

← Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .



← Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

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

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**PROSTAT KANSERİ HÜCRELERİNDEN mikroRNA
SALINIMININ IN VITRO KARAKTERİZASYONU**

ZEYNEP DUYGU TIRYAKIOĞLU

**DANIŞMAN
PROF. DR. UĞUR GEZER**

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


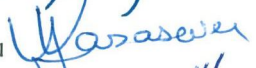



İSTANBUL-2015

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı Onkolojik Biyoloji ve İmmünoloji Programında Zeynep Duygu TİRYAKİOĞLU tarafından hazırlanan Prostat Kanseri Hücrelerinden mikroRNA Salınımının İn Vitro Karakterizasyonu başlıklı Yüksek Lisans tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

15 / 05 / 2015

Tez Sınav Jürisi

<u>Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)</u>	<u>İmzası</u>
1.Prof.Dr.Nejat DALAY/İ.Ü.Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı	
2. Prof.Dr.Vildan YASASEVER/İ.Ü.Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı	
3.Prof.Dr.Derya DURANYILDIZ/İ.Ü.Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı	
4.Prof.Dr.Uğur GEZER/İ.Ü.Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı/Danışman	
5.Y.Doç.Dr.Nagehan ERSOY TUNALI/Haliç Üniv.Fen Edebiyat Fak.Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü	

BEYAN

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

Zeynep Duygu Tiryakioğlu



İTHAF

Anneannem Süheyla Çakır ve dedem Lütfi Çakır'a ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Müdürü Sayın Prof. Dr. Ahmet Kizir'e,
Anabilim Dalı Başkanımız ve değerli hocamız Sayın Prof. Dr. Nejat Dalay'a,

Yüksek lisans eğitimim boyunca kendisinden pek çok şey öğrendiğim,
emeklerinin karşılığını asla ödeyemeyeceğim kıymetli hocam ve tez danışmanım Sayın
Prof. Dr. Uğur Gezer'e,

Değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Vildan Yasasever, Prof. Dr. Hülya Yazıcı
Özbek, Doç. Dr. Semra Demokan, Prof. Dr. Derya Duranyıldız ve Prof. Dr. Canan
Alatlı'ya,

Tecrübelerinden faydalandığım Dr. Ebru Esin Yörüker, Dr. Mustafa Işın, Uzman
Biyolog Zübeyde Yalnız Kayım ve Türkan Feradoğlu'na,

Mukaddes Avşar, Ufuk Mert, Emre Özgür, Müge Kovancılar ve Merve
Çetinkaya başta olmak üzere tüm çalışma arkadaşlarıma,

Tez çalışmam sürecinde yönlendirici olan İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri
Enstitüsü'ne,

Hiçbir zaman desteklerini esirgemeyen annem Alev Tiryakioğlu ve babam
Ahmet Tiryakioğlu'na,

En yakın arkadaşım, sevgili eşim Ozan Tiryakioğlu'na,

Her zaman kendisinden güç aldığım canım annem Dilek Çakır Umar'a teşekkür
ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
desteklenmiştir. Proje No: 28508

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN	İİİ
İTHAF	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ	Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	X
ÖZET.....	Xİ
ABSTRACT.....	Xİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Prostat Bezi	3
2.2. Prostat Kanseri.....	4
2.3. Prostat Kanserinde Moleküler Mekanizmalar.....	5
2.4. Prostat Kanserinde Androjen Reseptörü ve Androjenlerin Rolü	8
2.4.1. Androjen Reseptörü Aktivasyonu.....	9
2.5. Prostat Kanserinde Tümör Belirteci Olarak Öne Çıkan Biyomoleküller	11
2.5.1. Prostat Spesifik Antijen.....	11
2.6. Kodlama Yapmayan RNA'lar	12
2.6.1. Prostat Kanseri Antijeni 3	12
2.6.2. mikroRNA'lar	14
2.6.3. mikroRNA'ların Biyogenezi	15
2.7. Prostat Kanserinde mikroRNA'ların Rolü.....	16
2.7.1. Prostat Kanserinde mikroRNA'ların Androjen ve Androjen Reseptörü ile İlişkisi.....	17
2.7.2. Dolaşıma Katılan mikroRNA'lar	18
2.7.3. miR-141 ve miR-375.....	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	21
3.1. Materyal	21

3.2. Kimyasal Maddeler ve Yardımcı Ekipmanlar	21
3.3. Kullanılan Cihazlar	22
3.4. Yöntem	23
3.4.1. Hücrelerin Kültüre Alınması	23
3.4.2. Hücre Kültürü	23
3.4.3. Hücrelerin Androjen ile Muamelesi	24
3.4.4. Hücre ve Kültür Besiyerlerinden RNA İzolasyonu	25
3.4.5. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi	25
3.4.6. Nicel Gerçek Zamanlı PZR	27
3.4.7. İstatiksel Analizler	31
4. BULGULAR	32
4.1. Androjen ile Muamele Sonrasında Hücrelerden ve Besiyerlerinden Çoğaltılan Moleküllerin Uzunluk Analizleri	32
4.2. Nicel Gerçek Zamanlı PZR ile Çoğaltılan Moleküllerin Çoğalma Eğrileri ve Erime Eğrisi Analizleri	34
4.3. miR-141, miR-375, PSA ve PCA3 Moleküllerinin DHT Dozlarına Bağlı İfade ve Hücre Dışına Salınım Seviyelerinin Analizi	37
5. TARTIŞMA	43
KAYNAKLAR	47
ÖZGEÇMİŞ	59

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 3-1: RNA'dan cDNA sentez reaksiyonu bileşenleri.....	27
Tablo 3-2: PZR'de kullanılan primer dizileri.....	28
Tablo 3-3: miRNA'ların analizinde örnek başına kullanılan reaksiyon bileşenleri	29
Tablo 3-4: PCA3 ve PSA analizinde örnek başına kullanılan reaksiyon bileşenleri	29
Tablo 3-5: miR-141 ve miR-375 analizlerinde uygulanan PZR koşulları	30
Tablo 3-6: PSA ve PCA3 analizlerinde uygulanan PZR koşulları	30
Tablo 4-1: miR-141, miR-375, PSA mRNA ve PCA3 moleküllerinin LNCaP hücrelerinde göreceli ifade düzeyleri	38
Tablo 4-2: miR-141, miR-375, PSA ve PCA3 moleküllerinin hücre kültürü besiyerinde göreceli miktarları	39

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: AR aktivasyonu.....	10
Şekil 2-2: miRNA biyogenezi.....	16
Şekil 3-1: miRNA'lardan cDNA sentez şeması	26
Şekil 4-1: Hücre ve besiyerlerinden elde edilerek çoğaltılan miR-141 molekülünün büyüklük analizi.....	33
Şekil 4-2: Hücre ve besiyerlerinden elde edilerek çoğaltılan miR-375 molekülünün büyüklük analizi.....	33
Şekil 4-3: PCA3 molekülüne ait PZR ürünlerinin büyüklük analizi.....	34
Şekil 4-4: PSA molekülüne ait PZR ürünlerinin büyüklük analizi.....	34
Şekil 4-5: DHT ile muamele edilen LNCaP hücrelerinde miR-375 molekülünün çoğalma eğrileri.....	35
Şekil 4-6: DHT ile muamele edilen LNCaP hücrelerinde miR-141 molekülünün çoğalma eğrileri.....	35
Şekil 4-7: DHT ile muamele edilen LNCaP hücrelerinde PCA3 çoğalma eğrileri	36
Şekil 4-8: DHT ile muamele edilen LNCaP hücrelerinde PSA mRNA çoğalma eğrileri	36
Şekil 4-9: LNCaP hücrelerinden çoğaltılan miRNA moleküllerine özgü erime tepeleri.....	37
Şekil 4-10: Kültür besiyerlerinden çoğaltılan PSA ve PCA3 moleküllerine özgü erime tepeleri	37
Şekil 4-11: DHT ile muamele edilen LNCaP hücrelerinde miR-141 ifade seviyesi ve hücreden salınımındaki değişimler.....	40
Şekil 4-12: DHT ile muamele edilen LNCaP hücrelerinde miR-375 ifade seviyesi ve hücreden salınımındaki değişimler.....	41
Şekil 4-13: DHT ile muamele edilen LNCaP hücrelerinde PCA3 ifade seviyesi ve hücreden salınımındaki değişimler.....	42
Şekil 4-14: DHT ile muamele edilen LNCaP hücrelerinde PSA (mRNA) ifade seviyesi ve hücreden salınımındaki değişimler.....	42

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

- AR: Androjen reseptörü
ARE: Androjen reseptörü cevap elementi
Bç: Baz çifti
BPH: İyi huylu prostat hiperplazisi
Ct: Eşik döngüsü
DHT: Dihidrotestosteron
EMT: Epitelden mezenkimale geçiş
ER: Östrojen reseptörü
GAPDH: Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz
HSP: Isı şok proteini
kb: Kilobaz
kDa: Kilodalton
lncRNA: Uzun kodlama yapmayan RNA
LRHR: Lüteinize edici hormon salgılatıcı hormon
miRNA: mikroRNA
mRNA: Mesajcı RNA
nM: Nanomolar
PAP: Prostatik asit fosfataz
PCA3: Prostat kanseri antijen 3
PKa: Prostat kanseri
PSA: Prostat spesifik antijen
PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu
RISC: RNA indüklü susturucu kompleks
RNaz: Ribonükleaz
UTR: Çevrimi yapılmayan bölge

ÖZET

Tiryakioğlu ZD. Prostat Kanseri Hücrelerinden mikroRNA Salınımının in vitro Karakterizasyonu. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Temel Onkoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2015.

Gelişimi ve ilerleyebilmesi için androjenlere bağımlı bir malignite olan prostat kanserinde (PKa), hastaların tanı ve takibinde kullanılan belirteçlerin sınırlı özgüllük ve duyarlılığa sahip olması yeni biyobelirteçlerin gereksinimini doğurmuştur. Özgüllükleri ve kandaki kararlılıkları nedeniyle biyobelirteç adayı olarak öne çıkan mikroRNA'lardan (miRNA'lar) miR-141 ve miR-375'in artmış plazma düzeylerinin ileri evre/metastatik PKa ile ilişkisi olabileceği güncel çalışmalarda bildirilmektedir. Bu noktadan hareketle tez çalışmasında, miR-141 ve miR-375 ifadelerinin düzenlenmesinde ve hücre dışına salınımlarında androjenin etkisi incelenmiştir. Bu iki moleküle ilaveten, androjenler tarafından düzenlendiği bilinen moleküller olan “prostat spesifik antijen” (PSA) mRNA ve “prostat kanseri antijen 3” (PCA3) karşılaştırma molekülleri olarak incelendi. Bu amaçla, metastatik PKa soyu olan LNCaP hücreleri, androjenlerden arındırılmış besiyerinde çoğaltılmalarını takiben 24 saat süresince 0, 1, 10, 100 nM 5 α -dihidrotestosteron (DHT) ile muamele edildiler. Hücrelerden ve kültür besiyerinden tüm RNA izole edilip cDNA'ya çevrilerek gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonunda, miR-141 ve miR-375 moleküllerinin miktar tayini yapıldı. Tez bulguları, DHT etkisinin moleküller arasında farklılık gösterdiğini ortaya koymaktadır. LNCaP hücrelerinin androjenle muamelesi, miR-141 ve miR-375 ifadesini kontrol hücrelerine göre ortalama 1,5 kat (p=0,07) arttırırken, PSA ve PCA3 üzerindeki etki çok daha belirgindi. Doza bağılı olarak PSA mRNA düzeylerinde 14-30 kat, PCA3 düzeylerinde ise 200 kata kadar artış saptandı (p<0,001). Moleküllerin hücre dışına salınımları, PCA3 dışında, hücrel androjen uyarılarına benzer bulundu. DHT muamelesi, hücrelerden besiyerine yüksek düzeyde (9-12 kat) PSA mRNA salınımını sağlarken, miR-141 salınımı 1,7 ve miR-375 salınımı 1,4 kat artmıştır. Besiyerinde PCA3 ölçülebilir düzeyde saptanamamıştır. Çalışmanın deneysel sonuçları, miR-141 ve miR-375'in androjen tarafından düzenlenmesinin, PSA ve PCA3'e göre farklılık gösterebileceğini ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler: Prostat kanseri, mikroRNA, androjen, hücre kültürü, biyobelirteç

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 28508

ABSTRACT

Tiryakioğlu ZD. In vitro Characterization of microRNA Release from Prostate Cancer Cells. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Basic Oncology. MSc Thesis. İstanbul. 2015.

The limited specificity and sensitivity of biomarkers used in prostate cancer (PCa) necessitates the need for novel biomarkers. MicroRNAs (miRNAs) are promising cancer biomarkers due to their specificity and stability in blood circulation. Recent data reveals an association of increased plasma levels of miR-141 and miR-375 with advanced/metastatic PCa. Based on these findings, in this thesis the effect of androgens on the expression and release of miR-141 and miR-375 was investigated. Additionally, two androgen-regulated molecules, prostate specific antigen (PSA) mRNA and prostate cancer antigen 3 (PCA3) were also investigated. LNCaP cells were proliferated in androgen-depleted medium and treated with 0, 1, 10 and 100 nM of 5 α -dihydrotestosterone (DHT) for 24 hours. Following the whole RNA extraction and cDNA synthesis, all molecules were quantified by real time polymerase chain reaction. The findings indicate a variable effect of DHT on the individual molecules. Compared to untreated cells, androgen treatment of cells increased the expression of miR-141 and miR-375 by 1.5 fold ($p=0.07$), while the effect was more pronounced for PSA and PCA3. In a dose-dependent manner, PSA levels increased 14-30 fold and PCA3 up to approximately 200 fold ($p<0.001$). The release of molecules from cells was similar to their cellular DHT induction except for PCA3. DHT treatment resulted in high PSA-mRNA release (9-12 fold), while miR-141 and miR-375 release was increased 1.7 and 1.4 fold respectively. PCA3 was not at detectable levels in medium. The results suggest a differential androgen regulation of miR-141 and miR-375 than PSA and PCA3.

Key Words: Prostate cancer, microRNA, androgen, cell culture, biomarker

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No: 28508

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Prostat kanseri erkeklerde akciğer kanserinden sonra en sık görülen kanser tipi olup, kansere bağlı ölümlerde altıncı sırada yer almaktadır (1). Lokalize prostat kanserinde cerrahi girişim veya radyasyon terapisi ile yüksek sağkalım elde edilirken, orta ve yüksek riskli hastalar ile metastatik hastalıkta temel tedavi androjen ablasyonu. Androjen ablasyonu hastalıkta gerileme sağlayabilse de genellikle 18-24 ay sonra artmış tümör hacmi ve yeni metastatik yayılımlarla karakterize olan ve ölümcül fenotipi oluşturan androjen-bağımsız prostat kanseri gelişebilmektedir (2). Bu nedenle prostat kanserinin erken evrede teşhis edilmesi gerekmektedir.

Prostat kanseri androjen bağımlı bir kanser tipi olup, gelişimi ve ilerleyebilmesi için androjenlere ihtiyaç duyar. Androjenler, androjen reseptörlerine (AR) bağlandığında, reseptörler dimerize olup aktifleşerek prostat ve prostat kanseriyle ilişkili olduğu belirlenmiş pek çok genin ifadesini düzenlerler (3, 4). İfadesinin AR'lerce düzenlendiği bilinen moleküllerden biri olan PSA'nın prostat kanseri varlığında kandaki seviyesi yükselmektedir. Günümüzde PSA, prostat kanseri tanı ve takibinde bir biyobelirteç olarak rektal muayene ile birlikte kullanılmaktadır. PSA molekülü, prostat dokusuna özgü olduğu halde prostat kanserine özgü değildir ve iyi huylu prostat hiperplazisi (BPH), enfeksiyon hastalıkları gibi nedenlerle de dolaşımdaki seviyesi yükselebilmektedir (5, 6). Bu nedenle prostat kanserinde yeni biyobelirteç arayışlarına girilmiştir.

miRNA'lar, yaklaşık 22 nükleotit uzunluğunda, proteine çevrilmeyen kısa RNA molekülleridir (7). Birçok çalışmada miRNA'ların kanser ile ilişkisi gösterilmiştir. Doku özgüllükleri, kanser varlığında ifade seviyelerinin değişmesi, stabil yapıları ve vücut sıvılarından yeterli miktarda elde edilebilmeleri sebebiyle miRNA'lar biyobelirteç adayları olarak araştırılmaktadır.

Güncel çalışmalar miR-141 ve miR-375 moleküllerinin artmış plazma düzeylerinin ileri evre/metastatik prostat kanseri ile ilişkili olduğunu ortaya koymaktadır (8-12). Tez çalışması *in vitro* koşullarda gerçekleştirilerek, miR-141 ve miR-375 ifadelerinin düzenlenmesinde ve hücre dışına salınımlarında androjenin etkisini araştırmayı amaçlamıştır. Bu iki moleküle ek olarak, androjenler tarafından düzenlendiği bilinen moleküller olan PSA (mRNA düzeyinde) ve bir uzun kodlama

yapmayan RNA (lncRNA) olan PCA3'ün de ifade ve hücre dışına salınım seviyeleri incelenecektir. Model hücre sistemi olarak AR anlatımı yapan LNCaP hücreleri kullanılacaktır.

Çalışma sonucunda elde edilen bulguların, miR-141 ve miR-375'in prostat kanserindeki önemi konusunda yararlı veriler oluşturulabileceği ve moleküllerin klinik yararlılığı teyit edildiğinde, hastalığın belirlenmesi ve tedavi takibinde PSA'nın özgüllüğüne katkıda bulunabilecekleri düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Prostat Bezi

Prostat, erkek vücudunda mesanenin hemen altında yerleşmiş, semen üretimiyle görevli fibroglandüler bir organdır. Yapısal olarak ön kısımda dar, arka kısımda genişir ve içinden prostatik idrar yolu ile spermi idrar yoluna ileten kanallar geçmektedir (13). Büyüme ve gelişmesi için androjen varlığına ihtiyaç duyan prostat, ergenlik dönemiyle birlikte işlevsellik kazanır ve 25-30 yaşlarındaki yetişkin erkeklerde yaklaşık 20 gram ağırlığa ulaşır (14).

Daha eski çalışmalarda, deney hayvanlarıyla yapılan analogilerle birçok araştırmacı tarafından prostatın farklı anatomik loblardan oluştuğu düşünülürken, bezin işlevsel ve histolojik özelliklerine göre işlevsel prostat bölgeleri kavramının öne sürülmesiyle anatomik bölge yapıları düşüncesi önemini kaybederek, yerini daha güncel ve daha kabul görmekte olan işlevsel bölgeler kavramına bırakmıştır (14). Bu kavrama göre idrar yolu temel anatomik referans noktası olarak alındığında, prostatta histolojik ve biyolojik olarak farklı üç temel bölge bulunmaktadır: Yan ve arkada periferik bölge, tabanda merkezi bölge ve idrar yolu boyunca bulunan geçiş bölgesi (15, 16). Prostatın glandüler olmayan bölgeleri çoğunlukla orta kısımda yoğunlaşmıştır (15). Preprostatik sfinkter ve ön fibromusküler bölgeler salgı dokusu içermezken prostat hacminin yaklaşık %28'ini oluşturan merkez bölge, yoğun miktarda salgı keseciği içermektedir ve göreceli olarak kanser ile diğer hastalıklara karşı dirençlidir (15, 17). Geçiş bölgesi, sağlıklı prostatta çok küçük olup genç erkeklerde glandüler dokunun sadece %5 kadarını içerir. Yaşa bağlı olarak gelişen BPH, geçiş bölgesi kaynaklıdır ve nadiren adenokarsinom oluşturur (14, 15, 17). Periferik bölge çok sayıda salgı keseciği bulundururken, prostatın tepe kısmı ve kapsül yakınındaki arka kısmında bulunan glandüler dokunun tamamını içerir. Bu bölgede diğer bölgelere nazaran kronik prostatitis ve postenflamatuar atrofi daha sık görülürken prostat kanserinin de gelişme ihtimalinin en fazla olduğu bölgedir (14, 17).

Prostat daha küçük ölçekte, bölgeye göre değişen miktarlarda kanallar, salgı bezleri ve düz kas hücreleri içeren bağ dokudan oluşmaktadır. Hem kanallar hem de salgı kesecikleri, üstte lümenal sekretuar kolumnar hücre tabakası ve altta bazal hücre tabakası olmak üzere iki katlı hücre tabakasıyla çevrilidir. İyi farklılaşmış (Gleason

skoru 1-2) olan prostat kanseri hücrelerinde bazal hücre tabakası yok olmakta ve sadece lümenal hücrelerce çevrelenmiş yapılar oluşmaktadır (14, 15). Öte yandan normal histolojiden sık görülen sapmalar arasında olan postenflamatuar atrofi, bazal hücre hiperplazisi, iyi huylu nodüler hiperplazi, atipik adenomatöz hiperplazi benzeri durumlar biyopsi materyalinde karsinom ile karıştırılabilmektedir (15).

