



EMRE ÖZGÜR

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

DOKTORA TEZİ

İSTANBUL-2017

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(DOKTORA TEZİ)

**PROSTAT KANSERİNDE PROSTAT KANSER ANTİJEN 3'ÜN
ANDROJENLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

EMRE ÖZGÜR

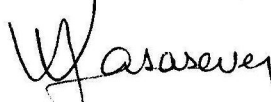
**DANIŞMAN
PROF. DR. UĞUR GEZER**

**TEMEL ONKOLOJİ ANABİLİM DALI
ONKOLOJİK BİYOLOJİ VE İMMÜNOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2017

DOKTORA TEZİ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı, Onkolojik Biyoloji ve İmmünoloji Bilim Dalı Programında Doktora öğrencisi Emre ÖZGÜR tarafından Prof.Dr.Uğur GEZER'in danışmanlığında hazırlanan "Prostat kanserinde prostat kanser antijen 3'ün androjenle ilişkisinin araştırılması" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 28 /09/2017 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.



Jüri Başkanı

Prof.Dr.Vildan YASASEVER
İ.Ü.Onkoloji Enstitüsü
Temel Onkoloji Anabilim Dalı



Jüri-Danışman

Prof.Dr.Uğur GEZER
İ.Ü.Onkoloji Enstitüsü
Temel Onkoloji Anabilim Dalı



Jüri

Prof.Dr.Derya DURANYILDIZ
İ.Ü.Onkoloji Enstitüsü
Temel Onkoloji Anabilim Dalı



Jüri

Doç.Dr.Pınar OBAKAN
İstanbul Kültür Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik
Anabilim Dalı

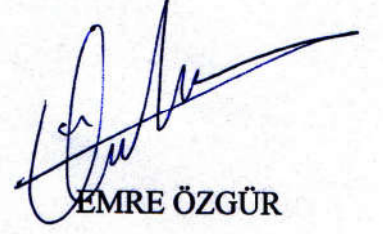


Jüri

Doç.Dr.Ajda ÇOKER GÜRKAN
İstanbul Kültür Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik
Anabilim Dalı

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 çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.



EMRE ÖZGÜR

İTHAF

Sevgili Annem, Babam, Kardeşlerim ve Eşim'e ithaf ediyorum...

TEŞEKKÜR

İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Müdürümüz Sn. Prof. Dr. Ahmet KİZİR'e,

Anabilim Dalı Başkanımız saygıdeğer hocamız Sn. Prof. Dr. Vildan YASASEVER'e,

Çalışmamda bana yol gösteren, hiçbir konuda yardımını ve desteğini esirgemeyen değerli danışman hocam Sn. Prof. Dr. Uğur GEZER'e,

Değerli hocalarım Prof. Dr. Hülya YAZICI, Prof. Dr. Derya DuranYILDIZ ve Doç. Dr. Semra DEMOKAN'a,

Katkıları ve destekleri için Dr. Mustafa Işın ve Dr. Ebru Esin YÖRÜKER'e,

Çalışmalarım sırasında bana destek olan Türkan Şen ve diğer Anabilim Dalı Yüksek Lisans ve Doktora öğrenci arkadaşlarıma,

Çalışmama maddi kaynak sağlayan İstanbul Üniversitesi Araştırma Fonu'na,

Hayatımdaki tüm zorluklarda ve güzelliklerde yanımda olduğu gibi, tez çalışmam süresince de hiçbir zaman desteğini ve yardımını esirgemeyen sevgili eşim Burçin ÖZGÜR'e,

Hayatımın her aşamasında maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, her zaman yanımda olan canım annem Şenel ÖZGÜR, babam Hasan ÖZGÜR ve kardeşlerim Mevlüt ÖZGÜR ve Mustafa Emin ÖZGÜR'e teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 50722

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	X
ÖZET	XV
ABSTRACT.....	XVI
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Prostat Bezi	3
2.2. Prostat Bezinin Hastalıkları	4
2.2.1. Prostatit	4
2.2.2. Selim Prostat Hiperplazi (BPH).....	4
2.2.3. Prostat Kanserinin Öncül Oluşumları	4
2.2.4. Prostat Kanseri	5
2.3. Prostat Kanseri Gelişiminin Moleküler Temelleri	8
2.4. Androjenler ve Androjen Reseptörü	10
2.5. Androjen Reseptörü ve Prostat Kanseri	13
2.6. AR Sinyali ile Düzenlenen Yolaklar.....	14
2.7. Kastrasyona Dirençli Prostat Kanserinin Gelişimi	15
2.7.1. Androjen Reseptör Amplifikasyonu ve Aşırı Duyarlılık	16
2.7.2. Androjen Reseptör Gen Mutasyonları	16
2.7.3. Androjen Reseptör Varyantları	17
2.7.4. Androjen Reseptörünün Eş-Düzenleyicileri	17
2.7.5. Tümör İçi Androjen Biyosentezi.....	17
2.7.6. Ligandtan –Bağımsız Aktivasyon	18
2.8. Androjen Reseptörünün Hedef Genleri	19

2.8.1. Prostat Asidik Fosfataz (PAP)	19
2.8.2. Prostat Spesifik Antijen (PSA)	19
2.8.3. TMPRSS2-ERG.....	20
2.9. Kodlamayan RNA'lar	20
2.9.1. Uzun Kodlanmayan RNA'lar.....	21
2.9.2. Prostat Kanseri Antijen 3 (PCA3).....	23
2.9.3. PRNCR1 ve PCGEM1	25
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	26
3.1. Materyal	26
3.1.1. Hücre Soyları	26
3.1.2. Kimyasal Maddeler ve Malzemeler	26
3.1.3. Kullanılan Cihazlar	27
3.2. Yöntem.....	28
3.2.1. Hücre Kültürü	28
3.2.2. siRNA ile PCA3 Baskılanması	28
3.2.3. Hücrelerin Androjen ile Muamelesi.....	30
3.2.4. Enzalutamid ile Androjen Reseptör Blokajı	31
3.2.5. Gen İfade Analizi	31
3.2.5.1. Hücrelerden Total RNA İzolasyonu	31
3.2.5.2. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi	32
3.2.5.3. Nicel Polimeraz Zincir Reaksiyonu	33
3.2.6. Hücre Çoğalmasının Gerçek Zamanlı Analizi	34
3.2.7. Klonojenik test	35
3.2.8. Apoptotik Hücre Ölümünün Değerlendirilmesi.....	36
3.2.9. İstatistiksel Analizler.....	37
4. BULGULAR.....	38
4.1. Androjenle Uyarılan Prostat Kanseri Hücrelerinde PCA3 Molekülünün İfade Düzeyinin İncelenmesi.....	38
4.2. siRNA-aracılı Oligonükleotidlerle PCA3 Geninin Baskılanması.....	39
4.3. Enzalutamid ile Androjen Reseptör İnhibisyonu Sonrası PCA3 Gen İfade Düzeyinin İncelenmesi.....	41

4.4. PCA3 Baskılanması ile Androjen Reseptörü İnhibisyonunun Androjen İlişkili Genler Üzerindeki Etkisinin İncelenmesi	42
4.5. PCA3 Baskılanması ile Androjen Reseptör İnhibisyonunun Hücre Sağkalımı Üzerine Etkisinin Araştırılması.....	48
5. TARTIŞMA	52
KAYNAKLAR	58
ÖZGEÇMİŞ	71



TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 3-1: cDNA sentez reaksiyon bileşenleri	32
Tablo 3-2: cDNA sentez reaksiyon koşulları.....	33
Tablo 3-3: Gerçek-zamanlı PZR reaksiyon bileşenleri.....	34
Tablo 3-4: Primer dizileri	34
Tablo 4-1: PCA3 baskılanması ve/veya enzalutamidin prostat kanseri hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisi (% kontrol)	49
Tablo 4-2: Prostat kanseri hücre soylarında klonojenik test ile belirlenen % canlılık oranları.....	51
Tablo 4-3: Prostat kanseri hücrelerinde apoptotik hücre ölüm oranları.....	51

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Prostat bezinin anatomisi	3
Şekil 2-2: Androjen reseptör geni ve AR proteinin şematik yapısı.....	11
Şekil 2-3: Androjen reseptör yolağının işleyişi.	13
Şekil 2-4: PCA3 transkripsiyon biriminin yapısı.....	24
Şekil 4-1: DHT ile muamele edilen LNCaP hücrelerinde PCA3 çoğalma eğrileri	38
Şekil 4-2: DHT ile muamele edilen LNCaP hücrelerinde A) PCA3 ifade düzeyi B) PSA ifade düzeyi	39
Şekil 4-3: siRNA ile transfekte edilen LNCaP-AR ⁺ hücrelerinde PCA3 çoğalma eğrileri.....	40
Şekil 4-4: siRNA ile transfekte edilen LNCaP ve LNCaP-AR ⁺ hücrelerinde PCA3 molekülüne ait PZR ürünlerinin jel görüntüsü.....	40
Şekil 4-5: siRNA yaklaşımı ile PCA3 baskılanan LNCaP (A), LNCaP-AR ⁺ (B) ve VCaP (C) hücrelerinde PCA3 ifade düzeyi.....	41
Şekil 4-6: Enzalutamid ile muamele edilen LNCaP (A), LNCaP-AR ⁺ (B) ve VCaP (C) hücrelerinde PCA3 ifade düzeyi.....	42
Şekil 4-7: LNCaP hücrelerinde hedef genlerin göreceli bazal ifade düzeyleri.....	43
Şekil 4-8: LNCaP-AR ⁺ hücrelerinde hedef genlerin göreceli bazal ifade düzeyleri.....	43
Şekil 4-9: VCaP hücrelerinde hedef genlerin göreceli bazal ifade düzeyleri	43
Şekil 4-10: Enzalutamid ile muamele edilen LNCaP (A), LNCaP-AR ⁺ (B) ve VCaP (C) hücrelerinde PSA ifade düzeyi	44
Şekil 4-11: Enzalutamid ile muamele edilen LNCaP (A), LNCaP-AR ⁺ (B) ve VCaP (C) hücrelerinde PCGEM1 ifade düzeyi	44
Şekil 4-12: Enzalutamid ile muamele edilen LNCaP (A), LNCaP-AR ⁺ (B) ve VCaP (C) hücrelerinde PRNCR1 ifade düzeyi.....	45
Şekil 4-13: PCA3 baskılanan LNCaP (A), LNCaP-AR ⁺ (B) ve VCaP (C) hücrelerinde PSA ifade düzeyi	45
Şekil 4-14: PCA3 baskılanan LNCaP (A), LNCaP-AR ⁺ (B) ve VCaP (C) hücrelerinde PRNCR1 ifade düzeyi.....	46
Şekil 4-15: PCA3 baskılanan LNCaP (A), LNCaP-AR ⁺ (B) ve VCaP (C) hücrelerinde PCGEM1 ifade düzeyi	46

Şekil 4-16: PCA3 ve AR baskılanan LNCaP (A), LNCaP-AR ⁺ (B) ve VCaP (C) hücrelerinde PSA ifadesi	47
Şekil 4-17: PCA3 ve AR baskılanan LNCaP (A), LNCaP-AR ⁺ (B) ve VCaP (C) hücrelerinde PRNCR1 ifadesi.....	47
Şekil 4-18: PCA3 ve AR baskılanan LNCaP (A), LNCaP-AR ⁺ (B) ve VCaP (C) hücrelerinde PCGEM1 ifadesi	47
Şekil 4-19: Prostat kanseri hücrelerinde gerçek zamanlı hücre çoğalma eğrileri.....	48
Şekil 4-20: Prostat kanseri hücrelerinin oluşturduğu koloni görüntüleri.....	50



SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

AR: Androjen reseptörü

ADT: Androjen deprivasyon tedavisi

PCA3: Prostat kanser antijen 3

PSA: Prostat spesifik antijen

PAP: Prostatik asit fosfataz

BPH: Selim prostat hiperplazisi

PIA: Proliferatif inflamatuvar atrofi

TMPRSS2: Transmembran proteaz serin 2

PTEN: Fosfataz ve Tensin Homolog

PI3K: Fosfoinositol-3-kinaz

LHRH: Luteinize edici hormon salgılatan hormon

LH: Luteinize edici hormon

SHBG: Seks hormonu bağlayıcı globülin

DHT: Dihidrotestosteron

NTD: N-terminal bölgesi

DBD: DNA bağlayıcı bölge

LBD: Ligand bağlama bölgesi

NLS: Nükleer lokalizasyon sinyali

FlnA: Filamin-A

HSP: Isı-şok proteinleri

SH3:Src homoloji 3

MAPK/ERK: Mitojen-aktif protein kinaz/ekstrasellüler sinyal regüle kinaz

KDPK: Kastrasyona dirençli prostat kanseri

CYP17A1: Sitokrom P450 17A1

ER: Endoplasmik retikulum

CTC: Dolaşımdaki tümör hücreleri

ctDNA: Serbest (cell-free) tümör DNA'sı

AR-V: AR varyantları

DHEA: Dehidroepiandrosteron

IL-6: İnterlökin-6

Her2 / neu: Epidermal büyüme faktörü reseptörü

NF- κ B: Nüklear faktör kappaB

ARE: Androjen reseptörü cevap elementi

ChIP: Kromatin immüno çökeltme

KLK: Kallikrein

ncRNA: Kodlamayan RNA

lncRNA: Uzun kodlamayan RNA

PRNCR1: Prostat Kanseri Kodlamayan RNA 1

PCGEM1: Prostat Spesifik Gen 1

PRUNE2: Prune homolog 2

siRNA: Küçük interferans RNA

RISC: RNA indüklü susturucu kompleks

GAPDH: Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz

ER: Östrojen reseptörü

HSP: Isı şok proteini

kb: Kilobaz

kDa: Kilodalton

miRNA: mikroRNA

mRNA: Mesajcı RNA

PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu



ÖZET

ÖZGÜR E. (2017). Prostat Kanserinde Prostat Kanseri Antijen 3'ün Androjenle İlişkisinin Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Temel Onkoloji Anabilim Dalı. Doktora Tezi. İstanbul.

‘Prostat kanser antijen 3’ (PCA3) olarak adlandırılan kodlamayan RNA, prostat kanserinde önem kazanan genlerden biridir. PCA3, prostat tümörlerinde ve prostat kanseri hücre soylarında aşırı ifade edilmektedir. Ayrıca, çok sayıda çalışmada PCA3’ün idrarda saptanmasının prostat kanseri teşhisindeki yararlılığı araştırılmaktadır. Son yıllarda elde edilen bulgular, bu kodlamayan RNA geninin prostat kanser tedavi stratejilerinde hedef moleküllerden biri olabileceğine işaret etmektedir. Bundan hareketle, tez çalışmasında PCA3 geninin androjen yolağı ile ilişkisi ve prostat kanseri hücrelerinin sağkalımı üzerindeki etkisinin incelenmesi amaçlandı. Bu amaçla, farklı klinik durumları temsil eden farklı prostat kanseri hücre modelleri kullanıldı; androjen reseptörü (AR) ifade eden ve androjen duyarlı LNCaP hücreleri ile yüksek oranda AR ifade eden LNCAP-AR⁺ hücreleri ve androjenden bağımsız büyüeyebilen VCaP hücreleri. Tek başına veya androjen reseptör blokajı ile kombinasyon halinde, PCA3 geninin baskılanmasının androjen yolağında yer alan genler (PSA, PRNCR1 ve PCGEM1) ile hücre sağkalımı üzerindeki etkisi incelendi. PCA3 geni, siRNA-aracılı yaklaşımla baskılanırken, AR enzalutamid ile bloke edildi. Gen ifadesi nicel PZR ile, hücre sağkalımı ise gerçek zamanlı hücre analizi, klonojenik test ve apoptoz ölçümü yaklaşımları incelendi. Tez çalışmasının bulguları, LNCaP hücrelerinin androjenle muamele edilmesi sonucu, PCA3’ün PSA’ya göre çok daha etkin bir şekilde uyarıldığını ortaya koymuştur. PCA3 geninin baskılandığı hücrelerde PSA ve PCGEM1 ifadesi azalırken, PRNCR1 geninde önemli bir değişiklik saptanmadı. PCA3 baskılanması, AR blokajı ile kombine edildiğinde etki daha yüksek idi. Prostat kanseri hücrelerinde PCA3 geninin susturulması, prostat kanseri hücrelerinin sağkalımını azaltırken, AR antagonisti olan enzalutamidin yol açtığı sitotoksisteyi arttırmaktadır. Sonuç olarak, çalışmanın bulguları, PCA3’ün androjen yolağının bir parçası olduğunu ve bu genin baskılanmasının prostat kanser hücrelerinin sağkalımını azalttığını ortaya koymaktadır. PCA3 prostat kanseri tedavisinde hedef moleküllerden biri olarak karşımıza çıkmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Prostat kanseri, PCA3, androjen, enzalutamid, hücre kültürü

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 50722.

ABSTRACT

Ozgur E. (2017). Investigation of the Relationship between Prostate Cancer Antigen 3 and Androgen in Prostate Cancer. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Basic Oncology. Doctorate Thesis. İstanbul.

The non-coding RNA gene, called 'Prostate cancer antigen 3' (PCA3), is one of the emerging molecules in prostate cancer. PCA3 has been shown to be expressed highly in prostate cancer cell lines and cancerous prostate tissues as compared with benign prostate tissues. Furthermore, urinary PCA3 has recently been studied extensively for its utility in prostate cancer detection. In view of latest findings, PCA3 is supposed to be a relevant target of treatment strategies in prostate cancer. Therefore, in this Thesis, the involvement of the PCA3 in the androgen pathway and the effect of PCA3 on the survival of prostate cancer cells were investigated. For this, we designed an *in vitro* investigation to study the effect of PCA3 targeting on androgen receptor (AR-related genes (PSA, PRNCR1 and PCGEM1) and the viability of PCa cells, in combination with enzalutamide-mediated AR inhibition. In hormone-sensitive LNCaP cells, AR-overexpressing LNCaP-AR⁺ cells and VCaP cells (representing castration-resistant prostate cancer), PCA3 was silenced using siRNA oligonucleotides. Gene expression was analyzed by real-time PCR, and the cell viability assessed in PCA3-silenced and/or AR-blocked cells by a real-time cellular analysis, clonogenic assay or apoptosis measurement. The findings reveal that the treatment of LNCaP cells with androgen has a much higher effect on PCA3 than on PSA. In PCA3-silenced cells, PSA and PCGEM1 were down-regulated whereas PRNCR1 was not affected. The silencing of the PCA3 gene in prostate cancer cells declined their survival and sensitized them to enzalutamide. In conclusion, our findings reveal that PCA3 is a component of androgen pathway and its silencing is associated with a reduced survival of prostate cancer cells. PCA3 proved to be a target of prostate cancer treatment strategies.

Keywords: Prostate cancer, PCA3, Androgen, Enzalutamide, Cell culture.

This Project has been funded by the İstanbul University Scientific Research Projects Coordination Unit. Project No: 50722

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Prostat bezinin malign bir hastalığı olan prostat kanseri, tüm dünyada erkeklerde en sık görülen ikinci kanserdir ve kanserden ölümlerde ön sıralarda yer almaktadır [1]. Prostat kanseri, androjene bağımlı bir hastalıktır. Androjen reseptörü (AR) üzerinden etki eden androjen, karmaşık bir transkripsiyonel program ile prostat kanseri gelişimini ve büyümesini düzenler. AR, prostat intraepitelyal neoplazinin (PIN) erken evrelerinden organ-sınırlı invaziv prostat kanserine, metastatik tümörden hormonal tedavinin öncesi ve sonrası olmak üzere prostat karsinogenezinin farklı aşamalarında ifade edilir [2-4]. Bu nedenle, androjenler ve androjen reseptörü prostat kanseri araştırmalarının en önemli alanını teşkil etmektedir. AR aktivitesini kontrol eden stratejiler prostat kanseri tedavisinin temel modalitelerini oluşturur. AR sinyali, prostat kanser hücreleri için önemli bir sağkalım yolağıdır ve androjen deprivasyon tedavisi (ADT) lokal ileri ve metastatik prostat kanserinde başlıca tedavi yöntemidir [5]. ADT, hücre döngüsünün durdurulması ve apoptotik hücre ölümü yoluyla tümör büyümesini ve hastalığın ilerlemesini yavaşlatır [6-8]. Hastaların birçoğunda ADT cevaba yol açar, ancak tedavi sürecinde yüksek oranda agresif, tedavi edilemeyen ve yüksek mortalite ile ilişkili olan ‘kastrasyona dirençli’ hastalık gelişir. Kastrasyona dirençli prostat kanserinde kemoterapötik ajanlar kullanılırken, yeni nesil androjen biyosentez inhibitörleri veya androjen reseptör antagonistleri kullanılmaya başlanmıştır [9].

Prostat kanserinde öne çıkan ve yüksek biyobelirteç potansiyeli taşıyan moleküllerden biri, 1999 yılında Bussemakers and Issacs tarafından keşfedilen ve ‘prostat kanser antijen 3’ (PCA3) olarak adlandırılmış moleküldür [10]. Uzun kodlamayan RNA geni olan PCA3, normal prostat dokusunda düşük; prostat kanseri hücre soylarında ve primer prostat tümörlerinde ise aşırı ifade edilir [11, 12]. PCA3’ün idrarda saptanması prostat kanserinin erken dönemde saptanmasında diagnostik doğruluğu arttırmaktadır [13]. PCA3, sınırlı ve patolojik olarak anlamlı olmayan prostat kanseri için prediktif değerde iken, lokal ileri hastalık veya agresif kanserde değerinin düşük olduğu gösterilmiştir. Güncel sonuçlar, PCA3’ün diğer biyobelirteçlerle kombinasyonunun prostat kanserinin diagnostik ve prognostik doğruluğunu iyileştireceğine işaret etmektedir.

PCA3 geninin, prostat spesifik antijen (PSA) ve prostatik asit fosfotaz (PAP) gibi androjenler tarafından uyarıldığı ve AR hedef genlerini modüle ettiği gösterilmiştir

[14]. Bu bulgulardan ve prostat kanserindeki öneminden hareketle, PCA3 molekülünün prostat kanserinin tedavi modalitelerinde hedef moleküllerden biri olabileceği düşünülmektedir. PCA3 geninin baskılanmasının prostat kanseri tedavisinin etkinliğini arttıracakı öngörülmektedir.

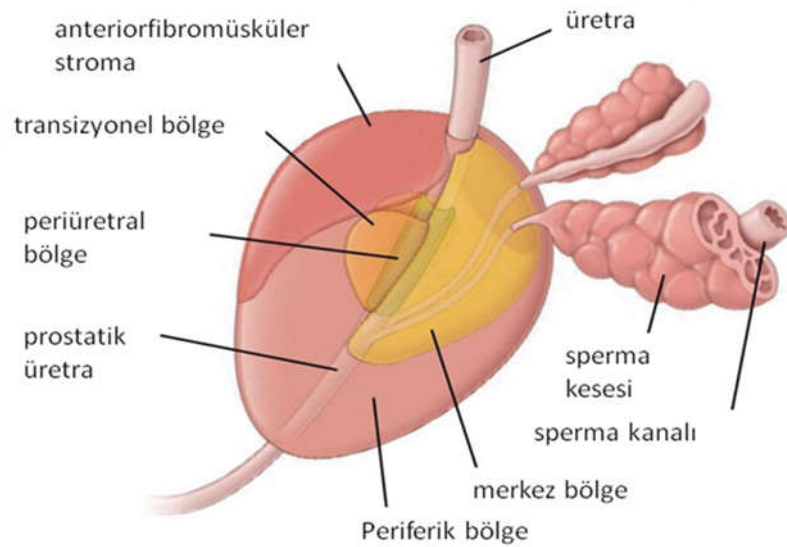
Tez çalışmasında PCA3 geninin androjen yolağı ile ilişkisi ve prostat kanseri hücrelerinin sağkalımı üzerindeki etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Deneysel çalışma niteliğinde olan bu tezde, ilk olarak, PCA3'ün androjen tarafından ne ölçüde uyarıldığı incelenecektir. Bunu takiben, farklı prostat kanseri hücre modelleri (AR ifade eden ve androjen duyarlı LNCaP hücreleri ile yüksek oranda AR ifade eden LNCAP-AR⁺ hücreleri ve androjenden bağımsız büyüeyebilen VCaP hücreleri) kullanılarak PCA3 geninin baskılanmasının etkileri araştırılacaktır. PSA ve androjen yolağı ile ilişkilendirilmiş iki kodlamayan RNA'nın (PRNCR1 ve PCGEM1) anlatım düzeylerini PCA3 baskılanmasından nasıl etkilendiği incelenecektir. PCA3 geninin baskılanmasının prostat kanseri hücrelerinin sağkalımını nasıl etkilediğinin araştırılması tez çalışmasının önemli hedeflerinden biridir. Bununla ilişkili olarak, ayrıca, PCA3 susturulmasının, yeni nesil AR antagonisti olan enzalutamidin etkisini etkileyip etkilemediği incelenecektir.

Tez çalışmasında, PCA3 geninin androjen yolağındaki önemi ve anti-AR tedavi yaklaşımını etkileme potansiyeli konusunda yararlı bilgiler elde edileceği öngörülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Prostat Bezi

Erkek üreme sisteminin bir parçası olan prostat, mesanenin altında bulunan, üretrayı çevreleyen ekzokrin bir bezdir. Prostat, idrar akışını kısıtlamak için hareket eder ve ince alkalın prostatik sıvı salgılayarak spermin hayatta kalmasına ve motilitesine yardımcı olur [15]. Prostat bezi, farklı işlevsel bölümlerden oluşur. 1981 yılında McNeal prostat bezini biyolojik ve histolojik özelliklerine göre 4 temel anatomik bölgeye ayırmıştır [16] (Şekil 2-1). Her bölge prostatik üretradan köken alır ve kendine özgü yapısal özelliklere sahiptir. Bu bölgeler; merkez bölge, periferik bölge, transizyonel bölge ve fibromüsküler stroma. Bu dört bölge, prostat bezinin ceviz şeklindeki yapısını oluşturmak üzere bir yalancı kapsül içinde sıkıştırılır [17]. Periferik bölge, prostatın glandüler kısmının yaklaşık %70'ini oluşturur [18] ve prostat kanserlerinin büyük bir kısmı bu bölgeden gelişir. Periferik ve transizyon bölgelerinin arasında yer alan merkez bölge ise glandüler dokunun yaklaşık %25'ini oluşturur ve bu bölgeden nadiren kanser gelişir. Transizyonel bölge, bezin yaklaşık %5'ini oluşturan ve klinik olarak önemli olan bir alandır. Çünkü bu bölge, ilerleyen yaş ile genişleyen ve Selim Prostat Hiperplazisinin (BPH) meydana geldiği alandır. Fibromüsküler stroma ise, glandüler yapıda olmayıp, üretranın önünde yer alan ve üretral direncin sağlanmasında önemli rol oynayan bölgedir [19, 20].



Şekil 2-1: Prostat bezinin anatomisi

2.2. Prostat Bezinin Hastalıkları

Erkeklerde yaş ilerledikçe prostata bağlı hastalıkların gelişme riski artmaktadır. En yaygın olarak görülen prostat hastalıkları, prostat bezinin iltihabı (prostatit), BPH, prostat kanserinin öncüsü olarak kabul edilen proliferatif inflamatuvar atrofi (PIA) ve prostatik intraepitelyal neoplazi ile prostat kanseridir.

2.2.1. Prostatit

Prostat bezinin iltihabı veya enfeksiyonu nedeni ile oluşan prostatit, şişkinlik ve çeşitli üriner problemlerle ortaya çıkan bir hastalıktır. Her yaşta görülebilmesine karşın, genç erkeklerde daha sık görülmektedir [21]. Hastalığın oluşmasına yol açan potansiyel risk faktörleri arasında virüsler, idrar reflüsü, beslenme ile ilişkili faktörler ve fiziksel travma yer almaktadır [22]. Prostat bezinin kronik iltihabı en yaygın olarak periferik bölgede görülür [20].

2.2.2. Selim Prostat Hiperplazi (BPH)

BPH, sıklıkla transizyonel bölgedeki genişlemeyle ortaya çıkan prostat bezinin malin olmayan büyümedir. BPH, progresif bir hastalıktır ve ileri yaş en önemli risk faktörüdür. BPH, 40'lı yaşlardaki erkeklerin yaklaşık %25'inde görülürken, 80 yaş üzerindeki erkeklerde %90 oranında rastlanılmaktadır [23]. Bazen prostatın üretra çevresindeki iç bölümü büyümeye devam eder ve bu durum ciddi problemlere yol açar. Prostat büyüdüğünde üretranın basısı nedeniyle idrar akışı kolayca kısıtlanır ve bu durum ağrı (dizüri), gece sık idrara çıkma (noktüri) ve mesanenin tam boşaltılamaması gibi bazı semptomlara yol açar. Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) yaklaşık 14 milyon erkeğin BPH nedeni bu sorunlarla karşı karşıya olduğu tahmin edilmektedir [24-26].

