



T. C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PROSTAT KANSERİNDE LNCRNA MEG3'ÜN RB1 İLE İLİŞKİLİ GENLER ÜZERİNDEKİ ROLÜ

Yunus ŞAHİN
DOKTORA TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK PROGRAMI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Emel ŞAHİN

Gaziantep

2020

**T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**PROSTAT KANSERİNDE LNCRNA MEG3'ÜN RB1 İLE İLİŞKİLİ
GENLER ÜZERİNDEKİ ROLÜ
YUNUS ŞAHİN**

Tez Savunma Tarihi: 10.09.2020

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onayı

Prof. Dr. Mehmet TARAKÇIOĞLU
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez çalışmasının bir “Doktora” derecesi için uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.

Prof. Dr. Sibel OĞUZKAN BALCI
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımca okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Doktora” tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Emel ŞAHİN
Tez Danışmanı

Bu tez tarafımca okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Doktora” tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi İmzası

Prof. Dr. Emel ŞAHİN

Prof. Dr. Hülya ÇİÇEK

Dr. Öğr. Üyesi Abu Shameem Md. Saadat KHANDAKAR

Dr. Öğr. Üyesi Elif PALA

Dr. Öğr. Üyesi Tuba DENKÇEKEN

BEYAN

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

10.09.2020

YUNUS ŞAHİN

TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmam süresince bilimsel katkısı, görüş ve önerilerinden ve tüm desteklerinden dolayı sayın hocam, tez danışmanım Prof. Dr. Emel ŞAHİN'e,

Tez çalışmam süresince bilgi, destek ve tecrübelerini esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Mehmet ŞAHİN'e,

Yüksek lisans ve doktora eğitimim boyunca her türlü yardım ve desteğini esirgemeyen Zekiye ALTAN'a,

Doktora eğitimim süresince maddi ve manevi desteklerinde dolayı Dr. Öğr. Üyesi Abu Shameem Md. Saadat KHANDAKAR'a,

Bugünlere gelmeme vesile olan ve tüm eğitim hayatım boyunca her zaman yanımda olan başta babam Hamza ŞAHİN ve annem Havva ŞAHİN olmak üzere tüm KARDEŞLERİM'e,

Doktora eğitimim boyunca BİDEB 2211/A Genel Yurtiçi Doktora Burs programı ile sağladığı destekten dolayı TÜBİTAK-BİDEB'e, teşekkür ederim.

Bu tez, Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Komisyonu Başkanlığı tarafından TF.DT. 19. 34 numaralı proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	I
İÇİNDEKİLER	II
SİMGE VE KISALTMALAR	VIII
ŞEKİL LİSTESİ.....	X
TABLO LİSTESİ.....	XVII
ÖZET	1
ABSTRACT.....	2
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
2. GENEL BİLGİLER	7
2.1. Prostat Kanseri	7
2.1.1. Prostat Bezinin Anatomisi	8
2.1.2. Prostat Kanserinin Tarihçesi	9
2.1.3. Epidemiyoloji.....	10
2.1.4. Mortalite.....	12
2.1.5. Sağ kalım	14
2.1.6. PSA ve Popülasyon Bazlı Tarama	14
2.1.7. Grade ve Evreleme.....	15
2.1.8. Risk Faktörleri	16
2.1.8.1. İleri Yaş.....	16
2.1.8.2. Etnik Köken	17
2.1.8.3. Diyet.....	17
2.1.8.4. İnsülin ve İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü	18
2.1.8.5. Cinsiyet Hormonları.....	18

2.1.8.6. Aile Öyküsü ve Genetik Faktörler	18
2.1.9. Genetiği ve Moleküler Biyolojisi	19
2.2. Kanser Gelişiminde Kodlamayan RNA'ların Rolü	21
2.2.1. Uzun Kodlamayan RNA'lar (LncRNAs)	25
2.2.1.1. LncRNA'ların Sınıflandırılması	26
2.2.1.2. LncRNA'ların İşlevleri	27
2.2.2. MEG3 (Maternally Expressed Gene 3)	29
2.3. RB1 (RB Transcriptional Corepressor 1)	32
2.3.1. Prostat Kanseriinde RB Yolağının Rolü	33
2.3.2. RB1 Hedef Genleri	34
3. GEREÇ ve YÖNTEM	35
3.1. Hücre Hatları.....	35
3.2. Hücre Kültürü	36
3.3. MEG3 ve Kontrol Plazmidlerin Çoğaltılması	38
3.3.1. Plazmid Gen Haritaları	38
3.3.1.1. MEG3 Plazmidi	39
3.3.1.2. MEG3b Plazmidi	40
3.3.1.3. MEG3-del5 Plazmidi	41
3.3.1.4. Boş Plazmid	42
3.3.2. Bakteri Ekimi ve Plazmid Çoğaltılması.....	43
3.3.2.1. LB Agar Besiyeri Hazırlanması.....	43
3.3.2.2. Bakteri Ekimi	43
3.3.3. Bakteri Stoğu Hazırlanması ve Saklanması.....	44
3.3.4. Plazmid İzolasyonu.....	44
3.4. Hücre Hatlarına Plazmid Verilmesi.....	45
3.5. Hücre Hatlarından RNA Eldesi	46

3.6. Tek Sarmal cDNA Sentezi.....	48
3.7. Primer Tasarımı	49
3.8. Primer Çiftleri İçin PCR Optimizasyonu.....	50
3.9. Gen İfade Analizi İçin Eş Zamanlı PCR (qRT-PCR) Yöntemi.....	51
3.10. Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi (MTT Deneyleri).....	52
3.11. Yara İyileşmesi Deneyleri	54
3.12. Koloni Oluşum Deneyleri.....	55
3.13. İstatistiksel Analizler	56
4. BULGULAR.....	57
4.1. RB1 Hedef Genlerinin Belirlenmesi.....	57
4.2. MEG3 ve İzofomu MEG3b	59
4.2.1. MEG3 ve MEG3b İkincil Yapıları	59
4.2.2. LncRNA MEG3'ün Prostat Kanserindeki Gen İfade Analizi	61
4.3. MEG3 Geninin Farklı Hücre Hatları ve İnsan Dokularında İfade Seviyesi.....	62
4.4. RB1 Geninin Farklı Hücre Hatları ve İnsan Dokularında İfade Seviyesi.....	65
4.5. RB1 ve Hedef Genlerinin Prostat Kanserindeki İfade Analizleri.....	67
4.5.1. RB1 Geninin Prostat Kanserindeki İfade Seviyesi	68
4.5.2. ABL1 Geninin Prostat Kanserindeki İfade Seviyesi	69
4.5.3. ATF2 Geninin Prostat Kanserindeki İfade Seviyesi.....	70
4.5.4. BAG1 Geninin Prostat Kanserindeki İfade Seviyesi	71
4.5.5. CASP8 Geninin Prostat Kanserindeki İfade Seviyesi	72
4.5.6. CDK2 Geninin Prostat Kanserindeki İfade Seviyesi	73
4.5.7. CHEK1 Geninin Prostat Kanserindeki İfade Seviyesi	74
4.5.8. E2F1 Geninin Prostat Kanserindeki İfade Seviyesi.....	75
4.5.9. E2F2 Geninin Prostat Kanserindeki İfade Seviyesi.....	76
4.5.10. GRB2 Geninin Prostat Kanserindeki İfade Seviyesi	77

4.5.11. JUN Geninin Prostat Kanserindeki İfade Seviyesi	78
4.5.12. KAT2B Geninin Prostat Kanserindeki İfade Seviyesi	79
4.5.13. MAPK8 Geninin Prostat Kanserindeki İfade Seviyesi	80
4.5.14. P53 Geninin Prostat Kanserindeki İfade Seviyesi	81
4.5.15. PRMT2 Geninin Prostat Kanserindeki İfade Seviyesi	82
4.5.16. RAF1 Geninin Prostat Kanserindeki İfade Seviyesi.....	83
4.5.17. SP1 Geninin Prostat Kanserindeki İfade Seviyesi.....	84
4.5.18. TFDP1 Geninin Prostat Kanserindeki İfade Seviyesi.....	85
4.6. MEG3 ve MEG3b Plazmid Transfeksiyonu	86
4.7. PC-3 Hücre Hattına Plazmid Transfeksiyonu Sonrası RB1 ve Hedef Genlerinin Gen İfade Analizi	91
4.7.1. RB1	91
4.7.2. ABL1	92
4.7.3. ATF2.....	93
4.7.4. BAG1	94
4.7.5. CASP8	95
4.7.6. CDK2	96
4.7.7. CHEK1.....	97
4.7.8. E2F1.....	98
4.7.9. E2F2.....	99
4.7.10. GRB2	100
4.7.11. JUN	101
4.7.12. KAT2B.....	102
4.7.13. MAPK8.....	103
4.7.14. P53	104
4.7.15. PRMT2.....	105

4.7.16. RAF1.....	106
4.7.17. SP1.....	107
4.7.18. TFD1.....	108
4.8. DU 145 Hücre Hattına Plazmid Transfeksiyonu Sonrası RB1 ve Hedef Genlerinin İfade Analizi	109
4.8.1. RB1	109
4.8.2. ABL1	110
4.8.3. ATF2.....	111
4.8.4. BAG1	112
4.8.5. CASP8	113
4.8.6. CDK2.....	114
4.8.7. CHEK1.....	115
4.8.8. E2F1.....	116
4.8.9. E2F2.....	117
4.8.10. GRB2	118
4.8.11. JUN.....	119
4.8.12. KAT2B.....	120
4.8.13. MAPK8.....	121
4.8.14. P53	122
4.8.15. PRMT2.....	123
4.8.16. RAF1.....	124
4.8.17. SP1.....	125
4.8.18. TFD1.....	126
4.9. Plazmid Transfeksiyonları Sonrası RB1 ve Hedef Genlerin İfade Değişimleri	127
4.10. Plazmid Transfeksiyonlarının Prostat Kanseri Hücrelerinin Proliferasyonu Üzerine Etkisi	128

4.11. Plazmid Transfeksiyonlarının Prostat Kanser Hücrelerinin Koloni Oluşturma Kapasiteleri Üzerine Etkisi	130
4.12. Plazmid Transfeksiyonlarının Prostat Kanser Hücrelerinin Yara İyileşmesi Üzerine Etkisi	134
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	138
6. KAYNAKLAR	153



SİMGE VE KISALTMALAR

ABL1	ABL Proto-Oncogene 1, Non-Receptor Tyrosine Kinase
ADT	Androjen deprivasyon tedavisinden
AR	Androjen reseptörü
ATF2	Activating Transcription Factor 2
BAG1	BAG Cochaperone 1
CASP8	Caspase 8
CDK	Cycline Dependent Kinase
CDK2	Cyclin Dependent Kinase 2
cDNA	Complementary DNA
CHEK1	Checkpoint Kinase 1
circRNA	Circular RNA
DNMT1	DNA methyltransferase 1
E2F1	E2F Transcription Factor 1
E2F2	E2F Transcription Factor 2
FBS	Fetal Bovine Serum
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GRB2	Growth Factor Receptor Bound Protein 2
GWAS	Genome-Wide Association Study
HBSS	Hawk's Balanced Salt Solution
JUN	Jun Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit
KAT2B	Lysine Acetyltransferase 2B
Kb	Kilobase

lncRNA	Long Non-Coding RNA
MAPK8	Mitogen-Activated Protein Kinase 8
MDM2	Murine Double Minute 2
MEG3	Maternally Expressed Gene 3
miRNA	MicroRNA
mRNA	Messenger RNA
MTT	Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide
ncRNA	Non-coding RNA
Nt	Nukleotide
P53	Tumor Protein 53
PCR	Polymerase Chain Reaction
PRMT2	Protein Arginine Methyltransferase 2
PSA	Prostate-Specific Antigen
RAF1	Raf-1 Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase
RB1	Retinoblastoma Transcriptional Corepressor 1
RISC	RNA-Induced Silencing Complex
RT-qPCR	Quantitative Reverse Transcription PCR
RT-PCR	Reverse Transcription PCR
SEER	Surveillance, Epidemiology, and End Results
SP1	Sp1 Transcription Factor
TFDP1	Transcription Factor Dp-1
WHO	World Health Organization

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1. Prostat bezinin farklı prostat hastalıklarının baskın olduğu bölgeleri içeren bölgesel anatomisi.....	8
Şekil 2.2. Prostat kanserinin yaşa bağlı standardize insidans oranı.....	10
Şekil 2.3. Türkiye’de 2018 yılında erkeklerde tespit edilen kanser vaka sayıları.	11
Şekil 2.4. ABD’de SEER verilerine göre 1975’ten 2013’e kadar yaşa göre ayarlanmış prostat kanseri insidans oranlarına PSA taramasının etkisi.	12
Şekil 2.5. Harita dünyada 2018 yılında erkeklerde prostat kanserinin yaşa bağlı standardize mortalite oranları.	13
Şekil 2.6. Türkiye’de 2018 yılında erkeklerde tespit edilen kanser türlerinin insidans ve mortalite sayıları.	13
Şekil 2.7. Gleason tarafından geliştirilen grade ve puanlama sistemi.	15
Şekil 2.8. Tümör baskılayıcı ve onkojenik bazı ncRNA kanser mekanizmaları..	24
Şekil 2.9. Kanserın temel özelliklerinde etkin olan bazı önemli lncRNA’lar.	26
Şekil 2.10. LncRNA’ların genomdaki sentez bölgelerine göre sınıflandırılması.....	27
Şekil 2.11. LncRNA’ların hücreşel işlevleri.....	28
Şekil 2.12. MEG3’un genomdaki yeri ve kanser gelişimine katılımıyla ilgili genomik organizasyon gösterimi.	29
Şekil 2.13. RB1’in 13. Kromozomdaki yeri ve yapısı.....	32
Şekil 2.14. RB1 yolağının tümör baskılayıcı aktivitesi	33
Şekil 2.15. Çeşitli hücreşel süreçlerde RB1’in transkripsiyonel hedefleri	34
Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan hücrelerin morfolojik görüntüleri.	37
Şekil 3.2. MEG3 genini içeren pCI-MEG3 plazmidinin gen haritası.....	39
Şekil 3.3. MEG3b genini içeren pCI-MEG3b plazmidinin gen haritası.	40
Şekil 3.4. MEG3-del5 bölgesini içeren pCI-MEG3-del5 plazmidin gen haritası.....	41

Şekil 3.5. Boş plazmidin gen haritası.	42
Şekil 4.1. RB1 hedef genleri	57
Şekil 4.2. MEG3 geninin ve MEG3'ün izoformlarının moleküler yapıları.....	59
Şekil 4.3. MEG3 ve MEG3b lncRNA'ların baz eşleşme olasılığına göre ikincil yapıları.	60
Şekil 4.4. MEG3 ve MEG3b'nin baz eşleşme olasılığına göre halkasal ikincil yapıları.	60
Şekil 4.5. MEG3 geninin normal prostat doku (NPD) ve PC-3, DU-145 prostat kanser hücre hatlarında ifade seviyesi.....	61
Şekil 4.6. MEG3 geninin 20 farklı sağlıklı insan dokusundaki ifade seviyesi.	62
Şekil 4.7. MEG3 geninin çeşitli kanser ve normal hücre hatlarındaki ifade seviyesi. ...	63
Şekil 4.8. LncRNA MEG3'ün çeşitli hücre hatlarında ve sağlıklı insan dokularındaki ifade seviyesini gösteren heat-map grafiği.	64
Şekil 4.9. RB1 geninin 20 farklı sağlıklı insan dokusundaki ifade seviyesi.....	65
Şekil 4.10. RB1 geninin sağlıklı insan dokularındaki ifade seviyesini gösteren heat-map grafiği.....	66
Şekil 4.11. RB1 hedef genlerinin heat-map grafiği.	67
Şekil 4.12. RB1 geninin normal prostat dokusu ve PC-3, DU-145 prostat kanser hücre hatlarında ifade seviyesi.....	68
Şekil 4.13. ABL1 geninin normal prostat doku (NDP) ve PC-3, DU-145 prostat kanser hücre hatlarında ifade seviyesi.....	69
Şekil 4.14. ATF2 geninin normal prostat dokusu (NPD) ve PC-3, DU-145 prostat kanser hücre hatlarında ifade seviyesi.....	70
Şekil 4.15. BAG1 geninin normal prostat doku (NPD) ve PC-3, DU-145 prostat kanser hücre hatlarında ifade seviyesi.....	71
Şekil 4.16. CASP8 geninin normal prostat doku (NPD) ve PC-3, DU-145 prostat kanser hücre hatlarında ifade seviyesi.....	72
Şekil 4.17. CDK2 geninin normal prostat doku (NPD) ve PC-3, DU-145 prostat kanser hücre hatlarında ifade seviyesi.....	73

Şekil 4.18. CHEK1 geninin normal prostat doku (NPD) ve PC-3, DU-145 prostat kanser hücre hatlarında ifade seviyesi.....	74
Şekil 4.19. E2F1 geninin normal prostat doku (NPD) ve PC-3, DU-145 prostat kanser hücre hatlarında ifade seviyesi.....	75
Şekil 4.20. E2F2 geninin normal prostat doku (NPD) ve PC-3, DU-145 prostat kanser hücre hatlarında ifade seviyesi.....	76
Şekil 4.21. GRB2 geninin normal prostat doku (NPD) ve PC-3, DU-145 prostat kanser hücre hatlarında ifade seviyesi.....	77
Şekil 4.22. JUN geninin normal prostat doku (NPD) ve PC-3, DU-145 prostat kanser hücre hatlarında ifade seviyesi.....	78
Şekil 4.23. KAT2B geninin normal prostat doku (NPD) ve PC-3, DU-145 prostat kanser hücre hatlarında ifade seviyesi.....	79
Şekil 4.24. MAPK8 geninin normal prostat doku (NPD) ve PC-3, DU-145 prostat kanser hücre hatlarında ifade seviyesi.....	80
Şekil 4.25. P53 geninin normal prostat doku (NPD) ve PC-3, DU-145 prostat kanser hücre hatlarında ifade seviyesi.....	81
Şekil 4.26. PRMT2 geninin normal prostat doku (NPD) ve PC-3, DU-145 prostat kanser hücre hatlarında ifade seviyesi.....	82
Şekil 4.27. RAF1 geninin normal prostat doku (NPD) ve PC-3, DU-145 prostat kanser hücre hatlarında ifade seviyesi.....	83
Şekil 4.28. SP1 geninin normal prostat doku (NPD) ve PC-3, DU-145 prostat kanser hücre hatlarında ifade seviyesi.....	84
Şekil 4.29. TFDPI geninin normal prostat doku (NPD) ve PC-3, DU-145 prostat kanser hücre hatlarında ifade seviyesi.....	85
Şekil 4.30. PC-3 prostat kanser hücrelerinde MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonu sonrası MEG3 ifade değişimi..	87
Şekil 4.31. DU 145 prostat kanser hücrelerinde MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonu sonrası MEG3 ifade değişimi..	88

Şekil 4.32. PC-3 prostat kanser hücre hattına, boş plazmid, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b transfeksiyonunun PC-3 hücre morfolojisi üzerindeki etkisi.....	89
Şekil 4.33. DU 145 prostat kanser hücre hattına, boş plazmid, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b transfeksiyonunun DU 145 hücre morfolojisi üzerindeki etkisi.	90
Şekil 4.34. PC-3 prostat kanser hücrelerinde boş, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları sonrası RB1 geninin göreceli ifade düzeyi.	91
Şekil 4.35. PC-3 prostat kanser hücrelerinde boş, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları sonrası ABL1 geninin göreceli ifade düzeyi.....	92
Şekil 4.36. PC-3 prostat kanser hücrelerinde boş, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları sonrası ATF2 geninin göreceli ifade düzeyi.	93
Şekil 4.37. PC-3 prostat kanser hücrelerinde boş, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları sonrası BAG1 geninin göreceli ifade düzeyi.	94
Şekil 4.38. PC-3 prostat kanser hücrelerinde boş, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları sonrası CASP8 geninin göreceli ifade düzeyi.....	95
Şekil 4.39. PC-3 prostat kanser hücrelerinde boş, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları sonrası CDK2 geninin göreceli ifade düzeyi.	96
Şekil 4.40. PC-3 prostat kanser hücrelerinde boş, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları sonrası CHEK1 geninin göreceli ifade düzeyi.....	97
Şekil 4.41. PC-3 prostat kanser hücrelerinde boş, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları sonrası E2F1 geninin göreceli ifade düzeyi.	98
Şekil 4.42. PC-3 prostat kanser hücrelerinde boş, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları sonrası E2F2 geninin göreceli ifade düzeyi.	99
Şekil 4.43. PC-3 prostat kanser hücrelerinde boş, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları sonrası GRB2 geninin göreceli ifade düzeyi.	100
Şekil 4.44. PC-3 prostat kanser hücrelerinde boş, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları sonrası JUN geninin göreceli ifade düzeyi.	101
Şekil 4.45. PC-3 prostat kanser hücrelerinde boş, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları sonrası KAT2B geninin göreceli ifade düzeyi.....	102

Şekil 4.46. PC-3 prostat kanser hücrelerinde boş, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları sonrası MAPK8 geninin göreceli ifade düzeyi.	103
Şekil 4.47. PC-3 prostat kanser hücrelerinde boş, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları sonrası P53 geninin göreceli ifade düzeyi.	104
Şekil 4.48. PC-3 prostat kanser hücrelerinde boş, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları sonrası PRMT2 geninin göreceli ifade düzeyi.	105
Şekil 4.49. PC-3 prostat kanser hücrelerinde boş, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları sonrası RAF1 geninin göreceli ifade düzeyi.	106
Şekil 4.50. PC-3 prostat kanser hücrelerinde boş, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları sonrası SP1 geninin göreceli ifade düzeyi.	107
Şekil 4.51. PC-3 prostat kanser hücrelerinde boş, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları sonrası TFDPI geninin göreceli ifade düzeyi.	108
Şekil 4.52. DU 145 prostat kanser hücrelerinde boş, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları sonrası RB1 geninin göreceli ifade düzeyi.	109
Şekil 4.53. DU 145 prostat kanser hücrelerinde boş, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları sonrası ABL1 geninin göreceli ifade düzeyi.	110
Şekil 4.54. DU 145 prostat kanser hücrelerinde boş, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları sonrası ATF2 geninin göreceli ifade düzeyi.	111
Şekil 4.55. DU 145 prostat kanser hücrelerinde boş, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları sonrası BAG1 geninin göreceli ifade düzeyi.	112
Şekil 4.56. DU 145 prostat kanser hücrelerinde boş, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları sonrası CASP8 geninin göreceli ifade düzeyi.	113
Şekil 4.57. DU 145 prostat kanser hücrelerinde boş, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları sonrası CDK2 geninin göreceli ifade düzeyi.	114
Şekil 4.58. DU 145 prostat kanser hücrelerinde boş, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları sonrası CHEK1 geninin göreceli ifade düzeyi.	115
Şekil 4.59. DU 145 prostat kanser hücrelerinde boş, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları sonrası E2F1 geninin göreceli ifade düzeyi.	116

Şekil 4.60. DU 145 prostat kanser hücrelerinde boş, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları sonrası E2F2 geninin göreceli ifade düzeyi.	117
Şekil 4.61. DU 145 prostat kanser hücrelerinde boş, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları sonrası GRB2 geninin göreceli ifade düzeyi.....	118
Şekil 4.62. DU 145 prostat kanser hücrelerinde boş, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları sonrası JUN geninin göreceli ifade düzeyi.	119
Şekil 4.63. DU 145 prostat kanser hücrelerinde boş, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları sonrası KAT2B geninin göreceli ifade düzeyi.	120
Şekil 4.64. DU 145 prostat kanser hücrelerinde boş, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları sonrası MAPK8 geninin göreceli ifade düzeyi.	121
Şekil 4.65. DU 145 prostat kanser hücrelerinde boş, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları sonrası P53 geninin göreceli ifade düzeyi.....	122
Şekil 4.66. DU 145 prostat kanser hücrelerinde boş, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları sonrası PRMT2 geninin göreceli ifade düzeyi.	123
Şekil 4.67. DU 145 prostat kanser hücrelerinde boş, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları sonrası RAF1 geninin göreceli ifade düzeyi.	124
Şekil 4.68. DU 145 prostat kanser hücrelerinde boş, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları sonrası SP1 geninin göreceli ifade düzeyi.	125
Şekil 4.69. DU 145 prostat kanser hücrelerinde boş, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları sonrası TFDP1 geninin göreceli ifade düzeyi.	126
Şekil 4.70. Plazmid transfeksiyonlarının PC-3 prostat kanser hücrelerinin hücre çoğalması üzerine olan etkilerinin MTT testi ile gösterilmesi.	128
Şekil 4.71. Plazmid transfeksiyonlarının DU 145 prostat kanser hücrelerinin hücre çoğalması üzerine olan etkilerinin MTT testi ile gösterilmesi.	129
Şekil 4.72. Plazmid transfeksiyonlarının PC-3 prostat kanser hücrelerinin koloni oluşturma kapasiteleri üzerine olan etkisi.....	130
Şekil 4.73. PC-3 prostat kanser hücrelerinde boş, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonlarının hücrelerin koloni oluşturma kapasitesi üzerindeki etkisi.....	131

Şekil 4.74. Plazmid transfeksiyonlarının DU 145 prostat kanser hücrelerinin koloni oluşturma kapasiteleri üzerine olan etkisi.....	132
Şekil 4.75. DU 145 prostat kanser hücrelerinde boş, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonlarının hücrelerin koloni oluşturma kapasitesi üzerindeki etkisi..	133
Şekil 4.76. Plazmid transfeksiyonlarının PC-3 prostat kanser hücrelerinin yara iyileştirme kapasiteleri üzerine olan etkisi.....	134
Şekil 4.77. PC-3 prostat kanser hücrelerinde boş, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonlarının hücre yara iyileşme kapasitesi üzerindeki etkisi.....	135
Şekil 4.78. Plazmid transfeksiyonlarının DU 145 prostat kanser hücrelerinin yara iyileştirme kapasiteleri üzerine olan etkisi.....	136
Şekil 4.79. DU 145 prostat kanser hücrelerinde boş, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonlarının hücre yara iyileşme kapasitesi üzerindeki etkisi.....	137

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1. Prostat kanserine neden olan bazı risk faktörlerinin hastalığa etkisi.....	16
Tablo 2.2. Prostat kanserinde yaygın genetik bozukluklar ve biyolojik işlevleri.....	20
Tablo 2.3. Düzenleyici rollerine göre ncRNA'ların sınıflandırılması.....	21
Tablo 2.4. Onkojenik ncRNA çeşitleri ve kanserdeki etki mekanizmaları.....	22
Tablo 2.5. Tümör baskılayıcı ncRNA çeşitleri ve kanserdeki etki mekanizmaları.....	23
Tablo 2.6. İnsan kanser hücre hatlarında MEG3 ifadesi, işlev ve mekanizması.....	30
Tablo 2.7. MEG3 ifadesi ile prostat kanserinin klinikopatolojik özellikleri arasındaki ilişki.....	31
Tablo 3.1. Gen ifadesine bakılan hücre hatları ve özellikleri.....	35
Tablo 3.2. Transfeksiyon deneylerinde kullanılan hücre hatları ve özellikleri.....	36
Tablo 3.3. Çalışmada kullanılan plazmidler ve özellikleri.....	38
Tablo 3.4. LB agar besiyeri hazırlamak için gerekli malzemeler.....	43
Tablo 3.5. Hücre kültüründen elde edilen RNA'ların konsantrasyonları.....	47
Tablo 3.6. RNA panelinde bulunan doku türleri.....	47
Tablo 3.7. cDNA sentezinde kullanılan bileşenlerin oranları.....	48
Tablo 3.8. cDNA sentezi tepkime koşulları.....	48
Tablo 3.9. Hedef genlerimizin ifade seviyelerinin belirlenmesi için tasarlanan primer dizilimlerinin özellikleri.....	49
Tablo 3.10. PCR bileşenleri ve 50 µL'lik toplam hacimdeki miktarları.....	50
Tablo 3.11. Gradient PCR tepkime sıcaklık koşulları.....	51
Tablo 3.12. Gen ifade düzeyinin ölçüldüğü eş zamanlı PCR reaksiyon karışımının içerikleri.....	51
Tablo 3.13. Gen ifade düzeyinin ölçüldüğü qPCR tepkime koşulları.....	52
Tablo 4.1. Çalışmada kullanılmak için seçilen RB1 hedef genleri.....	58

Tablo 4.2. Plazmid transfeksiyonları sonrası RB1 ve hedef genlerin ifade değişimleri.

..... 127



ÖZET

PROSTAT KANSERİNDE LNCRNA MEG3'ÜN RB1 İLE İLİŞKİLİ GENLER ÜZERİNDEKİ ROLÜ

Yunus ŞAHİN

Doktora Tezi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Tez danışmanı: Prof. Dr. Emel ŞAHİN

Eylül 2020, 176 sayfa

Prostat kanseri, dünya çapında erkeklerde kansere bağlı ölümlerin ikinci önde gelen nedeni olarak sıralanan heterojen bir hastalıktır. Prostat kanserinin ilerlemesi diğer kanser türlerine göre nispeten daha yavaştır. Ancak yine de erkeklerde kansere bağlı ölümlerin %10'undan fazlasını oluşturmaktadır. Bu nedenle, prostat kanserinin gelişmesindeki temel moleküler mekanizmaların kapsamlı bir şekilde anlaşılması, etkili tedavi stratejilerinin geliştirilmesine yardımcı olabilir. Yapılan son çalışmalar uzun kodlamayan RNA'ların (lncRNA'lar) prostat kanseri patogenezinin anlaşılmasında yeni bakış açıları sağladığını göstermiştir. MEG3 (Maternally Expressed Gene 3) tümör baskılayıcı bir lncRNA'dır ve MEG3b dahil 12 farklı izoformu vardır. RB1 (Retinoblastoma Transcriptional Corepressor 1), kodladığı protein prostat kanseri dahil birçok kanserde fonksiyonsuz olan ve DNMT1 (DNA Metil Transferaz 1) ifadesini etkileyerek MEG3 ifadesini değiştirebilen başka bir tümör baskılayıcı genidir. Hem MEG3 hem de RB1, ana hücresel süreçlerde rol oynar ve p53, Mdm2 gibi bazı ortak hedefleri paylaşırlar. Çalışmamızda 30 farklı kanser ve normal hücre hattı ile 20 farklı tipte normal insan dokusu kullanılarak MEG3 gen ifade profillemesi yapılmıştır. MEG3 gen ifadesinin kanser hücrelerinde düşük olduğu görülmüştür. Gen ifadesinin en düşük olduğu PC-3 ve DU 145 prostat kanser hücrelerinde plazmid transfeksiyonuyla MEG3 ve MEG3b ifadesinin artırılması sağlanmıştır. Artan MEG3 ve MEG3b ifadesi, prostat kanser hücrelerinin çoğalmasını, koloni oluşumunu ve göçünü baskımlarken RB1 ve hedeflerinin de ifadesini değiştirmiştir.

Anahtar kelimeler: LncRNA, MEG3, MEG3b, Prostate Kanseri, RB1

ABSTRACT

ROLE OF LNCRNA MEG3 ON RB1 RELATED GENES IN PROSTATE CANCER

Yunus ŞAHİN

Ph.D. Thesis, Department of Medical Biology and Genetics

Supervisor: Prof. Dr. Emel ŞAHİN

September 2020, 176 pages

Prostate cancer is a heterogeneous disease that is ranked as the second leading cause of cancer-related deaths in males worldwide. Progression of prostate cancer is relatively slower than other cancer types. However, it still accounts for more than 10% of cancer-related mortality in males. Therefore, achieving a comprehensive understanding of the basic molecular mechanisms in developing prostate cancer can be helpful in developing effective treatment strategies. Recently, increasing evidence has shown that long non-coding RNAs (lncRNAs) provide new insights into the understanding of prostate cancer pathogenesis. MEG3 (Maternally Expressed Gene 3) is a tumour suppressor lncRNA and it has 12 different isoform including MEG3b. RB1 (Retinoblastoma Transcriptional Corepressor 1) is also another tumor suppressor gene which loss of activation is the cause of many cancers including prostate cancer and its expression level is affected MEG3 expression by DNMT1. Both of MEG3 and RB1 have role in main cellular processes and they share some common targets including p53, Mdm2. In this study, MEG3 gene expression profile was performed by using 30 different cancer and normal cell lines and 20 different types of normal human tissue. MEG3 and MEG3b was overexpressed by plasmid transfection in PC-3 and DU 145 prostate cancer cells, where gene expression was the lowest in cancer cells. Overexpressed MEG3 and MEG3b altered the expression of RB1 and its targets while suppressing proliferation, colony formation and migration of prostate cancer cells.

Key words: LncRNA, MEG3, MEG3b, Prostate Cancer, RB1

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Prostat kanseri, dünya çapında erkeklerde en sık görülen ikinci malignitedir ve erkekler arasında önemli bir hastalık ve ölüm nedenidir. Her yıl yaklaşık 1.6 milyon erkeğe teşhis konulmakta ve yaklaşık 350.000 erkek prostat kanseri nedeniyle hayatını kaybetmektedir (1). Dünya çapında prostat kanseri insidansı ve mortalitesi, artan yaş ile ilişkilidir. Prostat kanseri tanısı sonrası sağkalım, büyük ölçüde tümör evresi ve derecesi ile ilişkilidir. Düşük dereceli, lokalize prostat kanseri olan hastalar tedavi olmadan onlarca yıl yaşayabilirken, metastatik hastalığı olan hastaların ortalama sağkalım süresi 30 aydır (2). Prostat kanseri risk faktörleri çok çeşitlidir. Yaş, etnik köken ve aile öyküsü prostat kanseri için en iyi bilinen risk faktörleridir, ancak çevre ve yaşam tarzı da kanser riskini etkilemektedir (3, 4). Prostat kanserinin teşhisi için halen kallikrein-3 (KLK3) olarak da bilinen serum prostata özgü antijen (PSA) ölçümüne dayalı yöntem kullanılmaktadır. Lokalize prostat kanserinin tedavisine yönelik olarak; Gleason skoru, başlangıç PSA düzeyi, hastanın yaşı ve klinik tümör evresi dahil klinikopatolojik faktörler göz önüne alınır (5). Gleason skoru daha yüksek olan kanserler daha agresiftir ve daha kötü bir prognoza sahiptir. Patolojik skorlar 2 ila 10 arasında değişmekte, daha yüksek sayı daha fazla risk ve daha yüksek mortalite anlamına gelmektedir (6).

Androjen reseptörü (AR) ve sinyali, hem lokalize hem de ileri metastatik prostat kanserinin gelişimi ve ilerlemesi için gereklidir (7). Bu nedenle günümüzde, ileri seviye lokal prostat kanseri için önerilen tedavi, radyoterapi ile birlikte uzun süreli androjen deprivasyon tedavisinden (ADT) oluşmaktadır. ADT, dolaşımdaki testosteron düzeyini çok düşük bir miktara düşüren kimyasal bir kastrasyon yöntemidir. Bununla birlikte, bazı prostat tümörlerinde kandaki PSA seviyesinin artması ve kanser hücrelerinde AR'nin aşırı ifadenmesi sonucunda ADT tedavisine karşı direnç oluşmaktadır (8).

Kanser alanına yönelik son yıllardaki teknolojik gelişmeler prostat kanseri hastalarının erken evrede teşhisine olanak vermiştir ve terapötik sonuçları kayda değer şekilde iyileştirmiştir (9). Bununla beraber, ilerlemiş veya metastatik prostat kanserinin tedavisi ve yönetiminde halen zorluklarla karşılaşılmalıdır (10). Karmaşık ve çoklu patojenik mekanizmalar prostat kanserinin oluşumunu kolaylaştırır, ancak ayrıntılı moleküler mekanizmanın anlaşılması hastadan hastaya değişen moleküler varyasyonlar nedeniyle

halen komplikedir (11). İnsan Genom Projesinin tamamlanmasından ve genom çapında ilişkilendirme çalışmalarının başlamasından bu yana, birçok çalışma prostat kanseri için duyarlı gen lokuslarını belirlemeye çalışmıştır. Prostat kanser oluşumunun heterojenliği nedeniyle, aile bağı ve ikiz çalışmalarında tekrarlanabilir sonuçlar bulunamamıştır (12, 13). HOXB13, BRCA1, BRCA2 gibi genlerin, prostat kanserinin gelişimine neden olduğu, kanserin saldırgan seyrini önemli ölçüde arttırdığı ve yüksek penetrasyona sahip otozomal dominant bir şekilde kalıtsal olarak tanımlandığı belirlenmiştir, ancak bu sadece ailesel prostat kanserinin küçük bir yüzdesini oluşturmaktadır (14, 15). Rubin ve ark. tarafından 2018'de yapılan bir çalışmada, PTEN, RB1, TP53, AR ve C MYC genlerindeki işlev düzensizliğinin prostat kanserinin başlangıcı ve ilerlemesinde önemli rollere sahip olduğu belirtilmiştir (16).

Kodlamayan RNA'lar (ncRNAs) protein kodlamayan RNA transkriptleridir ve uzunluklarına göre iki ana gruba ayrılabilir: 18 ila 200 nt uzunluğunda kısa ncRNA'lar ve 200 nt'den büyük olan uzun ncRNA'lar (lncRNA'lar). miRNA'lar, post-transkripsiyonel olarak gen ifadesini düzenleyen yaklaşık 18-22 nt uzunluğundaki evrimsel olarak korunmuş, tek iplikçikli kısa ncRNA transkriptleridir (17). miRNA'ların birçok kanser türünde anormal düzeyde ifadelendikleri bilinmektedir (18). miRNA'ların aksine, lncRNA'lar işlevlerini yerine getirdikleri ikincil ve üçüncül yapılara katlanabilirler (19). lncRNA'lar, gen ifadesini transkripsiyonel, posttranskripsiyonel ve epigenetik seviyelerde düzenleyebilmektedir. Şimdiye kadar, gelişim ve hastalıklarda lncRNA'ların işlev ve mekanizmalarını açıklayabilmek için büyük çaba sarf edilmiştir (20). lncRNA'lar, DNA, protein ve RNA gibi diğer hücresel moleküller ile çeşitli etkileşimlere girerek, prostat kanseri de dahil olmak üzere çok sayıda kanser fenotipine neden olabilmektedirler (21, 22). Ayrıca, birçok lncRNA'nın, hücre proliferasyonunu teşvik ederek ve apoptozisi azaltarak çeşitli tümörlerin kemorezistansında da rol oynadığı gösterilmiştir (23).

lncRNA'ların keşfinden bu yana birçok lncRNA, onkogen veya tümör baskılayıcı olarak tümör oluşumuyla ilişkilendirilmiştir. Bu lncRNA'ların çoğunun rol oynadığı moleküler mekanizmalar açıklanmaya devam ederken, lncRNA'ların prostat kanserinde, hastalığın başlangıcı, gelişimi ve ilerlemesinde etkisi üzerine yapılan çalışmalar artmaktadır (24). Prostat kanserinde yüksek oranda ifade artışı gösterdiği keşfedilen ilk lncRNA'lardan biri, prostat kanser örneklerinin ifade profili ile keşfedilen Prostat Kanseri Antijen 3'tür

(PCA3). PCA3'ün, radikal prostatektomi örneklerinin % 95' inde kanserli olmayan prostat dokularına karşı prostat kanserinde belirgin şekilde aşırı ifade edildiği gösterilmiştir (25). PCA3' ün keşfinden sonra, prostat kanseri ile ilişkili olan PCAT1 ve SChLAP1 lncRNA' larının prostat kanserinde neoplazik olmayan prostat dokularına göre farklı seviyede ifadelendiği bulunmuştur (24, 26).

Maternal Olarak İfade Edilen Gen 3 (MEG3; Maternally expressed gene 3), 14q32.3 kromozomu üzerinde yer alan, ve ilk olarak fare homologu Gtl2 olarak tanımlanan bir lncRNA'dır (27). MEG3'ün damgalanma motifi, yukarı bölgesinde yer alan intergenik farklı olarak metillenmiş bölge (IG-DMR) tarafından kontrol edilmektedir (28). MEG3, tümör baskılayıcı özellik gösteren bir lncRNA olarak tanımlanmıştır. Buna uygun olarak çeşitli dokularda normal ifade edilirken, birçok insan kanser hücre hattı ve tümörlerinde MEG3 ifadesi kaybolmuştur (29). Hem MEG3 promotörünün hem de IG-DMR'nin hipermetilasyonunun MEG3 ifadesinde kayba yol açtığı insan kanser hücrelerinde gösterilmiştir (30). Luo ve arkadaşları MEG3 ifadesinin prostat kanserinde de belirgin şekilde kayba uğradığını ve MEG3 ifadesinin artırılmasıyla beraber prostat kanserinde apoptozun indüklendiği ve hücre çoğalmasının baskılandığını bildirmişlerdir (31). Retinoblastom dokularında ise sıklıkla MEG3 promotör hipermetilasyonu gerçekleşmektedir. Bu metilasyonun retinoblastom hastalarında düşük MEG3 ifadesi ve zayıf sağkalımla ilişkili olduğu bildirilmiştir (32).

Retinoblastomada kilit rol oynayan RB1 (Retinoblastoma Transcriptional Corepressor 1), tümör baskılayıcı bir gendir ve hücre döngüsü ilerlemesinin düzenlenmesinde merkezi bir rol oynar (33). RB1 yolağı ayrıca farklılaşma, apoptozun düzenlenmesi ve genomik kararlılığın sürdürülmesi gibi birçok hücresel süreçte rol oynar (34). Bu yolak, pRB protein ailesi, E2F'ler, siklinler, siklin bağımlı kinazlar (CDK'ler) ve CDK inhibitörlerinden oluşur. pRB aktif olduğunda, kromozom yeniden düzenleme faktörleri (CRF'ler) ve transkripsiyon faktörleri olan E2F'lerle etkileşime girerek G1 evresinde hücre döngüsünü durdurur, böylece hücre döngüsünün ilerlemesi için gerekli genlerin ifadesini baskılar (33). Bu yolağın bir veya daha fazla bileşeninin bir mutasyon sonucu etkisiz hale gelmesi nedeni ile hücre döngüsünün işleyişi bozulur. Bu nedenle, insan malignitelerinin büyük çoğunluğu RB yolağında mutasyonlar barındırır (35).