2.2. Prostat Kanseri

Prostat kanseri erkeklerde dünya genelinde akciğer kanserinden sonra ikinci en sık görülen kanser tipi olup, kansere bağlı ölümlerde altıncı sırada yer almaktadır. Görülme sıklığı ve ölüm oranında dünya genelinde çok büyük değişkenlik göstermesine karşın prostat kanseri vakalarının ve prostat kanserine bağlı ölümlerin yarıdan fazlası gelişmiş ülkelerde görülmektedir. Buna karşın prostat kanseri etyolojisinde yegane belirlenebilmiş risk faktörleri ileri yaş, siyahi etnik köken ve hastalığın ailedeki hikayesidir (1, 18, 19).

Çoğunlukla birden fazla odak halinde görülen bir adenokarsinom olan prostat kanseri, ağırlıklı olarak periferik bölge (%70), daha nadir olarak da merkezi bölge (%15-20) ve geçiş bölgesi (%10-15) kaynaklıdır (20). Prostat kanseri yayılımında bölgesel lenf bezlerine lenfatik yolla metastaz, hematojen yayılımdan önce olmaktadır ve sıklıkla obturator lenf bezleri tutulmaktadır. En sık görülen hematojen yayılım ise kemik metastazları şeklindedir ve çoğunlukla pelvis, kaburgalar ve omurgaya metastaz gerçekleşmektedir. Kemik metastazları sıklıkla osteoblastik (kemik oluşturucu) olmakla birlikte, daha nadir olarak osteoklastik (kemik yıkıcı) şekilde de olabilmektedir (21).

Prostat kanseri hücreleri yavaş bölünen hücrelerdir. Bu nedenle hastalık uzun süre herhangi bir semptom vermeden gelişebilmekte ve bu süre zarfında metastatik hale geçebilmektedir. Oluşan semptomların büyük kısmı metastaz kaynaklı olduğundan, teşhis koyulduğunda hastaların çoğunda ileri evre metastatik prostat kanseri gelişmiş olmaktadır (21).

Günümüzde prostat kanserinin belirlenmesinde rektal muayene ve dokuya özgü bir biyokimyasal belirteç olan PSA'nın serumda miktarının tayini yöntemlerinden yararlanılmaktadır. Prostat tümörleri sıklıkla prostatın periferik bölgesinden kaynaklanmaktadır ve rektal muayene ile normal prostat dokusu dışındaki oluşumların belirlenebilmesi mümkündür. Ancak tek başına rektal muayene sonucu tümör varlığını kesin olarak ortaya koyamayacağı gibi, herhangi bir oluşumun belirlenmemesi de

kanser gelişmediği anlamına gelmemektedir. Öte yandan semenin sıvılaşmasını sağlamakla görevli bir proteaz olan PSA, prostata özgü bir molekül olduğu halde prostat kanserine özgü değildir. Tümör varlığında artmış miktarda kana salınan PSA; çoğunlukla prostat hücrelerinin sayıca anormal artışı (hiperplazi) olarak kendini gösteren BPH, prostat biyopsisi ve uzun süre yatalak kalma gibi durumlarda da yine artmış miktarda kana salınabilmektedir. Buna karşın prostat kanserli hastaların %30-40'ında normal seviyelerde de bulunabilmektedir. Değerlendirme açısından önemli olan bu yöntemler hastalığın tanısında yetersiz kaldığından prostat kanserinde kesin tanı, girişimsel bir yöntem olan transrektal ultrason eşliğinde alınan iğne biyopsisi ile konmaktadır. Prostat kanseri için biyopsi yapmadan kesin tanı koyabilecek yeterli bir radyolojik yöntem bulunmamaktadır (20, 22).

Tümörün davranışını belirlemede en önemli kriterler tümör büyüklüğü ve hücrelerin farklılaşma dereceleridir (20). Histolojik olarak prostat kanseri hücrelerinin farklılaşma derecelerinin sınıflandırılmasında Gleason Sistemi kullanılmaktadır. Bu sistemde, tümör dokusunu oluşturan heterojen yapıdaki hücreleri tanımlamak için karsinoma iki rakamsal değer atanır. Birinci rakam farklılaşmış hücrelerdeki baskın hücre tipini tanımlarken, ikinci rakam ikincil baskın hücre tipini tanımlamaktadır ve bu iki rakamın toplamı Gleason Skoru olarak adlandırılmaktadır. Gleason skorunu oluşturan rakamsal değerlerin ayrı ayrı verilmesi hastalığın seyrinin takibi açısından önemlidir çünkü, toplamları aynı Gleason Skoru'nu veren ancak baskın hücre tipine ait sayısal değerleri farklı olan tümörlerde, baskın hücre tipi için atanan sayısal değeri daha büyük olan tümörlerin prognozları da daha kötü olmaktadır (20-22).

Prostat kanserinin evrelemesi; Gleason skoru, rektal muayene sonucu ve PSA'nın serumdaki konsantrasyonu göz önünde bulundurularak, sıklıkla TNM sınıflama sistemi kullanılarak yapılmaktadır (22). Bu sistemde primer tümörün durumu (T), lenf nodlarına yayılım olup olmadığı (N) ve metastaz durumu (M) kriterleri esas alınarak sınıflama yapılmaktadır.

2.3. Prostat Kanserinde Moleküler Mekanizmalar

AR'nin prostat kanserindeki öneminin anlaşılmasıyla hastalıkla ilgili moleküler mekanizmalar araştırılmaya başlanmış fakat tümör oluşumlarının klonal özellik göstermemesi ve prostat kanserinin çok odaklı doğası sebebiyle başlangıç, ilerleme ve yayılımla ilgili moleküler işleyiş tam anlamıyla aydınlatılamamıştır (23).

Yaşlanmayla kuvvetli bir şekilde ilişkili olan ve nadiren 40 yaştan önce görülen prostat kanserlerinin yaklaşık %85'i sporadik tipte iken yaklaşık %15'lik kısmı herediter tiptedir ve genellikle erken yaşta ortaya çıkan hastalıkla ilişkilidir (23-25). Aralarında HPC1/RNASEL, HPC2/ELAC2, MSR1 ve HPCX genlerinin de bulunduğu pek çok gen ailesel yatkınlıkla ilişkilendirilmiş fakat sonraki çalışmalarla bu ilişkilerin çoğu desteklenemediğinden etkili olabilecek aday genler net olarak belirlenememiştir (23, 25-27). 1q24-25 kromozom bölgesi yerleşimli herediter prostat kanseri (HPC1) gen bölgesi, prostat kanserine ailesel yatkınlıkla ilişkilendirilmiş ilk gen bölgesi olup (24), sonraki çalışmalarda anti-viral ve pro-apoptotik bir enzim olan ribonükleaz L'nin (RNase-L) HPC1 gen bölgesini kapsadığı belirlenmiştir (28-30). Ribonükleaz L geni (RNASEL) viral enfeksiyona karşı interferon tarafından uyarılan, viral ve hücrel kökenli tek zincirli RNA'nın yıkımından sorumlu bir endoribonükleaz kodlamaktadır (31).

Öte yandan yetişkinlerde görülen kanser tiplerinin yaklaşık %20'sinin kronik enflamasyon bölgelerinde meydana geliyor olması, prostat kanserinin de enflamasyonla ilişkili olabileceği düşüncesini doğurmuştur (24, 26). İmmün cevap dahilinde prostat epitelinde enflamatuar hücre kaynaklı tekrar eden oksidatif veya nitrozatif hasarlar ile epitel hücrelerin çoğalmaları sonucu meydana gelen "proliferatif enflamatuar atrofi" (PIA) olarak adlandırılan morfolojik değişimlere sahip bölgeler ile prostatik intraepitelyal neoplazi (PIN) bölgeleri arasında bir geçiş olabileceği ve PIA ile prostat kanserinin bazı ortak moleküler yollara sahip oldukları gösterilmiştir (24). Prostat kanserinde enflamasyonla ilişkili olarak en dikkat çeken moleküllerden biri olan ve sitokinler, büyüme faktörleri, mitojenler ve tümör promotörleri tarafından uyarılan proenflamatuar bir enzim olan siklooksijenaz-2'nin prostat kanserinde yüksek miktarda ifade edildiği belirlenmiştir (24).

Yine hücre dışı etkenlere bağlı olarak gelişen oksidatif stres ile ilgili yapılan çalışmalarda da başlıca antioksidan enzimlerin prostat kanseri ve PIN'de azaldığı gösterilmiştir (26). En çok üzerinde durulan genlerden, karsinojen detoksifiye edici olarak rol alan bir enzimi kodlayan "glutasyon S-transferaz pi 1" geninin CpG adacıklarındaki hipermetilasyon ile ifadesinin engellendiği bazı prostat kanserlerinde gösterilmiştir (24).

5 α -redüktaz enziminin farklı dokularda düşük seviyelerde bulunan 5 α -redüktaz-1 ile deri ve prostatın androjene duyarlı hücrelerinde bulunan 5 α -redüktaz-2 olmak üzere iki izoenzimi bilinmektedir. 5 α -redüktaz-2 enzimi SRD5A2 geni tarafından kodlanmakta ve testosteronu daha aktif formu olan DHT'ye dönüştürmektedir. SRD5A2 geninde görülen A49T (49. kodonda alaninin terionine dönüşümü) polimorfizmi, enzim miktarını 5 kat arttırmaktadır. Bunun sonucu olarak yüksek serum testosteron seviyesine sahip topluluklarda prostat kanseri riskini arttırmanın yanı sıra kötü prognozla da ilişkili bulunmuştur (24). Öte yandan 5 α -redüktaz yoksunluğu olan erkekler prostat kanseri geliştirmezler ve ergenlikte veya erken yetişkinlikten önce kastre olmuş erkeklerde prostat kanseri nadirdir (24).

Prostat kanserinde 8p, 10q, 13q ve 17p kromozomlarında heterozigozluk kaybı sık görülür. Ayrıca kromozom kazanımları, kromozom kayıplarından daha az görülmektedir (23). Prostat karsinogenezinde allelik kaybın önemine karşın, kanser ilerleyişinde belirli bir aday tümör baskılayıcı gen nihai olarak belirlenememiştir (23). Prostat karsinogenezinin erken döneminde en sık rastlanan olaylardan biri, kromozom 8p'deki spesifik bölgelerin kaybıdır ki prostat tümörlerinde yaklaşık %85 oranında heterozigotluk kaybı görüldüğü gibi kolorektal ve akciğer karsinomlarında da görülmektedir (23, 26). Bir çok çalışma NKX3.1 genini 8p12-21 bölgesinde aday gen olarak desteklemektedir. Bununla birlikte prostat kanserinde NKX3.1 mutasyonları belirlenememiştir ve genin mutasyonundan ziyade ifadesinin azaldığı düşünülmektedir (23, 26). 10q bölgesi kaybı sık rastlanan bir olaydır. Bu bölgedeki aday genler arasında olan ve tümör baskılayıcı bir gen olan PTEN; glioblastoma, meme ve endometrial kanserlerde de kaybı görülen 10q23 bölgesinde bulunur fakat prostat kanseriyle ilgili elde edilen sonuçlar birbirleriyle çelişkilidir (23, 26).

Prostat kanseri ilerlemesinde kromatin modifikasyonları da önemlidir. Prostat kanseri ile ilişkili ana modifikasyonlardan biri, ilerlemiş hastalık ve metastazın onkojenik bileşenlerinden biri olan histon metil transferaz enzimi Ezh2 tarafından histon H3'ün 27. lizininin üçlü metilasyonudur (H3K27me3). H3K27me3 varlığı, ifade baskılanması ile ilişkili olduğu için bunun miktarının prostat kanserinde artması, Ras GTPaz ailesinin bir üyesi olan DAB2IP gibi tümör baskılayıcı genlerin baskılanmasıyla ilişkilidir (23).

Prostat kanserlerinin büyük çoğunluğunda ETS ailesinden transkripsiyon faktörlerinin (ERG, ETV1 ve ETV4) aktivasyonlarına sebep olan yeniden düzenlemeler belirlenmiştir. Bu yeniden düzenlemelerden en sık görüleni TMPRSS2-ERG füzyon genidir. Bu yeniden düzenleme N-terminal ucu budanmış ERG proteininin, TMPRSS2 geninin androjene cevap veren promotörünün kontrolü altına girmesiyle sonuçlanır. Lokalize prostat kanserlerinin yaklaşık %50'sinde bulunmuştur. Yapılan çalışmalarla androjene duyarlı LNCaP hücrelerinde AR bağlanmasının DNA hasarından sonra TMPRSS2-ERG füzyonlarını mümkün kılacak şekilde TMPRSS2 ve ERG gen bölgelerini birbirlerine yaklaştırdığı belirlenmiştir ancak bu füzyon geninin prostat kanserindeki önemi tam olarak anlaşılmış değildir (26).

Yetişkin erkek prostatında iki tip östrojen reseptörü (ER) ifade edilir: ER- α ve ER- β . ER- β daha çok bazal epitelde görülürken ER- α esasen stromal bölümde bulunur. Ayrıca androjenlerin östrojene dönüşümünde rol oynayan aromataz enzimi de prostat stromasında ifade edilir. Erkekler yaşlandıkça androjenin östrojene olan oranı azalır. Östrojen seviyeleri sabit kalırken testosteron seviyeleri azalır. Bu olay östrojenlerin prostat kanserinde etkili olabileceğine işaret eder. Hayvan modellerinde testosteron ve östrojenin bir arada verilmesinin yüksek oranda adenokarsinom oluşumu ile sonuçlandığı gözlemlenmiştir (23, 24).

AR, gen ifadesinin ligandla uyarılabilen düzenleyicileri olan nükleer hormon reseptörleri süper-ailesinin bir parçasıdır. Kodlayan gen, X kromozomunun uzun kolunda yer alır. Ligandla aktive olan bir transkripsiyon faktörü olarak işlev gösterir ve hem normal hem de anormal prostat gelişiminde etkili olan sinyal yollarında yer alan genlerin ifade edilmelerini de tetikler.

2.4. Prostat Kanserinde Androjen Reseptörü ve Androjenlerin Rolü

Lokalize prostat kanserinde cerrahi yolla tümörün uzaklaştırılması veya radyasyon terapisi ile hastaların hayatta kalma oranları oldukça yüksek iken, ileri ve/veya metastatik hastalıkta bu durum değişmekte ve ilk tedavi seçeneği olarak androjen deprivasyon terapisi uygulanmaktadır (2). Prostat kanserinin androjen bağımlı bir kanser tipi olduğu uzun süredir bilinmekte olup hormon deprivasyonu; cerrahi (orşiektomi) veya medikal (lüteinize edici hormon salgılatıcı hormon [LRHR] agonistleri ile) kastrasyon şeklinde gerçekleştirilebilmektedir (32-35). Hormonal terapi hastalıkta 2-3 yıla kadar gerileme sağlayabilse de çoğunlukla 18-24 ay sonra artmış

tümör hacmi, yeni metastatik yayılım ve yükselmiş serum PSA değerleri ile karakterize olan ve ölümcül fenotipi oluşturan kastrasyon-dirençli prostat kanseri gelişebilmektedir (2, 32, 36-38).

Androjenler ve androjen reseptörü, gerek prostat hücrelerinin gerekse prostat kanseri hücrelerinin büyüme ve çoğalmalarında temel düzenleyiciler olup cinsiyete bağlı hücresel farklılaşmada, kas ve yağ dokusu gelişiminde; prostatın normal büyüme, gelişme ve fizyolojik işlevlerini yerine getirmesinde, prostat karsinogenezinde ve androjen-bağımsız hastalığın gelişmesinde kritik rol oynarlar (2-4, 32, 39).

Androjenik steroidler 19 karbonlu steroidler olup testosteronun modifiye edilmesiyle oluşturulurlar (2). %95'i testislerde, %5'i ise adrenal bezlerde üretilen testosteron, pasif difüzyon yoluyla prostat epitel hücrelerine girer (40). Hücre içine giren testosteron, prostatta yüksek oranda ifade edilen bir sitokrom P450 enzimi olan 5 α -redüktaz tarafından aktif metaboliti olan DHT'ye dönüştürülür (2). Testosteron da fizyolojik koşullarda AR'nin doğal ligandı olmasına karşın DHT'nin AR'ye afinitesi 5-10 kat daha fazladır ve dolayısıyla AR dimerizasyonu ve AR hedef genlerinin aktivasyonu için daha düşük konsantrasyonları yeterlidir (2, 32). DHT'nin sitoplazmada bulunan AR monomerlerine bağlanmasıyla monomerlerin fosforilasyonu, dimerizasyonu ve hücre çekirdeğine lokalizasyonunu takiben DNA üzerindeki AR cevap elementlerine (ARE) bağlanma ve ilgili genlerin ifade edilmesi olayları gerçekleşir (32).

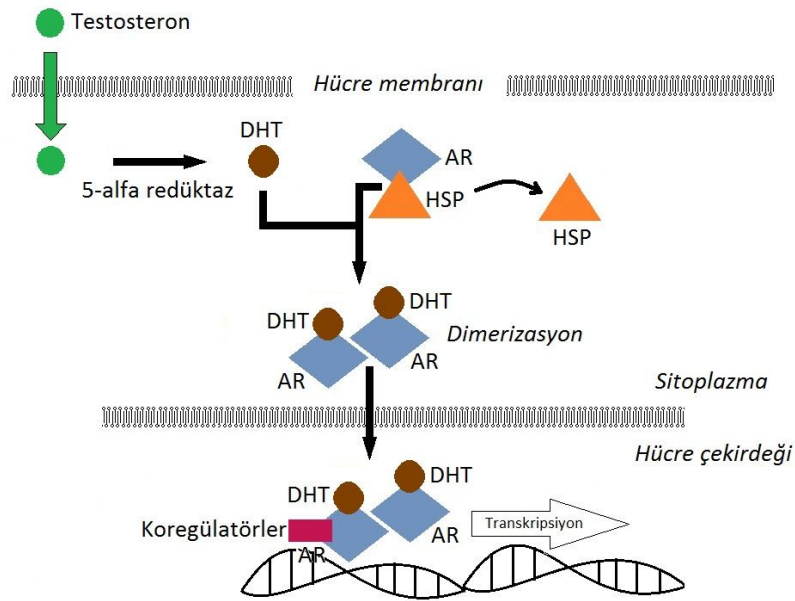
Androjen reseptörü; nükleer-reseptör süperaillesinden, ligand ile aktive olan, 110 kDa ağırlığında bir transkripsiyon faktörüdür (41, 42). Yapısal olarak; amino-terminal bölgesine (NTD) kısa bir aminoasit dizisi olan "Hinge Bölgesi" tarafından bağlanan DNA-bağlanma bölgesi (DBD) ve ligand-bağlanma bölgesinden (LBD) meydana gelmektedir (43-46).

2.4.1. Androjen Reseptörü Aktivasyonu

Ligand yokluğunda AR sitoplazmada bulunur ve ısı-şok proteinleri (HSP), sitoskeletal proteinler ve diğer şaperonlarla etkileşim halindedir (2, 47). Androjenlerin bağlanmasıyla reseptörde konformasyonel değişimler meydana gelir ve LBD'deki 3, 4 ve 12 numaralı heliks yapıları bağlanma yüzeyini oluşturur. 12. heliksin amfipatik yapısı sebebiyle LBD'de hidrofobik bir cep meydana gelir. Bu hidrofobik cep NTD ve karboksi-terminal uç arasında moleküler etkileşimlere sebep olur ve AR'nin ısı-şok

proteinlerinden ayrılarak serbest kalmasını sağlar. Serbest kalan AR'ler fosforillenerek işlevsel olarak aktif AR homodimer yapısını oluşturur. Homodimer yapıdaki fonksiyonel AR, filamin-A ve importin- α gibi yapılar aracılığıyla hücre çekirdeğine taşınır (2, 47, 48).

AR hücre çekirdeğine girdikten sonra 15 baz çiftinden oluşan palindromik ARE'leri tanır. ARE'ler 3 baz çifti ile ayrılan iki adet heksamerik birbirinin tersi baz dizisi içermektedir (41, 48-52). AR'nin ARE'lere bağlanması DBD'deki iki çinko parmak motifi aracılığıyla olur. İlk çinko parmak motifi DNA'nın büyük oyuğundaki DNA dizisi etkileşimlerinde rol alırken, ikinci çinko parmak da DNA'ya bağlanma sürecinde homodimerizasyon için gereklidir (2, 47, 53). AR transkripsiyonel kompleksine diğer düzenleyicilerin bağlanmasıyla hedef genlerin ifadeleri düzenlenir (2). Şekil 2.1'de AR aktivasyonu şematik olarak gösterilmektedir.