2.2.3. Prostat Kanserinin Öncül Oluşumları

Prostat kanseri, PIA veya PIN ile başlar ve daha sonra invaziv adeno karsinom gelişir. PIA, kronik inflamasyon ile yakından ilişkilidir. Sık görülen bu lezyonda, mast hücreleri ve makrofajlar gibi kronik inflamatuvar hücre infiltrasyonları ve prostatın periferik bölgesindeki atrofik hücrelerin yapılar izlenir [27, 28]. Etkilenmiş olan epitelyal luminal hücreler büyümüş çekirdek, artmış çoğalma hızı ve azalmış apoptoz

oranı sergilerler [29]. Çoğunlukla periferik bölgedeki yerleşimi nedeniyle PIN yada prostat kanserine dönüşebilmektedir [27].

PIN, prostatta asinüs ve salgı kanallarındaki epitel hücrelerin neoplastik büyümesidir. Bu hücreler, genişlemiş çekirdek, çekirdekçik ve artmış hücre çoğalması ile karakterizedir [30, 31]. Gözlenen değişiklikler sadece luminal hücreleri etkiler ve bazal tabaka bozulmadan kalır. PIN, düşük dereceli (sınıf I) ve yüksek dereceli (sınıf II-III) olarak sınıflandırılrsa da, günümüzde, PIN ile yüksek dereceli olanlar kastedilmektedir. Çünkü, düşük dereceli PIN prognostik bir değere sahip değildir. Yüksek dereceli PIN ise prostat kanseri gelişimi için öncü lezyon olarak kabul edilir [30, 32, 33]. Yüksek dereceli PIN ile prostat kanserinin sıklıkla periferik bölgede ortaya çıkması bu görüşü destekler niteliktedir [34, 35]. Klinik olarak, yüksek dereceli PIN'e sahip hastaların %40'ından fazlasında, tanıdan 3 yıl sonra prostat kanseri teşhisi konulmaktadır [30]. Diğer taraftan, PIN lezyonları ve prostat kanserinde ortak bazı çeşitli genetik değişiklikler de tanımlanmıştır. Örneğin, TMPRSS2-ERG gen füzyonu ve 8p12-21'de genetik kaybın her ikisinde de görülmesi, yüksek dereceli PIN'in prostat kanserinin doğrudan öncüsü olabileceğine işaret etmektedir [31, 36].

2.2.4. Prostat Kanseri

Normal hücrelerin çoğalması, doku yapısının bütünlüğünü ve fonksiyonunu sağlayan büyüme destekleyici faktörler ve hücre döngüsünün kontrol noktalarında yer alan proteinler ile kontrol edilir [37]. Kanser hücreleri ise kazandıkları bazı özellikler sayesinde kontrol noktalarından kaçarak, bağımsız olarak çoğalma yöntemleri geliştirmişlerdir. Bu özellikler; 'sürekli' aktif büyüme sinyallerine sahip olma, büyümeyi baskılayıcı faktörlere direnç, immün denetimden kaçma, replikatif ölümsüzlüğün sağlanması, tümör progresyonununu arttıran inflamasyon, anjiyogenez, invazyon ve metastazın aktive edilmesi, genom kararsızlığı, hücre ölümüne karşı direnç ve hücresel enerji metabolizmasındaki değişikliklerdir [38].

Prostat epitel hücrelerinin kontrolsüz büyümesi sonucu gelişen prostat kanseri dünya genelinde erkeklerde ikinci en sık görülen kanser tipi olup kansere bağlı ölümlerde de ön sıralarda yer alır [39]. Dünya genelinde görülme sıklığı değişkenlik gösteren prostat kanserlerinin yaklaşık %70 kadarı gelişmiş ülkelerde ortaya çıkmaktadır [40]. Prostat kanserinin gelişiminde yaş, aile öyküsü ve etnik köken gibi birçok risk faktörü tanımlanmıştır. Yaş, prostat kanseri için temel risk faktörüdür. Yaşa

göre düzeltilmiş insidans eğrileri incelendiğinde 55 yaşın üzerindeki erkeklerde prostat kanseri riskinin yükselmeye başladığı ve 74 yaşında riskin en yüksek seviyeye ulaştığı görülmektedir [41]. Prostat kanserlerinin %10-20'si ailesel, geriye kalan büyük bölümü ise sporadiktir [42-44]. Bununla birlikte, 44.788 ikiz üzerinde yapılan bir çalışmada, prostat kanseri gelişimi için kalıtsal faktörlerin %42'lik bir risk oluşturduğu gösterilmiştir [45]. Ayrıca siyahi etnik köken, prostat kanserine yakalanma riskini 1.4 kat arttırmaktadır [46]. Yukarıda bahsedilen risk faktörlerine ek olarak diyet, yaşam tarzı, çevresel faktörler ve steroid hormonlar gibi bazı etmenlerin prostat kanseri gelişiminde rol oynayabileceği düşünülmektedir.

Bir adenokarsinom olarak sınıflandırılan prostat kanseri yaygın olarak prostat bezinin periferik bölgesinden gelişir. Prostatta farklı hücre tipleri bulunmasına karşın, tüm prostat kanserlerinin yaklaşık %95'i prostatik kanallarda salgı yapan hücrelerden köken alır. Diğer %5'lik kısmı ise nadir olarak görülen transizyonel hücre karsinom, küçük hücreli karsinom ve skuamöz hücreli karsinom gibi histopatolojik tipleri oluşturur [47, 48]. Prostat kanseri yavaş büyüyen bir malignitedir; organa sınırlı kalarak yıllarca semptom oluşturmada kalabilir. Hastalık ilerlemeye başladığında, ilk olarak kapsül aracılığı ile invazyon yapar ve lokal olarak çevre dokulara yayılır. En sonunda lenf nodları, kemik, akciğer ve karaciğer gibi organlara yayılım gerçekleşir.

Günümüzde prostat kanserinin saptanmasında, parmakla rektal muayene (PRM) ve serumda PSA miktarının tayini yöntemlerinden yararlanılmaktadır. PSA normal prostat sekresyonlarında üretilen bir kallikrein-ilişkili serin proteazdır. Ancak, bazal membranın ve tümör büyümesiyle normal prostat yapısının bozulması sonucu prostat kanserli hastaların kan dolaşımına salınır [49]. PSA düzeylerini ölçmek için yapılan kan testleri 1990'lı yılların başlarından bu yana hastalığı saptamak ve tedaviye cevabı izlemek amacıyla kullanılmaktadır [49]. PRM ve PSA ölçümü, tüm prostat kanser vakalarını saptamaya yetecek kadar duyarlı değildir. Ayrıca bu incelemeler, prostatit veya BPH varlığında gereksiz biyopsileri önleyecek kadar duyarlı değildirler [50]. Bir hasta anormal PRM bulguları ve/veya yüksek PSA seviyesine sahipse prostat biyopsisi ile kesin tanı konulur.

Prostat biyopsileri, 1966 yılında Donald F. Gleason tarafından geliştirilen [51] ve Gleason skoru olarak adlandırılan histolojik derecelendirme sistemi kullanılarak skorlanır [52]. Çoğunlukla birden fazla odak halinde görülen bir adenokarsinom olan prostat kanserinin derecelendirmesinde yaygın kullanılan bu sistem, 2005 ve 2010'da

güncellenmiştir [53, 54]. Bu derecelendirme, tümörün ne kadar hızlı büyüyeceğinin ve yayılacağına öngörülmesini sağlayan bir ölçüttür. Bu sistemde doku yapısı, büyüme ve farklılaşma düzeyine göre 2 puanlama yapılır (her biri 1 ile 5 arasında). Birincisi, farklılaşmış hücrelerdeki baskın hücre tipini tanımlarken, ikinci rakam ikincil baskın hücre tipini tanımlar. 2 ile 10 arası değişen Gleason skoru, en baskın olan iki skurun toplamıdır. Düşük Gleason skoru kanserin agresifliğinin sınırlı olduğunu gösterirken, yüksek Gleason skoru kanserin metastaz yapma olasılığının arttığını işaretidir [53, 54].

Klinik prostat kanseri evrelemesi ise 1992 yılında Amerikan Kanser Komitesi (AJCC) ve Kansere Karşı Uluslararası Birlik (UICC) tarafından geliştirilen, 2010 yılında güncellenen TNM (Tümör-Lenf-Metastaz) sistemi kullanılarak yapılır [55, 56]. Bu sınıflamada primer tümörün boyutu (T), lenf nodlarına yayılım durumu (N) ve uzak metastaz (M) değerlendirilmektedir. Klinik olarak prostat kanserlerini 3 gruba ayrılmaktadır: Lokalize prostat kanseri, lokal ileri evre prostat kanseri ve metastatik prostat kanseri.

ABD’de prostat kanseri tanısı alan erkeklerin %90’ından fazlasında, tümörün prostatı çevreleyen dokularla sınırlı olduğu lokal hastalık mevcuttur [57]. Lokalize prostat kanseri tanısı konan erkeklerde ortalama 5 yıllık sağkalım oranı yaklaşık %100’dür [57]. Lokalize hastalığı olan erkekler için tedavi seçenekleri aktif izlem, prostatektomi veya radyasyon tedavisidir [58, 59]. Ancak lokalize prostat kanserlerinin yaklaşık %30’u 5 yıl içerisinde ileri evre hastalığa dönüşür [58]. Klinik olarak bölgesel lenf nodu tutulumu ya da uzak organ metastazı olmadan, kapsül dışı yayılım gösteren prostat kanseri, lokal ileri evre hastalık olarak tanımlanmakta olup, klinik evrelemede T3 veya T4 olarak sınıflandırılır. Yüksek riskli (Gleason skoru 7 ve /veya artmış PSA, >20 ng/mL) lokal hastalığa sahip hastalar ile lokal ileri hastalığa sahip hastalarda, cerrahi sonrası hormon tedavisi veya bunun radyoterapi ile kombinasyonu birlikte kullanılabilir [60].

Prostat kanseri prostat bezinin ve pelvik bölgenin dışına yayıldığında, ileri evre ya da metastatik prostat kanseri olarak adlandırılır. ABD’de, prostat kanseri olan erkeklerin %4’ü tanı esnasında ileri evre hastalığa sahiptir ve ortalama 5 yıllık sağkalım oranı %31’dir [57]. Prostat kanserlerinin büyük çoğunluğu bölgesel lenf nodlarına veya kemiğe metastaz yapar. Kemik metastazı ileri evre prostat kanserli hastaların %90’ında mevcuttur ve hastalığa özgül mortalitenin en sık nedenini oluşturur [61]. Metastatik prostat kanserli hastaların çoğunluğu bir süre sonra hormon tedavisine direnç kazanırlar.

Hastalarda kastrasyon direnci geliştiğinde androjen baskılanmasına devam edilir ve ek olarak hormon terapisi ve kemoterapötik ajanlar uygulanır. Hormonal veya hormon replasman tedavisi (kastrasyon), erkek hormonlarını baskılar. Son yıllarda yeni nesil androjen biyosentez inhibitörleri (abirateron asetat) veya androjen reseptör antagonistleri (örn.enzalutamid) başarılı bir şekilde uygulanmaktadır.

2.3. Prostat Kanseri Gelişiminin Moleküler Temelleri

Karsinogenez, farklı genetik değişikliklerin birikmesiyle ortaya çıkan ve birkaç aşamada gerçekleşen karmaşık bir süreç olarak nitelendirilir. Diğer birçok solid tümörde olduğu gibi, prostat kanserinin de farklı aşamalarının özgül genetik değişikliklerle ilişkili olduğu kabul edilmektedir. Yeni nesil dizileme ve mikrodizin temelli çalışmaların ilerlemesi ile prostat kanserlerindeki genetik değişiklikler aydınlatılmaya başlansa da [62-67], prostat kanserinin başlamasından sorumlu olabilecek ‘tek’ bir moleküler olay henüz tanımlanmamıştır. Kronik inflamasyon, oksidatif stres, kromozomal değişiklikler, genetik mutasyonlar ve epigenetik değişiklikler de dahil olmak üzere çok sayıda değişikliğin prostat kanserinin gelişmesine katkıda bulunduğu düşünülmektedir [68]. Prostat kanserinde yaygın olarak görülen genomik bozukluklar: TMPRSS2-ETS gen füzyonu, p53, AR, RB1 ve PTEN/PIK3CA'nın mutasyonları ve kopya sayısı değişikliklerinin yanı sıra BRCA2 ve ATM gibi DNA onarım genlerindeki değişikliklerdir [66, 69-74].

Androjenler tarafından düzenlenen bir serin proteaz olan Trans Membran Proteaz Serin 2 (TMPRSS2) ile ETS transkripsiyon faktör ailesine ait ERG ve ETV1 arasında oluşan füzyon malin prostat tümörlerinin yaklaşık %50-79’unda saptanmıştır [62, 65, 67, 75]. TMPRSS2–ETS füzyonu lokalize prostat kanserinde kötü prognoz ile ilişkilidir [76]. TMPRSS2-ERG füzyonuna ilaveten kromozom 8q'de kromozomal kazançlar; kromozom 3p, 8p, 10q, 13q ve 17p' de kayıplar görülmektedir [67, 77, 78]. 8q21'de NKX3-1, 10q23'te PTEN ve 8q24'de MYC gibi birkaç önemli düzenleyici gen genetik değişikliklerden etkilenmektedir [68].

Prostat tümörlerinin yaklaşık %3-47’sinde p53 gen mutasyonları, %2-15 kadarında ise homozigot delesyon saptanmaktadır [63, 67]. Bu protein, genomik stabilitenin korunmasında ve tümör oluşumunun önlenmesinde önemli yer tutar. Prostat kanserinde önem taşıyan diğer bir gen olan PTEN (Fosfataz ve Tensin Homolog); PI3K (fosfoinositol-3-kinaz) ve AKT'yi içeren sinyal yolağı, hücre çoğalması ve hücre

ölümünün düzenlenmesinde merkezi rol oynar [79]. PI3K/AKT/mTOR yolağı, prostat kanserinin metastatik potansiyelinin temelini oluşturur ve hedef tedavi yollarının başında gelir [69]. Erken evre prostat kanserinde PTEN'in bir kopyası sıklıkla kaybedilirken, ileri evre kanserde genin her iki kopyası da işlevsiz hale gelebilmektedir. PTEN, PI3K'yı etkisiz hale getiren bir fosfolipid fosfatazdır [80]. Prostat tümörlerinin yaklaşık %2-14'ünde PTEN mutasyonları ve %12-41'inde ise allel kaybı oluşabilmektedir [62, 65-67].

Bunların dışında, kanserlerin yaklaşık %2-20'sinde, hücre döngüsünün ilerlemesi, apoptoz ve hücrel dönüşümde önemli rol oynayan MYC geni amplifikasyonu gözlenmektedir [81]. Ayrıca son zamanlarda prostat kanserlerinin bir kısmında, BRCA2 ve ATM gibi DNA onarım genlerinde hem germline hem de somatik mutasyonların gerçekleştiği bildirilmektedir [66, 81, 82].

Bunlara ek olarak, histon modifikasyonları ve DNA metilasyonundaki global değişiklikler, normal prostat dokusunda ve prostat tümörlerinde tanımlanmıştır [83-85]. En çarpıcı epigenetik değişikliklerden biri, prostat kanseri vakalarının %90'ında saptanan GSTP1 geninde CpG hipermetilasyonudur [86]. Ayrıca, prostat kanserinde DNMT3A, DNMT3B ve EZH2 gibi DNA metilasyonu ve histon metilasyonunun düzenlenmesinde rol oynayan birkaç proteinin ifadesinde artış gösterilmiştir [84, 87].

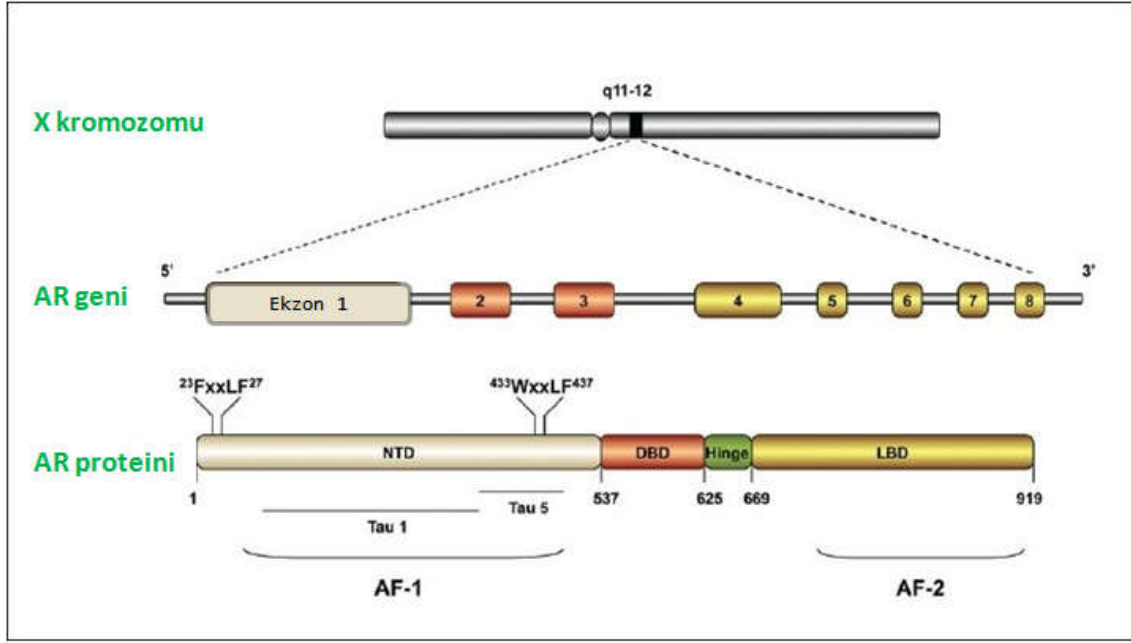
2.4. Androjenler ve Androjen Reseptörü

Erkek steroid hormonları olan androjenler, prostatın embriyonik gelişimi ve işlevlerini sürdürmesi için gerekli olmakla beraber prostat kanseri gelişimi de genel olarak androjenlere bağımlıdır [88]. Androjenler çoğunlukla (%90 oranında) testislerde Leydig hücreleri tarafından testosteron olarak üretilir [89]. Böbrek üstü bezlerde de (%10) androjenler üretilmesine karşın, bu, doku androjenlerinin birincil kaynağı değildir [90]. Testosteron üretimi hipotalamus-hipofiz bezi-gonadal aks tarafından düzenlenir. Hipotalamus, luteinize edici hormonu salgılayan hormonu (LHRH) salgılar ve bu şekilde hipofiz bezi tarafından luteinize edici hormon (LH) salınımını uyarır. LH, testislerdeki Leydig hücreleri tarafından testosteron üretimini uyarır. Kandaki testosteron seviyeleri, bir negatif 'geri bildirimle' kontrol edilir [91]. Dolaşımdaki testosteron genellikle seks hormonu bağlayıcı globulin (SHBG), albumin ve kortikosteroid bağlayıcı globulin gibi serum proteinlerine bağlanır [89]. Proteinlere bağlı testosteronlar, daha sonra bu proteinlerden ayrılarak prostat hücrelerinin plazma

zarları boyunca difüze olarak 5 α -redüktaz enzimleri (SRD5A1, SRD5A2) tarafından sitoplazmada AR'nin aynı türden ligandı olan dihidrotestosterona (DHT) dönüştürülür. SRD5A1'in varlığı, prostatta, testosterondan daha etkin bir androjen olan DHT'den zengin bir mikroçevre oluşturur [92, 93].

Prostat bezinin işlevlerini etkin bir şekilde sürdürebilmesi için androjenler, özellikle de testosteron ve DHT gereklidir. Prostat bazal epitel hücrelerinin, salgılayıcı luminal epitel hücrelerine farklılaşması androjenler tarafından düzenlenir. Bununla birlikte, androjenler aynı zamanda stromal hücrelerin parakrin desteğiyle epitel hücrelerinin çoğalmasını da uyarır. Stromal hücreler epitel hücrelerinin hayatta kalması için çok önemli olan büyüme ve sağkalım faktörleri salgırlar. Bu büyüme desteği, androjenler ve AR sinyali aracılığı ile meydana gelir. Androjenler olmadan, örneğin kastrasyondan sonra, epitelin stromal hücreleri tarafından epitele verilen destek bloke edilir; böylece epitelyal hücreleri hızla apoptoz yoluyla ölürler.

Androjenlerin işlevi, ligand tarafından uyarılabilir bir transkripsiyon faktörü olan AR aracılığı ile gerçekleşir [94-96]. AR, X kromozomu (Xq11-12) üzerinde, yaklaşık 90 kb uzunluğunda 8 ekzondan oluşan bir genomik bölge tarafından kodlanır. AR reseptörü, prostat bezindeki tüm hücre tiplerinde ifade edilmez. Lüminal salgı hücreleri yüksek düzeyde AR ifade ederken [97]; bazal hücrelerin, nöroendokrin hücrelerin ve kök hücrelerinin çoğunluğu AR negatiftir ve androjenlerden bağımsız olarak işlev görürler [98]. AR, steroid nükleer reseptör süperaillesine ait bir üyedir [99, 100]. Steroid reseptör ailesinin diğer üyelerine göre daha fazla korunmuş olan AR, yapısal olarak 4 fonksiyonel bölgeye ayrılır (Şekil 2-2). Bunlar; az korunmuş N-terminal bölgesi (NTD), yüksek oranda korunmuş DNA bağlayıcı bölge (DBD), orta derecede korunmuş ligand bağlama bölgesi (LBD) ve kısa bir aminoasit dizisi olan 'Hinge bölgesi'dir [99-102].



Şekil 2-2: Androjen reseptör geni ve AR proteinin şematik yapısı

AR'nin en büyük bölgesi olan N-terminal domaini (NTD), ekzon 1 tarafından kodlanır ve reseptörün, transkripsiyonel aktivasyon işlevine sahip alandır. NTD, iki transkripsiyonel aktivasyon birimini (TAU-1 ve TAU-5) içeren, ligandtan bağımsız transkripsiyonel aktivasyon birimini (AF-1) barındırır [103]. TAU5, NTD içindeki yapısal transkripsiyonel aktivitenin temel sorumlusudur [104].

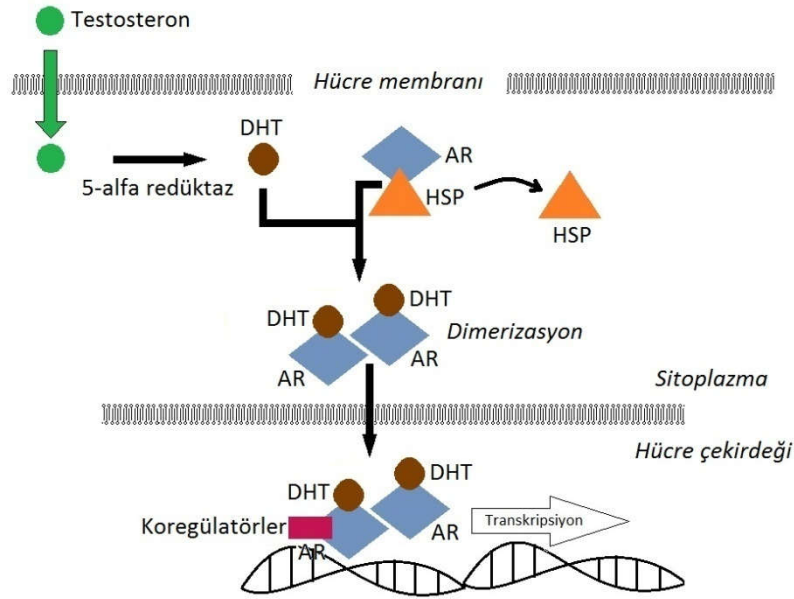
Ekzon 2 ve 3 tarafından kodlanan DNA bağlanma domaini (DBD) başlıca iki çinko parmak alandan oluşur. İlk çinko parmak, DNA oluğu içindeki gen spesifik nükleotid etkileşimlerini koordine eden korunmuş bir P-kutusu motifi içerir. İkinci çinko parmak ise, reseptör homodimer oluşumu için DBD/LBD bağlanma yeri olarak işlev gören korunmuş bir D-kutusu motifine sahiptir [105]. Bu iki çinko parmak, DNA'nın tanınması ve bağlanması için kritik önem taşır.

Yaklaşık 50 aminoasitlik kısa bir diziden oluşan “Hinge Bölgesi” LBD'yi DBD'den ayırır. Bu bölge, AR'nin çekirdek içine geçişi için çift taraflı ligand bağımlı nükleer lokalizasyon sinyalinin (NLS) bir kısmını da içerir. Bir hücre iskeleti proteini olan Filamin-A (FlnA), AR'nin Hinge, DBD ve LBD bölgeleri ile etkileşime girer ve AR'nin çekirdeğe geçişini kolaylaştırır. FlnA negatif hücre soylarında, AR'nin nükleer geçişi gerçekleşmemekte ve uzun süren androjen maruziyetinden sonra dahi AR sitoplazmada kalmaktadır [106].

Ekzon 4-8 tarafından kodlanan ligand bağlanma domaini (LBD), AR ligandlarının bağlanmasına yardımcı olur ve dimerizasyona katılan aminoasitleri içerir. Ayrıca LBD, ligand bağımlı aktivasyon fonksiyonu 2 (AF-2) olarak adlandırılan bir bölge taşır. Bu bölge spesifik ligand bağlanması, dimerizasyon ve transaktivasyon için gereklidir [100, 101].

Aktif olmayan AR, ısı-şok proteinleri (HSP) ailesinden şaperon proteinlerine (özellikle HSP90) bağlı olarak sitoplazmada bulunur [107]. LBD, reseptörün istenmeyen aktivasyonunu önlemek için inhibe edici özellikler sergiler [108]. AR'nin klasik etki yolağında, testosteron veya DHT'nin AR'nin LBD'ye bağlanması ile bir dizi konformasyonel değişiklikler meydana gelir ve böylece AR'nin HSP'lerden ve şaperon moleküllerinden ayrılması uyarılır. Bu değişiklikler ile AR'nin fosforilasyonu gerçekleşir ve aktif formdaki AR kompleksi hızla hücre çekirdeğine geçer. Çekirdekteki aktif AR, eş-düzenleyicilerle etkileşime girer ve hedef genlerin promotör bölgelerinde bulunan androjen cevap elementlerine (ARE) dimer halinde bağlanır [109] (Şekil 2-3). AR, hücre büyümesi, farklılaşması ve sağkalımına ek olarak birçok genin transkripsiyonunu kontrol eder [110, 111].

Bu klasik AR genomik sinyal yolağı, birkaç saat içinde gerçekleşen bir süreç olup yazılım ve hücre çoğalması için, AR'nin çekirdeğe geçişine ve DNA'ya bağlanmasına bağımlıdır. Buna karşılık, klasik olmayan ve 'genomik olmayan AR sinyal yolağı' olarak adlandırılan durumda, AR dakikalar içinde sitoplazmada hücre içi sinyal molekülleri ile etkileşir. Bu yolda aktif AR, direkt olarak PI3K'nin p85α düzenleyici alt birimi, Src'nin SH3 (Src homoloji 3) domaini ve Ras/Raf-1 ile doğrudan etkileşime girebilmektedir. Bunun sonucunda MAPK/ERK (mitojen-aktif protein kinaz/ekstrasellüler sinyal regüle kinaz) aktivasyonu ve hücre çoğalması uyarılır [112-114].



Şekil 2-3: Androjen reseptör yolağının işleyişi

2.5. Androjen Reseptörü ve Prostat Kanseri

1941 yılında Haggins ve Hodges'un [115], prostat kanseri büyümesinin ve ilerlemesinin androjen bağımlı olduğunu göstermelerinden bu yana androjenler ve AR, prostat kanserinin en önemli moleküllerini oluştururlar [116]. Yukarıda bahsedildiği gibi lokalize ve lokal ileri prostat kanseri için aktif izlem, radikal prostatektomi ve radyasyon terapisi tedavi seçenekleri oluştururlar. Metastatik prostat kanserinde ise, temel tedavi seçenekleri kemoterapi (dosetaksel) ve ADT'dir. Serum testosteron seviyeleri, testislerin cerrahi olarak çıkarılması (orşidektomi), LHRH agonistleri ve bunların kombinasyonunu kullanarak veya AR işlevini bloke eden AR antagonistleri kullanılarak düşürülür [117-119]. ADT ileri evre prostat kanseri tedavisinde temel yaklaşım olmaya devam etmektedir.

ADT'nin birincil amacı testis kaynaklı androjenlerin üretimini baskılamaktır. ADT, hücre döngüsünün durdurulması ve apoptotik hücre ölümü yoluyla tümör büyümesini ve hastalığın ilerlemesini yavaşlatır [6-8]. Başlangıçta ADT'ye yanıt gelişir; ancak birçok hastada birkaç yıl (2-3) içinde, androjen seviyelerinin düşürülmesine rağmen, tümör hücrelerinin kendi büyümelerini sağlayacak mekanizmalar geliştirdiği kastrasyona dirençli prostat kanseri (KDPK) gelişir [5]. Hormona duyarlı prostat kanseri ile karşılaştırıldığında KDPK'li hastaların prognozu bariz şekilde daha kötüdür [120]. Klinik çalışmalarda KDPK'li hastaların medyan sağkalımı 9-30 ay arasında değişmektedir [120]. Bu durum, abirateron asetat ve enzalutamid gibi ikinci nesil AR

sinyal yolağı inhibitörlerinin geliştirilmesine yol açmıştır. Abirateron asetat, adrenal bezlerden ve tümör mikroçevresinden ekstragonadal testosteron sentezini inhibe etmek için tasarlanmış, CYP17A1 (Sitokrom P450 17A1) enziminin geri dönüşsüz bir inhibitörüdür [121].

