μL, Deoksinükleotid karışımı-herbiri 10mM, Ters Transkriptaz enzimi 20U/μL, Oligodt Primer 600pmol/μL, Protector Rnase inhibitor, Reverse Transcriptase Enzyme (Roche-ALMANYA).
- Lightcycler Kapillerleri (Roche- ALMANYA ).

### 3.1.2. Kullanılan Cihazlar

- Derin dondurucu (-20<sup>0</sup>C) (Beko)
- Derin dondurucu (-80<sup>0</sup>C) (Sanyo)
- Etüv (Heraus-ALMANYA)
- Güç Kaynağı (Bio-Metra-ALMANYA)
- Jel Görüntüleme Sistemi (Vilber Lourmat Cedex-FRANSA)
- Gerçek zamanlı termal döngü cihazı (Roche Diagnostics, İSVİÇRE)
- Manyetik Karıştırıcı (Snijders-HOLLANDA)
- Nanodrop Spektrofotometre (ND-1000-ABD)
- Otoklav (Hirayama-JAPONYA)
- Otomatik pipetler (Eppendorf-ABD)
- pH Metre (Metler-Toledo-ABD)
- PZR Cihazı (Techne-İNGİLTERE)
- Sıvı Azot Tankı (Thermo)

- Soğutmalı mikrosantrifüj (Hettich-ALMANYA)
- Terazi (Metler-ABD)
- UV transilluminator (Vilber Lourmat Cedex-FRANSA)
- Vorteks (Nüve-TÜRKİYE)
- Yatay elektroforez sistemi (Thermo)

### 3.1.3. Tampon ve Çözeltiler

#### 3.1.3.1. RNA Eldesinde Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

SV Parçalama Tamponu:	4M Guanidyumizotiyosiyanat 0,01M Tris (pH:7,5) %0,97 $\beta$ -merkaptoetanol
SV Yıkama Tamponu:	162,8mM Potasyumasetat 27,1mM Tris-HCl (pH:7,5)
SV DNase Durdurucu Tampon:	5M Guanidinyumizotiyosiyanat 10mM Tris-HCl (pH:7,5)
DNase I Karışımı:	0,0225 Tris 1,125 M NaCl 0,0025% sarı renkli boya 0,09M MnCl <sub>2</sub> 5 $\mu$ l DNase I

### 3.1.3.2. cDNA Sentez Tepkimesinde Kullanılan Tampon

10 X Tampon: 250mM Tris-HCl  
150mM KCl  
40mM MgCl<sub>2</sub>

RNaz inhibitör 40U/ $\mu$ L

Deoksinükleotid karışımı-herbiri 10mM

Ters Transkriptaz enzimi 200U/ $\mu$ L

Primerler 600pmol/ $\mu$ L

### 3.1.3.3. Agaroz ve Formaldehidli Jel Elektrofrez Tamponları

10 X TEB (Tris Borat Tamponu) (1lt): 5M Tris Bazı  
0,02M EDTA (pH:8,0)  
0,88M Borik Asit

Etidyum Bromür: 10mg/ml

10 X Yükleme Tamponu (10ml): 4gr sukroz  
0,025gr Bromofenol mavisi

RNA Denatürasyon Tamponu: %95 Formamid  
%40 Formaldehid

### 3.1.3.4. Kullanılan Jeller

%2'lik agaroz jel:	0,6gr agaroz
30ml 0,5 X TEB tamponu	1,5µl Etidyum Bromür
Formaldehitli jel:	0,2M MOPS
	50mM Sodyum Asetat
	5mM EDTA

### 3.1.3.5. LC h-G6PDH Housekeeping Gene Set Kitinde Bulunan Tamponlar

h-G6PDH Tespit Karışımı

Primer/HybProb Prob karışımı-10X

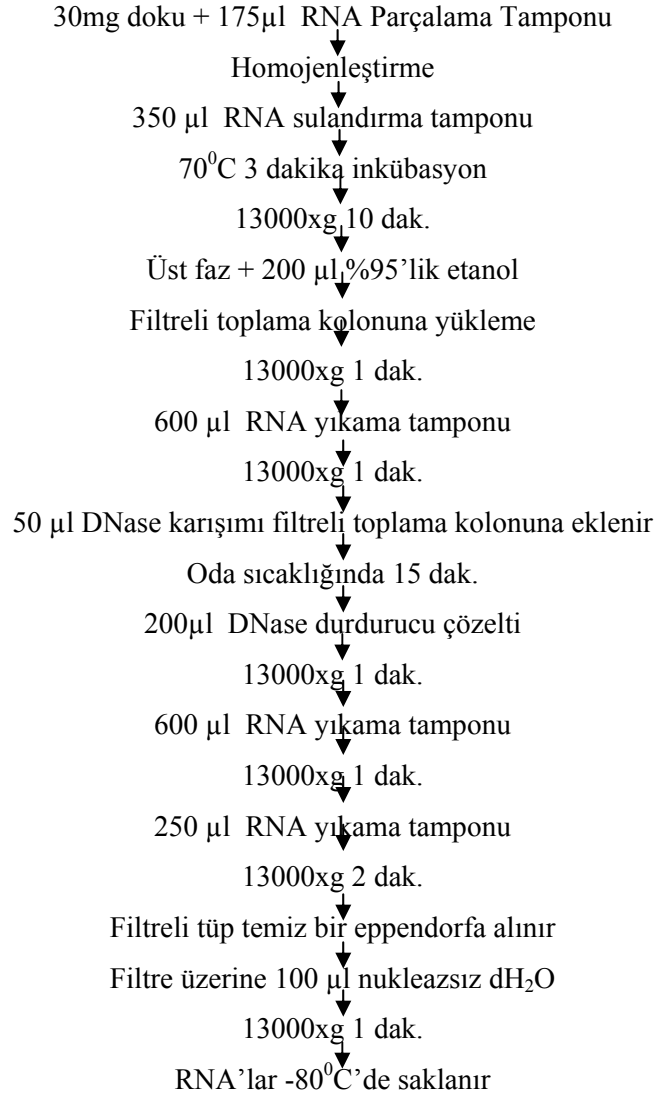
h-G6PDH Standartlar	Standart 1- $5 \times 10^6$ kopya/5µl
	Standart 2- $5 \times 10^5$ kopya/5µl
	Standart 3- $5 \times 10^4$ kopya/5µl
	Standart 4- $5 \times 10^3$ kopya/5µl
	Standart 5- $5 \times 10^2$ kopya/5µl

## 3.2. YÖNTEM

### 3.2.1. RNA Eldesi

Ameliyat esnasında mesane kanserli hastalardan alınan normal ve tümörlü dokular sıvı azot içerisinde muhafaza edildi. Doku parçalarından RNA izole edilerek gen ifade analiz işlemleri için kullanıldı. Hastalara ait tümörlü ve normal dokular önceden 180<sup>0</sup>C'lik etüvde 2 saat süreyle sterilize edilmiş daha sonra -80<sup>0</sup>C de soğutulmuş porselen havanlar içinde RNA parçalama tamponları ile homojenleştirildi. Daha sonra homojenleşen dokulardan RNA izolasyon kiti (SV Total RNA İzolasyon Sistemi-Promega-ABD) aracılığı ile RNA izolasyonu yapıldı. Yöntemin akış şeması Tablo 3-1'de görülmektedir.

**Tablo 3-1: RNA izolasyonu**



### 3.2.2. Spektrofotometrik analiz

RNA örneklerinin derişimi spektrofotometrede (nanodrop ND-1000 , ABD) ölçülerek miktar tayini yapıldı. RNA'nın parçalanmamış olduğu formaldehidli jelde yürütülerek belirlendi.

### 3.2.3. Formaldehidli Jelin Hazırlanması

Formaldehidli jel için; DEPC'li suda %1 agaroz kaynatıldıktan sonra çözelti çeker ocağa alınarak üzerine 10X MOPS ve %40 formaldehid eklendi ve jel polimerleşmeye bırakıldı. 0,5XTEB tamponu içine alınan jele, RNA denatürasyon tamponu ve etidyum bromürden oluşan karışım yüklendi ve 120V'ta yaklaşık 30 dakika yürütüldükten sonra jel, görüntüleme sisteminde incelendi.

### 3.2.4. cDNA Sentezi

RNA izolasyon kiti aracılığıyla elde edilen RNA'lar, spektrofotometrede ölçümleri yapılarak miktarlarının eşit olarak uygulanması amacı ile 250 ng/μl olacak şekilde sulandırılarak cDNA sentez kiti (Fermentas, Litvanya) aracılığıyla cDNA'ya dönüştürüldü. Tepkime koşulları Tablo 3-2 'de gösterilmiştir.

**Tablo 3-2: cDNA Sentezi Tepkime Koşulları**

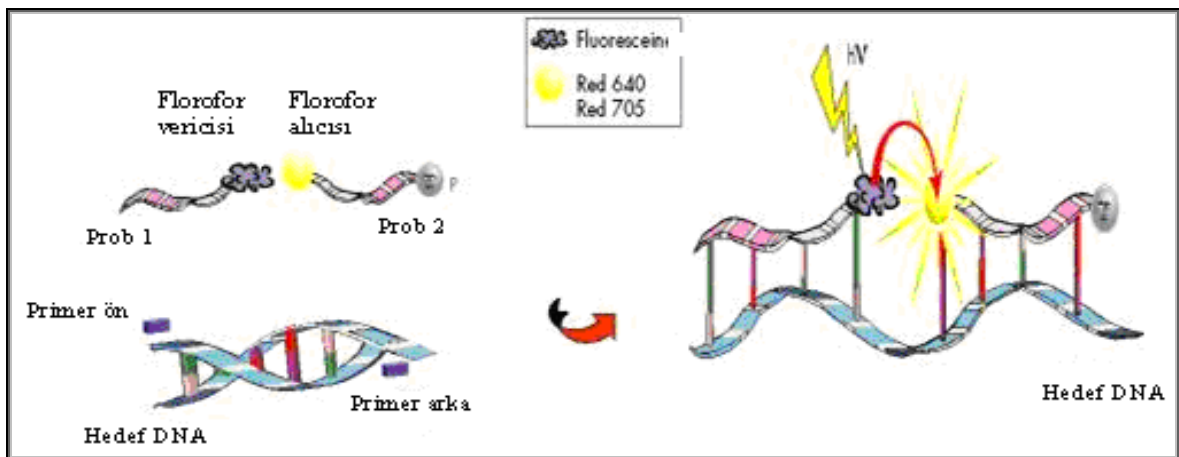
Kimyasallar	Total Derişim	Reaksiyon Derişimi	Reaksiyon Hacmi
Oligo (dT) primer	50 μM	2,5 μM	1 μl
Toplam RNA	(1ng-500ng)	100ng(10ng-500ng)	0,5μl-12μl
Toplam hacim dH20 ile 13μl'ye tamamlanır Karışım 65 °C'de 10 dakika İnkübe edilir			
RNA engelleyici	40 U	20 U	0,5μl
Tepkime tamponu (5x)	10x	1x	4μl
dNTP karışımı	10mM	1mM	2μl
55°C'de 30 dakika inkübe edilir			
85°C'de 5 dakika inkübe edilir			
4°C			

### 3.2.5. Rheb Geni İfade Analizi

Rheb geninin nicel ifade analizini yapmak için Lightcycler Fast Start DNA Master Hibridizasyon Prob kiti (Roche Diagnostics) ve hG6PDH House Keeper Gene Set kullanılmıştır.