Primer prostat tümörlerinde retinoblastom tümör baskılayıcı gen (RB1) kaybının olduğu bildirilmiştir (36). Son zamanlardaki biyoinformatik ve kanser genomik çalışmaları RB1 lokusunun homozigot delesyonunun, prostat kanserinin başlangıç ve ilerlemesinde merkezi bir konumda olduğunu göstermiştir. RB1 işlev kaybı, AR'nin E2F aracılı ifade artışı yoluyla bir kastrasyona dirençli fenotip (CRPC) gelişimini kolaylaştırır. Buna rağmen, kastrasyon direnci ve metastatik lezyonların oluşumu dikkat çeken biyolojik süreçler olmaya devam etmektedir. (37). Ayrıca kastrasyona dirençli prostat kanserinde gen metilasyonuna eş zamanlı olarak RB alelik delesyonuna oldukça sık rastlanır (38). Yapılan bir çalışmada, prostat kanseri primer tümörlerinin yaklaşık % 5'inde RB1 lokusunun delesyonu bildirilmiştir ve sıklıkla (% 30-40) dirençli prostat kanseri ile ilişkilendirilmiştir (39). RB inaktivasyonunun, androjen AR ekspresyonunu arttırdığı ve RB'nin LNCaP hücrelerinde yıkılmasının androjen blokasyonuna duyarlılıklarını azalttığı gösterilmiştir (36).

Kümülatif olarak, bu çalışmalar RB1 işlev kaybının prostat karsinogenezinde önemli bir rolü olduğunu göstermektedir. RB1 işlev bozukluğu, tümör oluşumu ile güçlü bir şekilde ilişkili olmasına rağmen, prostat kanserinin ilerlemesini desteklediğine dair mekanizmalar hala tam olarak anlaşılamamıştır. MEG3 geninin de prostat kanserinde RB1 gibi ifade kaybına uğramış olması dikkat çekicidir. MEG3 ve RB1 arasında düzenleyici bir ilişkinin varlığı yapılan bir çalışmada ortaya konmuştur (40). Ancak henüz prostat kanserinde RB1 ve MEG3 arasında bir düzenleyici ilişki ortaya konulamamıştır. Ayrıca MEG3'ün RB1 hedef genleri üzerindeki etkisi ve bu etkinin prostat kanserindeki rolü hakkında literatürde çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmanın amacı, prostat kanseri hücrelerinde MEG3 lncRNA ifade düzeylerindeki değişikliğin RB1 ve ilişkili genler üzerine olası etkilerini araştırmak ve MEG3 lncRNA ifadesindeki değişikliğin etkilerini hücre çoğalması ve migrasyonu yönünden incelemektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Prostat Kanseri

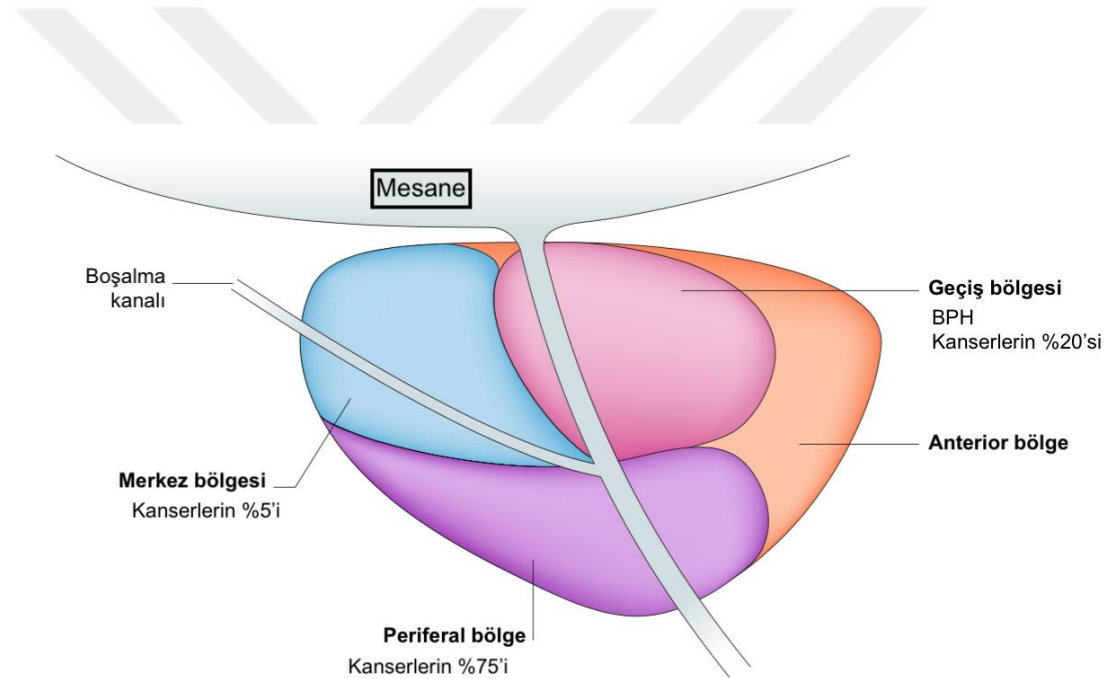
Prostat kanseri, prostat bezi hücrelerinde büyüme ve bölünme kontrolünün kaybıyla organ hacminde meydana gelen büyüme olarak tanımlanmaktadır. Prostat kanseri, yılda yaklaşık 1.600.000 vaka ve 366.000 ölüm ile dünya çapında erkeklerde cilt kanserinden sonra en sık görülen kanser türüdür (41). 1990'lı yılların başlarında Amerika Birleşik Devletleri'nde yaygın olarak kullanılmaya başlanan serum prostat spesifik antijen (PSA) testi, diğer tedavi yöntemleriyle de birleşince prostat kanserinden kaynaklı ölümlerde % 40'lık bir düşüş sağlamıştır. Bu düşüşe tedavi yöntemleriyle iyileşen hastaların etkisi sadece % 22 ile % 33 arasında olurken, ölüm oranlarının düşmesindeki en büyük etken PSA tabanlı toplum taramasının hayata geçirilmesi olmuştur (42).

Prostat Kanseri Avrupa Rastgele Tarama Çalışması (ERSPC), PSA testinin prostat kanseri üzerindeki etkisini araştırmak için yaptığı çalışmada, kontrol grubuyla (PSA testi yok) ile karşılaştırıldığında diğer grupta kanser metastaz oranında % 40 azalma ve 3 yıllık ölüm oranında ise % 20'lik bir azalma bulmuştur (43). Bu bulgular prostat kanserindeki asıl çelişkinin altını da çizmektedir: Prostat kanseri en fazla teşhis konulan ve aşırı tedavi gören kanser olmakla birlikte hala erkeklerde görülen en ölümcül kanser türlerinden biridir. Bu nedenle, fayda ve zarar dengesinin tam olarak anlaşılmaması nedeniyle toplum temelli prostat kanseri taraması tartışmalı bir konu olarak kalmaktadır (43).

Son yirmi yılda, geleneksel prostat kanser tedavilerindeki iyileşmelerle birlikte yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesiyle, kanser olan erkekler için tedavi yaklaşımları önemli ölçüde değişmiştir (44). Prostat kanserinin anatomisi, doğal öyküsü, epidemiyolojisi, tarama, tespit, tanı, derecelendirme, evreleme, risk faktörleri ve genetik mekanizması konusundaki ilerlemeler klinik uygulamayı değiştirmiş ve hastalığın tedavisine katkı sunmuştur. Tüm bu ilerlemeler prostat kanserinin gelişimi, ilerlemesi ve tedavisi için literatüre yeni katkılar sağlanmasına zemin olacaktır (45).

2.1.1. Prostat Bezinin Anatomisi

Pelviste bulunan prostat, erkeklerde üretrayı çevreleyen, mesaneye ve rektuma bitişik bir konumda yer alır. Prostat, tamamen kollajen, elastin ve düz kastan oluşan ince bir zarla çevrili bir bezdir (46). Prostat parankimi, transrektal ultrasonografi (TRUS) ile görülebilen ve radikal prostatektomi örneklerini inceleyen cerrahi patologlar tarafından kolaylıkla tanınabilen üç bölgeye ayrılmıştır. Bu bölgelerden ilki ejakülatör kanalları çevreleyen ve prostatın yaklaşık % 25'ini oluşturan merkezi bölgedir. İkincisi, prostat dokusunun % 10'u ile prostatik üretranın yakınında yer alan geçiş bölgesidir. Üçüncüsü ise prostat dokusunun büyük bir kısmı olan posterolateral bölgeyi içerisine alan periferik bölgedir (Şekil 2.1) (47).



Şekil 2.1. Prostat bezinin farklı prostat hastalıklarının baskın olduğu bölgeleri içeren bölgesel anatomisi (47).

Prostat bezinin anatomisini, özellikle de farklı prostat hastalıklarının yoğun olarak görüldüğü bölgeleri anlamak, hastalık yönetiminde kilit rol oynar. McNeil 'in çalışması, prostatın yapısal anatomisini anlayabilmemiz açısından büyük önem taşımaktadır. Bu çalışma, karsinomların genellikle prostat bezinin % 70'ini kaplayan periferik bölgede geliştiğini ve iyi huylu prostat hiperplazisinin (BPH) geçiş bölgesinde meydana gelme eğiliminde olduğunu ortaya koymuştur (47). Bu bilgiler özellikle, prostat spesifik

antijenin (PSA) ortaya çıkmasından önce, ultrasonografide görülen lezyonların kanser riskini sınıflandırmak, hastalığın araştırma ve tedavi ihtiyacını belirlemek için oldukça faydalı olmuştur.

McNeil'in çalışmalarından sonra prostatla ilgili en büyük ilerleme, prostattaki nörovasküler demetlerin anlaşılabilmesi sayesinde olmuştur. Walsh ve arkadaşları tarafından önerilen cerrahi anatomi Kourambas tarafından teyit edilmiştir. Ayrıca Costello ve arkadaşları, nörovasküler demetlerin fasya içerisinde, prostata hemen bitişik olarak tanımlanabilir bir yapı olduğunu ve prostatın cerrahi olarak çıkarımında, sinir koruyucu cerrahiyi mümkün kıldığını doğrulamışlardır (48-50). Kourambas, nörovasküler demeti, prostatın posterolateral kenarında ayrı bir yapı yerine, rektoprostatik fasyanın (Denonvilliers fasya) lateral kenarındaki yaygın bir sinir ağı birleşimi olarak karakterize etmiştir (49). Bu nedenle, radikal retropubik prostatektomi sırasında rektoprostatik fasyanın ve burada bulunan sinirlerin çıkarılması, nihayetinde post-operatif erektil disfonksiyon (ED) oluşumuna yol açan önemli bir mekanizmayı açıklamıştır. Daha az ED oranlarını sağlamak için Walsh tarafından önerilen sinir cerrahisi, günümüzde de devam eden prostatın modern cerrahi yöntemi olarak standart haline gelmiş durumdadır (51).

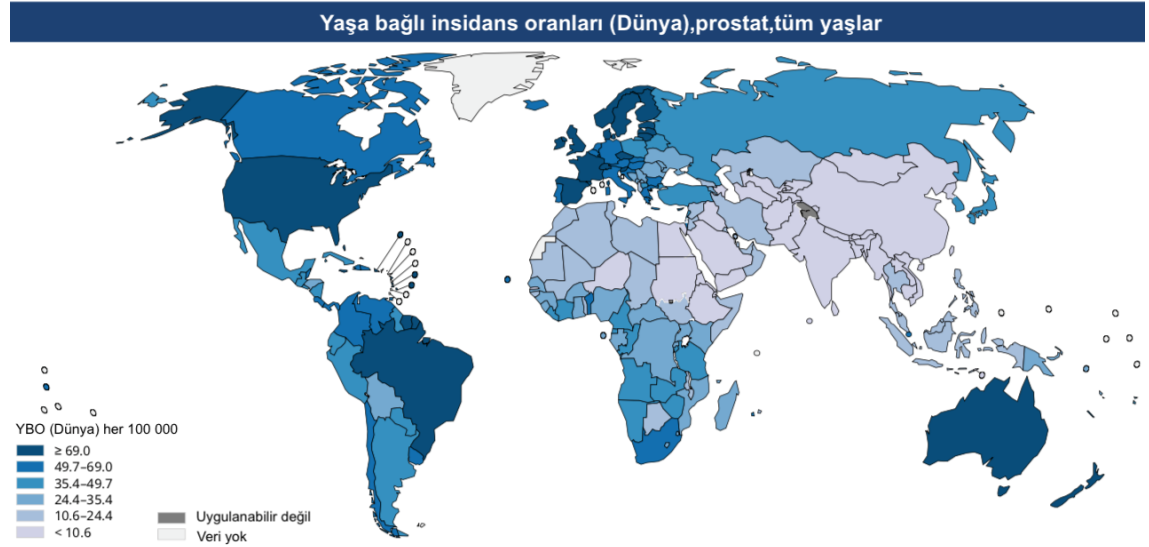
2.1.2. Prostat Kanserinin Tarihçesi

Londra Hastanesi'nde bir cerrah olan J. Adams 1853 yılında, histolojik inceleme ile keşfettiği ilk prostat kanseri vakasını açıklamıştır. Adams vaka raporunda bu durumun “çok nadir görülen bir hastalık” olduğunu bildirmiştir (52). Adams'dan 150 yıl sonra prostat kanseri önemli bir sağlık sorunu haline gelmekle beraber, Amerika Birleşik Devletleri'nde, erkeklerde en sık teşhis edilen kanser türü olmuştur (53). Prostat kanseri vakalarının sayısındaki bu dramatik artış çeşitli nedenlere bağlanabilir. Birincisi, prostat kanseri 1900' lerin başına kadar diğer idrar tıkanıklığı tiplerinden farklı değildi. İkincisi, prostat kanseri insidansı yaşla birlikte diğer tüm kanser türlerine göre daha hızlı artar. Üçüncüsü, artan insidans bir şekilde 'Batılı tarzda' yaşam biçimiyle ilişkili görünmektedir (54). Bu artan insidans, geçen yüzyıl boyunca prostat kanseri tanı ve tedavisinde önemli değişikliklere yol açmıştır. Elli yıl kadar önce, tipik prostat kanseri hastaları, 70'li yaşlarının başlarında kemik ve/veya yumuşak dokulara metastaz teşhisi

konulan bireylerdi. Karakteristik olarak, bu lezyonlar hantal ve histolojik olarak zayıf bir şekilde farklılaşmıştır. Bu durumda, hastaların tedavi için şansı oldukça düşük ve yaşam süresi en fazla 1-2 yıl olduğundan bu tanı biçimi hastalar için bir ölüm cezasıydı (55). Charles Huggins 1940' lı yıllarda, yeni bir prostat kanseri tedavisi döneminin başlangıcını müjdelemiştir. Metastatik prostat kanserinin, androjen ablasyon tedavisine yanıt verdiğini bildirmiştir. Dikkat çekici bir şekilde, oral östrojenlerle gerçekleşen tıbbi kastrasyon, herhangi bir kanser için ilk etkili sistemik tedavi olmuştur (56). Günümüzde ise halen androjen ablasyonu, genel olarak en etkili prostat kanseri tedavisi olmaya devam etmektedir.

2.1.3. Epidemiyoloji

Prostat kanseri, ABD'de erkeklerde en sık teşhis edilen katı organ malignitesidir ve dünya çapında ikinci en yaygın kanserdir. Prostat kanseri insidansı ve mortalitesi, artan yaşla ilişkilidir ve tanı yaş ortalaması 66'dır. Ayrıca Afrikalı ve Amerikalı erkeklerde insidans ve mortalite beyaz erkeklere göre daha yüksektir (57). Prostat kanseri insidansı, bölgelere ve popülasyonlara göre değişiklik göstermektedir (Şekil 2. 2) (1).



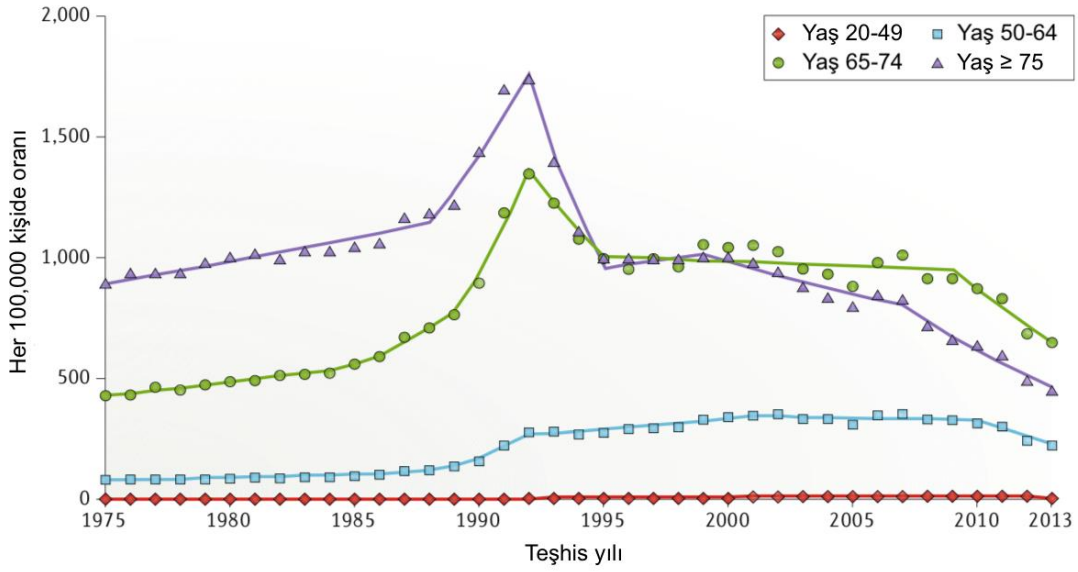
Şekil 2.2. Prostat kanserinin yaşa bağlı standardize insidans oranı. Harita dünyada 2018 yılında erkeklerde prostat kanserinin yaşa bağlı standardize insidans oranlarını göstermektedir (1).

Türkiye’de ise 2018 yılında tüm kanserler içerisinde % 14,6 orana sahip olan 17.332 yeni prostat kanseri tanısı rapor edilmiştir (Şekil 2.3). Bu rakamlarla erkeklerde prostat kanseri, akciğer kanserinden sonra en çok görülen ikinci kanser türü olmuştur (1).



Şekil 2.3. Türkiye’de 2018 yılında erkeklerde tespit edilen kanser vaka sayıları (1).

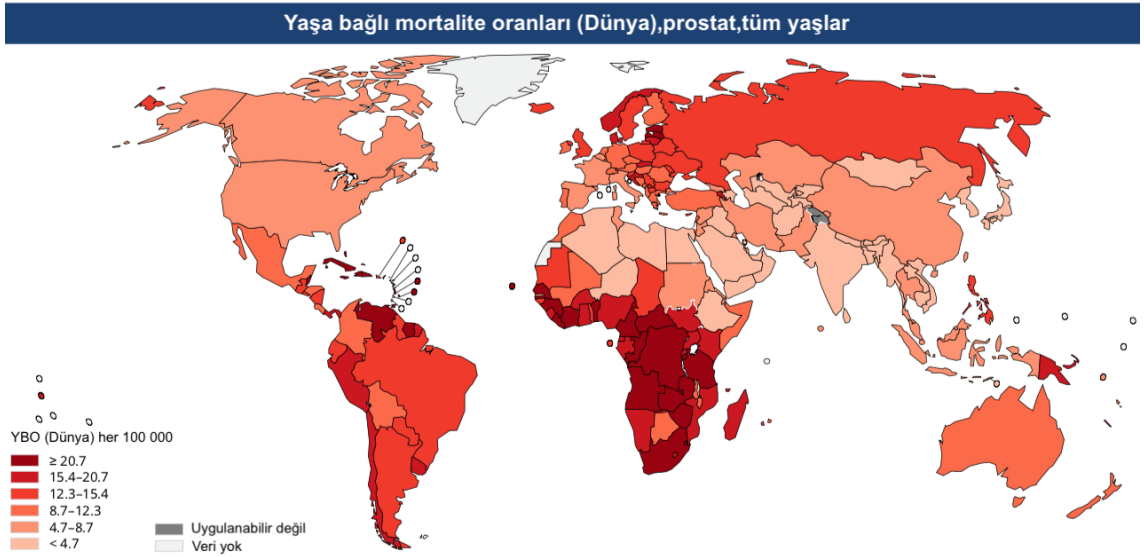
Hastalığın görülme sıklığının azaldığına dair önerilerin 2011'den itibaren popülasyon temelli PSA taramasındaki azalmanın bir ürünü olduğu düşünülmektedir. 75 yaşın üzerindeki erkeklerde PSA taraması için ABD Önleyici Hizmetler Görev Gücü'nün (USPSTF) D sınıfı tavsiyesini takiben, erken evre prostat kanseri insidansı azalmıştır (58, 59). Ayrıca, Gözetim, Epidemiyoloji ve Son Sonuçlar (SEER) verileri, insidanstaki en büyük düşüşün, USPSTF'nin 2012 raporunun taslağını yayınladığı 2011-2012 yılları arasında meydana geldiğini göstermiştir (60). Bu ilişki, ABD'de PSA taramasının başlamasından sonra 1986 ile 1991 arasında görülme sıklığındaki % 82'lik artışı yansıtmaktadır. 2012 yılında D sınıfı tavsiyenin yaştan bağımsız olarak tüm erkeklerle uzatılması hastalığın ortaya çıkması üzerinde önemli bir etkiye sahiptir (Şekil 2.4). Lokal ilerlemiş ve metastatik hastalık tanısında artışlar ABD'de 2011'de % 5' ten 2013' te % 7,7' ye yükselmiştir (61).



Şekil 2.4. ABD'de SEER verilerine göre 1975'ten 2013'e kadar yaşa göre ayarlanmış prostat kanseri insidans oranlarına PSA taramasının etkisi (58).

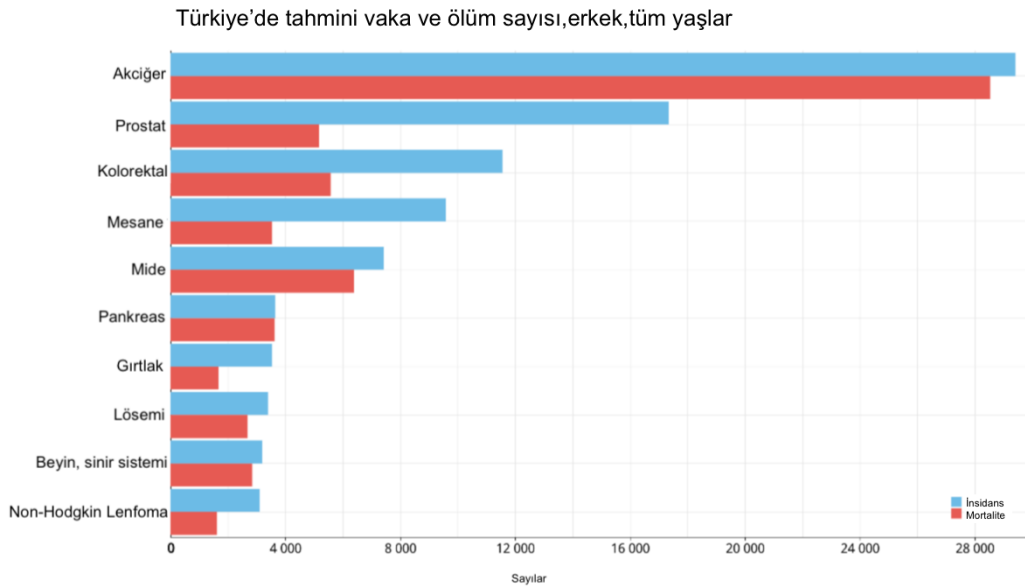
2.1.4. Mortalite

Prostat kanseri için uluslararası mortalite oranları dünya çapında büyük farklılıklar göstermektedir (Şekil 2. 5) (62). 2018 yılında en yüksek ölüm oranlarına sahip yerlerin başında 100.000 kişi başına 10.7 oran ile Orta Amerika gelmektedir. Burayı 10,2 oran ile Avustralya ve Yeni Zelanda'nın ardından 10,1 oranla Batı Avrupa takip etmektedir. En düşük oran 4,7 ile Asya ve 5,8 oran ile Kuzey Afrika ülkelerinde bildirilmiştir. Prostat kanserinden dolayı ölümlerinin üçte biri 118.427 kişi ile Asya'da, 107.315 ölüm ile %29'u ise Avrupa'da gerçekleşmiştir. Prostat kanserinin mortalite oranı yaşla birlikte artmaktadır ve tüm ölümlerin yaklaşık % 55'i 65 yaşından sonra ortaya çıkmaktadır (62).



Şekil 2.5. Harita dünyada 2018 yılında erkeklerde prostat kanserinin yaşa bağlı standardize mortalite oranları (1).

Türkiye’de ise 2018 yılında prostat kanserinden dolayı 5165 kişi hayatını kaybetmiştir. Bu rakam ile prostat kanseri kolon ve mide kanseriyle aynı mortalite oranlarına sahiptir ve akciğer kanserinden sonra mortalitesi en yüksek kanser türlerinden biridir (Şekil 2.6) (1).



Şekil 2.6. Türkiye’de 2018 yılında erkeklerde tespit edilen kanser türlerinin insidans ve mortalite sayıları (62).

2.1.5. Sağ Kalım

Prostat kanserinin insidans oranı yüksek olmasına rağmen, prostat kanseri vakalarının çoğu, kanser henüz prostat dışı dokulara yayılmamışken tespit edilmektedir. Eurocare projesinden (EUROCARE-5) elde edilen verilere göre, 2003-2007 yılları arasında prostat kanseri tanısı alan hastaların 5 yıllık sağ kalım oranlarının % 83 olduğu ortaya konulmuştur (63). Sağ kalım oranları Doğu Avrupa ülkelerinde % 76 civarındayken, Güney ve Orta Avrupa ülkelerinde % 88'e kadar değişkenlik göstermektedir. Ayrıca, sağ kalım süresi tüm Avrupa'da artmıştır ve en büyük gelişme Doğu Avrupa ülkelerinde gözlenmiştir (64). Bilim dünyası son yıllarda prostat kanserinde yer alan moleküler mekanizmaları ve risk faktörlerini ortaya çıkarmak için çok ilerleme kaydetmiş olsa da, prostat kanseri halen ABD'de erkekler için kanser mortalitesinin ikinci önde gelen nedenidir (65).

2.1.6. PSA ve Popülasyon Bazlı Tarama

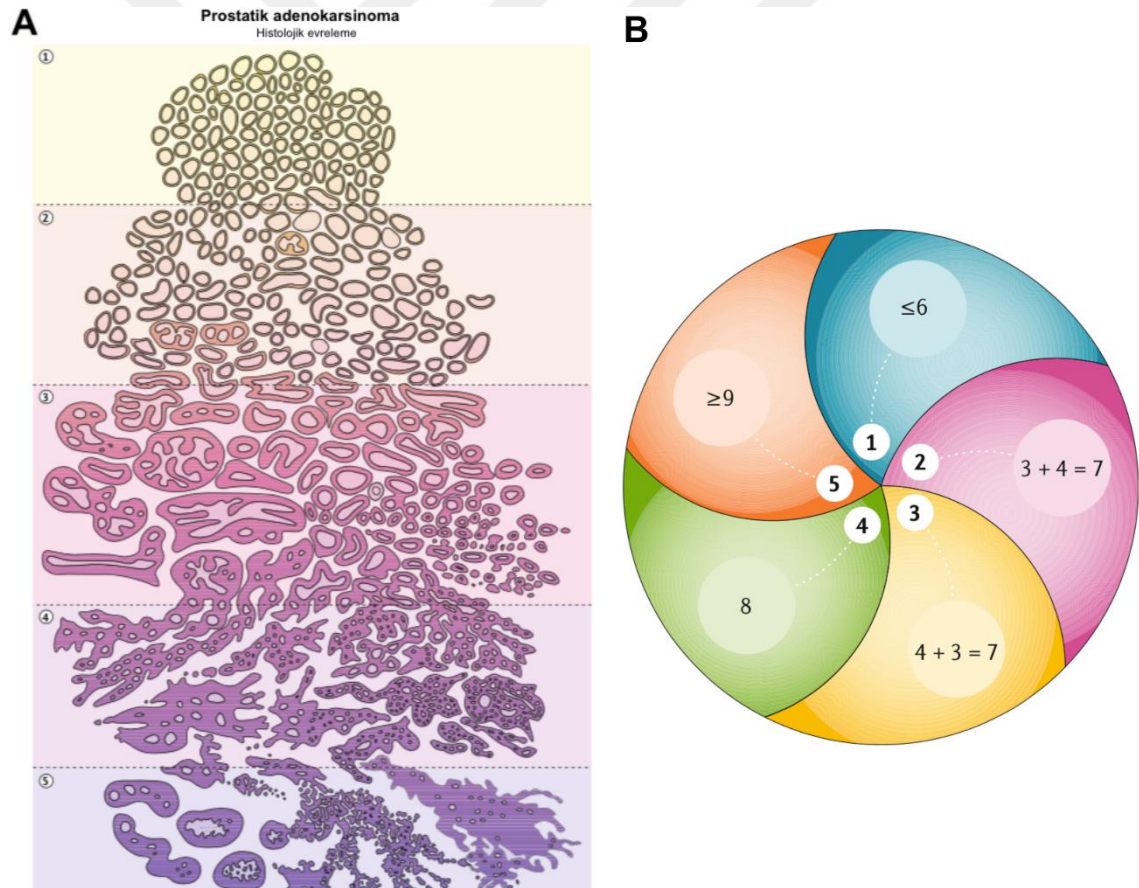
Wang ve Valenzuela tarafından 1970 yılında bulunan PSA (66), prostat kanserinin saptanmasında yüksek hassasiyete sahip olduğu için daha önce kullanılan prostatik asit fosfatazın (PAP) yerini almıştır (67). Baltimore Yaşlanma Çalışması (BLSA), hem serum PSA'sını hem de prostat kanseri ile arasındaki ilişkiyi anlamamızı sağladı (68). Prostat kanser hastalarında PSA seviyesinin yükseldiği biliniyordu ancak sağlıklı erkeklerde PSA seviyesindeki değişim oranları bilinmiyordu. Bu çalışma ile prostat kanseri tanısı konulmadan 5 yıl önce bireyin serum PSA seviyesinin arttığı tespit edildi (68). Kanser ne kadar agresif ise serum PSA seviyesindeki değişim oranı o kadar hızlı olmaktadır. Ulusal Kapsamlı Kanser Ağı, serum PSA seviyesi 3 ng/ml'den yüksek olan erkekler için biyopsi önermektedir (69).

Prostat kanseri tanısı için Prostat Sağlığı Endeksi (PHI), , SelectMDx, 4Kscore ve prostat kanseri antijeni 3 (PCA3) gibi biyolojik belirteçler geliştirilmiştir. Ancak hem yüksek maliyetle hem de erişilebilirlik sorunları nedeniyle yaygın olarak kullanılmamaktadırlar (69). Kanser taramaları, hastalığın erken tanısına katkı sağlar ve aynı zamanda aşırı tespit olarak da bilinen klinik bulgusu olmayacak kanserleri dahi tespit eder. 1990'ların başında ABD' de dijital rektal muayene (DRE), transrektal ultrasonografi ve PSA ile prostat

kanser taraması yapılmaya başlandı (70). Bu süreçte Catalonia ve arkadaşları, sadece DRE ve/veya transrektal ultrasonografi ile yapılan taramaların PSA ile yapılan taramalara göre kanserler vakalarının % 32-43'ünü kaçırdığını rapor etmiştir (71). Bu çalışma, PSA taramasının prostat kanser tanısındaki çok kritik önemini ortaya koymaktadır.

2.1.7. Grade ve Evreleme

Prostat kanseri için derecelendirme ve puanlama sistemini 1966 yılında Donald Gleason geliştirdi (72). Puanlama sistemi, prostat kanseri hücrelerinin histolojik görünümüne, stromadaki büyüme paternine ve özellikle glandüler pattern farklılaşmasına dayanmaktadır (Şekil 2.7) (73). Gleason skoru kanser tanısında ve yönetiminde olmazsa olmaz prognostik faktörlerden biridir (74).



Şekil 2.7. Gleason tarafından geliştirilen grade ve puanlama sistemi. Gleason sistemi, prostat kanseri hücrelerinin histolojik görünümüne, özellikle glandüler farklılaşma derecesine ve stromadaki büyüme paternine dayanmaktadır (72).

2.1.8. Risk Faktörleri

Prostat kanseri ile ilgili epidemiyolojik çalışmalar, bireysel biyoloji ve yaşam tarzının prostat kanseri riskini ve bu hastalıktan sağ kalım oranını etkileyen birçok risk faktörü ortaya koymuştur (Tablo 2.1). Prostat kanserinin etiyolojisi çok sayıda çalışmanın konusudur ve diğer yaygın kanserlere kıyasla büyük ölçüde bilinmemektedir. Köklü prostat kanseri risk faktörleri ileri yaş, etnik köken, genetik faktörler ve aile öyküsüdür (3). Prostat kanseri ile olumlu ilişkili diğer faktörler arasında diyet (doymuş hayvansal yağ ve kırmızı et tüketiminde artış, meyve, sebze, vitamin ve kahvenin daha az alımı), obezite ve fiziksel hareketsizlik, inflamasyon, hiperglisemi, enfeksiyonlar ve kimyasallara çevresel maruziyet veya iyonlaştırıcı radyasyon (4, 75).

Tablo 2.1. Prostat kanserine neden olan bazı risk faktörlerinin hastalığa etkisi (75).

Risk faktörleri	Kanıtlanmış etkisi
İleri yaş	Yüksek
Etnik köken	Yüksek
Diyet	Orta
İnsülin	Orta
Cinsiyet hormonları	Yüksek
Aile öyküsü	Yüksek
Genetik faktörler	Yüksek

2.1.8.1.İleri Yaş

Prostat kanseri, ileri yaştaki erkeklerde en sık teşhis edilen malignitedir (1). Prostat kanseri tanısı almış olan yaşlı erkek sayısındaki artış, uzun yaşam beklentisinin arttırdığından PSA taraması yaygınlaşmıştır. Ailesinde prostat kanseri öyküsü olmayan beyaz erkeklerde özellikle 50 yaşından sonra, ailesinde prostat kanseri öyküsü olan siyah ve beyaz erkeklerde 40 yaşından sonra prostat kanseri riskinin arttığı gözlenmiştir (76).

2.1.8.2. Etnik Köken

Prostat kanseri prevalansı farklı etnik kökenler arasında büyük farklılıklar göstermektedir. ABD'de en düşük insidans 46.9 oranla Amerikan Kızılderili erkeklerde görülmektedir. Bunları 93.9 oranla beyaz erkekler takip etmektedir. En yüksek insidans oranı ise 157.6 ile Afrikalı-Amerikalı erkeklerde görülmektedir (77). Bu büyük eşitsizlik hem sosyoekonomik koşullar hem de biyolojik faktörlerle ilişkilendirilmiştir. Örneğin, Afrikalı Amerikalıların daha düşük kalitede sağlık hizmeti aldıklarına ve sonuç olarak PSA taramasına girme olasılıklarının daha düşük olduğuna inanılmaktadır (78, 79).

Birçok çalışma genetik yatkınlığın rol oynayabileceğini öne sürdü. Afrikalı-Amerikalı erkekler, artmış prostat kanseri riski ile ilişkili olduğu gösterilen daha yaygın kromozom 8q24 varyantlarına sahiptir (80, 81). Bazı araştırma çalışmaları, Afrikalı Amerikalıların EphB2 gibi tümörleri baskılayan veya BCL2 gibi hücre apoptozunu düzenleyen genlerde yüksek oranda varyasyona sahip olduğunu göstermiştir (82, 83). Ayrıca, Afrikalı-Amerikalı erkekler, yeterli tarama ve gecikmiş sunum eksikliği de hariç tutulmamasına rağmen, genetik ve biyolojik farklılıklar ile ilişkili olan daha agresif bir hastalık formu sergilemektedir (78).

2.1.8.3. Diyet

Düşük prostat kanser insidansı bulunan gelişmekte olan ülkelere daha yüksek riskli sanayileşmiş ülkelere göç eden göçmenler üzerinde yapılan batılılaşmış yaşam tarzında değişikliğin nasıl tetiklendiğini gösteren çeşitli çalışmaların kanıtladığı gibi, diyet faktörleri prostat kanserinin gelişiminde önemli bir rol oynayabilmektedir (84). Örneğin Chu ve arkadaşları, Afrika kökenli Amerikalılar arasında prostat kanseri insidans oranının Afrika'daki insanlarla karşılaştırıldığında 40 kat kadar yüksek olduğunu bildirmiştir. Aynı zamanda Hsing ve arkadaşları, ABD'de yaşayan Çinli erkeklerde prostat kanseri insidansının Çin'de yaşayan erkeklere kıyasla 16 kat daha yüksek olduğunu tespit etmiştir. Tüm bunlar prostat kanser insidansında çevresel faktörlerin önemli bir rol oynadığını göstermektedir (85).

2.1.8.4. İnsülin ve İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü

Serum glikozu doğrudan insülin tarafından kontrol edilir, bu nedenle daha yüksek glikoz seviyesi pankreas β hücrelerinden insülin salınımını indükler. Lehrer ve arkadaşları, yüksek riskli prostat kanseri hastalarının daha yüksek insülin düzeylerine sahip olduklarını göstermişlerdir (86). Ek olarak, diyetle indüklenen hiperinsülinemi, bir zenograf modelinde tümör büyümesindeki artış ile ilişkilendirilmiştir (87). İnsülin benzeri büyüme faktörü (IGF-1), bağlayıcı proteinlerin üretimini azaltır. Dolaşımdaki yüksek insülin seviyesi, IGF-1 seviyesini artırır ve karsinogenezi teşvik eden ileri glikasyon son ürünlerinin üretimini artırır (88). IGF sisteminin uygunluğu çeşitli çalışmalarda değerlendirilmiştir. IGF-1'in serumdaki artmış konsantrasyonu, daha yüksek prostat kanseri riski ile korelasyon göstermektedir (89).

2.1.8.5. Cinsiyet Hormonları

“Androjen hipotezi” olarak da bilinen prostat kanseri patogenezinde ve ilerlemesinde androjenlerin önemli rolünü destekleyen, modern ve tarihsel verilerin büyük etkisi vardır. 1941'de Huggins ve Hodges, prostat kanseri hastalarında kastrasyonun faydalarını gözlemledikten sonra prostat kanseri büyümesinin androjenler tarafından yönlendirildiğini ileri sürmüşlerdir (90). Farklılaşmış prostat kanseri hücre hatlarından elde edilen birçok in vitro veri, androjen uyarımına yanıt verdiklerini ve androjenin geri çekilmesiyle apoptoza maruz kaldıklarını göstermiştir. Benzer şekilde, in vivo çalışmalar, androjenlerin hayvan modellerinde tümör oluşumunu ve ksenograft büyümesini desteklediğini ve androjen yoksunluğunda ise tümörün küçüldüğünü göstermiştir (91, 92).

2.1.8.6. Aile Öyküsü ve Genetik Faktörler

Prostat kanseri olan hastaların yaklaşık % 20'sinin sadece paylaşılan genler nedeniyle değil, aynı zamanda belirli çevresel kanserojenlere ve yaygın yaşam tarzı alışkanlıklarına benzer bir maruz kalma modeli için gelişebilecek bir aile öyküsü bildirdiği tahmin edilmektedir (93). Birçok çalışma kalıtsal genetik aile öyküsünün artmış prostat kanseri riski ile ilişkili olduğunu ve hastalık risklerinin yaklaşık % 5'ine katkıda bulunduğunu bildirmiştir (94, 95).

Gen bağlantı çalışmaları, prostat kanserinde yüksek etkiye sahip olan genlerin yedi farklı lokusta bulunduğunu ortaya çıkarmıştır. HPC1(Hereditary prostate cancer 1) geni olarak adlandırılan kromozom 1q24-25, doğuştan gelen bağışıklık savunma mekanizmaları ve interferon (IFN) aracılı sinyalleşme ile ilişkili ribonükleaz L (RNASEL) enzimini kodlamaktadır. RNASEL antiviral aktivitenin azaltılmasında ve apoptotik hücre ölümünün düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır (96, 97). Dikkat çekici bir şekilde, RNASEL mutasyonları olan prostat kanserli hastalardan alınan örnekler incelendiğinde retrovirüs varlığı tespit edilmesi, hastalığın gelişiminde antiviral savunma mekanizmasının önemini ortaya koymuştur (98).

17p11 kromozomu üzerinde bulunan bir başka HPC geni ELAC2 ise SMAD2'ye bağlanıp TGF-beta sinyal yolağını aktive ederek prostat kanseri gelişiminde rol almaktadır (99). Tanımlanan üçüncü HPC geni, 8p22 kromozomu üzerinde bulunan makrofaj temizleyici reseptör 1'dir (MSR1) (100). BRCA1 genindeki iki mutasyona sahip olan erkeklerde klinik olarak HPC'nin bir alt kümesini oluşturan agresif bir prostat kanseri formunun oluştuğu bulunmuştur. Ayrıca, BRCA2 gen mutasyonları da yüksek prostat kanseri insidansı ile korele edilmektedir. BRCA2 ile etkileşime sahip PALB2 proteini de ailesel prostat kanserinde rol oynamaktadır (101, 102).

X kromozomunun da prostat kanseri kalıtımında bir rolü olduğuna inanılmaktadır. X kromozomu AR içerir ve ve Xq26.3-q27.3 bölgesindeki küçük delesyonlar, sporadik ve kalıtsal prostat kanseri formlarında kaydedilmiştir (103). 301 kalıtsal prostat kanseri vakası üzerinde yapılan güncel bir çalışmada, hastalık üzerinde etkisi olabilecek bir dizi yeni lokus tanımlanmıştır (104).

2.1.9. Genetiği ve Moleküler Biyolojisi

İkizlerle yapılan çalışmalar, çoklu kişiler üzerindeki çalışmalar, özellikle epidemiyolojik çalışmalar ve genom çapında ilişkilendirme çalışmaları (GWAS) ile prostat kanserinin moleküler mekanizmasını aydınlatılmaya çalışılmıştır. Bu bilgiler prostat kanserinin başlaması, ilerlemesi ve tedavisine dair terapötik stratejiler belirlemede bir temel oluşturmaktadır (105). Hastalık üzerine yapılan birkaç büyük ölçekli genom çalışmaları ile genom üzerindeki mutasyonlar, DNA kopya sayısındaki değişiklikler, yeniden düzenlemeler ve gen füzyonları tanımlanmıştır (Tablo 2.2) (106).