Enzalutamid ise, 2012 yılında ABD gıda ve ilaç kurumu (FDA) tarafından onaylanmış ilk AR inhibitörüdür ve etki mekanizması ile, hem birinci nesil anti-androjenlerden (örneğin bicalutamid) hem de androjen biyosentezi inhibitörlerinden (örneğin abirateron asetat) ayrılır [122, 123]. Enzalutamid, AR antagonist ailesinin bir üyesi olan tiohidantoin türevidir ve diğer AR antagonistlerine kıyasla daha yüksek AR afinitesine sahiptir. Enzalutamid ile tedavi edilen hastaların yarısından çoğunda, serum PSA düzeyinde %50'den fazla azalma gözlemlenmiştir. Bu molekül KDPK'li hastalarda kemoterapi sonrası genel sağkalımı (OS) arttırmaktadır [124]. Yapılan *in vitro* çalışmalar enzalutamidin AR'nin LBD'sine bağlanarak AR sinyal yolunu üç ana aşamada etkilediğini göstermektedir. Bu ikinci nesil AR antagonisti; androjenlerin AR'ye bağlanmasını engelleyerek, aktif AR'ın çekirdeğe geçişini bloke ederek ve AR ile DNA'nın bağlanmasını önleyerek etki gösterir [9, 125].

2.6. AR Sinyali ile Düzenlenen Yolaklar

AR sinyali, genel metabolizma ve biyosentez, lipid ve kolesterol biyosentezi, yağ asidi metabolizması, endoplazmatik retikulum (ER) stresine yanıt ve glikozilasyon da dahil olmak üzere prostat kanseri gelişiminde ve ilerlemesinde önemli olduğu bilinen çok sayıda yolakla doğrudan bağlantılıdır [111, 126-133].

PI3K/AKT sinyal yolağı, prostat kanserinin ilerlemesinde önemli bir mekanizma olup, primer tümörlerin %42, metastatik tümörlerin ise %49'unda yolağın değişime uğradığı saptanmıştır [67]. PI3K/AKT sinyal yolağının negatif düzenleyicisi olan tümör baskılayıcı gen PTEN'in kaybı, hemen hemen tüm metastatik KDPK vakalarında PIK3CA ve AKT1 mutasyonları ile birlikte görülmektedir [66, 134]. AR sinyali ile PI3K yolu arasındaki karşılıklı çapraz etkileşim KDPK'nın gelişiminde temel mekanizmalardan biri olarak kabul edilmektedir [135]. PI3K proteininin düzenleyici alt ünitesi olan PIK3R1'in ifadesi androjen ile düzenlenir ve prostat kanser dokularında baskılanmıştır. Bu da AR sinyalizasyonu ve PI3K yolağı arasındaki transkripsiyonel bağlantıyı desteklemektedir [136]. Ayrıca, AR ve PI3K sinyal yolaklarının birlikte inhibisyonu, kanserin KDPK'ye ilerlemesini önemli ölçüde sınırlamaktadır.

Prostat kanserlerinde yaygın olarak görülen diğer bir genetik lezyon RAS/ERK1/ERK2 sinyal yolağının bozulmasıdır. Primer tümörlerin %43, metastatik tümörlerin %90'ında bu yolda yer alan genlerde aktive edici mutasyonlar görülür [67]. RAS/ERK1/ERK2'nin aktivasyonunun, prostat kanseri progresyonunda PTEN kaybının etkisini arttırdığı düşünülmektedir [137].

KDPK gelişiminde Wnt/ β -katenin yolağının rolü konusunda da bilgiler artmaktadır [138]. β -katenin, AR ile etkileşerek, ligand bağlama hassasiyetini ve özgüllüğünü değiştirerek transkripsiyonel aktiviteyi arttırmaktadır [139, 140]. Primer prostat tümörlerine kıyasla ileri evre tümörlerde ve KDPK'da çekirdekte β -katenin anlatımının arttığı gözlenmiştir [141, 142]. Ayrıca KDPK'lı hastalarda β -katenini kodlayan dizilerde aktive edici mutasyonlar ve APC'de tekrarlayan değişiklikler tanımlanmıştır [66, 143].

2.7. Kastrasyona Dirençli Prostat Kanserinin Gelişimi

KDPK, geleneksel olarak 'hormona dirençli' veya 'androjen bağımsız' prostat kanseri olarak adlandırılrsa da günümüzde tercih edilen terminoloji 'kastrasyona dirençli' kavramıdır. ADT tedavisi sürecinde, serum testosteronun kastrasyon seviyeleri (<50 ng/dL) ile aşağıdaki kriterlerden birini veya birkaçını karşılayan kanserler 'kastrasyona dirençli' olarak kabul edilir:

- 1) PSA serum seviyelerinin yükselmesi (biyokimyasal progresyon),
- 2) Önceden mevcut olan kanser varlığında belirtilerin gelişimi (klinik progresyon),
- 3) Görüntüleme ile teyit edilmiş yeni metastatik lezyonların saptanması (radyografik progresyon) [144, 145].

Androjene bağımlı prostat kanserinin KDPK'ye ilerlemesine yol açan mekanizmalar büyük ölçüde belirsizliğini korumaktadır. Dolaşımdaki androjenlerin azaltılmasına ve AR blokajına rağmen, devam eden AR sinyalizasyonun KDPK'nın gelişiminde merkezi rol oynadığı düşünülmektedir [94, 146]. KDPK'da gözlenen androjen bağımsız büyüme ile ilişkili birçok mekanizma ve alternatif yola bulunmaktadır. Bunların büyük çoğunluğu AR aracılığıyla gerçekleşir. Dolayısıyla, AR sinyalinin baskılanması, prostat kanserinin tedavisinde terapötik hedef olmaya devam etmektedir.

2.7.1. Androjen Reseptör Amplifikasyonu ve Aşırı Duyarlılık

AR üretimindeki artış KDPK'da AR sinyalinin etkinleşmesine yol açar. AR aşırı ekspresyonu KDPK'de en sık görülen genetik değişimdir. AR geninde amplifikasyon, mRNA transkripsiyonunun artması ya da mRNA veya proteinin stabilizasyonunun artması daha fazla AR üretilmesi ile sonuçlanır [147]. AR geninde kopya sayısı kazancı KDPK'lı hastaların %50'sinde saptanmıştır [65, 66, 148]. AR amplifikasyonu, tümör hücrelerinin düşük testosteron seviyelerine aşırı duyarlı hale gelmesine yol açar. Diğer taraftan, metastatik KDPK'lı hastaların dolaşımdaki tümör hücrelerinde (CTC'ler) ve serbest (cell-free) tümör DNA'sında (ctDNA) hem AR hem de CYP17A1'de geninde kopya sayısı değişiklikleri gösterilmiştir [149-151].

2.7.2. Androjen Reseptör Gen Mutasyonları

AR nokta mutasyonları lokal ve lokal ileri tümörlerde saptansa da, genel olarak, ileri derece androjen bağımsız kanserlerde, özellikle de anti-androjenlerle tedaviden sonra görülür. KDPK'lı hastalarının yaklaşık %10-30'unda AR mutasyonları görülmektedir [152]. KDPK'da saptanan mutasyonların çoğunluğu (%49) AR'nin LBD bölgesinde gerçekleşir. Bunu, NTD (%40), DBD (%7) ve hinge bölgesi (%2) izler [153]. En sık rastlanan AR mutasyonu, 877. nükleotidteki treonin aminositinin alanine (T877A) dönüştüğü nokta mutasyonudur. T877A mutasyonu AR'nin LBD domaininde meydana gelir ve KDPK'lı vakaların yaklaşık üçte birinde görülür [154]. LBD'deki mutasyonlar ligand özgünlüğünü genişleterek östrojen, progesteron ve hatta androjen antagonisti flutamidi içeren çok sayıda endojen hormon ile reseptörün aktive olmasına yol açabilir [155]. NTD ve DBD'de meydana gelen mutasyonlar, eş-düzenleyicilere karşı reseptör afinitesini ve çekirdeğe geçişi etkileyebilmektedir [156].

2.7.3. Androjen Reseptör Varyantları

Alternatif gen kırılması veya AR geninin yeniden düzenlenmesi yoluyla ortaya çıkan yapısal olarak aktif AR varyantları (AR-V), son yıllarda kastrasyona dirençli büyümeye katkıda bulunan bir unsur olarak giderek daha fazla araştırılmaktadır. Çok sayıda yapısal olarak aktif AR varyantı tanımlanmıştır. Bu varyantların büyük çoğunluğu, proteinin C-terminal ucunun kesilmesi veya ekzon atlaması yapılarak, LBD bölgesinin kaybı sonucu oluşur. AR varyantlarının en yaygın olanları AR-V7 [157] ve

ARv567es [158] olup, her ikisinde de işlevsel bir LBD yoktur. Ancak nükleer lokalizasyon sinyali muhafaza edilmiştir. Bu değişiklikler çekirdeğe geçişi sağlar ve androjenlerin yokluğunda veya enzalutamid varlığında AR sinyalini kolaylaştırır [159, 160]. Yüksek düzeyde AR-V7 ve ARv567es ifadesi saptanan hastalarda prognoz olumsuz etkilenir ve daha kısa sağkalım oranları söz konusudur [161]. Metastatik KDPK hastalarının dolaşımındaki tümör hücrelerinde AR-V7 mRNA transkriptleri saptanmıştır ve abirateron asetat ve enzalutamide karşı direnç için yüksek prediktif değere sahiptir [162, 163]. Bu bulgu, AR ek varyantlarının potansiyel prognostik ve prediktif belirteçler olarak önemine işaret etmektedir.

2.7.4. Androjen Reseptörünün Eş-Düzenleyicileri

AR için eş-düzenleyici (ko-regülatörler) olarak görev yapan birçok farklı protein tanımlanmıştır. Bu proteinler, AR'nin transkripsiyonel aktivitesini arttırıcı (ko-aktivatörler) ya da baskılayıcı (ko-represörler) olarak işlev görebilirler. Bu eş-düzenleyici proteinlerin ekspresyonu prostat kanseri progresyonunun farklı aşamalarında değişir ve bunun sonucunda prostat kanseri hücrelerinin çoğalması, apoptoz, migrasyon, invazyon ve farklılaşmasını etkileyebilir [164]. ADT sürecinde P300, CBP ve Tip60 dahil olmak üzere birkaç AR eş-düzenleyici molekülün ifadesinin arttığı gözlenmiştir [165-167]. P300/CBP yolağı androjenden bağımsız IL-6 aracılı AR aktivasyonunu uyarır [168]. Tip60, AR'nin çekirdeğe geçişi ile hücre çoğalmasını artırır [169].

2.7.5. Tümör İçi Androjen Biyosentezi

ADT sonrası düşük serum testosteron düzeyleri elde edilmesine karşın, tümör içi testosteron seviyeleri kanserin ilerlemesini uyarmak için yeterli düzeyde kalabilir. Bu durum, steroid biyosentezinin değiştirildiğini göstermektedir. Birçok çalışma, prostat kanseri hücrelerinin, kolesterol [170] ve adrenal androjen dehidroepiandrosteron (DHEA) gibi farklı androjen öncüllerinden testosteron sentezleyebildiğini göstermiştir [171]. Buna ek olarak, testosteron biyosentezinde yer alan birkaç genin ifadesi KDPK'de artmaktadır. Bu genler; öncül moleküllerin testosterona dönüşmesini katalizleyen bir enzimi kodlayan AKR1C3, testosteronu DHT'ye dönüştüren SRD5A1/2 ve kolesterolün androjen öncüllerine dönüştürülmesinden sorumlu CYP17A1 ve HSD17B6'dır [172].

2.7.6. Ligandan –Bağımsız Aktivasyon

ADT, AR sinyalini baskılamak için kullanılsa da, AR'yi stabilize eden ve ligand bağlanmasından bağımsız olarak transkripsiyonel aktiviteyi arttıran bir dizi sitokin ve büyüme faktörü bulunmaktadır. İnterlökin-6 (IL-6), immün regülasyon için önemli olan ve hücre çoğalmasını düzenleyen çok işlevli bir sitokindir [173]. Androjenler, androjen duyarlı LNCaP prostat kanseri hücre soylarında IL-6 ekspresyonunu uyarır [174]. Bunun tersi de gerçekleşebilir; IL-6, düşük androjen konsantrasyonlarında bile, AR aktivitesini ligandan bağımsız ve sinerjik bir şekilde düzenleyebilir [175, 176]. Serum IL-6 düzeyleri prostat kanserinde önemli bir prognostik faktördür ve KDPK hastalarında artmış IL-6 serum seviyeleri bildirilmiştir [177]. JAK-STAT, MAPK ve PI3K-AKT sinyal yollarının, IL-6 ile AR aktivasyonunda önemli olduğu gösterilmiştir [178, 179].

Epidermal büyüme faktörü reseptörü (Her2/neu) hücre büyümesinde ve farklılaşmada önemli bir rol oynayan bir reseptör tirozin kinaz onkoproteinidir [180]. Her2/neu gen amplifikasyonu ve Her2/neu proteininin aşırı ekspresyonu, meme kanseri ve yumurtalık kanseri de dahil olmak üzere birçok kanser türünün ilerlemesine yol açar [181]. KDPK'de Her2/neu ifadesi artmaktadır ve androjenlerin yokluğunda Akt (protein kinaz B) aktivasyonu vasıtasıyla hücre büyümesini ve sağkalımını teşvik etmektedir [182, 183].

Transkripsiyon faktörü nükleer faktör kappa B (NF- κ B) ailesi insan malinitelerinde onkogenik yolağın önemli bir bileşenidir. AR'nin, androjenlerin yokluğunda NF- κ B sinyalini aktive ettiği ve androjenlerin varlığında NF- κ B'yi baskıladığı düşünülmektedir [184]. Yapılan *in vitro* çalışmalarda androjenlerin bulunmadığı durumlarda, NF- κ B sinyalinin yapısal olarak aktive edilmesinin, AR mRNA ve protein düzeylerini, AR transaktivasyon aktivitesini ve hücre çoğalmasını önemli ölçüde arttırdığı gösterilmiştir [185].

2.8. Androjen Reseptörünün Hedef Genleri

Mikrodizin yaklaşımı ile yapılan gen ifadesi çalışmaları, hücredeki tüm transkriptlerin yaklaşık %24'ünün doğrudan veya dolaylı olarak androjenler tarafından düzenlenebileceğini öne sürmektedir [186, 187]. AR, hedef genlerin androjen cevap elementlerine (ARE'ler) bağlanarak androjene cevap veren genlerin ifadesini düzenler.

Dizi analizi ve kromatin immüno çökeltme (ChIP) teknikleri klasik ARE'lere ek olarak, hedef genden uzak bölgelerde bile (300 kb) bulunabilen doğal olmayan birkaç AR bağlanma bölgesi tanımlamıştır [188].

PAP, PSA ve TMPRSS2 en yaygın olarak bilinen ve araştırılan AR hedef genleri arasında yer alırlar. Bunlara ek olarak, son zamanlarda mikroRNA ve uzun kodlamayan RNA'ların androjen yolağındaki rolü konusunda yeni bulgular bildirilmektedir [189, 190].

2.8.1. Prostat Asidik Fosfataz (PAP)

PAP geni kromozom 3q21q23'de yer alır. PAP, prostat epitel hücrelerinde sentezlenen ve prostat sıvısına salınan 100 kDa büyüklüğünde bir lipid fosfataz kodlar. PAP'ın, hücresel ve salgılanan formu olmak üzere farklı biyokimyasal özelliklere sahip iki formu bulunur. PAP'ın androjenler tarafından doğrudan bifazik bir şekilde düzenlendiği ve hem normal prostatta hem de prostat kanserinde yüksek oranda ifade edildiği gösterilmiştir [191-193]. Hücresel PAP seviyeleri ileri evre prostat kanserinde azalır ve PAP ifadesi hücre büyümesi ve kanser ilerlemesi ile negatif olarak ilişkilidir. Ancak PAP düzeylerinin azalmasına neden olan moleküler mekanizmalar bilinmemektedir.

2.8.2. Prostat Spesifik Antijen (PSA)

AR'nin en önemli hedef genlerinden birisi olan PSA, insan kallikrein (KLK) ailesinin bir üyesidir ve kromozom 19q13.41'de yerleşiktir. PSA, 33 kDa'luk moleküler ağırlığa sahip bir glikoproteini kodlar ve serin proteaz olarak işlev görür. Tüm kallikrein genleri, benzer boyuttaki beş ekzona sahiptir ve yüksek dizi homolojisi gösterirler. Ayrıca bu peptidazların birçoğu birkaç alternatif bağlanma varyantına sahiptir ve androjenler tarafından düzenlendiği bilinmektedir [194].

PSA, sperm hareketliliğini kolaylaştırmak için prostat epiteli tarafından üretilen seminal sıvının bir bileşenidir [195]. Malin hücrelerden periferik dolaşıma PSA salınmasından dolayı prostat kanserli hastaların serumunda bu proteinin seviyeleri yükselme eğilimindedir [196]. PSA, prostata özgü olmasına karşın tümör spesifik değildir ve BPH, prostatit, travma ve alt üriner sistem enfeksiyonlarında da seviyesi yükselebilmektedir. Yüksek serum PSA değerlerine sahip erkeklerin yaklaşık %70'inde biyopside histolojik olarak prostat kanseri bulgusu bulunmamaktadır [197, 198].

Dahası, normal PSA düzeyleri olan erkekler arasında %15 kadarı prostat kanserine sahip olabilmektedir [199]. PSA'nın, ekstrasellüler matriks glikoproteinlerini doğrudan parçalayarak ve hücre göçünü kolaylaştırarak prostat kanserinin ilerlemesinde rol oynadığı düşünülmektedir [200, 201].

2.8.3. TMPRSS2-ERG

2005 yılında, prostat tümörlerinde androjen tarafından düzenlenen zar-geçen bir serin proteaz kodlayan TMPRSS2 geninin 5'-UTR bölgesi ile ETS transkripsiyon faktör ailesinin iki üyesi arasında (ERG ve ETV1) yaygın olarak bulunan füzyonlar tanımlanmıştır [202]. Bütün bu füzyonlar AR'nin transkripsiyonel kontrolü altında bulunur. En sık görülen füzyon olan ve klinik insidansı %50'yi aşan TMPRSS2-ERG'nin başlangıçta prostat kanserinin agresif, invaziv bir alt tipi ile ilişkili olduğu düşünülmekte idi [203]. Ancak, bu gen füzyonunun prognostik değeri tam olarak tanımlanamamıştır. Bazı çalışmalar, TMPRSS2-ERG gen füzyonu pozitif olan olgularda, bu genetik değişikliğin, agresif prostat kanseri, metastaz ve mortalite ile ilişkili olduğunu ileri sürerken [204, 205], diğer bazıları bu füzyon ile klinik sonuç arasında bir korelasyon saptayamamıştır [206].

2.9. Kodlamayan RNA'lar

RNA molekülleri protein kodlama özelliklerine göre ikiye ayrılır: protein kodlama yeteneğine sahip olan haberci RNA (mRNA) molekülleri ve protein kodlama potansiyeli olmayan veya çok az olan 'kodlamayan RNA'lar' (ncRNA'lar). Moleküler biyolojinin santral dogmasının temel bileşeni olan mRNA'lar, DNA'dan ribozomlara genetik bilgi aktarıp protein sentezine aracılık yaparlar. Yüksek çıktılı dizileme teknolojilerinin hızlı bir şekilde gelişmesi ve uygulanması ile ökaryotik genomların yaklaşık % 90'ının yazılıma uğradığı ve mRNA'ların toplam RNA'ların yalnızca %1-2'sini oluşturduğu gösterilmiştir [207].

ncRNA'lar işlevlerine bağlı olarak 'yaşamsal' ncRNA'lar ve 'düzenleyici' ncRNA'lar olarak sınıflandırılabilir. Yaşamsal ncRNA'lar olarak bilinen transfer RNA'lar (tRNA'lar), ribozomal RNA (rRNA'lar), küçük çekirdek RNA'ları (snRNA'lar) ve küçük çekirdekçik RNA'ları (snoRNA) protein sentezi başta olmak üzere birçok hücresel süreçte görev yapan bileşenlerdir. Düzenleyici ncRNA'lar ise genellikle küçük ncRNA'lar ve uzun kodlamayan RNA'lar (lncRNA) olarak adlandırılırlar [208].

miRNA'lar olarak adlandırılan kısa (yaklaşık 17-25 nükleotid uzunluğunda) kodlamayan RNA'lar, memeli genomunun %1-3'ünü oluşturur [209]. miRNA'lar gen ifadesinin yazılım sonrası aşamada negatif yönde düzenlenmesinde anahtar rol oynarlar. Bunu, protein sentezini baskılayarak ya da mRNA yıkımına yol açarak gerçekleştirirler [210, 211]. Dolayısıyla miRNA'lar, hücre gelişimi, farklılaşma, gen düzenlenmesi, kromatin düzenlenmesi ve apoptoz gibi farklı yolları düzenleyerek, hücrede ve dolayısıyla kanser gelişiminde son derece kritik rol oynarlar. Yapılan çalışmalarda prostat kanseri ile ilişkili birçok miRNA keşfedilmiştir, öne çıkan moleküller arasında miR-141 ve miR-375 yer almaktadır [212-214].

2.9. 1. Uzun Kodlamayan RNA'lar

Uzun kodlamayan RNA'lar (lncRNA'lar), biyogenezleri açısından geniş bir RNA grubuna ait olan, 200 nükleotidden uzun molekülleridir. lncRNA moleküllerinin birçoğu, poli-(A) kuyruğu ve şapka (7-metil guanozin) taşımaları yönüyle mRNA'lara benzerler [215]. Başlangıçtaki düşüncelerin aksine, son yıllarda yapılmış yüzlerce çalışma, DNA, RNA ve transkripsiyon faktörleri ile etkileşen lncRNA'ların, DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve kromatin yeniden modellenmesi gibi çeşitli biyolojik süreçlere katıldığını göstermektedir [216]. lncRNA promotörlerinin histon 3 lizin 4 trimetilasyonu (H3K4me3), RNA polimeraz II (Pol II) ve DNaz I aşırı duyarlılık bölgelerinden zengin olması, lncRNA ekspresyonunun aktif olarak düzenlendiğini düşündürmektedir. Bu bulgu, birçok lncRNA molekülünün doku veya gelişimsel aşamalardaki özgül ifadesini açıklamaktadır. Protein kodlayan genlerle karşılaştırıldığında, lncRNA'lar, düşük dizi korunmasına ve düşük ifade seviyelerine sahiptir.

İşlevsel olarak heterojen moleküller olmalarından dolayı lncRNA'ların sınıflandırılması konusunda tam bir fikir birliği oluşmamıştır. Genomdaki yerleşimlerine göre bu moleküller iki büyük sınıfa ayrılabilir: 1) intergenik lncRNA'lar; psödogenler, uzun intergenik kodlamayan RNA'lar (lincRNA'lar) ve çok uzun intergenik kodlamayan RNA'lar (vlincRNA'lar); 2) protein kodlayan genlerle çıkan lncRNA'lar; intronik RNA'lar, doğal antisens transkriptler (NAT'lar) ve promotör RNA'lar [217].

Yapılan çalışmalardan elde edilen bulgular bu RNA sınıfının tümör biyolojisinin önemli bileşenleri olduğunu göstermektedir. Bugüne kadar iyi tanımlanmış lncRNA'lar gen ifadesini yazılım sonrası (post-transkripsiyonel) aşamada düzenlerler. LncRNA'lar tarafından düzenlenen genler genomik olarak bölgesel (cis) ya da uzak yerleşimli (trans) olabilir. LncRNA'lar cis düzenleme ile histon modifikasyon komplekslerini genomun belirli alanlarına dahil ederek gen ifadesinin lokal kontrolüne katkıda bulunur. Bu etki, örneğin insülin-benzeri büyüme faktörü 2'de (IGF2) olduğu gibi belirli bir gen için spesifik olabildiği gibi XIST molekülü aracılığı ile dişi memelilerde X kromozomu sessizleştirilmesi örneğinde olduğu gibi tüm kromozomu da kapsayabilir.

Trans-düzenleyici lncRNA'lar genomun uzak bölgelerinde işlev görebilirler. Bu grup moleküllerin en çok çalışılan örneği HOTAIR'dır [218-220]. İlk olarak fibroblastlarda tanımlanan HOTAIR, HoxC kümesinde bulunur ve HoxD küme genlerinin düzenlenmesinde görev alır [221]. HOTAIR'ın iki ana işlevsel alanı vardır; RNA'nın 5' ucunda bulunan bir PRC2 bağlama alanı ve RNA'nın 3' ucunda yer alan LSD1/CoREST1 bağlama alanı. Bu baskılayıcı RNA/protein komplekslerinin genom boyunca birçok bölgede gen ifadesinin epigenetik olarak susturulmasında rol aldığı gösterilmiştir [221, 222].

Birçok lncRNA molekülünün kanserde düzenlenmesinin bozulduğu ve ifade düzeylerinin değiştiği saptanmıştır. Meme ve hepatoselüler karsinomlarda HOTAIR ifadesi yükselmektedir [223]. Meme kanserinde HOTAIR'ın aşırı ekspresyonu, genel sağkalım ve progresyonsuz sağkalım için bağımsız bir ön belirteçtir [219]. Meme kanseri hücre soylarında HOTAIR'ın aşırı ifadesi, kanser hücrelerinin yayılma kapasitelerinin artmasına yol açmaktadır. İnsan dokularında sıklıkla ifade edilen MALAT-1'in anlatım düzeyinin birçok kanserde değiştiği gösterilmiştir [224].

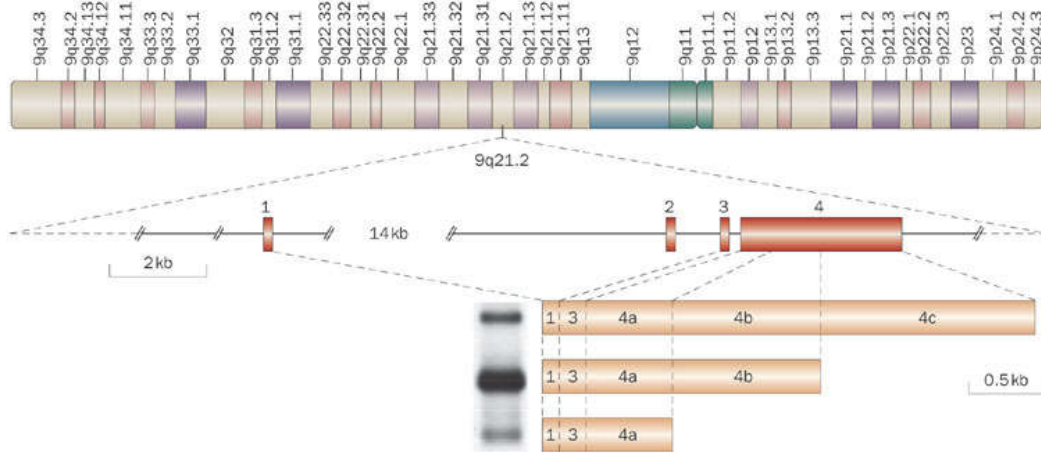
Dizileme teknolojisindeki ilerlemeler sayesinde lncRNA'lar konusundaki bilgiler artmaktadır. Bununla bağlantılı olarak prostat kanseri ile ilişkili birçok lncRNA tanımlanmıştır; bunların sayısı giderek artmaktadır [225, 226]. Bugüne kadar, prostat kanserinde araştırılan en belirgin lncRNA molekülü, 'Prostat Kanseri Antijen 3' (PCA3) olmuştur. DD3 olarak da bilinen PCA3'ün prostat kanseri tümörlerinde aşırı ifade edildiği ilk olarak 1999 yılında Bussemakers ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir [10]. Prostat kanseri dokusuna yüksek özgüllüğü (yaklaşık %100) nedeniyle en umut

verici yeni biyolojik belirteçlerden biri olarak kabul edilmektedir. PCA3 dışında, prostat kanseri ile ilişkili, ‘Prostat Kanseri Kodlamayan RNA 1’ (PCNCR1) ve ‘Prostat Spesifik Gen 1’ (PCGEM1), AR aktivitesini çeşitli mekanizmalar ile değiştiren onkojenik etkilere sahiptirler.