Normal ve tümör dokusunda Rheb geninin ifade düzeyleri GAPDH gen kopya sayıları ile karşılaştırılarak hesaplanmıştır (LightCycler Relative Quantification Software).

LightCycler cihazı kullanılarak ilgili genlerin hedef bölgelerine özgü primerler ve hedef bölge ile mezlenecek şekilde mezlleme prob çiftleri tasarlanmıştır (LightCycler Software). Mezlleme prob çiftinin biri 5'ucundan Light Cycler Red 640 ile (alıcı boya) diğeri ise 3'ucundan "florescein" adlı floresan boya ile işaretlidir. Floresanla işaretli olan prob, floresan rezonans enerji transfer (FRET) vericisi olarak hareket eder. 5'ucundan Red 640 ile işaretli prob ise alıcı olarak görev yapar. Enerji transferi ancak iki prob birden mezlendiği zaman floroforların yaklaşması ile gerçekleşir (Şekil 3-1). Birkaç nukleotid uzaklıktaki iki florofor arasında gerçekleşen enerji transferi sonrasında alıcıdan açığa çıkan floresan emisyonu PZR döngüleri esnasında eş zamanlı olarak görüntülenir. Her döngüde üretilen ürün miktarına paralel olarak sinyal şiddeti de artar.



Şekil 3-1: Lightcycler Cihazında Kullanılan Prob Sistemi



Rheb geninin ifade analizi için Tablo 3-3'deki prob ve primerler kullanılarak 20µl'lik hacimde tepkime karışımı hazırlandı. Tablo 3-4'deki gibi hazırlanan tepkime karışımları kapillerlere konuldu ve her bir kapillere 5 µl cDNA eklendi. Kapillerler 700g'de 10 saniye santrifüjlenerek LightCycler (Roche, Almanya) rotoru içine yerleştirildi.

**Tablo 3-3: Rheb Primer ve Prob Dizileri**

<b>Gerçek Zamanlı PZR'de Kullanılan Primer Dizisi</b>
Rheb ön primer dizisi: 5'-TGT AGA CAC AGC CGG G-3'
Rheb arka primer dizisi : 5'-CAC ATC ACC GAG CAT GAA-3'
<b>Gerçek Zamanlı PZR'de Kullanılan Prob Dizisi</b>
Rheb Hibridizasyon Prob 1: TGGCAAATTGTTGGATATGGTGGG-FL
Rheb Hibridizasyon Prob 2: LC 640-AAGTACAAATACCTATTATGTTGG TTGGGA-PH

**Tablo 3-4: Rheb Gen İfade Analizi için Tepkime Koşulları**

<b>Kimyasallar</b>	<b>Total Derişim</b>	<b>Reaksiyon Derişimi</b>	<b>Reaksiyon Hacmi</b>
dH2O		15µl'ye tamamlanır.	
MgCl <sub>2</sub>	25mM	2,5mM	1µl
Rheb primer F	5µM	0,5 µM	1µl
Rheb primer R	5µM	0,5 µM	1µl
Toplam CDNA	2000-2500ng/µl	1000-1250ng	5µl
Prob 1(FL)	2µM	0,2µM	1µl
Prob 2 (LC 640)	2µM	0,2µM	1µl
Hybprob tamponu (10x)	10x	1x	2µl

Aynı cDNA'lar referans gen G6PDH (Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz)'ın ifadesi için de kullanıldı. G6PDH gen ifade analizi PZR tepkime koşulları Tablo 3-5'de belirtilmiştir.

Rheb ve G6PDH analizleri için uygulanan protokol Tablo 3-6'da verilmiştir.

**Tablo 3-5: G6PDH Geni İfade Analizi için Tepkime Koşulları**

Kimyasallar	Total Derişim	Tepkime Derişimi	Tepkime Hacmi
dH <sub>2</sub> O		15µl'ye tamamlanır	
MgCl <sub>2</sub>	25mM	4mM	2,4µl
Toplam CDNA	2000-2500ng/µl	1000-1250ng	5µl
h-G6PDH Saptama Karışımı (Primer ve Prob karışımı)	10x	1x	2µl
Hybprobe tamponu (10x)	10x	1x	2µl

**Tablo 3-6:G6PDH ve Rheb Gen İfade Analizleri için Gerçek-Zamanlı PZR Koşulları**

İşlem	G6PDH ve Rheb	Süre	Döngü Sayısı
Ön İnkübasyon	95°C	10dk	
Çift Zincirin Ayrılması	95°C	10sn	55 Döngü
Primer bağlanma	50°C	15sn	
Uzama	72°C	13sn	
Soğuma	40°C	30sn	
Melting Curve	55°C	10sn	

### **3.2.6. Verilerin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi**

Hastalara ait tümör doku ve normal doku örneklerine ait Rheb gen ifade farklılıklarının, istatistiksel anlamlılığını hesaplamak için SPSS 12 programı kullanıldı. Mann-Whitney U testi, Anova Varyans Analizi, Fisher's exact test, T-test ve Pearson korelasyon analizi testleri kullanılarak elde edilen p değerlerine göre anlamlılıklar değerlendirildi.

#### 4. BULGULAR

Çalışmamızda mesane kanserli 53 hastanın tümör, 23'ünün de normal dokuları incelendi. Aynı hastaların tümörlü dokularından elde edilen sonuçlar, normal dokularından elde edilen sonuçlar ile kıyaslanarak değerlendirildi. Çalışılan hastalara ait yaş, patoloji evreleri ve patoloji gradları Rhab gen ifade düzeyi ile birlikte değerlendirildi. Çalışmaya alınan hastaların tümör tipi histolojileri, tümör patoloji evreleri ve tümör patoloji gradları Tablo 4-1'de görülmektedir.

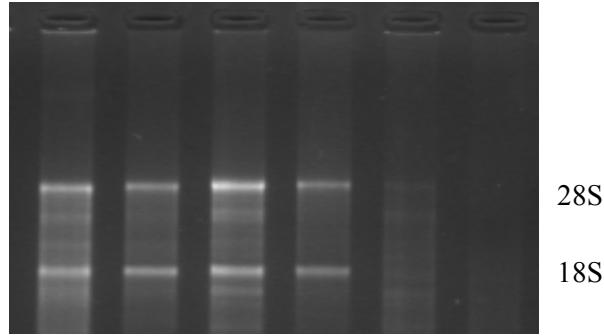
**Tablo 4-1: Çalışmaya alınan hastaların tümör tipi histolojileri**

<b>Tümör tipi histolojisi</b>	<b>Hasta sayısı (53)</b>	<b>(%)</b>
<b>Transizyonel Epitel Kökenli Mesane Tümörü</b>	<b>51</b>	<b>96</b>
<i>Yüksek Dereceli Transizyonel Epitel Karsinom</i>	40	<b>74</b>
<i>Düşük Dereceli Transizyonel Epitel Karsinom</i>	11	<b>22</b>
<b>Transizyonel Olmayan Epitel Kökenli Mesane Tümörü</b>	<b>2</b>	<b>4</b>
<i>Adenokarsinom</i>	1	<b>2</b>
<i>Squamos Hücreli Karsinoma</i>	1	<b>2</b>
<b>Patoloji Evreleri</b>	<b>Hasta sayısı (53)</b>	<b>(%)</b>
I	18	<b>34</b>
II	19	<b>36</b>
III	9	<b>17</b>
IV	7	<b>13</b>
<b>Patoloji Grade</b>	<b>Hasta sayısı (51)</b>	<b>(%)</b>
Yüksek	40	<b>78</b>
Düşük	11	<b>22</b>

Çalışma grubumuzdaki 2 hastanın patoloji grad bilgilerine ulaşılamamıştır.

#### 4.1. RNA'ların Formaldehidli Jelde Görünümü

RNA'larda fiziksel kırılma olup olmadığının saptanması amacı ile tümürlü ve normal dokulara ait RNA'lar formaldehitli jelde yürütüldü. Hastaların tümör ve normal dokularına ait RNA örnekleri Şekil 4-1'de görülmektedir. Jelde, 28S ve 18S olmak üzere iki bant varlığı görülmektedir.

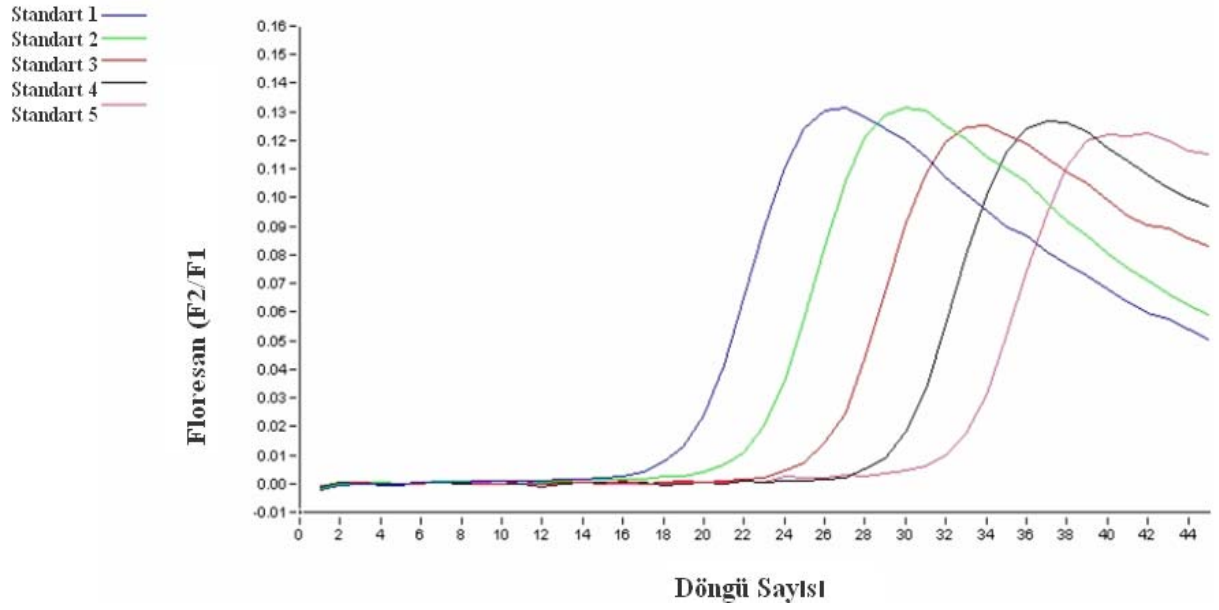


Şekil 4-1: RNA'ların formaldehidli jelde görünümü

#### 4.2. Rheb Geni İfade Değerleri

Tümör ve normal olmak üzere toplam 76 dokudan elde edilen RNA'lardan, cDNA sentezi yapıldı.