Tablo 2.2. Prostat kanserinde yaygın genetik bozukluklar ve biyolojik işlevleri (106).

Gen	Genomik Değişim	Lokus	Prostat Kanserinde Biyolojik İşlevi
APC	Delesyon	5q22.2	Wnt sinyal yolağının antagonisti; ayrıca hücre göçü ve adezyonu, transkripsiyonel aktivasyon ve apoptoz gibi diğer süreçlerde rol oynar.
AR	Amplifikasyon/ Mutasyon/ Splays Varyantları	Xq12	Steroid hormonla aktive edilen gelişimde önemli bir transkripsiyon faktörü; AR'nin amplifikasyonu ve mutasyonları, prostat kanserinin ilerlemesine ve AR yolunun yapısal aktivasyonuna izin vererek ADT'nin başarısızlığına katkıda bulunur.
ATM	Delesyon/Mutasyon	11q22.3	DNA hasarına karşı hücre yanıtı ve genom kararlılığı için gerekli olan hücre döngüsü kontrol noktası sinyal yollarının ana kontrolörlerinden biri.
BRCA1	Delesyon/Mutasyon	17q21.31	Transkripsiyonda anahtar rol oynar.
BRCA2	Delesyon/Mutasyon	13q13.1	DNA'da çift zincir kırıklarının tamiri ve rekombinasyon
ETVs	Füzyon/Delesyon	-	ETS aktivasyonu, soy spesifikasyonu, genom instabilitesi,
ERG	Füzyon/Delesyon	21q22.2	epigenetik değişiklikler ve metabolizma yeniden
ETS2	Delesyon	21q22.2	modellenmesi dahil olmak üzere geniş mekanizmalarla tümör oluşumunu artırır.
ERF	Delesyon/Mutasyon	19q13.2	E26 transformasyona özgü 2 (ETS2) promotörüne bağlanan transkripsiyonel baskılayıcı; ERG, ETS'nin konsensus bölgesindeki DNA'ya bağlanmak için ERF ile rekabet eder.
EZH2	Mutasyon	7q36.1	AR dahil olmak üzere, transkripsiyon faktörleri için koaktivatör gibi davranır.
FOXA1	Mutasyon	14q21.1	Murine prostatında, epitelyal hücre farklılaşması için gereklidir ve CRPC'de hücre döngüsünün ilerlemesini teşvik eder.
PTEN	Delesyon/Mutasyon	10q23.31	Hücre sağ kalımı, proliferasyonu ve enerji metabolizmasını düzenlemek için PI3K-AKT-mTOR yolağını bastırır.
RB1	Delesyon/Mutasyon	13q14.2	Hücre döngüsünün negatif regülatörü; genel kromatin yapısını korumak için heterokromatini stabilize eder.
SMAD4	Delesyon/Mutasyon	18q21.2	Tümör süpresörü; TGFβ yolağının downstream efektörü olarak işlev görür, gen transkripsiyonunu düzenler, epitel hücre çoğalmasını engeller ve TME'yi yeniden şekillendirir.
TP53	Delesyon/Mutasyon	17p13.1	Hücre döngüsünün durması, apoptoz, yaşlanma, DNA onarımı veya metabolik değişimde rol oynayan genlerin ifadesini düzenlemek için hücrel strese yanıt verir.

2.2. Kanser Gelişiminde Kodlamayan RNA'ların Rolü

Yüksek verimli dizileme teknolojilerindeki ve bilişim platformlarındaki son gelişmeler, genel olarak kodlamayan RNA (ncRNA) olarak bilinen birçok RNA türünün keşfine ve karakterizasyonuna olanak sağlamıştır. Memeli genomundan transkribe olan RNA'ların sadece %1-2'si protein kodlarken, büyük çoğunluğu protein kodlamayan ncRNA sınıfını oluşturmaktadır (107). NcRNA'lar rol oynadıkları düzenleyici mekanizmalara göre iki kategori altında toplanabilir (Tablo 2.3). Housekeeping ncRNA'lar, hücrede sürekli ve yüksek bir ifadeye sahiptir ve daha çok belirgin hücrel işlevleri düzenlerler. Düzenleyici ncRNA'lar ise transkripsiyonel ve transkripsiyon sonrası gen ifadelerini düzenleyen önemli düzenleyici RNA molekülleri olarak kabul edilmektedir (108).

Tablo 2.3. Düzenleyici rollerine göre ncRNA'ların sınıflandırılması (108).

Çeşit	Kısaltma	Tam Adı	Uzunluk
Housekeeping ncRNA'lar	rRNA	Ribozomal RNA	120-4500 nt
	tRNA	Transfer RNA	76-90 nt
	snRNA	Küçük çekirdek RNA'sı	100-300 nt
	snoRNA	Küçük nükleolar RNA	60-400
	TERC	Telomeraz RNA	/
	tRF	tRNA-kökenli fragment	16-28 nt
	tiRNA	tRNA yarısı	29-50 nt
Düzenleyici ncRNA'lar	miRNA	Mikro RNA	21-23 nt
	siRNA	Küçük müdahaleci RNA	20-25 nt
	piRNA	Piwi-etkileşimli RNA	26-32 nt
	eRNA	Enhanser RNA	50-2000 nt
	lncRNA	Uzun kodlamayan RNA	> 200 nt
	circRNA	Halkasal RNA	100-10000 nt
	Y RNA	Y RNA	/

Geçtiğimiz on yıldaki çalışmalar ncRNA algımızı 'önemsiz' transkripsiyonel ürünlerden kromatin yeniden modellenmesi, transkripsiyon, transkripsiyon sonrası modifikasyonlar ve sinyal transdüksiyonu dahil hücrel süreçlere aracılık eden fonksiyonel düzenleyici moleküllere dönüştürdü (107, 109). Çeşitli ncRNA'ların önemli biyolojik süreçlerde

anahtar rol oynadığı gösterilmiştir ve bunların deregölasyonunun kanser dahil farklı hastalıklarda rol oynadığı gösterilmiştir (110, 111). Kanser oluşum ve ilerleme mekanizmasında rolü olan onkojenik ncRNA örnekleri Tablo 2.4'te, tümör baskılayıcı ncRNA örnekleri Tablo 2.5'te gösterilmiştir (112).

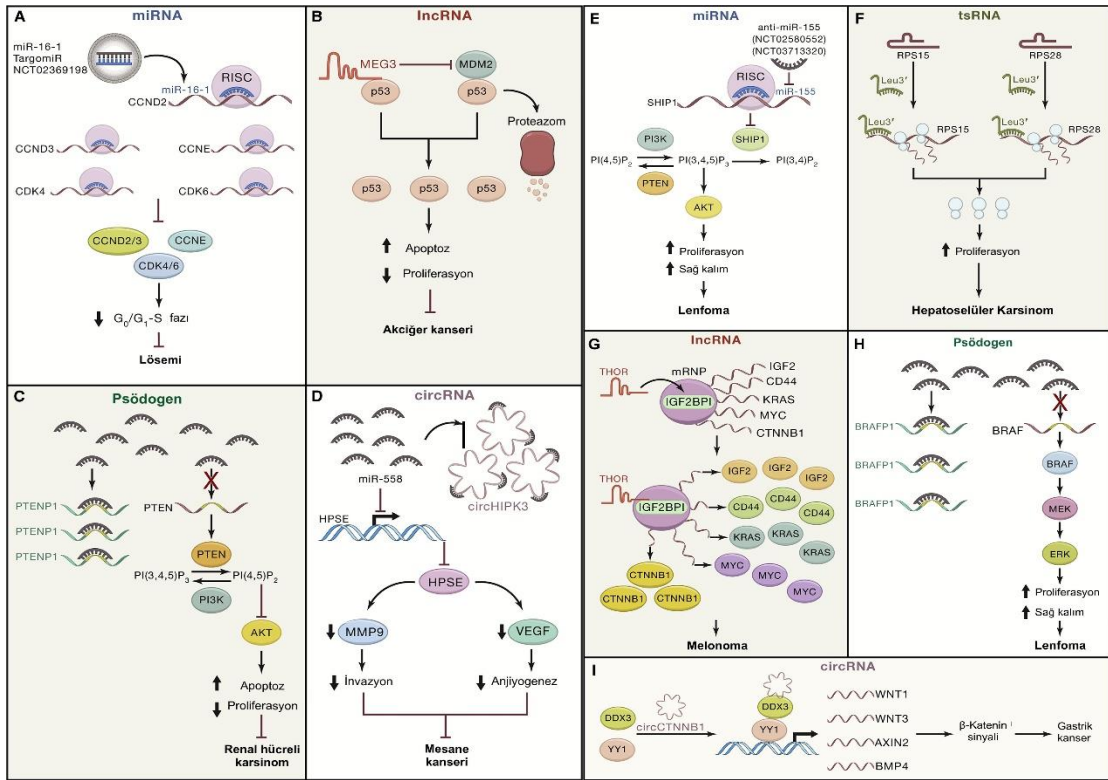
Tablo 2.4. Onkojenik ncRNA çeşitleri ve kanserdeki etki mekanizmaları (112).

ncRNA	Kanser Türü	Kansere Bağlı ncRNA'nın Mekanizmaları
miR-10b	Meme, Glioblastoma	Hücre döngüsünün ilerlemesi, göç, istila ve metastaz düzenleyicilerini kodlayan çeşitli transkriptleri hedefler
miR-155	Lenfoma	AKT'nin negatif düzenleyicisi olan SHIP1 transkriptini hedefler, SHIP1 hücre çoğalmasını ve sağ kalımı artırır
ARLNC1	Prostat	Nükleer bir reseptör olan AR'yi kodlayan mRNA ile etkileşime girerek, hücre proliferasyonu ve sağ kalımını destekleyen onkojenik AR sinyalini uyarır
CCAT1	Kolorektal, Özofagus	Proliferasyonu arttırmak ve apoptozu azaltan genlerin ifadesini aktive etmek için transkripsiyon faktörleriyle etkileşir
PCAT-1	Prostat	DNA hasar onarımına etki etmek için BRCA2 tümör baskılayıcı geninin ifadesini baskılar
SAMMSON	Melanoma	Mitokondriyal homeostazi ve metabolizmayı düzenleyen proteinlerin hücre altı lokalizasyonlarıyla etkileşir ve kontrol eder
SChLAP1	Prostat	İnvazyon ve metastazı arttırmak için SWI / SNF kromatin modifiye edici kompleks ile etkileşir ve komplekse antagonist etki eder
circCCDC66	Kolorektal	Onkojenik transkriptleri hedefleyen bazı miRNA'ları sünger gibi çeker, proliferasyonu, migrasyonu ve invazyonu teşvik eder
circCTNNB1	Mide	DDX3'e bağlanarak Transkripsiyon faktörü (YY1)'in ifadesini arttırarak WNT- kateninin hedef genlerini aktive etmek için DDX3'e bağlanır

Tablo 2.5. Tümör baskılayıcı ncRNA çeşitleri ve kanserdeki etki mekanizmaları (112).

İsim	Kanser Türü	Kansere Bağlı ncRNA'nın Mekanizmaları
Let-7	Akciğer	Onkogenleri kodlayan (RAS dahil) transkripleri hedefler, hücre döngüsü ilerlemesi ve proliferasyonun azalmasına önemlidir.
miR-15a/16-1	Prostat, Lösemi	Siklinleri, CDK'ları ve anti-apoptotik proteinleri kodlayan çeşitli transkriptleri hedefler, böylece apoptozu artırır ve proliferasyonu inhibe eder.
miR-122	Karaciğer	Lipid metabolizması, proliferasyon ve inflamasyonda yer alan birkaç genin ifadesini hedefler.
GAS5	Glioblastoma	Glukokortikotiroid için bir nükleer reseptör yanıt elemanı taklidi olarak işlev gösterir, onkogenik miRNA ekspresyonunu azaltır, bu da apoptozun artmasına, proliferasyonun, invazyonun ve göçün azalmasına yol açar.
LET	Karaciğer, Kolonorektal	HIF-1a seviyelerinin ve hücre invazyonunun düzenlenmesinde rol oynayan önemli bir faktör olan bir dsRNA bağlayıcı protein (NF90) ile etkileşir ve destabilize eder.
MEG3	Akciğer	Apoptozu aktive etmek ve proliferasyonu azaltmak için p53 tümör baskılayıcı seviyelerini artırır.
PTENP1	RCC, Mesane	PTEN tümör baskılayıcı transkriptini hedefleyen miRNA'lar için bir ceRNA olarak işlev görür ve artmış apoptoz, azalmış proliferasyon, migrasyon ve invazyona yol açar.
CircHIPK3	Mesane	Bir endoglikozidazın (HPSE) ifadesini baskılamak için miRNA'ları süngerler, böylece göç-öncesi faktörler ve anjiyogenik faktörlerin seviyelerini azaltır.
miR-506	Yumurtalık	İfadesini azaltmak için SNAI2 transkriptini hedefler böylece göç, istila ve EMT'yi inhibe eder.
miR-122	Karaciğer	Lipid metabolizması, hücre proliferasyonu ve inflamasyonda yer alan birkaç genin ifadesini hedefler.

NcRNA'ların dahil olduğu ağlar, spesifik hücre biyolojik tepkilerini ve kaderlerini harekete geçirmek için çok sayıda moleküler hedefi etkileyebilir. Sonuç olarak, ncRNA'lar gelişimsel ve hastalık bağlamında fizyolojik programların kilit düzenleyicileri olarak işlev görür. Özellikle kanserle ilgili olan ncRNA'lar, her ana kanser tipinde onkojenik sürücüler ve tümör baskılayıcılar olarak tanımlanmıştır (113). Her iki kategori için de birkaç örnek ile onkojenik ve tümör baskılayıcı yollar Şekil 2.8'de görselleştirilmiştir (112).



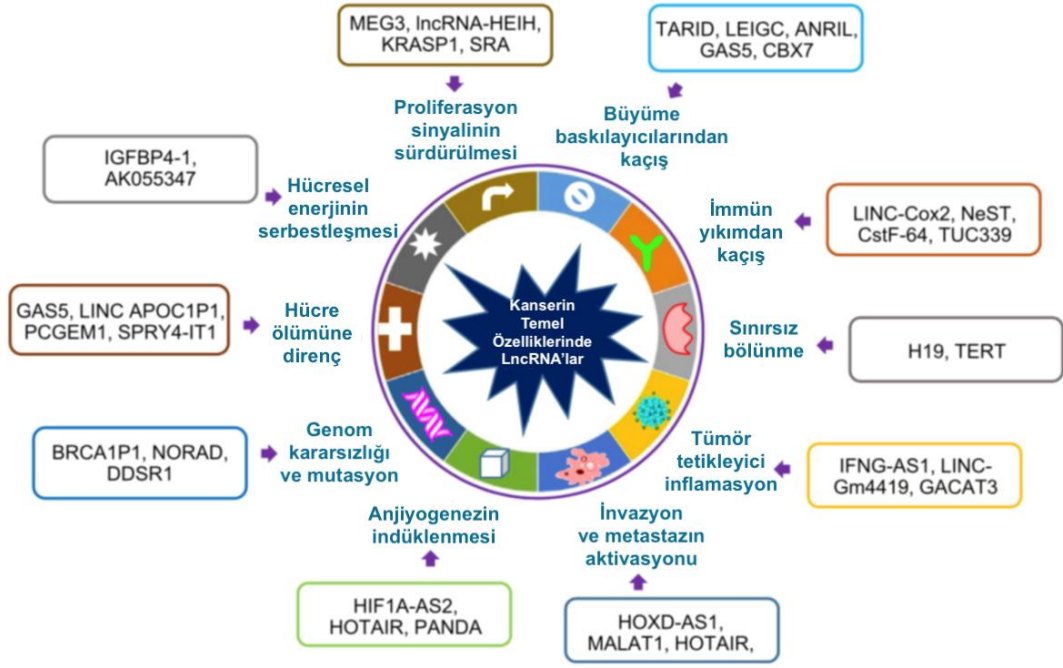
Şekil 2.8. Tümör baskılayıcı ve onkojenik bazı ncRNA kanser mekanizmaları. A,B,C ve D'de farklı ncRNA türlerinin kanserde tümör baskılayıcı mekanizmalarına bazı örnekler verilmiştir. E,F,G,H ve I'da ise farklı ncRNA türlerinin onkojenik moleküler mekanizmalarına bazı örnekler verilmiştir (112).

2.2.1. Uzun Kodlamayan RNA'lar (LncRNAs)

Uzun kodlama yapmayan RNA'lar (lncRNA'lar), genellikle protein kodlayamayan ve transkript uzunluğu 200'den fazla olan bir RNA sınıfıdır (114). Protein kodlamayan transkriptlerin büyük çoğunluğu lncRNA sınıfına aittir. Şimdiye kadar tanımlanmış lncRNA'ların kodlandığı gen sayısı yaklaşık 55 000'dir. Bu rakam insan genomunun büyük çoğunluğunu temsil etmektedir (115). Bu genlerin hala az bir kısmının, hücresel süreçlerin düzenlenmesindeki işlevi ve etki mekanizması aydınlatılabilmektedir (116).

Kısa kodlamayan RNA'ların aksine, lncRNA'lar yapı ve işlev bakımından oldukça çeşitlidir. LncRNA'lar bazı özellikleri bakımından mRNA ile benzer bir yapıya sahiptir. Örneğin, lncRNA'lar, 5' başlık, poly-A kuyruğa sahiptir ve kırılma mekanizması ile işlevsel olgun transkript haline gelir. Ayrıca, tıpkı mRNA'lar gibi RNA polimerase II tarafından sentezlenir. Hem çekirdekte hem de sitoplazmada bulunabilirler, ancak lokalizasyonlarını yönlendiren sinyaller henüz bilinmemektedir (117). Genellikle lncRNA'lar, protein kodlayan genlerle karşılaştırıldığında düşük ifade seviyesine sahiptir. Buna rağmen, birçoğu dokuya ve gelişimsel aşamalara özgü düzenleyici rollere sahip ifade paternleri sergilemektedir (118).

LncRNA'lar, daha önceleri transkripsiyon işleminin yan ürünleri olarak düşünülüyordu. Ancak, lncRNA'lar'ın, hücrelerde gen ifadesini ve işlevini transkripsiyonel, translasyonel ve translasyon sonrası süreçlerde düzenleyerek çeşitli biyolojik süreçlerde rol aldığı bilinmektedir (119). LncRNA'lar farklı kanser türlerinde yaygın olarak anormal ifade seviyesinin sahiptir. Bu nedenle lncRNA'ların, insan karsinogenezinde anahtar oyunculardan biri olduğu düşünülmektedir (21). LncRNA'lar kanser başlangıcı ve ilerlemesindeki birçok aşamada rol oynamaktadır. Bazı önemli lncRNA'ların kanserin temel özelliklerinde etkin rolleri şekil 2.9'da gösterilmiştir (120).

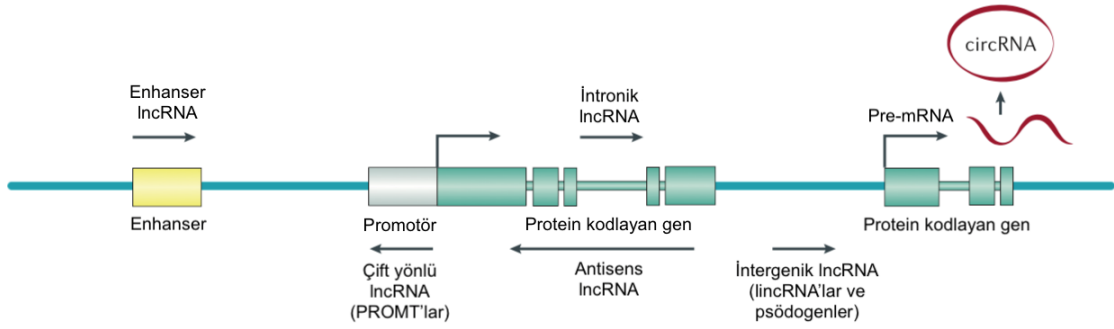


Şekil 2.9. Kanserin temel özelliklerinde etkin olan bazı önemli lncRNA'lar (120).

2.2.1.1. LncRNA'ların Sınıflandırılması

LncRNA'lar uzunluk, hücre içi konum ve moleküler işlevler bakımından kısa ncRNA'lardan oldukça farklı olduğundan dolayı lncRNA'ların sınıflandırılması daha güçtür (121). Genomik organizasyona göre, lncRNA'lar beş ana kategoriye ayrılabilir: intergenik, intronik, antisense, enhancer ve çift yönlü lncRNA. Bazı olgunlaşmamış mRNA'lar da ters kırılma ile lncRNA olarak kabul edilen halkasal RNA (circRNA)'ları meydana getirir (Şekil 2.10) (122)

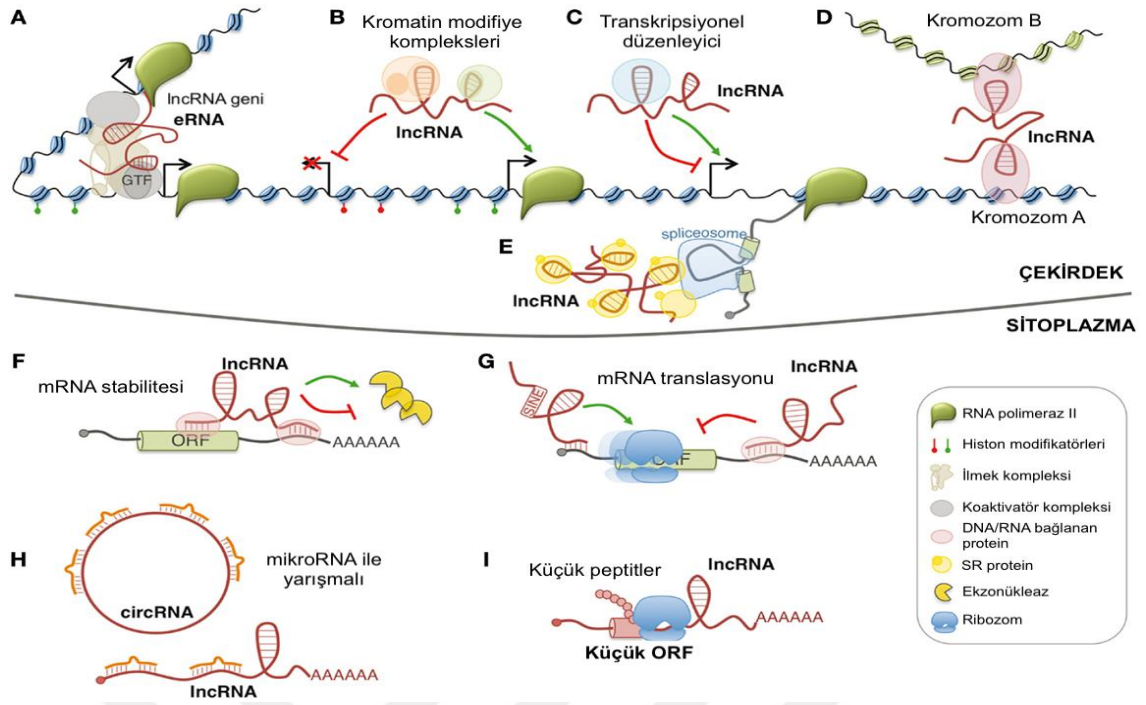
- İntergenik lncRNA, protein kodlayan iki gen arasındaki bölgeden;
- İntronik lncRNA, protein kodlayan genlerin intronik bölgesinden;
- Antisense lncRNA, protein kodlayan genlerin antisens yönünden;
- Enhancer lncRNA, genomun enhancer bölgelerinden;
- Çift yönlü lncRNA, protein kodlayan genlerin promotör bölgelerinden çift yönlü olarak transkribe olurlar (122).



Şekil 2.10. LncRNA'ların genomdaki sentez bölgelerine göre sınıflandırılması (122).

2.2.1.2. LncRNA'ların İşlevleri

LncRNA'lar, çekirdekte genom yapısını ve transkripsiyonu kontrol ederek, sitoplazmada ise mRNA kararlılığını, translasyon ve translasyon sonrası modifikasyonları kontrol ederek gen ifadesinin her basamağında rol alan önemli düzenleyiciler olarak ortaya çıkmaktadır (123). LncRNA'ların bulundukları konuma göre rol oynadıkları mekanizmalar da değişmektedir. Hem çekirdekte hem de sitoplazmada çeşitli düzenleme mekanizmalarında etkindirler. LncRNA'lar özellikle, kromozomların konformasyonu, kromatin ve DNA modifikasyonları, RNA transkripsiyonu, mRNA olgunlaşması, mRNA bozulması, mRNA translasyonu ve translasyon sonrası modifikasyonların düzenlenmesi gibi birçok hücresel süreci etkilemektedirler (Şekil 2.11) (124).



Şekil 2.11. LncRNA'ların hücresel işlevleri (124).

LncRNA'lar çekirdekte ve sitoplazmada gerçekleşen birçok hücresel süreçte rol oynamaktadır (124).

Çekirdek lncRNA'ları;

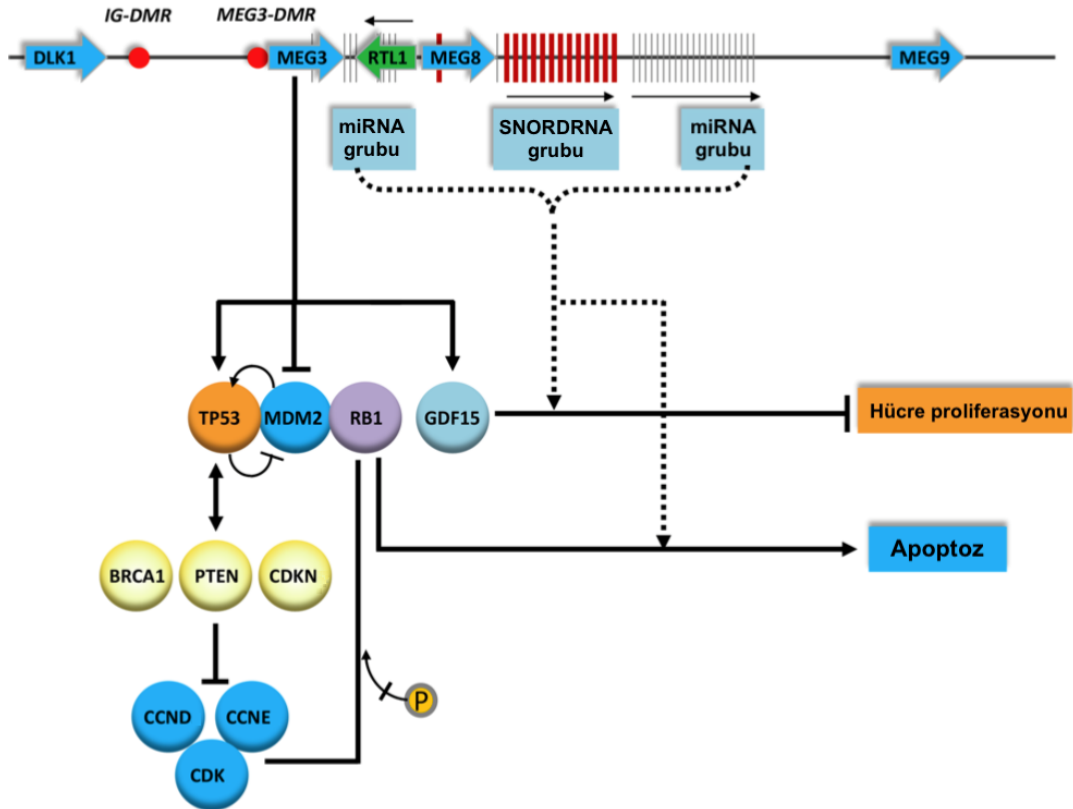
- Enhancer RNA olarak transkripsiyonu düzenleyebilir,
- Transkripsiyon düzenleyici komplekslerin gene bağlanmasını düzenleyebilir,
- Transkripsiyon faktörlerinin aktivitesini düzenleyebilir,
- Kromozomların konformasyonuna etki ederek, gen ifadesini düzenleyebilir,
- Olgunlaşmamış mRNA'nın kesip-çıkarma mekanizmasını düzenleyebilir.

Sitoplazmik lncRNA'lar;

- mRNA kararlılığını düzenleyerek mRNA'nın ifadesini düzenleyebilir,
- mRNA'nın translasyonunu düzenleyebilir,
- miRNA'ları üzerine toplayarak mRNA'ya bağlanmasını engelleyebilir,
- Biyolojik aktiviteye sahip bazı kısa peptit dizileri için açık okuma çerçevesi (ORF) içerebilir.

2.2.2. MEG3 (Maternally Expressed Gene 3)

MEG3 (Maternally Expressed Gene 3), kromozom 14q32 bölgesinde bulunan ve çok sayıda damgalı gen bulunduran DLK1-MEG3 bölgesinde yer alan bir lncRNA'dır (125, 126). MEG3'ün yanı sıra bu bölge birçok miRNA ve snoRNA'ya sahiptir ve bu bölgedeki transkriptlerin damgalama kontrolü metilasyon yolu ile düzenlenir (Şekil 2.12) (127).



Şekil 2.12. MEG3'ün genomdaki yeri ve kanser gelişimine katılımıyla ilgili genomik organizasyon gösterimi. (Genler, mRNA ve snoRNA'lar belirtilir ve transkripsiyon yönelimleri oklarla gösterilir. Kırmızı noktalar farklı şekilde metillenmiş bölgeleri temsil eder. MEG'lerin hücre proliferasyonu ve apoptozunda rol oynayan anahtar genlerle şematik etkileşimleri belirtilir. Oklar aktivasyonu gösterir. Noktalı çizgiler varsayılan etkileşimlerdir.) (127).

MEG3, yaklaşık 1.6 kb nükleotid uzunluğunda, on ekzon içeren ve maternal alelden ifade edilen bir lncRNA'dır (128). MEG3 birçok normal insan dokusunda ifade edilmesine rağmen, meme kanseri, akciğer kanseri, prostat kanseri ve diğer kanserler dahil olmak üzere çok sayıda kanser türünde ifade kaybına uğramıştır (Tablo 2.6) (129).

Tablo 2.6. İnsan kanser hücre hatlarında MEG3 ifadesi, işlev ve mekanizması (129).

Kanser Türü	MEG3 İfadesi	Hedefleri	İşlevi
Kronik Miyeloid Lösemi	Azalan	miR-21, MRP1, MDR1, ABCG2	↓Proliferasyon, ↑Apoptoz, ↑İmanitib Kemorezistansı
Papiller Tiroid Karsinom	Azalan	Rac1	↓Migrasyon, ↓İnvazyon
Prostat Kanseri	Azalan	Bcl-2, Bax, Kaspaz 3, Siklin D1	↓Proliferasyon, ↑Apoptoz, ↓Hücre Canlılığı, ↓Tümorogenez
Hipofiz Bezi Kanseri	Azalan	p53	↓Proliferasyon, ↓Apoptoz
Renal Hücreli Karsinom	Azalan	MiR-7, RASL11B	↑Apoptoz ↓Proliferasyon, ↓Migrasyon, ↓İnvazyon
Endometriyal Kanseri	Azalan	Notch1, Hes1	↓Proliferasyon, ↓Tümör Büyümesi
Serviks Kanseri	Azalan	Rac1	↓Migrasyon, ↓İnvazyon, ↓Hücre Sağ Kalımı, ↓Proliferasyon
Pankreas Kanseri	Azalan	Snail	↓Proliferasyon, ↓Migrasyon, ↓İnvazyon, ↓Kemorezistans
Gastrik Kanseri	Azalan	miR-181 family, Bcl-2	↓Proliferasyon, ↓Migrasyon, ↓İnvazyon, ↑Apoptoz
Nazofarenjiyal Karsinom	Azalan	p53	↓Proliferasyon, ↓Koloni Oluşumu
Meme Kanseri	Azalan	SP3, DNMT1, miR-506, SP1	↓Migrasyon, ↓İnvazyon

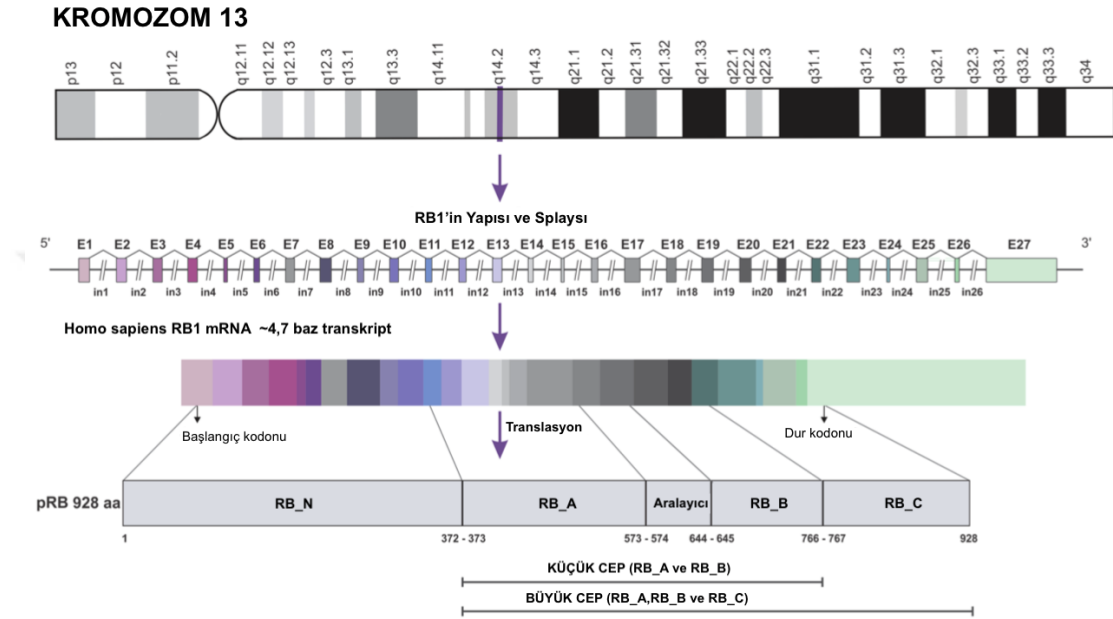
LncRNA'ların ifadesindeki düzensizlik birçok tümörün başlangıcı ve ilerlemesinde belirgin rol oynamaktadır (21). Yapılan bir çalışmada, MEG3'ün ifadesi prostat kanser dokularında sağlıklı prostat dokulara göre önemli derecede düşük bulunmuştur. Ayrıca, MEG3 ifadesi ile hastalığın klinikopatolojik özellikleri arasında ilişki tablo 2.7'de gösterilmiştir (31).

Tablo 2.7. MEG3 ifadesi ile prostat kanserinin klinikopatolojik özellikleri arasındaki ilişki (31).

Klinikopatolojik Özellikler	Grup	Toplam	MEG3 ifadesi		P Değeri
			Düşük	Yüksek	
Yaş(Yıl)	< 65	9	5	4	0,3972
	≥ 65	12	9	3	
PSA(ng/ml)	< 10	13	8	5	0,6557
	≥ 10	8	6	2	
Gleason puanı	≤ 6	8	4	4	0,3458
	≥ 7	13	10	3	
Klinik evre	≤ T2a	16	11	5	1.0
	≥ T2b	5	3	2	
Metastaz	Pozitif	3	1	2	0.2474
	Negatif	18	13	5	

2.3. RB1 (RB transcriptional corepressor 1)

RB1 (RB transcriptional corepressor 1), kromozom 13q14.2 bölgesinde bulunan, 27 ekzon içeren ve toplam 180 kilobaz uzunluğa sahip protein kodlayan bir gendir. RB1'in 4700 baz uzunluğundaki bir transkriptinden 928 aminoasitten oluşan Rb proteini (pRb) kodlanır (Şekil 2.13) (130).

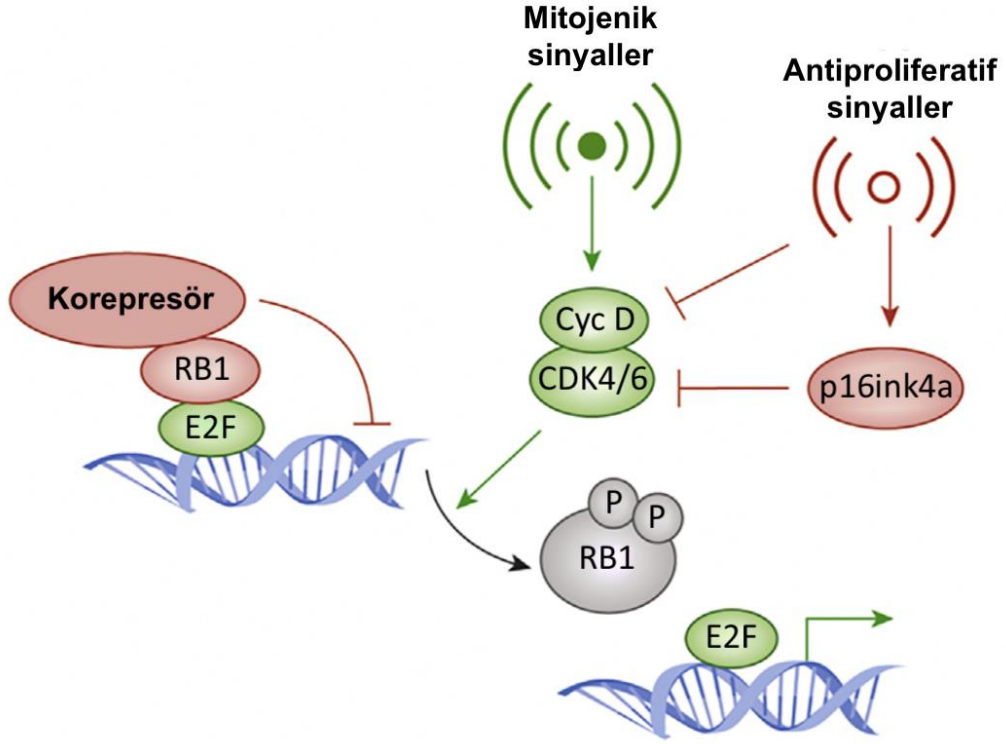


Şekil 2.13. RB1'in 13. Kromozomdaki yeri ve yapısı. RB1 transkript ürünü 928 aa uzunluğundaki pRB proteindir (130).

Özellikle hücre büyümesinin durması ve ölümü de dahil olmak üzere kanser tedavileri üzerinde hücre kaderini düzenlemede önemli bir rol oynayan RB1, tedavilere klinik yanıtın önemli bir belirleyicisi ve terapötik kararları desteklemek için belirgin bir aday olarak ortaya çıkmıştır. Bu amaçla, RB1'in çeşitli hücresel yollardaki karmaşık etki mekanizması tam olarak anlaşılmaya çalışılmaktadır (131, 132). RB1, tanımlanan ilk tümör baskılayıcı gendi ve o zamandan beri, RB yolağının kanser hücrelerinde çok sık inaktif olarak tümör gelişimine neden olduğu anlaşılmıştır (133).

RB1'in tümör baskılayıcı aktivitesi, transkripsiyon düzenleyicilerinin E2F ailesinin üyelerine bağlanarak G0/G1 fazından S fazına hücre döngüsü geçişini engelleyerek hücre çoğalmasını kısıtlama yeteneğine dayanmaktadır (134, 135). RB1'in düşük fosforile hali E2F'in trans-aktivasyon bölgesini bloklar. Bu ikili yapı, DNA sentezi ve hücre döngüsü

ilerlemesi için kritik olan genlerin promotör bölgelerini baskılar (136). Ancak, mitojenik sinyallere yanıt olarak siklin D-siklin bağımlı kinaz (CDK) 4/6 komplekslerinin aracılık ettiği RB1 fosforilasyonu, RB1'i inaktive ederek E2F transkripsiyon faktörlerini serbest kalmasına ve hücre döngüsünün devam etmesine neden olur (Şekil 2.14) (137).



Şekil 2.14. RB1 yolağının tümör baskılayıcı aktivitesi (137).

2.3.1. Prostat Kanseriinde RB Yolağının Rolü

RB1, moleküler olarak tanımlanan ilk tümör baskılayıcı gendir ve DNA replikasyonu ve onarımı, gen transkripsiyonu, hücre döngüsü ve mitoz gibi çeşitli biyolojik süreçlerde önemli rol oynar (34, 133). RB1 tümör baskılayıcısının inaktivasyonu, kanserin en sık ve erken tanınan moleküler özelliklerinden biridir (138).

Prostat kanserinde, RB1 yolağı AR alt yolağında yer almaktadır (139). AR'nin doğal ve sentetik androjenlerle aktivasyonu, siklin/CDK aktivitesini artırarak RB1 fosforilasyonunu artırır. Sonuç olarak artan AR aktivitesi hücre çoğalmasını artırıcı bir etkiye sahiptir (140). Ayrıca AR bağımlı ve bağımsız prostat kanser hücrelerinde, AR seviyesindeki düşüş, RB1 fosforilasyonunun azalması ve buna bağlı olarak G0/G1'de hücre

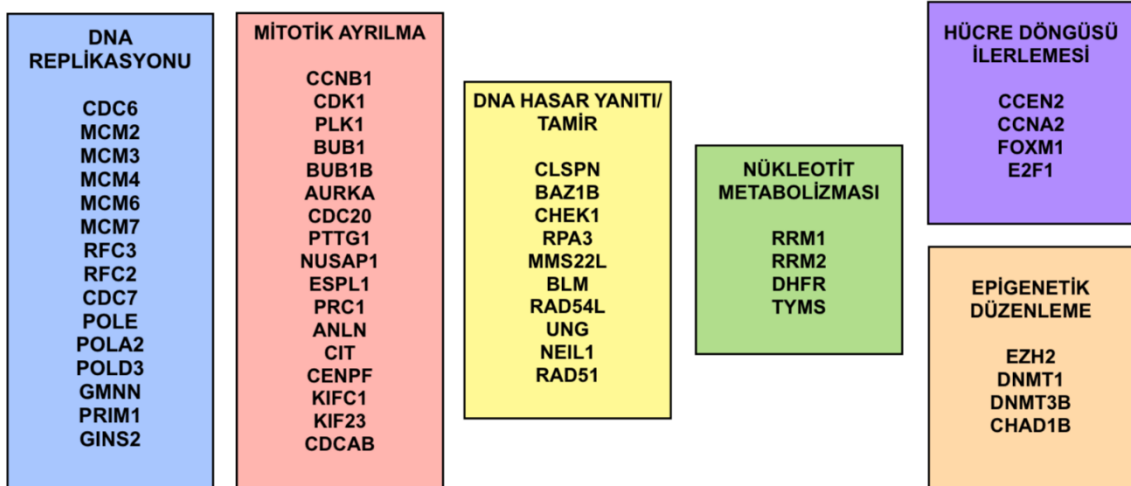
döngüsünün durması ile ilişkilidir (141). AR transkripsiyonu E2F transkripsiyon faktörleri tarafından düzenlenir. RB1, E2F'e bağlanarak hedef gen ifadelerini düzenlediği için RB1 kaybı AR'nin ifadesinin değişimine etki edebilir (142).