2.9.2. Prostat Kanseri Antijen 3 (PCA3)

PCA3 geni kromozom 9q21-22’de yaklaşık 25 kb’lık bir alanda yer alır ve ‘Prune Homolog 2’ (PRUNE2 veya BMCC1) geninin 6. intronunda ters yönde kodlanır. Biyolojik işlevi tam olarak bilinmemektedir ve homoloji gösterdiği bir gen henüz saptanmamıştır. PCA3, AR pozitif prostat kanseri hücrelerinde önemli ölçüde ifade edilirken, tümöre komşu neoplastik olmayan doku ve BPH hücrelerinde düşük anlatım seviyelerine sahiptir. PCA3 geni dört ekzon ve üç introndan oluşur. Birçok varyantı bulunan PCA3 transkriptlerinin %65’inde ekzon 1, 3, 4a ve 4b bulunur. Varyantların oluşmasına yol açan mekanizmalar, alternatif kırılma (en yaygın 2. ekzonda görülür) ve ekzon 4’te alternatif poliadenilasyondur (Şekil 2-4)

PCA3 promotöründe bilinen herhangi bir başlatıcı motif, TATA kutusu, CAAT kutusu ya da GC-açısından zengin bölgeler saptanmazken [227], kısa ardışık (tandem) tekrar polimorfizmi (TAAA) bulunduğunu gösterilmiştir [228]. Bu kısa tekrar polimorfizmi, beş polimorfizm ve sekiz genotip içerir ve bunun prostat kanseri için bir risk faktörü olabileceği öne sürülmüştür.



Şekil 2-4: PCA3 transkripsiyon biriminin yapısı

PCA3'ün hedeflerinden biri, tümör baskılayıcı gen PRUNE2'dir. Prostat kanserinde PCA3 ve PRUNE2 anlatım seviyeleri ters orantılıdır. PCA3 geninin, PRUNE2 geninin antisense yönünde yerleşmiş olması, PRUNE2 etkinliğini düzenlemek amaçlı olduğu kabul edilmektedir. Çekirdekte PCA3 lncRNA ve PRUNE2 pre-mRNA birlikte ifade edilir ve birbirlerine bağlanarak çift sarmallı bir RNA oluştururlar. Bu çift sarmallı RNA daha sonra bir kompleks oluşturarak, adenoazin deaminaz işlevi görür ve PRUNE2 ifadesini düzenler [229].

PCA3 dizilerinde ARE bölgeleri tanımlanmamış olsa da, PCA3 androjen uyarımına yanıt veren bir moleküldür. Androjene duyarlı prostat kanseri hücre soylarında duyarlı olmayanlara göre daha yüksek seviyelerde bulunur ve androjen uyarımıyla miktarı daha da artar [14, 230]. Ancak bu etkinin altında yatan mekanizmalar bilinmemektedir. Steroid hormon reseptörleri androjen duyarlı LNCaP hücrelerinde PCA3 ekspresyonunu etkilemektedir. Tümör baskılayıcı özelliğe sahip olan östrojen reseptör beta'nın (ER β) baskılanması, PSA artışı ve hücre çoğalmasının hızlanması eşliğinde PCA3'ün daha fazla oranda ifade edilmesine neden olur [231].

PCA3'ün idrarda saptanmasının klinik yararı konusunda da çalışmalar yapılmıştır. Bu amaçla geliştirilen testte, parmakla rektal muayene sonrası idrarda PCA3 ve PSA mRNA düzeyi ölçülür [232]. PCA3 skoru PCA3/PSA mRNA x 1000 formülüyle hesaplanır. Çeşitli çalışmalarda PCA3 testinin hem biyopsi kararının verilmesinde hem de klinik olarak önemli olan ve olmayan tümörlerin ayırımında kullanılabileceği bildirilmektedir [233, 234]. Marks ve ark. yaptığı çalışmada, daha önce bir ya da birden fazla negatif prostat biyopsi sonucu olup, PSA değeri 2.5 olan 233

olguda PCA3 skoru total PSA değerine kıyasla tekrar biyopsi sonucunu öngörmede daha yüksek tanı doğruluğu göstermiştir [235].

2.9.3. PRNCR1 ve PCGEM1

Prostat kanserinde, PCA3 dışında, AR aktivitesi ile ilişkili olabilecek başka lncRNA molekülleri de bildirilmiştir. Yang ve ark. yaptığı bir araştırma, PRNCR1 ve PCGEM1 olarak isimlendirilen iki lncRNA molekülünü AR yolağı ile ilişkilendirmiştir [236]. Ancak, başka bir çalışmada, araştırmacıların, bu moleküller ile AR arasında fiziksel etkileşim bulunmadığı ve KDPK ile ilişkili olmadığı hakkında görüş belirtmeleri bu konuyu tartışmalı hale getirmiştir [237]. Konuyu irdeleyen diğer çalışmalarda, androjen tedavisi üzerine PCGEM1'in tepki verdiği [238, 239], PCGEM1'in AR'ye bağlanma ve eş-uyarım yeteneği [240] ve AR transaktivasyonunda PRNCR1'in rolünü gösteren kanıtlar [241] PCGEM1 ve PRNCR1'in AR sinyalizasyonundaki onkogenik rollerini desteklemektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Hücre Soyları

Bu tez çalışması, *in vitro* koşullarda yapılan deneysel bir çalışma niteliğinde olup İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı Laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Çalışmada 3 farklı hücre soyu kullanıldı; LNCaP hücre soyu, 1977 yılında prostat adenokarsinomlu bir hastanın lenf nodu metastazından elde edilen androjene duyarlı hücrelerdir [242]. Diğer prostat kanseri hücrelerine göre, LNCaP hücrelerinde PCA3 ifadesi daha yüksektir [14]. LNCaP-AR⁺ hücre soyu, atasal LNCaP hücrelerinden türetilmiştir ve 3-5 kat daha fazla AR ifade eder. VCaP hücreleri ise, 1997 yılında kastrasyona dirençli bir hastanın vertebral kemik metastazından izole edilmiştir. Yabani tip AR ifade etseler de, androjenden-bağımsız çoğalabildikleri için KDPK için model olarak kullanılırlar [12]. LNCaP (ATCC# CRL-1740) ve VCaP (ATCC# CRL-2876) hücre soyları Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonundan (ATCC), LNCaP-AR⁺ hücre soyu ise Memorial Sloan Kettering Kanser Merkezinden (MSKCC) temin edildi.

3.1.2. Kimyasal Maddeler ve Malzemeler

RPMI 1640 Besiyeri	[BIOCHROM]
DMEM Besiyeri	[BIOCHROM]
Opti-MEM Medium	[GIBCO]
Fötal Sığır Serum	[BIOCHROM]
Penisilin/Streptomisin	[BIOCHROM]
Trypsin/EDTA	[BIOCHROM]
Enzalutamid	[ASTELLAS]
siRNA	[EUROFINS GENOMICS]
Lipofectamine 2000	[INVITROGEN]
Kristal Viyole	
Tripan Mavisi	[SIGMA]
6X Yükleme Boyası	[FERMENTAS]

100-bç Marker	[FERMENTAS]
0,5X TEB	[Laboratuar Stok]
PBS [SIGMA]	[Laboratuar Stok]
TriPure RNA İzolasyon Kiti	[ROCHE]
Transcriptor First Strand cDNA Sentez Kiti	[ROCHE]
Lightcycler DNA Master SYBR Green I	[ROCHE]
Lightcycler 480 Multiwell Plak	[ROCHE]
Primer	[IDT]
Cell Death Detection Elisa Kit	[ROCHE]
Petri Kabı (35x10 mm)	[GREİNER BIO-ONE]
Kültür Kapları (25, 75 cm ²)	[TPP]

3.1.3. Kullanılan Cihazlar

Sınıf II Laminar Akım Hücre Kültür Kabini	[TEZSAN]
CO ₂ İnkübatör	[HERAEUS]
Ters Mikroskop	[SEDIVAL]
Santrifüjler	[HETTICH, JOUAN]
-20 Derin Dondurucu	[ARISTON]
-80 Derin Dondurucu	[NUAIRE]
Thermal Cyclers	[TECHNE]
LightCycler 480	[ROCHE]
Jel Elektroforezi	[HORIZON]
Jel Görüntüleme	[VILBER LOURMAT]
Mikrodalga Fırın	[ARÇELİK]
Hassas Terazî	[CHYO]
Thoma Lamı	[HAUSSER]
ELISA Okuyucu	[THERMO]
iCELLigence	[ACEA BIOSCIENCES]

3.2. Yöntem

3.2.1. Hücre Kültürü

LNCaP ve LNCaP-AR⁺ hücrelerinin çoğaltılması için RPMI-1640, VCaP hücrelerinin çoğaltılması için ise DMEM besiyeri kullanıldı. RPMI-1640, 1966 yılında Roswell Park Memorial Enstitüsü'nde Moore ve arkadaşları tarafından geliştirilmiş olup deneysel çalışmalarda yaygın olarak kullanılan bir besiyeridir. Diğer bir yaygın kullanılan besiyeri olan DMEM ise, 1955 yılında Harry Eagle tarafından bulunan 'Eagle'ın Basal Medyumunun' (BME) değiştirilmiş halidir ve yüksek miktarda aminoasit ve vitaminleri içerir. Büyüme besiyerleri %10 fetal sıgır serumu (FBS) ve %1 antibiyotik (penisilin/streptomisin) içermektedir. Hücreler standart hücre kültürü koşullarında (37°C ve %5 CO₂) büyütüldüler.

Azot tankında muhafaza edilen hücreleri kültüre almak için, hücrelerin oda sıcaklığında çözölmeleri beklendi. Hücreler, besiyeri içeren tüplere pipetle yavaşça damlatıldı. Hücre pelleti elde etmek amacıyla 1500 rpm'de 5 dk. santrifüj yapıldı. Santrifüj sonunda sıvı faz uzaklaştırıldı ve pellet besiyeri içinde pipetaj yoluyla çözöldükten sonra yeni kültür şişesine aktarıldı. Hücreler kültür şişesinin yaklaşık %90'lık alanını kapladığında pasajlama işlemi gerçekleştirildi. Bu amaçla, öncelikle, hücre kültür şişesindeki besiyeri uzaklaştırıldı. Daha sonra uygun miktarda Tripsin/EDTA (75 cm²'lik kültür şişesi için 6 ml) eklendi; 5 dk. etüvde bekletildikten sonra çözönen hücreler toplanarak yeni tüplere aktarıldı. 3000 rpm'de 5 dk. santrifüjleme işleminden sonra oluşan hücre pelleti, taze besiyeri içinde çözöldü ve bir kısmı (yaklaşık 1/5) yeni bir kültür şişesine aktarılarak 37°C etüvde büyümeye bırakıldı.

Toplam hücre süspansiyonunun içerisindeki hücre sayısını hesaplamak için, üzerinde üçlü çizgilerle ayrılmış 16 büyük kareden oluşan yivler bulunan 1 mm²'lik alan ve 0,1 mm derinliğe sahip Thoma lamı kullanıldı. Süspansiyonun mililitresindeki toplam hücre sayısı aşağıdaki formülle hesaplandı: Toplam Hücre Sayısı/ml=Sayım Sonucu x 10⁴ x Besiyeri miktarı (ml)

3.2.2. siRNA ile PCA3 Baskılanması

Küçük interferans RNA (siRNA) temelli gen susturulması tekniği olarak bilinen RNA interferans (RNAi), son 15 yılda moleküler biyolojinin en önemli tekniklerinden biri haline gelmiştir. RNAi, evrimsel olarak büyük oranda korunmuş bir mekanizmadır ve çift iplikli RNA'nın hücreye girişiyle birlikte, benzer diziyeye sahip mRNA

moleküllerinin yıkımı esasına dayanır. Bu yazılım-sonrası (post-transkripsiyonel) gen susturma mekanizması, fonksiyonları bilinmeyen genlerin işlevlerinin ortaya çıkarılmasında ya da hedeflenen genlerin ekspresyonunu baskılamak amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır.

siRNA, hedef mRNA dizisinin parçalanması için spesifik olarak tasarlanmış sentetik bir RNA dupleksidir. siRNA'lar, bir antisens zincir (veya rehber) ve bir sens zincir (veya korunan) olmak üzere iki RNA iplikciğinden oluşur. Bunlar, 3' dinükleotid çıkıntıları ile 19 ila 25 bp uzunluğunda bir dupleks oluştururlar. Hücreye aktarıldığında, RNAi mekanizmasının bileşenleri siRNA'yı tanır ve 'RNA tarafından uyarılan susturucu kompleks' (RISC) olarak bilinen protein kompleksi ile siRNA'nın antisens ipliği etkileşir. Bu şekilde aktifleşen protein ve nükleik asit kompleksi, daha sonra, hedef mRNA dizisine bağlanır ve onun yıkımına yol açar. siRNA'lar, katyonik lipid ya da polimer bazlı transfeksiyon reaktifleri, elektroporasyon veya hücre tarafından alınmasına yardımcı olmak için dupleks üzerinde kimyasal modifikasyonlar ekleyerek hücrelere transfekte edilirler.

Tez çalışmasında prostat kanseri hücre hücrelerinde PCA3 gen ifadesini baskılamak için Ferreira ve ark. tarafından çalışmalarında tanımladıkları siRNA dizileri kullanıldı [14]. PCA3 geninin 4. ekzonunu hedefleyen siPCA3 ve negatif kontrol olarak kullanılan 'scramble küçük interferans RNA' (siScrbl) oligonükleotidlerinin dizisi aşağıdaki gibidir:

siPCA3: 5 'CUAGCACACAGCAUGAUCAUACGG 3'

siScrbl: 5 'GCACGCUCCUACGAAUGCUAGUAAA 3'

PCA3 baskılanması amacıyla yapılan transfeksiyon deneylerinde yaklaşık 200.000 hücre kullanıldı. Bu amaçla, hücreler 35x10 mm petri kaplarına ekildi ve 2'şer ml antibiyotik içermeyen besiyeri eklenip %5 CO₂ içeren ve 37 °C ısıya sahip etüvde büyümeye bırakıldı. 24 saat sonra, petrillerdeki besiyeri 1.5 mL taze besiyeri ile değiştirildi ve katyonik lipid bazlı bir transfeksiyon ajanı olan Lipofectamine 2000 (İnvitrogen), siPCA3 veya kontrol siScrbl ile transfeksiyon karışımı hazırlandı.

siRNA transfeksiyon karışımı (toplam 500 µL) 250'şer µl'lık iki bileşenden oluşmaktadır; serum içermeyen siRNA karışımı ve transfeksiyon karışımı. siRNA

karışımı 60 nM (12 µL) siRNA ve transfeksiyon için üretilmiş özel bir besiyeri olan Opti-MEM besiyerinden oluşmaktadır. Transfeksiyon karışımı ise, transfeksiyon ajanının (5 µL) yine Opti-MEM besiyerinde çözülmesi ile hazırlandı. siRNA transfeksiyon karışımının iki bileşeni (siRNA çözeltisi ve transfeksiyon çözeltisi) karıştırılarak son karışım (500 µL) elde edildi. Lipozomların oluşması ve siRNA enkapsülasyonu için 20 dk. oda sıcaklığında muamele edildi. Transfeksiyon karışımı 1,5 ml besiyeri içeren petrillerdeki hücrelerin üzerine aktarıldı ve etüvde 6 saat inkübasyona kaldırıldı. Petri kapları etüvden çıkarılarak, antibiyotik içermeyen besiyeri uzaklaştırıldı ve %1 antibiyotik içeren taze besiyeri eklendi. Hücreler 30 saat etüvde inkübasyona bırakıldı. Etüvde 30 saat kalan petri kapları alınarak hücreler toplandı. Elde edilen hücreler sonraki işlemler için kullanıldı (örn. PCA3 gen ifade incelenmesi) ya da hemen kullanılmayacaksa -80°C'ye kaldırıldı.

3.2.3. Hücrelerin Androjen ile Muamelesi

Hücrelerin dihidrotestosteron (DHT) veya enzalutamid ile muamelesinden önce, hücre kültürü besiyerinde kullanılan büyüme serumunu steroid hormonlardan arındırma işlemi gerçekleştirildi. Bu işlem, fetal sığır serumunun dekstran kaplı kömür ile muamelesi yoluyla yapıldı. Bu amaçla, 100 mg kömür, 5 ml serum ile karıştırıldı ve +4°C'de çalkalayıcı üzerinde gece boyu inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında serum 2000 rpm'de 30 dk. santrifüjlendi. Üst faz, kalan kömür moleküllerini tamamen uzaklaştırmak amacıyla, iki defa 0,2 µm'lik filtreden geçirildi. Bu şekilde, steroid hormonlardan arındırılmış serum ve antibiyotik içeren RPMI-1640 ve DMEM besiyerleri hazırlanarak, kullanılıncaya kadar +4°C'de muhafaza edildi.

DHT, etanol içerisinde çözülerek stok çözelti (10 nM) hazırlandı ve alikotlar halinde -20°C'de muhafaza edildi. Enzalutamid ise dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde çözüldü ve stok çözeltisi (1mM) hazırlanarak alikotlara ayrıldı ve -20°C'de muhafaza edildi.

Hücrelerin DHT ile muamelesi 6 kuyucuk içeren petri kaplarında gerçekleştirildi. Her bir kuyuya 5 ml hormondan arındırılmış serum içeren besiyeri eşliğinde yaklaşık 300.000 hücre ekildi. Hücreler 48 saat hormonlardan arındırılmış besiyeri koşullarında tutulduktan sonra besiyerleri ortamdan uzaklaştırıldı. DHT (0, 1, 10 ve 100 nM konsantrasyonlarda) eklenerek hücreler 24 saat androjenle muamele

edildi. Sürenin sonunda hücreler kazıma yoluyla toplandı ve sonraki PCA3 ifade analizinde kullanılmak üzere -80°C’de muhafaza edildi.

3.2.4. Enzalutamid ile Androjen Reseptör Blokajı

Tez çalışmasında, PCA3 gen baskılanmasının, AR inhibisyonunun etkisini arttırıp arttırmadığını araştırmak amacıyla AR blokajı yapıldı. AR inhibisyonu için ikinci nesil AR antagonisti olan enzalutamid kullanıldı. Bu ajan, metastatik KDPK’lı hastalarda dozetaksel sonrası kullanılmaktadır. Enzalutumidin etki mekanizması Genel Bilgilerde anlatılmıştır.

Androjen reseptör blokajı için yaklaşık 200.000 hücre 35x10 mm petri kaplarına ekildi. Hücreler, standard büyüme kolşullarında 3 gün boyunca, dekstran kaplı kömür ile muamele edilmiş serum içeren besiyeri içinde büyütüldüler. 72 saat sonra enzalutamid (0, 500 veya 5000 nM) eklenerek 24 saat süre ile AR blokajı yapıldı. PCA3 baskılanması ile AR blokajının kombinasyonunda ise, enzalutamid eklenmeden 6 saat önce, yukarıda anlatıldığı gibi siPCA3 (ve kontrol siRNA) transfeksiyonu yapıldı. Besiyeri değiştirme aşamasında enzalutamid eklenerek, hücreler bu koşullarda 30 saat büyütüldüler. Süre sonunda hücreler toplanarak sonraki işlemlere geçildi.

3.2.5. Gen İfade Analizi

Tez çalışmasında PCA3 ve bazı AR hedef genlerinin (PSA, PRNCR1, PCGEM1) ifade düzeyleri incelendi. PCA3 ifadesi, hem DHT ile muamele edilen hücrelerde hem de PCA3 baskılanan hücrelerde araştırıldı. AR hedef genlerinin ifadesi ise, PCA3 baskılanan ve/veya AR blokajı yapılan hücrelerde analiz edildi. Gen ekspresyon analizinin ilk aşaması için hücrelerden RNA izolasyonu gerçekleştirildi.

3.2.5.1. Hücrelerden Total RNA İzolasyonu

Tez çalışmasında araştırılan hedef genlerin anlatım düzeyleri total RNA üzerinden ölçüldü. Bu amaçla ticari olarak temin edilen RNA izolasyon solüsyonu (fenol ve guanidin tiosiyanat karışımı) kullanıldı. RNA izolasyon işlemi, hücrelerin üzerine 1 ml RNA izolasyon solüsyonu eklenmesi ile başladı. Hücreler solüsyon içinde homojenize edilip 5 dk. oda ısısında muamele edildi. Bu aşamada, hücreler parçalanmakta ve endojen nükleazlar denatüre edilmektedir. Böylece RNA’nın intakt kalması sağlanmaktadır. Örneklerin üzerine 200 µl kloroform eklenerek, vortekslendi ve

5 dk. oda ısısında inkübasyon gerçekleştirildi. İnkübasyon sonrasında örnekler 15 dk. 11.200 rpm'de soğutulmuş santrifüjde santrifüjlendi. İşlem sonrası 3 faza ayrılan karışımın, en üst kısmındaki RNA içeren renksiz faz yeni tüpe aktarıldı. RNA'nın çökeltilmesi amacıyla 500 µl izopropanol eklendi ve 5 dk. oda ısısında inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında örnekler 4°C'de 10 dk. 11.200 rpm'de santrifüjlenerek çöktürüldü. Sıvı faz uzaklaştırıldı ve RNA pelletinin üzerine 1 ml %75'lik soğuk etanol eklendi. Bu yıkama işleminin amacı, RNA'yı, tuz ve diğer bileşenlerden temizlemektir. Örnekler soğutulmuş ortamda tekrar santrifüjlenerek (5 dk. 7500 rpm'de) RNA yeniden çöktürüldü. Sıvının uzaklaştırılmasını takiben etanolün tamamen buharlaşması amacıyla örnekler 10 dk. oda ısısında bekletildi. Son olarak, elde edilen RNA, 50 µl RNaz DNaz içermeyen su içerisinde çözüldü. Elde edilen RNA'nın miktar tayini ve saflık düzeyi spektrofotometrik olarak belirlendi. Protein ve fenol benzeri kimyasalların kontaminasyon oranını belirlemek amacıyla yapılan 260/280 ve 260/230 absorbans ölçümlerinde saflıklar 1.7-1.8 aralığında ölçüldü ve elde edilen RNA'lar cDNA sentez işlemine kadar -80°C'de muhafaza edildi.

3.2.5.2. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

Prostat kanser hücrelerinden elde edilen total RNA'lardan cDNA sentezi gerçekleştirildi. Bunun için ticari olarak temin edilen kit kullanıldı. cDNA sentezi için, 0.2 µl'lik PCR tüplerine 6 µl total RNA, 1 µl random hekzamer primeri ve 5 µl dH₂O eklendi. Daha sonra, Tablo 1'de gösterilen reaksiyon bileşenleri sırasıyla karıştırılarak termal döngü cihazına yerleştirildi. cDNA sentezinin reaksiyon koşulları Tablo 2'de verilmiştir. Elde edilen cDNA örnekleri – 20°C'de muhafaza edildiler.

Tablo 3-1: cDNA sentezi reaksiyon bileşenleri

Reaksiyon Bileşenleri	1 Örnek
5X RT Reaksiyon Tamponu	4 µl
Protector RNase İnhibitör	1 µl
10 mM Deoksिनुकлеотид Karışımı	2 µl
Transkriptor Reverse Transkriptaz	1 µl

Tablo 3-2: cDNA sentez reaksiyon koşulları	
Sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$)	Süre
25	5 dk.
42	60 dk.
70	5 dk.

3.2.5.3. Nicel Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PCA3 gen ifadesi baskılanan ve enzalutamid ile androjen blokajı yapılan hücrelerde PCA3 ve AR ilişkili genlerin ifade düzeyleri incelendi. Ekspresyon analizi, nicel gerçek-zamanlı PZR yöntemi ile laboratuvarımızda bulunan LightCycler 480 PZR platformu (Roche) kullanılarak yapıldı. İfade düzeyleri ‘yarı-nicel’ (semi-quantitative) olarak gerçekleştirildi. Hücreler için yaşamsal gen olan gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz (*GAPDH*) hedef genlerin ifade düzeylerinin normalizasyonunda referans gen olarak kullanıldı. Nicel PZR’de floresan molekül olarak SYBR Green’den (Roche) yararlanıldı.

Tablo 3’de tek bir örnek için PZR bileşenleri gösterilmektedir. Tablo 4’de ise, tez çalışmasında ifade düzeyleri incelenen hedef genlerin ve referans gen için kullanılan primer dizileri yer almaktadır. PZR koşulları, primer özellikleri ve SYBR Green kitinin protokolüne göre seçildi. PZR protokolü 45 döngüden oluştu; her bir döngü 95°C ’de 10 sn., 55°C ’de 20 sn. (ilk iki döngü 60°C ’de) ve 72°C ’de 30 sn. olmak üzere sırasıyla denatürasyon, bağlanma ve sentez alt aşamalarını içerir. PZR aşamasını takiben, “erime eğrisi analizi” (melting curve analysis) gerçekleştirildi. Bunun amacı oluşan PCR ürünlerinin istenilen gerçek ürünler olup olmadığının teyit edilmesi ve özgül olmayan ürünler ile primer dimerleri gibi ikincil yapıların dışlanmasıdır. Bu amaçla, örnekler, 55°C ’den 95°C ’ye kadar saniyede 0.2°C ’de artan bir ısı yükselmesine maruz bırakılırlar. Bu süreçte, PZR ürünün bileşenine bağlı olarak, yaklaşık $75-80^{\circ}\text{C}$ aralığında erime eğrileri ortaya çıkmaktadır.

Örneklerin miktar tayini göreceli olarak gerçekleştirildi. Gerçek-zamanlı PZR reaksiyonunda, floresan düzeyinin cihaz tarafından ölçülebilen eşik değerini aştığı döngü Ct (cycle threshold) olarak adlandırılır. Elde edilen Ct değerlerine göre, her bir örnek için $2^{-\Delta\text{Ct}}$ metodu kullanılarak gen ifadeleri hesaplandı ve değerlendirildi.

$$\Delta Ct = (C_{t_{\text{hedef}}} - C_{t_{\text{referans}}})$$

$$2^{-\Delta Ct} = 2^{-[(C_{t_{\text{hedef}}} - C_{t_{\text{referans}}})]}$$

Tablo 3-3: Gerçek-zamanlı PZR reaksiyon bileşenleri

Reaksiyon Bileşenleri	1 Örnek
10X LightCycler® 480 SYBR Green I Master	10 µl
Primer-F (300 µM)	0,2 µl
Primer-R (300 µM)	0,2 µl
cDNA	3 µl
dH ₂ O	6,6 µl
Toplam	20 µl

Tablo 3-4: Primer dizileri

Gen Adı	İleri yönlü primer F (5' - 3')	Ters yönlü primer R (5' - 3')
PCA3	GGTGGGAAGGACCTGATGATAC	GGGCGAGGCTCATCGAT
PSA	TGAACCAGAGGAGTTCTTGAC	CCCAGAATCACCCGAGCA
PRNCR1	CCAGATTCCAAGGGCTGATA	GATGTTTGGAGGCATCTGGT
PCGEM1	GGTGCCTTTGCCAATGTTAT	AGCATGCTCTCTGCAAAGGT
GAPDH	GCTCTCTGCTCCTCCTGTTC	ACGACCAAATCCGTTGACTC

3.2.6. Hücre Çoğalmasının Gerçek Zamanlı Analizi

Teknolojideki ilerlemeler sonucu geliştirilen yeni sistemler, kültür hücrelerinin çoğalma kinetiklerini gerçek zamanlı takip etme imkanı tanımaktadır. Bunlardan birisi olan 'iCELLigence' sistemi (ACEA BIOSCIENCES), hücrelerin elektrik akımına karşı gösterdikleri direncin ölçülmesi esasına dayanır. Alt yüzeyinde altın elektrotlar bulunan 'E-Plaka' yüzeyine tutunan hücrelerin çoğalması veya azalması ölçülen direnç ile doğru orantılıdır. Bu gerçek-zamanlı hücresel analizde, hücrelerin çoğalma özellikleri sürekli olarak kaydedilebilmekte ve kaydedilen veriler grafikler halinde bilgisayar ekranına aktarılmaktadır.

Tez çalışmasında, siRNA yaklaşımı ile PCA3 baskılanması ve enzalutamid ile AR blokajının prostat kanseri hücrelerine olan etkileri, gerçek zamanlı hücre analiz sistemi ile değerlendirildi. İlk olarak her E-plakanın bir kuyucuğuna, hücre içermeyen 100 µL besiyeri konularak cihazda bazal ölçüm yapıldı. Ardından kültür şişelerinden tripsinizasyon ve santrifüjleme (1500 rpm, 5 dk.) ile toplanan hücreler sayılarak 500 µl besiyeri içinde kuyucuk başına 2×10^4 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Ekim işleminin ardından E-Plakalar 30 dk. boyunca steril çalışma kabini içerisinde oda sıcaklığında

inkübe edildi ve daha sonra iCELLigence cihazındaki yerlerine yerleştirilerek 37°C ve % 5 CO₂ ortam şartlarında inkübasyona devam edildi. Cihaza her 30 dakikada bir ölçüm alması için komut verildi. 24 saat sonunda, hücrelerin çoğalma fazının 1/3'lük diliminde, yukarıda anlatıldığı gibi PCA3 gen baskılanması ve/veya enzalutamid (0, 500 ve 5000 nM) uygulamaları gerçekleştirilerek 72 saat süresince 30 dakika aralıklarla ölçüm alındı ve hücrelerin çoğalma kinetikleri takip edildi.