Rheb geninin nicel ifade analizi için Lightcycler cihazı ile Lightcycler Fast Start DNA Master Hibridizasyon Prob kiti ve referans gen olarak da G6PDH geni kullanıldı. G6PDH'ın  $5 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^3$  ve  $5 \times 10^2$  sayıda mRNA kopyası içeren standartları kullanılarak standart eğri oluşturuldu (Şekil 4-2).



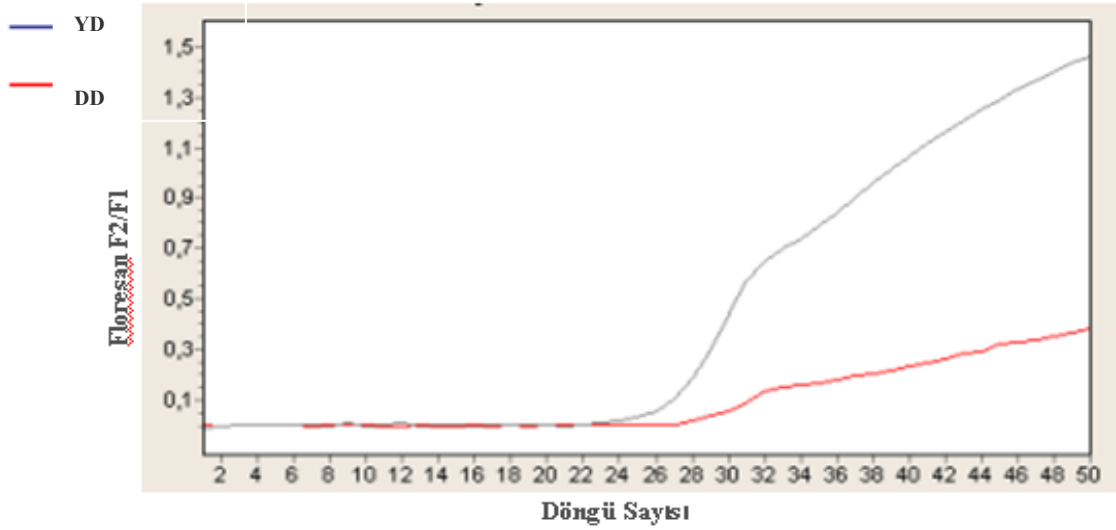
**Şekil 4-2: G6PDH Standartlarına ait floresan eğriler**

Standart 1:  $5 \times 10^6$ , Standart 2:  $5 \times 10^5$ , Standart 3:  $5 \times 10^4$ , Standart 4:  $5 \times 10^3$ , Standart 5:  $5 \times 10^2$  kopya.

Her hasta için, Rheb ve G6PDH gen kopya sayıları oranlanarak, gen ifade düzeyleri belirlendi. Elde edilen sayısal verilere göre hastaların sonuçları iki gruba ayrıldı.

Rheb gen kopya sayısı / G6PDH gen kopya sayısı = 0-10 arası olanlar; düşük düzey;

Rheb gen kopya sayısı / G6PDH gen kopya sayısı = 10 ve üzeri olanlar; yüksek düzey olarak değerlendirildi (Şekil 4-3).



**Şekil 4-3: Rheb gen ifadesinin yüksek düzeyde ve düşük düzeydeki floresan diyagramı**

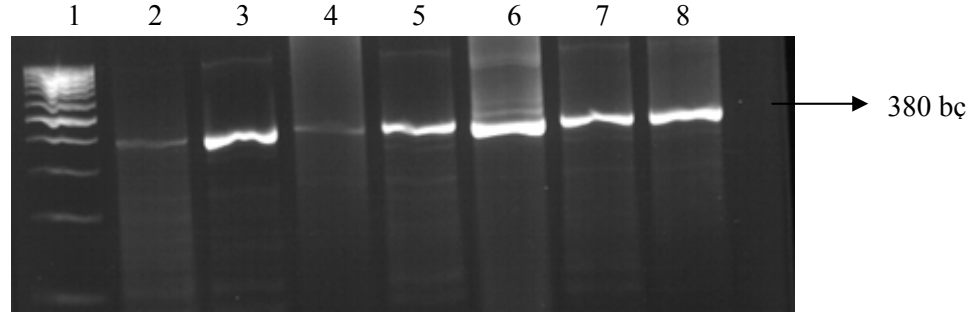
YD: Yüksek düzeyde Rheb gen ifadesi, DD: Düşük düzeyde Rheb gen ifadesi

Rheb gen ifade düzeylerine göre hasta ve kontrol grubunun dağılımı sırasıyla Tablo 4-2’de görülmektedir.

**Tablo 4-2: Rheb gen ifadesi düşük ve yüksek düzeyde olan hasta ve kontrol grubunun dağılımı**

Rheb Gen İfade Düzeyleri	Hasta		Kontrol	
	Sayı	%	Sayı	%
<b>Düşük Düzey</b>	26	47	7	30
<b>Yüksek Düzey</b>	27	53	16	70

Gerçek Zamanlı PZR ile nicel ifade miktarları belirlenen örnekler aynı zamanda PZR sonrası %2'lik agaroz jelde de yürütülerek sonuçların doğruluğu karşılaştırıldı. PZR sonucunda 380 baz çiftlik PZR ürünü oluşturması beklenen Rheb geninin PZR sonucu Şekil 4-4'de görülmektedir.



**Şekil 4-4: Örneklerin Rheb gen ifadeleri**

Örneklerin %2'lik agaroz jeldeki görünüşleri: 1.kuyu; 100 bç'lik DNA belirteci, 2. ve 4.kuyular; Rheb gen ifade anlatımı düşük örnekleri, 3.,5., 6., 7. ve 8. kuyular ise Rheb gen ifade anlatımı yüksek olan örnekleri göstermektedir.

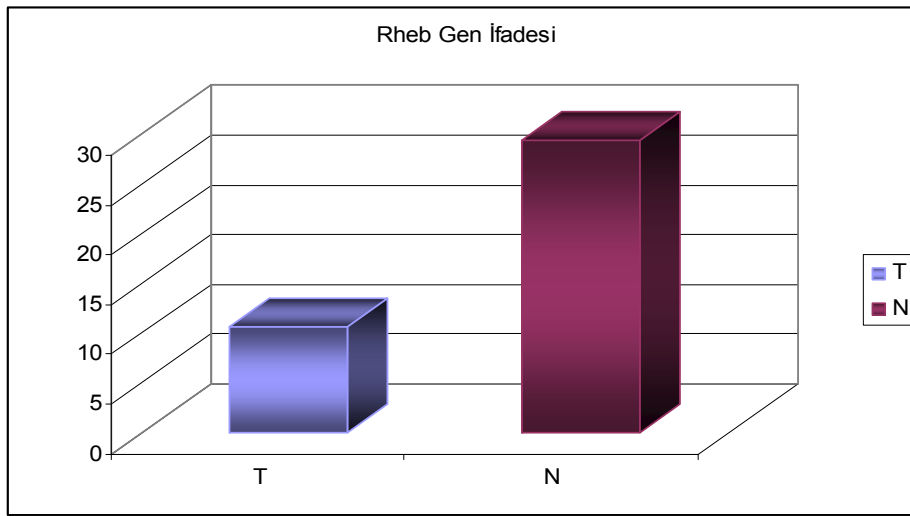
Hastaların tümör ve normal dokuları Rheb gen ifade düzeyi açısından kıyaslandı. Normal doku örneklerinde Rheb gen ifade düzeyi (%70'inde yüksek düzey), tümör doku örneklerine göre Rheb gen ifade düzeyi (%53'ünde yüksek düzey ) daha yüksek olduğu görülse de aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ( $p=0,142$ ) (Şekil4-5).

Tümör ve normal doku örneklerinin ortanca Rheb gen ifade düzeyleri Tablo 4-3'de görülmektedir.



**Tablo 4-3: Tümör ve normalde ortalanca Rheb gen ifade düzeyleri**

Örnek	Rheb Gen İfadesi Ortanca Değerleri
Tümör	10,67
Normal	29,47

**Şekil 4-5: Tümör ve Normalde Rheb Gen İfade Düzeyi**

Hastalara ait Rheb gen ifade düzeyleri ve klinik parametreler Tablo 4-4'de, kontrol grubuna ait Rheb gen ifade düzeyleri de Tablo 4-5'da görülmektedir.

Tablo 4-4: Hastalara ait Rheb Gen İfade Düzeyleri ve Klinik Parametreler

Hasta No	Rheb/G6PDH	Patolojik Grad	Histolojik Tip	Patolojik Evre
MT-1	43,33	Y.Dereceli	Transizyonel Epitelyum	2
MT-2	65,61	Y.Dereceli	Transizyonel Epitelyum	4
MT-3	2,27	Y.Dereceli	Transizyonel Epitelyum	3
MT-4	215,18	Y.Dereceli	Transizyonel Epitelyum	4
MT-5	2,69	Y.Dereceli	Transizyonel Epitelyum	3
MT-6	161,38	Y.Dereceli	Transizyonel Epitelyum	4
MT-7	10,80	Adenokarsinom	Adenokarsinom	3
MT-8	453,29	Y.Dereceli	Transizyonel Epitelyum	2
MT-9	4,59	Y.Dereceli	Transizyonel Epitelyum	2
MT-10	63,03	D.Dereceli	Transizyonel Epitelyum	1
MT-11	11,12	Y.Dereceli	Transizyonel Epitelyum	2
MT-12	10,98	Y.Dereceli	Transizyonel Epitelyum	4
MT-13	6,62	D.Dereceli	Transizyonel Epitelyum	1
MT-14	9,90	D.Dereceli	Transizyonel Epitelyum	1
MT-15	35,15	D.Dereceli	Transizyonel Epitelyum	1
MT-16	104,45	Y.Dereceli	Transizyonel Epitelyum	2
MT-17	0,53	Y.Dereceli	Transizyonel Epitelyum	3
MT-18	242,55	Y.Dereceli	Transizyonel Epitelyum	1
MT-19	1,76	Y.Dereceli	Transizyonel Epitelyum	2
MT-20	1,67	Y.Dereceli	Transizyonel Epitelyum	3
MT-21	3,53	Y.Dereceli	Transizyonel Epitelyum	1
MT-22	63,30	Y.Dereceli	Transizyonel Epitelyum	3
MT-23	34,34	Y.Dereceli	Transizyonel Epitelyum	2
MT-24	189,60	Y.Dereceli	Transizyonel Epitelyum	4
MT-25	1,05	Y.Dereceli	Transizyonel Epitelyum	2
MT-26	101,86	Y.Dereceli	Transizyonel Epitelyum	1
MT-27	211,45	Y.Dereceli	Transizyonel Epitelyum	4
MT-28	7,94	Y.Dereceli	Transizyonel Epitelyum	1
MT-29	32,77	Y.Dereceli	Transizyonel Epitelyum	3
MT-30	16,73	D.Dereceli	Transizyonel Epitelyum	1
MT-31	7,85	Y.Dereceli	Transizyonel Epitelyum	2
MT-32	43,43	D.Dereceli	Transizyonel Epitelyum	1
MT-33	7,42	D.Dereceli	Transizyonel Epitelyum	1
MT-34	171,69	Y.Dereceli	Transizyonel Epitelyum	2
MT-35	26,91	Y.Dereceli	Transizyonel Epitelyum	3
MT-36	5,86	Y.Dereceli	Transizyonel Epitelyum	2
MT-37	1,88	Y.Dereceli	Transizyonel Epitelyum	4
MT-38	0,39	Y.Dereceli	Transizyonel Epitelyum	3
MT-39	1,98	Y.Dereceli	Transizyonel Epitelyum	2
MT-40	0,95	Y.Dereceli	Transizyonel Epitelyum	2
MT-41	3,36	D.Dereceli	Transizyonel Epitelyum	1
MT-42	9,46	Y.Dereceli	Transizyonel Epitelyum	2
MT-43	5,56	Y.Dereceli	Transizyonel Epitelyum	1
MT-44	3,60	Y.Dereceli	Transizyonel Epitelyum	1
MT-45	10,67	D.Dereceli	Transizyonel Epitelyum	1
MT-46	1,51	Y.Dereceli	Transizyonel Epitelyum	1
MT-47	17,81	Y.Dereceli	Transizyonel Epitelyum	2
MT-48	4,33	Y.Dereceli	Transizyonel Epitelyum	2
MT-49	6,99	Y.Dereceli	Transizyonel Epitelyum	2
MT-50	21,67	Y.Dereceli	Transizyonel Epitelyum	2
MT-51	104,96	D.Dereceli	Transizyonel Epitelyum	1
MT-52	8,91	SCC	SCC	2
MT-53	9,63	D.Dereceli	Transizyonel Epitelyum	1