Şekil 2-1: AR aktivasyonu

AR birçok doku ve hücrede ifade edilmekte ve hücre çoğalması, farklılaşması ve sinyalizasyonunun da dahil olduğu pek çok hücreyel olayda düzenleyici olarak görev almakta, farklı işlevleri olan pek çok geni hedef alarak bunların aktivasyon veya baskılanmasında etkili olmaktadır (53, 54). Prostat kanseri ile ilişkili olduğu belirlenen PSA, FGF8, Cdk1, Cdk2, PMEPA1, TMPRSS2 gibi genler de AR'nin hedef

genlerindedir (55) ve daha pek çok genin ifadesinin AR tarafından düzenlendiği bilinmektedir. Öte yandan kodlama yapmayan RNA'lar üzerinde yoğunlaşan güncel çalışmalar, AR'nin kodlama yapmayan RNA'ları da hedef aldığını göstermektedir.

Prostat kanserinde bir AR hedef geni olan PSA'nın yüksek serum değerleri, AR'nin aşırı etkinliğiyle ilişkilidir. Bu aşırı etkinliğin sebebi AR gen amplifikasyonu sonucu aşırı ifadesi olabileceği gibi; işlev kazandırıcı AR mutasyonları, AR'nin sürekli aktif mRNA kırılma varyantlarının varlığı, AR koregülatörlerinin anormal miktarları gibi faktörlerin etkisi de kabul edilmektedir (2, 32).

2.5. Prostat Kanserinde Tümör Belirteci Olarak Öne Çıkan Biyomoleküller

Kanser tanısı ve tedavi takibinde girişimsel olmayan yöntemler olan, vücut sıvılarından tümör biyobelirteçlerinin tayini gün geçtikçe daha fazla önem kazanan güncel bir konudur. Prostat kanserinde de gerek hastalığın takibi, gerekse erken tanının hayatta kalım üzerindeki belirgin etkisi sebebiyle tanı aşamasında biyobelirteçler kullanılmakta ve araştırılmaktadır.

1930'larda metastatik prostat kanserli hastalarda serum prostatik asit fosfataz (PAP) seviyelerinin yüksek bulunmasıyla hastalık seyrinde bir klinik belirteç olarak uzun süre araştırılmış, 1980'lerde ise yerini prostat spesifik antijene (PSA) bırakmıştır (56).

2.5.1. Prostat Spesifik Antijen

Doku kallikrein ailesinin bir üyesi olan PSA, kromozom 19q13.4 yerleşimli bir gen olan kallikrein 3 (KLK3) geni tarafından kodlanan, 33 kDa moleküler ağırlığında, 240 aminoasitlik, prostata özgü bir glikoproteindir (56-60). PSA ifadesi androjenlerce pozitif yönde düzenlenir ve dolaşıma katılan androjen seviyeleriyle serum PSA seviyeleri arasında belirgin bir korelasyon vardır (57, 59, 61-63).

PSA, prostatta bulunan salgı kesecikleri ve kanallardaki sekretuar epitel hücrelerce üretilir. PSA transkripsiyon başlangıç bölgesinin 156-170 baz çifti uzağındaki ARE'ye AR homodimerinin bağlanmasıyla PSA öncül peptidi olan pre-proPSA oluşturulur ve bunun proteolitik kesimi sonucu meydana gelen proPSA inaktif bir proenzim olarak prostatik kanallara salgınır (56, 57, 59, 62). proPSA'nın N-terminal bölgesinden 7 aminoasidin ayrılmasıyla aktif hale geçen olgun PSA seminal sıvıda 0,5-2,0 ng/ml konsantrasyonlarda bulunur ve semendeki temel protein yapıyı oluşturur (57).

PSA, yüksek substrat özgülüğü gösteren bir serin proteazdır ve seminal pıhtıdaki jelleştirici etkiye sahip semenogelin 1 ve 2'leri ayırarak semenin sıvılaştırılmasını sağlar (57, 59, 64).

Normal koşullarda PSA kanda düşük seviyelerde bulunmaktadır. Prostat kanserinde erken bir olay olan bazal hücre tabakası ve bazal membranın parçalanmaya başlamasıyla PSA'nın periferel dolaşıma geçişi artar (65). Bu nedenle prostat biyopsisi uygulaması için minimum eşik değer 4 ng/ml olarak belirlenmiş olup daha yüksek serum PSA değerleri kişide tümör varlığı şüphesi uyandırmaktadır (5, 66).

Hassas bir biyobelirteç olan PSA, prostat dokusuna özgül olduğu halde prostat kanserine özgül değildir (5). BPH, prostat enfeksiyonu ve travma gibi tümörden bağımsız sebeplerle de artabilen kandaki PSA seviyesi, 50 yaşını geçmiş erkeklerin yarısından fazlasında BPH geliştiği de göz önüne alındığında yaş ve benzeri fiziksel etmenlere bağlı olarak da değişkenlik gösterebilmektedir (5, 6, 56). Bununla birlikte PSA, özgülüğü düşük fakat hassas bir molekül olmasına karşın, bir biyobelirteç olarak tek başına yeterli değildir. Organla sınırlı hastalığı olan erkeklerin bir kısmında serum PSA değerleri 4 ng/ml'den düşük olabilmekte ve hastalık bu yolla belirlenemeyebilmektedir (57, 67-69).

2.6. Kodlama Yapmayan RNA'lar

2.6.1. Prostat Kanseri Antijeni 3

İlk olarak 1999 yılında kanserli ve kanserli olmayan dokular arasındaki farklılıkların gösterilmesi sonucu bulunan ve uzun süredir prostat kanseri biyobelirteci olarak gündemde olan PCA3, vücut sıvılarından belirlenebilen, prostat dokusuna özgü bir uzun kodlama yapmayan RNA'dır (lncRNA) (70, 71).

lncRNA'lar 200 nükleotitten 100 kilobaza kadar değişik uzunluklarda olabilen, protein kodlamayan RNA'lardır ve genellikle mesajcı RNA (mRNA)'lar gibi RNA polimeraz 2 tarafından okunurlar ancak yazılım sonrasında mRNA'lardan farklı olarak çok adımlı işlemlerden geçirilmeden direkt olarak işlev gösterebilmektedirler (72, 73). lncRNA'ların çoğu poliadenilasyon kuyruğu içermektedir (73).

İlk belirlenen lncRNA'lardan olan X inaktif spesifik transkript'in (XIST)' X kromozomu sessizleştirilmesinde kilit rol oynadığının belirlenmesi, lncRNA'ların önemli hücresel işlevlerden sorumlu olduklarını göstermiştir (74). lncRNA'lar hücrede;

transkripsiyonel baskılama, kromatin yeniden modellenmesi ve histon modifikasyonlarının başlatılması, protein aktivitelerinin ve yerleşimlerinin düzenlenmesi, daha küçük RNA'ların öncüllüğü gibi çok çeşitli işlevler gösterebilmektedirler ve işlevlerinde meydana gelen bozulmalar kanser gelişiminde önemli rol oynamaktadır (73, 75).

lncRNA'lar uzun nükleotit dizilerinden oluştuğu için hedefleri de son derece özgüdür ve bu nedenle çok hassas bir şekilde işlev gösterebilmektedirler. Transkripsiyon bölgesine RNA-DNA polimeraz 2 kompleksi aracılığıyla bağlanmaktadır ve 3' uçları kompleksin lokusa yaklaşmasını sağlarken, 5' uçları kromatin komplekslerine bağlanmak üzere açıkta olabilir (76). lncRNA'lar transkripsiyonun düzenlenmesinde iki farklı şekilde işlev gösterebilmektedirler: Aynı kromozom üzerinde, sentezlendikleri bölgeye yakın bir veya birkaç gen üzerinde etkili olabilirler veya sentezlendikleri bölgeden yayılarak uzak genlerde, hatta farklı kromozomlar üzerindeki genlerde etki gösterebilirler (76).

lncRNA'lar farklı dokulara özgü olabildikleri gibi hastalık varlığında değişik ifade seviyeleri de gösterebilmekte ve vücut sıvılarında belirlenebilmektedir. Bu nedenle kanser tanısında ve tedavi takibinde biyobelirteç adayları olarak öne çıkmaktadırlar. MALAT1 gibi prostat kanseri de dahil olmak üzere pek çok kanser tipinde ifade seviyesi artan lncRNA'lar olduğu gibi tek bir kanser tipine özgü olan lncRNA'lar da bulunmaktadır. Kanser tipine özgü lncRNA'lardan; prostat kanseri kodlamayan RNA 1 (PCNCR1), prostat spesifik gen 1 (PCGEM1) ve PCA3 sadece prostat kanseriyle ilişkilendirilmiş olup; PCNCR1'in AR transaktivasyonunda ve prostat kanserinin ilerlemesinde kilit bir role sahip olduğu, PCGEM1'in ise tümör oluşumunu desteklediği belirlenmiştir (73). Buna karşın PCA3 prostat kanserinde yüksek seviyede ifade edilirken, biyolojik fonksiyonu bilinmemektedir ve homoloji gösterdiği bir gen belirlenmemiştir (77).

PCA3 androjen uyarımına yanıt veren bir moleküldür. Androjene duyarlı prostat kanseri hücre soylarında duyarlı olmayanlara göre daha yüksek seviyelerde bulunmaktadır ve androjen uyarımıyla miktarı daha da artmaktadır fakat bunun altında yatan mekanizma bilinmemektedir ve PCA3 molekülüne ait ARE bölgeleri tanımlanamamıştır (71).

PCA3 geni kromozom 9q21-22'de bulunmaktadır ve prune homolog 2 (PRUNE2) geninin 6. intronunda ters yönde kodlanmaktadır. PRUNE2 geni hücrel çoğalmada, hücre ölümünde ve hücrel dönüşümde etkiliyken, genin ifadesinin DHT ile tetiklenebildiğini ve prostat kanserinde ifade seviyesinin arttığını gösteren çalışmalar olmasına karşın bu sonuçları desteklemeyen çalışmalar da mevcuttur (70, 71). 4 ekzon içeren ve 4. ekzonunda 3 farklı noktadan poli-A kuyruk eklenebilen PCA3 geninin oldukça karmaşık olduğu belirlenmiştir; alternatif varyantları daha nadir görülmesine karşın yeni çalışmalarla 4 farklı transkripsiyon başlangıç bölgesi, 2 farklı kırılan ekzon bölgesi ve 4 yeni poliadenilasyon bölgesi bulundurduğu gösterilmiştir (70, 71, 73).

Prostat dokusuna özgü olan PCA3'ün miktarı normal koşullarda çok düşük bir seviyededir ve sadece prostat kanseri varlığında artmaktadır. Hastaların %90'undan fazlasında bu artış belirlenebilmekteyken, BPH ve enflamasyon varlığından herhangi bir artış meydana gelmemektedir (78-80). Öte yandan belirlenen PCA3 miktarları ile tümör evresi ve hastalığın agresifliği arasında bir korelasyon belirlenmemiştir (81, 82). Bunun yanı sıra iyi, orta ve az farklılaşmış tümörlerin tamamında yüksek seviyelerde belirlenmesi, PCA3 ifade seviyesinin artışının prostat kanserinin erken evrelerinde gelişen bir olay olduğuna işaret etmektedir (71).

2.6.2. mikroRNA'lar

Doku özgüllükleri, kanser varlığında ifade seviyelerinin değişmesi ve kanda yüksek derecede stabil kalmaları sebebiyle mikroRNA'lar (miRNA'lar) girişimsel olmayan güncel biyobelirteç adayları olarak ön plana çıkmaktadır. miRNA'lar mesajcı RNA'lardan daha kararlı yapıda olup vücut sıvılarındaki ribonükleazlara ve farklı fiziksel koşullara karşı dayanıklıdırlar.

Prostat kanseriyle ilgili yapılan çalışmalar sonucunda pek çok aday miRNA belirlenmiş, bir kısmının ifade seviyelerindeki değişimler vücut sıvılarında gösterilebilmiştir. Özellikle miR-141 ve miR-375 ile ilgili dikkate değer bulgular elde edilmiştir.

Yaklaşık 22 nükleotid uzunluğunda, protein kodlamayan kısa RNA dizileri olan mikroRNA'lar çoğalma, farklılaşma, hücre döngüsü ve apoptoz gibi pek çok önemli hücrel olayda görev almaktadırlar (7, 83, 84). Özgül hedefleri olan mRNA'lara (mRNA) bağlanıp bu mRNA'ların okunmalarını engelleyerek, gen ifadesinin transkripsiyon sonrasında kontrol edilmesini sağlamaktadırlar (7, 83, 84). İnsan

genomundaki gen ifadelerinin yaklaşık %30'unun miRNA'lar tarafından düzenlendiği düşünülmektedir ve kanser de dahil olmak üzere pek çok hastalıkla ilişkilendirilmişlerdir (7, 83, 85).

Biyogenezlerinin baskılanmasının farelerde embriyonik ölümle sonuçlanması, miRNA'ların yaşamsal öneme sahip moleküller olduklarını göstermektedir. Bugüne kadar 1400'den fazla insan miRNA'sı belirlenmiştir ve idrar, tükürük, semen, gözyaşı, süt ve amniyotik sıvı gibi farklı vücut sıvılarından izole edilebilmişlerdir (86).

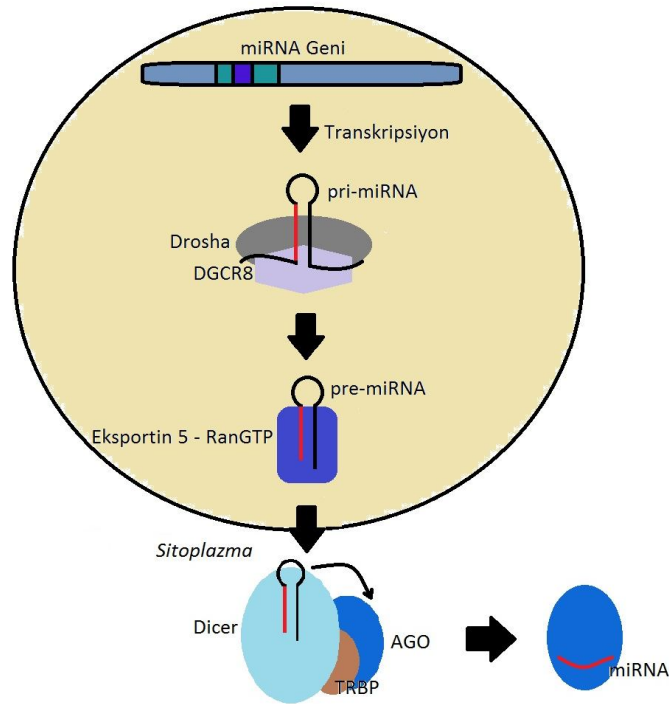
2.6.3. mikroRNA'ların Biyogenezi

Olgun miRNA'lar daha uzun öncül moleküllerin çok aşamalı işlemlerden geçirilmesiyle oluşturulmaktadır. miRNA genleri transkripsiyonlarını başlatacak bir "Polimeraz II (Pol II) promotor" bölgesine sahip olabilecekleri gibi, genlerin intronik bölgelerinde bulunarak bu genlerin kırılması sonucu da oluşturulabilmektedirler (7).

miRNA'ların RNA polimeraz II tarafından ilk okunmuş halleri olan pri-miRNA'lar, 5'şapka ve 3'poli-A kuyruğu içeren, 1 kilobazdan (kb) daha uzun dizilerdir ve tek bir pri-miRNA transkriptinden birden fazla miRNA oluşturulabilmektedir (7, 87-90). Pri-miRNA'lardan olgun miRNA'ların oluşturulması iki adımlı bir süreçtir ve ilk adım hücre çekirdeğinde gerçekleştirilir. Çift zincirli RNA'ya bağlanabilen bir protein olan "DGCR8" (DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8), bir ribonükleaz (RNaz) III olan "Drosha" enzimi ile bağlanarak pri-miRNA ile etkileşimi sağlar ve kompleksin katalitik olmayan kısmını oluşturur. Bu sayede pri-miRNA'nın her iki zinciri birden Drosha tarafından kesilir ve yaklaşık 70 nükleotit uzunluğa sahip sap-ilmik formundaki ikinci öncül moleküller olan pre-miRNA'lar oluşturulur (91, 92).

İşlenme sürecinin bu ilk basamağının ardından pre-miRNA'lar hücre çekirdeğinden sitoplazmaya taşınır. Bu işlem nükleositoplazmik taşıma faktörlerinden karyoferin ailesinin bir üyesi olan ve fonksiyon kazanabilmesi için kofaktörü olan Ran-GTP'ye ihtiyaç duyan "eksportin-5" tarafından gerçekleştirilir (93-97). Sitoplazmada Ran-GTP'nin hidrolizi sonucu serbest kalan pre-miRNA'lar, çift zincirli RNA'ya bağlanabilen "TRBP" (HIV-1 TAR RNA binding protein) proteini ve bir RNaz III olan "Dicer" ile kompleks oluşturur (20-22, 42). Dicer enzimi pre-miRNA'nın ilmik formunu keser ve yaklaşık 22 nükleotit uzunluğunda çift zincirli bir RNA yapısı oluşturulur (93, 94).

Çift zincirli miRNA yapısı işlevsel değildir, bu nedenle zincirlerden biri parçalanırken diğeri Argonaute-2 (Ago2) proteinine yüklenerek, “RNA indüklü susturucu kompleks” (RISC) yapısına katılır (98, 99). RISC yapısına katılan aktif miRNA hedef mRNA'lara yönlendirilir ve mRNA'nın 3'UTR bölgesindeki nükleotitlerle kısmi eşleşme göstererek mRNA ifadesini baskılar (100). Eşlenikliğin kısmi olması sebebiyle bir miRNA birden fazla mRNA'yı hedefleyebileceği gibi, bir mRNA'da birden fazla miRNA tarafından hedeflenebilmektedir (101, 102). miRNA'ların biyogenezine dair şematik gösterim şekil 2-2'de sunulmuştur.



Şekil 2-2: miRNA biyogenezini

2.7. Prostat Kanserinde mikroRNA'ların Rolü

miRNA genlerinin yaklaşık %50'si kanser ile ilişkilendirilmiş bölgelerde bulunmaktadır ve anlatımı yapılan miRNA'ların kanserli hücrelerde düzenlenmeleri bozulmakta, sağlıklı ve kanserli dokularda seviyeleri farklılık göstermektedir (83, 97).

Kanserde düzenlenmeleri bozulan miRNA'ların bir bölümünün hedeflerinin onkogen (tümör baskılayıcı miRNA'lar) ve tümör baskılayıcı genlerin mRNA'ları (onkomiRNA'lar) olduğu belirlenmiştir (103, 104). Bu şekilde etki gösteren ve bir kemoterapötik hedef olabileceği düşünülen miR-21'in çoğu kanser tipinde miktarının

arttığı ve çoğalma, hücre ölümü ve yayılımla ilişkili pek çok tümör baskılayıcı geni hedef olarak onkogenik etki gösterdiği belirlenmiştir (105). Bunun tersi şekilde let-7 ailesi üyelerinin de tümör baskılayıcı etki gösterdiği ve artmış ifade seviyelerinin akciğer kanserinde hayatta kalımla ilişkili olduğu gösterilmiştir (106). Öte yandan mRNA üzerindeki miRNA etkileşim bölgeleri olan 3'UTR'lerdeki polimorfizmlerin de miRNA bağlanmasını etkilediği ve bu şekilde, onkogenik özellikteki mRNA'ların baskılanmasının önüne geçilerek kanser riskinin artabileceği yine let-7 ailesi ile gösterilmiştir (107).

Prostat kanseri oluşum ve gelişiminde etkili olabilecek pek çok aday miRNA belirlenmiş olmasına rağmen bunların çok azının işlevleri bilinmektedir. Bunların arasından tümör baskılayıcı olarak işlev gösteren miRNA'lardan olan miR-143'ün pek çok yolda etkili olarak, miR-200 ailesi ve miR-145'in hücre göçü ve yayılımında engelleyici role sahip olarak, miR-488'in AR-aracılı hücre büyümesindeki durdurucu rolüyle prostat kanserinde etkilerinin olabileceği belirlenmişken; onko-miRNA olarak işlev gösteren miRNA'lardan miR-21'in tümör büyümesi ve yayılımında, miR-125b'nin hücre çoğalmasını arttırırken hücre ölümünü engelleyerek, miR-221 ve miR-222'nin hücre döngüsünde rol olarak etkilerinin olabileceği belirlenmiştir (97). miR-93'ün ise artmış seviyelerinin, yüksek riskli prostat kanseriyle ilişkili olduğu bulunmuştur (8).

Gerek hücre hatları gerekse klinik örneklerle yapılan çalışmalar sonucunda prostat kanseriyle ilişkili bulunan ve ifade değişimleri rutin olarak kullanılan biyobelirteçlerle tutarlılık gösteren az sayıda miRNA belirlenebilmiştir. Ön plana çıkan moleküllerden olan miR-107 ve miR-574-3p'nin hastalık varlığında serumdaki seviyelerinin arttığı ve idrardaki seviyelerinin de PCA3'ten daha bilgilendirici olduğu bulunmuştur (86). Buna karşın tekrarlanan çalışmalarla ortak bir gen ifade profili ortaya konamamıştır; ancak çalışmaların çoğunda prostat kanserinde biyobelirteç adayları olarak ön plana çıkan miR-141 ve miR-375 molekülleri için tutarlı ve tekrarlanabilir sonuçlar elde edilmiştir.