3.2.7. Klonojenik test

Klonojenik test, sitotoksik bir tedavinin (ışınlama, kemoterapotik ajanlar gibi) tümör hücrelerine olan etkisini belirlemek amacıyla yapılan *in vitro* hücre sağkalım deneyidir. Tez çalışmasında, prostat kanser hücrelerinde PCA3 baskılanmasının ve enzalutamid ile AR blokajının hücre sağkalımına etkisini araştırmak için bu test uygulandı.

Klonojenik test için, 200.000 hücre 35x10 mm petri kaplarına ekildi ve steroid hormonları uzaklaştırılmış serum içeren besiyerinde 24 saat büyümeye bırakıldı. siRNA transfeksiyonu yapıldı ve 6 saat tamamlandığında besiyeri değiştirilerek enzalutamid eklendi. Hücreler 30 saat bu koşullarda büyütüldüler. Sürenin tamamlanmasıyla hücreler hasat edildi ve 1 ml taze besiyerinde çözüldüler. Tripan mavisi ile boyama ile canlı hücre sayımı yapıldı. Bunu takiben, petri başına 1000 canlı hücre olacak şekilde yeni petrilere ekim yapıldı. Etüve kaldırılan hücreler 10 gün büyümeye bırakıldılar. İnkübasyonun tamamlanmasıyla beraber sıvı besiyeri uzaklaştırılarak hücreler PBS ile yıkandı ve etanol ile 5 dk. muamele edilerek sabitlendiler. Hücreler %0,5'lik kristal viyole ile 5 dk. boyandılar ve koloniler sayıldı. Hücre canlılığı aşağıdaki eşitliğe göre hesaplandı:

$$\% \text{ Canlılık} = \frac{\text{Petri başına düşen ortalama koloni sayısı}}{\text{Kontrol petrisindeki ortalama koloni sayısı}} \times 100$$

3.2.8. Apoptotik Hücre Ölümünün Değerlendirilmesi

PCA3 geni baskılanan ve/veya enzalutamid ile muamele edilen hücrelerdeki apoptotik hücre ölümü düzeyleri, ELİZA-bazlı çalışan ve sitoplazmadaki mono- ve oligonükleozomların ölçümü esasına dayanan “Cell Death Detection ELISA” kiti (Roche) ile saptandı. Nükleozom, DNA’nın, 4 nüve histon proteininin (H2A, H2B, H3 ve H4) ikiyeşerli kopyalarının oluşturduğu oktamer yapının etrafını dolanması ile ortaya çıkan kromatin paketlenmesinin temel birimidir. İki nükleozom arasında uzanan DNA’nın uzunluğu yaklaşık 150 bp’dir. Apoptotik hücre ölümü sürecinde, aktifleşen endonükleazlar, DNA’yı nükleozomlarda kestiğinden, apoptozun tipik göstergeleri olan mono- ve oligonükleozomlar oluşur ve sitoplazmaya geçerler. “Cell Death Detection ELISA” kiti, içerdiği anti-histon ve anti-DNA antikorlarıyla söz konusu yapıları saptamaya yöneliktir. Materyal olarak hücrelerden elde edilen sitoplazmik lizat kullanıldı.

Bu amaçla, -80°C’ye kaldırılan hücreler alınıp üzerlerine 500 µl inkübasyon tamponu eklendi. Homojenizasyon sonrası örnekler 30 dk. oda sıcaklığında muamele edildi. Yüksek hızda (16.700 rpm) 10 dk. santrifüj yapıldı ve oluşan üst sıvı faz (yaklaşık 400 µl) yeni tüpe aktarıldı. ELİZA mikropiğının her kuyucuğuna 100 µl kaplama solüsyonu eklendi ve oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Süre sonunda solüsyon ortamdan uzaklaştırıldı ve kuyucuklara 200 µl inkübasyon tamponu eklenerek 30 dk. oda sıcaklığında muamele edildi. İnkübasyon tamponu uzaklaştırıldı ve kuyucuklar yıkama solüsyonu ile 3 defa yıkandı. Hücrelerden elde edilen sitoplazmik lizatlardan 25’er µl, 200 µl inkübasyon tamponu ile karıştırıldı. Bu karışımdan 100’er µl kuyucuklara eklendi ve 90 dk. oda sıcaklığında inkübe edildi. Süre sonunda 3 defa yıkama yapıldıktan sonra 100’er µl enzim solüsyonu eklendi. 90 dk. oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra tekrar 3 defa yıkama yapıldı. Daha sonra 100 µl substrat solüsyonu eklenerek karıştırıcı üzerinde 250 rpm hızda renk değişimi görülünceye kadar muamele edildi (10-15 dk.). Renk değişimleri gözlemlendikten sonra absorbans değerleri ELİZA okuyucusunda 405 nm’de okutuldu ve değerler göreceli apoptoz miktarı olarak kabul edildi.

3.2.9. İstatistiksel Analizler

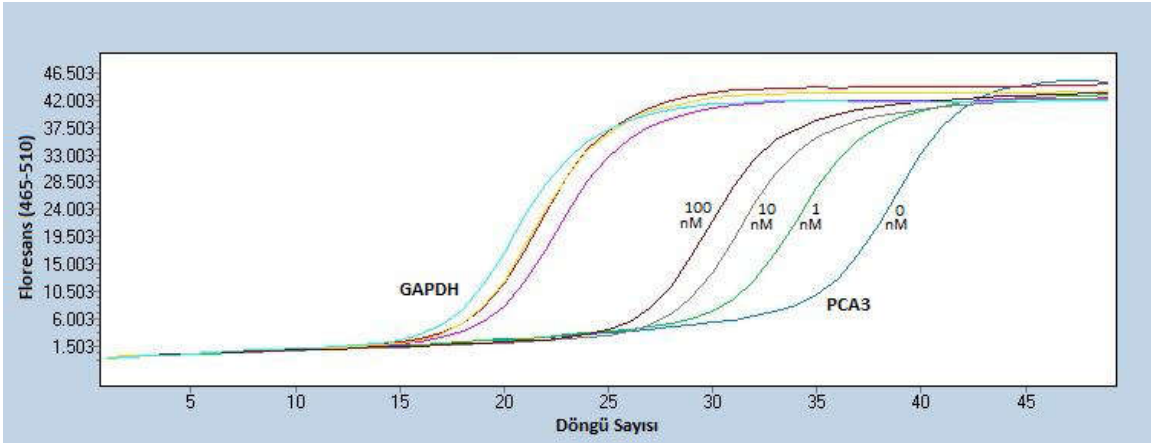
Tez çalışmasında, istatistiksel analizler için birbirinden bağımsız olarak gerçekleştirilmiş 3 hücre kültürü deneyinin bulguları kullanıldı. Kontrol hücreleri (muamele edilmeyen hücreler ya da kontrol siRNA ile transfekte edilen hücreler) ile PCA3 geninin baskılandığı veya enzalutamid ile muamele edilen hücreler arasında, gen ifade değişimleri ve sitotoksosite karşılaştırmaları yapıldı. İncelenen parametrelerdeki değişimler, bazal seviyelere göre “kat değişimi” olarak ifade edildi. İstatistiksel karşılaştırmalar “Bağımsız Örneklem t Testi” kullanılarak yapıldı ve $p < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



4. BULGULAR

4.1. Androjenle Uyarılan Prostat Kanseri Hücrelerinde PCA3 Molekülünün İfade Düzeyinin İncelenmesi

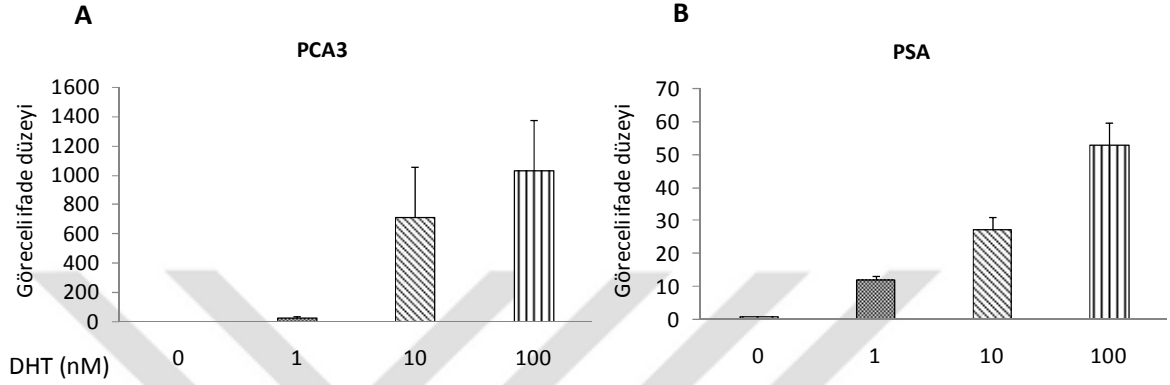
Normal prostat hücrelerinde ve prostat kanser hücrelerinde birçok genin androjenler tarafından düzenlendiği bilinmektedir. PCA3 molekülünün de androjen tarafından uyarıldığını bildiren sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada da PCA3 molekülünün ne oranda androjen tarafından uyarıldığı incelendi. Bu amaçla LNCaP hücreleri 24 saat süre ile DHT'nin farklı dozları ile (0, 1, 10 ve 100 nM) muamele edildiler. Hasat edilen hücrelerden total RNA izole edildi; cDNA sentezini takiben PCA3 ve PSA genlerinin ekspresyon düzeyleri nicel GZ-PZR ile incelendi. Şekil 4-1'de PCA3 genine ait çoğalma eğrilerine örnek gösterilmektedir. Referans genin anlatımı tüm DHT konsantrasyonlarında birbirine yakın iken, PCA3 ifadesinin önemli ölçüde değiştiği göze çarpmaktadır.



Şekil 4-1: DHT ile muamele edilen LNCaP hücrelerinde PCA3 çoğalma eğrileri

Birbirinden bağımsız 3 farklı deneyin sonuçları Şekil 4-2'de özetlenmiş ve gen anlatım düzeyindeki değişimler 'kat değişimi' olarak ifade edilmiştir. PCA3 ve PSA genlerinin ifade düzeylerinin artan DHT konsantrasyonları ile arttığı göze çarpmaktadır. En yüksek DHT dozunda (1000 nM), PCA3 ifade düzeyinde yaklaşık 1000 kat artış saptanmıştır ($p < 0.001$) (Şekil 4-2A). PSA anlatım düzeyinde ise doza bağlı olarak 12 ile

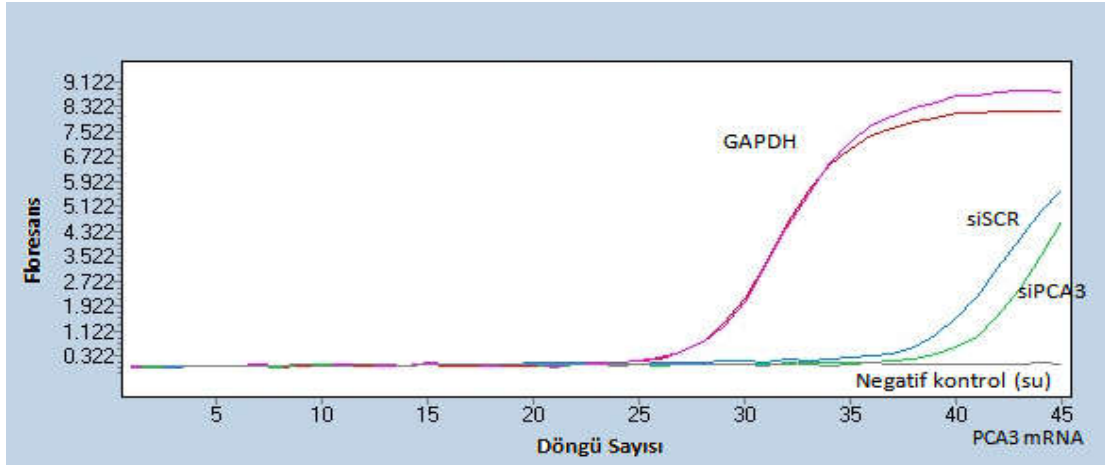
53 katlık bir artış ($p<0.01$) gözlenmiştir (Şekil 4-2B). Bu veriler, prostat kanseri hücrelerinin androjenle uyarımının, PSA'ya kıyasla, protein kodlamayan bir gen olan PCA3 üzerinde çok daha büyük bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir.



Şekil 4-2: DHT ile muamele edilen LNCaP hücrelerinde A) PCA3 ifade düzeyi B) PSA ifade düzeyi

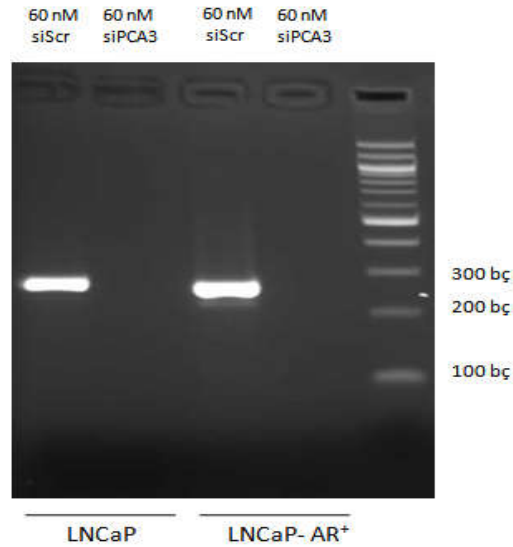
4.2. siRNA-aracılı Oligonükleotidlerle PCA3 Geninin Baskılanması

PCA3 geninin androjen tarafından yüksek oranda uyarıldığıının gösterilmesinin ardından, bu genin baskılanmasının etkilerinin araştırılması amaçlandı. PCA3 baskılanması siRNA-aracılı oligonükleotidlerle gerçekleştirildi. Gereç ve yöntem bölümünde detaylı olarak anlatılan deney koşullarında, LNCaP, LNCaP-AR⁺ ve VCaP hücreleri kontrol siRNA (siSCR) ve PCA3-siRNA ile transfekte edildiler. Transfeksiyondan 36 saat sonra hücreler hasat edildi; RNA izolasyonu ve cDNA sentezini takiben, PCA3 ifade düzeyi GZ-PZR ile incelendi. Şekil 4-3'te görüldüğü üzere, PCA3-siRNA ile transfekte edilen hücrelerdeki PCA3 anlatım düzeyinin, kontrol siRNA (siSCR) ile transfekte olan hücrelerdeki PCA3 ifade düzeyine oranla azaldığı göze çarpmaktadır. Buna karşın, referans gen PCA3 susturulmasından etkilenmemektedir.



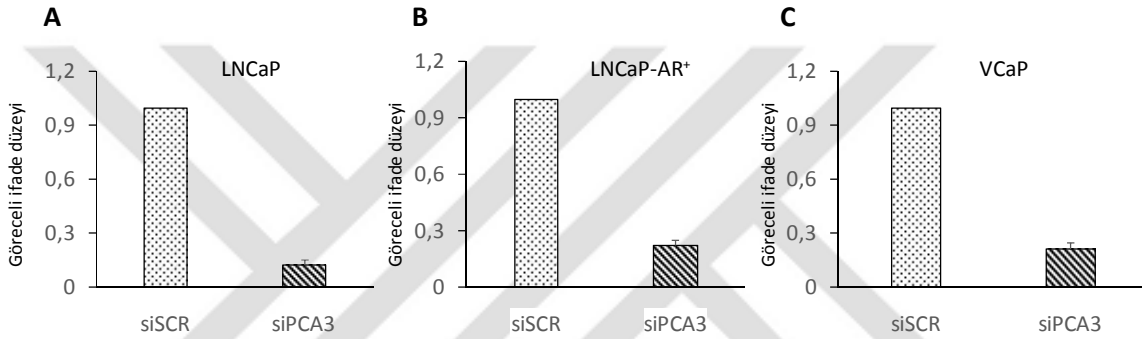
Şekil 4-3: siRNA ile transfekte edilen LNCaP-AR⁺ hücrelerinde PCA3 çoğalma eğrileri

Şekil 4-4, LNCaP ile LNCaP-AR⁺ hücrelerinde PCA3 baskılanması sonrası yapılan nicel PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde ayrıştırılmasını göstermektedir. Görüldüğü üzere, kontrol siRNA ile transfekte edilen hücrelerde PCA3 bandı yer alırken, PCA3-siRNA ile transfekte edilen hücrelerde gen baskılanmasının etkin şekilde gerçekleştiği görülmektedir.



Şekil 4-4: siRNA ile transfekte edilen LNCaP ve LNCaP-AR⁺ hücrelerinde PCA3 molekülüne ait PZR ürünlerinin jel görüntüsü

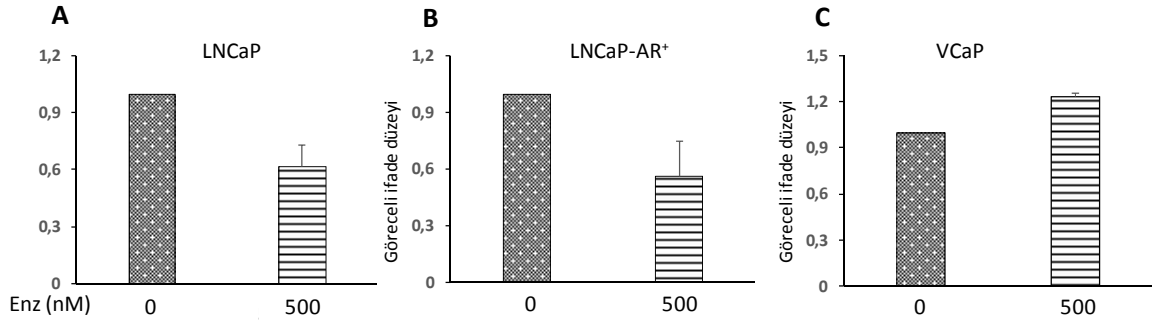
Şekil 4-5'te PCA3 baskılanan LNCaP, LNCaP-AR⁺ ve VCaP hücrelerinde 3 farklı deneyin sonuçları gösterilmektedir. Analiz sonrası, kontrol siRNA (siSCR) ile transfekte edilen hücrelerdeki PCA3 ifade düzeyi '1' olarak kabul edildi ve PCA3-siRNA ile transfekte edilen hücrelerdeki ifade değişimleri hesaplandı. Şekilde görüldüğü üzere, PCA3 gen ifadesinde en fazla azalma LNCaP hücrelerinde (ortalama %88) görülürken, LNCaP-AR⁺ hücrelerinde ortalama %77, VCaP hücrelerinde ise %80 oranında azalma saptanmıştır. Bu bulgular, PCA3 geninin siRNA yaklaşımı ile başarı bir şekilde baskılandığını göstermektedir. Her 3 hücre soyunda elde edilen değerler istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$)



Şekil 4-5: siRNA yaklaşımı ile PCA3 baskılanan LNCaP (A), LNCaP-AR⁺ (B) ve VCaP (C) hücrelerinde PCA3 ifade düzeyi

4.3. Enzalutamid ile Androjen Reseptör İnhibisyonu Sonrası PCA3 Gen İfade Düzeyinin İncelenmesi

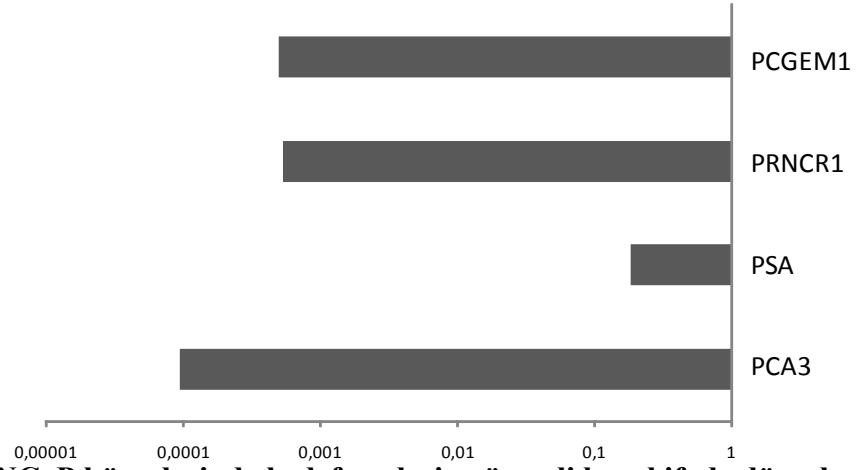
PCA3 geninin androjen tarafından etkin bir şekilde uyarıldığı yukarıda gösterildi. Bu nedenle, androjen yolağının baskılanmasının PCA3 üzerine etkisinin ne olacağı merak konusu idi. Bu konuyu araştırmak amacıyla, LNCaP, LNCaP-AR⁺ ve VCaP hücreleri 24 saat süre ile göreceli olarak düşük bir enzalutamid dozu ile (500 nM) muamele edildiler. Süre sonunda, PCA3 gen ekspresyonu nicel GZ-PZR ile incelendi. Enzalutamid ile AR inhibisyonu, PCA3 geni ifadesinin LNCaP (%37) ve LNCaP-AR⁺ (%44) hücrelerinde azalmasına yol açarken, VCaP hücrelerinde herhangi bir etki saptanmadı (Şekil 4-6). Bu bulgular, göreceli olarak düşük bir enzalutamid dozunun PCA3 geninde önemli oranda ekspresyon azalışına yol açtığını göstermekte ve PCA3'ün androjen yolağının bir parçası olduğunu teyit etmektedir. Kastrasyona dirençli özellikteki VCaP hücrelerinde etki saptanmaması bu hücrelerde farklı bir düzenlenmeye işaret etmektedir.



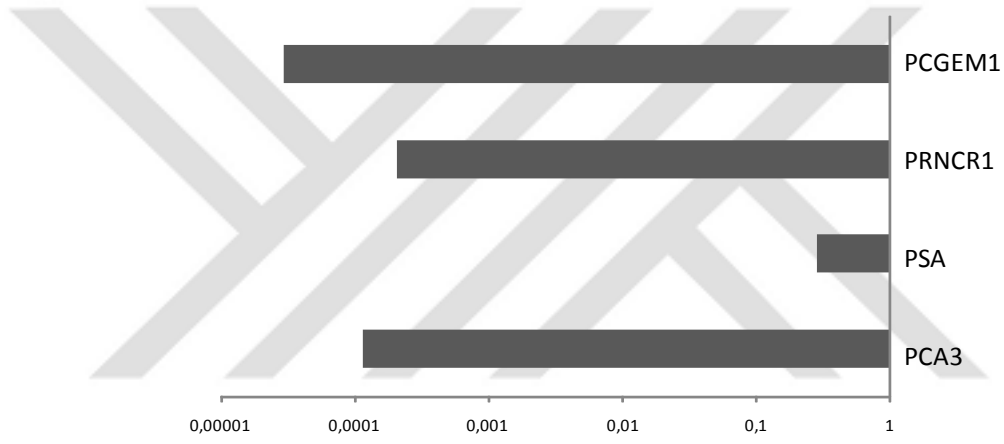
Şekil 4-6: Enzalutamid ile muamele edilen LNCaP (A), LNCaP-AR⁺ (B) ve VCaP (C) hücrelerinde PCA3 ifade düzeyi

4.4. PCA3 Baskılanması ile Androjen Reseptörü İnhibisyonunun Androjen İlişkili Genler Üzerindeki Etkisinin İncelenmesi

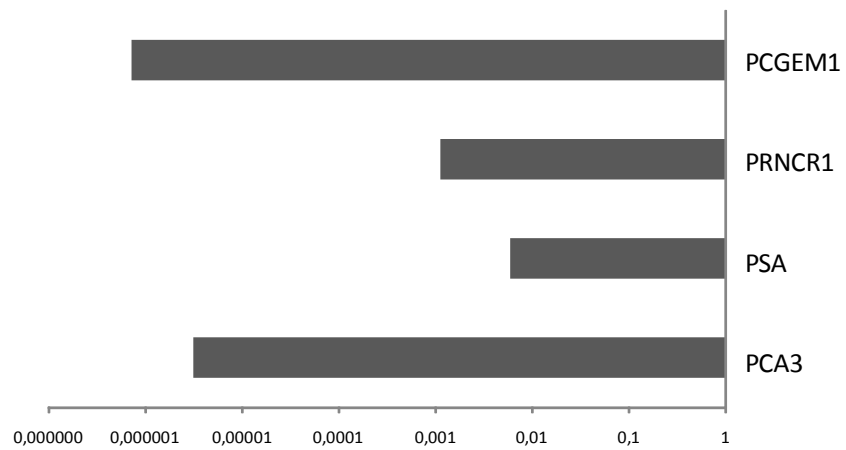
Bir sonraki aşamada, AR inhibisyonu ile birlikte PCA3 baskılanmasının AR ilişkili genleri nasıl etkilediği araştırılmıştır. Bu amaçla, PSA genine ilaveten AR yolağı ile ilişkilendirilmiş 2 kodlamayan RNA geni (PCGEM1 ve PRNCR1) seçilmiştir. PCA3 ile birlikte, seçilen genlerin LNCaP, LNCaP-AR⁺ ve VCaP hücrelerindeki bazal ekspresyon düzeyleri (referans gen GAPDH'a kıyasla) Şekil 4-7, Şekil 4-8 ve Şekil 4-9 gösterilmektedir. Oranlar logaritmik olarak ifade edilmiştir. İfade profilleri her üç hücre tipinde benzerlik gösterirken, PSA'nın bazal düzeyinin, beklendiği gibi, diğer genlere göre daha yüksek olduğu görülmektedir. LNCaP-AR⁺ hücrelerinde PCA3 geninin bazal ifade düzeyi LNCaP hücrelerine kıyasla bir miktar daha yüksek iken (yaklaşık 1.2 kat), VCaP hücrelerinde PCA3 ifadesinin çok daha düşük olduğu göze çarpmaktadır. PRNCR1 VCaP hücrelerinde bazal olarak daha yüksek düzeyde eksprese olmaktadır. PCGEM1 ifade düzeyinin ise LNCaP ve LNCaP-AR⁺ hücrelerinde VCaP hücrelerine kıyasla daha yüksek olduğu saptandı.



Şekil 4-7: LNCaP hücrelerinde hedef genlerin göreceli bazal ifade düzeyleri

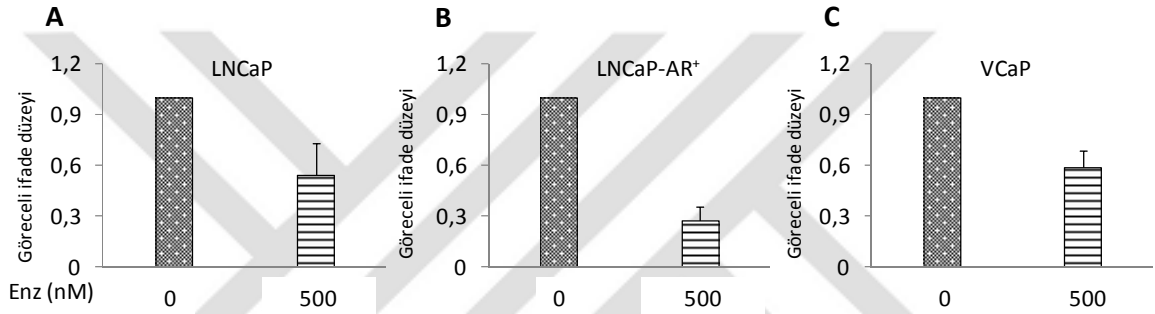


Şekil 4-8: LNCaP-AR⁺ hücrelerinde hedef genlerin göreceli bazal ifade düzeyleri



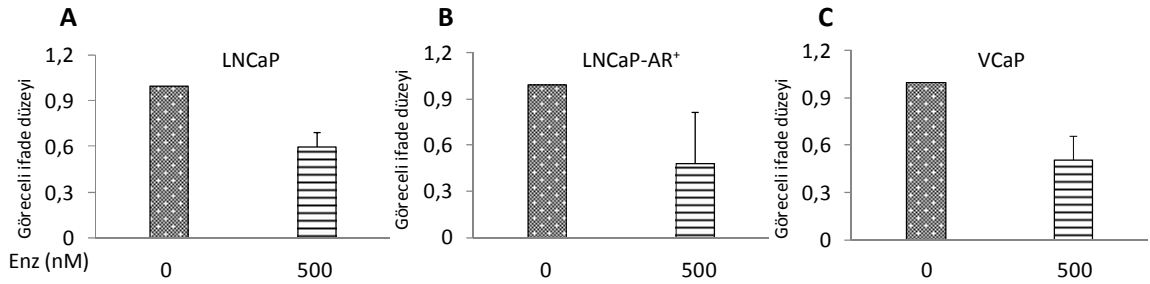
Şekil 4-9: VCaP hücrelerinde hedef genlerin göreceli bazal ifade düzeyleri

Enzalutamid ile AR blokajının, hedef genler (PSA, PRNCR1, PCGEM1) üzerine olan etkisini araştırmak için hücreler 24 saat boyunca bu ajan (500 nM) ile muamele edildiler. Süre sonunda, hedef genlerin ifade düzeyi yukarıda anlatıldığı gibi nicel GZ-PZR ile incelendi. Şekil 4-10'da görüleceği üzere, hücrelerin enzalutamid ile muamelesi her 3 hücre soyunda da PSA geninin ifadesinin azalmasına yol açmaktadır. PSA ifadesi, LNCaP-AR⁺ hücrelerinde ortalama %72 oranında azalırken, LNCaP hücrelerinde %47 ve VCaP hücrelerinde ise ortalama %41 oranında azalma saptanmıştır. Bu bulgu, enzalutamid ile AR blokajının, AR ifadesinin yüksek olduğu durumda, LNCaP-AR⁺ hücrelerinde olduğu gibi, etkisinin daha belirgin olduğunu göstermektedir.