**Tablo 4-5: Kontrol grubuna ait Rheb gen ifade düzeyleri**

Hasta No	Rheb/G6PDH
MN-1	65,29
MN-2	4,73
MN-3	174,26
MN-4	170,97
MN-5	34,59
MN-6	1,89
MN-7	56,92
MN-8	14,90
MN-9	29,47
MN-10	60,75
MN-11	20,39
MN-12	68,49
MN-13	140,88
MN-14	702,14
MN-15	3,59
MN-16	122,54
MN-17	151,00
MN-18	80,72
MN-19	29,19
MN-20	3,22
MN-21	2,43
MN-22	0,50
MN-23	27,47

Hastalar patolojik evreleri açısından değerlendirildiğinde; 18'i 1. evre, 19'u 2.evre, 9'u 3. evre, 7'si 4.evre hastası olarak belirlendi. Hastalar Rheb gen ifadesi açısından değerlendirildiğinde;1.evre hastalarının 8'i yüksek düzey, 10'u düşük düzey, 2.evre hastaların 8'i yüksek düzey, 11'i düşük düzey , 3. evre hastaların 5'i yüksek düzey, 4'ü düşük düzey, 4.evre hastaların 6'sı yüksek düzey, 1'i düşük düzey olarak belirlendi (Tablo 4-6).

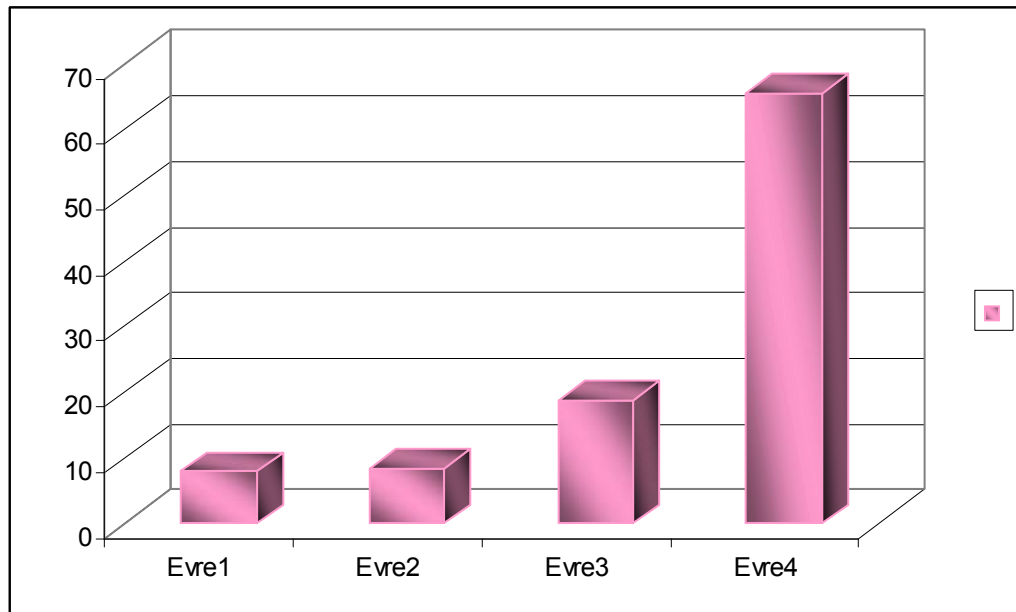
**Tablo 4-6 :Rheb gen ifadesi düşük ve yüksek düzeyde olan hastaların evre dağılımları**

Patolojik evre	Toplam	Düşük düzey	Yüksek düzey
<b>I</b>	18	10	8
<b>II</b>	19	11	8
<b>III</b>	9	4	5
<b>IV</b>	7	1	6

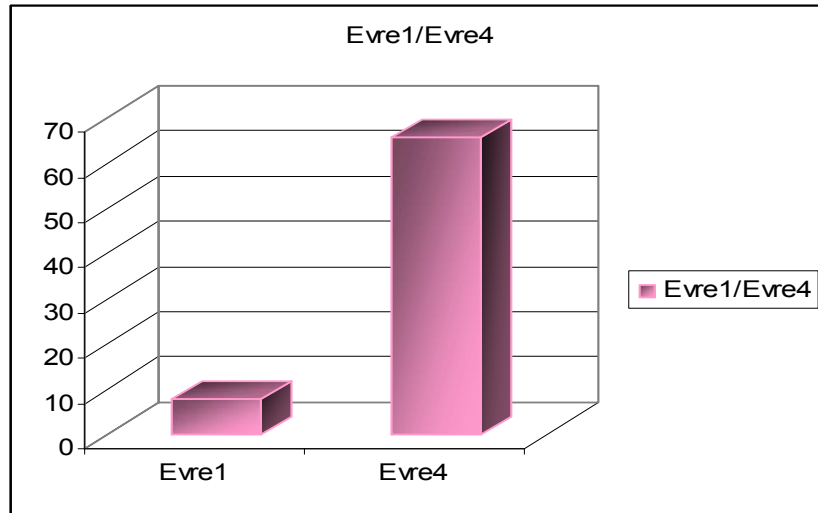
Hastaların patolojik evrelerine göre Rheb gen ifade düzeyi ortanca değerleri Tablo 4-7'de ve Şekil 4-6'da görülmektedir.

**Tablo 4-7:Hastaların patolojik evrelerine göre Rheb gen ifade düzeyi ortanca değerleri**

Evre	Rheb Gen İfadesi Ortanca Değerleri
Evre1	7,94
Evre2	8,38
Evre3	18,86
Evre4	65,61



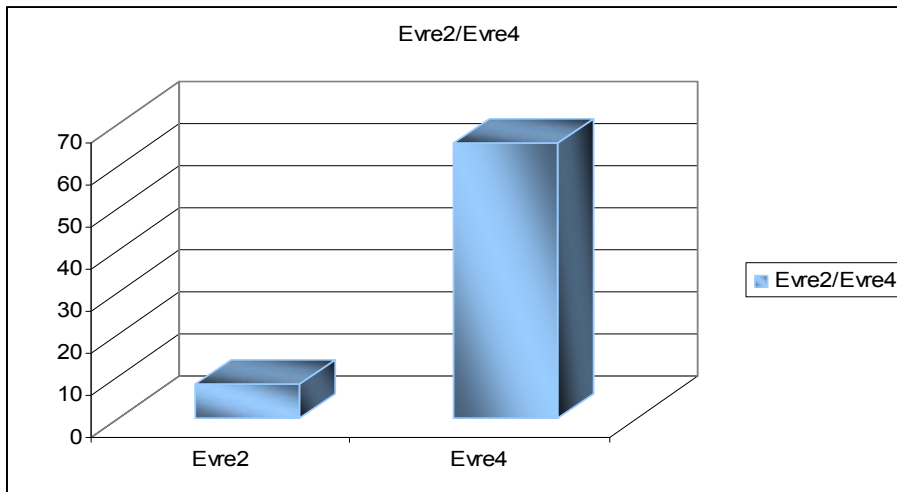
**Şekil 4-6: Hastaların patolojik evrelerine göre Rheb gen İfade düzeyi ortanca değerleri**



**Şekil 4-7: 1. ve 4. evre hastaların Rheb gen ifade düzeyi ortanca değerleri**

1.evre ve 4.evredeki hastaların Rheb gen ifade düzeyi ortanca değerleri kıyaslandığında aralarında anlamlı fark olduğu görülmüştür. 4.evre hastaları 1.evre hastalarına göre Rheb gen ifade düzeyi açısından oldukça yüksek bulunmuştur ( $p=0,05$ ).

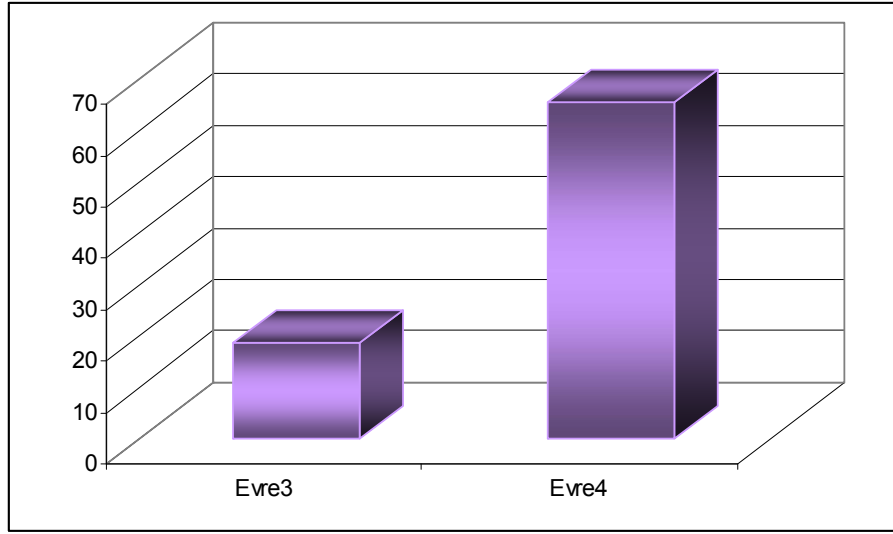
Şekil 4-7’de 1. ve 4. evre hastaların Rheb gen ifade düzeyi ortanca değerleri görülmektedir.



**Şekil 4-8: 2. ve 4. evre hastaların Rheb gen ifade düzeyi ortanca değerleri**

2.evre ve 4.evredeki hastaların Rheb gen ifade düzeyi ortanca değerleri kıyaslandığında aralarında anlamlı fark olduğu görülmüştür. 4.evre hastaları 2.evre hastalarına göre Rheb gen ifade düzeyi açısından oldukça yüksek bulunmuştur.