2.3.2. RB1 Hedef Genleri

RB1, hücresel süreçlerde birçok farklı işleve sahiptir. En önemli işlevlerinden biri de DNA replikasyonu ve mitotik ilerleme için gerekli olan çok sayıda gen içeren transkripsiyonel programın baskılanmasıdır. RB1 inaktivasyonu, hücre döngüsünün S fazı ve sonrasına ilerlemesi için gerekli olan genlerinin ekspresyonuna izin verir (143).

RB1 aktivasyonu ve delesyonunun çok sayıda modeli üzerine yapılan gen ifade analizlerinde yüksek oranda korunmuş birçok gen tanımlanmıştır. Bu genler, çoğunlukla hücre döngüsü ile ilgili DNA replikasyonu, mitotik ayrılma gibi birden fazla işlemde yer alırken DNA onarımı ve epigenetik programlamada da önemli rollere sahiptir (Şekil 2.15) (137).

RB1 YOLAĞININ YAYGIN TRANSKRİPSİYONEL HEDEFLERİ



Şekil 2.15. Çeşitli hücresel süreçlerde RB1'in transkripsiyonel hedefleri (137).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Hücre Hatları

Tez çalışmasında kullanılan hücre hatları gen ifade analizi ve fonksiyonel hücre deneyleri olmak üzere iki guruba ayrılmaktadır. Çalışmamızda MEG3 ve RB1 genlerinin ifade analizi için kullandığımız farklı kanser ve normal hücre hatları ATCC (ATCC, Teddington, UK)'den temin edilmiştir (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. Gen ifadesine bakılan hücre hatları ve özellikleri.

Hücre Adı	Köken	Hücre Özellikleri
HGC 27	Mide	Metastatik bölgeden türevli doku, farklılaşmamış karsinom
HE-LA	Serviks	Adenokarsinom
HL-60	Periferal Kan	Akut promiyelotik lösemi, miyeloblastik
PANC1	Pankreas	Pankreas/Duct, karsinom
HUV-EC-C	Göbek bağı	Normal
A-172	Beyin	Glioblastoma
BEAS-2B	Akciğer	Bronş, Normal
A549	Akciğer	Karsinom
Nthy-ori 3-1	Tiroid	Foliküler epitel, Normal
B-CPAP	Tiroid	Zayıf farklılaşmış papiller tiroid karsinomdan (PTC) türevli PTC
CAL-29	Mesane	Mesane transisyonel hücreli karsinom
LNCaP	Prostat	Metastatik bölgeden türevli: sol supraklaviküler lenf nodu
DU 145	Prostat	Metastatik bölgeden türevli: beyin
PNT1A	Prostat	SV40 ile immortalize edilmiş insan post pubertal normal prostat
PC-3	Prostat	Metastatik bölgeden türevli doku, Grade IV, Adenokarsinom
DLD-1	Kolon	Dukes' tip C, Kolorektal adenocarcinoma
HT-29	Kolon	Kolorektal karsinom
HCT 116	Kolon	Kolorektal karsinom
HCC-1500	Meme	Meme Bezi / Dukt, TNM evre IIB, Grade 2, Primer duktal karsinom
hTERT-HME1	Meme	Meme bezi epiteli, normal hücre
MCF-7	Meme	Meme bezi ve metastatik bölgeden türevli doku, Adenokarsinom
SK-BR-3	Meme	Meme bezi, Metastatik bölgeden türevli doku, Plevral Efüzyon
MDA-MB-231	Meme	Meme bezi, Metastatik bölgeden türevli doku, Adenokarsinom
2-A	Böbrek	Embriyonik böbrek hücresi
HEK-293	Böbrek	Embriyonik böbrek hücresi

Hep G2	Karaciğer	Hepatoselüler Karsinom
SNU-423	Karaciğer	Evre III / IV, Pleomorfik hepatoselüler karsinom
hFOB 1.19	Kemik	SV40 büyük T antijeni transfekte edilmiş, Normal hücre
OST-7	Kemik	Osteosarkom
U-2 OS	Kemik	Osteosarkom

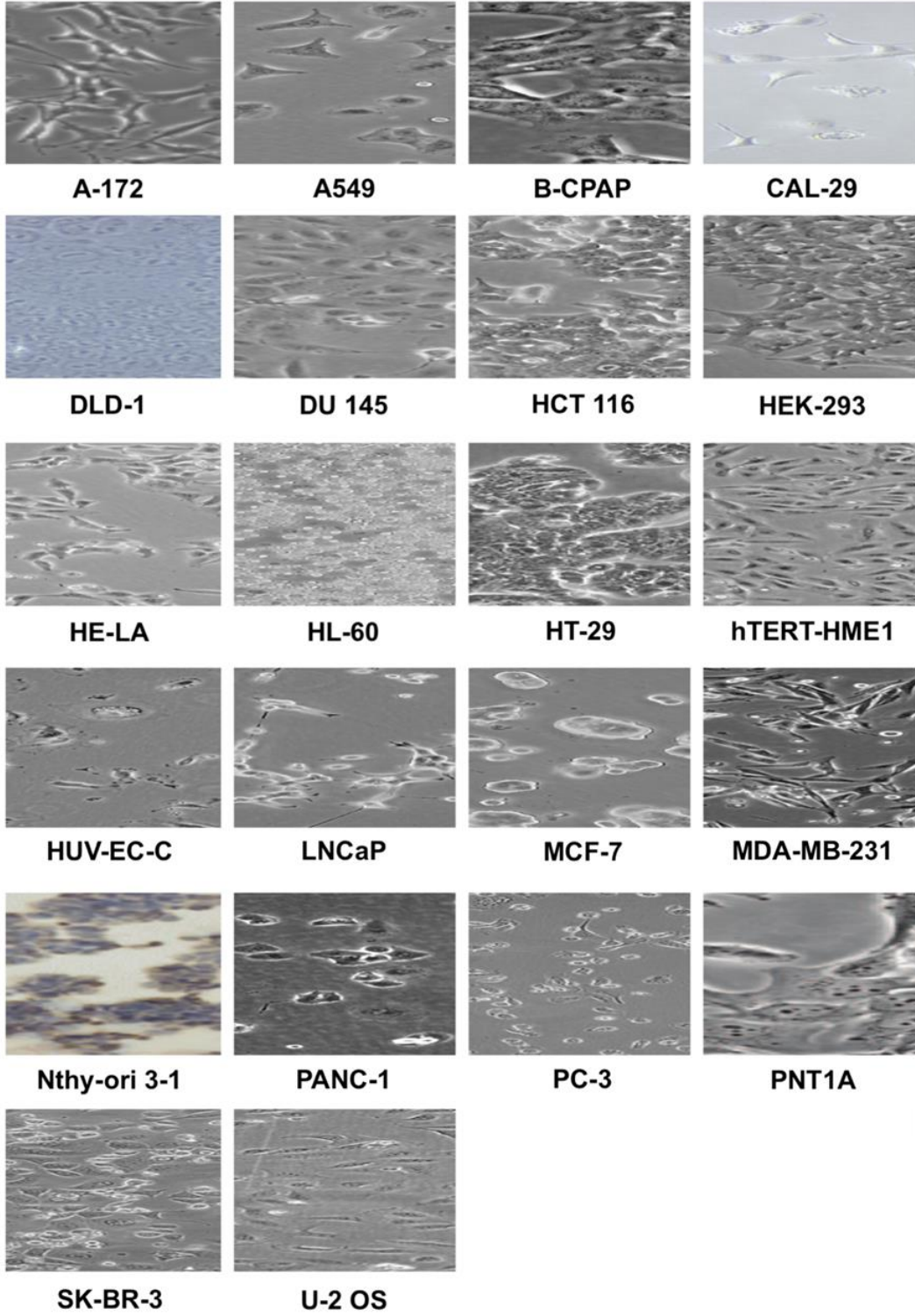
MEG3 gen ifade düzeyi PC-3 ve DU 145 prostat kanser hücre hattında düşük seviyede olduğu için MEG3 overekspresyon deneylerinde kullanılmak üzere bu iki hücre hattı seçilmiştir. Plasmid transfeksiyonu ve fonksiyonel hücre deneyleri için seçilen prostat kanser hücre hatları ve özellikleri Tablo 3.2’de gösterilmiştir.

Tablo 3.2. Transfeksiyon deneylerinde kullanılan hücre hatları ve özellikleri.

No	Hücre İsmi	Hücre tipi	Hücre özellikleri
1	DU-145	Epitel	Prostat, metastatik bölgeden türevli doku, karsinom
2	PC-3	Epitel	Prostat, metastatik bölgeden türevli doku, Grade IV, Adenokarsinom

3.2. Hücre Kültürü

Hücreler hFOB1.19 hariç %10 cenin sığır serum (fetal bovine serum, FBS) (Sigma, Deisenhofen, Almanya), 50 U/ml penisilin/streptomisin (Sigma, Deisenhofen, Almanya) içeren DMEM (Dulbecco’s modified eagle’s medium) (Thermo Scientific, California, USA) ve RPMI (Roswell Park Memorial Institute) (Sigma, Deisenhofen, Almanya) besi yerleri içerisinde çoğaltılmıştır. Hücreler, karbondioksit inkübatöründe % 5 CO₂’li ortamda, 37°C sıcaklıkta ve %95’lik nemli ortamda kültür edilmiştir (Şekil 3.1). hFOB1.19 hücre hattı 1:1 oranında karışımı hazırlanmış olan Ham's F12 Medium Dulbecco's Modified Eagle's Medium ile 2.5 mM L-glutamine içeren 0.3 mg/ml G418 ortamda büyütülmüştür. Karbondioksit inkübatöründe % 5 CO₂’li ortamda, 34°C sıcaklıkta ve %95’lik nemli ortamda kültür edilmiştir (Şekil 3.1). Her 2-3 günde bir, hücre yoğunluğuna ve deneysel ihtiyaçlara bağlı olarak pasajları gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan hücrelerin morfolojik görüntüleri. (Bu görüntüler <http://www.atcc.org/> internet sitesinden alınmıştır).

3.3. MEG3 ve Kontrol Plazmidlerin oğaltılması

Prostat kanser hücre hatlarına transfekte edilmek üzere MEG3 ve izoformu MEG3b ile kontrol plazmidler olan boş plazmid ve delesyonlu MEG3 plazmidi Addgene (Addgene, Watertown, US)’den agara gömülü halde temin edilmiştir. Çalışmada kullanılan bu plazmidler ve zellikleri Tablo 3.3’te gösterilmiştir.

Tablo 3.3. Çalışmada kullanılan plazmidler ve özellikleri.

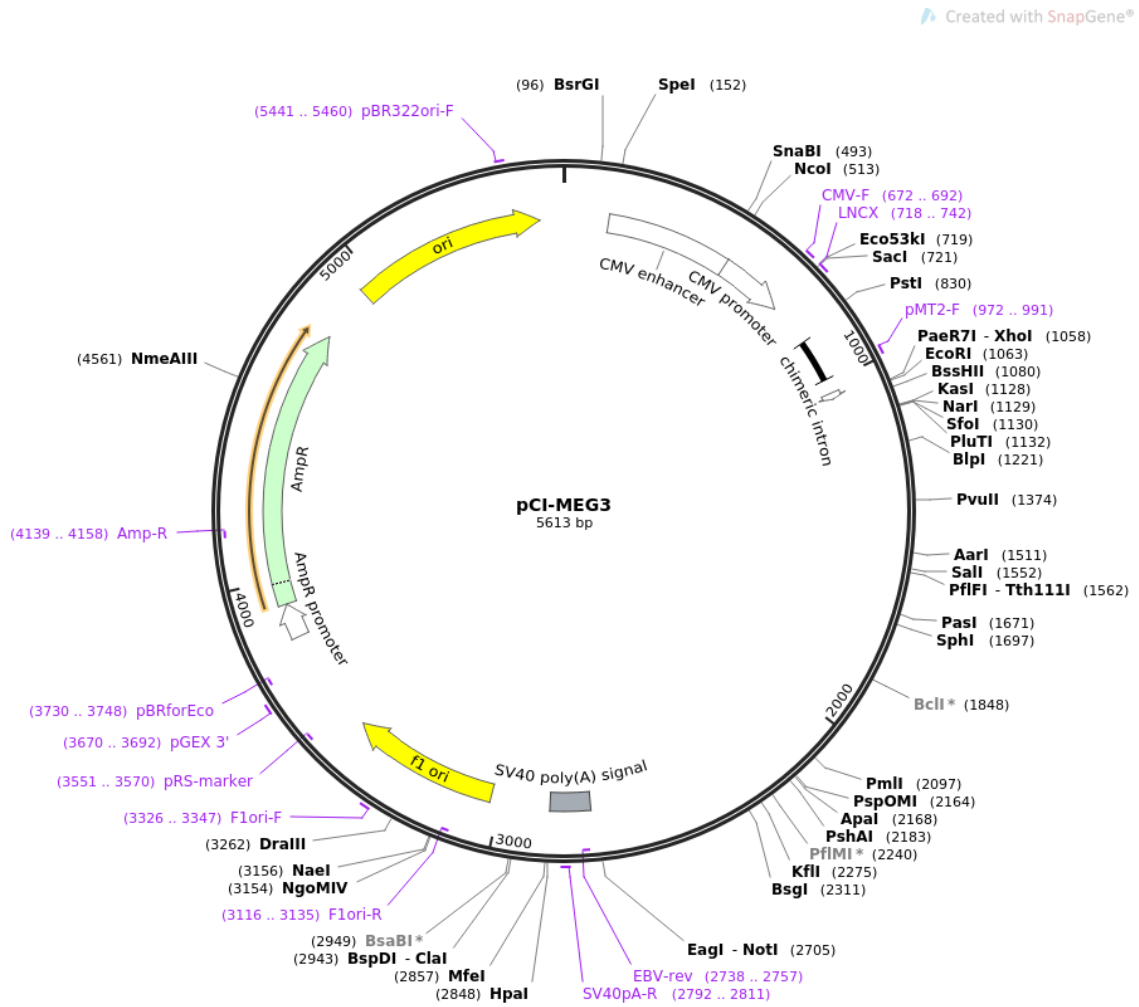
Plazmidler	Tam adı	Omurga Boyutu	Antibiyotik Direnci	İçerdikleri Gen
Boş Plazmid	pMIG	6492 b	Amphisilin	EGFP-IRES füzyon proteinini kodlayan gen içeren boş omurga
Delesyonlu MEG3 Plazmidi	MEG3-del5	4006 b	Amphisilin	MEG3’n ilk 450 bazlık kısmının delesyona uğratılmasıyla elde edilen mutant gen
MEG3 Plazmidi	pCI-MEG3	4006 b	Amphisilin	MEG3 geninin 1200 bazlık kısmını içerir
MEG3 İzoformu	MEG3b	4006 b	Amphisilin	MEG3 geninin izoformunun 1586 bazlık kısmını içerir

3.3.1. Plazmid Gen Haritaları

Prostat kanser hücrelerinde MEG3 geninin ifadesini artırmak için MEG3 plazmidi kullanıldı. MEG3’n alternatif kırpılma ile oluşmuş izoformu olan MEG3b ise MEG3’ten farklı ekzonlar içermektedir. Bu nedenle MEG3 ve MEG3b arasındaki farkı anlayabilmek için MEG3b plazmidi kullanılarak MEG3b ifadesi de artırıldı. Boş plazmid hem MEG3 hem MEG3b için kontrol plasmid olarak transfekte edilirken, MEG3-del5 MEG3 için ikinci bir kontrol olarak transfekte edilmiştir.

3.3.1.1. MEG3 Plazmid

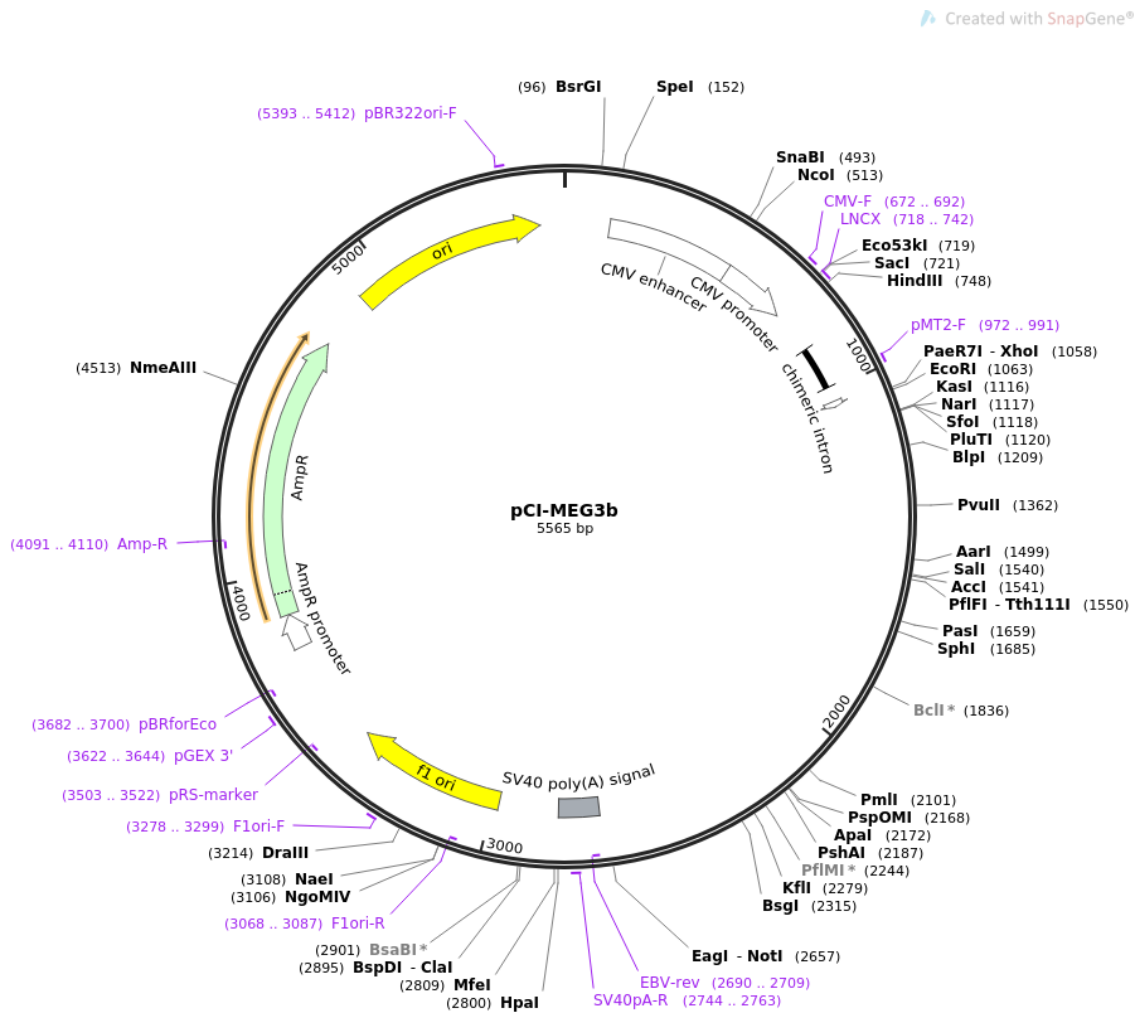
MEG3 plazmid prosta kanser hücrelerindeki lncRNA MEG3'ün gen ifadesini artırmak için kullanıldı. pCI-MEG3 4006 bazlık omurgaya 1600 bazlık MEG3 eklenmesiyle oluşmuş bir plazmidir. pCI-MEG3 plazmidine ait gen haritası Şekil 3.2'de gösterilmiştir (144).



Şekil 3.2. MEG3 genini içeren pCI-MEG3 plazmidinin gen haritası (144).

3.3.1.2. MEG3b Plazmid

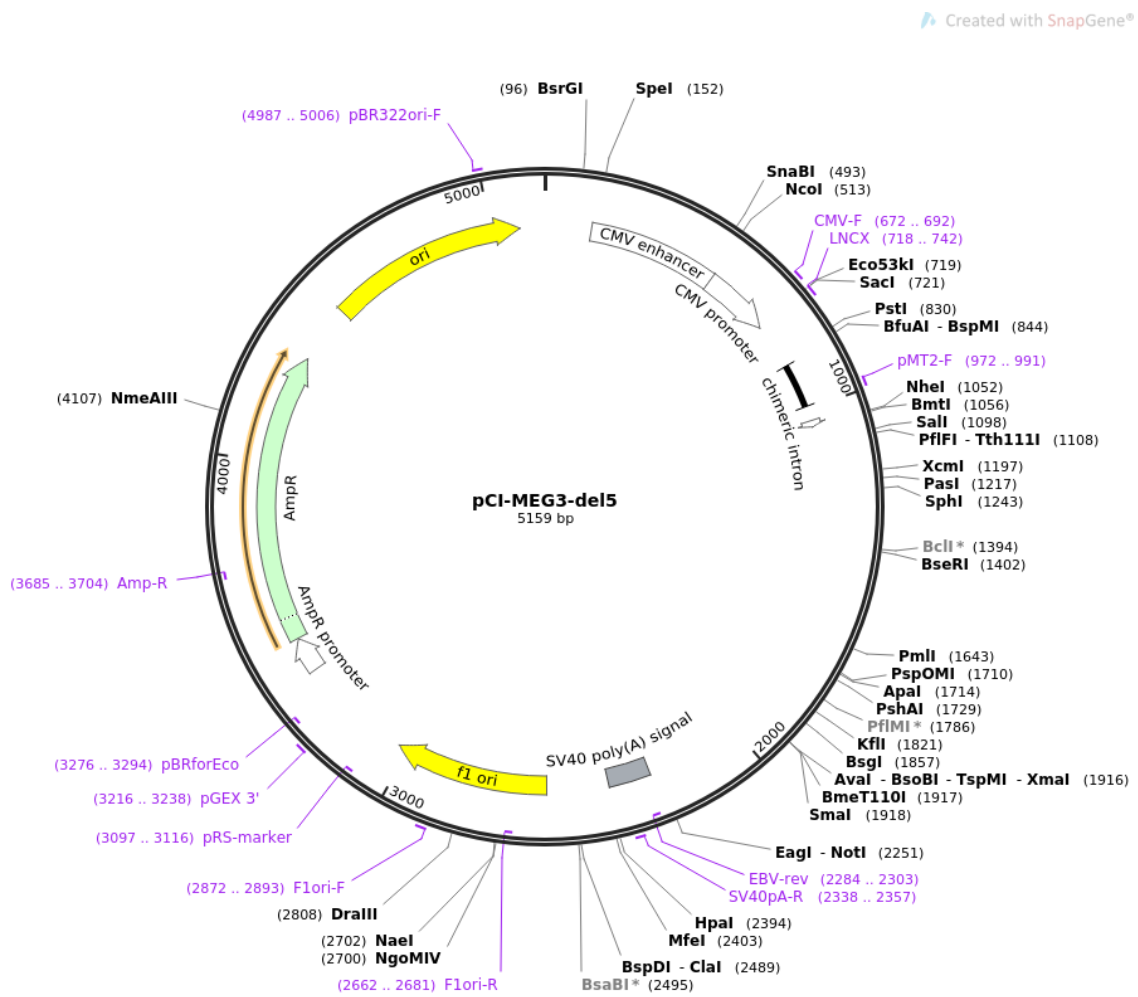
MEG3 geninden, alternatif kırılma mekanizması nedeniyle 12 farklı transkript sentezlenmektedir. MEG3'e kıyasla bazı transkriptler fazla ekzon içerirken bazıları daha az ekzon içermektedir. MEG3b de bu izoformlardan biridir. MEG3 ve MEG3b birbirlerinde farklı birer ekzon içermektedir. Bu farkın işlevsel etkisini araştırmak için çalışmamıza MEG3b plazmidini de dahil ettik. MEG3b plazmidinin gen haritası Şekil 3.3'te gösterilmiştir (144).



Şekil 3.3. MEG3b genini içeren pCI-MEG3b plasmidinin gen haritası (144).

3.3.1.3. MEG3-del5 Plazmidi

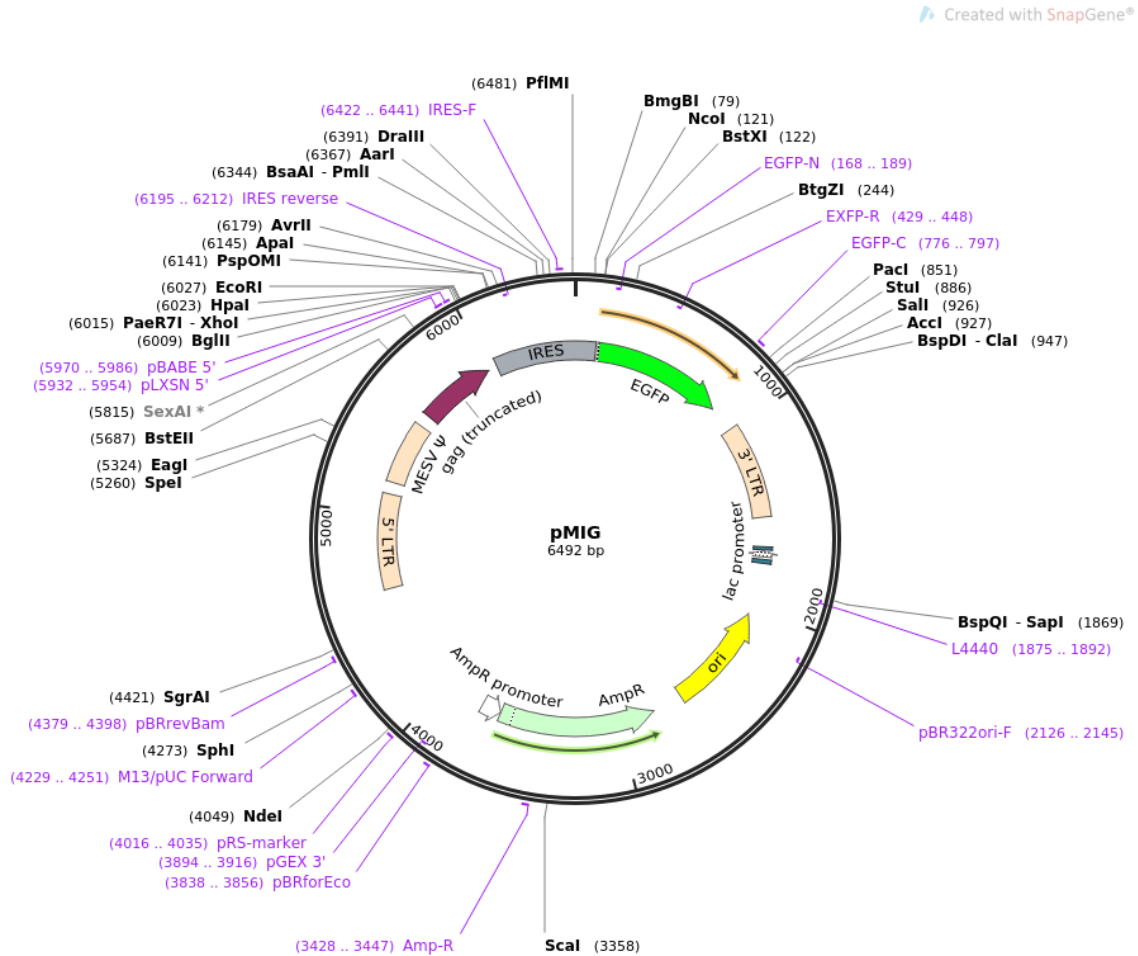
LncRNA MEG3' ün ilk 450 baz uzunluğundaki bölgesi delesyona uğratarak elde edilen MEG3-del5 plazmidi, MEG3 plazmidinin normalizasyonu için seçilmiştir. MEG3 için boş plazmid kontrol plazmidi olarak kullanılırken, delesyonlu MEG3 ise eksik MEG3 RNA'sının işlevsel etkisini araştırmak için çalışmaya dahil edilmiştir. MEG3-del5 plazmid gen haritası Şekil 3.4'te gösterilmiştir (144).



Şekil 3.4. MEG3-del5 bölgesini içeren pCI-MEG3-del5 plazmidin gen haritası (144).

3.3.1.4. Boş Plazmid

Boş plazmid hem MEG3 hem de MEG3b için kontrol plazmid olarak kullanılmıştır. Boş plazmidin omurga uzunluğu 6500 bazdır ve IRES-GFP (Yeşil Floresan Proteini) füzyon geni bulundurmaktadır. Plazmid gen haritası Şekil 3.5'te gösterilmiştir (144).



Şekil 3.5. Boş plazmidin gen haritası (144).

3.3.2. Bakteri Ekimi ve Plazmid oğaltılması

3.3.2.1. LB Agar Besiyeri Hazırlanması

Çalışmada kullanacağımız plazmidler Addgene Deposit Plasmids'den (Addgene, Watertown, US) agara gömülü bakteri kültürü içeridinde temin edilmiştir. Agara gömülü bakteri kültüründen saf kültür elde edebilmek amacıyla LB agar besiyeri hazırlanmıştır. LB agar besiyeri hazırlamak için gereken malzemeler aşağıdaki Tablo 3.4'te verilmiştir.

Tablo 3.4. LB agar besiyeri hazırlamak için gerekli malzemeler.

Malzeme	Miktar	Menşei
Agar-Agar	12 g	Sigma, Deisenhofen, Almanya
LB Broth	25 g	Sigma, Deisenhofen, Almanya
Amphisilin	100 µg/µl	Sigma, Deisenhofen, Almanya
Distile Su	1 litre	-

Agar-Agar ve LB Broth Tablo 3.4'te verilen miktarlara göre tartılarak otoklavlanabilir 2 litrelik cam şişe içerisine aktarıldı. Üzerine distile su eklenerek iyice karıştırıldıktan sonra 121 °C ve 1 atm basınç altında otoklavlandı. Besiyeri otoklavdan çıkarıldıktan sonra 55 °C'ye kadar kontrollü şekilde soğutuldu ve amphisilin eklenerek karıştırıldı. Bu aşamadan sonra fazla bekletmeden bek alevi etrafında petrilere yaklaşık 30 ml olmak üzere besiyeri döküldü. Hazırlanan petrilere soğuduktan sonra ters çevrilerek daha sonra kullanılmak üzere 4 °C'ye kaldırıldı.

3.3.2.2. Bakteri Ekimi

LB Broth tartılarak otoklavlanabilir cam şişeye aktarıldı ve üzerine distile su eklendi. Tamamen çözündükten sonra 121 °C ve 1 atm basınç altında otoklavlandı. Otoklavdan çıkarılan besiyeri 55 °C'ye kadar kontrollü olarak soğutuldu. Soğuyan besiyerine Ampisilin eklenerek karıştırıldı. Hazırlanan besiyeri 10-15 ml'lik cam tüplere bek alevi

etrafında aktarıldı. Agarlı petrilere ekilen saf koloniler, bek alevi etrafında öze yardımıyla alınarak, sıvı besiyerlerine ekildi. Ekim sonrasında sıvı besiyerleri 37 °C'deki çalkalamalı etüvde gece boyu inkübasyona bırakıldı.

3.3.3. Bakteri Stoğu Hazırlanması ve Saklanması

Sıvı kültürde çoğaltılmış olan koloniler gliserol çözeltisi eklenerek uzun süreli muhafaza edilebilirler. Bu çalışmada gliserol çözeltisi hazırlamak için 50 ml gliserole 50 ml distile su eklenerek homojenize olana kadar karıştırıldı. Bek alevi etrafında, sıvı besiyerindeki bakteri kültür sıvısından 500 µl alınarak üzerine 500 µl gliserol çözeltisi eklendi. Elde edilen süspansiyonlar daha sonra kullanılmak üzere -80 °C'ye kaldırıldı.

3.3.4. Plazmid İzolasyonu

Sıvı kültürde çoğaltılan bakteriler 1 gece inkübasyonun ardından bek alevi etrafında 1.5 ml'lik ependorf tüplere aktarıldı. Plazmid DNA'sını izole edebilmek için EZ-10 Spin Column Plasmid MiniPreps Kit (Biobasic, Markham, Kanada) kullanıldı. Uygulanan prosedür şu şekildedir:

- Tüpler 2 dk 13.800 x g'de santrifüj edildi ve üst faz uzaklaştırıldı.
- Tüpün içerisinde kalan peletin üzerine 100 µl Solüsyon I eklendi ve karıştırıldı.
- Elde edilen homojenat 1 dk boyunca oda sıcaklığında bekletildi.
- Ardından homojenata 200µl Solüsyon II eklenerek alt üst edilerek hafifçe karıştırıldı.
- Karışım 1 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 350 µl Solüsyon III eklenerek karıştırıldı.
- Karışım 1 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra bu aşamada bulutumsu bir tabaka oluşmaktadır. Bu beyaz bulutumsu tabaka tamamen giderilene kadar pipetle hafifçe karıştırıldı.
- Karışım 13.800 x g'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüjün ardından süpernatant kolona aktarıldı.
- Kolon 9.300 x g'de 2 dakika santrifüj edildi. Kolonun altındaki toplama tüpünde biriken sıvı atıldı ve kolona 750µl yıkama solüsyonu eklendi.
- Kolon 2 dk boyunca 9.300 x g'de santrifüj edildi. Yıkama prosedürünü tekrarlandı ve kolonun altındaki sıvı atıldı.

- Kolonun tam kuruması için 9.300 x g'de 1 dakika ilave olarak santrifüj edildi.
- Kolon yeni bir ependorf tüpe aktarıldı. Kolonun tam merkezine 50µl elüsyon tamponu eklendi.
- Elüsyon tamponunun tüm DNA'yı elüe edebilmesi için oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi.
- Kolon 9.300 x g'de 2 dakika santrifüj edildikten sonra ependorf tüpte biriken kısım izole edilmiş plazmid DNA'yı içermektedir. Plazmidler kullanılacakları zamana kadar -20°C'de saklandı.

3.4. Hücre Hatlarına Plazmid Verilmesi

PC-3 ve DU-145 prostat kanseri hücreleri azot tankından alınarak T25'lik flasklara ekildi ve uygun koşullarda %100 yoğunluğa erişene kadar inkübe edildi. Transfeksiyondan 1 gün önce, her kuyuda 200.000 hücre olacak şekilde sayıldı ve 12 kuyucuklu platelere ekildi ve 12 saat boyunca uygun koşullarda inkübe edildi. Hücreler 12 saatin sonunda transfeksiyona hazır yaklaşık %70 yoğunluğa erişmiş haldeyken transfeksiyon gerçekleştirildi. Her bir hücre hattı için 12 kuyulu plate'ten 5 kuyu seçildi. Bu kuyulara kontrol, boş plazmid, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmidleri olmak üzere transfeksiyon grupları oluşturuldu. Transfeksiyon için DNAfectin™ Plus Transfeksiyon Reagent (ABM Good, Richmond, Kanada) kullanılmıştır. Transfeksiyon için DNAfectin™ Plus, bir süre oda sıcaklığına getirilerek ve hafifçe vortekslendi. Daha sonra Karışım I (200 µl Opti-MEM (Sigma, Deisenhofen, Almanya) içerisine 2.0 µg plazmid DNA eklenerek hazırlanır) içerisine 6 µl DNAfectin™ Plus eklenerek homojenize olana kadar karıştırıldı. Oluşan bu kompleks oda sıcaklığında 5-10 dk kadar inkübe edildikten sonra 12 kuyulu plate'in farklı yerlerine damla damla aktarılacak ileri-geri ve sağ-sol hareketler yaparak plate içerisinde iyice yayılması için sallandı. 12 kuyulu plateler transfeksiyonun ardından uygun koşullarda yaklaşık 24 saat inkübasyona bırakıldı. PC-3 ve DU-145 hücreleri hassas olduğu için transfeksiyondan 12 saat sonra besiyeri değişimi gerçekleştirildi.

3.5. Hücre Hatlarından RNA Eldesi

Hücreler, uygun koşullara geldiğinde ve %100 oranında çoğaldığında RNA eldesi için kaldırıldı. Hücre kültüründen RNA eldesi High Pure RNA Isolation Kit (Roche, Mannheim, Almanya) kullanılarak ve kitin iş akış şeması b z alınarak RNA elde edildi. RNA elde protokolü aşağıdaki gibi uygulandı:

1. %100'e ulaştığına emin olunan hücre soylarından yaklaşık 1.000.000 hücre alınarak santrifüjle          ,   st faz atıldıktan sonra kalan pelet 200  l PBS eklenerek          .
2. Elde edilen süspansiyonun üzerine 400  l Lysis Buffer eklenerek 15 saniye vorteks yapıldı.
3. Tüm süspansiyon filtreli tüpe konulup, 20 saniye 9200 rpm'de santrifüjlenir. Alttaki tüpte biriken sıvı atılır ve filtrenin altına yeni bir toplama tüpü yerleştirildi.
4. Kolona 100  l (10  l DNase ve 90  l DNase incubation buffer) DNase solüsyonu eklenerek 15 dakika oda sıcaklığında beklendi ve üzerine 500  l Wash Buffer I eklenerek 20 saniye 9200 rpm'de santrifüjlendi. Alttaki toplama tüpü yenisi ile değiştirildi.
5. Kolona 500  l Wash Buffer II eklenerek 20 saniye 9200 rpm'de santrifüjlendi. Alttaki t p yenisi ile deėiştirildi.
6. Tekrardan 200  l Wash Buffer II eklenerek 2 dakika 9200 rpm'de santrifüjlendi. Alttaki t p atılır ve yeni bir t p yerleştirildi.
7. Kolonun ortasına 50-100  l arasında Elution Buffer eklenerek 1 dakika oda sıcaklığında bekletildi. 9200 rpm'de 1 dakika santrifüj yapıldı ve filtreli tüp atıldı.
8. RNA içeren mikrosantrifüj tüpleri kullanılacak zamana kadar –80 C'de saklandı.

Elde edilen hücre kültürü RNA  rnekleri, RNA miktar ve kalitesini belirlemek amacıyla spektrofotometrik yöntem ile  l      (Tablo 3.5). Kalite ve miktar tayini NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, California, USA) cihazı kullanılarak yapıldı.

Tablo 3.5. Hücre kültüründen elde edilen RNA'ların konsantrasyonları.

No	Hücre ismi	ng/μl	260/280	No	Hücre ismi	ng/μl	260/280
1	HGC 27	1368	2,08	16	DLD-1	892	2,05
2	HE-LA	760	2,03	17	HT-29	1260	2,09
3	HL-60	480	2,05	18	HCT 116	1425	2,06
4	PANC1	1214	2,06	19	HCC-1500	945	2,04
5	HUVE-EC-C	952	2,07	20	hTERT-HME1	893	2,06
6	A-172	1086	2,06	21	MCF-7	1127	2,03
7	BEAS-2B	1150	2,08	22	SK-BR-3	1301	2,07
8	A549	1625	2,05	23	MDA-MB-231	1050	2,04
9	Nthy-ori 3-1	1345	2,08	24	2-A	380	2,03
10	B-CPAP	740	2,02	25	HEK-293	650	2,06
11	CAL-29	938	2,07	26	Hep G2	837	2,05
12	LNCaP	683	2,06	27	SNU-423	748	2,06
13	DU 145	896	2,08	28	hFOB 1.19	950	2,09
14	PNT1A	1240	2,09	29	OST-7	840	2,08
15	PC-3	1451	2,05	30	U2-OS	1480	2,06

Gen ifade profillemeye çalışmamızda çeşitli kanser ve normal hücrelerden elde edilen RNA'lar haricinde ticari olarak aldığımız 20 farklı normal insan doku RNA' sı da kullanılmıştır (#636643, Human Total RNA Master Panel II, Clontech Laboratories) (Tablo 3.6). Kullanılan doku RNA panelindeki her bir doku RNA'sının konsantrasyonu 1 μg/μl'dir.

Tablo 3.6. RNA panelinde bulunan doku türleri.

No	Doku	No	Doku
1	Adrenal Bez	11	Kalp
2	Akciğer	12	Karaciğer
3	Beyin	13	Kemik İliği
4	Beyin, Serebellum	14	Kolon
5	Böbrek	15	Mide
6	Dalak	16	Plasenta
7	Fetal Beyin	17	Prostat
8	Fetal Karaciğer	18	Testis
9	İnce Bağırsak	19	Timus
10	İskelet Kası	20	Uterus

3.6.Tek Sarmal cDNA Sentezi

Hücre kültürü sonucu elde ettiğimiz RNA ve doku panelindeki RNA örneklerinden cDNA eldesinde “Maxima H Minus First Standart cDNA Synthesis Kit #K1652 (Thermo Scientific, California, USA) kiti kullanıldı. Kitin iş akış şeması baz alınarak cDNA elde edildi (Tablo 3.7). Tepkimeye girecek RNA’lar eşit konsantrasyona getirilmiştir.

Tablo 3.7. cDNA sentezinde kullanılan bileşenlerin oranları.

Bileşen	Miktar
Oligo d(T) ₁₈ primer	1µl
Sekizli rastgele primer	*
RNA	*
10 mM dNTP karışımı	1µl
Nükleaz içermeyen distile su	**
Toplam	15µl
5X RT buffer	4µl
Maxima H minus enzim karışımı	1µl
Toplam karışım	20µl

* RNA konsantrasyonlarına göre toplam karışımdaki RNA miktarları eşit olacak şekilde Tablo 3.3’den yardım alınarak her örnek için ayrı hesaplanmıştır. Toplam RNA konsantrasyonu 1 pg – 5 µg arasında olacaktır.

** RNA ve distile su hacmi toplam 13 µl olacak şekilde hazırlanmıştır.

Karışımları hazırlanan örnekler Sensquest PCR (Sensquest, Göttingen, Almanya) cihazında Tablo 3.8’de gösterildiği şekli ile RT-PCR tepkimesi gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.8. cDNA sentezi tepkime koşulları.

Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre(dk)
İnkübasyon	25	10
Enzim aktivasyonu	50	30
Enzim inaktivasyonu	85	5

Elde edilen tek sarmal cDNA örnekleri, dondurma çözme işleminin tek sarmal DNA üzerine bozucu etkisinin önüne geçilmesi amacı ile 0,2 ml’lik PCR tüplerine 5µl miktarında dağıtılmıştır. Eşit miktarlarda bölme işlemi yapıldıktan sonra cDNA’ların kullanım ömrünü uzatmak için -80 °C’de muhafaza edilmiştir.

3.7. Primer Tasarımı

Primerler, gen ifade seviyesini tespit edebilmek için kodlanan bölgelerin herhangi bir bölgesinde tasarlanabilmektedir. Ancak tasarlanan bölge içerisinde intron içeren primerler (ekzon ekzon bağlantı bölgelerinden tasarlanan), elde edilen RNA’lardaki olası bir DNA bulaşığını ayırt edebilmeye imkan sağlamaktadır. Primerler NCBI veri tabanı kullanılarak tasarlanmıştır (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primerblast/>). Tasarımı yapılan primerlerin ileri ve geri primer dizilimleri, bağlanma sıcaklıkları ve ürün uzunlukları gibi özellikleri Tablo 3.9’ da gösterilmiştir.

Tablo 3.9. Hedef genlerimizin ifade seviyelerinin belirlenmesi için tasarlanan primer dizilimlerinin özellikleri. * F:Forward “ileri” primer, R:Reverse “geri” primer

Primer Adı	Primer dizilimi	Tm (°C)
SP1-F	ACGCTTCACACGTTCCGGATGAG	69,7
SP1-R	TGACAGGTGGTCACTCCTCATG	
RAF1-F	TCAGGAATGAGGTGGCTGTTCTG	67,4
RAF1-R	CTCGCACCACCTGGGTCAACAATT	
TFDP1-F	CACTTTGCCTCTCAGAACCAGC	66,5
TFDP1-R	CTTTCCTCTGCACCTTCTCGCA	
KAT2B-F	GCACCATCTCAACGAAGACTGC	66,6
KAT2B-R	GTGTGGTTTTCGTACCGAGGTAG	
E2F1-F	GGACCTGGAAACTGACCATCAG	65,6
E2F1-R	CAGTGAGGTCTCATAGCGTGAC	
MAPK8-F	GACGCCTTATGTAGTGAATCGC	65,6
MAPK8-R	TCCTGGAAAGAGGATTTTGTGGC	
P53-F	CCTCAGCATCTTATCCGAGTGG	65,2
P53-R	TGGATGGTGGTACAGTCAGAGC	
MEG3-F	CCACTCCCAGTTCAATTACAGCTC	66,1
MEG3-R	TAGTGCCCTCGTGAGGTGTAG	
RB1-F	CAGAAGGTCTGCCAACACCAAC	66,7
RB1-R	TTGAGCACACGGTCGCTGTTAC	
E2F2-F	CTTGACGGCAATCACTGTCTGC	65,7
E2F2-R	GATGATTGCCGCCGTGGAC	
CDK2-F	ATGGATGCCTCTGCTCTCACTG	67,1
CDK2-R	CCCGATGAGAATGGCAGAAAGC	
JUN-F	CCTTGAAAGCTCAGAACTCGGAG	65,8
JUN-R	TGCTGCGTTAGCATGAGTTGGC	
ABL1-F	CCAGGTGTATGAGCTGCTAGAG	64,9
ABL1-R	GTCAGAGGGATTCCACTGCCAA	
CHECK1-F	GTGTCAGAGTCTCCCAGTGGAT	66,3

CHECK1-R	GTTCTGGCTGAGAACTGGAGTAC	
PRMT2-F	GCAGTTGGACATGAGAACCGTG	66,6
PRMT2-R	AGGCTCTGGAAGTGGACGCTAA	
GRB2-F	GAAATGCTTAGCAAACAGCGGCA	67,5
GRB2-R	TCCATCTCGGAGCACCTTGAAG	
ATF2-F	GGTAGCGGATTGGTTAGGACTC	65,1
ATF2-R	TGCTCTTCTCCGACGACCACTT	
CASP8-F	AGAAGAGGGTCATCCTGGGAGA	67,2
CASP8-R	TCAGGACTTCCTTCAAGGCTGC	
BAG1-F	GTGAACCAGTTGTCCAAGACCTG	66,3
BAG1-R	CAAGTGCTGACAACGGTGTTTCC	
GAPDH-F	AGACCACAGTCCATGCCATCAC	67,6
GAPDH-R	GGTCCACCACCCTGTTGCTGT	

Çalışmada referans gen (housekeeping gene) olarak Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) kullanılmıştır.

3.8. Primer Çiftleri için PCR Optimizasyonu

Çalışmada kullanılacak primer çiftleri için en uygun çalışma sıcaklığını belirlemek için DNA kullanılarak Gradient PCR programı Tag DNA polimeraz (Fermentas, Vilnius, Litvanya) kullanılarak yapılmıştır. Gradient PCR için kullanılan PCR bileşenleri Tablo 3.10'da gösterilmiştir.

Tablo 3.10. PCR bileşenleri ve 50 µL'lik toplam hacimdeki miktarları.

Kimyasal Bileşen	Miktar (µL)
dH ₂ O	31.25
10X PCR tampon amonyum sülfat (NH ₄) ₂ SO ₄	5
25 mM MgCl ₂	5
2 mM dNTP	5
12.5 mM ileri primer	1
12.5 mM geri primer	1
5 U/ML Taq DNA polimeraz	0.25
DNA kalıbı	1.5
Toplam hacim	50

PCR programı 30 döngü olacak şekilde Tablo 3.11’de gösterildiği gibi ayarlanmıştır.

Tablo 3.11. Gradient PCR tepkime sıcaklık koşulları.

Basamak	Sıcaklık	Döngü	Zaman
İlk denatürasyon	95°C	1 döngü	1 dakika
Denaturasyon	95°C	30 döngü	30 saniye
Primer bağlanması	56°C - 61°C	30 döngü	30 saniye
Uzama	72°C	30 döngü	30 saniye
Son uzama	72°C	1 döngü	5 dakika
	4°C	∞	∞

3.9. Gen İfade Analizi için Eş Zamanlı PCR (qRT-PCR) Yöntemi

Genlerin ifade profili çıkarılırken sağlıklı doku ve hücre kültüründen elde edilen cDNA örnekleri kullanılarak qPCR deneyleri yapılmıştır. Ayrıca prostat kanser hücrelerine plasmid transfeksiyonu sonrasında elde edilen cDNA'lardan da ilgili genlerin ifadelerine qPCR ile tespit edilmiştir. qPCR, Rotor Gene Q (Qiagen GmbH, Hilden, Almanya) Real-Time PCR cihazında gerçekleştirilmiştir. MEG3 geninin ifade analizi için buz kalıbında hazırlanan PCR ön karışımında, Maxima SYBR Green qPCR Master Mix(2X) (Thermo Scientific, California, USA) kullanılmıştır. Karışıma analiz için kalıp hariç gerekli bileşenler konulduktan sonra iyice karıştırılıp cDNA kalıbı konulmuş tüplere bu karışım eşit miktarlarda pipetleme yapılarak dağıtılmıştır. Tablo 3.12’de eş zamanlı PCR analizi için her bir tüpte bulunacak bileşenler ve miktarları gösterilmiştir. Ayrıca, qPCR için kullanılan terimler MIQE (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments) standartlarına uygun olarak yazılmıştır.

Tablo 3.12. Gen ifade düzeyinin ölçüldüğü eş zamanlı PCR reaksiyon karışımının içerikleri.

Kimyasal Bileşen	Miktar (µl)
RT ² SYBR Green ROX FAST Mastermix	7,5
F Primer (10 µM)	0,5
R Primer (10 µM)	0,5
Rnaz/Dnaz içermeyen su	5,5
cDNA (200 ng)	1,0
Total	15

Karışım daha etkin bir analiz sonucu alabilmek için buz kalıbı üzerinde hazırlanmıştır. Rotor Gene 6000 cihazına ölçüm için gerekli program girilerek cihaz çalıştırılmıştır (Tablo 3.13).

Tablo 3.13. Gen ifade düzeyinin ölçüldüğü qPCR tepkime koşulları.

	Sıcaklık (°C)	Süre(sn)	Döngü Sayısı
Enzim aktivasyonu	95	600	
Denaturasyon	95	15	
Primer bağlanması/uzama	60	60	40
Erime eğrisi	65	60	
	4	∞	

QRT-PCR yöntemi ile elde edilen Ct değerleri kullanılarak istatistiksel analizler yapılmıştır. Çalışmada kullanılan genlerin ifade seviyesini belirlemek için referans gen (housekeeping gene) olarak GAPDH kullanılmıştır. qRT-PCR sonuçlarına istatistiksel analiz yapılırken $2^{-\Delta Ct}$ formülü kullanılmıştır. Ct (cycle threshold), real-time PCR deneylerinde floresan sinyal miktarının gözlemlenebilmesi için gereken minimum değeri geçtiği döngü sayısına verilen isimdir.

3.10. Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi (MTT Deneyleri)

MTT (Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide) tetrazolyum tuzu, memeli hücrelerinin hayatta kalması ve çoğalmasını kantitatif olarak ölçmeye yarayan yüksek hassasiyet gösteren kolorimetrik bir analiz yöntemidir. Bu yöntem canlı hücre miktarını tespit ederken ölü hücre miktarı hakkında bilgi vermez. MTT sitotoksosite, proliferasyon veya aktivasyon ölçümü için kullanılabilir. Elde edilen sonuçlar ELISA okuyucu ile okunabilir. Hızlı, hassas ve herhangi bir radyoizotop veya yıkama aşaması gerektirmeyen avantajlı bir yöntemdir (145).

MTT (Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide) (Sigma, Deisenhofen, Almanya) toz formunda ticari olarak temin edildi. MTT boyasının çalışma boyunca kullanımı için stok solüsyonu hazırlandı.

- **Stok Solüsyonu Hazırlanışı:** MTT oranı 5 mg/ml olacak şekilde, RPMI-1640 içerisinde çözdürüldü. İyice çözdürülen solüsyon 0.2 µm'lik filtreden geçirilir. Hazırlanan stok solüsyonu kullanılıncaya kadar 4°C'de saklandı.
- **Çalışma Solüsyonu Hazırlanışı:** Hazırlanan stok solüsyonun 1:10 oranında RPMI-1640 besi yeri kullanılarak seyreltildi. Hazırlanan solüsyon çalışma için kullanıldı.
- **Hücre Ekimi ve Transfeksiyon:** DU-145 ve PC-3 hücreleri 6 kuyulu kültür kaplarına her kuyuda 100.000 hücre olacak şekilde ekildi. Her kuyuya 2 ml DMEM eklenerek hücreler 24 saat süreyle uygun koşullarda inkübe edilir. 24 saatin sonunda yeterli yoğunluğa erişen hücrelerin seçilen 4 kuyusuna MEG3, MEG3b, PMIG ve MEG3-Del5 plazmitleri transfekte edildi. Seçilen bir kuyudaki hücrelere herhangi bir plazmit transfeksiyonu yapılmadan kontrol grubu oluşturuldu ve 24 saat süreyle uygun koşullarda inkübasyona bırakıldı. Hücreler 24 saatin sonunda tripsin-EDTA (Sigma, Deisenhofen, Almanya) ile kaldırılarak Tripkan mavisi yöntemi kullanılarak sayıldı. 24 kuyulu kültür kaplarının her kuyusuna 12.000 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Hücreler 24, 48 ve 72 saat olmak üzere üç farklı zaman aralığında, 37 °C sıcaklıkta % 5 CO₂ içeren etüvde inkübasyona bırakıldı.
- **MTT Muamelesi ve Ölçümü:** 24, 48 ve 72 saat etüvde inkübe edilmiş olan PC-3 ve DU-145 hücrelerinin besiyerleri uzaklaştırılarak 500 µl MTT eklendi. 4 saat boyunca uygun koşullarda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda MTT uzaklaştırılarak her bir kuyuya 500 µl asidik izopropanolda (mutlak izopropanol) hazırlanmış 0.04 M HCl eklendi. Boyanın homojenize olması için pipetaj yapıldı. Çözünen boya 1.5 ml'lik eppendorf tüplere alınarak 2 dk 5000 rpm'de santrifüjlendi. Santrifüj sonrasında üst fazdan 250 µl alınarak 96 kuyulu ölçüm kaplarına eklendi. 570 nm dalga boyunda Thermo Scientific™ Multiscan™ GO Microplate Spectrophotometer (Thermo Scientific, California, USA) içerisinde yerleştirilerek absorbans ölçümü yapıldı.

3.11. Yara iyileşmesi Deneyleri

In vitro yara iyileştirme yöntemi, hücre göçünü *in vitro* olarak ölçmek için geliştirilmiş kolay ve düşük maliyetli bir yöntemdir. Temel mantık olarak, tek hücre tabakasında bir yara oluşturarak oluşan yara boşluğunun kapanma sürecinin izlenmesine dayanır. Yaranın iyileşme sürecini takip edebilmek için belirli aralıklarla yara görüntüsü alınır ve hücrelerin göç hızını ölçmek için görüntüler karşılaştırılır (146).

Yara iyileştirme deneyi için aşağıdaki protokol takip edilmiştir.

- PC-3 ve DU-145 prostat kanseri hücreleri % 0,25 Tripsin-EDTA çözeltisi ile kaldırılır. Tripsin aktivitesini durdurmak için hücrelerin üzerine 15 ml DMEM (%1 FBS ve %1 Penisilin/Streptomisin) besi yeri eklenerek 50 ml'lik santrifüj tüplerine aktarılır ve 4500 rpm'de 5 dk boyunca santrifüjlenir. Üst faz uzaklaştırıldıktan sonra üzerine 10 ml besi yeri eklenerek homojenize edildi.
- Tripan mavisi ile hücre sayımı yapıldıktan sonra 6 kuyulu kültür kaplarına, 24 saat sonra % 80 yoğunluğa erişecek şekilde 1×10^6 hücre ekildi.
- Seçilen kuyulara MEG3, MEG3b, PMIG ve MEG3-Del5 plazmitleri transfekte edilir ve 24 saat boyunca uygun koşullarda inkübasyona bırakıldı.
- 100 µl'lik pipet ucu kullanılarak kültür kaplarının orta hizasından yatay bir çizgi çekildi. Çizme işlemi yapılırken kuyu yüzeyine zarar vermemek için fazla kuvvet uygulamamaya dikkat edildi.
- Kültür kapları dikkatli bir şekilde HBSS (Hawk's Balanced Salt Solution) (Sigma, Deisenhofen, Almanya) çözeltisi ile iki kez yıkandı. Hücre kalıntılarını uzaklaştırmak için kapların içindeki çözelti aspire edildi. Kuyuların altını örtmek ve tutunmuş hücrelerin yüzeyden kopmasını önlemek için kuyu duvarına oldukça yavaş şekilde 2 ml besi yeri eklendi.
- Yaranın ortaya çıkması ve incelenmesinin ardından ilk resim çekildi ve kültür kapları etüve yerleştirildi.
- Her 24 saatte bir kültür kapları etüvden alınarak, kuyu içerisindeki çözelti uzaklaştırıldı. Mikroskop altında görüntülenerek, yara kapanma süreci gözlemlendi.

Çekilen resimler Image J programı kullanılarak analiz edildi. Boşluklar program ile ölçülerek aralarındaki farklar belirlendi. Bu farklılıklar ve geçen zamana göre değerlendirmeler yapıldı.

3.12. Koloni Oluşum Deneyleri

Kolonojenik analiz veya koloni oluşturma deneyi, tek bir hücrenin koloni oluşturabilme kabiliyetine dayalı olarak hücrelerin hayatta kalabilmesini ölçmeye yarayan *in vitro* bir yöntemdir. Koloninin en az 50 hücreden oluştuğu varsayılır. Bu yöntem popülasyondaki her bir hücrenin "sınırsız" bölünme yeteneğini test etmektedir. Kolonojenik analiz, iyonize radyasyon ile muameleden sonra hücre üreme ölümünü test etmek amacıyla kullanılan bir yöntem olsa da diğer sitotoksik ajanların etkisini tayin edebilmek için de kullanılabilir. Sitotoksik ajanlarla muameleden sonra hücrelerin yalnızca bir kısmı koloni oluşturabilme kapasitesini korur (147).

- **Hücre Ekimi ve Transfeksiyon:** PC-3 ve DU-145 hücreleri 6 kuyulu kültür kaplarına her kuyuda 100.000 hücre olacak şekilde ekildi. Kuyuların üzeri 2'şer ml DMEM (%1 FBS ve %1 Penisilin/Streptomisin) ile doldurulduktan sonra hücreler 24 saat süreyle uygun koşullarda inkübe edildi. 24 saatin sonunda yeterli yoğunluğa erişen hücrelerin seçilen 4 kuyusuna MEG3, MEG3b, PMIG ve MEG3-Del5 plazmitleri transfekte edildi. Bir kuyudaki hücelere herhangi bir plazmit transfeksiyonu yapılmadan kontrol grubu oluşturuldu.
- **Koloni Oluşumu İçin Hücre Ekimi:** Oluşturulan deney grubu hücreleri 24 saat uygun koşullarda inkübe edildikten sonra tripsinle kaldırılarak sayıldı. 6 kuyulu kültür kaplarına her kuyuda 1000 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Hücrelerin her 3 günde bir besiyeri değişimleri yapıldı.
- **Kolonilerin Fikse Edilmesi:** Hücreler koloni oluşturmaya başlayıp, her kolonideki hücre sayısı 50'yi geçtikten sonra (yaklaşık 2 hafta sonra) besiyeri uzaklaştırılarak hücreler PBS ile yıkandı. Sonrasında, 1 ml % 70'lik metanol eklenerek oda sıcaklığında 5 dk boyunca hücreler fikse edildi.
- **Kristal Viyole ile Boyama:** Metanolle fiksasyonu takiben metanol uzaklaştırıldı. Kuyuların üzerine 1 ml %1'lik kristal viyole (0.5 g kristal viyole 50 ml PBS'de çözündürülmüş) (Sigma, Deisenhofen, Almanya) ile eklenerek 15 dk boyunca oda sıcaklığında bekletildi. Fazla boyanın uzaklaştırılması için musluk altında kuyular yıkandı ve kurumaya bırakıldı.

- **Koloni Sayımı:** Kuyular 24 saat kurumaya bırakıldıktan sonra ışık mikroskobu altında altında sayıldı. En az 50'şer hücreden meydana gelen hücre toplulukları koloni olarak kabul edilmiştir. Sayımı takiben kolonilerin görüntüleri alındı.

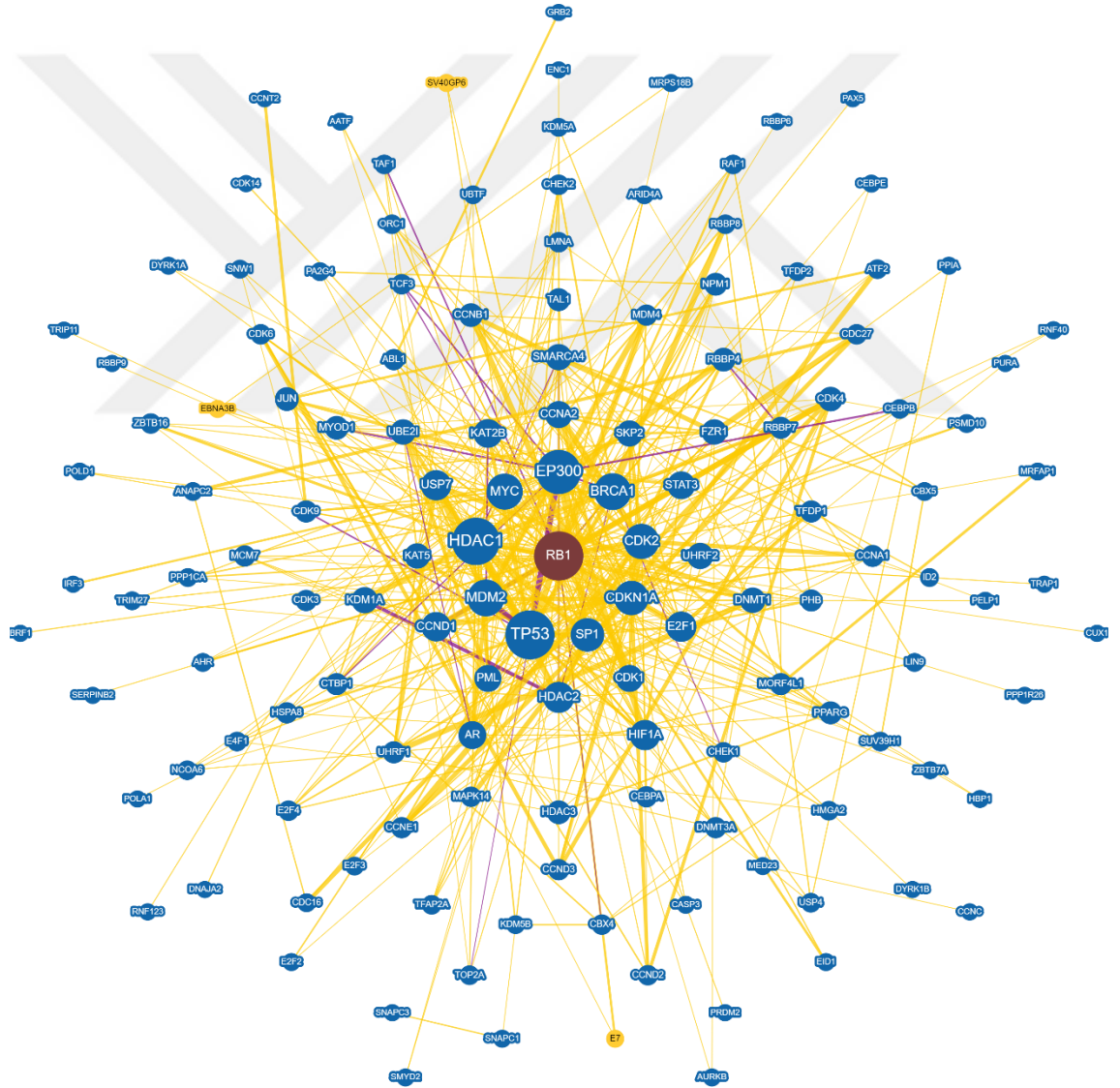
3.13. İstatistiksel Analizler

Hesaplamalar sonrasında elde edilen veriler GraphPad Prism 7.02 programında analiz edilmiştir. Verilerin ortalama ve standart sapma (SD) değerleri en az 3 bağımsız deney tekrarının hesaplanmasıyla, tanımlayıcı istatistiklerden Column Statistics ile yapıldı. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir. Elde edilen verilerin istatistiksel olarak anlamlılık derecelerini belirlemeden önce Shapiro-Wilk normality test kullanılarak normalite testi yapılmıştır. Gen ifade seviyelerinin değerlendirilmesi, koloni oluşumu, yara iyileşmesi ve MTT sonuçlarının gruplar arası karşılaştırılmasında, one-way ANOVA ve post-hoc testlerden Tukey çoklu karşılaştırma testi kullanıldı. Gruplar arasındaki karşılaştırmalar için $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilirken, anlamlılık dereceleri $*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$ olarak ifade edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. RB1 Hedef Genlerinin Belirlenmesi

Çalışmada kullanacağımız RB1 hedef genleri biyoinformatik araçlarla belirlenmiştir. RB1'in fiziksel etkileşimde bulunduğu genlerin grafiksel gösterimi Şekil 4.1'de gösterilmiştir (148).



Şekil 4.1. RB1 hedef genleri (148).

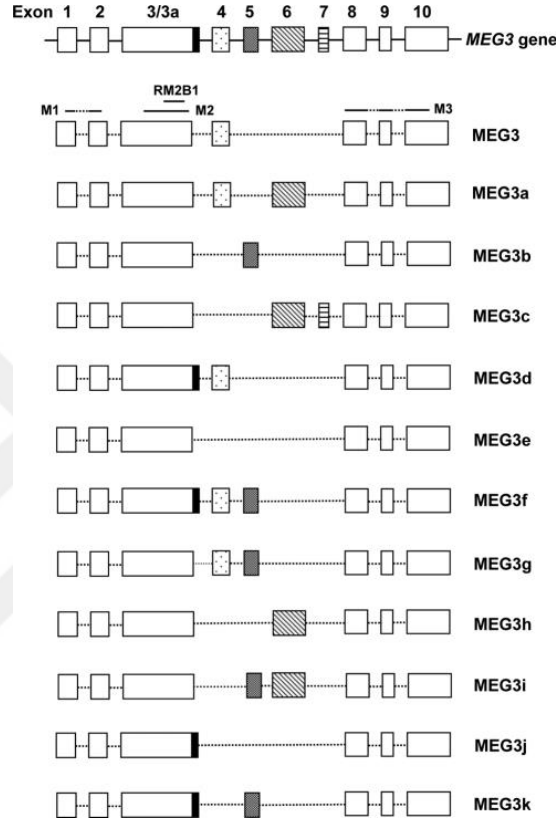
RB1 hedef genlerinden literatürde daha önce MEG3 ile aralarındaki ilişki hiç çalışılmamış olan 17 farklı gen seçilmiştir. Seçilen genlerin sembolleri, tam isimleri ve gen id numaraları Tablo 4.1’de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Çalışmada kullanılmak için seçilen RB1 hedef genleri.

Gen Sembolü	Resmi Tam İsim	Gen ID
ABL1	ABL Proto-Oncogene 1, Non-Receptor Tyrosine Kinase	25
ATF2	Activating Transcription Factor 2	1386
BAG1	BAG Cochaperone 1	573
CASP8	Caspase 8	841
CDK2	Cyclin Dependent Kinase 2	1017
CHEK1	Checkpoint Kinase 1	1111
E2F1	E2F Transcription Factor 1	1869
E2F2	E2F Transcription Factor 2	1870
GRB2	Growth Factor Receptor Bound Protein 2	2885
JUN	Jun Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit	3725
KAT2B	Lysine Acetyltransferase 2B	8850
MAPK8	Mitogen-Activated Protein Kinase 8	5599
P53	Tumor Protein P53	7157
PRMT2	Protein Arginine Methyltransferase 2	3275
RAF1	Raf-1 Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase	5894
SP1	Sp1 Transcription Factor	6667
TFDP1	Transcription Factor Dp-1	7027

4.2.MEG3 ve İsoformu MEG3b

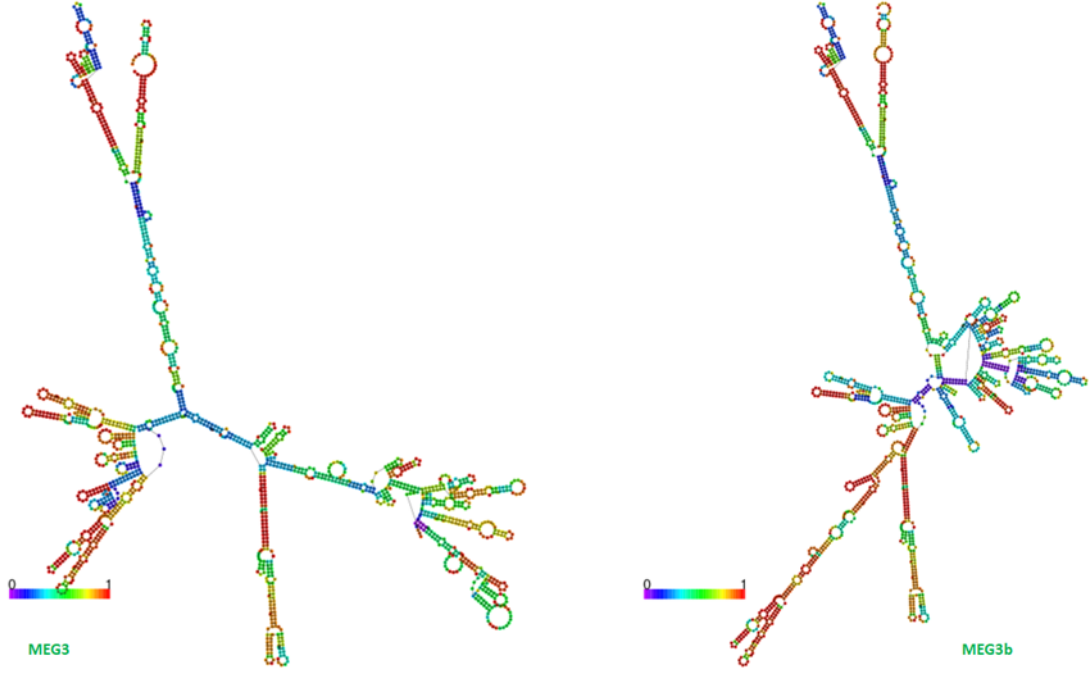
LncRNA MEG3'ün alternatif kırılma ile oluşmuş en az 12 farklı izoformu bulunmaktadır. Bazı izoformlar MEG3'e göre daha fazla ekzon içerirken bazılarının ekzon sayıları daha azdır. Bu izoformlardan biri de MEG3b'dir. MEG3b ile MEG3 birbirlerinden farklı birer ekzon içermektedir (125) (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. MEG3 geninin ve MEG3'ün izoformlarının moleküler yapıları (125).

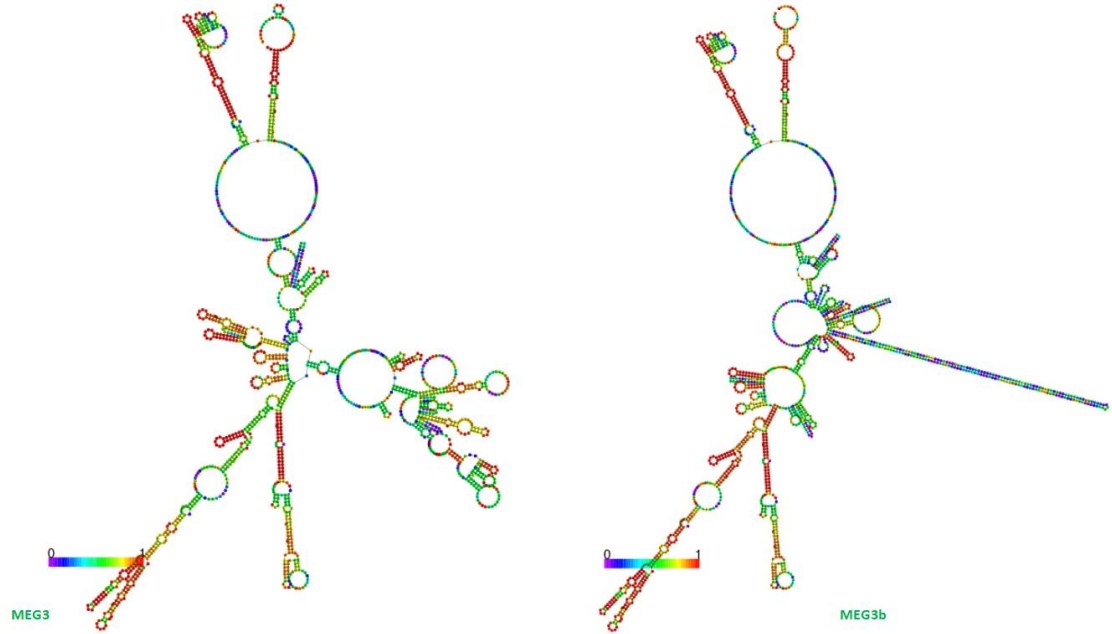
4.2.1. MEG3 ve MEG3b İkincil Yapıları

MEG3b ve MEG3 farklı ekzonlar içerdikleri için ikincil yapıları benzer motifler içerse de bazı katlanma motifleri birbirlerinden farklılık göstermektedir. MEG3 ve MEG3b'nin olası ikincil yapısı baz eşleşme sistemiyle RNAfold veri tabanı kullanılarak oluşturulmuştur (149) (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. MEG3 ve MEG3b lncRNA'ların baz eşleşme olasılığına göre ikincil yapıları.

LncRNA MEG3 ve MEG3b'nin baz eşleşme olasılığına göre halkasal ikincil yapıları ise Şekil 4.4'te gösterilmiştir. MEG3b'nin ikincil yapısı MEG3'ten farklı uzantılara sahiptir.

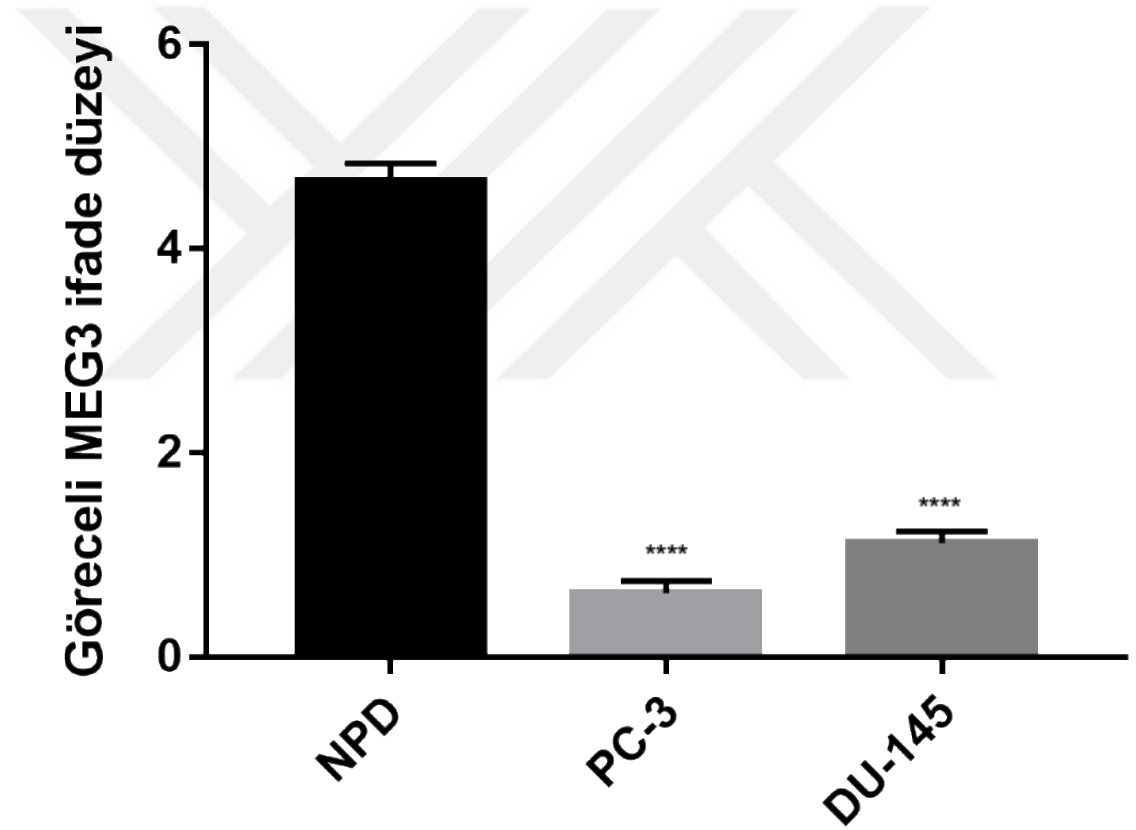


Şekil 4.4. MEG3 ve MEG3b'nin baz eşleşme olasılığına göre halkasal ikincil yapıları.

4.2.2. LncRNA MEG3'ün Prostat Kanserindeki Gen İfade Analizi

MEG3 geninin prostat kanserindeki ifade seviyesini belirlemek için sağlıklı prostat doku ve prostat kanser hücre hatları olan PC-3 ve DU-145 kullanılarak qRT-PCR yöntemi gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizlerde prostat kanserinde MEG3 geninin düzensiz ifadeye sahip olduğu saptanmıştır.

MEG3 geninin, PC-3 ve DU-145 prostat kanser hücre hatlarında, normal prostat dokuya kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük ifade seviyesine sahip olduğu bulunmuştur (p değerleri, PC-3 için $p<0,0001$, DU-145 için $p<0,0001$) (Şekil 4.5).

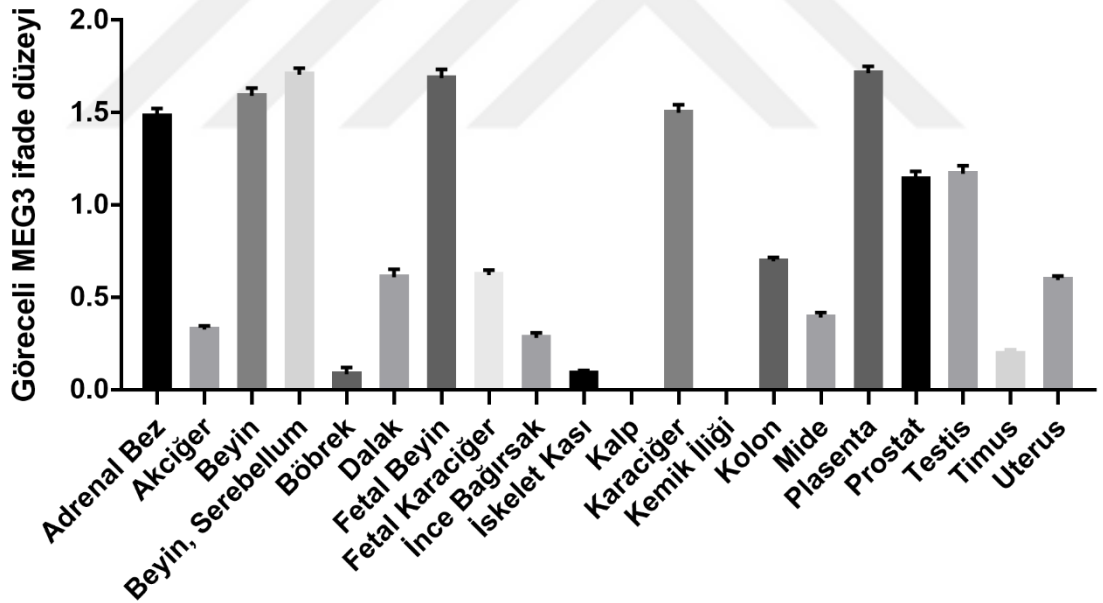


Şekil 4.5. MEG3 geninin normal prostat doku (NPD) ve PC-3, DU-145 prostat kanser hücre hatlarında ifade seviyesi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (**** $p<0,0001$).

4.3.MEG3 Geninin Farklı Hücre Hatları ve İnsan Dokularında İfade Seviyesi

Otuz çeşit insan hücre hattı ve 20 tane sağlıklı insan dokusu kullanılarak lncRNA MEG3'ün gen ifade profili oluşturulmuştur. Çalışmada kullanılan hem kanser hücre hatları hem de normal hücre hatlarıyla beraber sağlıklı insan doku örnekleri sayesinde MEG3 geninin çeşitli kanserlerde normale göre düzensiz ifadeye sahip olduğu bulunmuştur.

MEG3 geninin, kalp kemik iliği gibi dokularda ifadesi tamamen kaybolmuşken, plasenta beyin ve karaciğer gibi dokularında ifade düzeyi oldukça yüksektir. Çalışmamızda normalizasyon için kullanacağımız sağlıklı prostat dokuda ise ortalama bir ifade düzeyine sahiptir. MEG3 geninin 20 farklı insan dokusundaki ifade seviyesi Şekil 4.6'da gösterilmiştir.

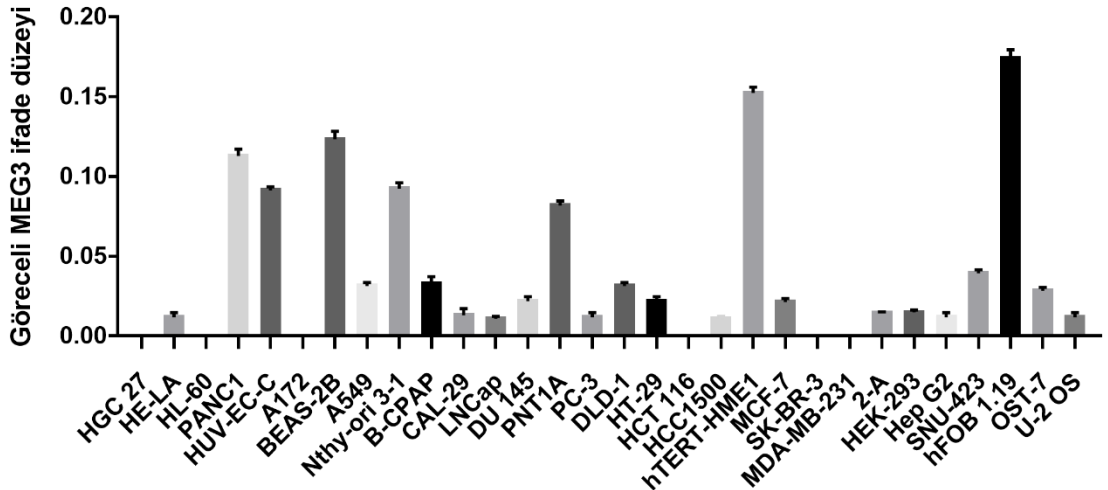


Şekil 4.6. MEG3 geninin 20 farklı sağlıklı insan dokusundaki ifade seviyesi.

Aynı zamanda 30 farklı kanser ve normal hücre hattı kullanılarak qRT-PCR yöntemiyle yapılan çalışmalar neticesinde MEG3 geninin ifade analizi gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.7). LncRNA MEG3'ün ifadesi birçok kanser türünde tamamen kaybolmuş veya çok düşük seviyededir. HGC-27 mide kanseri, HL-60 akut promiyelotik lösemi, A-172 gliblosatoma, HCT-116 kolon kanseri, SK-BR-3 ve MDA-MB-231 meme kanser hücrelerinde MEG3 ifadesi yoktur. hFOB 1.19 normal osteoblast, hTERT-HME1 normal meme, PNT1A normal prostat, BEAS-2B normal akciğer, Nthy-ori 3-1 normal tiroid hücre hatları MEG3 geninin en yüksek ifadeye sahip olduğu hücrelerdir.