2.7.1. Prostat Kanserinde mikroRNA'ların Androjen ve Androjen Reseptörü ile İlişkisi

Prostatın normal bir şekilde gelişip işlev göstermesi androjenler ve androjen reseptörü varlığında gerçekleşirken, prostat kanseri de androjen bağımlı bir kanser

tipidir. Yapılan miRNA çalışmalarında, miRNA ifade seviyelerinin androjen reseptörünün durumuna bağlı olarak değiştiği belirlenmiştir (7).

Önceleri dirençli prostat kanserlerinin androjene duyarsız oldukları düşünülürken, artık bu hücrelerin AR'yi aşırı ifade ettikleri ve az miktarda androjene bile duyarlılık gösterebildikleri belirlenmiştir (108). AR'nin aşırı ifadesinin androjen bağımlı hastalığın androjen bağımsız şekle dönüşmesinde etkili olduğu düşünülmektedir (108).

Prostat kanserinin de dahil olduğu bir çok kanser tipinde yüksek derecede ifade edilen ve tümör baskılayıcı, “programlanmış hücre ölümü proteini 4”ü (PDCD4) hedef olarak onkogenik etki gösteren miR-21'in ifadesinin AR tarafından düzenlendiği, promotorunda ARE bulundurduğu belirlenmiştir (109, 110).

Prostat kanserli doku ve hücre hatlarında yapılan çalışmalar, başta miR-141 olmak üzere belirli miRNA anlatım seviyelerinin androjenle düzenlendiğini ortaya koymaktadır. Oldukça kapsamlı olan bir çalışmada miR-141'in aşırı ifadesi LNCaP hücrelerinde büyümeyi arttırırken, miR-141'in anti-miR-141 ile baskılanmasının, aşırı AR ifade eden LNCaP hücrelerinde büyümeyi baskıladığı belirlenmiştir. Yine bu çalışmada hücre hatlarına DHT uygulamasının miR-141'in de dahil olduğu bir grup miRNA'nın ifade seviyelerini 1,5 kattan fazla arttırdığı belirlenmiştir. AR ifadesi olan hücre hatlarında miR-141 ifadesinin gerçekleştiği fakat AR ifadesi olmayan hücre hatlarında ya ifade edilmediği ya da çok az miktarda edildiği belirlenmiştir. Çalışmada ayrıca BPH ve kastrasyona dirençli prostat kanseri örnekleri de karşılaştırılmış ve miR-141 ve miR-375 seviyeleri kastrasyona dirençli prostat kanserinde artmış olarak bulunmuştur. Hücre hattı ve klinik örneklerden elde edilen veriler birleştirildiğinde ortak olarak belirgin bir şekilde miktarı değişen, 1,5 kattan fazla artışla miR-141 olmuştur. Öte yandan bu çalışmada miR-141'in hedefi olabilecek bir gen belirlenememiştir (108).

2.7.2. Dolaşıma Katılan mikroRNA'lar

Tümör kökenli miRNA'ların tümör dokusundan ayrılıp ölçülebilen miktarlarda dolaşıma katıldıkları ve mRNA'ların aksine, RNaz ve diğer çevresel faktörlerden yüksek derecede korunarak kandan ve diğer vücut sıvılarından izole edilerek biyobelirteç olarak kullanılacakları gösterilmiştir (111). Bu korunmanın sebebinin miRNA'ların diğer proteinlerle birlikte ribonükleoprotein kompleksleri oluşturmasının

yanı sıra eksozomlar, mikroveziküller ve apoptotik cisimciklerin yapısına katılarak hücre dışına salınmaları olduğu düşünülmektedir (86).

Vücut sıvılarından elde edilen total miRNA'ların yanı sıra sadece eksozomlardan izole edilen miRNA'ların da hastalık konusunda yeterince bilgilendirici olduğu gösterilmiştir. Metastatik prostat kanserli hastalarda miR-141 ve miR-375 moleküllerinin seviyelerindeki belirgin artış eksozomlardan izole edilen miRNA'lar ile de doğrulanmıştır (9). Bu yönde yapılan çalışmalarla prostat kanserli erkeklerin idrar, plazma ve serumlarından elde edilen miRNA'ların hastalığın varlığı ve seyri açısından önemli moleküller oldukları belirlenmiştir (9).

Yapılan çalışmalarla prostat kanseri varlığında miR-141 ve miR-375 moleküllerinin ifade seviyelerinin arttığı görülmüş ve tümör dokusundan kana salındıkları düşünülmüştür (111). Serum, plazma ve dokulardan elde edilen miRNA'larla yapılan farklı çalışmalarda ise miR-141 ve miR-375 ifade seviyelerinin metastatik hastalıkta metastatik olmayan hastalığa göre daha fazla artmış olduğu belirlenmiştir (8, 9, 11, 12). Metastatik hastalıkta serumda en yüksek seviyede bulunan bu iki miRNA PSA'ya ek birer parametre olarak önerilmişlerdir (11, 12).

2.7.3. miR-141 ve miR-375

Sağlıklı ve kanserli prostat dokuları karşılaştırıldığında, kanserli örneklerde miR-141 seviyesinin oldukça yükselmiş olduğu ve serum PSA seviyeleriyle korelasyon gösterdiği belirlenmiştir (111). miR-141 tedavi etkinliğinin belirlenmesi açısından da önem taşıyan bir belirteç adaydır, plazma seviyeleri tedaviye dayalı olarak incelendiğinde PSA ve diğer belirteçlerle uyumlu olarak bulunmuştur (8, 112). Bunlarla birlikte miR-141 seviyelerindeki artış ileri evre hastalıkla ilişkilendirildiğinden prostat kanseri açısından büyük önem taşımaktadır (11, 113).

Hücrelerin hareketlilik ve yayılım yeteneklerini arttırması sebebiyle epitelden mezenkimale geçiş (EMT), metastaz gelişimi için çok önemli bir olay olarak değerlendirilmektedir (97). miR-141, transkripsiyon faktörleri ZEB1 ve ZEB2'yi hedefleyerek EMT'yi baskılayan miR-200 ailesinin bir üyesidir (97, 114, 115). Bu ailenin insanlardaki diğer üyeleri: miR-200a, miR-200b, miR-200c ve miR-429'dur (111). miR-200 ailesinin bir üyesi olan miR-200b'nin plazmadaki seviyesinin de metastatik hastalıkta metastatik olmayan hastalığa göre arttığı ve seviyelerinin miR-141

ile korele olduğu gösterilmiştir, fakat sonraki çalışmalar hastalığın durumu konusunda miR-200b'nin yeterince bilgilendirici olmadığını göstermiştir (11).

miR-141 seviyelerinin androjenlerle düzenlendiği bildirilmişken (8), ilginç bir şekilde güncel bir çalışmayla miR-141'in "küçük heterodimer partner"i (SHP) hedefleyerek AR transkripsiyonel aktivitesinin artırılmasında rol oynayabileceği gösterilmiştir (116). SHP, nükleer reseptör ailesinin bir üyesi olup, DNA bağlanma bölgesi içermediğinden daha farklı işlev göstermektedir ve transkripsiyonel baskılayıcı rol oynamaktadır. SHP, AR ile direkt etkileşime girebilen bir protein olup 3'UTR bölgesinde miR-141 ile komplementer bir bölge içerdiği belirlenmiştir. Bu sebeple prostat kanserinde miR-141'in artmış seviyelerinin SHP ifadesini azaltabileceği ve AR transkripsiyonel aktivitesini artırabileceği düşünülmüştür (116).

miR-375 serum/plazma seviyelerinin tümör varlığında arttığı ve aşırı ifadesinin ilerlemiş hastalıkla ilişkili olduğu belirlenmiştir (10). Uzak metastazı olan hastaların serumlarında seviyesi en yüksek bulunan miRNA olmuştur (11). Ayrıca lenf nodu tutulumlarıyla da korele olduğundan sistemik hastalıkla ilişkilendirilmiştir (11).

Endoplazmik retikulumdan golgi cisimciğine COP-II aracılı protein taşınmasında rol alan SEC23A'nın aşırı ifadesi hücre büyümesini azaltırken, apoptoz üzerinde bir etkisi yoktur. Bilgisayar analizleriyle SEC23A geninin 3'UTR bölgesinin miR-375 için bir hedef olduğunun belirlenmesiyle birlikte yapılan çalışmalar prostat kanserlerinde miR-375 seviyelerindeki artışla korele şekilde SEC23A ifadesinin mRNA ve protein düzeyinde azaldığını göstermiştir (117). Bununla birlikte miR-375'in prostat kanserindeki rolü henüz açık değildir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Tez projesi, *in vitro* koşullarda, İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

Tez çalışmasında bir insan prostat adenokarsinomu hücre hattı olan LNCaP (Lymph Node Carcinoma of the Prostate) hücre hattı kullanılmıştır. LNCaP hücreleri, 1977 yılında Horoszewicz ve arkadaşları tarafından, 50 yaşında metastatik prostat kanserli beyaz bir erkeğin sol supraklaviküler lenf nodundaki metastazdan iğne aspirasyon biyopsisiyle izole edilmiş olan, hormona duyarlı bir hücre hattıdır. LNCaP hücreleri, androjen ve östrojen reseptörleri ile prostatik asit fosfataz ve PSA ifade eden epitel kökenli hücrelerdir. Tez çalışmasında testosteronun aktif formu olan 5 α -dihidrotestosteron ile muamele edilen LNCaP hücrelerinde, miR-141, miR-375, PSA mRNA ve PCA3 uyarımı ve bu moleküllerin hücreden besiyerine salınımları incelenmiştir.

3.2. Kimyasal Maddeler ve Yardımcı Ekipmanlar

RPMI 1640 Besiyeri (BIOCHROM)

Fötal sığır serumu (BIOCHROM)

Penisilin / Streptomisin (BIOCHROM)

%0,25 Trypsin-EDTA (1X) (GIBCO)

5 α -Androstan-17 β -ol-3-one (SIGMA-ALDRICH)

Charcoal, Dextran Coated (SIGMA-ALDRICH)

TriPure Isolation Reagent (ROCHE)

miScript II RT Kit (QIAGEN)

miScript SYBR Green PCR Kit (QIAGEN)

miScript Primer Assays (QIAGEN)

PBS (SIGMA-ALDRICH)

Kloroform (Riedel-deHaen)

İzopropanol (J.T. BAKER)
Etanol (Riedel-deHaen)
0,5 X TBE (Laboratuar Stok)
Agaroz (MULTICELL)
Bromofenol Mavisi (Laboratuar Stok)
50 bç markör (FERMENTAS)
0,2 µm filtre (SCHLEICHER & SCHUELL)
25 cm² ve 75 cm² hücre kültürü flaskları (GREINER BIO-ONE)
6 Well Cell Culture Plate (GREINER BIO-ONE)
Tek Kullanımlık Hücre Kazıyıcı (COSTAR)
Thoma Lamı (HAUSSER)
LightCycler 480 Multiwell Plate 96 (ROCHE)
Serolojik Pipetler (2ml, 10 ml, 25 ml) (TPP)
Mikro Pipetler (0,2-2 µl, 2-20 µl, 20-200 µl) (THERMO SCIENTIFIC)
Pipet Uçları (Beyaz, Sarı, Mavi) (GREINER BIO-ONE)
Eppendorf Tüpler (200 µl, 500 µl, 1500 µl, 2000 µl) (GRENIER)
Cryo Tüpler (GRENIER)
Santrifüj Tüpleri (15 ml, 50 ml) (GRENIER)
Serolojik Pipetler için Pipetör (GRENIER LABORTECHNIK)

3.3. Kullanılan Cihazlar

Class 2 Laminar Kabin (TEZSAN)
CO₂ İnkübatör (HERAEUS)
Işık mikroskopları (CARL ZEISS/JENA “SEDIVAL” ve “JENAVAL”)
Açılır Rotorlu Santrifüj (HETTICH UNIVERSAL)
Hettich mikro 200R Soğutmalı Santrifüj (HETTICH UNIVERSAL)
Thermal Cyclers (TECHNE)

Distile Su Cihazı (LABCONCO)
-20°C Derin Dondurucu (ARISTON)
-80°C Derin Dondurucu (NUAIRE)
Derin Donduruculu Buzdolabı (BEKO)
Çalkalayıcı (EDMUND BÜHLER BIOTECHNOLOGIE)
Hassas Terazı (CHYO)
Mikrodalga Fırın (ARÇELİK)
Jel Elektroforezi (THERMO ELECTRON CORPORATION)
Jel Elektroforezi Tankı (BETHESDA RESEARCH LABORATORIES)
Jel Görüntüleme Sistemi (Vilber Lourmat)
LightCycler 480 Gerçek Zamanlı PZR için Thermal Cycler (ROCHE)
Spektrofotometre NanoDrop 2000 (THERMO SCIENTIFIC)

3.4. Yöntem

3.4.1. Hücrelerin Kültüre Alınması

Azot tankında muhafaza edilen hücrelerin oda sıcaklığında çözünmesi beklendi. Santrifüj tüplerine (15 ml), %10 fetal sığır serumu ve %1 penisilin/streptomisin içeren RPMI-1640 besiyeri eklendi ve hücreler pipetle yavaşça damlalar halinde hazırlanan besiyerine eklendi. Hücre pelleti elde edebilmek için 1500 RPM'de 5 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüj sonunda üst faz atıldı; pellet besiyeri ile pipetaj yapılarak çözüldükten sonra yeni kültür şişesine aktarıldı. Hücreler %5 CO₂ içeren 37°C'lik inkübatöre kaldırılarak büyümeye bırakıldı.

3.4.2. Hücre Kültürü

LNCaP hücrelerinin en uygun büyüme koşulları, %10 fetal sığır serumu ve %1 penisilin/streptomisin içeren RPMI-1640 besiyeri ve 37°C'de %5 CO₂ içeren sıcaklık ortamı olarak bildirilmiştir. RPMI-1640 birçok hücre tipi için uygun bir besiyeri olmasına karşın, hormonlar, lipitler, büyüme ve adhezyon faktörleri açısından zengin olan fetal sığır serumu ayrıca ilave edildi. Gram-pozitif bakterilere karşı penisilin, gram-negatif bakterilere karşı streptomisin antibiyotik karışımı kullanıldı.

Hücreler ilk olarak 25 cm²'lik kültür kaplarına ekildi ve yeterli sayıya ulaşıncaya 75 cm²'lik hücre kültür kaplarına aktarıldı. Yaklaşık 34 saatte bir bölünen LNCaP hücrelerinin pasajlamaları ise, hücreler kültür kabının yaklaşık %70-80'ini kapladığında, haftada 1 veya 2 defa olacak şekilde gerçekleştirildi. Pasajlamalar yapılırken kültür kaplarındaki besiyerleri uzaklaştırıldı ve hücrelerin tutundukları kap yüzeyinden ayrılmalarını sağlamak amacıyla her 75 cm²'lik kültür kabı için 3 ml tripsin-EDTA kullanıldı. Üzerlerine tripsin-EDTA eklenen hücreler, tripsin için en uygun çalışma sıcaklığı olan 37°C'lik inkübatörde 3 dakika bekletildi. Birbirleriyle ve kap yüzeyiyle bağlantıları kopmuş olan hücreler pipetle toplandı ve 15 ml'lik santrifüj tüplerine aktararak 1000 RPM'de 10 dak. santrifüjlendi. Tüpte üst fazı oluşturan tripsin-EDTA uzaklaştırıldı ve pelleti oluşturan hücreler yoğunluklarına bağlı olarak uygun hacimde besiyeri içinde çözüldü. Hücrelerin bir kısmı (yaklaşık 1/5'i) 15 ml besiyeri içeren 75 cm²'lik yeni kültür kaplarına aktararak %5 CO₂ ortamını sağlayan 37°C'lik inkübatöre büyümeleri için kaldırıldı.

3.4.3. Hücrelerin Androjen ile Muamelesi

Hücre kültürü besiyerinde kullanılan serum kaynaklı hormonların deney sonuçlarını etkilemesini engellemek için fetal sıgır serumu, DHT uygulamasından önce, dekstran kaplı kömür ile muamele edildi ve tüm steroid hormonlar uzaklaştırıldı. Bunun için 0,1 gram kömür 5 ml serum ile karıştırıldı ve +4°C'de çalkalayıcı üzerinde gece boyu inkübasyona bırakıldı. Serum, inkübasyon sonrasında 2000 RPM'de 30 dakika santrifüjlendi. Üst faz alındı ve DHT uygulamasını inhibe edebilecek kalan kömür moleküllerini uzaklaştırmak amacıyla, iki defa 0,2 µm'lik filtreden geçirildi. Bu şekilde, steroid hormonlardan arındırılmış serum ve antibiyotik içeren RPMI-1640 besiyeri hazırlanarak, kullanılıncaya kadar +4°C'de muhafaza edildi.

Dihidrotestosteron (DHT, C₁₉H₃₀O₂; sinonim 5α-androstan-17β-ol-3-one) etanol içerisinde çözülerek stok çözeltisi (10 nM) hazırlandı ve alikotlar halinde -20°C'de muhafaza edildi.

Kültüre alınan hücreler yeterli sayıya ulaştığında (4. pasajdan itibaren) hormon muamelesine başlandı. Androjen uygulaması 6 kuyu içeren petri kaplarında gerçekleştirildi ve 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 ortamdaki uzaklaştırıldı ve 0, 1, 10,

100 nM konsantrasyonlarda DHT stok dilüsyonları eklenerek 24 saatliğine inkübatöre kaldırıldı. Sürenin sonunda önce besiyerleri toplanarak -80°C 'ye kaldırıldı. Ardından hücreler kazıma yoluyla hasat edildi ve sonraki analizlerde kullanılmak üzere -80°C 'ye kaldırıldı.

3.4.4. Hücre ve Kültür Besiyerlerinden RNA İzolasyonu

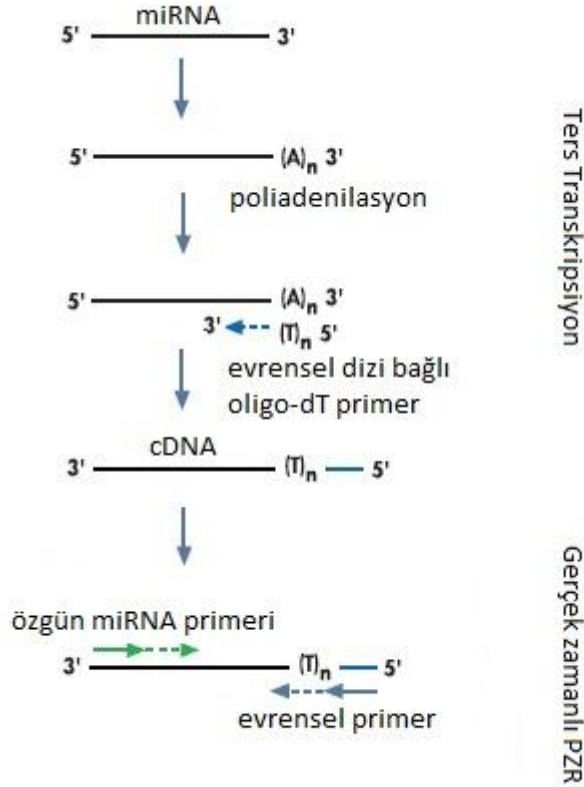
Hücre ve besiyerlerinden RNA izolasyonu, ticari olarak temin edilen RNA izolasyon solüsyonu ile (TriPure) önerilen protokole göre gerçekleştirildi. Bunun için öncelikle hücrelerin üzerine 1 ml, 200 μl besiyeri üzerine ise 800 μl RNA izolasyon solüsyonu eklendi ve iyice karıştırılıp nükleoprotein komplekslerin ayrılması için 2 dakika oda ısısında muamele edildi. Tüp içeriklerine 200 μl kloroform eklenerek kısa bir vorteks sonrasında 5 dakika oda ısısında inkübasyon gerçekleştirildi. İnkübasyon sonrasında örnekler 4°C 'de 12.000xg'de 15 dakika santrifüjlendi. Santrifüjle 3 faza ayrılan örneklerin en üst kısmındaki renksiz fazlar RNA izolasyonu için yeni tüplere aktarıldı; üzerlerine 500 μl izopropanol eklenerek iyice karıştırıldı ve RNA'nın ayrılabilmesi için 5 dakika oda ısısında inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında örnekler 4°C 'de 12.000xg'de 10 dakika santrifüjlendi ve üst faz atıldı. Örnekler üzerine, %75'lik soğuk etanolden 1'er ml eklendi ve vorteksenerek RNA yıkandı. Sonrasında 4°C 'de 7.500xg'de 5 dakika santrifüjlendi ve üst faz atıldı. Kalan etanolün buharlaşması için örnekler 10 dakika oda ısısında bekletildi. Son olarak, elde edilen RNA, 50 μl RNaz DNaz içermeyen su içerisinde çözüldü.