( $p=0,036$ ). Şekil 4-8’de 2. ve 4. evre hastaların Rheb gen ifade düzeyi ortanca değerleri görülmektedir.



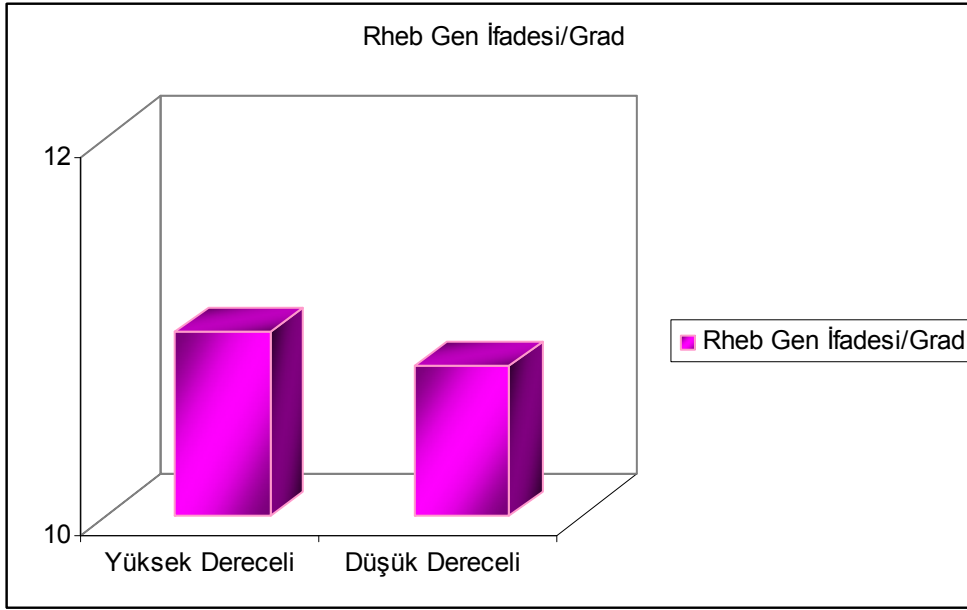
**Şekil 4-9: 3. ve 4. evre hastaların Rheb gen ifade düzeyi ortanca değerleri**

3. evre ve 4.evredeki hastaların Rheb gen ifade düzeyi ortanca değerleri kıyaslandığında aralarında anlamlı fark olduğu görülmüştür. 4.evre hastaları 3.evre hastalarına göre Rheb gen ifade düzeyi açısından oldukça yüksek bulunmuştur ( $p=0,037$ ). Şekil 4-9'de 3. ve 4. evre hastaların Rheb gen ifade düzeyi ortanca değerleri görülmektedir.

Diğer patolojik evreler aralarında Rheb gen ifade düzeyi açısından kıyaslandığında anlamlı bir fark gözlenmedi ( $p> 0,05$ ).

**Tablo 4-8: Hastaların patolojik gradlarına göre Rheb gen ifade düzeyi ortanca değerleri**

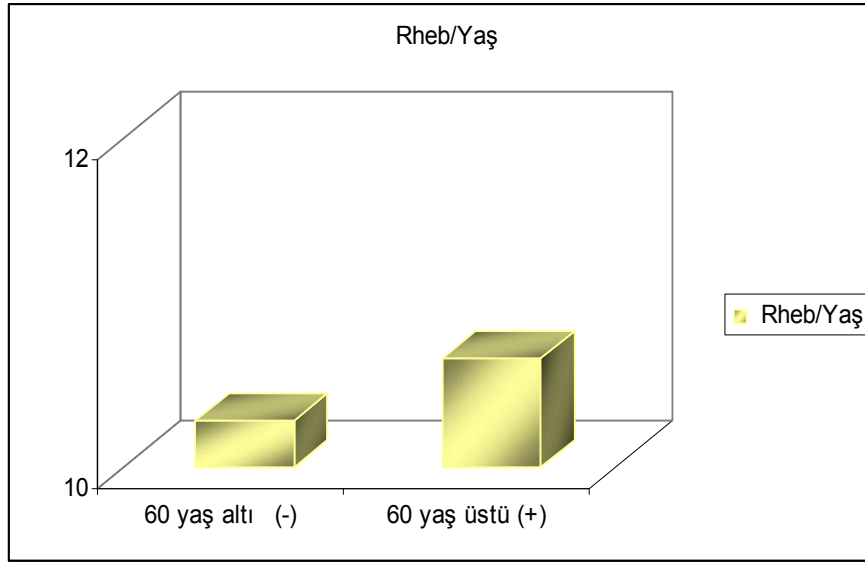
Patolojik Grade	Rheb Gen İfadesi Ortanca Değerleri
Yüksek Dereceli Transizyonel Epitelyum	10,98
Düşük Dereceli Transizyonel Epitel	10,80

**Şekil 4-10: Hastaların patolojik gradlarına göre Rheb gen ifade düzeyi ortanca değerleri**

Hasta grubu patolojik gradlarına göre, yüksek derece grad ile düşük derece grad hastaları Rheb gen ifade düzeyleri ortanca değerleri birbirleri ile kıyaslandığında; aralarında anlamlı bir fark bulunamadı ( $P=0,117$ ). Hastaların patolojik gradlarına göre Rheb gen ifade düzeyi ortanca değerleri Tablo 4-8'de ve Şekil 4-10'da görülmektedir.

**Tablo 4-9 :Hastaların yaşlarına göre Rheb gen ifade düzeyi ortanca değerleri**

Yaş	Rheb Gen İfadesi Ortanca Değerleri
60 yaş altı (-)	10,29
60 yaş üstü (+)	10,67

**Şekil 4-11: Hastaların yaşlarına göre Rheb gen ifade düzeyi ortanca değerleri**

Ortalama yaşları 64 ( $\pm 17$ ) olan hasta grubu, 60 yaş altı ve 60 yaş üstü olarak gruplandırılarak değerlendirildiğinde Rheb gen ifade düzeyi ortanca değerleri açısından aralarında anlamlı bir fark bulunamadı ( $p=0,587$ ). Hastaların yaşlarına göre Rheb gen ifade düzeyi ortanca değerleri Tablo 4-9'de ve Şekil 4-11'de görülmektedir.

Hastaların tümör ve normal dokuları Rheb gen ifade düzeyi açısından incelendiğinde tümör doku örneklerinin %53'ünde, normal örneklerinin %70'inde Rheb gen ifade düzeyi yüksek olarak gözlemlendi. Tümör doku örnekleri evrelerine göre Rheb gen ifade düzeyi açısından incelendiğinde 4. evre hastalarının 1., 2., 3., evrelere göre oldukça yüksek olduğu gözlemlendi. Rheb geninin ifade düzeyinin ileri evrede yüksek bulunması Rheb geninin ürünü olan proteinin hastalığın ilerlemesi ile ilgili olduğu ancak patolojik grad ve yaş ile ilgili olmadığı belirlendi.



## TARTIŞMA

Hücre büyümesinde önemli rolü olan mTOR sinyal yolağında kilit rol oynayan Rheb proteini, GTP bağlayabilen ve hidrolizleyebilen özellikte önemli bir hücre zar proteinidir (Tee ve ark. 2005). Son yıllarda Rheb'in bir protoonkogen olduğu düşünülmektedir. Mesane tümörlerinde rolü henüz açıklığa kavuşmamış olsa da Rheb geninin aşırı ifade edilmesinin selim ve habis tümör oluşumunda önemli rolü olduğu düşünülmektedir (Holland ve ark 2004).

Robb ve arkadaşlarının böbrek tümör parafin doku örneklerinden yaptıkları bir çalışmada, 29 örnekte Rheb-mTOR yolağında yer alan, normalde (-) olarak bulunan fosforillenmiş mTor ve S6 kinaz immünohistokimya ile analiz edilmiş; 29 örnekten 17'sinde (%59) S6 kinaz (+), 12'sinde (%41) mTOR (+) olarak analiz edilmiştir (Robb ve ark. 2007).

Saucedo ve arkadaşlarının Rheb'in işlevini araştırmak üzere *Drosophila* larvaları, Rheb(+) grup (Transgenik olarak Rheb nakledilen larvalar), Rheb(-) grup (Rheb geni eksik-delesyona uğramış grup), Rheb (normal hali) olmak üzere üç gruba ayırarak bir çalışma yapmış. *Drosophila* larvalarına transgenik yollarla Rheb geni verilen larvalarda, dışarıdan Rheb geni nakledilmeyen larvalara göre bir çok doku tipinde hücre büyümesi gerçekleşmiştir. Rheb geni açısından delesyona uğramış larvalarda ise bir süre sonra ölümler gözlenmiştir. Bu çalışmanın sonuçları, Rheb proteinin hücre büyümesi için gerekliliğini ortaya koymuştur (Saucedo ve ark. 2003).

Knowles ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, 62 mesane tümör dokusu ve 33 mesane tümör hücre soyunda SSCP ile TSC1 mutasyon analizi sonucunda, örneklerin %20'sinin TSC1 mutasyonu taşıdığı tespit edilmiştir (Knowles ve ark. 2003). TSC1 Rheb proteinini negatif yönde düzenleyen bir protein olduğundan . TSC mutasyonlarının Rheb geni aşırı ifade edilmesine neden olmaktadır. Ayrıca TSC mutasyonları gözlenen kişilerde bazı habis ve selim tümörlerin oluşumu bildirilmiştir (Kwiatkowski 2003; Luis ve ark. 2007). Çalışmamızda da mesane tümörlü örneklerin %53'ünde Rheb gen ifade düzeyi yüksek bulunmuştur. Rheb gen ifade düzeyi yüksek

saptanan hastalarda TSC1 mutasyonu olma olasılığının yüksek olduğu düşünülmektedir. Rheb gen ifade düzeyi yüksek olan kişilerde bu durum kanserleşmeye neden olmuş olabilir. Ancak tüm Rheb gen ifade düzeyi yüksek çıkan hastalarda TSC mutasyonları olması zorunlu değildir. Aynı şekilde Rheb gen ifade düzeyi düşük çıkan örneklerimiz de TSC1 mutasyonu taşıyor olabilirler ve TSC1 mutasyonu varlığı kanserleşmeye neden olmuş olabilir.

Eom ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, 20 meme dokusuna ait fibroadenom ve 20 meme tümörüne ait taze dokuda nicel Gerçek Zamanlı PZR ile Rheb gen ifade düzeyi analiz edilmiş ve çalışma sonucunda fibroadenom Rheb gen ifade düzeyi ortalama değeri meme kanserli örneklere göre 2,46 kat yüksek olarak gözlenmektedir. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p<0,01$ ). Aynı zamanda mikroarray analizi ve immünohistokimya ile de Rheb gen ifade düzeyi fibroadenomlarda meme kanserli örneklere göre artmış olarak gözlenmektedir (Eom ve ark. 2008). Bizim çalışmamızda da Eom ve arkadaşlarının yaptığı çalışma sonuçlarına uyumlu olarak normal doku örneklerinin Rheb gen ifade düzeyi tümör doku örneklerine göre yüksek olduğu gözlenmiştir. Bizim çalışmamızda da normal doku örneklerinin Rheb gen ifade düzeyi ortalama değeri, tümör doku örneklerinin Rheb gen ifade düzeyi ortalama değerine göre 1,7 kat yüksek olarak bulunmuştur ( $p=0,142$ ).