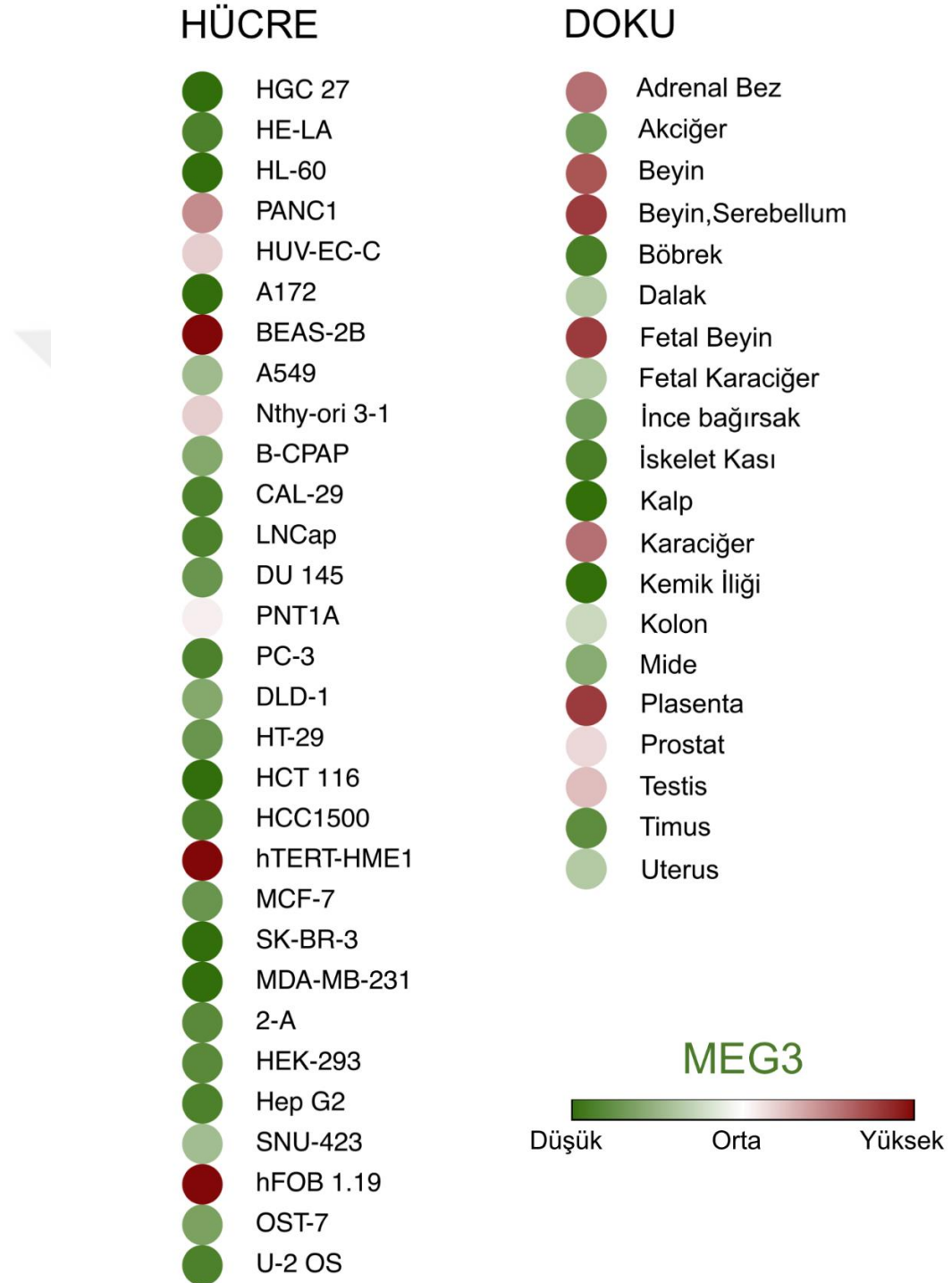
LncRNA MEG3'ün ifadesi, U-2 OS, OST-7 osteosarkom hücrelerinde hFOB 1.19 normal osteoblast hücrelerine göre çok düşük seviyededir. Benzer şekilde, hTERT-HME1 normal meme hücresinde MEG3 gen ifadesi HCC-1500, MCF-7, SK-BR-3 ve MDA-MB-231 meme kanser hücre hatlarında daha yüksek seviyededir. Akciğer kanser hücre hattı A549'da da aynı şekilde MEG3 ifadesi normal akciğer hücre hattı BEAS-2B'ye göre daha düşüktür. Çalışmada kullandığımız PC-3 ve DU 145 ile LNCap prostat kanser hücrelerinde de yine MEG3 ifadesi PNT1A normal prostat hücresine göre düşük seviyededir.

Sonuç olarak, 30 çeşit insan normal ve kanser hücre hattındaki gen ifade analizine göre MEG3 geni çok sayıda kanserde ifade kaybına uğramıştır.



Şekil 4.7. MEG3 geninin çeşitli kanser ve normal hücre hatlarındaki ifade seviyesi.

MEG3 geninin çeşitli sağlıklı insan dokularında ve hücre hatlarında ifade seviyesini özetleyen heat-map grafikleri DisplayR toolu kullanılarak oluşturulmuştur (Şekil 4.8) (150).

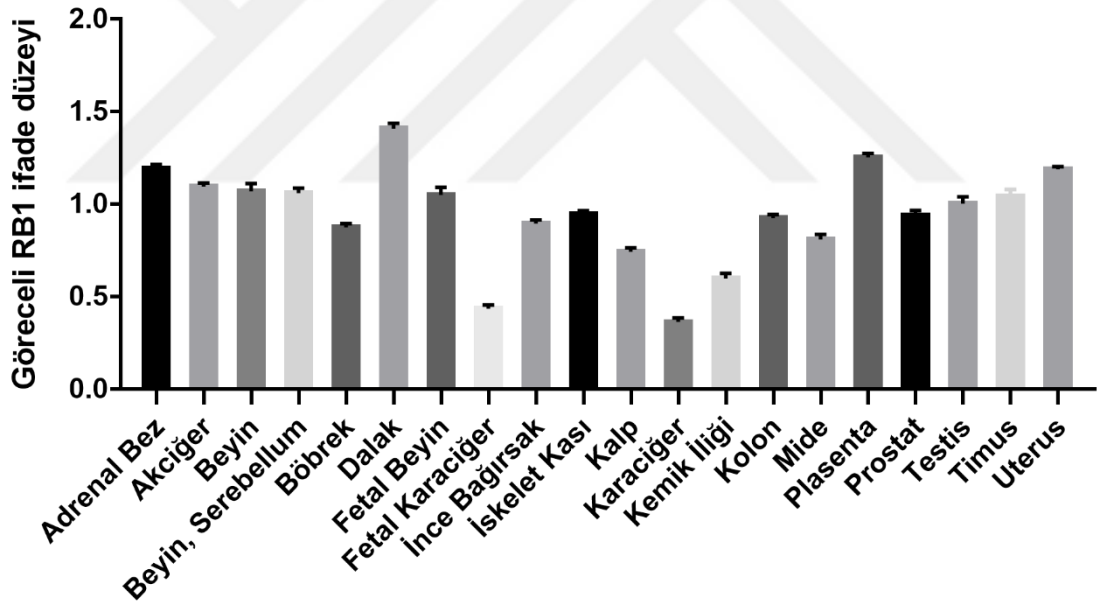


Şekil 4.8. LncRNA MEG3'ün çeşitli hücre hatlarında ve sağlıklı insan dokularındaki ifade seviyesini gösteren heat-map grafiği.

4.4.RB1 Geninin Farklı Hücre Hatları ve İnsan Dokularında İfade Seviyesi

Otuz çeşit insan hücre hattı ve 20 tane sağlıklı insan dokusu kullanılarak RB1 geninin ifade profili oluşturulmuştur. Çalışmada kullanılan hem kanser hücre hatları hem de normal hücre hatlarıyla beraber sağlıklı insan doku örnekleri sayesinde RB1 geninin çeşitli kanserlerde normale göre düzensiz ifadeye sahip olduğu bulunmuştur.

RB1 geninin çalışmada kullandığımız sağlıklı insan dokularının hepsinde farklı düzeylerde olsa da belirgin bir gen ifadesine sahip olduğu görülmüştür. Karaciğer ve fatal karaciğer dokularında diğer dokulara göre daha düşük ifadeye sahipken, dalak plasenta ve uterus dokularında ise daha yüksek ifade seviyesine sahiptir. RB1 geninin 20 farklı insan dokusundaki ifade seviyesi Şekil 4.9’da gösterilmiştir.



Şekil 4.9. RB1 geninin 20 farklı sağlıklı insan dokusundaki ifade seviyesi.

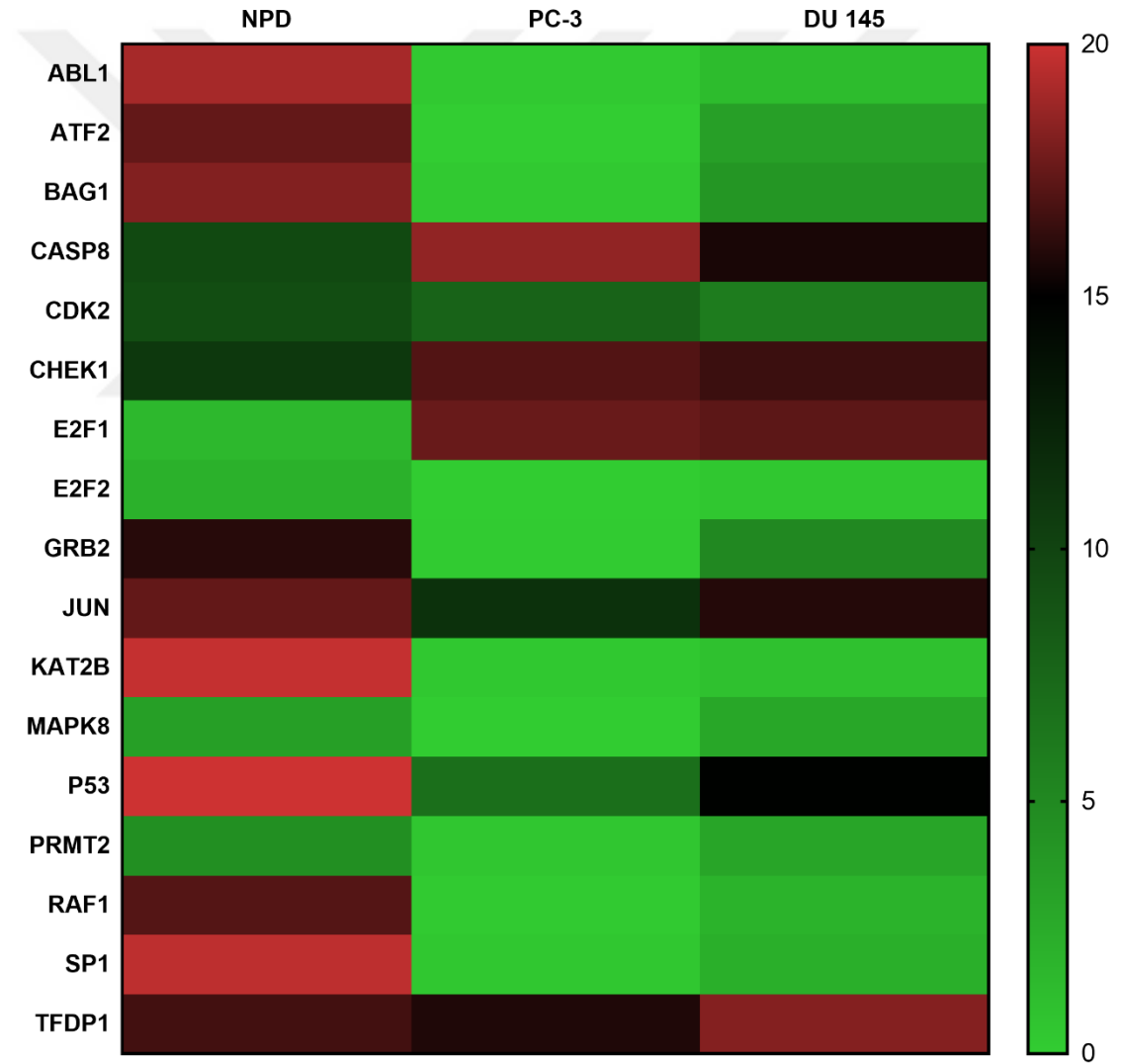
RB1 geninin çeşitli sağlıklı insan dokularında ifade seviyesini özetleyen heat-map grafikleri DisplayR toolu kullanılarak oluşturulmuştur (Şekil 4.10) (150).



Şekil 4.10. RB1 geninin sağlıklı insan dokularındaki ifade seviyesini gösteren heat-map grafiği.

4.5.RB1 ve Hedef Genlerinin Prostat Kanseriindeki İfade Analizleri

Çalışmada RB1'in hedef genleri olarak seçtiğimiz 17 genin prostat kanserinde ifade değişimine uğrayıp uğramadığını belirlemek için gen ifade analizlerini gerçekleştirdik. Prostat kanserindeki gen ifade seviyelerini belirlemek için prostat kanser hücre hatları olan PC-3 ve DU-145 kullanılmıştır. Ayrıca ticari olarak temin ettiğimiz sağlıklı prostat doku gen ifade analizinde kanser hücre hatlarının kontrolü olarak kullanılmıştır. Gen ifade düzeylerini belirlemek için qRT-PCR yöntemi kullanılmıştır. Elde edilen verilerin istatistiksel analizleri GraphPad Prism 6 programı kullanılarak hesaplanmıştır. Tüm genlerin ifade düzeylerine ait heat-map grafiği Şekil 4.11'de gösterilmiştir.

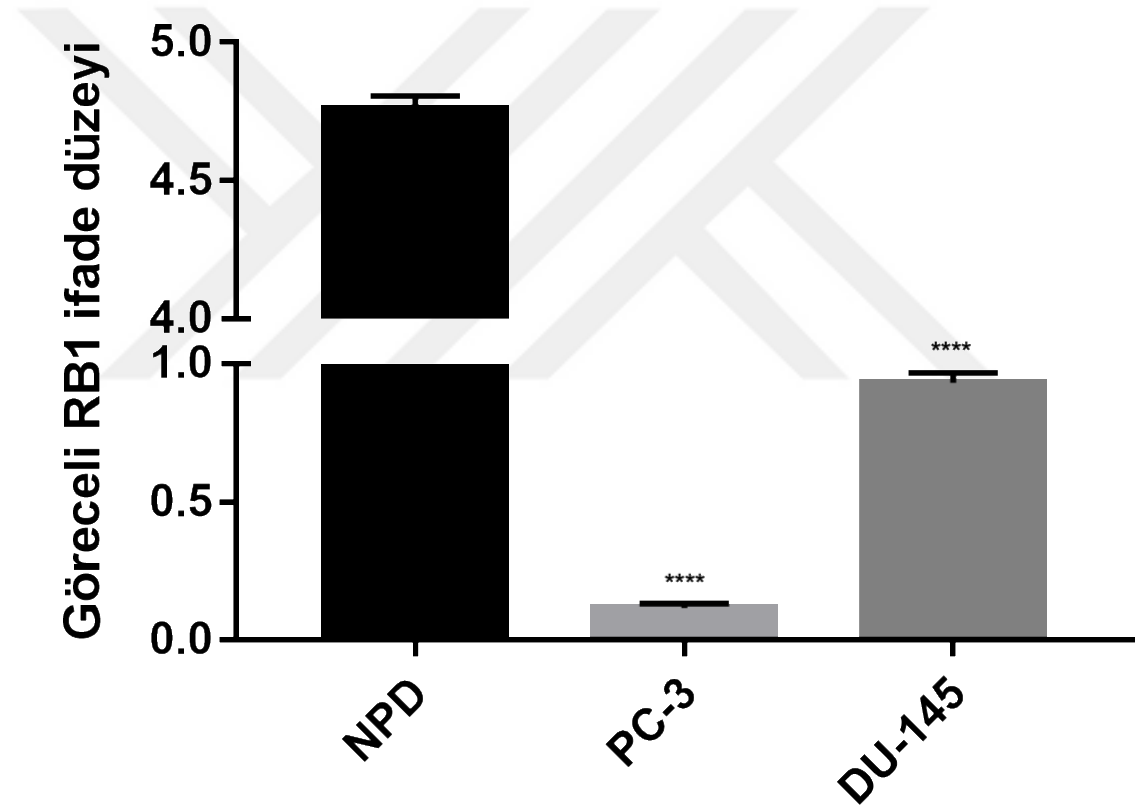


Şekil 4.11. RB1 hedef genlerinin heat-map grafiği.

4.5.1. RB1 Geninin Prostat Kanserindeki İfade Seviyesi

RB1 geninin prostat kanserindeki ifade seviyesini belirlemek için sağlıklı prostat doku ve prostat kanser hücre hatları olan PC-3 ve DU-145 kullanılarak qRT-PCR yöntemi gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizlerde prostat kanserinde RB1 geninin düzensiz ifadeye sahip olduğu saptanmıştır.

RB1 geninin, PC-3 ve DU-145 prostat kanser hücre hatlarında, normal prostat dokuya kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük ifade seviyesine sahip olduğu bulunmuştur (p değerleri, PC-3 için $p<0,0001$, DU-145 için $p<0,0001$) (Şekil 4.12).

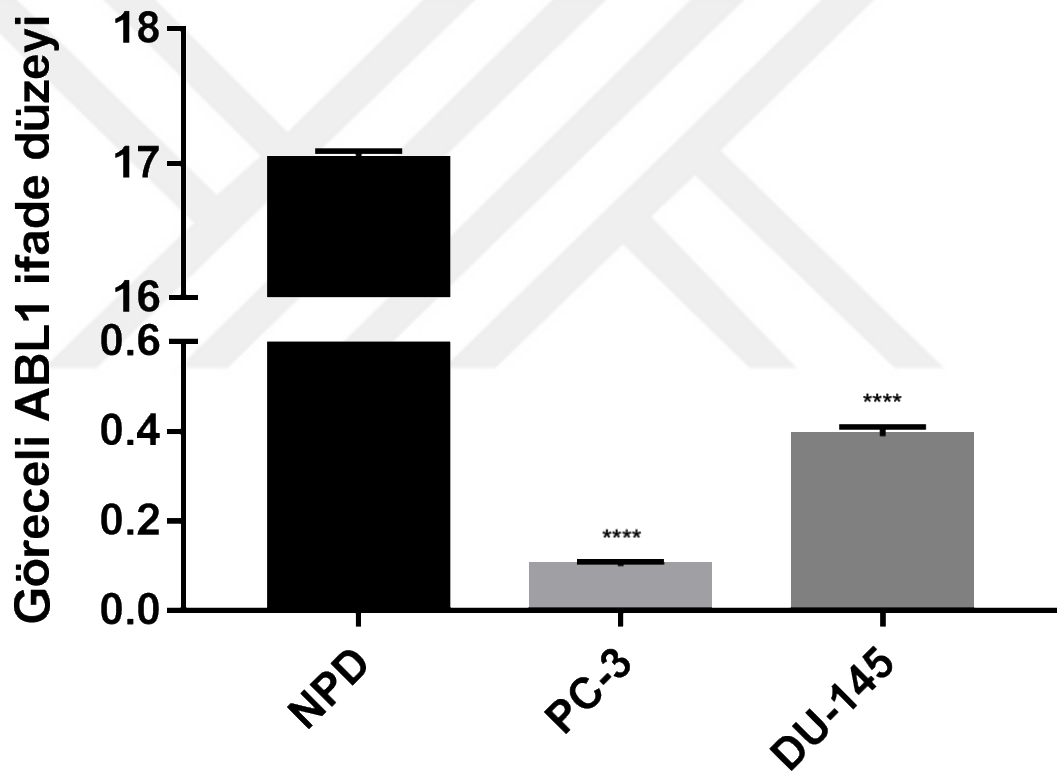


Şekil 4.12. RB1 geninin normal prostat dokusu ve PC-3, DU-145 prostat kanser hücre hatlarında ifade seviyesi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (**** $p<0,0001$).

4.5.2. ABL1 Geninin Prostat Kanserindeki İfade Seviyesi

ABL1 geninin prostat kanserindeki ifade seviyesini belirlemek için sağlıklı prostat doku ve prostat kanser hücre hatları olan PC-3 ve DU-145 kullanılarak qRT-PCR yöntemi gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizlerde prostat kanserinde ABL1 geninin düzensiz ifadeye sahip olduğu saptanmıştır.

ABL1 geninin, PC-3 ve DU-145 prostat kanser hücre hatlarında, normal prostat dokuya kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük ifade seviyesine sahip olduğu bulunmuştur (p değerleri, PC-3 için $p<0,0001$, DU-145 için $p<0,0001$) (Şekil 4.13).

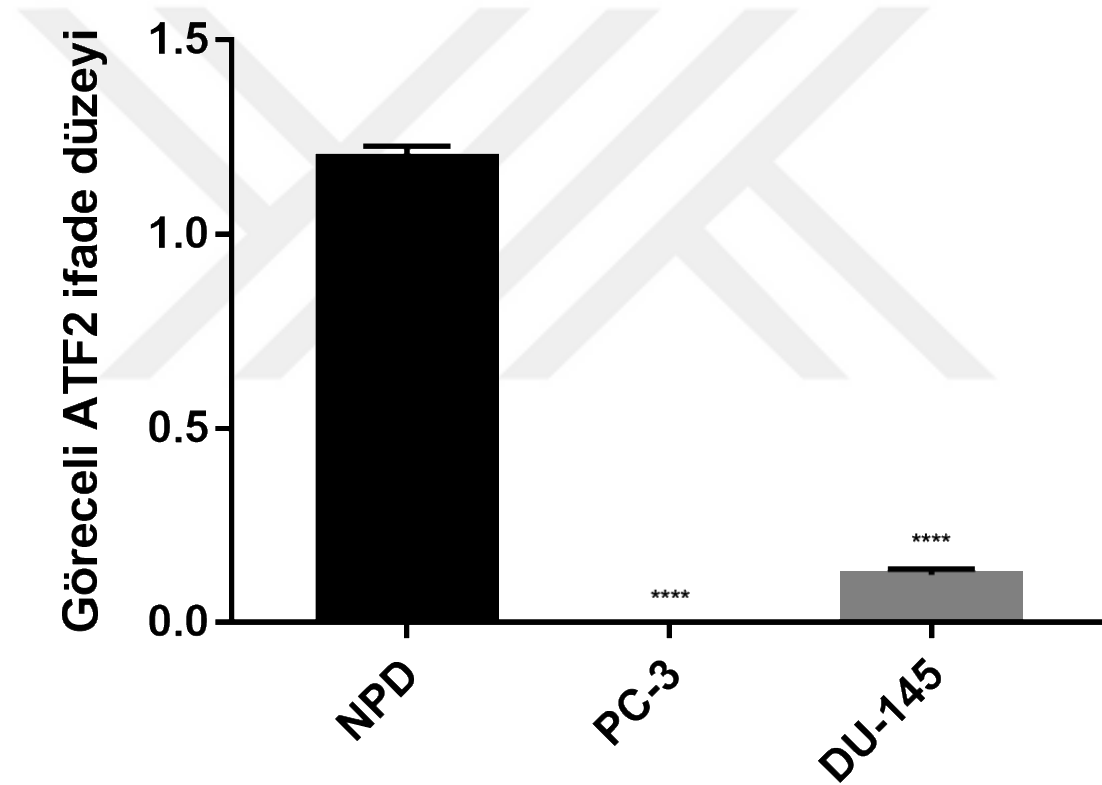


Şekil 4.13. ABL1 geninin normal prostat doku (NDP) ve PC-3, DU-145 prostat kanser hücre hatlarında ifade seviyesi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (**** $p<0,0001$).

4.5.3. ATF2 Geninin Prostat Kanserindeki İfade Seviyesi

ATF2 geninin prostat kanserindeki ifade seviyesini belirlemek için sağlıklı prostat doku ve prostat kanser hücre hatları olan PC-3 ve DU-145 kullanılarak qRT-PCR yöntemi gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizlerde prostat kanserinde ATF2 geninin düzensiz ifadeye sahip olduğu saptanmıştır.

ATF2 geninin, PC-3 ve DU-145 prostat kanser hücre hatlarında, normal prostat dokuya kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük ifade seviyesine sahip olduğu bulunmuştur (p değerleri, PC-3 için $p<0,0001$, DU-145 için $p<0,0001$) (Şekil 4.14).

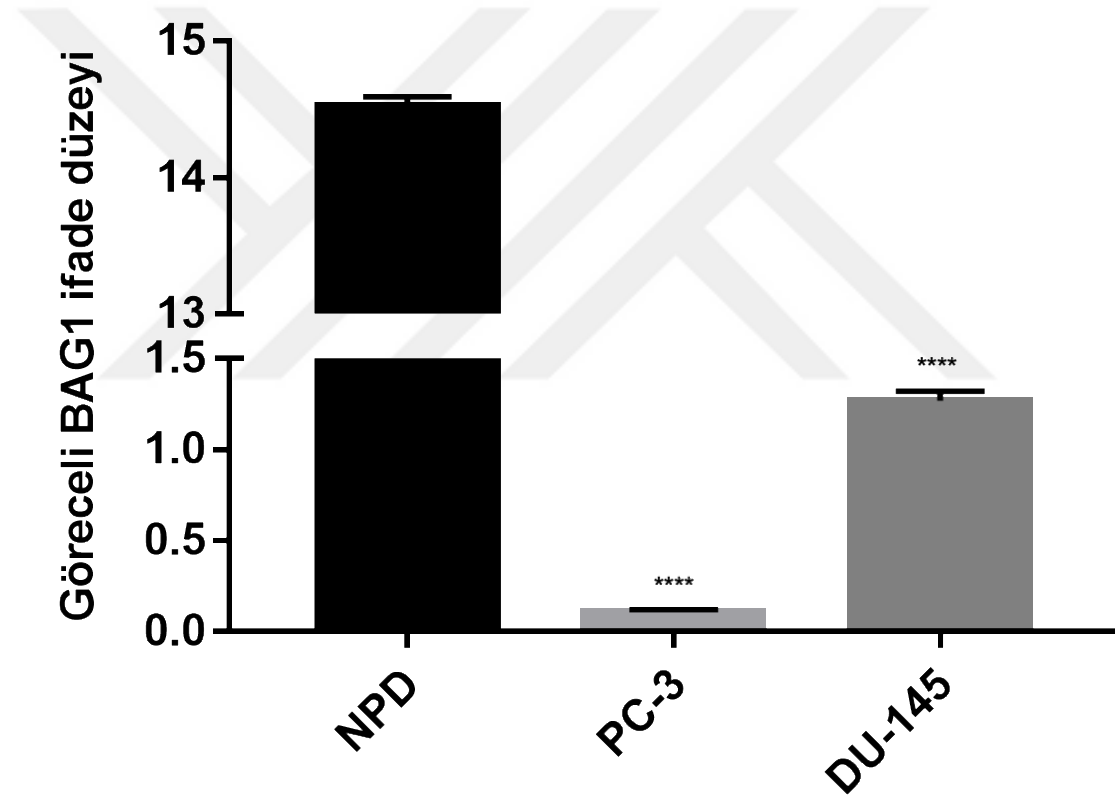


Şekil 4.14. ATF2 geninin normal prostat dokusu (NPD) ve PC-3, DU-145 prostat kanser hücre hatlarında ifade seviyesi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (**** $p<0,0001$).

4.5.4. BAG1 Geninin Prostat Kanserindeki İfade Seviyesi

BAG1 geninin prostat kanserindeki ifade seviyesini belirlemek için sağlıklı prostat doku ve prostat kanser hücre hatları olan PC-3 ve DU-145 kullanılarak qRT-PCR yöntemi gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizlerde prostat kanserinde BAG1 geninin düzensiz ifadeye sahip olduğu saptanmıştır.

BAG1 geninin, PC-3 ve DU-145 prostat kanser hücre hatlarında, normal prostat dokuya kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük ifade seviyesine sahip olduğu bulunmuştur (p değerleri, PC-3 için $p<0,0001$, DU-145 için $p<0,0001$) (Şekil 4.15).

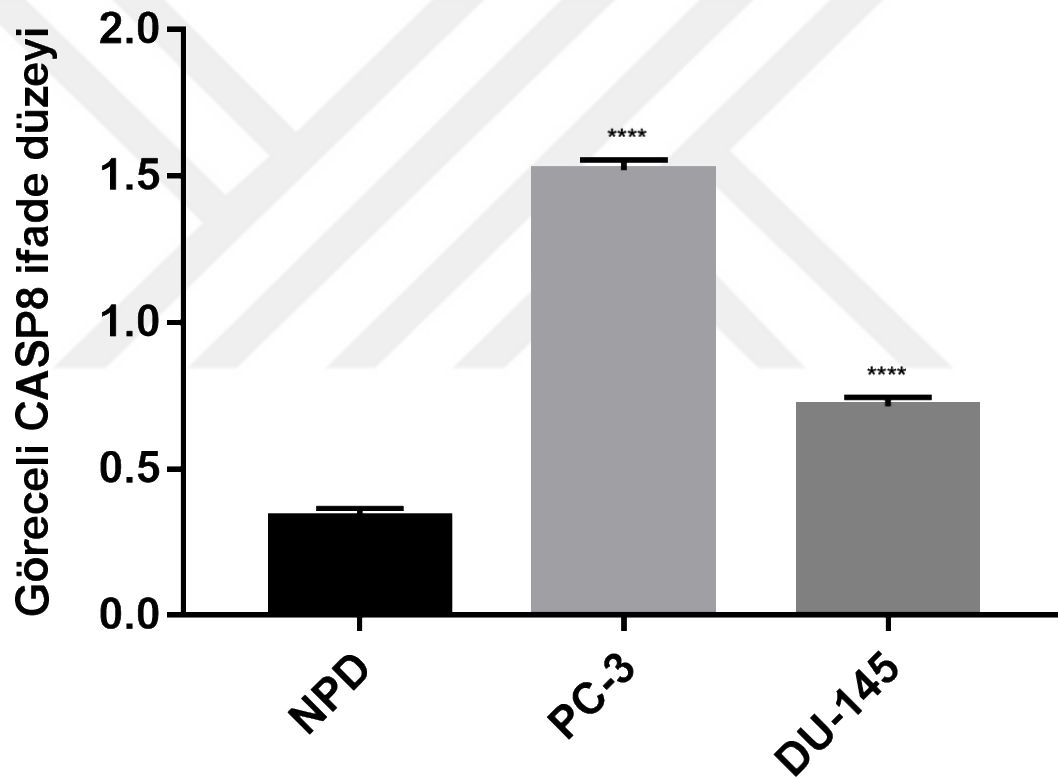


Şekil 4.15. BAG1 geninin normal prostat doku (NPD) ve PC-3, DU-145 prostat kanser hücre hatlarında ifade seviyesi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (**** $p<0,0001$).

4.5.5. CASP8 Geninin Prostat Kanserindeki İfade Seviyesi

CASP8 geninin prostat kanserindeki ifade seviyesini belirlemek için sağlıklı prostat doku ve prostat kanser hücre hatları olan PC-3 ve DU-145 kullanılarak qRT-PCR yöntemi gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizlerde prostat kanserinde CASP8 geninin düzensiz ifadeye sahip olduğu saptanmıştır.

CASP8 geninin, PC-3 ve DU-145 prostat kanser hücre hatlarında, normal prostat dokuya kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek ifade seviyesine sahip olduğu bulunmuştur (p değerleri, PC-3 için $p<0,0001$, DU-145 için $p<0,0001$) (Şekil 4.16).

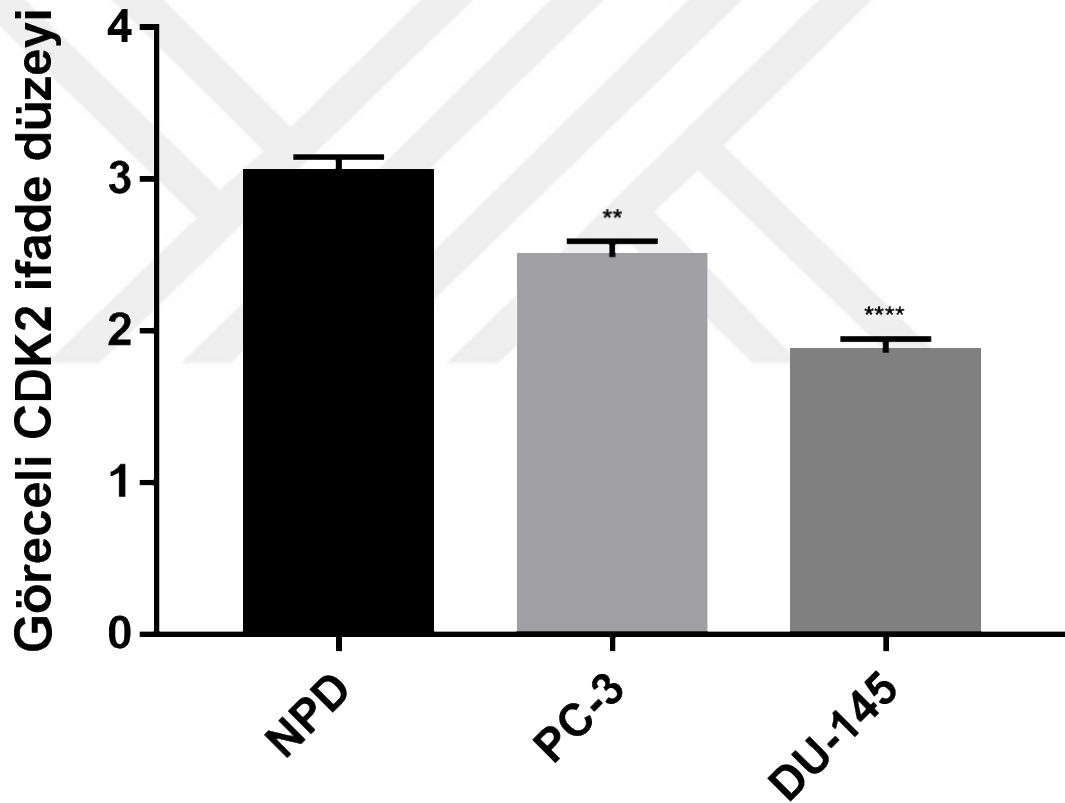


Şekil 4.16. CASP8 geninin normal prostat doku (NPD) ve PC-3, DU-145 prostat kanser hücre hatlarında ifade seviyesi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (**** $p<0,0001$).

4.5.6. CDK2 Geninin Prostat Kanserindeki İfade Seviyesi

CDK2 geninin prostat kanserindeki ifade seviyesini belirlemek için sağlıklı prostat doku ve prostat kanser hücre hatları olan PC-3 ve DU-145 kullanılarak qRT-PCR yöntemi gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizlerde prostat kanserinde CDK2 geninin düzensiz ifadeye sahip olduğu saptanmıştır.

CDK2 geninin, PC-3 ve DU-145 prostat kanser hücre hatlarında, normal prostat dokuya kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük ifade seviyesine sahip olduğu bulunmuştur (p değerleri, PC-3 için $p=0,0013$, DU-145 için $p<0,0001$) (Şekil 4.17).

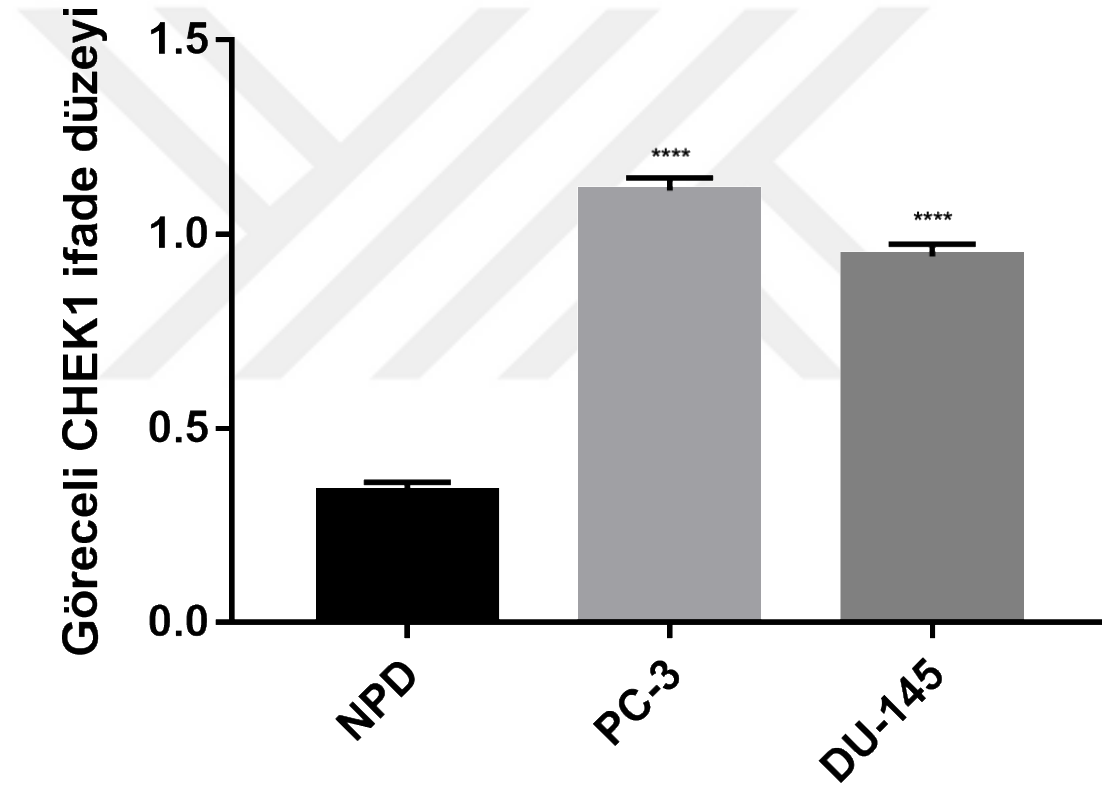


Şekil 4.17. CDK2 geninin normal prostat doku (NPD) ve PC-3, DU-145 prostat kanser hücre hatlarında ifade seviyesi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (** $p<0,01$; **** $p<0,0001$).

4.5.7. CHEK1 Geninin Prostat Kanserindeki İfade Seviyesi

CHEK1 geninin prostat kanserindeki ifade seviyesini belirlemek için sağlıklı prostat doku ve prostat kanser hücre hatları olan PC-3 ve DU-145 kullanılarak qRT-PCR yöntemi gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizlerde prostat kanserinde CHEK1 geninin düzensiz ifadeye sahip olduğu saptanmıştır.

CHEK1 geninin, PC-3 ve DU-145 prostat kanser hücre hatlarında, normal prostat dokuya kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek ifade seviyesine sahip olduğu bulunmuştur (p değerleri, PC-3 için $p<0,0001$, DU-145 için $p<0,0001$) (Şekil 4.18).

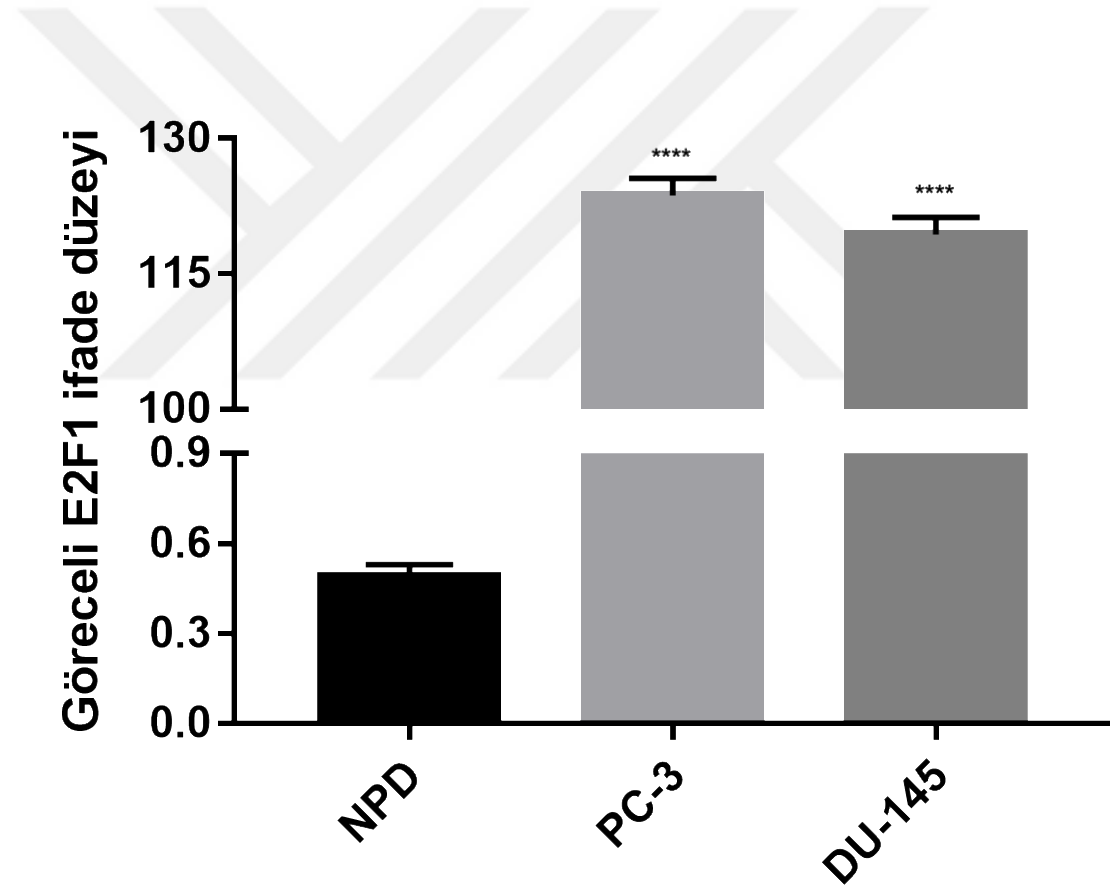


Şekil 4.18. CHEK1 geninin normal prostat doku (NPD) ve PC-3, DU-145 prostat kanser hücre hatlarında ifade seviyesi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (**** $p<0,0001$).

4.5.8. E2F1 Geninin Prostat Kanserindeki İfade Seviyesi

E2F1 geninin prostat kanserindeki ifade seviyesini belirlemek için sağlıklı prostat doku ve prostat kanser hücre hatları olan PC-3 ve DU-145 kullanılarak qRT-PCR yöntemi gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizlerde prostat kanserinde E2F1 geninin düzensiz ifadeye sahip olduğu saptanmıştır.

E2F1 geninin, PC-3 ve DU-145 prostat kanser hücre hatlarında, normal prostat dokuya kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek ifade seviyesine sahip olduğu bulunmuştur (p değerleri, PC-3 için $p<0,0001$, DU-145 için $p<0,0001$) (Şekil 4.19).