RNA konsantrasyon ve saflıkları spektrofotometrik yöntemle analiz edildi. Protein ve fenol benzeri moleküllerin 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 'ye kaldırıldı.

3.4.5. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

İzole edilen total RNA'dan cDNA sentezi, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonlarında kullanıma uygun olacak şekilde mRNA, miRNA ve diğer kodlama yapmayan RNA'lardan eş zamanlı cDNA sentezinin gerçekleştirilebilmesine olanak sağlayan bir kit (miScript II RT Kit) ile protokole uygun şekilde gerçekleştirildi. Kullanılan kit RNA moleküllerini standart şekilde cDNA'ya çevirirken oldukça küçük olan miRNA'ların polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılabilmelerini sağlamak amacıyla özel bir cDNA sentez yaklaşımı izlemektedir. Bu yaklaşımda, miScript Ters

Transkripsiyon karışımı içerisinde bulunan iki enzimden ilki olan poli-A polimeraz miRNA moleküllerine poli-A kuyruğu eklerken, ikinci enzim olan ters transkriptaz, oligo-dT primerleri kullanarak poli-A eklenmiş miRNA moleküllerini cDNA'ya çevirir. Bu sayede miRNA'lar PZR ile çoğaltılabilmekte ve yaklaşık 80 baz çifti (bç) uzunluğunda PZR ürünleri elde edilebilmektedir (Şekil 3-1).



Şekil 3-1: miRNA'lardan cDNA sentez şeması

Kite dahil olan reaksiyon bileşenleri her bir örnek için Tablo 3-1'de belirtilen hacimlerde hazırlandı ve son hacim 20 μ l'ye tamamlanacak şekilde kitin çalışma protokolüne uygun olarak kullanıldı.

Kalıp RNA moleküllerini de içeren reaksiyon karışımları, PZR cihazına yerleştirildi ve 37°C sıcaklıkta 60 dakikalık inkübasyonu takiben ters transkripsiyon enziminin aktivitesini kaybetmesi için 95°C'de 5 dakika bekletildi.

Elde edilen cDNA'lar buz üzerine alınarak spektrofotometrik yöntemle konsantrasyon ve saflıkları ölçüldü. Konsantrasyonlar ortalama 550 nM olarak

ölçülürken, saflıklar da 1,7-1,8 aralığında ölçüldü. cDNA örnekleri daha sonra nicel gerçek zamanlı PZR işlemine tabi tutulmak üzere -20°C dondurucuya kaldırıldı.

Tablo 3-1: RNA'dan cDNA sentez reaksiyonu bileşenleri

Malzeme	Örnek Başına Kullanılan Miktar
5x miScript HiFlex Tamponu	4 µl
10x Nucleics Mix	2 µl
RNaz İçermeyen Su	7 µl
miScript Ters Transkripsiyon Karışımı	2 µl
Kalıp RNA	5 µl

3.4.6. Nicel Gerçek Zamanlı PZR

Tez çalışmasına konu olan RNA moleküllerinin anlatım düzeyleri SYBR Green I floresan boya kullanılarak LightCycler 480 (Roche) cihazında nicel gerçek zamanlı PZR ile analiz edildi. PSA ve PCA3 moleküllerinin analizi için LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche), miR-141 ve miR-375 moleküllerinin analizi için ise miScript SYBR Green PCR Kit (Qiagen) kullanıldı.

Nicel gerçek zamanlı PZR'de PZR ürünlerinin oluşumu, SYBR Green I moleküllerinin oluşturduğu floresan ışımının ölçümü ile takip edilebilmektedir. SYBR Green I molekülünün çift zincirli DNA moleküllerine bağlanma verimi çok yüksektir ve serbest boya molekülleri çok az floresan ışımaya yapmaktadır. PZR sürecinde primerlerin hedef DNA molekülüne bağlanmasıyla 530 nm'de SYBR Green floresan ışması ölçülebilir hale gelmekte ve uzama fazında ise daha fazla çift zincir DNA molekülünün oluşmasıyla floresan sinyal giderek güçlenmektedir. Bu sayede nicel gerçek zamanlı PZR'de her uzama fazının sonunda 530 nm'de floresans miktarı ölçülerek PZR ürün miktarı hesaplanabilmektedir.

PSA ve PCA3 moleküllerinin PZR işlemi sırasında, bu moleküllerin dizilerine özgül olan ileri (F) ve geri (R) primerler kullanıldı. miRNA moleküllerinin analizinde ise özgün dizi içeren uçlarda moleküllere özgül primerler kullanılırken, poliadenillenmiş uçta cDNA sentez aşamasında eklenmiş olan poliA dizisine komplementer ve analizi gerçekleştirilecek her miRNA için standart olan “evrensel primer” kullanıldı. Göreceli gen ifadesi analizi için gerekli olan normalizasyon işlemi ise miRNA’lar için miR-16, PCA3 ve PSA için ise *GAPDH* primerleri kullanılarak gerçekleştirildi. PZR işleminde kullanılan ileri ve geri primer dizileri Tablo 3-2’de gösterilmiştir.

Tablo 3-2: PZR’de kullanılan primer dizileri

Hedef	İleri Primer Dizisi	Geri Primer Dizisi
PSA	TGA ACC AGA GGA GTT CTT GAC	CCC AGA ATC ACC CGA GCA
PCA3	GGT GGG AAG GAC CTG ATG ATA C	GGG CGA GGC TCA TCG AT
GAPDH	GCT CTC TGC TCC TCC TGT TC	ACG ACC AAA TCC GTT GAC TC
miR-141	UAA CAC UGU CUG GUA AAG AUG G	EVRENSEL PRİMER
miR-375	UUU GUU CGU UCG GCU CGC GUG A	EVRENSEL PRİMER
miR-16	UAG CAG CAC GUA AAU AUU GGC G	EVRENSEL PRİMER

PZR’de kullanılan reaksiyon bileşenleri, kullanılan primer ve kitlerin farklılığı sebebiyle Tablo 3-3 ve Tablo 3-4’teki miktarlarda, ayrı ayrı hazırlandı ve farklı reaksiyonlar gerçekleştirildi.

Tablo 3-3: miRNA'ların analizinde örnek başına kullanılan reaksiyon bileşenleri

Reaksiyon Bileşeni	Miktar
SYBR Green	10 µl
Universal Primer	2 µl
Özgül Primer	2 µl
DNaz, RNaz İçermeyen Su	5 µl
cDNA	1 µl

Tablo 3-4: PCA3 ve PSA analizinde örnek başına kullanılan reaksiyon bileşenleri

Reaksiyon Bileşeni	Miktar
SYBR Green	10 µl
İleri Primer	0,5 µl
Geri Primer	0,5 µl
DNaz, RNaz İçermeyen Su	6 µl
cDNA	3 µl

PZR işlemleri sırasında kullanılan polimeraz enzimini aktive etmek için (“hot start”) reaksiyon bileşenleri başlangıçta 95°C’de muamele edildi ve denatürasyon, bağlanma, sentez aşamaları Tablo 3-5 ve Tablo 3-6’daki PZR koşullarına göre gerçekleştirildi. PZR sonrasında hedeflenen genler dışında bir ürünün çoğalmadığından ve primer dimerlerinin oluşmadığından emin olmak için “erime eğrisi analizi” yapıldı. Erime eğrisi analizi ile PZR ürün karakterizasyonu; DNA molekülünün, uzunluğu ve GC içeriğine bağlı olarak, sıcaklık muamelesiyle %50’sinin tek sarmallı hale geldiği %50’sinin ise çift sarmallı olarak kaldığı karakteristik bir erime sıcaklığına sahip

olmasına dayanmaktadır. Analiz sırasında reaksiyon karışımı 95 °C'ye kadar ısıtılır. Isıtma sürecinde sıcaklık, PZR ürününün erime sıcaklığına ulaştığında çift zincirli DNA erir ve SYBR Green floresan ışımalarının keskin bir şekilde azalmasına neden olur. Bu sayede sıcaklık geçişlerinde floresan ışımalarının sürekli olarak takip edilmesiyle oluşturulan erime eğrileriyle analiz sonucu gözlemlenebilmektedir.

Analize paralel olarak moleküllerin büyüklük analizleri agaroz jel elektroforezi ile tayin edildi. Jeller, agaroz konsantrasyonu %2 olacak şekilde hazırlandı, UV ışık altında gözlem yapılabilmesi için son konsantrasyonu 0,5 mg/ml olacak şekilde EtBr eklendi ve tampon olarak 0,5 X konsantrasyonda TBE kullanıldı. Örnekler 120 voltta 30 dakika yürütülerek elektroforez işlemi gerçekleştirildi ve işlem sonrasında jel dokümantasyon sisteminde UV ışık altında incelenerek değerlendirme yapıldı.

Tablo 3-5: miR-141 ve miR-375 analizlerinde uygulanan PZR koşulları

	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
Aktivasyon	95	15 dakika	1
Denatürasyon	94	15 saniye	45
Yapışma	55	30 saniye	
Uzama	70	30 saniye	
Erime Eğrisi Analizi	95	1 saniye	1
	40	1 saniye	
	50	1 saniye	
	95	Devamlı	
Soğutma	40	10 saniye	1

Tablo 3-6: PSA ve PCA3 analizlerinde uygulanan PZR koşulları

	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
Pre-inkübasyon	95	5 dakika	1
Denatürasyon	95	10 saniye	49
Yapışma	60	20 saniye	
Uzama	72	30 saniye	
Erime Eğrisi Analizi	95	5 saniye	1
	65	1 dakika	
	95	Devamlı	
Soğutma	40	10 saniye	1

Elde edilen PZR verilerinin değerlendirilebilmesi için normalizasyon işlemleri gerçekleştirildi ve moleküllerin ifadelerinin hesaplanmasında $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metodundan faydalanıldı. Bunun için ifade seviyelerinin çok değişkenlik göstermemesi beklenen miR-16 ve *GAPDH* molekülleri referans olarak kullanıldı.

3.4.7. İstatiksel Analizler

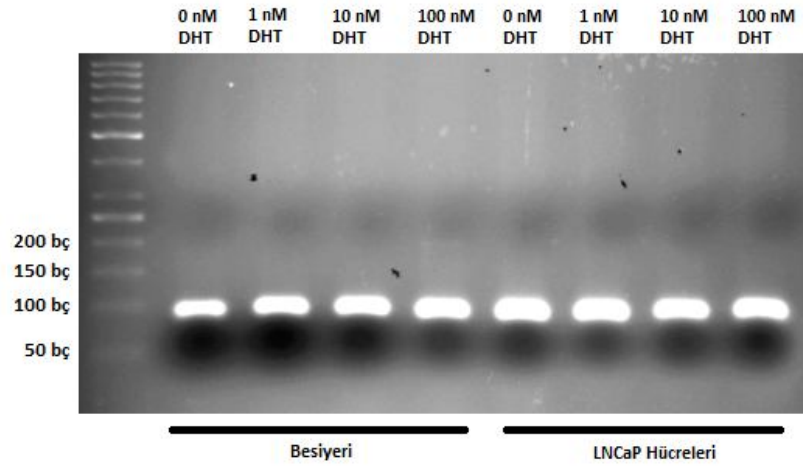
Tez çalışmasında, LNCaP hücrelerinin androjenle muamelesini takiben miR-141, miR-375, PSA mRNA ve PCA3 moleküllerinin ifade düzeyleri ve hücreden kültür besiyerine salınımları araştırıldı. Bu amaç için birbirinden bağımsız olarak gerçekleştirilmiş 5 hücre kültürü deneyinin bulguları kullanıldı. Gen ifadesindeki değişimler, androjenle muamele edilmeyen hücrelerdeki değerlere (bazal seviyeler) göre “kat değişimi” olarak ifade edildi. İstatiksel karşılaştırma “medyan testi” kullanılarak yapıldı. $p < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

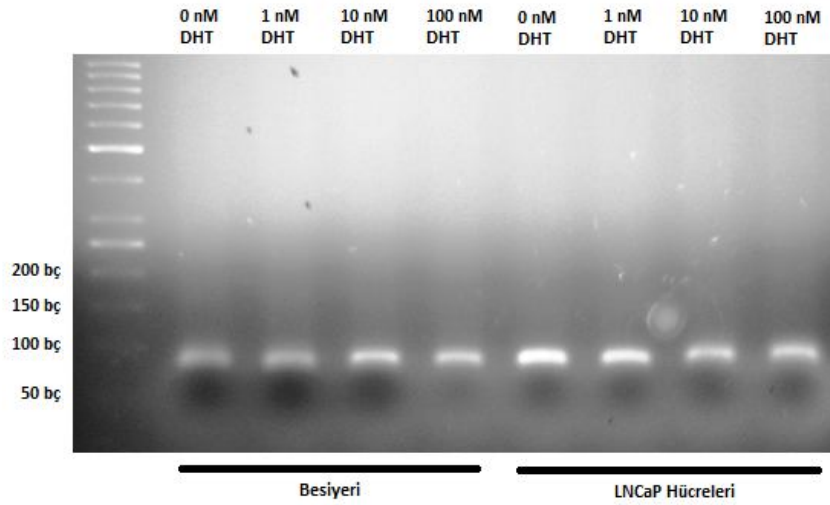
Tez çalışmasında, prostat kanserinde miR-141 ve miR-375 moleküllerinin öneminden yola çıkarak, bu iki molekülün ifadelerinin düzenlenmesi ve hücre dışına salınımlarında androjenin etkisi araştırılmıştır. Tez çalışmasında ayrıca, ifadelerinin androjenlerce düzenlendiği bilinen PSA ve PCA3 karşılaştırma molekülleri olarak kullanıldı. Çalışma *in vitro* koşullarda, androjene duyarlı bir prostat kanseri hücre hattı olan LNCaP hücreleri kullanılarak gerçekleştirildi. Androjenden arındırılmış besiyerinde büyütülen hücreler 24 saat süresince 0, 1, 10 ve 100 nM konsantrasyonlarda testosteronun daha aktif metaboliti olan 5 α -dihidrotestosteron (DHT) ile muamele edildiler. Muamele sonrasında, moleküllerin ifade seviyeleri ve hücre dışına salınımları nicel PZR'de incelendi.

4.1. Androjen ile Muamele Sonrasında Hücrelerden ve Besiyerlerinden Çoğaltılan Moleküllerin Uzunluk Analizleri

Tez çalışmasında, kodlama yapmayan kısa RNA dizileri olan miR-141 ve miR-375 moleküllerinin yanı sıra PSA mRNA'sı ve bir uzun kodlama yapmayan RNA olan PCA3'ün de kullanılması nedeniyle gerek hücrelerden gerekse kültür besiyerinden RNA eldesi tüm RNA moleküllerini içerecek şekilde gerçekleştirildi. Elde edilen tüm RNA, spektrofotometrik yöntemle miktar ve saflık açısından kontrolünün yapılmasından sonra cDNA'ya dönüştürüldü. Bu aşamada, mRNA, miRNA ve uzun kodlama yapmayan RNA moleküllerinden cDNA elde edilebilmesine olanak sağlayan bir protokol izlenmiştir. Detaylı anlatımı Gereç ve Yöntemler Bölümü'nde bulunan bu protokole göre mRNA ve uzun kodlama yapmayan RNA moleküllerinin cDNA'ya çevrilmeleri standart bir şekilde gerçekleştirilirken, miRNA moleküllerinin 3' ucuna poli-A kuyrukları eklenmekte ve cDNA'ya çevrilmeleri sırasında poli-T primerleri kullanılarak, PZR sonrasında yaklaşık 80-90 bp uzunluğunda PZR ürünleri elde edilebilmektedir. Çalışmada gerçekleştirilen nicel gerçek zamanlı PZR sonrasında miRNA PZR ürünlerinin uzunlukları beklendiği gibi yaklaşık 80-90 bp olarak teyit edilmiştir. Şekil 4-1 ve 4-2'de PZR sonrasında miR-141 ve miR-375 moleküllerinin agaroz jel elektroforezi sonucu elde edilen görüntüleri gösterilmektedir.

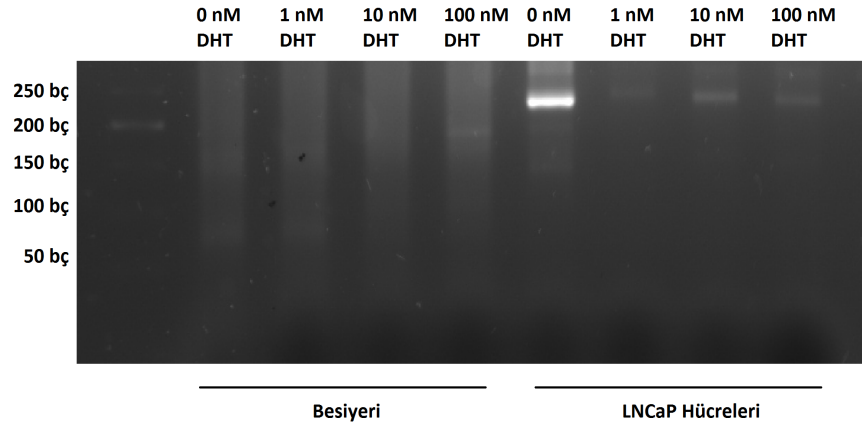


Şekil 4-1: Hücre ve besiyerlerinden elde edilerek çoğaltılan miR-141 molekülünün büyüklük analizi

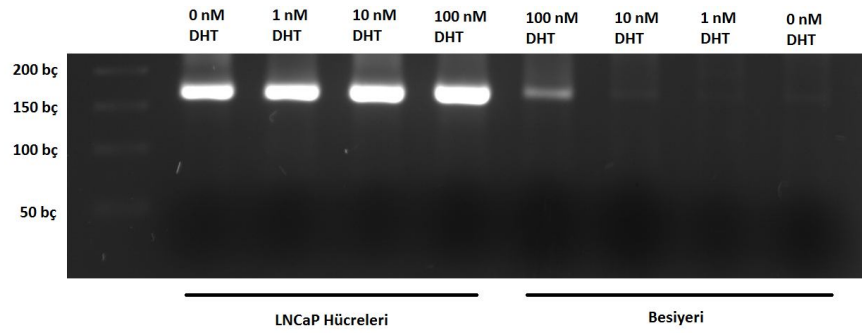


Şekil 4-2: Hücre ve besiyerlerinden elde edilerek çoğaltılan miR-375 molekülünün büyüklük analizi

Şekil 4-3 ve 4-4'te ise aynı koşullarda agaroz jel elektroforezi yöntemiyle analiz edilen PSA mRNA ve PCA3 PZR ürünlerinin jel görüntüleri görülmektedir. PCA3 PZR ürününün uzunluğu yaklaşık 250 bç olarak gözlemlenirken, PSA mRNA PZR ürününün boyu yaklaşık 160 bç olarak gözlemlenmiştir.



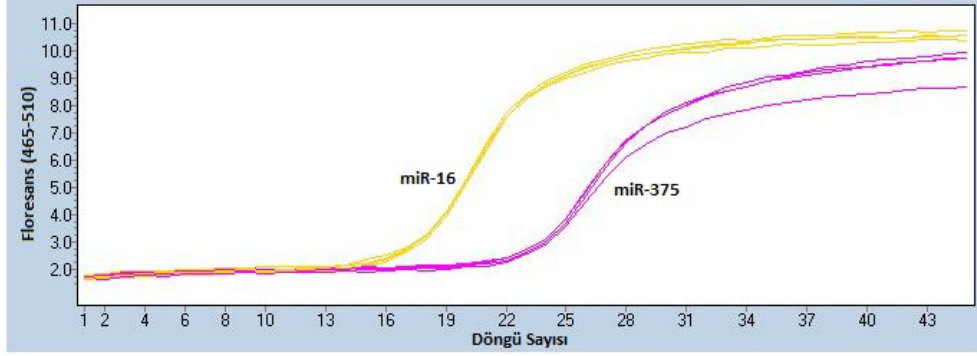
Şekil 4-3: PCA3 molekülüne ait PZR ürünlerinin büyüklük analizi



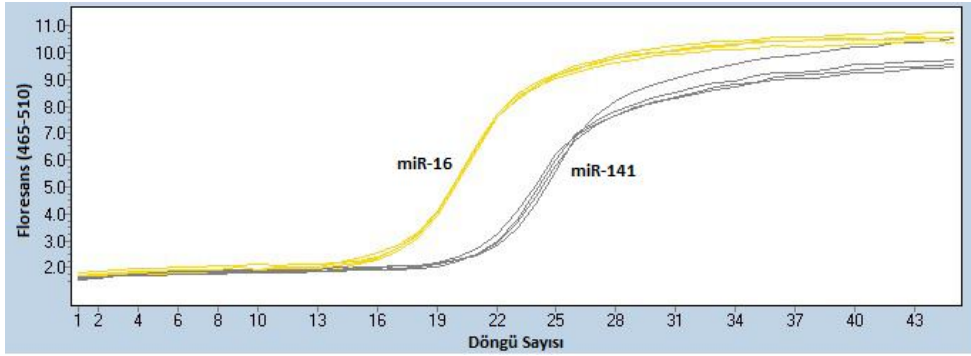
Şekil 4-4: PSA molekülüne ait PZR ürünlerinin büyüklük analizi

4.2. Nicel Gerçek Zamanlı PZR ile Çoğaltılan Moleküllerin Çoğalma Eğrileri ve Erime Eğrisi Analizleri

Çalışmada incelenen miRNA molekülleri olan miR-141 ve miR-375'in miktar tayin analizinde mir-16 molekülü referans molekül olarak kullanılmıştır. miR-16 molekülü, ifade düzeyinin farklı koşullarda kararlı kalması nedeniyle bir çok çalışmada "kontrol molekülü" olarak tercih edilen bir miRNA olarak dikkati çekmektedir. Şekil 4-5 ve 4-6'da da görüldüğü gibi, farklı DHT konsantrasyonlarında miR-16 molekülünün aynı düzeyde ifade edildiği görülmektedir. miR-141 ve miR-375 ifadesinde ise küçük farklılıkların olduğu dikkati çekmektedir.