Basso ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, tümör hücre soylarında ve normal hücre soylarında nicel Gerçek Zamanlı- PZR ile Rheb gen ifade düzeyi analiz edilmiştir. Sonuç olarak, tümör hücre soylarında, normal hücre soylarına göre Rheb gen ifade düzeyi yüksek olarak gözlenmiştir. Rheb gen ifadesinin meme tümör hücre soyunun %22'sinde, over tümör hücre soyunun %85'inde, pankreas tümör hücre soyunun %100'ünde, akciğer tümör hücre soyunun %58'inde, prostat tümör hücre soyunun %50'sinde, kolon tümör hücre soyunun %88'inde ve melanoma hücre soyunun ise %28'inde artmış olduğu gösterilmiştir. (Basso ve ark. 2005). Bizim çalışmamızda ise, tümör doku örneklerinin Rheb gen ifade düzeyi incelendiğinde, tüm mesane tümör örneklerinin %53'ünde Rheb gen ifade düzeyi yüksek olarak saptanmıştır. Normal doku örneklerinde ise bu oran %70 olarak saptanmıştır. Çalışmamızda tümör ve normal dokuları Rheb gen ifade düzeyi açısından incelendiğinde, normal doku örneklerinde Rheb gen ifadesinin tümör doku örneklerine göre daha yüksek olduğu gözlenirse de bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı

saptanmıştır ( $p=0,142$  ). Basso ve arkadaşlarının elde ettiği sonuçların bizim sonuçlarımız ile uyumlu olmaması yaptıkları çalışmanın tamamen normal doku veya organdan elde edilmiş hücre soyları kullanılmış olmasından kaynaklanmaktadır. Çünkü bizim çalışmamızda normal olarak alınan dokular mesane kanserli hastanın mesanesinde tümör olmayan bölümüne aittir. Bu hastalarda mesanede tümör oluştuğunda tüm mesane hücrelerinde kanserleşme yönünde moleküler bir değişim başlamış olabilir. Basso ve arkadaşlarının bir çok hücre soyunda Rheb gen ifade düzeyini incelemelerine rağmen bunların arasında mesane kanseri hücre soyu bulunmamaktadır.

Çalışmamızda, hastaların normal dokularında tümör dokularına oranla Rheb gen ifade düzeyinin yüksek bulunması birkaç nedene bağlı olabilir. Bunlardan biri çalışılan tüm hastalara ait normal doku örneklerinin elde edilememiş olması dolayısıyla kontrol grubu sayısının azlığı olabilir. Kontrol grubu sayısı artırılabilmesi mümkün olabilirse daha sağlıklı sonuçlar elde edilebilir. Kontrol grubumuzdaki örnekler, tümör örneği alınmış aynı hastanın mesane normal dokusundan alındığından bu hastaların mesanelerinde tümör oluştuğunda tüm mesane hücrelerinde moleküler bir değişim başlamış olabileceğinden, normal doku materyelinde de Rheb gen ifade düzeyi hiç kanser olmamış bir kişinin mesane doku materyeline göre yükselmiş olabilir. Bir diğer neden de mesane tümöründe tümör ve normal doku örneği ayırımını yapan patoloğun bu ayrımı iyi yapamamış olma olasılığıdır.

Yapılan çalışmalarda hastaların patolojik evreleri ile Rheb gen ifade düzeyi açısından da karşılaştırma bildirilmemektedir. Çalışmamızda Rheb gen ifade düzeyinin evre ilerledikçe düzenli olarak arttığı gözlenmiştir. 4.evre hastaları 1. 2. 3. evre hastalarına göre Rheb gen ifade düzeyi açısından oldukça yüksektir. Normal doku örneklerinde Rheb gen ifade düzeyinin tümör doku örneklerine göre daha yüksek bulunması bu sonuç ile ters bir durumdur. Fakat bu örneklerde tümöre dönüşmeden yüksek olan Rheb gen ifade düzeyi, tümöre dönüştüğünde mesane hücrelerinin kendine has bir savunma mekanizması ile Rheb gen ifade düzeyini düşürmüş olabilir. İleri evre mesane tümörlerinde ise tümörün agresifleşmesi ile Rheb gen ifade düzeyi yeniden artmış olabilir.

Ayrıca Basso ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Rheb farnesillenmesini engelleyen ajanlar ile aynı hücre soylarında kanser karşıtı tedavi uygulamışlardır. Rheb

farnesillenerek etkinleşen bir proteindir. Basso ve arkadaşları yaptıkları bu çalışmada FTI SCH 66336 Farnesil Transferaz Engelleyicisinin kanser hücre soylarına uygulamışlardır. Bu uygulamadan sonra Rheb sinyalinin engellendiği gözlenmekle birlikte hücrelerin apoptoza gittikleri belirtilmiştir. FTI SCH 66336 tümör karşıtı ajan olan tamoksifen ve taksane ile birlikte kullanıldıklarında etkinliklerini arttırdığı gözlenmiştir. Rapamisin, paklitaksel ve karboplatinin de FTI SCH 66336 gibi etki yaptığı gösterilmiştir (Basso ve ark. 2005).

Mavrakis ve Wendel lenfoma ve gliomalarda Rheb gen ifadesinin artmış olduğunu gösteren bir çalışmada, hücrelerde Rapamisin ve FTI'ların birlikte etkili bir kanser tedavisi olabileceğini iddia etmişlerdir (Mavrakis ve Wendel 2008).

Rheb'e yönelik tedavilerden yarar görebilecek hastaları tespit edebilmek için Rheb gen ifade düzeyinin Gerçek Zamanlı PZR ile belirlenerek tedavi için yön gösterici olabilmesi açısından daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

## KAYNAKLAR

- Adachi, H. Igawa, M. Shiina, H. ve ark. (2003). Human bladder tumors with 2-hit mutations of tumor suppressor gene TSC1 and decreased expression of p27. *The Journal of Urology*, **170**, 601-604.
- Adjei, A.A. ve Hidalgo, M. (2005). Intracellular signal transduction pathway proteins as targets for cancer therapy . *Journal of Clinical Oncology*, **23**, 5386-5403.
- Aspuria, P.J. Tamanoi, F. (2004). The Rab family of GTP-binding proteins. *Cellular Signaling* **16**:1105-1112.
- Basso A.D. Mirza, A. Liu, G. Long, B.J. Bishop, W.R. ve Kirschmeier, P. (2005). The farnesyl transferase inhibitor (FTI) SCH66336 (Ionafarnib) inhibits rheb farnesylation and mTOR signaling. *The Journal of Biological Chemistry* , **280**,35:31101-31108.
- Bianchi, G.D. Cerhan, J.R. ve Parker, A.S. (2000). Tea consumption and risk of bladder and kidney cancers in a population based case-control study. *American Journal of Epidemiology*, **151**, 377-383.
- Bjornsti, M.A. ve Houghton, P.J. (2004). The TOR pathway: A target for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, **4**, 335-348.
- Bjornsti, M.A. ve Houghton, P.J. (2004). Lost in translation: Dysregulation of cap-dependent translation and cancer. *Cancer Cell*, **5**.
- Buerger, C. Vries, B.D. ve Stambolic, V. (2006). Localization of Rheb to the endomembrane is critical for its signaling function. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **344**, 869-880
- Caşkurlu, T. (2007). Üriner Sistemin Ürotelyal Tümörleri İçinde Özen, H. Türkeri, L. (eds). . *Üroonkoloji*. İzmir: Üroonkoloji Derneği . 260-346.
- Chen, J.ve Fang, Y. (2002). A novel pathway regulating the mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling. *Biochemical Pharmacology*, **64**, 1071-1077.
- Cohen, S.M. Shirai, P. ve Steineck, G. (2000). Epidemiology and etiology of premalignant and malignant urothelial changes. *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology*, **205**, 105-115.

- Cordon-Cardo, C. (1998). Molecular alterations in bladder cancer. *Cancer Surveys*, **32**, 115-131.
- Cote, R.J. dunn, M.D. ve Chatterjee, S.J. (1998). Elevated and absent pRb expression is associated with bladder cancer progression and has cooperative effects with p53. *Cancer Research*, **58**, 1090-1094.
- Crespo, J.L. ve Hall, M.N. (2002). Elucidating TOR signaling and rapamycin action: Lessons from *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **66**, 579-591).
- Çıkılı, N. Akbay, K. (2007). Üriner Sistemin Ürotelyal Tümörleri İçinde Özen, H. Türkeri, L. (eds). . *Üroonkoloji*. İzmir: Üroonkoloji Derneği . 260-346
- Dancey, J.E. (2005). Inhibitors of the mammalian target of rapamycin. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, **14**, 313-328.
- Demirel, A. (2007). Üriner Sistemin Ürotelyal Tümörleri İçinde Özen, H. Türkeri, L. (eds). . *Üroonkoloji*. İzmir: Üroonkoloji Derneği . 260-346
- Edinger, A.L. Thompson, C.B. (2002). Akt maintains cell size and survival by increasing mTOR-dependent nutrient uptake . *Molecular Biology Cell*, **13**, 2276-2288.
- Eom, M. Han. A. Yi, S.Y. Shin, Junghun, S. Cui, Y. ve ark. (2008). Rheb expression in fibroadenomas of the breast. *Pathology International*, **58**, 226-232.
- Expanding mTOR signaling. Erişim: 18.01.09.  
<http://www.nature.com/cr/journal/v17/n8/images/cr200764f2.jpg>
- Fauceglia, P.M. Cheney, R.T. ve Schwaller, J. (2006). Genetic alterations in urothelial bladder carcinoma. *Cancer*, **106**, 1205-1216.
- Findlay, G.M. Harrington, L. S. ve Lamb, R.F. (2005). TSC1-2 tumour supressor and regulation of mTOR signaling; linking cell growth and proliferation. *Current Opinion in Genetics and Development*, **15**, 69-76.
- Fontana, D. Bellina, M. ve Scoffone, C. (1996). Evalutaion of c-ras oncogene product (p21) in superficial bladder cancer. *European Urology*, **29**, 470-476.
- Franekova, M. Erika, H. Bukovska, E. Luptak, J.Dobrata, D. (2008). Gene polymorphisms in bladder cancer. *Urologic Oncology*, **26**, 1-8.

-Garami, A. Zwartkruis, F. J.T. Nobukuni, T. Joaquin, M. Roccio M. Stocker, H. ve ark. (2003) Insulin activation of Rheb, a mediator of mTOR/S6K/4E-BP signaling, is inhibited by TSC1 and 2. *Molecular Cell*, **11**, 1457-1466).

-Gene Loc gene densities for. Erişim: 18.01.09.