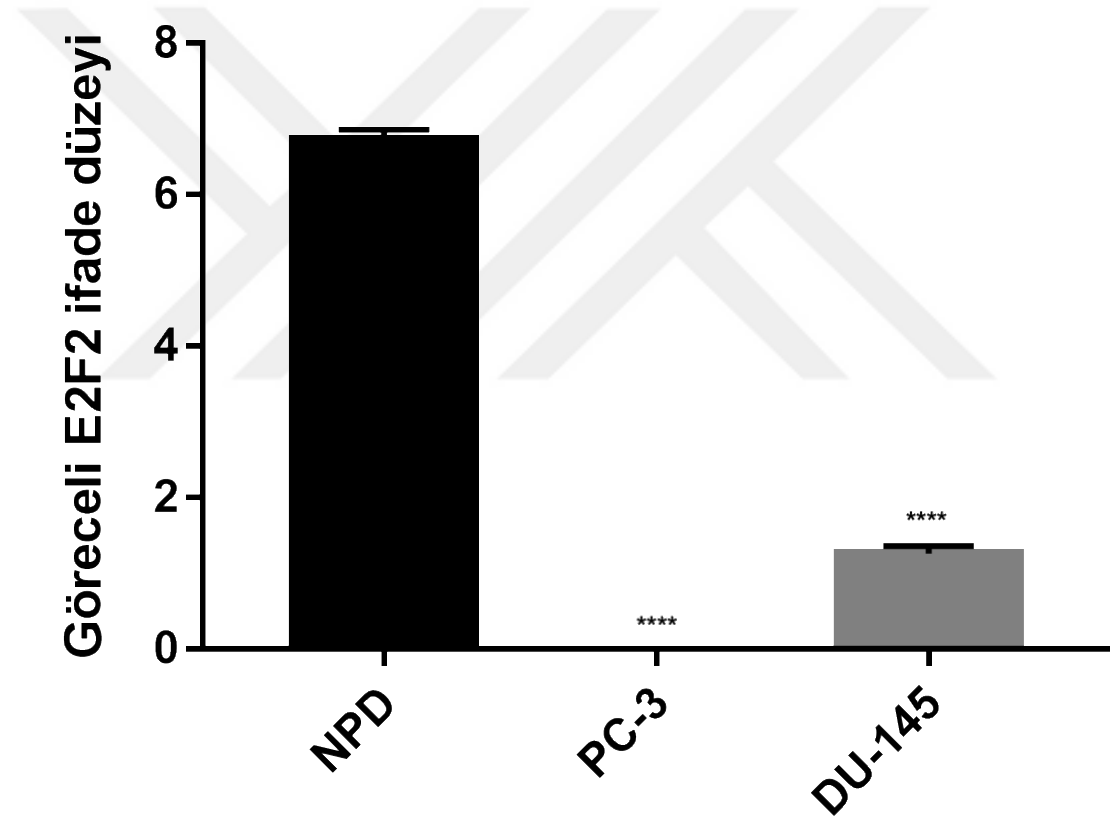


Şekil 4.19. E2F1 geninin normal prostat doku (NPD) ve PC-3, DU-145 prostat kanser hücre hatlarında ifade seviyesi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (**** $p<0,0001$).

4.5.9. E2F2 Geninin Prostat Kanserindeki İfade Seviyesi

E2F2 geninin prostat kanserindeki ifade seviyesini belirlemek için sağlıklı prostat doku ve prostat kanser hücre hatları olan PC-3 ve DU-145 kullanılarak qRT-PCR yöntemi gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizlerde prostat kanserinde E2F2 geninin düzensiz ifadeye sahip olduğu saptanmıştır.

E2F2 geninin, PC-3 ve DU-145 prostat kanser hücre hatlarında, normal prostat dokuya kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük ifade seviyesine sahip olduğu bulunmuştur (p değerleri, PC-3 için $p<0,0001$, DU-145 için $p<0,0001$) (Şekil 4.20).

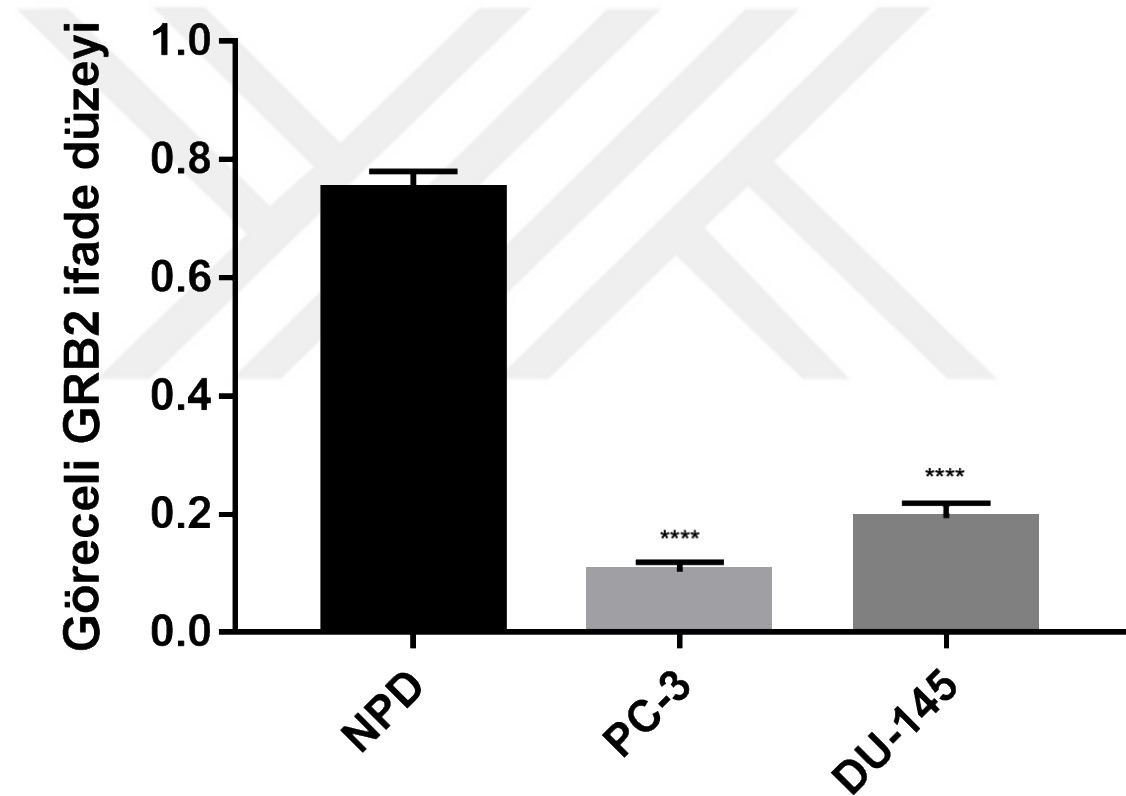


Şekil 4.20. E2F2 geninin normal prostat doku (NPD) ve PC-3, DU-145 prostat kanser hücre hatlarında ifade seviyesi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (**** $p<0,0001$).

4.5.10. GRB2 Geninin Prostat Kanserindeki İfade Seviyesi

GRB2 geninin prostat kanserindeki ifade seviyesini belirlemek için sağlıklı prostat doku ve prostat kanser hücre hatları olan PC-3 ve DU-145 kullanılarak qRT-PCR yöntemi gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizlerde prostat kanserinde GRB2 geninin düzensiz ifadeye sahip olduğu saptanmıştır.

GRB2 geninin, PC-3 ve DU-145 prostat kanser hücre hatlarında, normal prostat dokuya kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük ifade seviyesine sahip olduğu bulunmuştur (p değerleri, PC-3 için $p<0,0001$, DU-145 için $p<0,0001$) (Şekil 4.21).

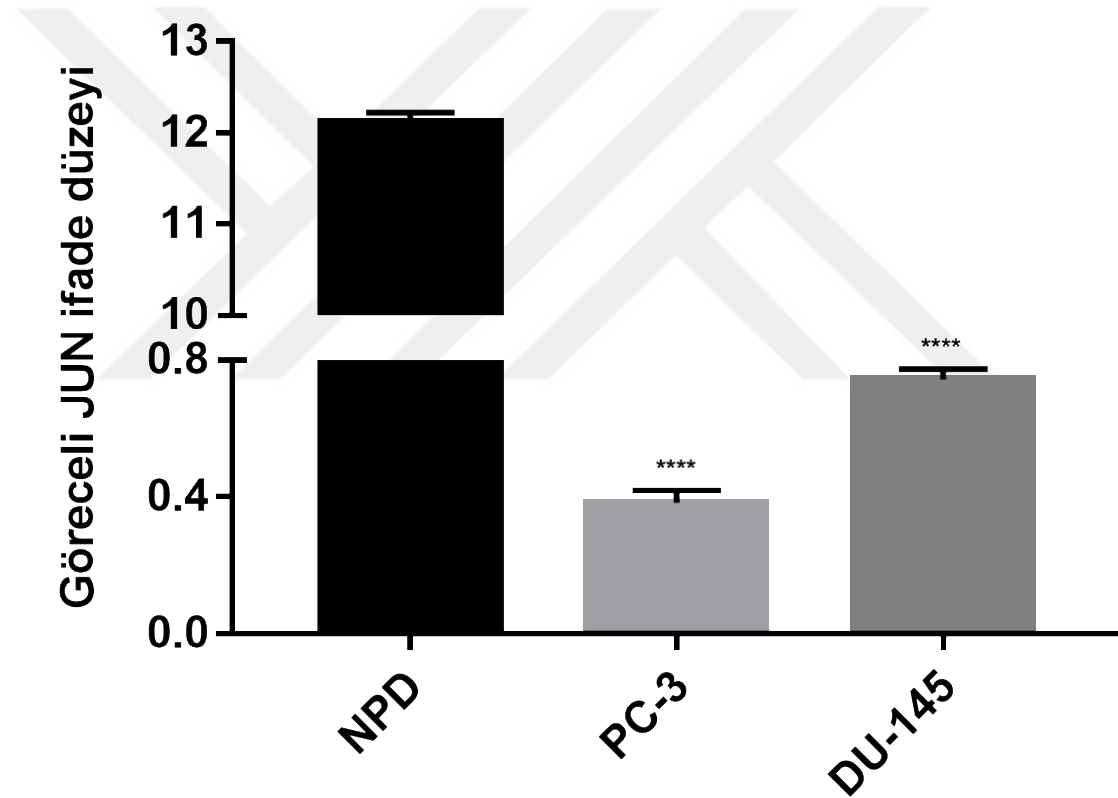


Şekil 4.21. GRB2 geninin normal prostat doku (NPD) ve PC-3, DU-145 prostat kanser hücre hatlarında ifade seviyesi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (**** $p<0,0001$).

4.5.11. JUN Geninin Prostat Kanserindeki İfade Seviyesi

JUN geninin prostat kanserindeki ifade seviyesini belirlemek için sağlıklı prostat doku ve prostat kanser hücre hatları olan PC-3 ve DU-145 kullanılarak qRT-PCR yöntemi gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizlerde prostat kanserinde JUN geninin düzensiz ifadeye sahip olduğu saptanmıştır.

JUN geninin, PC-3 ve DU-145 prostat kanser hücre hatlarında, normal prostat dokuya kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük ifade seviyesine sahip olduğu bulunmuştur (p değerleri, PC-3 için $p<0,0001$, DU-145 için $p<0,0001$) (Şekil 4.22).

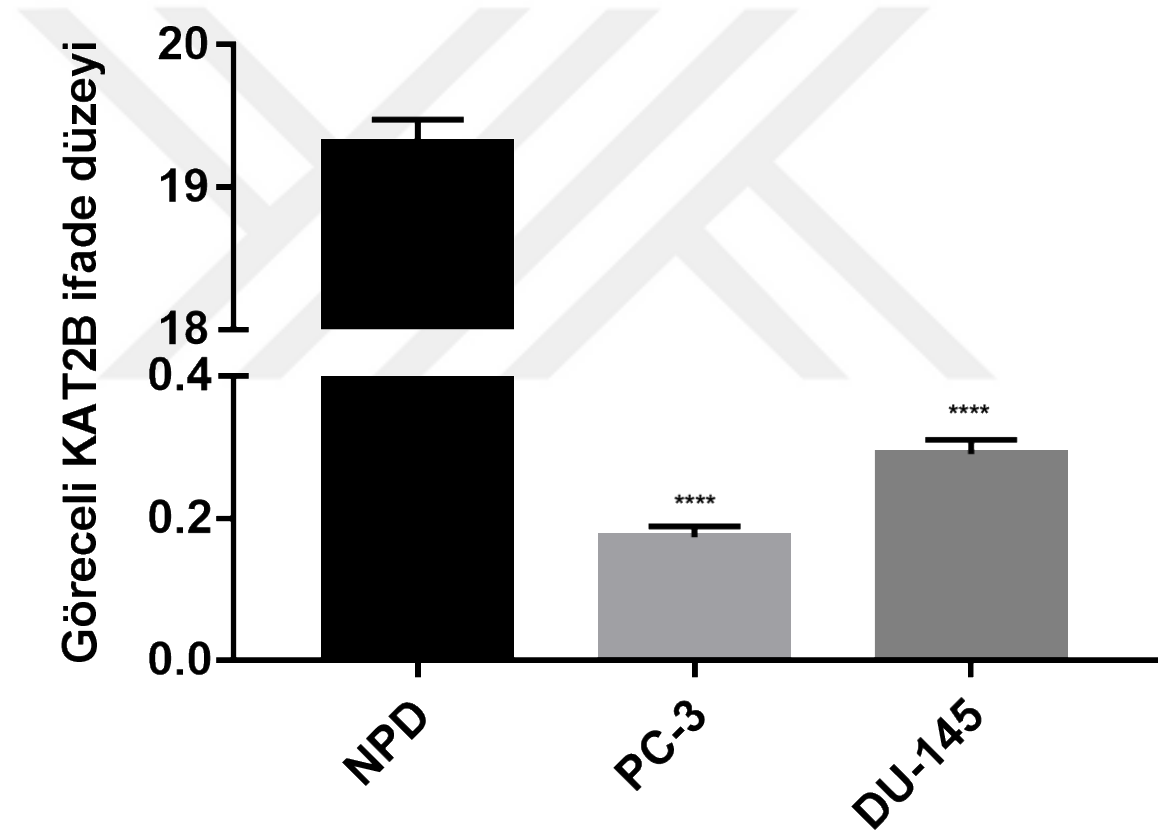


Şekil 4.22. JUN geninin normal prostat doku (NPD) ve PC-3, DU-145 prostat kanser hücre hatlarında ifade seviyesi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (**** $p<0,0001$).

4.5.12. KAT2B Geninin Prostat Kanserindeki İfade Seviyesi

KAT2B geninin prostat kanserindeki ifade seviyesini belirlemek için sağlıklı prostat doku ve prostat kanser hücre hatları olan PC-3 ve DU-145 kullanılarak qRT-PCR yöntemi gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizlerde prostat kanserinde KAT2B geninin düzensiz ifadeye sahip olduğu saptanmıştır.

KAT2B geninin, PC-3 ve DU-145 prostat kanser hücre hatlarında, normal prostat dokuya kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük ifade seviyesine sahip olduğu bulunmuştur (p değerleri, PC-3 için $p<0,0001$, DU-145 için $p<0,0001$) (Şekil 4.23).

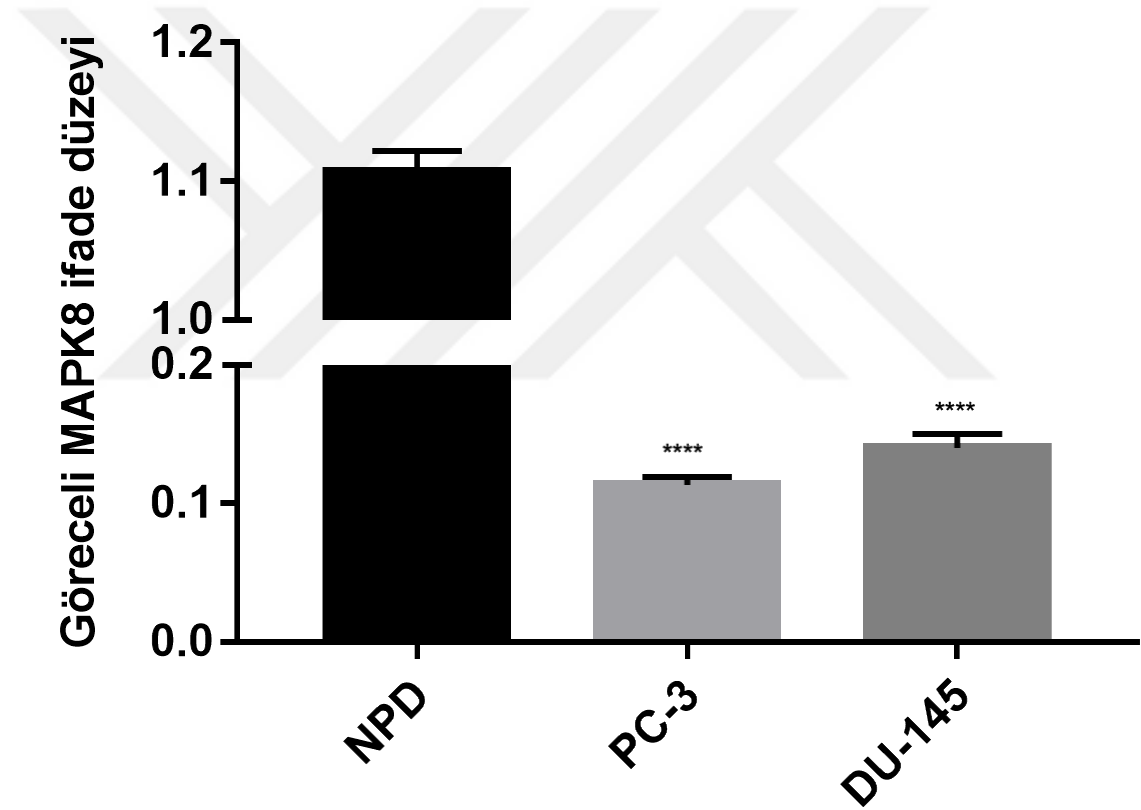


Şekil 4.23. KAT2B geninin normal prostat doku (NPD) ve PC-3, DU-145 prostat kanser hücre hatlarında ifade seviyesi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (**** $p<0,0001$).

4.5.13. MAPK8 Geninin Prostat Kanserindeki İfade Seviyesi

MAPK8 geninin prostat kanserindeki ifade seviyesini belirlemek için sağlıklı prostat doku ve prostat kanser hücre hatları olan PC-3 ve DU-145 kullanılarak qRT-PCR yöntemi gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizlerde prostat kanserinde MAPK8 geninin düzensiz ifadeye sahip olduğu saptanmıştır.

MAPK8 geninin, PC-3 ve DU-145 prostat kanser hücre hatlarında, normal prostat dokuya kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük ifade seviyesine sahip olduğu bulunmuştur (p değerleri, PC-3 için $p<0,0001$, DU-145 için $p<0,0001$) (Şekil 4.24).

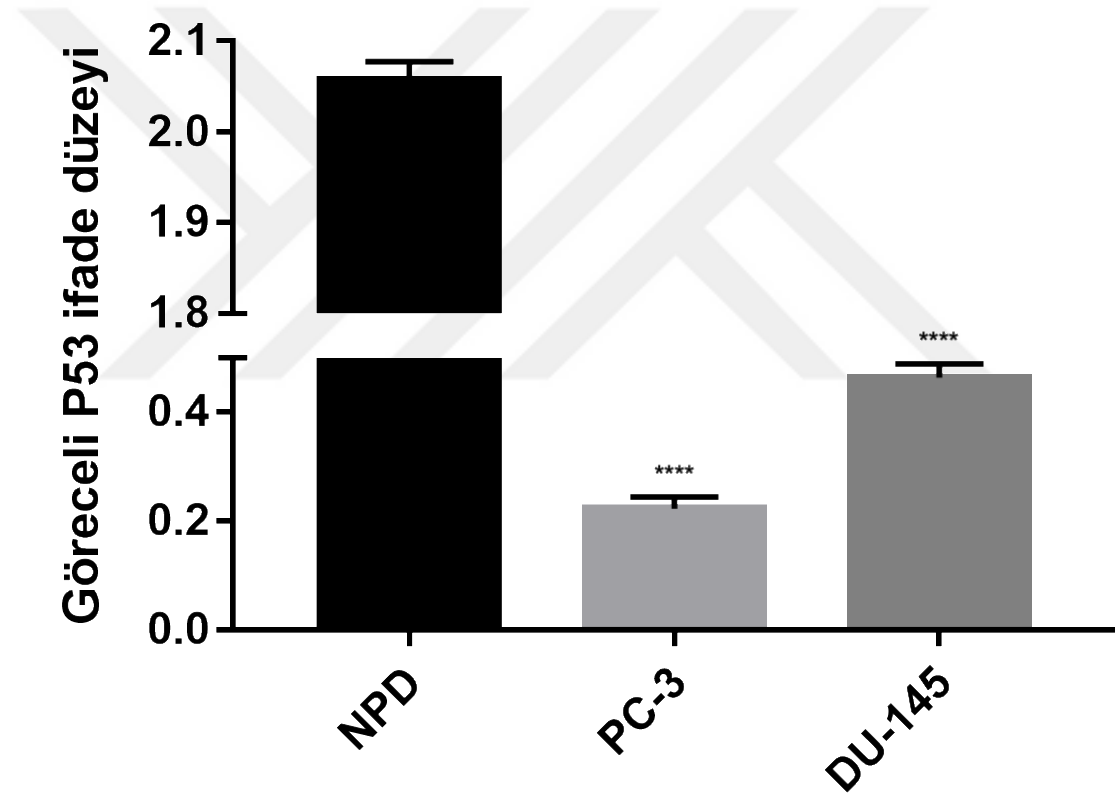


Şekil 4.24. MAPK8 geninin normal prostat doku (NPD) ve PC-3, DU-145 prostat kanser hücre hatlarında ifade seviyesi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (**** $p<0,0001$).

4.5.14. P53 Geninin Prostat Kanserindeki İfade Seviyesi

P53 geninin prostat kanserindeki ifade seviyesini belirlemek için sağlıklı prostat doku ve prostat kanser hücre hatları olan PC-3 ve DU-145 kullanılarak qRT-PCR yöntemi gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizlerde prostat kanserinde P53 geninin düzensiz ifadeye sahip olduğu saptanmıştır.

P53 geninin, PC-3 ve DU-145 prostat kanser hücre hatlarında, normal prostat dokuya kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük ifade seviyesine sahip olduğu bulunmuştur (p değerleri, PC-3 için $p<0,0001$, DU-145 için $p<0,0001$) (Şekil 4.25).

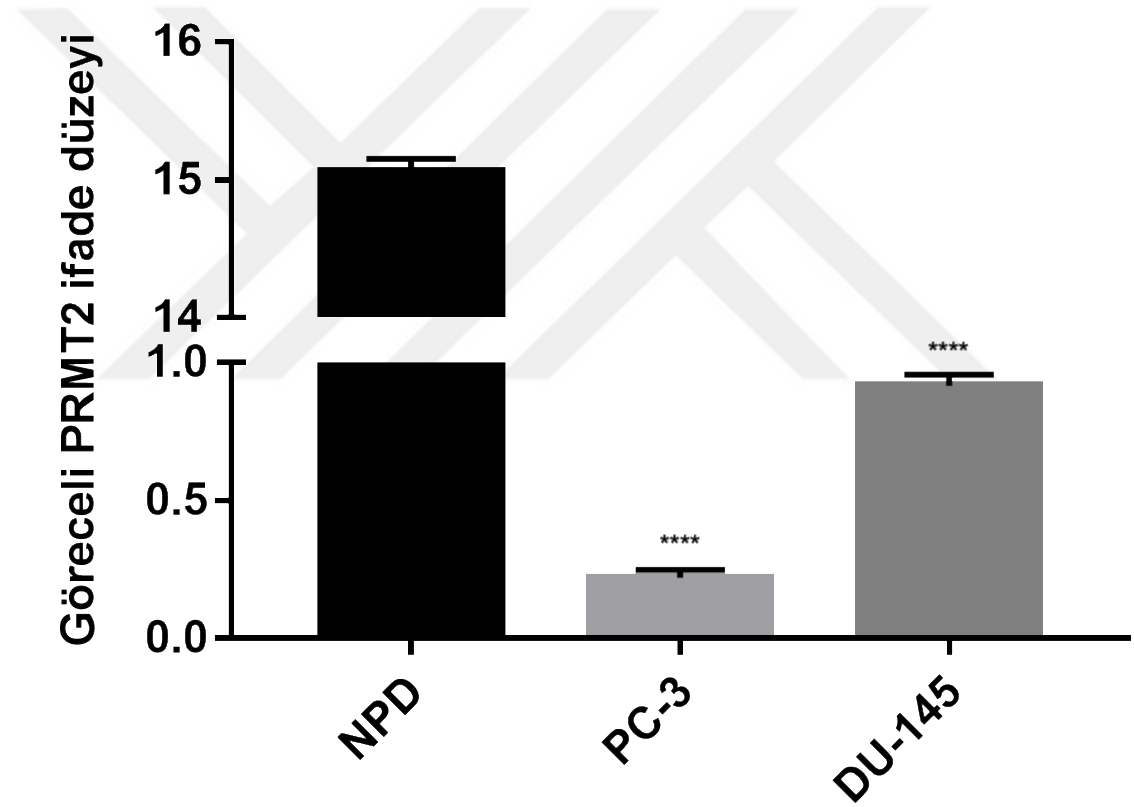


Şekil 4.25. P53 geninin normal prostat doku (NPD) ve PC-3, DU-145 prostat kanser hücre hatlarında ifade seviyesi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (**** $p<0,0001$).

4.5.15. PRMT2 Geninin Prostat Kanserindeki İfade Seviyesi

PRMT2 geninin prostat kanserindeki ifade seviyesini belirlemek için sağlıklı prostat doku ve prostat kanser hücre hatları olan PC-3 ve DU-145 kullanılarak qRT-PCR yöntemi gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizlerde prostat kanserinde PRMT2 geninin düzensiz ifadeye sahip olduğu saptanmıştır.

PRMT2 geninin, PC-3 ve DU-145 prostat kanser hücre hatlarında, normal prostat dokuya kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük ifade seviyesine sahip olduğu bulunmuştur (p değerleri, PC-3 için $p<0,0001$, DU-145 için $p<0,0001$) (Şekil 4.26).

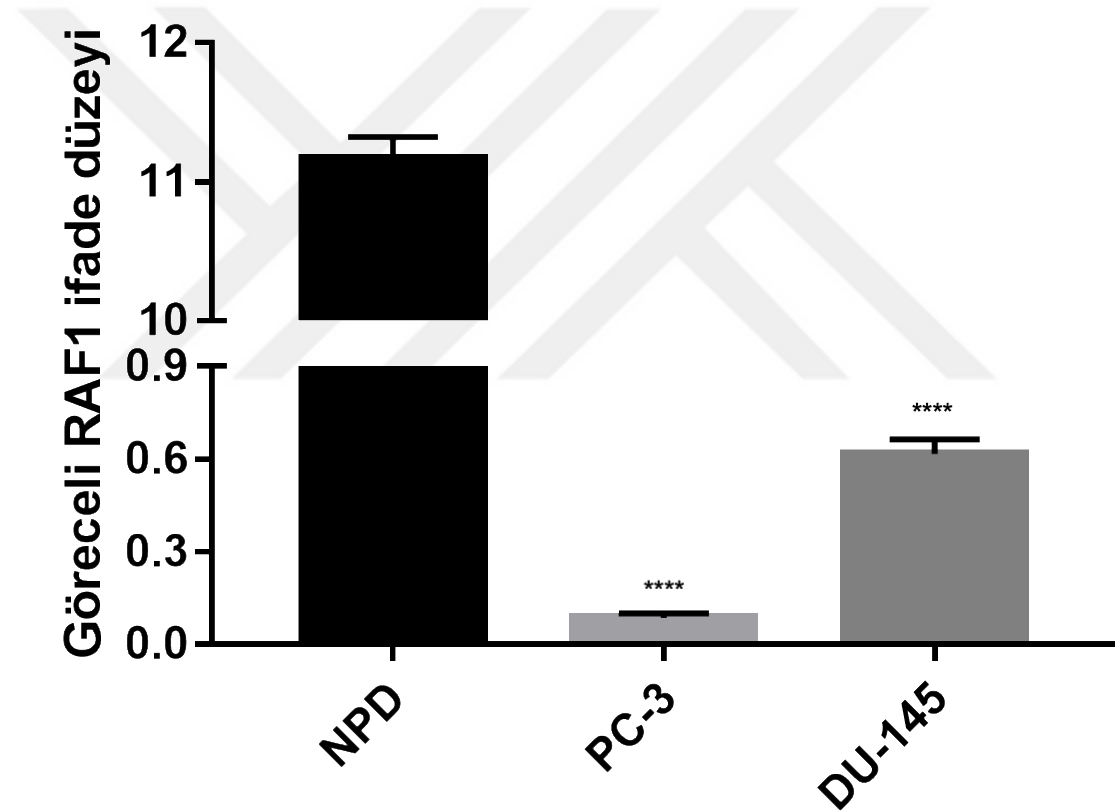


Şekil 4.26. PRMT2 geninin normal prostat doku (NPD) ve PC-3, DU-145 prostat kanser hücre hatlarında ifade seviyesi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (**** $p<0,0001$).

4.5.16. RAF1 Geninin Prostat Kanserindeki İfade Seviyesi

RAF1 geninin prostat kanserindeki ifade seviyesini belirlemek için sağlıklı prostat doku ve prostat kanser hücre hatları olan PC-3 ve DU-145 kullanılarak qRT-PCR yöntemi gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizlerde prostat kanserinde RAF1 geninin düzensiz ifadeye sahip olduğu saptanmıştır.

RAF1 geninin, PC-3 ve DU-145 prostat kanser hücre hatlarında, normal prostat dokuya kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük ifade seviyesine sahip olduğu bulunmuştur (p değerleri, PC-3 için $p<0,0001$, DU-145 için $p<0,0001$) (Şekil 4.27).

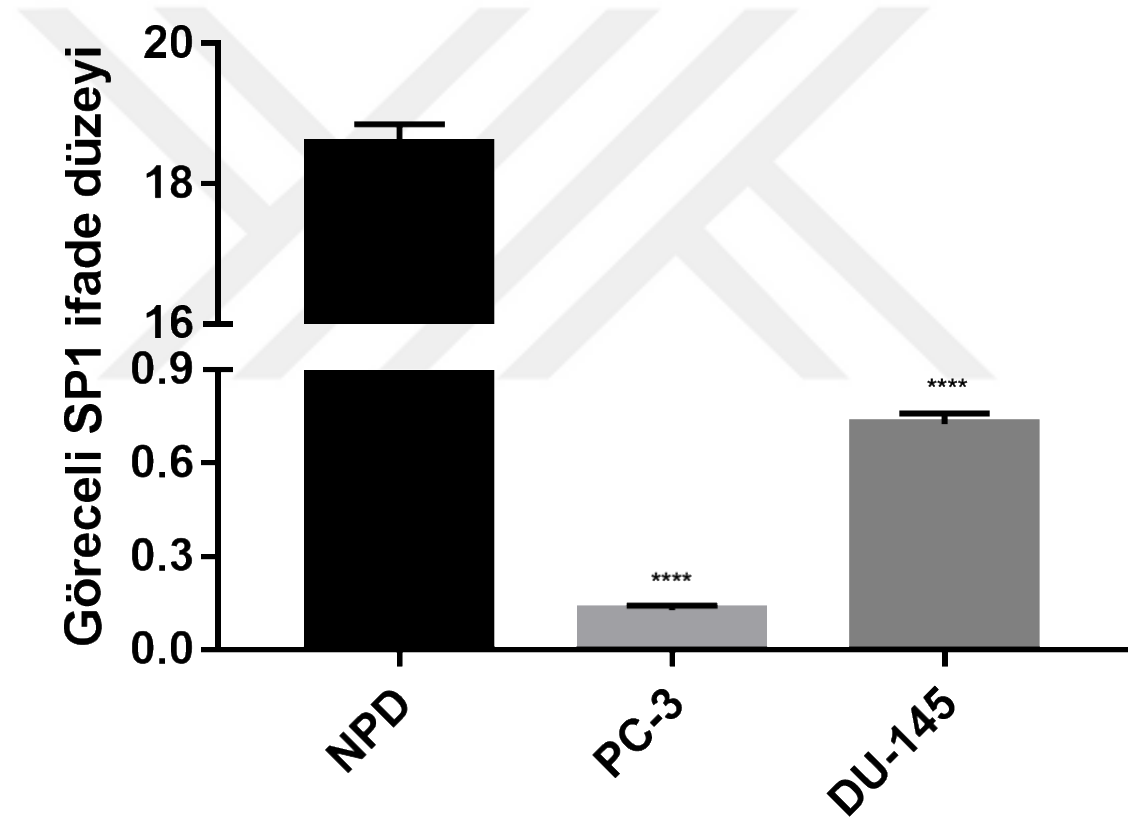


Şekil 4.27. RAF1 geninin normal prostat doku (NPD) ve PC-3, DU-145 prostat kanser hücre hatlarında ifade seviyesi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (**** $p<0,0001$).

4.5.17. SP1 Geninin Prostat Kanserindeki İfade Seviyesi

SP1 geninin prostat kanserindeki ifade seviyesini belirlemek için sağlıklı prostat doku ve prostat kanser hücre hatları olan PC-3 ve DU-145 kullanılarak qRT-PCR yöntemi gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizlerde prostat kanserinde SP1 geninin düzensiz ifadeye sahip olduğu saptanmıştır.

SP1 geninin, PC-3 ve DU-145 prostat kanser hücre hatlarında, normal prostat dokuya kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük ifade seviyesine sahip olduğu bulunmuştur (p değerleri, PC-3 için $p<0,0001$, DU-145 için $p<0,0001$) (Şekil 4.28).

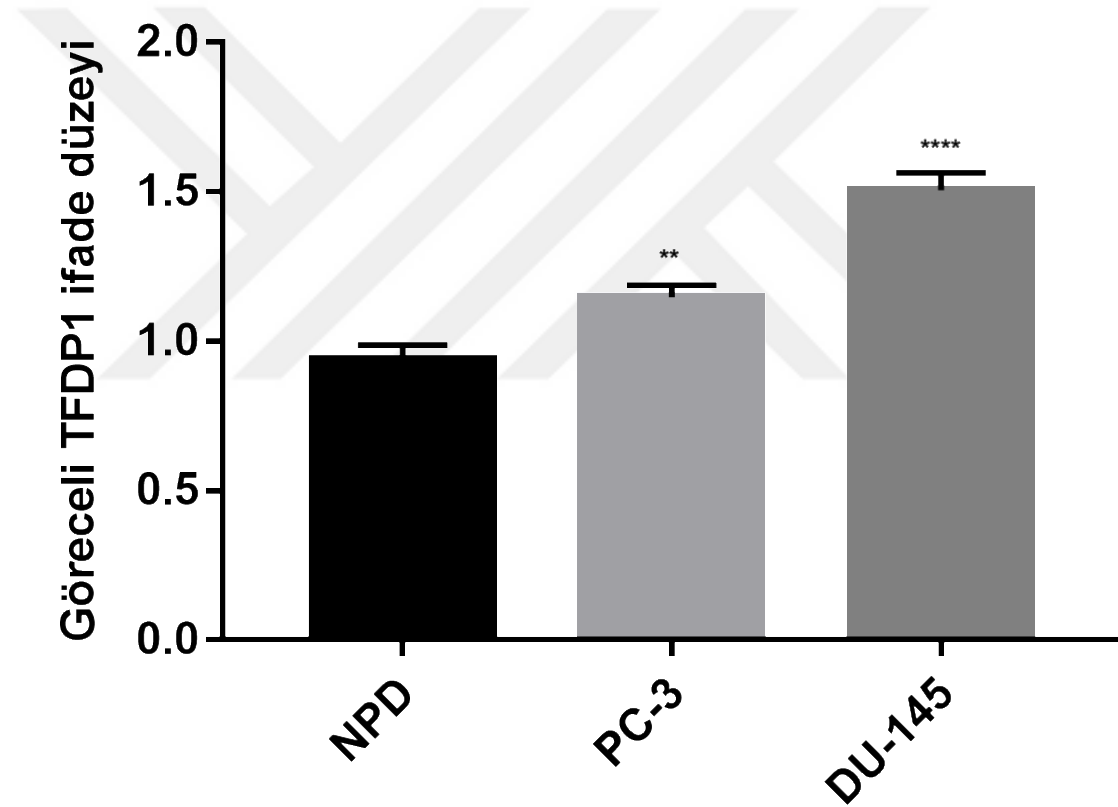


Şekil 4.28. SP1 geninin normal prostat doku (NPD) ve PC-3, DU-145 prostat kanser hücre hatlarında ifade seviyesi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (**** $p<0,0001$).

4.5.18. TFDP1 Geninin Prostat Kanserindeki İfade Seviyesi

TFDP1 geninin prostat kanserindeki ifade seviyesini belirlemek için sağlıklı prostat doku ve prostat kanser hücre hatları olan PC-3 ve DU-145 kullanılarak qRT-PCR yöntemi gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizlerde prostat kanserinde TFDP1 geninin düzensiz ifadeye sahip olduğu saptanmıştır.

TFDP1 geninin ifade seviyesinin PC-3 ve DU-145 prostat kanser hücre hatlarında, normal prostat dokuya kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı bulunmuştur (p değerleri, PC-3 için $p=0,0053$, DU-145 için $p<0,0001$) (Şekil 4.29).



Şekil 4.29. TFDP1 geninin normal prostat doku (NPD) ve PC-3, DU-145 prostat kanser hücre hatlarında ifade seviyesi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (** $p<0,01$; **** $p<0,0001$).

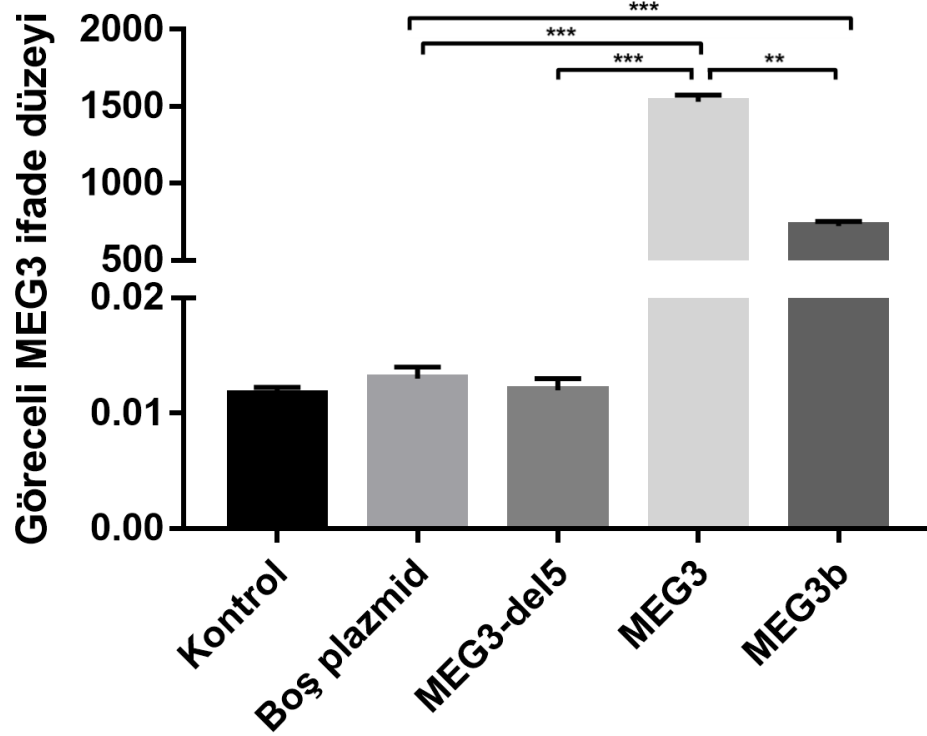
4.6. MEG3 ve MEG3b Plazmid Transfeksiyonu

LncRNA MEG3'ün ifade düzeyinin prostat kanser hücrelerindeki etkisini araştırmak için, PC-3 ve DU 145 hücre hatlarına plazmid transfeksiyonu gerçekleştirilmiştir. Prostat kanser hücrelerine MEG3 plazmidi ile birlikte MEG3 izoformu olan MEG3b plazmidi de transfeke edilerek MEG3 geninin ifade seviyesi arttırılmıştır. MEG3 ve MEG3b genleri farklı birer ekzon içermektedir. Bu nedenle MEG3b'nin farklı iki ve üç boyutlu katlanma motifleri nedeniyle prostat kanser hücrelerinin çoğalması ve migrasyonundaki etkisi araştırıldı.

Aynı zamanda MEG3b ifade artışının RB1 ve onun hedef genlerinin ifadeleri üzerindeki etkisi de araştırıldı. Çalışmamızda MEG3 geninin kontrolü olarak MEG3-del5 plazmidi kullanılmıştır. MEG3-del5, MEG3 geninin ilk 450 bazlık kısmını içermeyip geri kalan dizisini içeren plazmidtir. Boş plazmid ise hem MEG3 hem de MEG3b ifade kıyaslaması için prostat kanser hücrelerine transfeke edilmiştir.