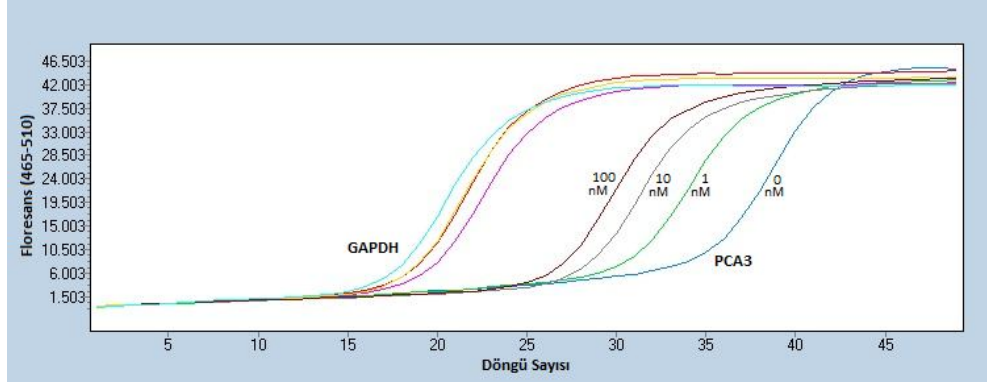


Şekil 4-5: DHT ile muamele edilen LNCaP hücrelerinde miR-375 molekülünün çoğalma eğrileri

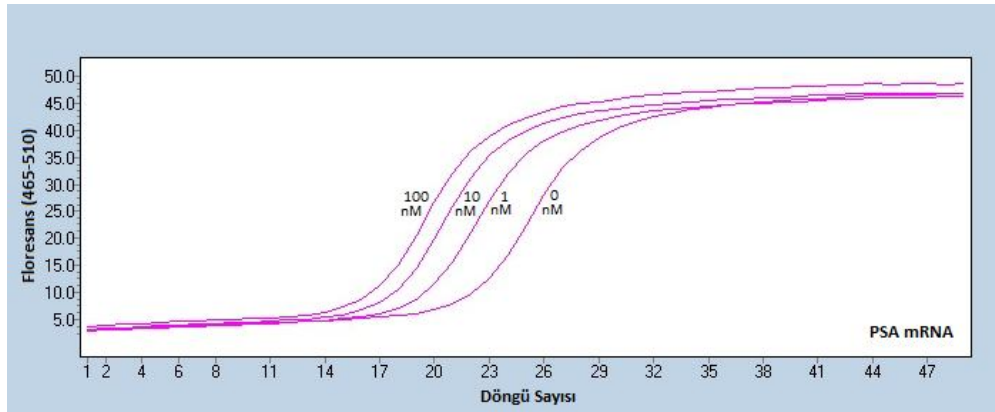


Şekil 4-6: DHT ile muamele edilen LNCaP hücrelerinde miR-141 molekülünün çoğalma eğrileri

PSA ve PCA3 genlerinin ifade analizlerinde ise GAPDH referans olarak kullanıldı. Şekil 4-7'de görüldüğü üzere, GAPDH ifadesi farklı DHT konsantrasyonlarında nispeten kararlı iken, PCA3 anlatım düzeyinin artan DHT konsantrasyonu ile bariz şekilde arttığı göze çarpmaktadır. Benzer durum PSA için de geçerlidir. Artan DHT dozlarının PSA anlatımını uyardığı gözlenmektedir (Şekil 4-8).

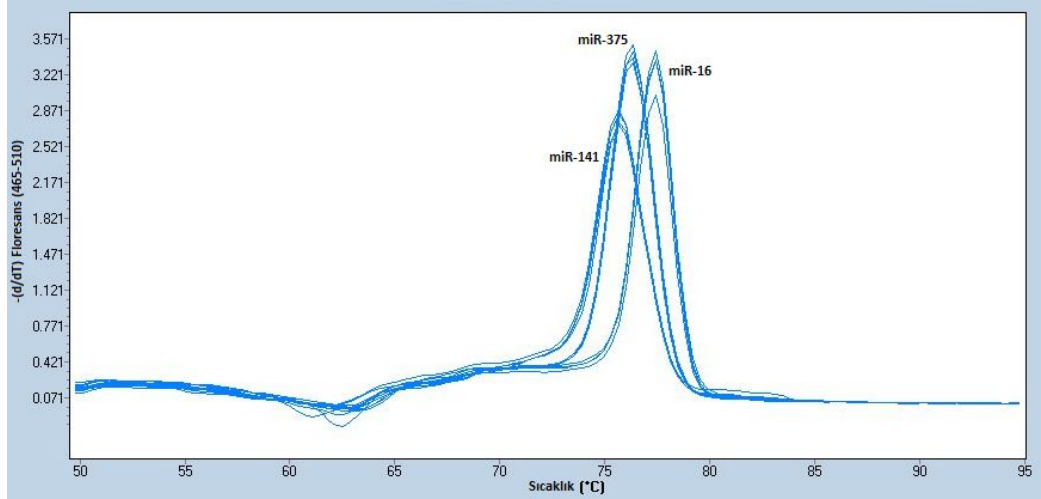


Şekil 4-7: DHT ile muamele edilen LNCaP hücrelerinde PCA3 çoğalma eğrileri

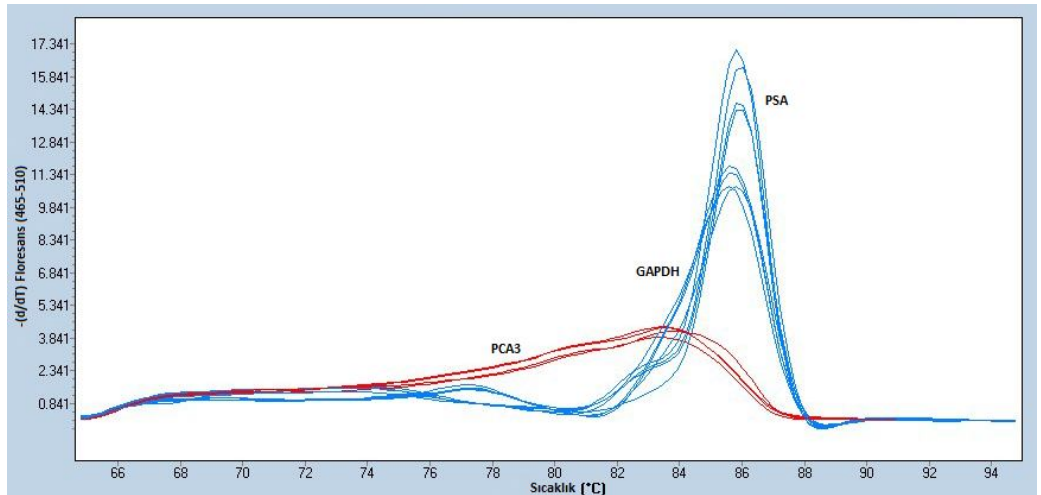


Şekil 4-8: DHT ile muamele edilen LNCaP hücrelerinde PSA mRNA çoğalma eğrileri

Tez çalışmasında çoğalma eğrilerinin analizlerinin ardından erime eğrisi analizleri de gerçekleştirilmiş olup PZR ürünlerinin özgülüğü teyit edilmiştir. Şekil 4-9'da miRNA moleküllerinin erime tepeleri gösterilmektedir. Her bir molekül dizisinin kendine özgü guanin-sitozin içerikleri ve molekül büyüklüklerine bağlı olarak özgül erime tepeleri oluşturdukları görülmektedir. Şekil 4-10'da ise kültür besiyerlerinden çoğaltılan PSA ve PCA3 moleküllerinin erime tepeleri yer almaktadır. Burada PSA ve GAPDH moleküllerine özgü erime tepeleri gözlemlenirken, PCA3'ün saptanabilir düzeyde olmaması nedeniyle bu moleküle ait özgül bir erime tepesi oluşmamıştır.



Şekil 4-9: LNCaP hücrelerinden çoğaltılan miRNA moleküllerine özgü erime tepeleri



Şekil 4-10: Kültür besiyerlerinden çoğaltılan PSA ve PCA3 moleküllerine özgü erime tepeleri

4.3. miR-141, miR-375, PSA ve PCA3 Moleküllerinin DHT Dozlarına Bağlı İfade ve Hücre Dışına Sahnım Seviyelerinin Analizi

Hedef moleküllerin, LNCaP hücrelerinde ve kültür besiyerindeki miktarlarını değerlendirmek için birbirinden bağımsız olarak gerçekleştirilen 5 hücre kültürü deneyinin bulguları kullanıldı. Hedef moleküllerin ifade düzeyleri göreceli olarak (“semi-quantitative”) hesaplandı. Bu amaçla nicel PZR’de eşik floresan ışımaya değerinin aşıldığı döngüye (Ct, “Cycle treshold”) dayanan $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodundan faydalanıldı. Bu

metoda göre, hedef molekülün Ct değerinin kontrol amaçlı kullanılan molekülün Ct değerine bölünmesiyle, örnekler arasındaki değişimlerin normalize edilmesi sağlandı. Tablo 4-1 ve Tablo 4-2’de, miR-141, miR-375, PSA mRNA ve PCA3 moleküllerinin, 0, 1, 10 ve 100 nM DHT ile muamele edilen LNCaP hücrelerinde ve hücrelerden salınım sonrası kültür besiyerinde göreceli miktarları yer almaktadır.

miR-141 ve miR-375’in LNCaP hücrelerindeki bazal ifade seviyeleri karşılaştırıldığında miR-141’in (ortalama 0,14), miR-375’e (ortalama 0,005) göre daha yüksek seviyede ifade edildiği görülmektedir. PCA3’ün bazal seviyesinin, PSA’ya (ortalama 0,07) oranla yaklaşık 3800 kat daha düşük olduğu belirlenmiştir.

Tablo 4-1: miR-141, miR-375, PSA mRNA ve PCA3 moleküllerinin LNCaP hücrelerinde göreceli ifade düzeyleri

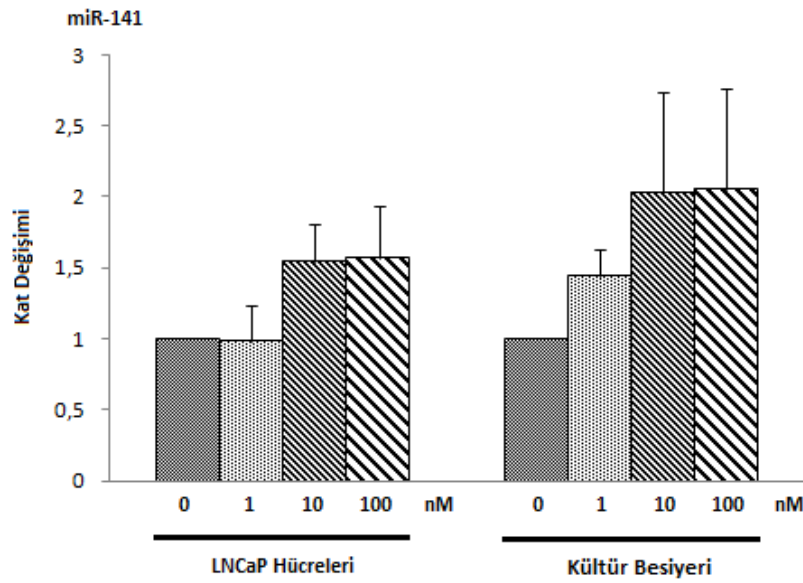
LNCaP Hücrelerinde Göreceli İfade Düzeyi				
miR-141				
DHT (nM)	0 nM	1 nM	10 nM	100 nM
Deney 1	0,031	0,046	0,072	0,061
Deney 2	0,056	0,010	0,066	0,067
Deney 3	0,122	0,073	0,121	0,067
Deney 4	0,211	0,311	0,425	0,279
Deney 5	0,269	0,313	0,324	0,734
miR-375				
DHT (nM)	0 nM	1 nM	10 nM	100 nM
Deney 1	0,003	0,004	0,004	0,004
Deney 2	0,007	0,003	0,008	0,021
Deney 3	0,007	0,008	0,008	0,010
Deney 4	0,004	0,005	0,005	0,003
Deney 5	0,003	0,004	0,004	0,002
PCA3				
DHT (nM)	0 nM	1 nM	10 nM	100 nM
Deney 1	0,00001	0,0004	0,0012	0,0019
Deney 2	0,00001	0,0003	0,0011	0,0015
Deney 3	0,00003	0,0004	0,005	0,002
Deney 4	0,00002	0,0006	0,008	0,014
Deney 5	0,00002	0,0009	0,012	0,004
PSA mRNA				
DHT (nM)	0 nM	1 nM	10 nM	100 nM
Deney 1	0,161	2,52	3,983	4,931
Deney 2	0,092	1,33	1, 838	1,982
Deney 3	0,049	0,712	0,72	0,946
Deney 4	0,029	0,37	1,01	0,95
Deney 5	0,014	0,238	0,94	1,18

Tablo 4-2: miR-141, miR-375, PSA ve PCA3 moleküllerinin hücre kültürü besiyerinde göreceli miktarları

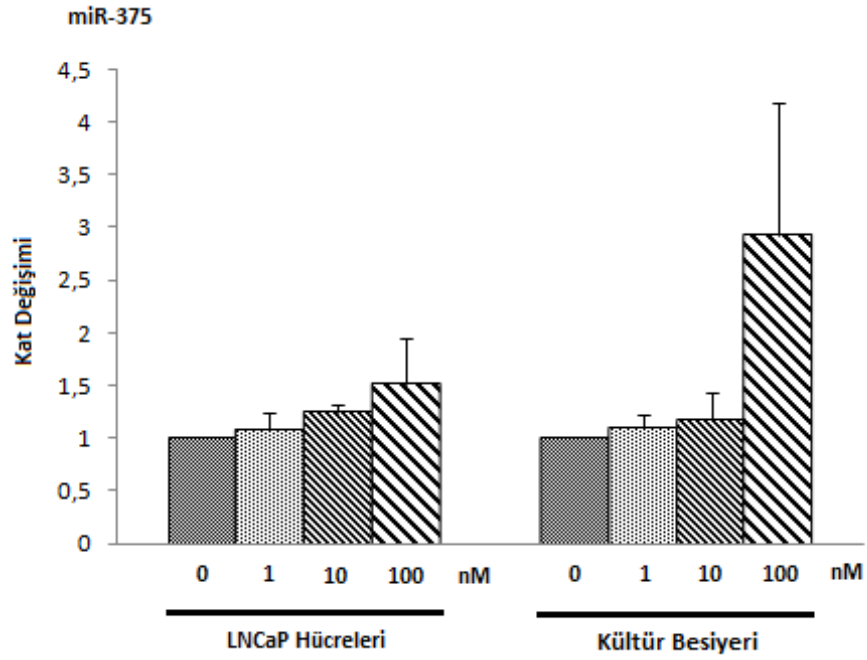
Hücre Kültürü Besiyerinde Göreceli Miktar				
miR-141				
DHT (nM)	0 nM	1 nM	10 nM	100 nM
Deney 1	0,031	0,06	0,07	0,132
Deney 2	0,034	0,056	0,024	0,023
Deney 3	0,012	0,029	0,057	0,036
Deney 4	0,333	0,367	0,449	0,567
Deney 5	0,529	0,554	0,589	0,297
miR-375				
DHT (nM)	0 nM	1 nM	10 nM	100 nM
Deney 1	0,006	0,008	0,012	0,041
Deney 2	0,002	0,002	0,002	0,002
Deney 3	0,005	0,003	0,002	0,002
Deney 4	0,005	0,005	0,003	0,005
Deney 5	0,005	0,005	0,006	0,021
PCA3				
DHT (nM)	0 nM	1 nM	10 nM	100 nM
Deney 1	0	0	0	0
Deney 2	0	0	0	0
Deney 3	0	0	0	0
Deney 4	0	0	0	0
Deney 5	0	0	0	0
PSA mRNA				
DHT (nM)	0 nM	1 nM	10 nM	100 nM
Deney 1	0,0528	0,232	0,289	0,36
Deney 2	0,057	0,627	0,409	0,508
Deney 3	0,059	0,67	0,72	0,92
Deney 4	0,068	0,61	0,69	0,87
Deney 5	0,081	0,73	0,86	1,1

İstatiksel karşılaştırma ve gen ifade düzeylerinin grafiksel gösterimi için, yukarıdaki tablolarda yer alan değerler “kat değişimi” şeklinde ifade edildi. Bunun için, DHT ile muamele edilmeyen hücrelerdeki ifade düzeyleri “1” olarak alınarak (bazal düzey), DHT’nin farklı konsantrasyonlarındaki değişim oranları katlar şeklinde hesaplandı. İstatistiksel karşılaştırma, 5 farklı deneyin değerleri baz alınarak “medyan test” ile yapıldı. Grafiksel gösterimler, gen ifadelerinin ortalama değerlerini ve standart sapmalarını göstermektedir (Şekil 4-11’den 4-14’ e kadar).

Analiz sonucunda DHT muamelesinin hedef moleküller üzerindeki uyarıcı etkisinin farklılık gösterdiği belirlenmiştir. PSA ve PCA3 ile karşılaştırıldığında, DHT'nin miR-141 ve miR-375 moleküllerinin LNCAP hücrelerindeki ifade düzeylerine etkisinin zayıf olduğu görülmektedir. miR-141 ve miR-375 moleküllerinin en yüksek DHT konsantrasyonunda anlatım düzeyleri en fazla 1,5 kat artmıştır ($p=0,07$) (Şekil 4-11 ve 4-12). miRNA moleküllerinin hücre dışına salınımlarındaki değişimler, hücresel ifade seviyelerine benzer gerçekleşmiştir. En yüksek DHT dozu (100 nM) ile muamele edilen hücrelere ait besiyerlerinde, kontrollere göre miR-141 miktarı 1,7 kat ($p=0,07$) miR-375 düzeyi ise 1,4 kat ($p=0,07$) artmıştır. Bu değerler, miR-141 ve miR-375'in artan oranlarının istatistiksel olarak anlamlı olmasa da, anlamlılığa yakın olduğunu göstermektedir.