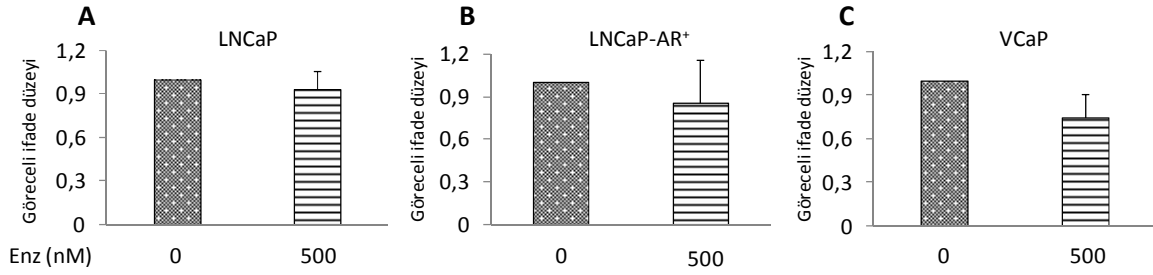


Şekil 4-10: Enzalutamid ile muamele edilen LNCaP (A), LNCaP-AR⁺ (B) ve VCaP (C) hücrelerinde PSA ifade düzeyi

Reseptör blokajı sonrası PRNCR1 ve PCGEM1 genlerinin ifade değişiklikleri incelendiğinde; PCGEM1 ifadesinde her 3 hücre soyunda azalma gözlenirken, PRNCR1 ifadesinde belirgin bir değişiklik saptanmadı. PCGEM1 ifadesindeki azalma LNCaP-AR⁺ ve VCaP hücrelerinde benzer oranda gerçekleşirken (yaklaşık %50 azalma), LNCaP hücrelerinde yaklaşık %40 azalma saptandı (Şekil 4-11). PCGEM1'in aksine PRNCR1 ekspresyon düzeyinde anlamlı bir değişiklik görülmedi (Şekil 4-12).



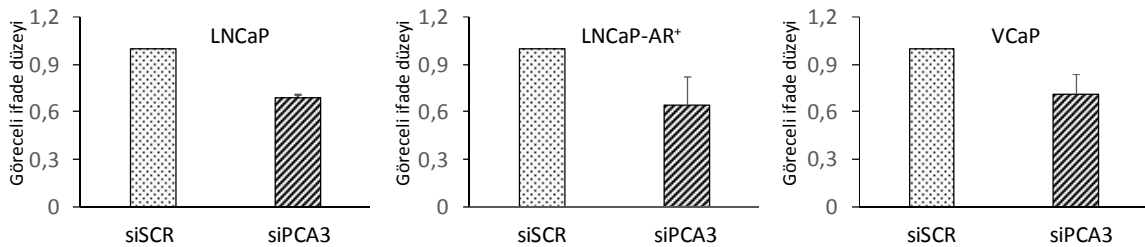
Şekil 4-11: Enzalutamid ile muamele edilen LNCaP (A), LNCaP-AR⁺ (B) ve VCaP (C) hücrelerinde PCGEM1 ifade düzeyi



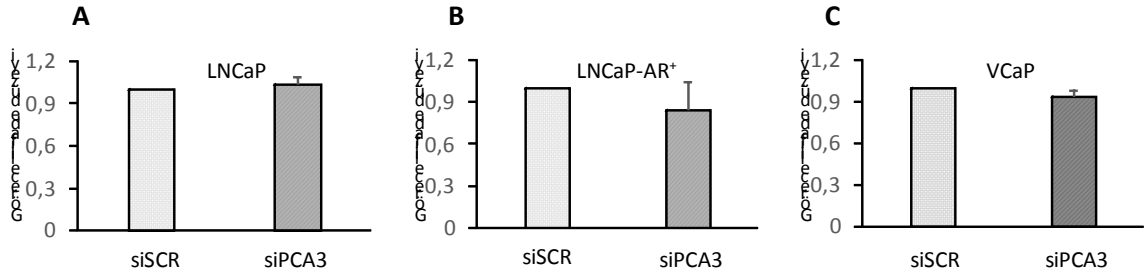
Şekil 4-12: Enzalutamid ile muamele edilen LNCaP (A), LNCaP-AR⁺ (B) ve VCaP (C) hücrelerinde PRNCR1 ifade düzeyi

PCA3 baskılanmasının PSA, PCGEM1 ve PRNCR1 genleri üzerindeki etkisini incelemek amacıyla hücreler kontrol siRNA ve PCA3-siRNA ile transfekte edildiler. Transfeksiyondan 36 saat sonra hücreler hasat edildi, RNA izolasyonu ve cDNA sentezi sonrası moleküllerin ifade düzeyleri nicel GZ-PZR ile incelendi. Şekil 4-13'de PCA3 baskılanmış hücrelerde PSA ifade düzeyleri görülmektedir. LNCaP-AR⁺ hücrelerinde PCA3 baskılanması, kontrole kıyasla PSA ifadesinde ortalama yaklaşık %40 azalmaya yol açmıştır. LNCaP ve VCaP hücre soylarında ise bu oran %30 olarak gerçekleşti.

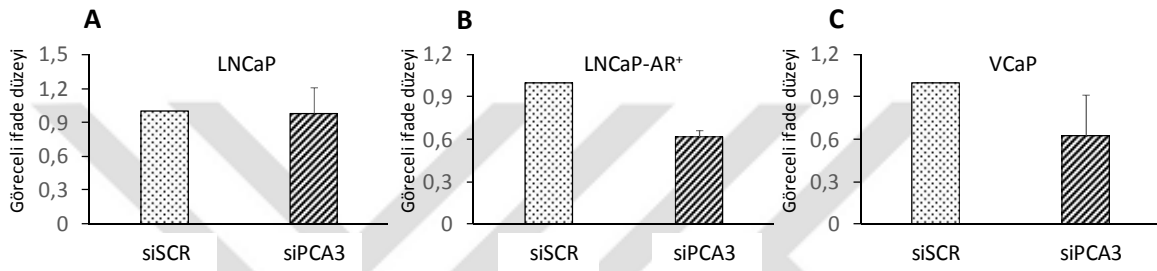
PCA3 baskılaması her üç hücre soyunda da PRNCR1 ifadesinde önemli bir değişikliğe yol açmamıştır (Şekil 4-14). Sadece LNCaP-AR⁺ hücrelerinde yaklaşık %20'lik bir düşüş göze çarpmaktadır. LNCaP-AR⁺ ve VCaP hücrelerinde PCGEM1 gen ifadesinde %40 oranında azalma görülmektedir. LNCaP hücrelerinde PCGEM1 anlatım düzeyinde değişiklik gözlenmedi (Şekil 4-15).



4-13: PCA3 baskılanan LNCaP (A), LNCaP-AR⁺ (B) ve VCaP (C) hücrelerinde PSA ifade düzeyi



Şekil 4-14: PCA3 baskılanan LNCaP (A), LNCaP-AR⁺ (B) ve VCaP (C) hücrelerinde PRNCR1 ifade düzeyi

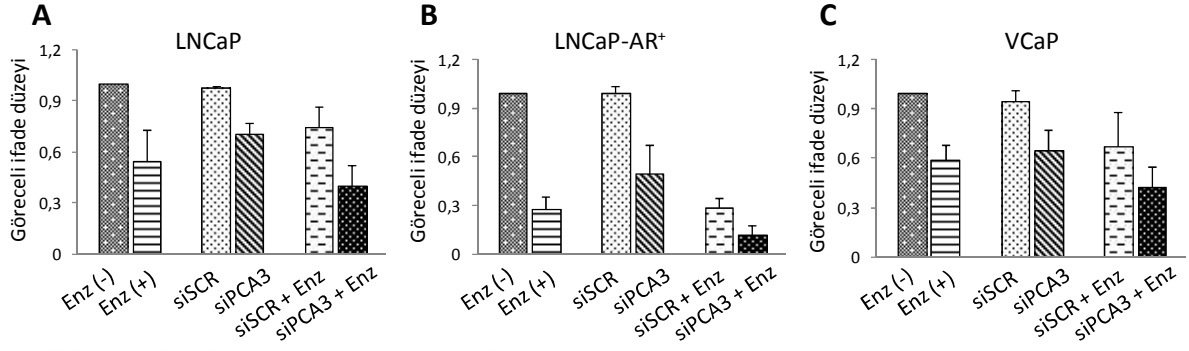


Şekil 4-15: PCA3 baskılanan LNCaP (A), LNCaP-AR⁺ (B) ve VCaP (C) hücrelerinde PCGEM1 ifade düzeyi

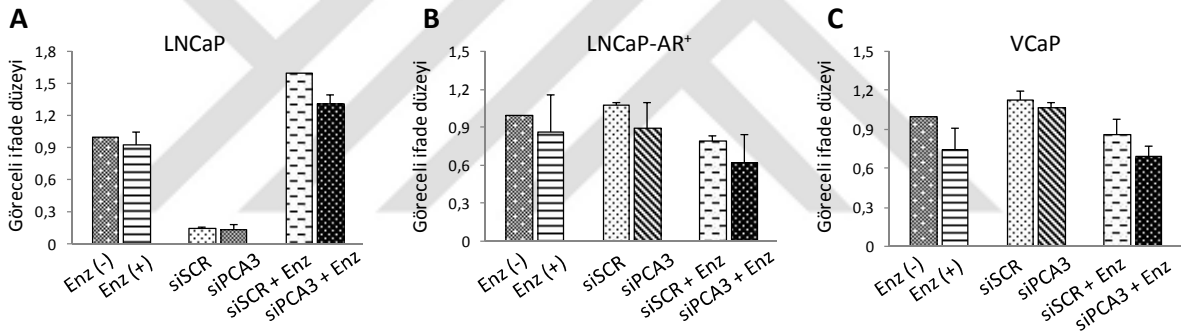
Yukarıda görüldüğü gibi, hem enzalutamid ile AR blokajı hem de PCA3 susturulması, PSA ve PCGEM1 genlerinin anlatımlarını önemli ölçüde baskımlarken, PRNCR1 geni üzerinde sınırlı bir etki saptanmıştır. Bir sonraki aşamada, AR inhibisyonu ile PCA3 baskılanması kombine edilerek genler üzerindeki etkisi araştırıldı. Bu amaçla, hücreler yukarıda olduğu gibi, kontrol siRNA ve PCA3-siRNA ile transfekte edildiler. Transfeksiyondan 6 saat sonra besiyeri değiştirilme aşamasında 500 nM enzalutamid eklendi ve hücreler bu koşullarda 30 saat muamele edildiler. Sürenin tamamlanmasıyla hasat edilen hücrelerde RNA izolasyonu yapıldı ve cDNA sentezi sonrası moleküllerin ifade düzeyleri nicel GZ-PZR ile incelendi.

Her 3 hücre soyunda PCA3 baskılanmasının AR blokajının etkisini arttırdığı görülmektedir. Kontrol hücreleri (kontrol siRNA + enzalutamid) ile karşılaştırıldığında, PCA3-siRNA + enzalutamid kombinasyonu uygulanan LNCaP hücrelerinde PSA gen ifadesinde ortalama %40 oranında ilave bir azalma saptanmıştır (Şekil 4-16). Diğer hücrelerde etki biraz daha düşük gerçekleşti. PRNCR1 geninde AR blokajı ile PCA3 baskılanmasının etkileri ayrı ayrı düşük iken, bu ikisinin kombinasyonu PRNCR1 gen ifadesini azaltmaktadır (%20-40) (Şekil 4-17). PCGEM1 ifadesine göz atıldığında ise,

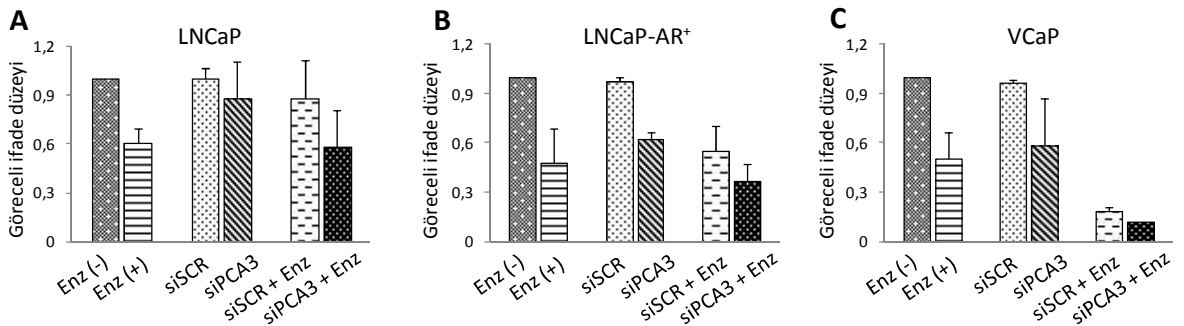
VCaP hücrelerinde yaklaşık %50 oranında ilave bir etki görülmektedir (Şekil 4-18). LNCaP ve LNCaP-AR⁺ hücrelerinde azalma VCaP hücrelerine kıyasla daha düşüktür.



Şekil 4-16: PCA3 ve AR baskılanan LNCaP (A), LNCaP-AR⁺ (B) ve VCaP (C) hücrelerinde PSA ifadesi



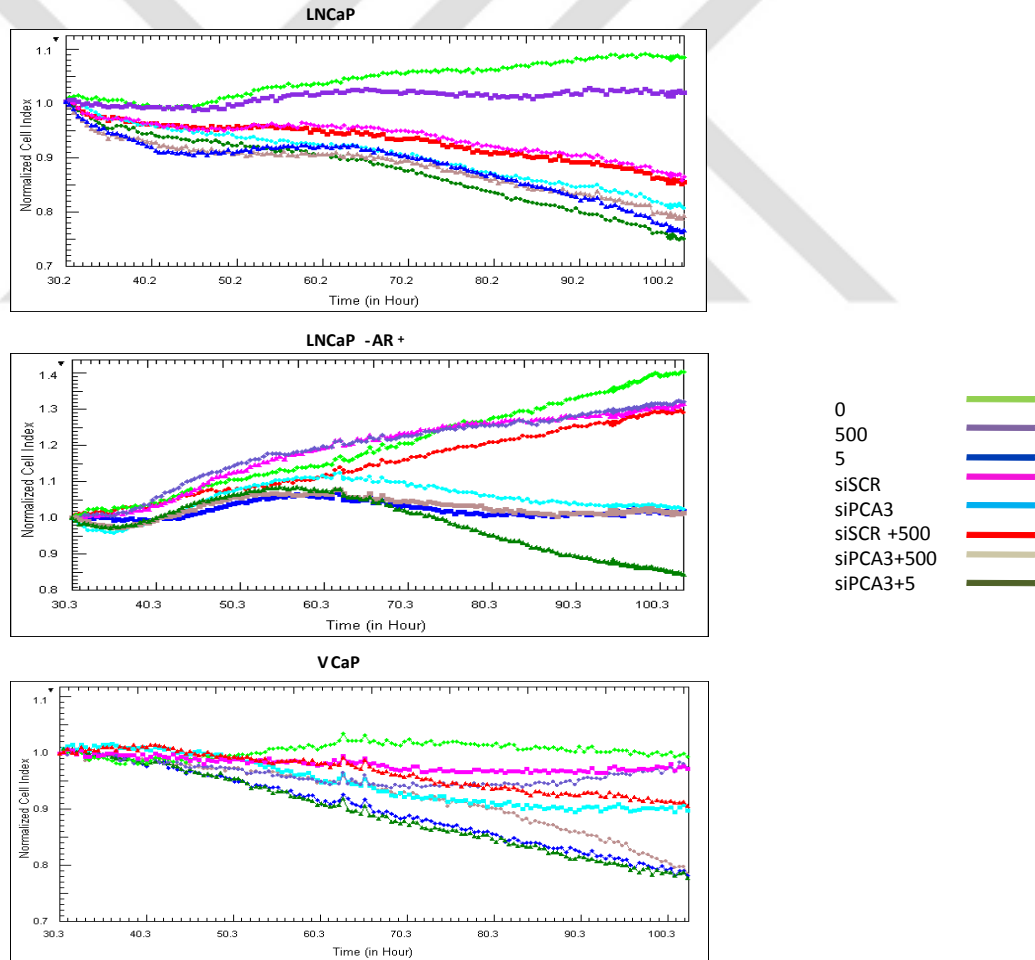
Şekil 4-17: PCA3 ve AR baskılanan LNCaP (A), LNCaP-AR⁺ (B) ve VCaP (C) hücrelerinde PRNCR1 ifadesi



Şekil 4-18: PCA3 ve AR baskılanan LNCaP (A), LNCaP-AR⁺ (B) ve VCaP (C) hücrelerinde PCGEM1 ifadesi

4.5. PCA3 Baskılanması ile Androjen Reseptör İnhibisyonunun Hücre Sağkalımı Üzerine Etkisinin Araştırılması

Yukarıda bulguları sıralanan deneysel çalışmalarda PCA3 baskılanmasının, AR inhibisyonuna benzer şekilde, androjen yolağında yer alan genleri baskıladığı gösterildi. Buradan yola çıkarak, PCA3 baskılanmasının tek başına veya enzalutamid (500 nM ve 5000 nM) ile kombinasyon halinde, prostat kanser hücrelerinin sağkalımını nasıl etkilediği araştırıldı. Hücreler yukarıda anlatıldığı gibi tansfekte edildiler ve transfeksiyon sonrası enzalutamid eklendi. Hücrelerin çoğalma özellikleri iCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz sisteminde 72 saate kadar izlendi. Bunun sonucunda elde edilen ve normalize edilmiş hücre indeksi eğrileri Şekil 4-19' da gösterilmektedir.



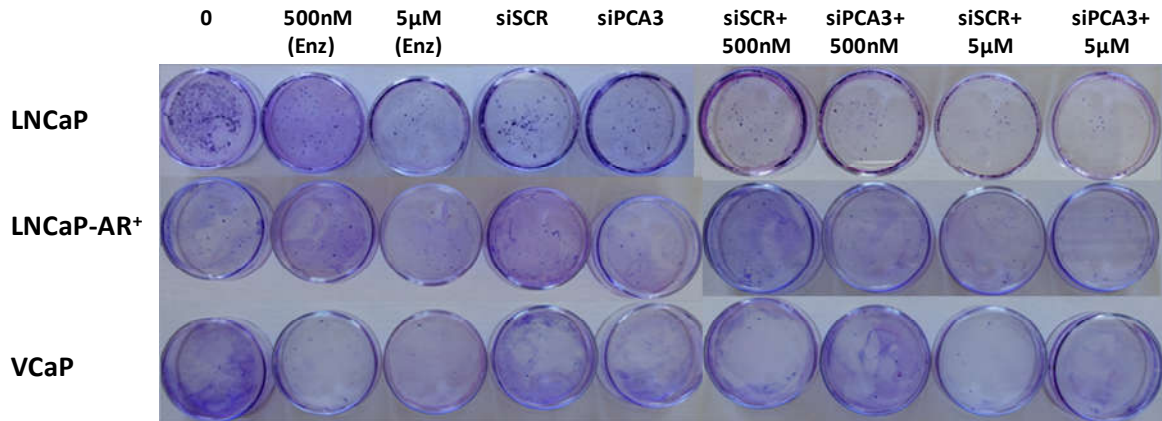
Şekil 4-19: Prostat kanseri hücrelerinde gerçek zamanlı hücre çoğalma eğrileri

Tablo 4-1’de, hücresel analizde 36. ve 72. saatte elde edilen canlılık değerleri özetlenmiştir. Buna göre, iki farklı enzalutamid dozu ile muamele edilen hücrelerde 36. saatte gözlenen etkinin sınırlı olduğu görülmektedir. 72. saat sonunda ise, artan doza paralel bir şekilde LNCaP ve LNCaP-AR⁺ hücrelerinde canlılık oranlarının %32 ve %30 azaldığı saptanmıştır. VCaP hücrelerinde canlılık daha az (%21) etkilenmiştir. PCA3 baskılanması ise, (kontrol siRNA’ya kıyasla) 72. saat sonunda LNCaP, LNCaP-AR⁺ ve VCaP hücrelerinde canlılığı sırasıyla %11, %20 ve %6 düşürmüştür. PCA3 baskılanması ile enzalutamid edildiğinde ise, etkinin düşük doz enzalutamid ile kombinasyonda daha belirgin olduğu göze çarpmaktadır. LNCaP-AR⁺ hücrelerinde canlılıkta belirgin (%22 ilave düşüş) azalma saptanırken, LNCaP ve VCaP hücrelerinde etki daha sınırlı olarak gerçekleşti. Sonuç olarak, PCA3 baskılanmasının prostat kanser hücrelerinin sağkalımını azalttığı ve etkinin AR’yi aşırı eksprese eden hücrelerde daha yüksek olduğu görülmektedir.

Tablo 4-1: PCA3 baskılanması ve/veya enzalutamidin prostat kanseri hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisi (% kontrol)

Hücre Soy	Enzalutamid 500 nM 36s 72s	Enzalutamid 5 µM 36s 72s	siSCR 36s 72s	siPCA3 36s 72s	siSCR+ 500 nM Enz 36s 72s	siPCA3 + 500 nM Enz 36s 72s	siPCA3 + 5 µM Enz 36s 72s
LNCaP	97 94	87 68	91 84	87 75	89 79	85 73	84 68
LNCAP- AR ⁺	98 94	88 70	98 93	92 73	96 92	88 70	88 60
VCaP	93 92	88 79	96 95	92 89	95 91	92 82	87 78

Bir sonraki aşamada, AR inhibisyonu ile birlikte PCA3 baskılanmasının prostat kanseri hücreleri üzerindeki etkisini daha iyi değerlendirmek amacıyla klonojenik test gerçekleştirildi. Klonojenik test, sitotoksik bir ajanın (radyasyon, ilaç vb.) etkisini belirlemek açısından yaygın olarak kullanılan bir uygulamadır. Bu testte PCA3 baskılanan ve/veya enzalutamid ile muamele edilen hücrelerin hücre kültür koşullarında koloni oluşturabilme kapasiteleri araştırıldı. Bu amaçla hücreler deney koşullarında 10 gün büyütüldüler ve hücrelerin oluşturduğu koloniler boyanarak sayıldı (Şekil 4-20).



Şekil 4-20: Prostat kanseri hücrelerinin oluşturduğu koloni görüntüleri

Elde edilen bulgular Tablo 4-2’de özetlenmiştir. Beklendiği gibi, PCA3 baskılanması ve/veya AR inhibisyonunun hücreler üzerindeki etkisi, klonojenik testte, iCELLigence cihazındaki 72 saatlik gerçek zamanlı hücre analizine kıyasla, daha iyi görülmektedir.

Düşük doz enzalutamid (500 nM) hücrelerin koloni oluşturma kapasitelerini %7-16, 5µM enzalutamid ise %22-38 oranında azaltmıştır. PCA3 baskılanması da hücrelerin canlılığını azaltmaktadır. PCA3 baskılanması LNCaP ve LNCaP-AR⁺ hücrelerinde yaklaşık %35, VCaP hücrelerinde ise %21 düzeyinde koloni sayısını azaltmıştır. PCA3 baskılanması AR inhibisyonu ile kombine edildiğinde ise etkinin çok daha yüksek olduğu görülmektedir. Örneğin LNCaP-AR⁺ hücrelerinde, kombinasyon uygulaması ile hücre canlılığı yaklaşık %80 oranında baskılanmıştır. Bu bulgular, gerçek-zamanlı hücre canlılık analiz bulguları ile uyumlu şekilde, PCA3 baskılanmasının ve bunun enzalutamid ile kombinasyonunun prostat kanser hücrelerinin canlılığını azalttığını ortaya koymaktadır.

Tablo 4-2: Prostat kanseri hücre soylarında klonojenik test ile belirlenen % canlılık oranları

Hücre Soyu	Kontrol	Enz (500 nM)	Enz (5 µM)	siSCR	siPCA3	siSCR + 500 nM Enz	siPCA3 + 500 nM Enz	siSCR + 5 µM Enz	siPCA3 + 5 µM Enz
LNCaP	100	90	68	88	67	83	55	53	32
LNCaP-AR ⁺	100	84	62	93	65	88	60	52	21
VCaP	100	93	78	90	79	84	69	63	42

Sitotoksik ajanların hücresel sağkalım üzerine etkisini değerlendirmek amacıyla kullanılan diğer bir yaklaşım apoptotik hücre ölümünün incelenmesidir. Tez çalışmasında, prostat kanser hücrelerinde apoptotik hücre ölümü, ELİZA-bazlı yaklaşımla DNA yıkım ürünleri olan nükleozomların ölçülmesi yolu ile gerçekleştirildi. PCA3 baskılanan ve/veya enzalutamid ile muamele edilen hücrelerde 36 saat sonra ölçülen apoptotik hücre ölüm düzeyleri Tablo 4-3’de özetlenmiştir. Görüldüğü üzere 500 nM enzalutamid her 3 hücre tipin de hücre ölüm düzeylerini önemli ölçüde arttırmaktadır. Kontrol hücrelerine kıyasla, hücre ölüm oranlarının LNCaP ve LNCaP-AR⁺ hücrelerinde 2 kattan fazla, VCaP hücrelerinde ise 1.6 kat arttığı belirlenmiştir. PCA3 baskılanması, hücre ölüm seviyelerini en fazla LNCaP-AR⁺ hücrelerinde artırırken (2.4 kat), LNCaP (1.9 kat) ve VCaP (1.5 kat) hücrelerinde etki daha az idi. Her iki uygulama kombine edildiğinde etkinin daha da arttığı dikkat çekmektedir.

Tablo 4-3: Prostat kanseri hücrelerinde apoptotik hücre ölüm oranları

HücreSoyu	Kontrol	Enzalutamid (500 nM)	siPCA3	siSCR+Enz	siPCA3+ Enz
LNCaP	1	2.4	1.9	3.1	3.7
LNCaP-AR ⁺	1	2.7	2.4	2.6	3.8
VCaP	1	1.6	1.5	1.6	1.9

5. TARTIŞMA

1940'lı yıllardan bu yana ileri evre prostat kanseri tedavisinde, androjenler ve AR sinyal yolağı inhibisyonuna odaklanılmıştır. AR, sadece sağlıklı prostatın büyümesi ve farklılaşması için değil, aynı zamanda prostat kanseri patogeneğinde de önemli rol oynar [243]. Malign prostat hücrelerinde AR sinyal yolağı hücre çoğalması ve apoptoz arasındaki dengeyi bozarak kontrolsüz büyümeyi yönlendirir [102]. Hastalığın biyolojisinin daha iyi anlaşılması, prostat kanserinde tedavi seçeneklerinin artmasına yol açmıştır. Bunlar arasında yeni kemoterapi ajanları (kabazitaksel), immünolojik yaklaşımlar (sipuleucel-T) ile yeni nesil AR biyosentez inhibitörleri ve antagonistleri (abirateron asetat, enzalutamid) yer almaktadır [244, 245]. Enzalutamid, KDPK tedavisinde kullanılan yeni nesil androjen reseptör inhibitörlerinden biridir [9]. Preklinik çalışmalarda, bu molekülün reseptörün çekirdeğe geçmesini ve DNA'ya bağlanmasını bloke ettiği ve böylece hücreleri apoptoza yönlendirerek tümör büyümesini engellediği gösterilmiştir [246]. Klinik çalışmalar, enzalutamidin, ADT'yi takiben metastatik KDPK'li hastalarda genel sağkalımı arttırdığını ortaya koymuştur [124, 247].

Prostat kanseri tanısında yaygın olarak kullanılan PSA, hastalığın erken dönemde saptanmasında yararlı olmasına karşın, prostat kanseri için yeterli özgüllüğe sahip olmaması gereksiz biyopsi ve tedavilere yol açabilmektedir. Bu nedenle daha spesifik tümör belirteçlerine ihtiyaç duyulmaktadır. PCA3 olarak adlandırılan uzun kodlamayan RNA, prostat kanserinde önem kazanan moleküllerden biridir. PCA3, normal prostat dokusunda düşük oranda anlatıma sahip iken, prostat kanseri hücre soylarında ve primer prostat tümör dokularında aşırı ifade edilir [10]. PSA, hastanın yaşı, prostat hacmi ve dijital rektal muayene bulguları gibi diğer klinik ölçümlerle birlikte PCA3 idrar düzeylerinin ölçülmesi, prostat kanseri varlığının öngörülmesine katkı sağlamaktadır [204, 248]. Prostat kanserindeki öneminden hareketle, PCA3 molekülünün prostat kanserinin tedavi modalitelerinde hedef moleküllerden biri olabileceği düşünülmektedir. Tez çalışmasında, PCA3 geninin AR yolağı ilişkisi ve prostat kanseri hücrelerinin sağkalımı üzerindeki önemi araştırıldı. Bu amaçla farklı hücre modelleri kullanıldı; LNCaP hücreleri androjene duyarlı prostat kanserini temsil

ederken, LNCaP-AR hücre soyu androjen reseptörünü daha yüksek oranda ifade eden hücrelerdir. VCaP hücreleri ise kastrasyona dirençli prostat kanserinin modeli olarak seçildi. Böylece, farklı klinik durumları temsil eden hücre soylarında PCA3'ün androjen yolağı ile ilişkisi araştırılmıştır.