<http://www.genecards.org/pics/loc/GC07M150794.RHEB.png>

-Guertin, D.A. ve Sabatini, D.M. (2005). An expanding role for m TOR in cancer. *Trends in Molecular Medicine*, **11**, 353-361.

-Guimaraes, A.R. ve Harisinghani, M.G. (2005). Imaging of transitional cell carcinoma İçinde Vogelzang, N.J. Shipley, W.U. Scardino, P.T. ve ark. (eds). *Comprehensive Textbook of Genitourinary Oncology*. Baltimore: Lipincott Williams and Wilkins; 417-434.

-Hanahan, D. Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, **100**, 57-70.

-Hara, K.Maruki, Y. Long, X. Yoshino, K. Oshino, N. Hidayet, S. ve ark. (2002). Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell*, **110**, 177-189.

-Hay, N. ve Sonenberg, N. (2004). Upstream and downstream of mTOR. *Genes Development*, **18**, 1926-1945.

-Holland, E.C. Sonenberg, N. Pandolfi, P. ve Thomas, G. (2004). Signaling control of mRNA translation in cancer pathogenesis. *Oncogene*, **23**, 3138-3144.

-Huang, S. ve Houghton, P.J. (2003). Targeting mTOR signaling for cancer therapy. *Current Opinion in Pharmacology*, **3**, 371-377.

-Hudson, C.C. ve Liu, M. Chiang, G.G. Otternes, D.M. Loomis, D.C. Kaper, F. ve ark. (2002). Regulation of hypoxia- inducible factor 1alpha expression and function by the mammalian target of rapamycin. *Molecular Cell Biology*, **22**, 7004-7014.

-Inoki, K. Li, Y. Xu, T. ve Guan, K.L. (2003). Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes&Devolpment*, **17**, 1829-1834.

-Inoki, K. Ouyang, H. Li, Y.ve Guan, K.L. (2005). Signaling by target of Rapamycin proteins in cell growth control. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **69**, 79-100.

- Janus, A. Robak, T. ve Smolewski, P. (2005). The mammalian target of the rapamycin (mTOR) kinase pathway; its role in tumorigenesis and targeted antitumour therapy. *Cell Molecular Biology Letters*, **10**, 479-497.
- Jemal, A. Tiwari, R. Murray, T. ve ark. (2004). Cancer statistic. *CA Cancer Journal for Clinicians*, **54**, 8-29.
- Johansson, S.L. Cohen, S.M. (1997). Epidemiology and etiology of bladder cancer. *Seminars in Surgical Oncology*, **13**, 291-298.
- Kahan, B.D. Gibbons, S. ve Tejpal, N. (1991) Synergistic interactions of cyclosporine and rapamycin to inhibit immune performances of normal human peripheral blood lymphocytes in vitro. *Transplantation*, **51**, 232-239.
- Kaldor, J.M. Day, N.E. Kittelman, B. Pettersson, F. Langman, F. Pedersen, D. ve ark. (1995). Bladder tumours following chemotherapy and radiotherapy for ovarian cancer: a case-control study. *International Journal Cancer*, **63**, 1-6.
- Kayıgil, Ö. (2007). Üriner Sistemin Ürotelyal Tümörleri İçinde Özen, H. Türkeri, L. (eds). . *Üroonkoloji*. İzmir: Üroonkoloji Derneği . 260-346
- Kırkalı, Z. Chan, T. Manoharan, M. Algoba, F. Busch, C. Cheng, L. (2005). Bladder cancer: epidemiology, staging and grading, and diagnosis. *Urology*, **66**, 4-34.
- Knowles, M.A. Habuchi, T. Kennedy, W. ve Cuthbert-Heavens, D. (2003). Mutation spectrum of the 9q34 tuberous sclerosis gene TSC1 in transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer Research*, **63**, 7652-7656.
- Knowles, M.A. (2006). Molecular subtypes of bladder cancer: Jekyll and Hyde or chalk and cheese? *Carcinogenesis*, **27**, 361-373.
- Ku, J.H. Kwak, C. Lee, H.S. Park, H.K. Lee, E. Lee, S.E. (2004). Expression of survivin , a novel inhibitor of apoptosis, in superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *Journal of Urology*, **171**, 631-635.
- Kwiatkowski, D.J. (2003). Rhebbing up mTOR. *Cancer Biology & Therapy*, **5**, 471-476.
- Land, S.C. ve Tee, A.R. (2007). Hypoxia inducible factor 1 $\alpha$  is regulated by the mammalian target of rapamycin (mTOR) via an mTOR-signalling motif. *Journal of Biological Chemistry*, **282**, 20534-20543.



- Lee, C. Yamamoto, S. Morimura, K. Wanibuchi, H. Nishisaka, N. Ikemoto, S. ve ark. (1997). Significance of cyclin D1 overexpression in transitional cell carcinomas of the urinary bladder and its correlation with histopathologic features. *Cancer*, **79**, 780-789.
- Leppert, J.T. Shvarts, O. Kawaoka, K. Liebermen, R. Belldgrun, A.S. ve Pantuck, A.J. (2006). Prevention of bladder cancer: a review. *European Urology*, **49**, 226-234.
- Long, X. Lin, Y. Vega, S.O. Yonezawa, K. ve Avruch, J. (2005). Rheb binds and regulates the mTOR kinase. *Current Biology*, **15**, 702-713.
- Luis, N.M. Knowles, L.E. ve Real, F. X. (2007). Molecular biology of bladder cancer. *Clinical Translate Oncology*, **9**, 5-12.
- Mavrakis, K.J. ve Wendel, H.G. (2008). Translational control and cancer therapy. *Cell Cycle*, **7**, 2791-2794.
- Messing, E.M. (2005) Üriner traktın ürotelyal tümörleri içinde Walsh Retik, Vaughan Wein (eds). Sekizinci baskı, *Campbell Üroloji*. İstanbul: Güneş Kitabevi;. S.2732-2748.
- Michaud, D.S. Spiegelman, D. Clinton, S.K. Rimm, E.B. Curhan, G.C. Willet, W.C. ve ark. (1999). Fluid intake and the risk of bladder cancer in men. *New England Journal of Medicine*, **340**, 1390-1397.
- Mita, M.M. Mita, A. ve Rowinsky, E.K. Mammalian target of rapamycin: a new molecular target for breast cancer. (2003). *Clinical Breast Cancer*, **4**, 126- 137.
- mTOR and GβL that orchestrates. Erişim: 18.01.09.  
<http://www.wi.mit.edu/news/archives/2003/img/mtor.jpg>
- mTOR Target of Rapamycin. Erişim:18.01.09.  
<http://www.medscape.com/content/2004/00/48/13/481328/art-nm481328.fig1.gif>
- Nagano, J. Kono, S. Preston, D.L. Moriwaki, H. Sharp, G.B. Koyama, K. ve ark. (2000). Bladder-cancer incidence in relation to vegetable and fruit consumption: A prospective study of atomic-bomb survivors. *International Journal Cancer*, **86**, 132-138.

- Nelsen, C.J. Rickheim, D.G. Tucker, M.M. Hansan, L.K. ve Albrech, J.H. (2003). Evidence that cylin D1 mediates both growth and proliferation downstream of TOR in hepatocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, **278**, 3656-3663.
- Nicholson, K.M. Anderson, N.G. (2002). The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cellular Signalling*, **14**, 381-95.
- Nobukuni, T. Joaquin, M. Roccio, M. Dann, S.G. Kim, S.Y. Gulati, P. ve ark. (2005). Amino acids mediate mTOR/raptor signaling through activation of class 3 phosphatidylinositol 3 OH- kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **102**, 14238-14243.
- Olderoy, G. Daehlin, L. ve Ogreid, D. (1998). Low-frequency mutation of HA-ras and Ki- ras oncogenes in transitional cell carcinoma of the bladder. *Anticancer Research*, **18**, 2675-2678.
- Özcan, F. (2000). Ürolojik ve Erkek Genital Kanserleri İçinde Topuz, E. Aydiner, A. Karadeniz, A.N. (eds). *Klinik Onkoloji*. İstanbul: Tunç Matbaası. 140-156.
- Özkan, B. Yalçın, V (2007). Üriner Sistemin Ürotelyal Tümörleri İçinde Özen, H. Türkeri, L. (eds). . *Üroonkoloji*. İzmir: Üroonkoloji Derneği . 260-346
- Parkin, D.M. Pisani, P. ve Ferlay, J. (1999). Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. *International Journal of Cancer*, **80**, 827-841.
- Parkin, D.M. Bray, F. Ferlay, J. Pisani, P. (2005). Global Cancer Statistics, 2002. *CA Cancer Journal for Clinicians*, **55**, 74-108.
- Powis, G. ve Kirkpatrick, L. (2004). Hypoxia inducible factor-1 (alpha) as a cancer drug target . *Molecular Cancer Therapy*, **3**, 647-654.
- Prout, G.R. Wesley, M.N. McCarron, P.G. Chen, V.W. Greenberg, R.S. Mayberry, R.M. ve ark. (2004). Survival experience of black patients and white patients with bladder carcinoma. *Cancer*, **100**, 621-630.
- Reuter, V.E. (2006). The Pathology of Bladder Cancer. *Urology*, **67**, 11-18.
- Rheb GTPases is the upstream. Erişim: 18.01.09.  
<http://drugdiscoveryopinion.com/images/rheb.jpg>

-Robb, V.A. Karbowniczek, M. Klein- Szanto, A. J. ve Henske, E.P. (2007). Activation of the mTOR Signaling pathway in renal clear cell carcinoma. *The Journal of Urology*, **177**, 345-353.

-Rosner, M. Freiling, A. ve Hengstschlager, M. (2006). The tuberous sclerosis genes and regulation of the cyclin- dependent kinase inhibitor p27. *Mutations Research*, **136**, 7824- 7831.

Sandberg, A.A. Berger, C.S. (1994). Review of chromosome studies in urologic tumors. II. Cytogenetics and molecular genetics of bladder cancer. *Journal of Urology*, **151**, 545-560.

-Sarbassov, D.D. Ali, S.M. ve Sabatini, D.M. (2005). Growing roles for the mTOR pathway. *Current Opinion in Cell Biology*, **17**, 596-603.

-Saucedo, L. J. Gao, X. Dominic, A. Chiarelli, L.L. Duojia, P. ve Edgar, B.A. (2003). Rheb promotes cell growth as a component of the insulin/TOR signaling network. *Nature Cell Biology*, **5**, 565-571.

-Schultz, I.J. Kiemeny, L.A. Witjes, J.A. Schalken, J.A. Willems, J.L. Swinkels, D.W. ve ark. (2003) Survivin mRNA expression is elevated in malignant urothelial cell carcinomas and predicts time to recurrence. *Anticancer Research*, **4**, 3327-3331.

-Schulz, W. (2006). *Molecular Biology of Human Cancers. An Advanced Student's Textbook*. Springer : 289-306.

-Sekulic, A. Hudson, C.C. Homme, J.L.ve ark. (2000). A direct linkage between the phosphoinositide 3-kinase-AKT signaling pathway and the mammalian target of rapamycin in mitogen-stimulated and transformed cells. *Cancer Research*, **60**, 3504-13.