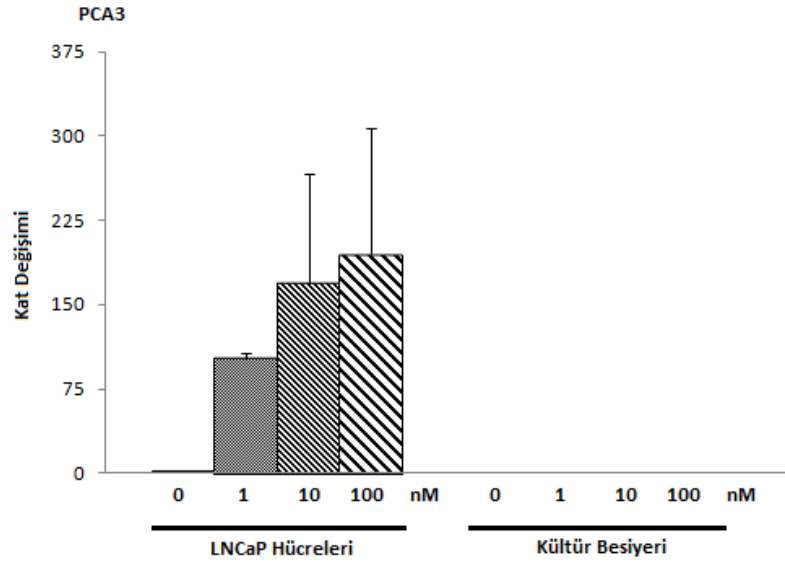


Şekil 4-11: DHT ile muamele edilen LNCaP hücrelerinde miR-141 ifade seviyesi ve hücreden salınımindaki değişimler

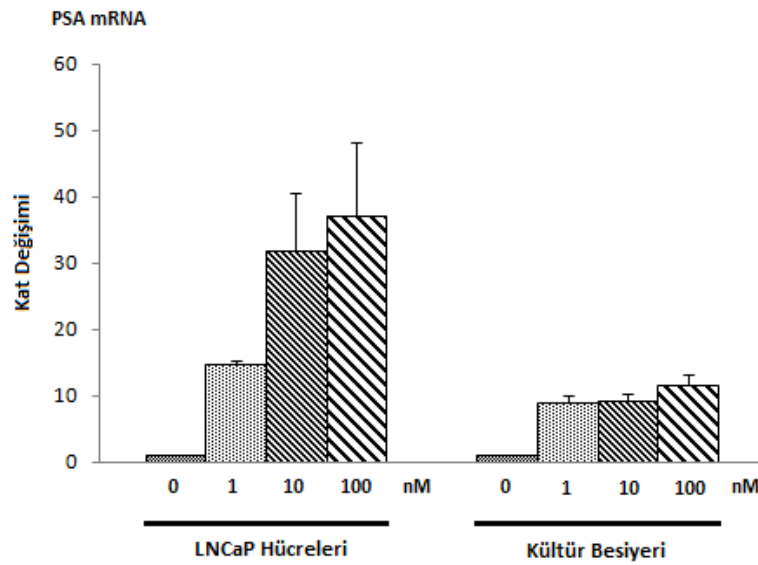


Şekil 4-12: DHT ile muamele edilen LNCaP hücrelerinde miR-375 ifade seviyesi ve hücreden salımmındaki değişimler

miRNA moleküllerinden farklı olarak, DHT'nin PSA mRNA ve PCA3 moleküllerinin ifadesinde çok daha belirgin bir artışa neden olduğu belirlenmiştir. DHT dozuna bağlı olarak, LNCaP hücrelerindeki PSA mRNA miktarı 14-30 kat, PCA3 molekül düzeyi ise yaklaşık 200 kata kadar artmıştır ($p < 0,001$) (Şekil 4-13 ve 4-14). Bu verilere göre DHT muamelesinin PCA3 ifade seviyesi üzerinde daha belirgin bir etkiye sahip olduğu söylenebilir. Kültür besiyerinden PCA3 molekülü çoğaltılamamıştır. Buna karşın beklendiği gibi, DHT uygulaması hücrelerden önemli oranda PSA salınımına yol açmıştır. Hücrelerden salınan PSA miktarında, kontrollere göre 9-12 kat artış ($p < 0,01$) gerçekleşmiştir. (Şekil 4-14).



Şekil 4-13: DHT ile muamele edilen LNCaP hücrelerinde PCA3 ifade seviyesi ve hücreden salınımindaki değişimler



Şekil 4-14: DHT ile muamele edilen LNCaP hücrelerinde PSA (mRNA) ifade seviyesi ve hücreden salınımindaki değişimler

5. TARTIŞMA

Prostat kanseri androjen bağımlı bir kanser tipidir. Androjenler, gerek prostat dokusunun normal gelişimi ve işlev göstermesinde, gerekse prostat karsinogenezinde birinci basamağı oluşturan düzenleyicilerdir. Hücre içerisinde ligandları oldukları androjen reseptörlerine bağlanmalarını takiben, reseptör fosforilasyonu ve dimerizasyonu gerçekleşerek işlevsel androjen reseptörü dimerleri oluşturulur (32). Androjen reseptörleri nükleer transkripsiyon faktörleridir ve en iyi bilinen örnek PSA başta olmak üzere birçok genin ifadesinin düzenlenmesinden sorumludurlar (55). Tez çalışmasında androjen molekülü olarak kullanılan dihidrotestosteron (DHT), testosteronun daha aktif olan hücre içi metabolitidir ve androjen reseptörünün temel ligandı olup, reseptör afinitesi daha yüksektir (2).

Çalışmaya konu olan miR-141 ve miR-375 moleküllerinin ileri evre/metastatik hastalıkla ilişkisi, bu moleküllerin de androjenler tarafından düzenleniyor olabileceği düşüncesini doğurmuştur. Bu noktadan hareketle, tez çalışmasında, androjene duyarlı bir hücre hattı olan LNCaP hücreleri kullanılarak farklı konsantrasyonlarda (0, 1, 10, 100 nM) uygulanan DHT'nin bu moleküllerin ifade seviyelerine etkisi incelenmiştir. Öte yandan belirlenen miRNA'ların hasta serum/plazmalarında bulunan yüksek değerleri, moleküllerin tümör dokusundan kana salınıyor olduklarına işaret etmekte olduğundan (10), hücre kültürü besiyerine salınan miRNA seviyeleri de ayrı bir parametre olarak değerlendirilmiştir. Androjenlerce ifadelerinin düzenlendiği bilinen diğer moleküllerle karşılaştırmalı bir çalışma yapılabilmesi açısından PSA ve PCA3 molekülleri de aynı metotla analiz edilmiştir.

Elde edilen bulgular, DHT'nin analiz edilen moleküllerin anlatım düzeyleri ve hücre dışına salınımlarına farklı şekilde etki ettiği yönündedir. LNCaP hücrelerinde, her iki miRNA'nın da doza bağlı olarak zayıf şekilde uyarıldığı görülürken, PSA ve PCA3 üzerindeki DHT etkisi çok daha belirgin bulunmuştur. Moleküllerin hücre dışına salınımları analiz edildiğinde ise PCA3 haricindeki diğer moleküllerin, hücresel ifade seviyeleriyle korele şekilde salınım gösterdikleri belirlenmiştir. Bu verilere göre androjenlerin miR-141 ve miR-375'in ifade edilmelerine ve salınımlarına etkisinin, PSA mRNA ve PCA3 ile kıyaslandığında sınırlı olduğu söylenebilir. Bu bulgular, adı

geçen moleküllerin androjenler tarafından farklı şekilde düzenleniyor olabileceğine işaret etmektedir.

miR-141 ile ilgili elde edilen veriler güncel çalışmalarla uyumlu bulunmuştur. Waltering ve ark.'nın yayınladığı çalışmada da tez çalışmasına benzer şekilde, androjen uygulamasının miR-141 ifade seviyesini yaklaşık 1,5 kat arttırdığı bildirilmiştir (108).

miR-141, metastaz gelişimi için çok önemli bir adım olan epitelden mezenkimale dönüşümde (EMT) transkripsiyon faktörleri ZEB1 ve ZEB2'yi hedefleyerek EMT'yi baskılayan miR-200 ailesinin bir üyesidir (97, 114, 115) fakat özgül hedefi belirlenmemiştir (108). EMT'nin baskılanması tümör hücresi için bir dezavantaj olsa da ileri evre/metastatik hastalıkta miR-141'in seviyelerinin artma sebebi henüz bilinmemektedir. Öte yandan bir başka çalışmada ise miR-141'in androjen reseptörü işlevinin düzenlenmesinde etkili olabileceği gösterilmiştir (116). AR ile direkt etkileşime geçerek reseptör aktivitesini engelleyen SHP'nin 3'UTR'sinde miR-141 ile komplementer bir bölge içerdiği bildirilmiştir (116). miR-141'in ileri evre/metastatik prostat kanserinde ifade seviyeleri artmaktadır fakat molekülün hastalık prognozundaki rolü tam olarak belirlenmemiştir. Bilgisayar analizleriyle yapılan çalışmalarla miRNA dizileriyle kısmi ya da tam eşleniklik gösteren pek çok 3'UTR bölgesi tanımlanabilmektedir fakat bu eşleniklik dolayısıyla meydana gelebilecek mRNA susturulmasının deneysel çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir. Elde edilen bulgulara dayanarak miR-141 molekülünün gerek ifade gerekse hücre dışına salınmasının androjenlerce sınırlı olarak düzenlendiği söylenebilecek iken, hastalık gelişme ve ilerlemesi safhalarında düzenleyici olabilecek başka moleküller olabileceği de dışlanmamalıdır. Diğer taraftan, zayıf bir uyarımın bile androjenin miR-141 aracılı etkileri için yeterli olabileceği de göz ardı edilmemelidir.

Tez çalışmasında elde edilen bulgular, miR-375'in miR-141'e benzer şekilde androjen tarafından düzenleniyor olabileceğine işaret etmektedir. miR-375 molekülü de miR-141 gibi ileri evre/metastatik hastalıkla ilişkilendirilmiş olup, hücre fonksiyonu hakkında çok az çalışma yapılmıştır ve prostat kanserindeki rolü bilinmemektedir. miR-375 seviyeleri uzak metastazların bulunması durumunda ve lenf nodu tutulumlarında artmış olarak bulunduğu sistemik hastalıkla ilişkilendirilmiştir (11). Öte yandan normal fizyolojik koşullarda pankreasta yüksek seviyede ifade edildiği belirlenmiştir (118, 119). Bir başka çalışmada ise endoplazmik retikulumdan golgi cisimciğine protein

taşınmasında görevli SEC23A geninin 3'UTR bölgesinin miR-375 için bir hedef olabileceği ifade edilmiş ve prostat kanserinde SEC23A protein ve mRNA seviyelerinin miR-375 artışıyla korelasyon gösterecek şekilde azaldığı ifade edilmiştir (117). Bu veriler ışığında miR-375 molekülünün hormonlarla ilişkili bir hücresel görevi olduğu speküle edilebilir fakat bu konuda yayınlanmış veri olmadığından miR-375 molekülünün işlev ve düzenlenmesiyle ilgili yapılacak araştırmalara ihtiyaç vardır.

Tez çalışmasında, beklenildiği gibi, PSA mRNA ve PCA3'ün androjen tarafından yüksek oranda uyarıldığı belirlenmiştir. Bununla ilişkili olarak, oldukça düşük bir DHT konsantrasyonu (1 nM) bile bu iki molekülü yüksek oranda uyarmak için yeterli olmuştur. PCA3'ün prostata spesifik gen anlatımını (120) ve AR hedef genlerini düzenlemedeki rolünü (71) dikkate aldığımızda, bu sonucun gerçekçi olduğu söylenebilir. PCA3 seviyeleri sağlıklı prostat dokusunda ve diğer dokularda belirlenemeyecek kadar düşük iken prostat kanserinde yüksek seviyelerde ifade edilmektedir (81). Yapılan çalışmalar doku PCA3 seviyeleri ile hastalığın agresifliği arasında bir ilişki bulamamıştır fakat az, orta ve iyi seviyelerde farklılaşmış tüm prostat tümörlerinde belirlenebilir olması, PCA3 ifadesinin tümör gelişimde erken bir olay olduğuna işaret etmektedir (71, 81). Tez çalışmasında da androjen uyarımının PCA3 ifade seviyesini konsantrasyona bağlı şekilde arttırdığı belirlenmiştir fakat besiyerinde ölçülebilir düzeyde PCA3 molekülü saptanamamıştır. Kültür besiyerinde PCA3 saptanamamasının, molekülün hücresel düzeylerinin düşük olmasının ve/veya besiyerinde kararlılığının düşük olmasının bir sonucu olduğu düşünülmektedir. PCA3'ün prostat kanseri tanısında kullanılmasına olanak sağlayacak testler, genellikle prostat muayenesini takiben idrardan PCA3 analizine imkan verecek şekilde tasarlanmıştır ve rektal muayenenin idrar örneklerindeki PCA3 seviyesini dikkate değer şekilde arttırdığı belirlenmiştir (70). Materyal olarak periferik kanın kullanıldığı sınırlı sayıda çalışma vardır ve elde edilen sonuçlar çelişkilidir. Buna karşın çalışmaların çoğunda ya az sayıda kan örneğinde PCA3 belirlenebilmiştir ya da hiç belirlenememiştir (71). Bu verilere ve tez çalışmasında elde edilen sonuçlara dayanarak; PCA3'ün hücre dışında serbest şekilde bulunmadığı, idrardan analizi gerçekleştirilen PCA3 moleküllerinin ise muayene sonrası idrar yoluna dökülen tümör hücrelerinden kaynaklandığı, yine aynı şekilde periferik kandan az oranda elde edilebilen PCA3'ün de dolaşıma katılan tümör hücreleri kaynaklı olabileceği speküle edilebilir.

Nükleik asitlerin hücre dışına salınım mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamıştır. Apoptotik ve nekrotik hücre ölümü sonucunda hücre içeriğinin bir kısmı dolaşıma geçebilirken, bazı deneysel çalışmalar nükleik asitlerin hücrelerden aktif olarak salındıklarını göstermektedir. Özellikle son derece hassas moleküller olan RNA'ların RNaz aktivitesinden korunarak vücut sıvılarından elde edilebilmeleri, nükleik asitlerin eksozom ve vezikül yapılarına katılarak veya lipoproteinlerle kompleks oluşturarak hücre dışına salınıyor olabilecekleri düşüncesini doğurmuştur. Eksozom yapılarından nükleik asitlerin elde edilebildiğinin gösterilmesi bu düşüncüyü doğrular niteliktedir (9). Öte yandan eksozom yapısına katıldığı bilinen moleküllerden miRNA'ların hücreler arası iletişimde rol oynadığı bildirilmiştir (121). Vücut sıvılarında varlığı gösterilen ve kanserle ilişkilendirilen pek çok kodlama yapmayan RNA molekülünün çeşitli yollardaki bozulmalar sonucunda farklı ifade ve salınım düzeylerine sahip olmaları, kanser oluşum ve ilerlemesinde aktif rol aldıklarına işaret etmektedir. Serum ve plazma gibi vücut sıvılarında kanserle ilişkili saptanan değişiklikler, bu moleküllerin biyobelirteç potansiyelini göstermektedir.

Sonuç olarak, tez çalışmasında, androjen bağımlı bir kanser olan prostat kanserinde ileri evre/metastatik hastalıkla ilişkilendirilmiş iki miRNA olan miR-141 ve miR-375 ile androjenlerle ifadelerinin düzenlendiği bilinen PSA ve PCA3 moleküllerinin anlatım ve hücre dışı salınımlarına androjenin etkisi *in vitro* koşullarda karşılaştırmalı olarak araştırılmıştır. Elde edilen bulgular, androjenin, moleküllerin anlatım seviyeleri ve salınımları üzerinde etkisinin farklı düzeyde olduğuna işaret etmektedir. miRNA'ların doza bağlı olarak zayıf oranda uyarıldığı, hücre dışına salınımlarının da anlatım düzeyleriyle korele olacak şekilde sınırlı düzeyde olduğu belirlenmiştir. PSA ve PCA3 üzerindeki androjen etkisi ise çok daha belirgin olup anlatım düzeylerini yüksek oranda etkilerken, PSA salınımının da androjen etkisiyle arttığı, buna karşın PCA3 salınımının ölçülebilecek düzeyde olmadığı ortaya konmuştur. Çalışma, androjenlerin, incelenen moleküllerin anlatım seviyelerine etkisinin yanında, hücre dışına salınımlarına etkisinin de araştırılması açısından özgün bir değer taşımaktadır. miR-141 ve miR-375'in androjen tarafından hangi mekanizmalarla düzenlendiği konusunda ileri çalışmaların yapılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E ve Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011; **61**(2): 69-90.
2. Lonergan PE ve Tindall DJ. Androgen receptor signaling in prostate cancer development and progression. *J Carcinog.* 2011; **10**(1): 20.
3. Taplin ME, Bubley GJ, Shuster TD, Frantz ME, Spooner AE, Ogata GK ve ark. Mutation of the androgen-receptor gene in metastatic androgen-independent prostate cancer. *N Engl J Med.* 1995; **332**(21): 1393-1398.
4. Dehm SM ve Tindall DJ. Alternatively spliced androgen receptor variants. *Endocr Relat Cancer.* 2011; **18**(5): 183-186.
5. Laxman B, Morris DS, Yu J, Siddiqui J, Cao J, Mehra R ve ark. A first-generation multiplex biomarker analysis of urine for the early detection of prostate cancer. *Cancer Res.* 2008; **68**(3): 645-649.
6. Dhanasekaran SM, Barrette TR, Ghosh D, Shah R, Varambally S, Kurachi K ve ark. Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer. *Nature.* 2001; **412**(6849): 822-826.
7. Coppola V, De Maria R ve Bonci D. MicroRNAs and prostate cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2010; **17**(1): 1-17.
8. Kuner R, Brase JC, Sltmann H ve Wuttig D. microRNA biomarkers in body fluids of prostate cancer patients. *Methods.* 2013; **59**(1): 132-137.
9. Bryant RJ, Pawlowski T, Catto JWF, Marsden G, Vessella RL, Rhee B ve ark. Changes in circulating microRNA levels associated with prostate cancer. *Br J Cancer.* 2012; **106**(4): 768-774.
10. Selth LA, Townley S, Gillis JL, Ochnik AM, Murti K, Macfarlane RJ ve ark. Discovery of circulating microRNAs associated with human prostate cancer using a mouse model of disease. *Int J Cancer.* 2012; **131**(3): 652-661.
11. Brase JC, Johannes M, Schlomm T, Falth M, Haese A, Steuber T ve ark. Circulating miRNAs are correlated with tumor progression in prostate cancer. *Int J Cancer.* 2011; **128**(3): 608-616.

12. Nguyen HCN, Xie W, Yang M, Hsieh CL, Drouin S, Lee GSM ve ark. Expression differences of circulating microRNAs in metastatic castration resistant prostate cancer and low-risk, localized prostate cancer. *Prostate*. 2013; **73**(4): 346-354.
13. Netter FH. *Atlas of Human Anatomy*. 5th ed. United Kingdom: Elsevier Limited; 2010.
14. Hammerich KH, Ayala GE ve Wheeler TM. Anatomy of the prostate gland and surgical pathology of prostate cancer. İçinde Hricak H ve Scardino P, editor. *Prostate Cancer*. Cambridge: Cambridge University Press; 2009. pp.1-10.
15. McNeal JE. Normal histology of the prostate. *Am J Surg Pathol*. 1988; **12**(8): 619-633.
16. Villers A, Steg A ve Boccon-Gibod L. Anatomy of the prostate: review of the different models. *Eur Urol*. 1990; **20**(4): 261-268.
17. Selman SH. The McNeal prostate: a review. *Urology*. 2011; **78**(6): 1224-1228.
18. Jemal A, Center MM, DeSantis C ve Ward EM. Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2010; **19**(8): 1893-1907.
19. Center MM, Jemal A, Lortet-Tieulent J, Ward E, Ferlay J, Brawley O ve ark. International variation in prostate cancer incidence and mortality rates. *Eur Urol*. 2012; **61**(6): 1079-1092.
20. Özcan F. Ürolojik ve erkek genital kanserleri. İçinde Topuz E, Aydın A ve Karadeniz AN, editor. *Klinik Onkoloji*. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Yayınları; 2000. pp.140-156.
21. İnan Y. *Patoloji*. İstanbul: Klinisyen Tıp Kitabevleri; 2006.
22. Coen JJ ve Dahl DM. Localized prostate cancer. İçinde Chabner BA, Thomas JL ve Longo DL, editor. *Harrison's Manual of Oncology*. NY: The McGraw Hill Companies; 2007. pp.357-364.
23. Abate-Shen C ve Shen MM. Molecular genetics of prostate cancer. *Genes Dev*. 2000; **14**(19): 2410-2434.

24. Correa JJ ve Pow-Sang J. Mechanisms of carcinogenesis in prostate cancer. İçinde Coppola D, editor. *Mechanisms of Oncogenesis*. Netherlands: Springer; 2010. pp. 295-304.
25. Bunz F. *Principles of Cancer Genetics*. NY: Springer Science and Business Media; 2008.
26. Shen MM ve Abate-Shen C. Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges. *Genes Dev*. 2010; **24**(18): 1967-2000.
27. Nupponen NN, Wallen MJ, Ponciano D, Robbins CM, Tammela TL, Vessella RL ve ark. Mutational analysis of susceptibility genes RNASEL/HPC1, ELAC2/HPC2, and MSR1 in sporadic prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 2004; **39**(2): 119-125.
28. Malathi K, Paranjape JM, Ganapathi R ve Silverman RH. HPC1/RNASEL mediates apoptosis of prostate cancer cells treated with 2',5'-oligoadenylates, topoisomerase I inhibitors, and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Cancer Res*. 2004; **64**(24): 9144-9151.
29. Larson BT, Magi-Galluzzi C, Casey G, Plummer SJ, Silverman R ve Klein EA. Pathological aggressiveness of prostatic carcinomas related to RNASEL R462Q allelic variants. *J Urol*. 2008; **179**(4): 1344-1348.
30. Casey G, Neville PJ, Plummer SJ, Xiang Y, Krumroy LM, Klein EA ve ark. RNASEL Arg462Gln variant is implicated in up to 13% of prostate cancer cases. *Nat Genet*. 2002; **32**(4): 581-583.
31. Liang SL, Quirk D ve Zhou A. RNase L: its biological roles and regulation. *IUBMB Life*. 2006; **58**(9): 508-514.
32. Pienta KJ ve Bradley D. Mechanisms underlying the development of androgen-independent prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2006; **12**(6): 1665-1671.
33. Grayhack JT, Keeler TC ve Kozlowski JM. Carcinoma of the prostate. Hormonal therapy. *Cancer*. 1987; **60**(S3): 589-601.
34. Gregory CW, He B, Johnson RT, Ford OH, Mohler JL, French FS ve ark. A mechanism for androgen receptor-mediated prostate cancer recurrence after androgen deprivation therapy. *Cancer Res*. 2001; **61**(11): 4315-4319.