Androjenler, prostat kanseri hücrelerinde birçok genin düzenlenmesinde ve AR sinyal yolağının ilerletilmesinde önemli rol oynamaktadır. Bu nedenle, tez çalışmasında, ilk olarak, androjene duyarlı LNCaP hücre soyunda, PCA3 molekülünün androjenler tarafından ne ölçüde uyarıldığı araştırıldı. DHT'nin farklı dozları ile (0, 1, 10 ve 100 nM) muamele edilen hücrelerde, PCA3'ün DHT tarafından kuvvetli bir şekilde (ortalama yaklaşık 1000 kata kadar) uyarıldığı saptandı. Diğer taraftan, DHT uyarımına karşı PCA3'ün verdiği cevabın PSA yanıtına göre çok daha etkin olması dikkat çekici idi. Bu bulgu, kodlamayan RNA geni olan PCA3 ve protein kodlayan gen olan PSA'nın androjenler tarafından farklı şekilde düzenleniyor olabileceklerini göstermektedir. PCA3 gen promotöründe androjen cevap elementi (ARE) bölgeleri bulunmamasına rağmen [249] androjenler tarafından uyarılması, AR ile düzenlenen başka gen veya moleküllerin PCA3 ifadesi üzerinde etkisi olduğunu düşündürmektedir. PCA3'ün prostata kanserine özgü olması [227] ve daha önceki çalışmalarda DHT tedavisi üzerine PCA3 uyarıldığının gösterilmesi [227, 250] elde edilen bulguların doğruluğunu desteklemektedir.

PCA3 geninin androjen tarafından etkin bir şekilde uyarıldığının gösterilmesinin ardından, PCA3 baskılanmasının, AR ilişkili genler (PSA, PCGEM1 ve PRNCR1) üzerine etkisi araştırıldı. Günümüze kadar yapılan çalışmalarda genel olarak lncRNA genlerinin anlatım düzeylerinin protein kodlayan genlerin ekspresyon seviyelerine kıyasla daha düşük olduğu bildirilmiştir [223]. Çalışmamızda da benzer şekilde, her üç hücre tipinde PSA dışındaki moleküllerin oldukça düşük düzeylerde ifade edildiği saptandı. PCA3 ifade düzeyinin, LNCaP ve LNCaP-AR⁺ hücrelerinde VCaP hücrelerine göre daha yüksek olduğu göze çarpmaktadır. Ferreira ve ark. farklı prostat kanseri hücre soylarında yaptıkları çalışmada da en yüksek PCA3 ifade düzeyinin LNCaP hücrelerinde olduğunu bildirmişlerdir [14]. Bu da LNCaP ve bundan köken alan hücrelerde daha yüksek PCA3 gen anlatımı olduğunu göstermektedir.

PCA3 geninin baskılanması her üç hücre tipinde de PSA gen ifadesinin azalmasına yol açarken en fazla etki LNCaP-AR⁺ (yaklaşık %70 azalma) hücrelerinde saptandı. Bu hücre tipinin AR'yi daha fazla ifade etmesi ve bu hücrelerde PCA3

ifadesinin daha yüksek olması etkinin daha fazla görülmesinin nedeni olarak açıklanabilir. Bu bulgular PCA3 geninin AR yolağında görev aldığına diğer bir kanıt olarak görülebilir. Kodlamayan RNA genleri olan PCGEM1 ve PRNCR1, AR yolağı ile ilişkilendirilmiş ve KDPK'nin bir komponenti olduğu bildirilmiştir [236]. PCA3 susturulması sonrası bu moleküllerin prostat kanseri hücrelerindeki düzeylerine bakıldığında, PCGEM1 ifadesinin azaldığı, PRNCR1 anlatımında ise önemli bir değişim olmadığı görüldü. Bu bulgu ile uyumlu şekilde, literatürde PRNCR1'in prostat kanseri ve AR sinyal yolağındaki rolünün tartışmalı olduğu göze çarpmaktadır. 2014 yılında yapılan ve detaylı bir RNA dizileme analizi içeren bir çalışma PCGEM1'i prostat kanseri ile ilişkili bulurken, PRNCR1 için aynı sonuçlara ulaşamamıştır [237]. Ancak bu çalışma her iki molekülün de AR sinyal yolağının bileşenleri olmadığını iddia etmiştir. Bunu takip eden ve fare ksenograft modelleriyle yapılan diğer bir çalışmada ise kastrasyon sonrası PCGEM1 ifadesinin 500 kattan fazla düştüğü ve testosteron uygulaması sonucu ifadenin arttığı gösterilmiştir [238]. Yine aynı çalışmada prostat kanseri hücre soylarının (LNCaP ve VCaP) DHT ile uyarımı sonrası PCGEM1 ifadesinin arttığı belirtilmiştir [238]. Bu sonuçlar çalışmamızdaki sonuçları destekler nitelikte olup AR'nin PCGEM1 ifadesinin düzenlenmesinde rol oynadığını gösterirken aynı durum PRNCR1 için geçerli gözükmemektedir.

Enzalutamid ile AR blokajı gerçekleştirildiğinde, PCA3 ve diğer genlerin (PSA, PCGEM1, PRNCR1) verdiği yanıtların birbirinden farklı olduğu ve hücre tipine göre de farklılık gösterdiği gözlemlenmiştir. AR inhibisyonu sonucu LNCaP ve LNCaP-AR⁺ hücrelerinde PCA3 gen ifadesinin azaldığı saptanırken, VCaP hücrelerinde önemli bir azalma saptanmadı. Bu durum, bu hücrelerin kastrasyona dirençli olmaları ile ve/veya bu hücrelerde farklı bir düzenlenme bulunması ile açıklanabilir. Nitekim, aşağıda tartışıldığı gibi, VCaP hücrelerinde AR blokajı veya PCA3 baskılanması sonucu sitotoksitenin diğer hücrelere göre daha düşük olması da bununla ilişkili olabilir.

Yapılan klinik çalışmalarda, enzalutamid kullanımının hastalarda PSA azalmasına yol açarak genel sağkalımı arttırdığı gösterilmiştir [251, 252]. Tzu-Hua Lin ve ark. prostat kanseri hücre soylarında yaptığı çalışmada 5µM enzalutamid kullanımının AR'nin hedef geni olan PSA ifadesinin düşmesine yol açtığı belirtilmiştir [253]. Çalışmamızda da bu sonuçla uyumlu şekilde, her üç hücre soyunda da enzalutamid ile AR blokajı sonucu PSA ifadesinin azaldığı saptandı. Ancak VCaP hücrelerindeki azalış diğer hücrelere göre daha az gözlemlendi. Bunun, VCaP hücre

soyunun normal koşullarda AR'nin ek varyant proteinini ifade etmesi ile ilişkili olabileceğini düşünülmektedir [125, 159]. AR'nin kırılması ve yeniden düzenlenmesi yoluyla oluşan AR ek varyantları, yapısal olarak sürekli aktif olup KDPK'da AR etkinleştirilmesinin mekanizmalarından birisini oluşturmaktadır. En sık görülen varyant olan AR-V7 yapısal olarak sürekli aktif olup kastrasyona dirençli büyümeden sorumlu olup, mKDPK'lı hastalarda abirateron asetat ve enzalutamid ile tedaviye direnç açısından oldukça prediktif değere sahiptir [162, 163]. Ayrıca Kregel ve ark. yaptığı çalışmada LNCaP hücrelerinde enzalutamidin PSA ve TMPRSS2 ifadesini anlamlı derecede azalttığı, VCaP hücrelerinde ise PSA ifadesindeki azalışın anlamlı olmadığı belirtilmiştir [254]. Literatürdeki bu veriler çalışmamızın bulgularını desteklemektedir.

Enzalutamid-aracılı AR blokajı ile PCA3 susturulması birlikte uygulandığında, beklendiği üzere, AR ilişkili genler üzerinde saptanan etki daha yüksek oranda gerçekleşti. Her 3 hücre soyunda da PCA3 baskılanmasının AR blokajının etkisini arttırdığı belirlendi. Hücre tipine göre; PSA ifadesinde %40'a kadar, PCGEM1 ifadesinde ise %50'ye yakın ilave bir azalma gözlemlendi. İlginç bir şekilde, PCA3 baskılanmasının veya androjen blokajının tek başlarına PRNCR1 geni üzerindeki etkileri çok düşük düzeyde iken, birlikte uygulandıklarında gen ifadesinde hücre tipine bağlı olarak %40'a kadar azalma saptandı. Bu bulgu, PCA3 baskılanması ve AR blokajının birlikte sinerjik etki göstererek daha etkili olduğunu ortaya koymaktadır.

Gen ekspresyon çalışmaları ile, PCA3 geninin baskılanmasının, AR blokajına benzer şekilde AR androjen yolağında yer alan genleri baskıladığı gösterildi. Bir sonraki aşamada, PCA3 susturulmasının prostat kanser hücrelerinin sağkalımını nasıl etkilediği incelendi. iCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analizi ile elde edilen hücre indeksi verileri değerlendirildiğinde; 3 hücre soyunda da hem PCA3 baskılanması hem de enzalutamid ile AR inhibisyonu tek başlarına hücreler üzerinde sitotoksik etki gösterdiler (Tablo 4.1). Birlikte uygulandıklarında, tek tek oluşan etkiden daha fazla etki ortaya çıktı. Bu bulgular, PCA3'ün AR yolağının bir modülatörü olarak görev yaptığını ve hücre çoğalmasını uyardığı görülmektedir. Sitotoksik etkinin VCaP hücrelerinde diğerlerine kıyasla daha az görüldüğü saptandı. Yukarıda bahsedildiği gibi, AR blokajından PCA3'ün sınırlı etkilenmesi ve VCaP hücrelerinin AR-V7 proteini ifade etmesi enzalutamidin sınırlı etkisini açıklayabilir. Ayrıca VCaP hücrelerinin çoğalma hızının yavaş olması [255] diğer sınırlayıcı bir faktör olarak düşünülebilir.

Enzalutamidin prostat kanseri hücreleri üzerinde gösterdiği sitotoksik etki, ilacın doz ve uygulama süresine göre değişiklik gösterdi ve artan doz ve süre ile daha yüksek anti-proliferatif etki elde edildi. Tez çalışmasında da kullanılan 5 μ M'lik enzalutamid konsantrasyonunun, LNCaP-neo hücrelerinin büyümesini %30'dan daha fazla azalttığı gösterilmiştir [256]. Heimo Syvala ve arkadaşları tarafından yapılan *in vitro* çalışmada enzalutamid (1 μ M) ile LNCaP hücrelerinin (%59) ve VCaP hücrelerinin (%31) büyümesinde düşüş gözlemlenmiştir [257]. Literatür bilgileri, tez çalışmasının bulgularını genel olarak desteklerken, çalışmalar arasında görülen farklar, hücre tipine, hücrelerin pasaj sayısına veya kullanılan sitotoksikite ölçüm yöntemlerine göre farklılık gösterebilmektedir.

Klonojenik test ile yapılan hücre sağkalımı deneyleri ile de, PCA3 baskılanması ve AR blokajının prostat kanseri hücrelerinin canlılığını azalttığı teyit edildi. PCA3 baskılanması ve AR inhibisyonu birlikte uygulandıklarında etkinin çok daha yüksek olduğu görüldü (Tablo 4.2). Örneğin LNCaP ve LNCaP-AR⁺ hücrelerinde, kombinasyon uygulaması ile hücre canlılığını yaklaşık %70-%80 oranında azaltmaktadır. Benzer etkiler, apoptotik hücre ölüm oranlarında da gözlemlendi. Enzalutamid ve PCA3 baskılanması tek başlarına hücrelerde ölüm oranlarını arttırırken, kombine edildiklerinde etkinin daha da arttığı dikkat çekmektedir (Tablo 4.3).

PCA3'ün, bir tümör baskılayıcı olan, PRUNE2 geninin ekspresyonunu modüle ettiği gösterilmiştir [229]. Sağlıklı prostat dokusunda, PRUNE2 ifadesinin yüksek PCA3 anlatımının düşük olduğu saptandı. Yüksek PRUNE2 seviyeleri prostat kanseri hücrelerinin çoğalmasını azaltırken, bu genin susturulması hücre çoğalması ve transformasyonunu uyarmaktadır [229]. Bu durum, prostat kanseri örneklerinde tam tersidir. Tez çalışmasında, her ne kadar PRUNE2 geninin ifadesi incelenmemiş olsa da, PCA3 geninin baskılandığı hücrelerde hücre ölüm oranının artması, PRUNE2 geninin ifadesinin artması ve bunun sonucu olarak hücreleri apoptoza yönlendirilmesi ile açıklanabilir.

Sonuç olarak, PCA3 geninin androjen tarafından etkin bir şekilde uyarılması, bu uyarımın PSA'ya göre daha kuvvetli olması; PCA3 geni susturulduğunda, AR ilişkili genler olan PSA ve PCGEM1 ifadesinin azalması PCA3 geninin AR yolağının bir bileşeni olduğunu göstermektedir. Tez çalışmasında elde edilen bulgular literatür bilgileri ile uyumludur. Çalışmada, ayrıca, literatürde tartışmalı bir konu olan PRNCR1 ve PCGEM1 genlerinin AR sinyal yolağı ile ilişkisi konusuna açıklayıcı yönde katkı

sağlamaktadır. Güncel bir çalışmada, PCA3'ün anjiyogenez, hücre adezyonu, sinyal iletimi ve apoptoz ile ilgili önemli kanser genlerinin ekspresyonunu düzenlediği bildirilmektedir [258]. Yine bu çalışma ile uyumlu bir şekilde, çalışmamızda PCA3 geninin susturulması, prostat kanseri hücrelerinin sağkalımını azaltırken, AR antagonisti olan enzalutamidin neden olduğu sitotoksisiteyi arttırmıştır. Elde edilen bu bulgular, PCA3'ün tanısal bir belirteç olarak uygulanmasının yanı sıra, prostat kanserinde terapötik bir hedef olarak da hizmet edebileceğini göstermektedir. Buna ilaveten, PCA3 geninin susturulmasının farklı klinik antitilerde (androjene duyarlı ya da kastrasyona dirençli gibi) yararlı olabileceği gösterilmiştir. Yapılacak *in vivo* ve klinik çalışmalarda, PCA3 geninin hedeflenmesinin klinik yararlılığının araştırılması gerekmektedir.



KAYNAKLAR

1. Jemal A ve ark. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 2011. **61**(2): p. 69-90.
2. Chodak GW ve ark. Nuclear localization of androgen receptor in heterogeneous samples of normal, hyperplastic and neoplastic human prostate. *J Urol*, 1992. **147**(3 Pt 2): p. 798-803.
3. Ruizeveld de Winter JA ve ark. Androgen receptor status in localized and locally progressive hormone refractory human prostate cancer. *Am J Pathol*, 1994. **144**(4): p. 735-46.
4. Sadi MV ve ark. Immunohistochemical study of androgen receptors in metastatic prostate cancer. Comparison of receptor content and response to hormonal therapy. *Cancer*, 1991. **67**(12): p. 3057-64.
5. Karantanos T ve ark. Prostate cancer progression after androgen deprivation therapy: mechanisms of castrate resistance and novel therapeutic approaches. *Oncogene*, 2013. **32**(49): p. 5501-11.
6. Agus DB ve ark. Response of prostate cancer to anti-Her-2/neu antibody in androgen-dependent and -independent human xenograft models. *Cancer Res*, 1999. **59**(19): p. 4761-4.
7. Balk SP ve KE Knudsen. AR, the cell cycle, and prostate cancer. *Nucl Recept Signal*, 2008. **6**: p. e001.
8. Denmeade SR ve ark. Role of programmed (apoptotic) cell death during the progression and therapy for prostate cancer. *Prostate*, 1996. **28**(4): p. 251-65.
9. Tran C ve ark. Development of a second-generation antiandrogen for treatment of advanced prostate cancer. *Science*, 2009. **324**(5928): p. 787-90.
10. Bussemakers MJ ve ark. DD3: a new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer. *Cancer Res*, 1999. **59**(23): p. 5975-9.
11. de Kok JB ve ark. DD3(PCA3), a very sensitive and specific marker to detect prostate tumors. *Cancer Res*, 2002. **62**(9): p. 2695-8.
12. van Bokhoven A ve ark. Molecular characterization of human prostate carcinoma cell lines. *Prostate*, 2003. **57**(3): p. 205-25.
13. Auprich M ve ark. Contemporary role of prostate cancer antigen 3 in the management of prostate cancer. *Eur Urol*, 2011. **60**(5): p. 1045-54.
14. Ferreira LB ve ark. PCA3 noncoding RNA is involved in the control of prostate-cancer cell survival and modulates androgen receptor signaling. *BMC Cancer*, 2012. **12**: p. 507.
15. Ross MH ve Pawlina W. *Histology: A Text and Atlas 6th edition*. 2010: Lippincott Williams & Wilkins.
16. McNeal JE. The zonal anatomy of the prostate. *Prostate*, 1981. **2**(1): p. 35-49.
17. Mawhinney, M. and A. Mariotti, Physiology, pathology and pharmacology of the male reproductive system. *Periodontol 2000*, 2013. **61**(1): p. 232-51.
18. Bhavsar A ve Verma S. Anatomic imaging of the prostate. *Biomed Res Int*, 2014. **2014**: p. 728539.
19. Ehrlich Y ve ark. Division of prostatic anterior fibromuscular stroma reduces urethral resistance in an ex vivo human prostate model. *Urology*, 2010. **76**(2): p. 511 e10-3.

20. Zelefsky MJ, ve Sartor AO. *Cancer of the prostate. Cancer: Principles and Practice of Oncology*, ed. L.T. In: DeVita VT Jr, Rosenberg SA. 2011: Lippincott Williams & Wilkins.
21. Murphy AB ve ark. Chronic prostatitis: management strategies. *Drugs*, 2009. **69**(1): p. 71-84.
22. Woenckhaus J ve Fenic I., Proliferative inflammatory atrophy: a background lesion of prostate cancer? *Andrologia*, 2008. **40**(2): p. 134-7.
23. Sarma AV ve Wei JT. Clinical practice. Benign prostatic hyperplasia and lower urinary tract symptoms. *N Engl J Med*, 2012. **367**(3): p. 248-57.
24. McVary KT ve ark. Update on AUA guideline on the management of benign prostatic hyperplasia. *J Urol*, 2011. **185**(5): p. 1793-803.
25. Paolone DR. Benign prostatic hyperplasia. *Clin Geriatr Med*, 2010. **26**(2): p. 223-39.
26. Cunningham GR ve Kadmon D. Medical treatment of benign prostatic hyperplasia. *UpToDate*, 2013.
27. De Marzo AM ve ark. Proliferative inflammatory atrophy of the prostate: implications for prostatic carcinogenesis. *Am J Pathol*, 1999. **155**(6): p. 1985-92.
28. De Marzo AM ve ark. Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat Rev Cancer*, 2007. **7**(4): p. 256-69.
29. Ruska KM ve ark. Histology and cellular kinetics of prostatic atrophy. *Am J Surg Pathol*, 1998. **22**(9): p. 1073-7.
30. Bostwick DG ve ark. High-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Rev Urol*, 2004. **6**(4): p. 171-9.
31. Montironi R ve ark. Mechanisms of disease: high-grade prostatic intraepithelial neoplasia and other proposed preneoplastic lesions in the prostate. *Nat Clin Pract Urol*, 2007. **4**(6): p. 321-32.
32. Baca SC ve Garraway LA. The genomic landscape of prostate cancer. *Front Endocrinol* (Lausanne), 2012. **3**: p. 69.
33. Nagle RB ve ark. Phenotypic relationships of prostatic intraepithelial neoplasia to invasive prostatic carcinoma. *Am J Pathol*, 1991. **138**(1): p. 119-28.
34. Epstein JI. Precursor lesions to prostatic adenocarcinoma. *Virchows Arch*, 2009. **454**(1): p. 1-16.
35. Qian J ve ark. Chromosomal anomalies in prostatic intraepithelial neoplasia and carcinoma detected by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Res*, 1995. **55**(22): p. 5408-14.
36. Barbieri CE ve Tomlins SA. The prostate cancer genome: perspectives and potential. *Urol Oncol*, 2014. **32**(1): p. 53 e15-22.
37. Hanahan D ve Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*, 2000. **100**(1): p. 57-70.
38. Hanahan D ve Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 2011. **144**(5): p. 646-74.
39. Siegel RL ve ark. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin*, 2015. **65**(1): p. 5-29.
40. Torre LA ve ark. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*, 2015. **65**(2): p. 87-108.
41. Gann PH. Risk factors for prostate cancer. *Rev Urol*, 2002. **4 Suppl 5**: p. S3-S10.
42. Carter BS ve ark. Hereditary prostate cancer: epidemiologic and clinical features. *J Urol*, 1993. **150**(3): p. 797-802.

43. Ostrander EA ve ark. Finding prostate cancer susceptibility genes. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2004. **5**: p. 151-75.
44. Stanford JL ve Ostrander EA. Familial prostate cancer. *Epidemiol Rev*, 2001. **23**(1): p. 19-23.
45. Lichtenstein P ve ark. Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N Engl J Med*, 2000. **343**(2): p. 78-85.
46. Chornokur G ve ark. Disparities at presentation, diagnosis, treatment, and survival in African American men, affected by prostate cancer. *Prostate*, 2011. **71**(9): p. 985-97.
47. Institute, N.C. *Health Information National Trends Survey 4 (HINTS 4) Cycle 2 Analytic Recommendations 2013*. 2013.
48. Theodorescu D. Prostate Cancer: *Management of Localized Disease 2004*.
49. Lilja, H., D. Ulmert, and A.J. Vickers, Prostate-specific antigen and prostate cancer: prediction, detection and monitoring. *Nat Rev Cancer*, 2008. **8**(4): p. 268-78.
50. Prensner JR ve ark. Beyond PSA: the next generation of prostate cancer biomarkers. *Sci Transl Med*, 2012. **4**(127): p. 127rv3.
51. Gleason DF. Classification of prostatic carcinomas. *Cancer Chemother Rep*, 1966. **50**(3): p. 125-8.
52. Humphrey PA. Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate. *Mod Pathol*, 2004. **17**(3): p. 292-306.
53. Epstein JI. An update of the Gleason grading system. *J Urol*, 2010. **183**(2): p. 433-40.
54. Epstein JI ve ark. The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. *Am J Surg Pathol*, 2005. **29**(9): p. 1228-42.
55. Cheng L ve ark. Staging of prostate cancer. *Histopathology*, 2012. **60**(1): p. 87-117.
56. Edge SB ve Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol*, 2010. **17**(6): p. 1471-4.
57. Jemal A ve ark. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin*, 2010. **60**(5): p. 277-300.
58. Gleave ME ve ark. Information for men newly diagnosed with prostate cancer. *V. P. Centre*, 2009.
59. Association AU. *Guideline for the Management of Clinically Localized Prostate Cancer: 2007 Update*. American Urological Association Education and Research, Inc, 2007.
60. Heidenreich A ve ark. EAU guidelines on prostate cancer. part 1: screening, diagnosis, and local treatment with curative intent-update 2013. *Eur Urol*, 2014. **65**(1): p. 124-37.
61. Kelly K ve Yin JJ. Prostate cancer and metastasis initiating stem cells. *Cell Res*, 2008. **18**(5): p. 528-37.
62. Baca SC ve ark. Punctuated evolution of prostate cancer genomes. *Cell*, 2013. **153**(3): p. 666-77.
63. Barbieri CE ve ark. Exome sequencing identifies recurrent SPOP, FOXA1 and MED12 mutations in prostate cancer. *Nat Genet*, 2012. **44**(6): p. 685-9.

64. Berger MF ve ark. The genomic complexity of primary human prostate cancer. *Nature*, 2011. **470**(7333): p. 214-20.
65. Grasso CS ve ark. The mutational landscape of lethal castration-resistant prostate cancer. *Nature*, 2012. **487**(7406): p. 239-43.
66. Robinson D ve ark. Integrative clinical genomics of advanced prostate cancer. *Cell*, 2015. **161**(5): p. 1215-28.
67. Taylor BS ve ark. Integrative genomic profiling of human prostate cancer. *Cancer Cell*, 2010. **18**(1): p. 11-22.
68. Shen MM ve Abate-Shen C. Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges. *Genes Dev*, 2010. **24**(18): p. 1967-2000.
69. Bitting RL ve Armstrong AJ. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in castration-resistant prostate cancer. *Endocr Relat Cancer*, 2013. **20**(3): p. R83-99.
70. Friedlander TW ve ark. Common structural and epigenetic changes in the genome of castration-resistant prostate cancer. *Cancer Res*, 2012. **72**(3): p. 616-25.
71. Huret JL ve ark. Atlas of genetics and cytogenetics in oncology and haematology in 2013. *Nucleic Acids Res*, 2013. **41**: p. D920-4.
72. Said R ve ark. P53 mutations in advanced cancers: clinical characteristics, outcomes, and correlation between progression-free survival and bevacizumab-containing therapy. *Oncotarget*, 2013. **4**(5): p. 705-14.
73. Tan MH ve ark. Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. *Acta Pharmacol Sin*, 2015. **36**(1): p. 3-23.
74. Yu J ve ark. An integrated network of androgen receptor, polycomb, and TMPRSS2-ERG gene fusions in prostate cancer progression. *Cancer Cell*, 2010. **17**(5): p. 443-54.
75. Lin B ve ark. Prostate-localized and androgen-regulated expression of the membrane-bound serine protease TMPRSS2. *Cancer Res*, 1999. **59**(17): p. 4180-4.
76. Demichelis F ve ark. TMPRSS2:ERG gene fusion associated with lethal prostate cancer in a watchful waiting cohort. *Oncogene*, 2007. **26**(31): p. 4596-9.
77. Kim JH ve ark. Integrative analysis of genomic aberrations associated with prostate cancer progression. *Cancer Res*, 2007. **67**(17): p. 8229-39.
78. Lapointe J ve ark. Genomic profiling reveals alternative genetic pathways of prostate tumorigenesis. *Cancer Res*, 2007. **67**(18): p. 8504-10.
79. Sun X ve ark. Genetic alterations in the PI3K pathway in prostate cancer. *Anticancer Res*, 2009. **29**(5): p. 1739-43.
80. Song MS ve ark. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012. **13**(5): p. 283-96.
81. Safran M ve ark. GeneCards Version 3: the human gene integrator. *Database (Oxford)*, 2010. **2010**: p. baq020.
82. Edwards SM ve ark. Two percent of men with early-onset prostate cancer harbor germline mutations in the BRCA2 gene. *Am J Hum Genet*, 2003. **72**(1): p. 1-12.
83. Ke XS ve ark. Genome-wide profiling of histone h3 lysine 4 and lysine 27 trimethylation reveals an epigenetic signature in prostate carcinogenesis. *PLoS One*, 2009. **4**(3): p. e4687.
84. Kobayashi Y ve ark. DNA methylation profiling reveals novel biomarkers and important roles for DNA methyltransferases in prostate cancer. *Genome Res*, 2011. **21**(7): p. 1017-27.