-Shariat, S.F. Tokunaga, H. Zhou, J. Kim, J. Ayala, G.A. Benedict, W.F. (2004). p53, p21, pRB, and p16 expression predict clinical outcome in cystectomy with bladder cancer. *Journal of Clinical Oncology*, **22**, 1014-1024.

Steineck, G. Plato, N. Norell, S.E. Hogstedt, C. (1990). Urothelial cancer and some industry-related chemicals: an evaluation of the epidemiologic literature. *American Journal of Industrial Medicine*, **27**,371-391.

-Steinmaus, C.M. Nunez, S. ve Smith, A.H. (2000). Diet and bladder cancer: a meta-analysis of six dietary variables. *American Journal of Epidemiology*, **151**, 693-702.

- Sturgeon, S.R. Hartge, P. Silverman, D.T. (1994). Associations between bladder cancer risk factors and tumor stage and grade at diagnosis. *Epidemiology*, **5**, 218-225.
- Sundaram, P.C. Rawal, A. ve Saltzman B. (1998). Characteristics of bladder leiomyoma as noted on magnetic resonance imaging. *Urology*, **52**, 1142-43.
- Taha, C. Liu, Z. Jin, J. Al-Hasani, H. Sonenberg, N. ve Klip, A. (1999). Opposite Translational Control of Glut 1 and Glut 4 Glucose Transporter mRNAs in Response to İnsulin. *The Journal of Biological Chemistry*, **274**, 33085-33091.
- Tee, A.R. Blenis, J. ve Proud, C.G. (2005). Analysis of mTOR signaling by the small G-proteins, Rheb and RhebL1. *FEBS Letters*, **579**, 4763-4768.
- Vaupel, P. (2004). The role of hypoxia- induced factors in tumor progression. *Oncologist* , **9**, 10-17.
- Virgilio, C.D. ve Loewith, R. (2006). The TOR signaling network from yeast to man. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **38**, 1476-1481.
- Vivanco, I. ve Sawyers, C.L. (2002). The phosphatidylinositol 3 –kinase-akt pathway in human cancer. *Nature Reviews Cancer*, **2**, 489-501.
- Why mTORin Renal Cell Carcinoma. Erişim:18.01.09.  
[http://www.targetmtor.com/pdfs/Why\\_mTOR\\_in\\_Renal\\_Cell\\_Carcinoma.pdf](http://www.targetmtor.com/pdfs/Why_mTOR_in_Renal_Cell_Carcinoma.pdf)
- Williams, S.G. ve Stein, J. P. (2004). Molecular pathways in bladder cancer. *Urology Research*, **32**, 373-385.
- Yörükoğlu, K. (2007). Üriner Sistemin Ürotelyal Tümörleri İçinde Özen, H. Türkeri, L. (eds). . *Üroonkoloji*. İzmir: Üroonkoloji Derneği . 260-346
- Zeegers, M.P. Goldbohm, R.A. Bode, P. Brandt, P.A. (2002). A prospective study on active and environmental tobacco smoking and bladder cancer risk. *Cancer Causes Control*, **13**, 83-90.
- Zeegers, M.P.A. Kellen, E. Buntinx, F. Piet, A. (2004). The association between beverage consumption, diet and bladder cancer: a systematic literature review. *World Journal of Urology*, **21**, 392-401.

-Zeng, Z. Sarbassov, D.D. Samudio I.J. Yee, K.W.L. Munsell, F.M. Jackson, E. ve ark. (2007). Rapamycin derivatives reduce mTORC2 signaling and inhibit AKT activation in AML *Blood*, **109**, 3509- 3512.

-Zhang, Y. Gao, X. Saucedo, L.J. Ru, B. Edgar, B.A. ve Pan, D. (2003). Rheb is a direct target of the tuberous sclerosis tumour supressor proteins. *Nature Cell Biology*, **5**, 578-581.

-Zhao, H. Grossman, H.B. ve Spitz, M.R. (2003). Plasma levels of insulin-like growth factor-1 and binding protein-3, and their association with bladder cancer risk. *The Journal of Urology*, **169**, 714-717.

## ETİK KURUL KARARI



T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ  
DEKANLIĞI



01 Şubat 2008

İstanbul, ..... / ..... / .....

Sayı : 3246

Konu :

TÜBİTAK  
Bilimsel ve Teknolojik Araştırma  
Projeleri Destekleme Programına

Fakültemiz Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında Doktora eğitimine devam eden **HATİCE TIĞLI**'nın yürüteceği " Hücre Büyümesi İle İlgili mTor Sinyal Yolağında Yer Alan RHEB Proteinlerinin Araştırılması" başlıklı tez çalışması 12 Aralık 2006 tarihinde toplanan Fakültemiz Etik Kurulunca müzakere edilmiş olup, etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilgilerinizi saygılarımla rica ederim.

**ETİK KURUL ÜYELERİ:**

PROF.DR. NERGİZ DOMANIÇ

PROF.DR. TULAY AKÇAY

PROF.DR. ERBİL GÖZÜKIRMIZI

PROF.DR. HÜSEYİN ÖZ

PROF.DR. SERMET KOÇ ( KONGREDE)

PROF.DR. DÜNDAR OKAN YILLAR

PROF.DR. MEHMET FAİK ÖZÇELİK

PROF.DR. FİGEN AKSOY

PROF.DR. ÖNER SÜZER

PROF. DR. İSMAİL ÇEPNİ

PROF.DR. İBRAHİM BAŞAĞAOĞLU

PROF.DR. NURAN ŞENEL BEŞE

PROF.DR. ÖZGÜR KASAPÇOPUR

DOÇ.DR. MAHMUT REHA BAYAR

DOÇ.DR. MEHMET RIZA ALTIPARMAK

YARD.DOÇ.DR. HÜSEYİN ÖZCAN (DERSTE)

ALİ BAŞARAN

Prof.Dr. Mehmet YILDIRIM  
Dekan Yardımcısı ve Etik  
Kurul Başkanı

Not : Yanıtlarda yazımızın gün sayısının belirtilmesi rica olunur. Tel : (0212)4143000

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

<b>Adı</b>	Hatice	<b>Soyadı</b>	TIĞLI
<b>Doğ.Yeri</b>	Bozkurt	<b>Doğ.Tar.</b>	25.04.1975
<b>Uyruğu</b>	T.C.	<b>TC Kim No</b>	209902768
<b>Email</b>	<a href="mailto:haticetigli@yahoo.com">haticetigli@yahoo.com</a>	<b>Tel</b>	0212 487 52 95/ 05325615188

### Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
<b>Doktora</b>		
<b>Yük.Lis.</b>	İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü/Genetik	2001
<b>Lisans</b>	İstanbul Üniversitesi Tıbbi Biyolojik Bilimler Bölümü	1998
<b>Lise</b>	İstanbul Vefa Lisesi	1992

### İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Araştırma Görevlisi	Haliç Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi	2004
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	İyi	İyi	İyi	55	

\*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
<b>LES Puanı</b>			
<b>ALES Puanı</b>	62,74	66,41	68,78

### Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Word, Excel, Powerpoint	İyi

## **Yayımları/Tebligleri Sertifikaları/Ödülleri**

### **-Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayımlanan Makaleler:**

1. Nur Buyru, Hatice Tigli, Nejat Dalay. (2003). p53 Codon 72 Polymorphism *Breast Cancer. Oncology Reports*, **10**,711-714.
2. Nur Buyru, Hatice Tigli, Nejat Dalay. (2003). Ras Oncogene Mutations in Urine Sediments of Patients with Bladder Cancer. *Journal of Biochemistry& Molecular Biology*, **36**, No.4 399-402.
3. Hatice Tigli, Nur Buyru, Nejat Dalay. (2005) Molecular Analysis of the p27/kip1 Gene in Breast Cancer. *Breast Cancer Research*, **9**, 17-21.
4. Nur Buyru,Hatice Tigli,Derya Duranyıldız and Nejat Dalay. (2006). Molecular detection of squamous cell carcinoma antigen transcripts in peripheral blood of cancer patients. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 44, 538-541
5. ED Arısan, S Arısan, MC Kiremit, H Tigli, T Caşkurlu, N Palavan Unsal and E Ergenekon. Manganese superoxide dismutase polymorphism in chronic pelvic pain syndrome patients. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases* (2006), 1-6

### **Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler:**

1. p27/ kip1 Polymorphism in Breast Cancer. Nur Sayhan, Hatice Tigli, Nejat Dalay. Asian Pasific Conference of Tumor Biology, 2001.
2. C77 Detection of Ras Gene Mutations in Urine of Bladder Cancer Patients . N.Dalay, H.Tigli, N.Sayhan. Asian Pasific Conference of Tumor Biology, 2001.

### **Uluslararası Kongrelerde Sunulan Posterler**

- Tigli H.<sup>1</sup>, Sanli O .<sup>2</sup>, Tezer M.<sup>2</sup>, Tefik T.<sup>2</sup>, Ozcan F.<sup>2</sup>, Dalay N.<sup>1</sup>. Single Nucleotide Polymorphism In The Estrogen Receptor (ER) $\alpha$  Gene Constitutes A Risk Factor For



Prostate Cancer But Not For RCC. European Association of Urology 1<sup>st</sup> Eastern Mediterranean Meeting 19-20 October 2007 Glorai Convention Centre, Antalya, Turkey.

### **Ulusal Kongrelerde Sunulan Bildiriler**

- Hatice Tıǒlı, Hly Tıǒlı, ner Şanlı, Fatih Akbulut, Murat Tunç, Nur Buyru. Mesane Kanserli Hastalarda mTOR Sinyal Yolaǒında Yer Alan Rheb Proteininin Araştırılması. 20. Ulusal roloji Kongresi-1-6 Kasım 2008, Antalya.

### **Projeler:**

İ.. ARAŞTIRMA FONU: Meme Kanserli Hastalarda p27/kip1 Gen Mutasyonları Saptanması. Proje No: t-811(2000) (Proje Yürütücüsü).

İ..ARAŞTIRMA FONU: Hücre Büyümesi ile İlgili mTOR Sinyal Yolaǒında Yer Alan Rheb Proteininin Mesane Kanserli Hastalarda Araştırılması.(2006) (Proje Yürütücüsü)

### **Katılım Belgeleri ve Sertifikalar:**

- Programlı Hücre lm Sempozyumu - Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İstanbul, 9Nisan 2008.

3.Klinik Pratikte Kök Hücre ve Gen Tedavisi Kongresi Katılım Belgesi -29Mayıs-1Haziran2008 Harbiye, İstanbul

-3.Klinik Pratikte Kök Hücre ve Gen Tedavisi Kongresi - Moleküler Biyoloji ve Genetik Metodlara Giriş Uygulamalı kursuna katılım belgesi.

### **dller:**

İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (Araştırma Fonu) tarafından 2003 yılında yaptığı uluslararası yayınlarla'' Başarılı AraŐtırıcı Belgesi'' verilmiştir.

**Özel İlgil Alanları (Hobileri):** Resim yapma (Yaǒlı boya çalıŐmaları), kitap okuma,