35. McEwan IJ. Molecular mechanisms of androgen receptor-mediated gene regulation: structure-function analysis of the AF-1 domain. *Endocr Relat Cancer*. 2004; **11**(2): 281-293.
36. Bubendorf L, Schöpfer A, Wagner U, Sauter G, Moch H, Willi N ve ark. Metastatic patterns of prostate cancer: an autopsy study of 1,589 patients. *Hum Pathol*. 2000; **31**(5): 578-583.
37. Roudier MP, True LD, Higano CS, Vesselle H, Ellis W, Lange P ve ark. Phenotypic heterogeneity of end-stage prostate carcinoma metastatic to bone. *Hum Pathol*. 2003; **34**(7): 646-653.
38. Feldman BJ ve Feldman D. The development of androgen-independent prostate cancer. *Nat Rev Cancer*. 2001; **1**(1): 34-45.
39. Estebanez-Perpina E, Moore JM, Mar E, Delgado-Rodrigues E, Nguyen P, Baxter JD ve ark. The molecular mechanisms of coactivator utilization in ligand-dependent transactivation by the androgen receptor. *J Biol Chem*. 2005; **280**(9): 8060-8068.
40. Schmidt LJ ve Tindall DJ. Steroid 5 α -reductase inhibitors targeting BPH and prostate cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2011; **125**(1): 32-38.
41. Centenera MM, Harris JM, Tilley WD ve Butler LM. Minireview: the contribution of different androgen receptor domains to receptor dimerization and signaling. *Mol Endocrinol*. 2008; **22**(11): 2373-2382.
42. Dehm SM ve Tindall DJ. Ligand-independent androgen receptor activity is activation function-2-independent and resistant to androgens in androgen refractory prostate cancer cells. *J Biol Chem*. 2006; **281**(38): 27882-27893.
43. Helsen C, Kerkhofs S, Clinckemalie L, Spans L, Laurent M, Boonen S ve ark. Structural basis for nuclear hormone receptor DNA binding. *Mol Cell Endocrinol*. 2012; **348**(2): 411-417.
44. Andersen RJ, Mawji NR, Wang J, Wang G, Haile S, Myung JK ve ark. Regression of castrate-recurrent prostate cancer by a small molecule inhibitor of the amino-terminus domain of the androgen receptor. *Cancer Cell*. 2010; **17**(6): 535-546.

45. Van Royen ME, van Cappellen WA, de Vos C, Houtsmuller AB ve Trapman J. Stepwise androgen receptor dimerization. *J Cell Sci.* 2012; **125**(8): 1970-1979.
46. Chan SC, Li Y ve Dehm SM. Androgen receptor splice variants activate androgen receptor target genes and support aberrant prostate cancer cell growth independent of canonical androgen receptor nuclear localization signal. *J Biol Chem.* 2012; **287**(23): 19736-19749.
47. Bennett NC, Gardiner RA, Hooper JD, Johnson DW ve Gobe GC. Molecular cell biology of androgen receptor signalling. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010; **42**(6): 813-827.
48. Salah Z, Maoz M, Cohen I, Pizov G, Pode D, Runge MS ve ark. Identification of a novel functional androgen response element within hPar1 promoter: implications to prostate cancer progression. *FASEB J.* 2005; **19**(1): 62-72.
49. Horie-Inoue K, Bono H, Okazaki Y ve Inoue S. Identification and functional analysis of consensus androgen response elements in human prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; **325**(4): 1312-1317.
50. Roche PJ, Hoare SA ve Parker MG. A consensus DNA-binding site for the androgen receptor. *Mol Endocrinol.* 1992; **6**(12): 2229-2235.
51. Reid KJ, Hendy SC, Saito J, Sorensen P ve Nelson CC. Two classes of androgen receptor elements mediate cooperativity through allosteric interactions. *J Biol Chem.* 2001; **276**(4): 2943-2952.
52. Shaffer PL, Jivan A, Dollins DE, Claessens F ve Gewirth DT. Structural basis of androgen receptor binding to selective androgen response elements. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; **101**(14): 4758-4763.
53. Gelmann EP. Molecular biology of the androgen receptor. *J Clin Oncol.* 2002; **20**(13): 3001-3015.
54. Bolton EC, So AY, Chaivorapol C, Haqq CM, Li H ve Yamamoto KR. Cell- and gene-specific regulation of primary target genes by the androgen receptor. *Genes Dev.* 2007; **21**(16): 2005-2017.

55. Jariwala U, Prescott J, Jia L, Barski A, Pregizer S, Cogan JP ve ark. Identification of novel androgen receptor target genes in prostate cancer. *Mol Cancer*. 2007; **6**(39): 10-1186.
56. Prensner JR, Rubin MA, Wei JT ve Chinnaiyan AM. Beyond PSA: the next generation of prostate cancer biomarkers. *Sci Transl Med*. 2012; **4**(127): 127rv3-127rv3.
57. Balk SP, Ko YJ ve Bubley GJ. Biology of prostate-specific antigen. *J Clin Oncol*. 2003; **21**(2): 383-391.
58. Lee C, Keefer M, Zhao ZW, Kroes R, Berg L, Liu X ve Sensibar J. Demonstration of the role of prostate-specific antigen in semen liquefaction by two-dimensional electrophoresis. *J Androl*. 1989; **10**(6): 432-438.
59. Montgomery BT, Young CYF, Bilhartz DL, Andrews PE, Thompson NF, Tindall DJ ve ark. Hormonal regulation of prostate-specific antigen (PSA) glycoprotein in the human prostatic adenocarcinoma cell line, LNCaP. *Prostate*. 1992; **21**(1): 63-73.
60. Nelson PS, Gan L, Ferguson C, Moss P, Gelinas R, Hood L ve ark. Molecular cloning and characterization of prostase, an androgen-regulated serine protease with prostate-restricted expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; **96**(6): 3114-3119.
61. Murtha P, Tindall DJ ve Young CY. Androgen induction of a human prostate-specific kallikrein, hKLK2: characterization of an androgen response element in the 5'promoter region of the gene. *Biochemistry*. 1993; **32**(25): 6459-6464.
62. Zhu YS, Cai LQ, You X, Cordero JJ, Huang Y ve Imperato-McGinley J. Androgen-induced prostate-specific antigen gene expression is mediated via dihydrotestosterone in LNCaP cells. *J Androl*. 2003; **24**(5): 681-687.
63. Young CY, Andrews PE, Montgomery BT ve Tindall DJ. Tissue-specific and hormonal regulations of human prostate-specific glandular kallikrein. *Biochemistry*. 1992; **31**(3): 818-824.

64. Lilja H, Oldbring J, Rannevik G ve Laurell CB. Seminal vesicle-secreted proteins and their reactions during gelation and liquefaction of human semen. *J Clin Invest.* 1987; **80**(2): 281.
65. Bostwick DG. Prostate-specific antigen. Current role in diagnostic pathology of prostate cancer. *Am J Clin Pathol.* 1994; **102**(4Suppl1): 31-37.
66. Catalona WJ, Richie JP, Ahmann FR, Hudson MA, Scardino PT, Flanigan RC ve ark. Comparison of digital rectal examination and serum prostate specific antigen in the early detection of prostate cancer: results of a multicenter clinical trial of 6,630 men. *J Urol.* 1994; **151**(5): 1283-1290.
67. Thompson IM, Pauler DK, Goodman PJ, Tangen CM, Lucia MS, Parnes HL ve ark. Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level \leq 4.0 ng per mililiter. *N Engl J Med.* 2004; **350**(22): 2239-2246.
68. Schröder FH, van der Crujisen-Koeter INGRID, de Koning HJ, Vis AN, Hoedemaeker RF ve Kranse R. Prostate cancer detection at low prostate specific antigen. *J Urol.* 2000; **163**(3): 806-812.
69. Stenman UH, Leinonen J, Hakama M, Knekt P, Aromaa A ve Teppo L. Serum concentrations of prostate specific antigen and its complex with α 1-antichymotrypsin before diagnosis of prostate cancer. *Lancet.* 1994; **344**(8937): 1594-1598.
70. Day JR, Jost M, Reynolds MA, Groskopf J ve Rittenhouse H. PCA3: from basic molecular science to the clinical lab. *Cancer Lett.* 2011; **301**(1): 1-6.
71. Ferreira LB, Palumbo A, de Mello KD, Sternberg C, Caetano MS, de Oliveira FL ve ark. PCA3 noncoding RNA is involved in the control of prostate-cancer cell survival and modulates androgen receptor signaling. *BMC Cancer.* 2012; **12**(1): 507.
72. Brosnan CA ve Voinnet O. The long and the short of noncoding RNAs. *Curr Opin Cell Biol.* 2009; **21**(3): 416-425.
73. Gibb EA, Brown CJ ve Lam WL. The functional role of long non-coding RNA in human carcinomas. *Mol Cancer.* 2011; **10**(1): 38-55.

74. Brown CJ, Ballabio A, Rupert JL, Lafreniere RG, Grompe M, Tonlorenzi R ve ark. A gene from the region of the human X inactivation centre is expressed exclusively from the inactive X chromosome. *Nature*. 1991; **349**(6304): 38-44.
75. Wilusz JE, Sunwoo H ve Spector DL. Long noncoding RNAs: functional surprises from the RNA world. *Genes Dev*. 2009; **23**(13): 1494-1504.
76. Lee JT. Epigenetic regulation by long noncoding RNAs. *Science*. 2012; **338**(6113): 1435-1439.
77. De Kok JB, Verhaegh GW, Roelofs RW, Hessels D, Kiemeny LA, Aalders TW ve ark. DD3 PCA3, a very sensitive and specific marker to detect prostate tumors. *Cancer Res*. 2002; **62**(9): 2695-2698.
78. Haese A, de la Taille A, Van Poppel H, Marberger M, Stenzl A, Mulders PF ve ark. Clinical utility of the PCA3 urine assay in European men scheduled for repeat biopsy. *Eur Urol*. 2008; **54**(5): 1081-1088.
79. Bussemakers MJ, van Bokhoven A, Verhaegh GW, Smit FP, Karthaus HF, Schalken JA ve ark. DD3: A new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer. *Cancer Res*. 1999; **59**(23): 5975-5979.
80. Alvarez MA. Prostate cancer biomarkers. *Ultrasound Clin*. 2014; **9**(1): 95-98.
81. Auprich M, Bjartell A, Chun FKH, de la Taille A, Freedland SJ, Haese A ve ark. Contemporary role of prostate cancer antigen 3 in the management of prostate cancer. *Eur Urol*. 2011; **60**(5): 1045-1054.
82. Klecka J, Holubec L, Pesta M, Topolcan O, Hora M, Eret V ve ark. Differential display code 3 (DD3/PCA3) in prostate cancer diagnosis. *Anticancer Res*. 2010; **30**(2): 665-670.
83. Mahn R, Heukamp LC, Rogenhofer S, von Ruecker A, Müller SC ve Ellinger J. Circulating microRNAs (miRNA) in serum of patients with prostate cancer. *Urology*. 2011; **77**(5): 1265e9-1265e16.
84. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004; **116**(2): 281-297.

85. Zhang W, Edwards A, Fan W, Flemington EK ve Zhang K. miRNA-mRNA correlation-network modules in human prostate cancer and the differences between primary and metastatic tumor subtypes. *PLoS One*. 2012; **7**(6): e40130.
86. Selth LA, Tilley WD ve Butler LM. Circulating microRNAs: macro-utility as markers of prostate cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2012; **19**(4): 99-113.
87. Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S ve Kim VN. microRNA maturation: stepwise processing and subcellular localication. *EMBO J*. 2002; **21**(17): 4663-4670.
88. Cai X, Hagedom CH ve Cullen BR. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA*. 2004; **10**(12): 1957-1966.
89. Han J, Lee Y, Yeom KH, Kim YK, Jin H ve Kim VN. The drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev*. 2004; **18**(24): 3016-3027.
90. Gregory RI ve Shiekhattar R. MicroRNA biogenesis and cancer. *Cancer Res*. 2005; **65**(9): 3509-3512.
91. Han J, Pedersen JS, Kwon SC, Belair CD, Kim YK, Yeom KH ve ark. Posttranscriptional crossregulation between drosha and DGCR8. *Cell*. 2009; **136**(1): 75-84.
92. Yeom KH, Lee Y, Han J, Suh MR ve Kim VN. Characterization of DGCR8/Pasha, the essential cofactor for drosha in primary miRNA processing. *Nucleic Acids Res*. 2006; **34**(16): 4622-4629.
93. Cullen BR. Transcription and processing of human microRNA precursors. *Mol Cell*. 2004; **16**(6): 861-865.
94. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI ve Diederichs S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol*. 2009; **11**(3): 228-234.
95. Zeng Y. Principles of micro-RNA production and maturation. *Oncogene*. 2006; **25**(46): 6156-6162.
96. Yi R, Qin Y, Macara IG ve Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev*. 2003; **17**(24): 3011-3016.

97. Hassan O, Ahmad A, Sethi S ve Sarkar FH. Recent updates on the role of microRNAs in prostate cancer. *J Hematol Oncol*. 2012; **5**(9):13.
98. Holley CL ve Topkara VK. An introduction to small non-coding RNAs: miRNA and snoRNA. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2011; **25**(2): 151-159.
99. Kawamata T ve Tomari Y. Making risc. *Trends Biochem Sci*. 2010; **35**(7): 368-376.
100. Rajewsky N. microRNA target predictions in animals. *Nat Genet*. 2006; **38**: 8-13.
101. Lewis BP, Burge CB ve Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*. 2005; **120**(1): 15-20.
102. Wang L, Tang H, Thayanithy V, Subramanian S, Oberg AL, Cunningham JM ve ark. Gene networks and microRNAs implicated in aggressive prostate cancer. *Cancer Res*. 2009; **69**(24): 9490-9497.
103. Calin GA ve Croce CM. microRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer*. 2006; **6**(11): 857-866.
104. Croce CM. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat Rev Genet*. 2009; **10**(10): 704-714.
105. Pan X, Wang ZX ve Wang R. microRNA-21: a novel therapeutic target in human cancer. *Cancer Biol Ther*. 2010; **10**(12): 1224-1232.
106. Boyerinas B, Park SM, Hau A, Murmann AE ve Peter ME. The role of let-7 in cell differentiation and cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2010; **17**(1): 19-36.
107. Chin LJ, Ratner E, Leng S, Zhai R, Nallur S, Babar I ve ark. A SNP in a let-7 microRNA complementary site in the KRAS 3' untranslated region increases non-small cell lung cancer risk. *Cancer Res*. 2008; **68**(20): 8535-8540.
108. Waltering KK, Porkka KP, Jalava SE, Urbanucci A, Kohonen PJ, Latonen LM ve ark. Androgen regulation of microRNAs in prostate cancer. *Prostate*. 2011; **71**(6): 604-614.

109. Lu Z, Liu M, Stribinskis V, Klinge CM, Ramos KS, Colburn NH ve ark. microRNA-21 promotes cell transformation by targeting the programmed cell death 4 gene. *Oncogene*. 2008; **27**(31): 4373-4379.
110. Ribas J, Ni X, Haffner M, Wentzel EA, Salmasi AH, Chowdhury WH ve ark. miR-21: an androgen receptor-regulated microRNA that promotes hormone-dependent and hormone-independent prostate cancer growth. *Cancer Res*. 2009; **69**(18): 7165-7169.
111. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL ve ark. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; **105**(30): 10513-10518.
112. Gonzales JC, Fink LM, Goodman OB, Symanowski JT, Vogelzang NJ ve Ward DC. Comparison of circulating microRNA 141 to circulating tumor cells, lactate dehydrogenase, and prostate-specific antigen for determining treatment response in patients with metastatic prostate cancer. *Clin Genitourin Cancer*. 2011; **9**(1): 39-45.
113. Agaoglu FY, Kovancilar M, Dizdar Y, Darendeliler E, Holdenrieder S, Dalay N ve ark. Investigation of miR-21, miR-141 and miR-221 in blood circulation of patients with prostate cancer. *Tumour Biol*. 2011; **32**(3): 583-588.
114. Peter ME. Let-7 and miR-200 microRNAs: guardians against pluripotency and cancer progression. *Cell Cycle*. 2009; **8**(6): 843-852.
115. Bracken CP, Gregory PA, Khew-Goodall Y ve Goodall GJ. The role of microRNAs in metastasis and epithelial-mesenchymal transition. *Cell Mol Life Sci*. 2009; **66**(10): 1682-1699.
116. Xiao J, Gong AY, Eischeid AN, Chen D, Deng C, Young CY ve ark. miR-141 modulates androgen receptor transcriptional activity in human prostate cancer cells through targeting the small heterodimer partner protein. *Prostate*. 2012; **72**(14): 1514-1522.
117. Szczyrba J, Nolte E, Wach S, Kremmer E, Stöhr R, Hartmann A ve ark. Downregulation of Sec23A protein by miRNA-375 in prostate carcinoma. *Mol Cancer Res*. 2011; **9**(6): 791-800.

118. Poy MN, Hausser J, Trajkovski M, Braun M, Collins S, Rorsman P ve ark. miR-375 maintains normal pancreatic α - and β -cell mass. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; **106**(14): 5813-5818.
119. Poy MN, Eliasson L, Krutzfeldt J, Kuwajima S, Ma X, MacDonald PE ve ark. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature*. 2004; **432**(7014): 226-230.
120. Van Bokhoven A, Varella-Garcia M, Korch C, Johannes WU, Smith EE, Miller HL ve ark. Molecular characterization of human prostate carcinoma cell lines. *Prostate*. 2003; **57**(3): 205-225.
121. Mittelbrunn M, Gutierrez-Vazquez C, Villarroya-Beltri C, Gonzalez S, Sanchez-Cabo F, Gonzalez MA ve ark. Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nat Commun*. 2011; **2**: 282.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Zeynep Duygu	Soyadı	Tiryakioğlu
Doğ. Yeri	Bornova	Doğ. Tar.	18.03.1984
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	23636322254
Email	duygutiryakioğlu@gmail.com	Tel	0530 0103108

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.		
Lisans	Haliç Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü	2009
Lise	Buca Anadolu Lisesi	2003

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Kurucu	Modus Analiz	2014-Devam
2.	Uygulama uzmanı	CDK Tıbbi Malzeme	2009-2011
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
Fransızca	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi		
İngilizce	İyi	İyi	İyi	63,75000	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı	69,06773	64,37714	51,17518
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi

Yayımları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

1. Mert U, Ozgur E, Tiryakioglu D, Dalay N ve Gezer U. Induction of p53-inducible microRNA miR-34 by gamma radiation and bleomycin are different. *Front Genet.* 2012; 3.
2. Tiryakioglu D, Bilgin E, Holdenrieder S, Dalay N ve Gezer U. miR-141 and miR-375 induction and release are different from PSA mRNA and PCA upon androgen stimulation of LNCaP cells. *Biomed Rep.* 2013; **1**(5): 802-806.
3. Gezer U, Keskin S, Igci A, Tukenmez M, Tiryakioglu D, Cetinkaya M ve ark. Abundant circulating microRNAs in breast cancer patients fluctuate considerably during neoadjuvant chemotherapy. *Oncol Lett.* 2014; **8**(2): 845-848.
4. Gezer U, Tiryakioglu D, Bilgin E, Dalay N ve Holdenrieder S. Androgen stimulation of PCA3 and miR-141 and their release from prostate cancer cells. *Cell.* 2015; **16**(4): 488-493.
5. Duygu Tiryakioğlu, Merve Çetinkaya, Emre Özgür, Nejat Dalay, Uğur Gezer. Androjenle muamele edilen prostat kanseri hücrelerinden mikroRNA salınımının in vivo karakterizasyonu. 20. Ulusal Kanser Kongresi, 19-23 Nisan 2013; Antalya. Sözel bildiri (Ref no: S032).
6. Merve Çetinkaya, Elif Bilgin, Duygu Tiryakioğlu, Vildan Yasasever, Nejat Dalay, Uğur Gezer. Prostat kanserli hastalarda miR-141 ve miR-375 plazma düzeylerinin araştırılması. 20. Ulusal Kanser Kongresi, 19-23 Nisan 2015; Antalya. Poster bildirisi (Ref no: P-707).