85. Kondo Y ve ark. Gene silencing in cancer by histone H3 lysine 27 trimethylation independent of promoter DNA methylation. *Nat Genet*, 2008. **40**(6): p. 741-50.
86. Nakayama M ve ark. GSTP1 CpG island hypermethylation as a molecular biomarker for prostate cancer. *J Cell Biochem*, 2004. **91**(3): p. 540-52.
87. Varambally S ve ark. The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature*, 2002. **419**(6907): p. 624-9.
88. Miyamoto HA ve ark. Androgen receptor in prostate cancer progression. *In Current Clinical Oncology*. 2008. p. 129-146.
89. Taplin ME ve Ho SM, Clinical review 134: The endocrinology of prostate cancer. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001. **86**(8): p. 3467-77.
90. Shen HC ve Coetzee GA. The androgen receptor: unlocking the secrets of its unique transactivation domain. *Vitam Horm*, 2005. **71**: p. 301-19.
91. Conn, PM ve Crowley WF Jr. Gonadotropin-releasing hormone and its analogs. *Annu Rev Med*, 1994. **45**: p. 391-405.
92. Askew EB ve ark. Modulation of androgen receptor activation function 2 by testosterone and dihydrotestosterone. *J Biol Chem*, 2007. **282**(35): p. 25801-16.
93. Isaacs JT ve ark. Androgen regulation of programmed death of normal and malignant prostatic cells. *J Androl*, 1992. **13**(6): p. 457-64.
94. Isaacs JT ve Isaacs WB. Androgen receptor outwits prostate cancer drugs. *Nat Med*, 2004. **10**(1): p. 26-7.
95. van Leenders GJ ve Schalken JA. Epithelial cell differentiation in the human prostate epithelium: implications for the pathogenesis and therapy of prostate cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2003. **46 Suppl**: p. S3-10.
96. Vander Griend DJ ve ark. Cell-autonomous intracellular androgen receptor signaling drives the growth of human prostate cancer initiating cells. *Prostate*, 2010. **70**(1): p. 90-9.
97. Maitland NJ ve ark. Prostate cancer stem cells: do they have a basal or luminal phenotype? *Horm Cancer*, 2011. **2**(1): p. 47-61.
98. Mirosevich J ve ark. Androgen receptor expression of proliferating basal and luminal cells in adult murine ventral prostate. *J Endocrinol*, 1999. **162**(3): p. 341-50.
99. Gelmann EP. Molecular biology of the androgen receptor. *J Clin Oncol*, 2002. **20**(13): p. 3001-15.
100. Heery DM ve ark. A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature*, 1997. **387**(6634): p. 733-6.
101. Claessens F ve ark. Diverse roles of androgen receptor (AR) domains in AR-mediated signaling. *Nucl Recept Signal*, 2008. **6**: p. e008.
102. Heinlein CA ve Chang C. Androgen receptor in prostate cancer. *Endocr Rev*, 2004. **25**(2): p. 276-308.
103. Jenster G ve ark. Identification of two transcription activation units in the N-terminal domain of the human androgen receptor. *J Biol Chem*, 1995. **270**(13): p. 7341-6.
104. Dehm SM ve ark. Selective role of an NH2-terminal WxxLF motif for aberrant androgen receptor activation in androgen depletion independent prostate cancer cells. *Cancer Res*, 2007. **67**(20): p. 10067-77.
105. Umesono K ve Evans RM, Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. *Cell*, 1989. **57**(7): p. 1139-46.

106. Ozanne DM ve ark. Androgen receptor nuclear translocation is facilitated by the f-actin cross-linking protein filamin. *Mol Endocrinol*, 2000. **14**(10): p. 1618-26.
107. Cano, LQ ve ark. Mini-review: Foldosome regulation of androgen receptor action in prostate cancer. *Mol Cell Endocrinol*, 2013. **369**(1-2): p. 52-62.
108. Jenster G ve ark. Domains of the human androgen receptor involved in steroid binding, transcriptional activation, and subcellular localization. *Mol Endocrinol*, 1991. **5**(10): p. 1396-404.
109. He B ve ark. Activation function 2 in the human androgen receptor ligand binding domain mediates interdomain communication with the NH(2)-terminal domain. *J Biol Chem*, 1999. **274**(52): p. 37219-25.
110. Cleutjens KB ve ark. Two androgen response regions cooperate in steroid hormone regulated activity of the prostate-specific antigen promoter. *J Biol Chem*, 1996. **271**(11): p. 6379-88.
111. Massie CE ve ark. The androgen receptor fuels prostate cancer by regulating central metabolism and biosynthesis. *EMBO J*, 2011. **30**(13): p. 2719-33.
112. Liao RS ve ark. Androgen receptor-mediated non-genomic regulation of prostate cancer cell proliferation. *Transl Androl Urol*, 2013. **2**(3): p. 187-96.
113. Migliaccio A ve ark. Steroid-induced androgen receptor-oestradiol receptor beta-Src complex triggers prostate cancer cell proliferation. *EMBO J*, 2000. **19**(20): p. 5406-17.
114. Sun M ve ark. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway by androgen through interaction of p85alpha, androgen receptor, and Src. *J Biol Chem*, 2003. **278**(44): p. 42992-3000.
115. Huggins C ve Hodges CV. Studies on prostatic cancer. I. The effect of castration, of estrogen and androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. *CA Cancer J Clin*, 1972. **22**(4): p. 232-40.
116. Harris WP ve ark. Androgen deprivation therapy: progress in understanding mechanisms of resistance and optimizing androgen depletion. *Nat Clin Pract Urol*, 2009. **6**(2): p. 76-85.
117. Klugo RC ve ark. Bilateral orchiectomy for carcinoma of prostate. Response of serum testosterone and clinical response to subsequent estrogen therapy. *Urology*, 1981. **17**(1): p. 49-50.
118. Labrie F ve ark. Science behind total androgen blockade: from gene to combination therapy. *Clin Invest Med*, 1993. **16**(6): p. 475-92.
119. Labrie F ve ark. Treatment of prostate cancer with gonadotropin-releasing hormone agonists. *Endocr Rev*, 1986. **7**(1): p. 67-74.
120. Kirby M ve ark. Crawford, Characterising the castration-resistant prostate cancer population: a systematic review. *Int J Clin Pract*, 2011. **65**(11): p. 1180-92.
121. de Bono JS ve ark. Abiraterone and increased survival in metastatic prostate cancer. *N Engl J Med*, 2011. **364**(21): p. 1995-2005.
122. (enzalutamide), XTANDI. Prescribing Information. 2014.
123. (enzalutamide), XTANDI. Summary of Product Characteristics. 2013.
124. Scher HI ve ark. Increased survival with enzalutamide in prostate cancer after chemotherapy. *N Engl J Med*, 2012. **367**(13): p. 1187-97.
125. Watson PA ve ark. Constitutively active androgen receptor splice variants expressed in castration-resistant prostate cancer require full-length androgen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(39): p. 16759-65.
126. Liu Y. Fatty acid oxidation is a dominant bioenergetic pathway in prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 2006. **9**(3): p. 230-4.

127. Munkley J ve ark. The role of glycans in the development and progression of prostate cancer. *Nat Rev Urol*, 2016. **13**(6): p. 324-33.
128. Segawa T ve ark. Androgen-induced expression of endoplasmic reticulum (ER) stress response genes in prostate cancer cells. *Oncogene*, 2002. **21**(57): p. 8749-58.
129. Sheng X ve ark. Divergent androgen regulation of unfolded protein response pathways drives prostate cancer. *EMBO Mol Med*, 2015. **7**(6): p. 788-801.
130. Suburu J ve Chen YQ. Lipids and prostate cancer. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2012. **98**(1-2): p. 1-10.
131. Swinnen JV ve ark. Androgens stimulate fatty acid synthase in the human prostate cancer cell line LNCaP. *Cancer Res*, 1997. **57**(6): p. 1086-90.
132. Swinnen JV ve ark. Coordinate regulation of lipogenic gene expression by androgens: evidence for a cascade mechanism involving sterol regulatory element binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(24): p. 12975-80.
133. Wu X ve ark. Lipid metabolism in prostate cancer. *Am J Clin Exp Urol*, 2014. **2**(2): p. 111-20.
134. Pourmand G ve ark. Role of PTEN gene in progression of prostate cancer. *Urol J*, 2007. **4**(2): p. 95-100.
135. Carver BS ve ark. Reciprocal feedback regulation of PI3K and androgen receptor signaling in PTEN-deficient prostate cancer. *Cancer Cell*, 2011. **19**(5): p. 575-86.
136. Munkley J ve ark. Androgen-regulation of the protein tyrosine phosphatase PTPRR activates ERK1/2 signalling in prostate cancer cells. *BMC Cancer*, 2015. **15**: p. 9.
137. Schutzman JL ve Martin GR. Sprouty genes function in suppression of prostate tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(49): p. 20023-8.
138. Yokoyama NN ve ark. Wnt signaling in castration-resistant prostate cancer: implications for therapy. *Am J Clin Exp Urol*, 2014. **2**(1): p. 27-44.
139. Mulholland DJ ve ark. The androgen receptor can promote beta-catenin nuclear translocation independently of adenomatous polyposis coli. *J Biol Chem*, 2002. **277**(20): p. 17933-43.
140. Truica, CI ve ark. Beta-catenin affects androgen receptor transcriptional activity and ligand specificity. *Cancer Res*, 2000. **60**(17): p. 4709-13.
141. Chen G ve ark. Up-regulation of Wnt-1 and beta-catenin production in patients with advanced metastatic prostate carcinoma: potential pathogenetic and prognostic implications. *Cancer*, 2004. **101**(6): p. 1345-56.
142. Rajan P ve ark. Next-generation sequencing of advanced prostate cancer treated with androgen-deprivation therapy. *Eur Urol*, 2014. **66**(1): p. 32-9.
143. Voeller H.J ve ark. Beta-catenin mutations in human prostate cancer. *Cancer Res*, 1998. **58**(12): p. 2520-3.
144. Hotte SJ ve Saad F. Current management of castrate-resistant prostate cancer. *Curr Oncol*, 2010. **17 Suppl 2**: p. S72-9.
145. Shaffer DR ve Scher HI. Prostate cancer: a dynamic illness with shifting targets. *Lancet Oncol*, 2003. **4**(7): p. 407-14.
146. Scher HI ve Sawyers CL. Biology of progressive, castration-resistant prostate cancer: directed therapies targeting the androgen-receptor signaling axis. *J Clin Oncol*, 2005. **23**(32): p. 8253-61.
147. Edwards J ve ark. Gene amplifications associated with the development of hormone-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 2003. **9**(14): p. 5271-81.

148. Barbieri CE ve ark. The mutational landscape of prostate cancer. *Eur Urol*, 2013. **64**(4): p. 567-76.
149. Azad AA ve ark. Androgen Receptor Gene Aberrations in Circulating Cell-Free DNA: Biomarkers of Therapeutic Resistance in Castration-Resistant Prostate Cancer. *Clin Cancer Res*, 2015. **21**(10): p. 2315-24.
150. Salvi S ve ark. Circulating cell-free AR and CYP17A1 copy number variations may associate with outcome of metastatic castration-resistant prostate cancer patients treated with abiraterone. *Br J Cancer*, 2015. **112**(10): p. 1717-24.
151. Shaffer DR ve ark. Circulating tumor cell analysis in patients with progressive castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 2007. **13**(7): p. 2023-9.
152. Wallen MJ ve ark. Androgen receptor gene mutations in hormone-refractory prostate cancer. *J Pathol*, 1999. **189**(4): p. 559-63.
153. Gottlieb B ve ark. The androgen receptor gene mutations database: 2012 update. *Hum Mutat*, 2012. **33**(5): p. 887-94.
154. Gaddipati JP ve ark. Frequent detection of codon 877 mutation in the androgen receptor gene in advanced prostate cancers. *Cancer Res*, 1994. **54**(11): p. 2861-4.
155. Steketee K ve ark. Broadened ligand responsiveness of androgen receptor mutants obtained by random amino acid substitution of H874 and mutation hot spot T877 in prostate cancer. *Int J Cancer*, 2002. **100**(3): p. 309-17.
156. Steinkamp MP ve ark. Treatment-dependent androgen receptor mutations in prostate cancer exploit multiple mechanisms to evade therapy. *Cancer Res*, 2009. **69**(10): p. 4434-42.
157. Hu R ve ark. Ligand-independent androgen receptor variants derived from splicing of cryptic exons signify hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res*, 2009. **69**(1): p. 16-22.
158. Sun S ve ark. Castration resistance in human prostate cancer is conferred by a frequently occurring androgen receptor splice variant. *J Clin Invest*, 2010. **120**(8): p. 2715-30.
159. Hu R ve ark. Distinct transcriptional programs mediated by the ligand-dependent full-length androgen receptor and its splice variants in castration-resistant prostate cancer. *Cancer Res*, 2012. **72**(14): p. 3457-62.
160. Li Y ve ark. Androgen receptor splice variants mediate enzalutamide resistance in castration-resistant prostate cancer cell lines. *Cancer Res*, 2013. **73**(2): p. 483-9.
161. Hornberg E ve ark. Expression of androgen receptor splice variants in prostate cancer bone metastases is associated with castration-resistance and short survival. *PLoS One*, 2011. **6**(4): p. e19059.
162. Antonarakis ES ve ark. AR-V7 and resistance to enzalutamide and abiraterone in prostate cancer. *N Engl J Med*, 2014. **371**(11): p. 1028-38.
163. Steinestel J ve ark. Detecting predictive androgen receptor modifications in circulating prostate cancer cells. *Oncotarget*, 2015.
164. Culig Z. Androgen Receptor Coactivators in Regulation of Growth and Differentiation in Prostate Cancer. *J Cell Physiol*, 2016. **231**(2): p. 270-4.
165. Comuzzi B ve ark. The androgen receptor co-activator CBP is up-regulated following androgen withdrawal and is highly expressed in advanced prostate cancer. *J Pathol*, 2004. **204**(2): p. 159-66.
166. Halkidou K ve ark. Expression of Tip60, an androgen receptor coactivator, and its role in prostate cancer development. *Oncogene*, 2003. **22**(16): p. 2466-77.

167. Heemers HV ve ark. Androgen deprivation increases p300 expression in prostate cancer cells. *Cancer Res*, 2007. **67**(7): p. 3422-30.
168. Debes JD ve ark. p300 mediates androgen-independent transactivation of the androgen receptor by interleukin 6. *Cancer Res*, 2002. **62**(20): p. 5632-6.
169. Shiota M ve ark. Tip60 promotes prostate cancer cell proliferation by translocation of androgen receptor into the nucleus. *Prostate*, 2010. **70**(5): p. 540-54.
170. Mostaghel EA ve ark. Impact of circulating cholesterol levels on growth and intratumoral androgen concentration of prostate tumors. *PLoS One*, 2012. **7**(1): p. e30062.
171. Hamid AR ve ark. Aldo-keto reductase family 1 member C3 (AKR1C3) is a biomarker and therapeutic target for castration-resistant prostate cancer. *Mol Med*, 2013. **18**: p. 1449-55.
172. Knuuttila M ve ark. Castration induces up-regulation of intratumoral androgen biosynthesis and androgen receptor expression in an orthotopic VCaP human prostate cancer xenograft model. *Am J Pathol*, 2014. **184**(8): p. 2163-73.
173. Kishimoto T. The biology of interleukin-6. *Blood*, 1989. **74**(1): p. 1-10.
174. Okamoto M ve ark. Autocrine effect of androgen on proliferation of an androgen responsive prostatic carcinoma cell line, LNCAP: role of interleukin-6. *Endocrinology*, 1997. **138**(11): p. 5071-4.
175. Culig Z ve ark. Interleukin-6 regulates androgen receptor activity and prostate cancer cell growth. *Mol Cell Endocrinol*, 2002. **197**(1-2): p. 231-8.
176. Hobisch A ve ark. Immunohistochemical localization of interleukin-6 and its receptor in benign, premalignant and malignant prostate tissue. *J Pathol*, 2000. **191**(3): p. 239-44.
177. Twillie DA ve ark. Interleukin-6: a candidate mediator of human prostate cancer morbidity. *Urology*, 1995. **45**(3): p. 542-9.
178. Chen T ve ark. Interleukin 6 activates androgen receptor-mediated gene expression through a signal transducer and activator of transcription 3-dependent pathway in LNCaP prostate cancer cells. *Cancer Res*, 2000. **60**(8): p. 2132-5.
179. Heinrich PC ve ark. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J*, 2003. **374**(Pt 1): p. 1-20.
180. Olayioye MA ve ark. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J*, 2000. **19**(13): p. 3159-67.
181. Slamon DJ ve ark. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*, 1989. **244**(4905): p. 707-12.
182. Signoretti S ve ark. Her-2-neu expression and progression toward androgen independence in human prostate cancer. *J Natl Cancer Inst*, 2000. **92**(23): p. 1918-25.
183. Wen Y ve ark. HER-2/neu promotes androgen-independent survival and growth of prostate cancer cells through the Akt pathway. *Cancer Res*, 2000. **60**(24): p. 6841-5.
184. Karin M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature*, 2006. **441**(7092): p. 431-6.
185. Zhang L ve ark. NF-kappaB regulates androgen receptor expression and prostate cancer growth. *Am J Pathol*, 2009. **175**(2): p. 489-99.
186. Amler LC ve ark. Dysregulated expression of androgen-responsive and nonresponsive genes in the androgen-independent prostate cancer xenograft model CWR22-R1. *Cancer Res*, 2000. **60**(21): p. 6134-41.

187. Nelson PS ve ark. The program of androgen-responsive genes in neoplastic prostate epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(18): p. 11890-5.
188. Wang Q ve ark. A hierarchical network of transcription factors governs androgen receptor-dependent prostate cancer growth. *Mol Cell*, 2007. **27**(3): p. 380-92.
189. Jalava SE ve ark. Androgen-regulated miR-32 targets BTG2 and is overexpressed in castration-resistant prostate cancer. *Oncogene*, 2012. **31**(41): p. 4460-71.
190. Kino T ve ark. Noncoding RNA gas5 is a growth arrest- and starvation-associated repressor of the glucocorticoid receptor. *Sci Signal*, 2010. **3**(107): p. ra8.
191. Henttu, P ve ark. Androgens up-regulate the human prostate-specific antigen messenger ribonucleic acid (mRNA), but down-regulate the prostatic acid phosphatase mRNA in the LNCaP cell line. *Endocrinology*, 1992. **130**(2): p. 766-72.
192. Li SS ve Sharief FS. The prostatic acid phosphatase (ACPP) gene is localized to human chromosome 3q21-q23. *Genomics*, 1993. **17**(3): p. 765-6.
193. Ulrix W ve ark. Identification of the phosphatidic acid phosphatase type 2a isozyme as an androgen-regulated gene in the human prostatic adenocarcinoma cell line LNCaP. *J Biol Chem*, 1998. **273**(8): p. 4660-5.
194. Lawrence MG ve ark. Clements, Kallikreins on steroids: structure, function, and hormonal regulation of prostate-specific antigen and the extended kallikrein locus. *Endocr Rev*, 2010. **31**(4): p. 407-46.
195. Roth-Kauffman M. Prostate cancer. *Clinician Reviews*, 2011. **21**: p. 28-34.
196. Simmons MN ve ark. A practical guide to prostate cancer diagnosis and management. *Cleve Clin J Med*, 2011. **78**(5): p. 321-31.
197. Selley S ve ark. Diagnosis, management and screening of early localised prostate cancer. *Health Technol Assess*, 1997. **1**(2): p. i, 1-96.
198. Thompson IM ve ark. Operating characteristics of prostate-specific antigen in men with an initial PSA level of 3.0 ng/ml or lower. *JAMA*, 2005. **294**(1): p. 66-70.
199. Thompson IM ve ark. Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level < or =4.0 ng per milliliter. *N Engl J Med*, 2004. **350**(22): p. 2239-46.
200. Hollenberg MD ve ark. Kallikreins and proteinase-mediated signaling: proteinase-activated receptors (PARs) and the pathophysiology of inflammatory diseases and cancer. *Biol Chem*, 2008. **389**(6): p. 643-51.
201. Lilja H. Biology of prostate-specific antigen. *Urology*, 2003. **62**(5 Suppl 1): p. 27-33.
202. Tomlins SA ve ark. Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science*, 2005. **310**(5748): p. 644-8.
203. Wang J ve ark. Expression of variant TMPRSS2/ERG fusion messenger RNAs is associated with aggressive prostate cancer. *Cancer Res*, 2006. **66**(17): p. 8347-51.
204. Crawford ED ve ark. Diagnostic performance of PCA3 to detect prostate cancer in men with increased prostate specific antigen: a prospective study of 1,962 cases. *J Urol*, 2012. **188**(5): p. 1726-31.

205. Schoenborn JR ve ark. Genomic profiling defines subtypes of prostate cancer with the potential for therapeutic stratification. *Clin Cancer Res*, 2013. **19**(15): p. 4058-66.
206. Vlaeminck-Guillem V ve ark. Urinary prostate cancer 3 test: toward the age of reason? *Urology*, 2010. **75**(2): p. 447-53.
207. Ponting CP ve Belgard TG. Transcribed dark matter: meaning or myth? *Hum Mol Genet*, 2010. **19**(R2): p. R162-8.
208. Kim ED ve Sung S. Long noncoding RNA: unveiling hidden layer of gene regulatory networks. *Trends Plant Sci*, 2012. **17**(1): p. 16-21.
209. Vasarainen H ve ark. Effects of prostate cancer screening on health-related quality of life: results of the Finnish arm of the European randomized screening trial (ERSPC). *Acta Oncol*, 2013. **52**(8): p. 1615-21.
210. Baum M. Screening for prostate cancer: can we learn from the mistakes of the breast screening experience? *Eur Urol*, 2013. **64**(4): p. 540-1.
211. Carter HB. Prostate-specific antigen-based screening for prostate cancer: the irony of it all. *Eur Urol*, 2013. **64**(5): p. 710-1; discussion 711-2.
212. Kilpelainen TP ve ark. Prostate cancer mortality in the Finnish randomized screening trial. *J Natl Cancer Inst*, 2013. **105**(10): p. 719-25.
213. Lippi G ve ark. Prostate-specific antigen for prostate cancer screening: a different strategy should be planned. *JAMA Intern Med*, 2013. **173**(5): p. 392.
214. Melnikow J ve ark. Counterpoint: Randomized trials provide the strongest evidence for clinical guidelines: The US Preventive Services Task Force and Prostate Cancer Screening. *Med Care*, 2013. **51**(4): p. 301-3.
215. Yang Y ve ark. Unveiling the hidden function of long non-coding RNA by identifying its major partner-protein. *Cell Biosci*, 2015. **5**: p. 59.
216. Chen LL ve Carmichael GG. Decoding the function of nuclear long non-coding RNAs. *Curr Opin Cell Biol*, 2010. **22**(3): p. 357-64.
217. Khorkova O ve ark. Basic biology and therapeutic implications of lncRNA. *Adv Drug Deliv Rev*, 2015. **87**: p. 15-24.
218. Di W ve ark. The long non-coding RNA HOTAIR promotes thyroid cancer cell growth, invasion and migration through the miR-1-CCND2 axis. *Am J Cancer Res*, 2017. **7**(6): p. 1298-1309.
219. Gupta RA ve ark. Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. *Nature*, 2010. **464**(7291): p. 1071-6.
220. Hajjari M ve Salavaty A. HOTAIR: an oncogenic long non-coding RNA in different cancers. *Cancer Biol Med*, 2015. **12**(1): p. 1-9.
221. Rinn JL ve ark. Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell*, 2007. **129**(7): p. 1311-23.
222. Tsai MC ve ark. Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes. *Science*, 2010. **329**(5992): p. 689-93.
223. Gibb EA ve ark. The functional role of long non-coding RNA in human carcinomas. *Mol Cancer*, 2011. **10**: p. 38.
224. Wilusz JE ve ark. 3' end processing of a long nuclear-retained noncoding RNA yields a tRNA-like cytoplasmic RNA. *Cell*, 2008. **135**(5): p. 919-32.
225. Du Z ve ark. Integrative genomic analyses reveal clinically relevant long noncoding RNAs in human cancer. *Nat Struct Mol Biol*, 2013. **20**(7): p. 908-13.
226. Hu CC ve ark. Identification of prostate cancer lncRNAs by RNA-Seq. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014. **15**(21): p. 9439-44.

227. Clarke RA ve ark. New genomic structure for prostate cancer specific gene PCA3 within BMCC1: implications for prostate cancer detection and progression. *PLoS One*, 2009. **4**(3): p. e4995.
228. Zhou W ve ark. Association of short tandem repeat polymorphism in the promoter of prostate cancer antigen 3 gene with the risk of prostate cancer. *PLoS One*, 2011. **6**(5): p. e20378.
229. Salameh A ve ark. PRUNE2 is a human prostate cancer suppressor regulated by the intronic long noncoding RNA PCA3. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015. **112**(27): p. 8403-8.
230. Tiryakioğlu D ve ark. miR-141 and miR-375 induction and release are different from PSA mRNA and PCA3 upon androgen stimulation of LNCaP cells. *Biomed Rep*, 2013. **1**(5): p. 802-806.
231. Stettner M ve ark. The relevance of estrogen receptor-beta expression to the antiproliferative effects observed with histone deacetylase inhibitors and phytoestrogens in prostate cancer treatment. *Mol Cancer Ther*, 2007. **6**(10): p. 2626-33.
232. Groskopf J ve ark. APTIMA PCA3 molecular urine test: development of a method to aid in the diagnosis of prostate cancer. *Clin Chem*, 2006. **52**(6): p. 1089-95.
233. Haese A ve ark. Clinical utility of the PCA3 urine assay in European men scheduled for repeat biopsy. *Eur Urol*, 2008. **54**(5): p. 1081-8.
234. Nakanishi H ve ark. PCA3 molecular urine assay correlates with prostate cancer tumor volume: implication in selecting candidates for active surveillance. *J Urol*, 2008. **179**(5): p. 1804-9; discussion 1809-10.
235. Marks LS ve ark. PCA3 molecular urine assay for prostate cancer in men undergoing repeat biopsy. *Urology*, 2007. **69**(3): p. 532-5.
236. Yang L ve ark. lncRNA-dependent mechanisms of androgen-receptor-regulated gene activation programs. *Nature*, 2013. **500**(7464): p. 598-602.
237. Prensner JR ve ark. The lncRNAs PCGEM1 and PRNCR1 are not implicated in castration resistant prostate cancer. *Oncotarget*, 2014. **5**(6): p. 1434-8.
238. Parolia A ve ark. The long non-coding RNA PCGEM1 is regulated by androgen receptor activity in vivo. *Mol Cancer*, 2015. **14**: p. 46.
239. Srikantan V ve ark. PCGEM1, a prostate-specific gene, is overexpressed in prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(22): p. 12216-21.
240. Hung CL ve ark. A long noncoding RNA connects c-Myc to tumor metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014. **111**(52): p. 18697-702.
241. Chung S ve ark. Association of a novel long non-coding RNA in 8q24 with prostate cancer susceptibility. *Cancer Sci*, 2011. **102**(1): p. 245-52.
242. Horoszewicz JS ve ark. The LNCaP cell line--a new model for studies on human prostatic carcinoma. *Prog Clin Biol Res*, 1980. **37**: p. 115-32.
243. Roy AK ve ark. Regulation of androgen action. *Vitam Horm*, 1999. **55**: p. 309-52.
244. Merseburger AS ve ark. Pathophysiology and therapy of castration-resistant prostate cancer. *Urologe A*, 2013. **52**(2): p. 219-25.
245. Sternberg CN ve ark. *Progress in the treatment of advanced prostate cancer*. Am Soc Clin Oncol Educ Book, 2014: p. 117-31.
246. Guerrero J ve ark. Enzalutamide, an androgen receptor signaling inhibitor, induces tumor regression in a mouse model of castration-resistant prostate cancer. *Prostate*, 2013. **73**(12): p. 1291-305.

247. Graham L ve Schweizer MT. Targeting persistent androgen receptor signaling in castration-resistant prostate cancer. *Med Oncol*, 2016. **33**(5): p. 44.
248. Hansen J ve ark. Initial prostate biopsy: development and internal validation of a biopsy-specific nomogram based on the prostate cancer antigen 3 assay. *Eur Urol*, 2013. **63**(2): p. 201-9.
249. Verhaegh GW ve ark. Isolation and characterization of the promoter of the human prostate cancer-specific DD3 gene. *J Biol Chem*, 2000. **275**(48): p. 37496-503.
250. Schalken J. Interview with Jack Schalken. PCA3 and its use as a diagnostic test in prostate cancer. Interview by Christine McKillop. *Eur Urol*, 2006. **50**(1): p. 153-4.
251. Brasso K ve ark. Enzalutamide Antitumour Activity Against Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer Previously Treated with Docetaxel and Abiraterone: A Multicentre Analysis. *Eur Urol*, 2015. **68**(2): p. 317-24.
252. Penson DF ve ark. Enzalutamide Versus Bicalutamide in Castration-Resistant Prostate Cancer: The STRIVE Trial. *J Clin Oncol*, 2016. **34**(18): p. 2098-106.
253. Lin TH ve ark. Differential androgen deprivation therapies with anti-androgens casodex/bicalutamide or MDV3100/Enzalutamide versus anti-androgen receptor ASC-J9(R) Lead to promotion versus suppression of prostate cancer metastasis. *J Biol Chem*, 2013. **288**(27): p. 19359-69.
254. Kregel S ve ark. Acquired resistance to the second-generation androgen receptor antagonist enzalutamide in castration-resistant prostate cancer. *Oncotarget*, 2016. **7**(18): p. 26259-74.
255. Cunningham D ve You Z. In vitro and in vivo model systems used in prostate cancer research. *J Biol Methods*, 2015. **2**(1).
256. Liu C ve ark. Inhibition of constitutively active Stat3 reverses enzalutamide resistance in LNCaP derivative prostate cancer cells. *Prostate*, 2014. **74**(2): p. 201-9.
257. Syvala H ve ark. Additive inhibitory effects of simvastatin and enzalutamide on androgen-sensitive LNCaP and VCaP prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016. **481**(1-2): p. 46-50.
258. Lemos AE ve ark. PCA3 long noncoding RNA modulates the expression of key cancer-related genes in LNCaP prostate cancer cells. *Tumour Biol*, 2016. **37**(8): p. 11339-48.