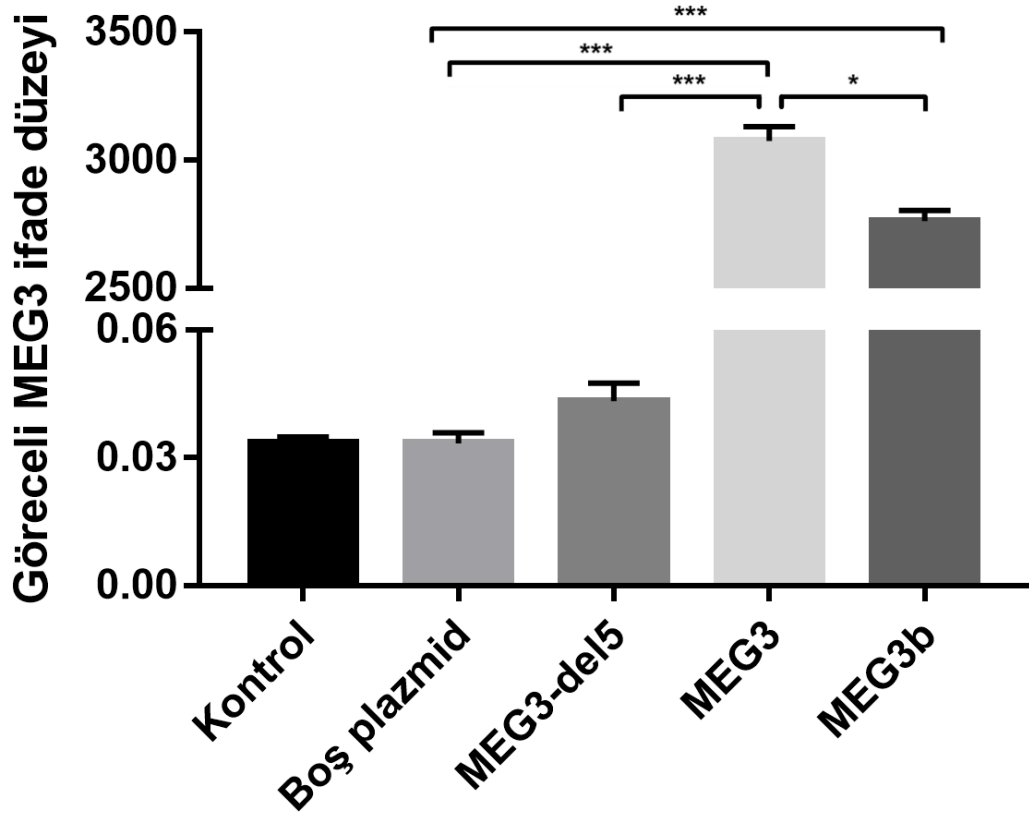
Elde edilen sonuçlara göre PC-3 prostat kanser hücrelerinde MEG3 gen ifadesi boş plazmide kıyasla anlamlı bir şekilde artmıştır ($p<0,0001$). Aynı şekilde MEG3 ifadesi, MEG3-del5 transfeke edilen hücrelere kıyasla anlamlı bir şekilde artmıştır ($p<0,0001$). MEG3 geninin ifade seviyesinin MEG3b plazmidi verilen hücrelerde boş plazmid verilen hücrelere göre anlamlı bir şekilde arttığı bulunmuştur ($p<0,0001$).

MEG3 geninin, MEG3b plazmidi verilen hücrelerde MEG3 plazmidi verilen hücrelere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük ifadeye sahip olduğu tespit edilmiştir ($p=0,0020$). Sonuç olarak lncRNA MEG3, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonu gerçekleştirilen hücrelerde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde aşırı ifadelenmiştir (Şekil 4.30).



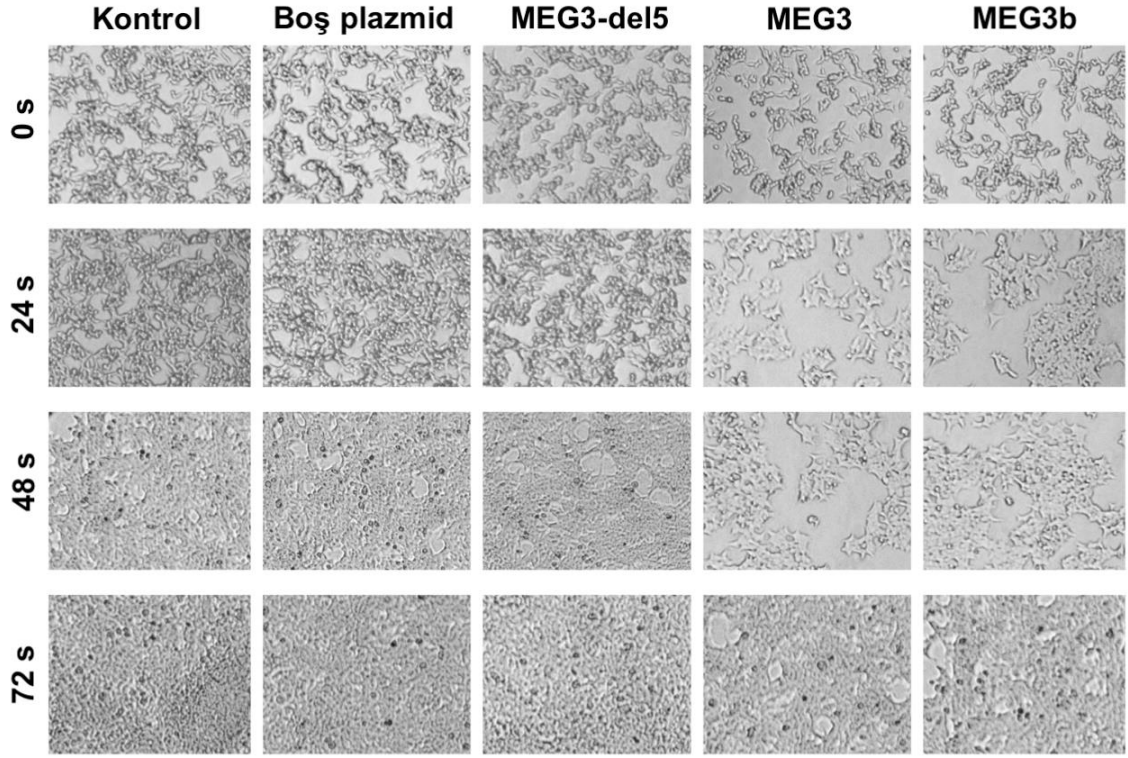
Şekil 4.30. PC-3 prostat kanser hücrelerinde MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonu sonrası MEG3 ifade değişimi. Kontrol; Uygulama yapılmamış, boş plazmid; MEG3 genini içermeyen boş plazmid, MEG3-del5; MEG3 geninin ilk 450 bazlık bölgesinin delesyona uğramış halini içeren plazmid, MEG3; MEG3 genini içeren plazmid, MEG3b; MEG3 izoformunu olan MEG3b genini içeren plazmid.

Elde edilen sonuçlara göre DU 145 prostat kanser hücrelerinde MEG3 gen ifadesi boş plazmide kıyasla anlamlı bir şekilde artmıştır ($p < 0,0001$). Aynı şekilde MEG3 ifadesi, MEG3-del5 transfekte edilen hücelere kıyasla anlamlı bir şekilde artmıştır ($p < 0,0001$). MEG3 geninin ifade seviyesinin MEG3b plazmidi verilen hücelerde boş plazmid verilen hücelere göre anlamlı bir şekilde arttığı bulunmuştur ($p < 0,0001$). MEG3 geninin, MEG3b plazmidi verilen hücelerde MEG3 plazmidi verilen hücelere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük ifadeye sahip olduğu tespit edilmiştir ($p = 0,0158$). Sonuç olarak lncRNA MEG3, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonu gerçekleştirilen hücelerde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde aşırı ifadelenmiştir (Şekil 4.31).



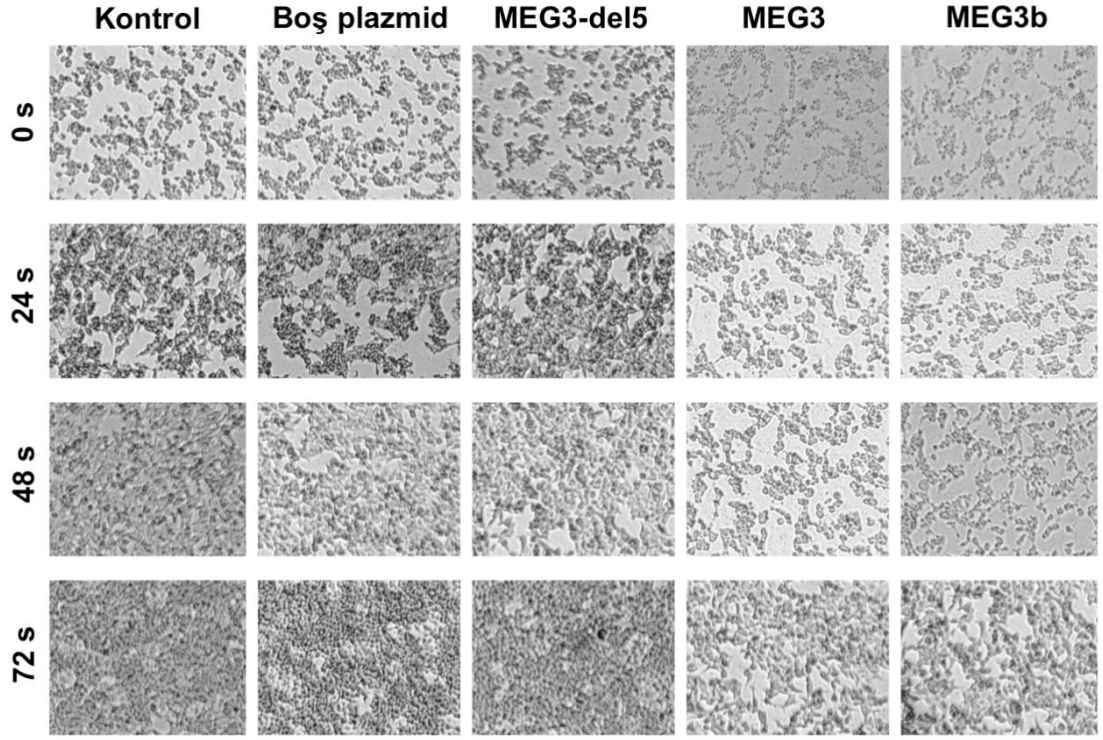
Şekil 4.31. DU 145 prostat kanser hücrelerinde MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonu sonrası MEG3 ifade değişimi. Kontrol; Uygulama yapılmamış, boş plazmid; MEG3 genini içermeyen boş plazmid, MEG3-del5; MEG3 geninin ilk 450 bazlık bölgesinin delesyona uğramış halini içeren plazmid, MEG3; MEG3 genini içeren plazmid, MEG3b; MEG3 izoformunu olan MEG3b genini içeren plazmid.

PC-3 prostat kanser hücre hattına, boş plazmid, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b transfeksiyonunun PC-3 hücre morfolojisi üzerindeki etkileri 0, 24, 48 ve 72 saat boyunca görüntülenmiştir. Elde edilen morfolojik görüntüler Şekil 4.32’de verilmiştir. MEG3 ve MEG3b ile transfekte edilen hücre gruplarında kontrol ve boş plazmidle transfekte edilmiş deney gruplarına kıyasla hücre morfolojisi transfeksiyondan sonraki 24 saat içerisinde değişmeye başlamıştır. MEG3-del5 ile transfekte edilen hücre grubunda kontrol ve boş plazmidle transfekte edilmiş deney gruplarına kıyasla hücre morfolojisinde yok denecek kadar az değişim olmuştur. MEG3 ve MEG3b ile transfekte edilen hücre morfolojisi 24-48 saat arasında en fazla değişime uğramıştır.



Şekil 4.32. PC-3 prostat kanser hücre hattına, boş plazmid, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b transfeksiyonunun PC-3 hücre morfolojisi üzerindeki etkisi.

DU-145 prostat kanser hücre hattına, boş plazmid, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b transfeksiyonunun DU-145 hücre morfolojisi üzerindeki etkileri 0, 24, 48 ve 72 saat boyunca görüntülenmiştir. Elde edilen morfolojik görüntüler Şekil 4.33’de verilmiştir. MEG3 ve MEG3b ile transfekte edilen hücre gruplarında kontrol ve boş plazmidle transfekte edilmiş deney gruplarına kıyasla hücre morfolojisi transfeksiyondan sonraki 24 saat içerisinde değişmeye başlamıştır. MEG3-del5 ile transfekte edilen hücre grubunda kontrol ve boş plazmidle transfekte edilmiş deney gruplarına kıyasla hücre morfolojisinde yok denecek kadar az değişim olmuştur. MEG3 ve MEG3b ile transfekte edilen hücre morfolojisi 48-72 saat arasında en fazla değişime uğramıştır.



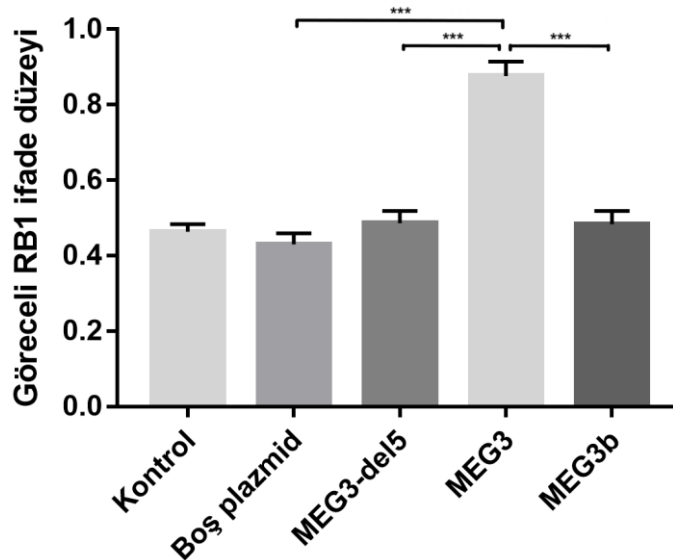
Şekil 4.33. DU 145 prostat kanser hücre hattına, boş plazmid, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b transfeksiyonunun DU 145 hücre morfolojisi üzerindeki etkisi.

Çalışmamızın geri kalan kısmında, MEG3 ifadesi artırılmış hücrelerdeki RB1 ve 17 hedef geninin ifade seviyeleriyle kontrol plazmid verilen hücrelerdeki ifade seviyeleri arasındaki farklılıklar incelenmiştir. Buna göre artmış MEG3 ifadesinin hangi genlerin ifadesi üzerinde etkisi olup olmadığı incelenmiştir. Bununla birlikte, artmış MEG3 ve MEG3b ifadesinin prostat kanser hücrelerinin çoğalması ve migrasyonu üzerindeki etkisi de araştırılmıştır.

4.7. PC-3 Hücre Hattına Plazmid Transfeksiyonu Sonrası RB1 ve Hedef Genlerinin Gen İfade Analizi

4.7.1. RB1

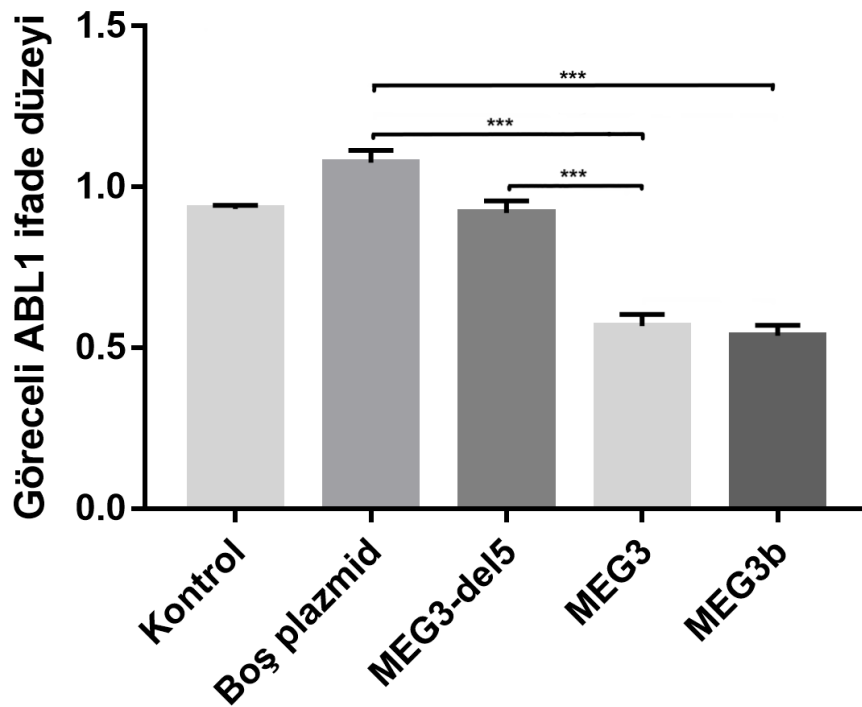
PC-3 prostat kanser hücrelerine MEG3 ve MEG3b plazmidleri uygun koşullarda transfekte edilerek her iki geninin de aşırı ifadelenmesi sağlanmıştır. Daha sonra, artan MEG3 ve MEG3b ifade seviyesinin RB1 gen ifade düzeyi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre PC-3 prostat kanser hücrelerinde RB1 gen ifadesi, MEG3 plazmidi transfekte edilen hücrelerde boş plazmide kıyasla anlamlı bir şekilde artmıştır ($p<0,0001$). Aynı şekilde RB1 ifadesi, MEG3-del5 transfekte edilen hücrelere kıyasla MEG3 plazmidi transfekte edilen hücrelerde anlamlı bir şekilde artmıştır ($p<0,0001$). RB1 geninin ifade seviyesinin MEG3b plazmidi verilen hücrelerde boş plazmid verilen hücrelere göre arttığı bulunmuştur. Ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir. RB1 geninin, MEG3b plazmidi verilen hücrelerde MEG3 plazmidi verilen hücrelere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük ifadeye sahip olduğu tespit edilmiştir ($p<0,0001$). Sonuç olarak RB1 geninin ifade seviyesi, MEG3 plazmid transfeksiyonu gerçekleştirilen hücrelerde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştır (Şekil 4.34).



Şekil 4.34. PC-3 prostat kanser hücrelerinde boş, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları sonrası RB1 geninin göreceli ifade düzeyi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (**** $p<0,001$).

4.7.2. ABL1

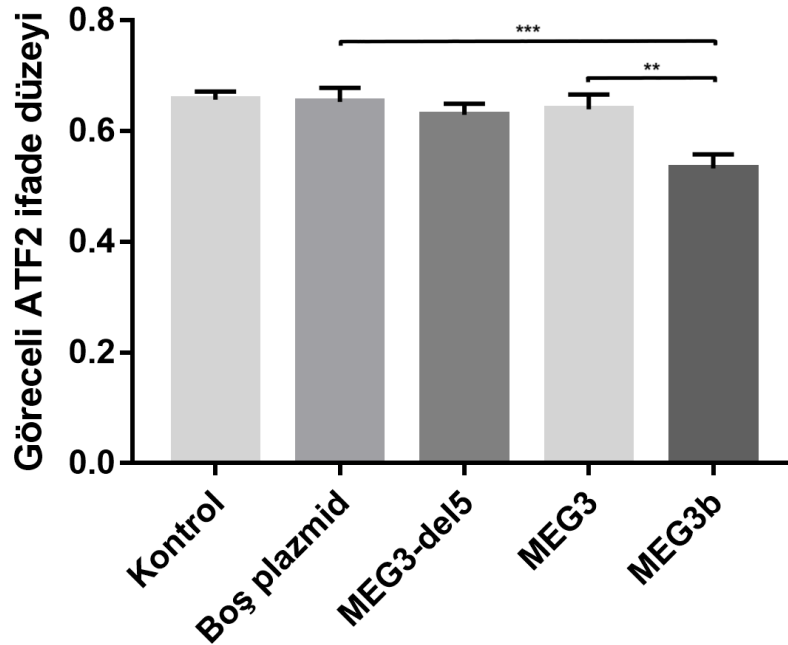
Prostat kanser hücresi olan PC-3 hücrelerinde MEG3 ve onun izoformu olan MEG3b genlerinin ifadeleri plazmid transfeksiyonu aracılığıyla artırılmış ve artan MEG3 ve MEG3b ifade seviyesinin ABL1 gen ifade düzeyi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre PC-3 prostat kanser hücrelerinde ABL1 gen ifadesi, MEG3 plazmidi transfekte edilen hücrelerde boş plazmide kıyasla anlamlı bir şekilde azalmıştır ($p<0,0001$). Aynı şekilde ABL1 ifadesi, MEG3-del5 transfekte edilen hücrelere kıyasla MEG3 plazmidi transfekte edilen hücrelerde anlamlı bir şekilde azalmıştır ($p<0,0001$). ABL1 geninin ifade seviyesinin, MEG3b plazmidi verilen hücrelerde de boş plazmid verilen hücrelere göre anlamlı bir şekilde azaldığı bulunmuştur ($p<0,0001$). Ancak ABL1 geninin ifade düzeyi, MEG3 ve MEG3b plazmidi verilen hücrelerde herhangi bir farklılık göstermemiştir. Sonuç olarak ABL1 geninin ifade seviyesi, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonu gerçekleştirilen hücrelerde kontrol grubu hücrelere göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmıştır (Şekil 4.35).



Şekil 4.35. PC-3 prostat kanser hücrelerinde boş, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları sonrası ABL1 geninin göreceli ifade düzeyi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (** $p<0,001$).

4.7.3. ATF2

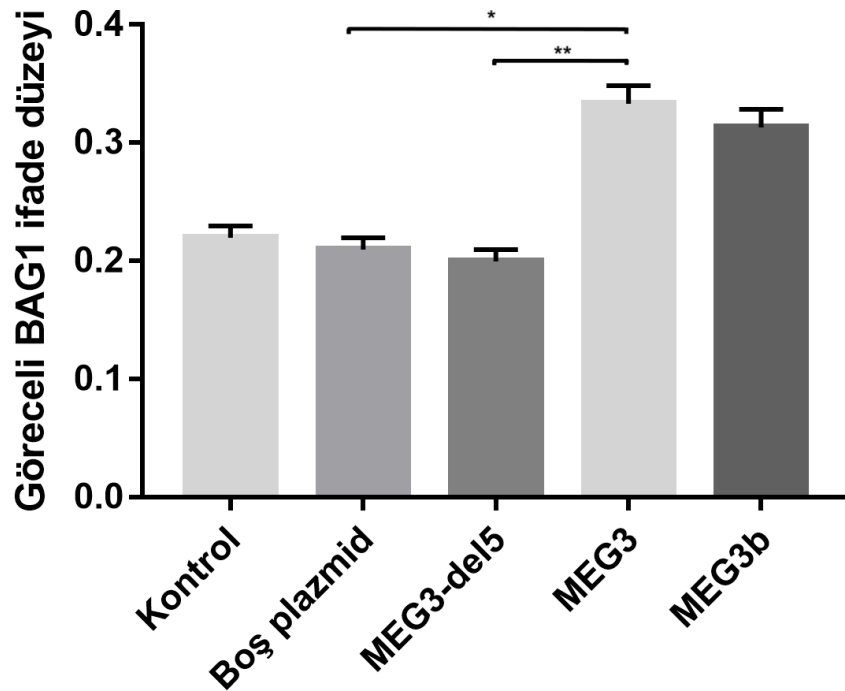
MEG3 ve MEG3b plazmidleri, PC-3 prostat kanser hücrelerine uygun koşullarda transfekte edilerek MEG3 ve MEG3b genlerinin aşırı ifadenmesi sağlanmıştır. Daha sonra, artan MEG3 ve MEG3b ifade seviyesinin ATF2 gen ifade düzeyi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre PC-3 prostat kanser hücrelerinde ATF2 gen ifadesi, MEG3 plazmidi transfekte edilen hücrelerde boş plazmide kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermemiştir. Aynı şekilde ATF2 ifadesi, hem MEG3-del5 transfekte edilen hücrelerde hem de MEG3 plazmidi transfekte edilen hücrelerde aynı seviyededir. ATF2 geninin ifade seviyesinin, MEG3b plazmidi verilen hücrelerde boş plazmid verilen hücrelere göre azaldığı bulunmuştur ($p=0,0005$). ATF2 geninin, MEG3b plazmidi verilen hücrelerde MEG3 plazmidi verilen hücrelere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük ifadeye sahip olduğu tespit edilmiştir ($p=0,0014$). Sonuç olarak ABL1 geninin ifade seviyesi, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonu gerçekleştirilen hücrelerde kontrol grubu hücrelere göre istatistiksel olarak anlamlı bir değişim göstermemiştir (Şekil 4.36).



Şekil 4.36. PC-3 prostat kanser hücrelerinde boş, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları sonrası ATF2 geninin göreceli ifade düzeyi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (** $p<0,01$; *** $p<0,001$).

4.7.4. BAG1

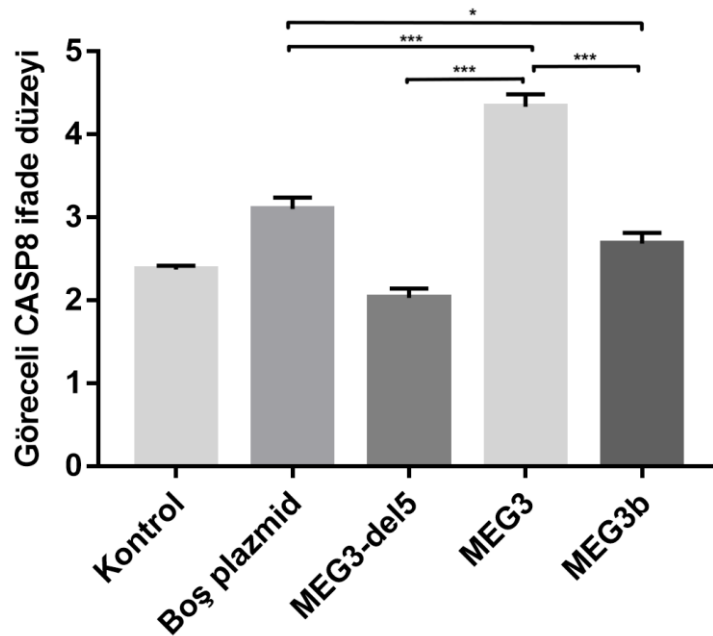
Prostat kanser hücresi olan PC-3 hücrelerinde MEG3 ve onun izoformu olan MEG3b genlerinin ifadeleri plazmid transfeksiyonu aracılığıyla arttırılmış ve artan MEG3 ve MEG3b ifade seviyesinin BAG1 gen ifade düzeyi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre PC-3 prostat kanser hücrelerinde BAG1 gen ifadesi, MEG3 plazmidi transfekte edilen hücrelerde boş plazmide kıyasla anlamlı bir şekilde artmıştır ($p=0,0297$). Benzer şekilde, MEG3-del5 plazmidi transfekte edilen hücrelere göre MEG3 plazmidi transfekte edilen hücrelerdeki BAG1 ifade seviyesindeki artış istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0,0066$). MEG3b plazmidi verilen hücrelerde boş plazmid verilen hücrelere göre BAG1 geninin ifadesi artmıştır ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir. Ayrıca BAG1 geni, hem MEG3 hem de MEG3b plazmidi transfekte edilen hücrelerde benzer ifade seviyesine sahiptir. Sonuç olarak BAG1 geninin ifade seviyesi, farklı plazmid transfeksiyonları gerçekleştirilen hücrelerde kontrol grubu hücrelere göre istatistiksel olarak anlamlı bir değişim göstermemiştir (Şekil 4.37).



Şekil 4.37. PC-3 prostat kanser hücrelerinde boş, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları sonrası BAG1 geninin göreceli ifade düzeyi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (* $p<0,05$; ** $p<0,01$).

4.7.5. CASP8

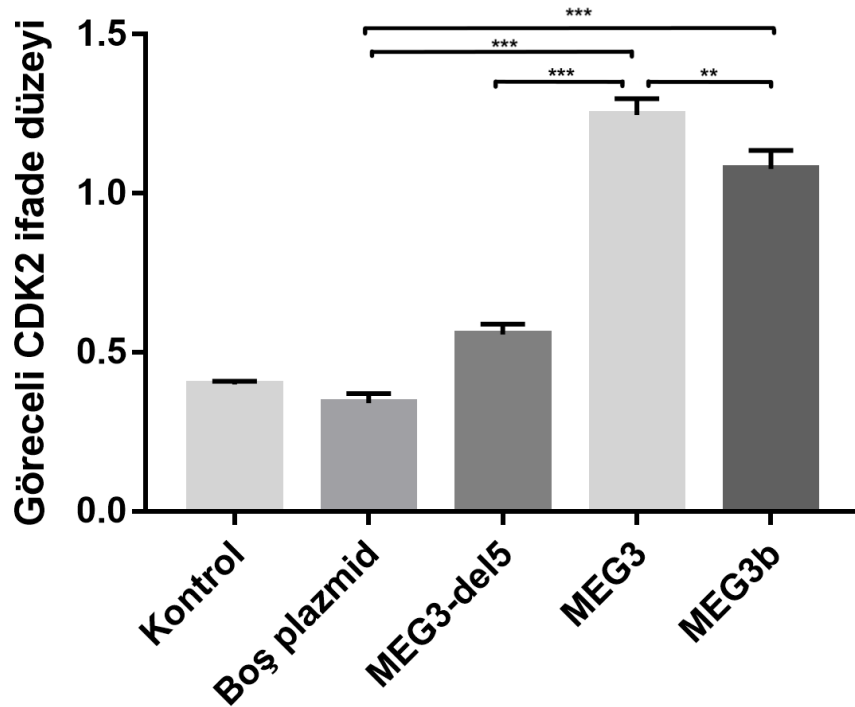
PC-3 prostat kanser hücrelerine MEG3 ve MEG3b plazmidleri uygun koşullarda transfekte edilerek her iki geninin de aşırı ifadenmesi sağlanmıştır. Daha sonra, artan MEG3 ve MEG3b ifade seviyesinin CASP8 gen ifade düzeyi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre PC-3 prostat kanser hücrelerinde CASP8 gen ifadesi, MEG3 plazmidi transfekte edilen hücrelerde boş plazmide kıyasla anlamlı bir şekilde artmıştır ($p<0,0001$). Aynı şekilde CASP8 ifadesi, MEG3-del5 transfekte edilen hücrelere kıyasla MEG3 plazmidi transfekte edilen hücrelerde anlamlı bir şekilde artmıştır ($p<0,0001$). CASP8 geninin ifade seviyesinin, MEG3b plazmidi verilen hücrelerde boş plazmid verilen hücrelere göre azalması istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0,0116$). Ayrıca CASP8 geninin, MEG3b plazmidi verilen hücrelerde MEG3 plazmidi verilen hücrelere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük ifadeye sahip olduğu tespit edilmiştir ($p<0,0001$). Sonuç olarak CASP8 geninin ifade seviyesi, MEG3 plazmid transfeksiyonu gerçekleştirilen hücrelerde hem boş plazmid hem de MEG3-del5 plazmidi transfekte edilen hücrelere göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştır (Şekil 4.38).



Şekil 4.38. PC-3 prostat kanser hücrelerinde boş, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları sonrası CASP8 geninin göreceli ifade düzeyi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (* $p<0,05$; *** $p<0,001$).

4.7.6. CDK2

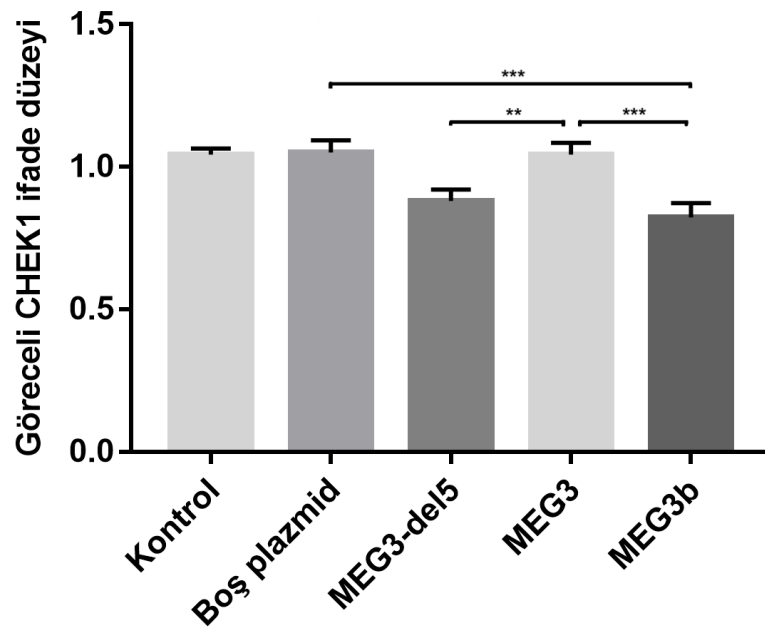
Prostat kanser hücresi olan PC-3 hücrelerinde MEG3 ve onun izoformu olan MEG3b genlerinin ifadeleri plazmid transfeksiyonu aracılığıyla arttırılmış ve artan MEG3 ve MEG3b ifade seviyesinin CDK2 gen ifade düzeyi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre PC-3 prostat kanser hücrelerinde CDK2 gen ifadesi, MEG3 plazmidi transfekte edilen hücrelerde boş plazmide kıyasla anlamlı bir şekilde artmıştır ($p<0,0001$). Aynı şekilde CDK2 ifadesi, MEG3-del5 transfekte edilen hücrelere kıyasla MEG3 plazmidi transfekte edilen hücrelerde anlamlı bir şekilde artmıştır ($p<0,0001$). Ayrıca CDK2 geninin ifade seviyesinin, MEG3b plazmidi verilen hücrelerde de boş plazmid verilen hücrelere göre anlamlı bir şekilde arttığı bulunmuştur ($p<0,0001$). CDK2 geninin, MEG3b plazmidi verilen hücrelerde MEG3 plazmidi verilen hücrelere göre azalması istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0,0030$). Sonuç olarak CDK2 geninin ifade seviyesi, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları gerçekleştirilen hücrelerde kontrol grubu hücrelere göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştır (Şekil 4.39).



Şekil 4.39. PC-3 prostat kanser hücrelerinde boş, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları sonrası CDK2 geninin göreceli ifade düzeyi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (** $p<0,01$; *** $p<0,001$).

4.7.7. CHEK1

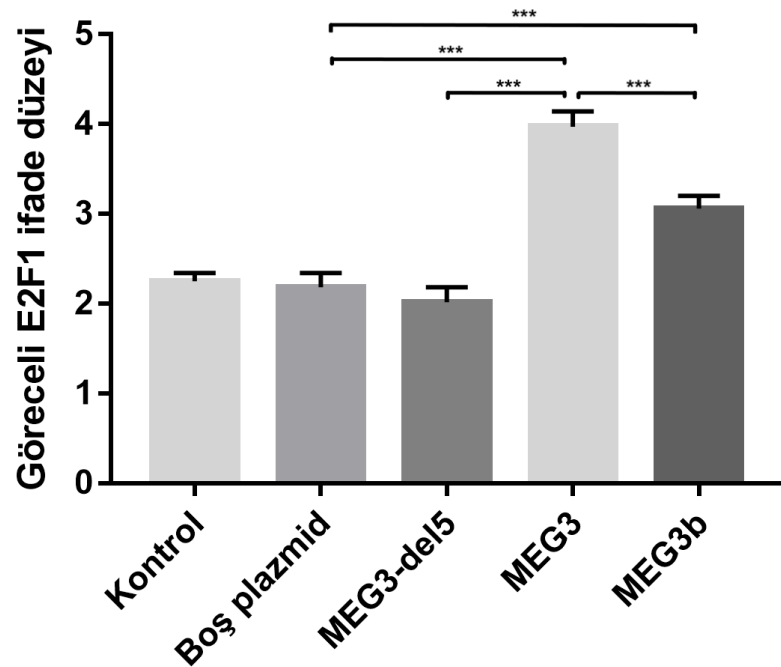
MEG3 ve MEG3b plazmidleri, PC-3 prostat kanser hücrelerine uygun koşullarda transfekte edilerek MEG3 ve MEG3b genlerinin aşırı ifadenmesi sağlanmıştır. Daha sonra, artan MEG3 ve MEG3b ifade seviyesinin CHEK1 gen ifade düzeyi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre PC-3 prostat kanser hücrelerinde CHEK1 gen ifadesi, MEG3 plazmidi transfekte edilen hücrelerde boş plazmide kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermemiştir. Ancak CHEK1 ifadesi seviyesinin, MEG3-del5 transfekte edilen hücrelere göre MEG3 plazmidi transfekte edilen hücrelerde azalması istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0,0041$). Bununla birlikte CHEK1 geninin ifade seviyesinin MEG3b plazmidi verilen hücrelerde boş plazmid verilen hücrelere göre anlamlı bir şekilde azaldığı bulunmuştur ($p=0,0003$). Ayrıca CHEK1 geninin, MEG3b plazmidi verilen hücrelerde MEG3 plazmidi verilen hücrelere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük ifadeye sahip olduğu tespit edilmiştir ($p=0,0004$). Sonuç olarak CHEK1 geninin ifade seviyesi, MEG3b plazmid transfeksiyonu gerçekleştirilen hücrelerde kontrol grubu hücrelere göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmıştır (Şekil 4.40).



Şekil 4.40. PC-3 prostat kanser hücrelerinde boş, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları sonrası CHEK1 geninin göreceli ifade düzeyi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (** $p<0,01$; *** $p<0,001$).

4.7.8. E2F1

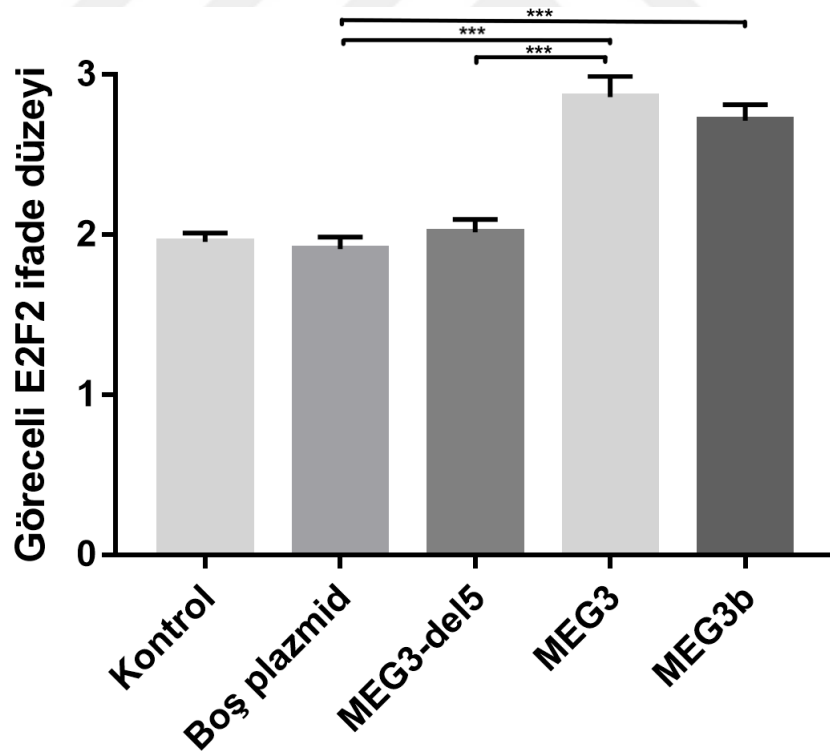
PC-3 prostat kanser hücrelerine MEG3 ve MEG3b plazmidleri uygun koşullarda transfekte edilerek her iki geninin de aşırı ifadelenmesi sağlanmıştır. Daha sonra, artan MEG3 ve MEG3b ifade seviyesinin E2F1 gen ifade düzeyi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre PC-3 prostat kanser hücrelerinde E2F1 gen ifadesi, MEG3 plazmidi transfekte edilen hücrelerde boş plazmide kıyasla anlamlı bir şekilde artmıştır ($p<0,0001$). Aynı şekilde E2F1 ifadesi, MEG3-del5 transfekte edilen hücrelere kıyasla MEG3 plazmidi transfekte edilen hücrelerde anlamlı bir şekilde artmıştır ($p=0,0002$). Bununla birlikte E2F1 geninin ifade seviyesinin MEG3b plazmidi verilen hücrelerde boş plazmid verilen hücrelere göre anlamlı bir şekilde arttığı bulunmuştur ($p<0,0001$). Ayrıca E2F1 geninin, MEG3b plazmidi verilen hücrelerde MEG3 plazmidi verilen hücrelere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük ifadeye sahip olduğu tespit edilmiştir ($p=0,0002$). Sonuç olarak E2F1 geninin ifade seviyesi, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları gerçekleştirilen hücrelerde kontrol grubu hücrelere göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştır (Şekil 4.41).



Şekil 4.41. PC-3 prostat kanser hücrelerinde boş, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları sonrası E2F1 geninin göreceli ifade düzeyi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (** $p<0,001$).

4.7.9. E2F2

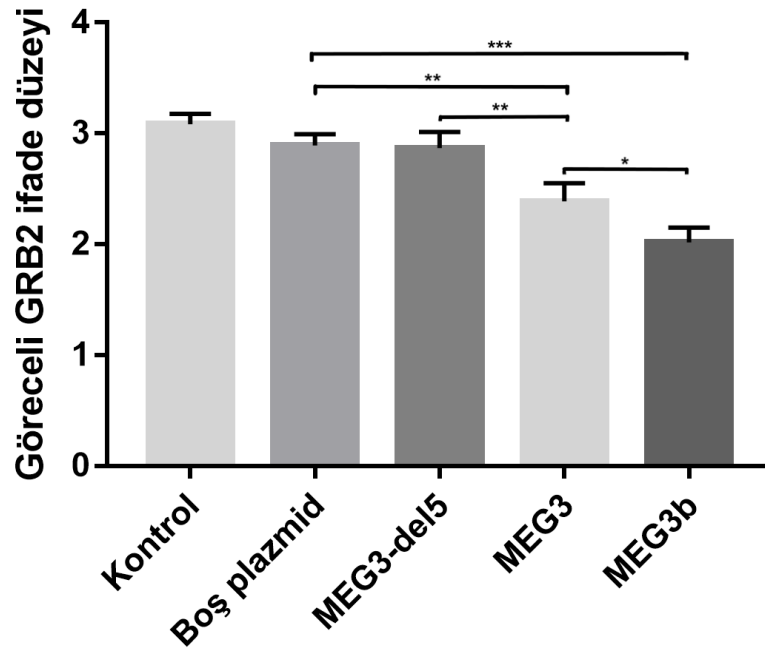
Prostat kanser hücresi olan PC-3 hücrelerinde MEG3 ve onun izoformu olan MEG3b genlerinin ifadeleri plazmid transfeksiyonu aracılığıyla arttırılmış ve artan MEG3 ve MEG3b ifade seviyesinin E2F2 gen ifade düzeyi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre PC-3 prostat kanser hücrelerinde E2F2 gen ifadesi, MEG3 plazmidi transfekte edilen hücrelerde boş plazmide kıyasla anlamlı bir şekilde artmıştır ($p<0,0001$). Aynı şekilde E2F2 ifadesi, MEG3-del5 transfekte edilen hücrelere kıyasla MEG3 plazmidi transfekte edilen hücrelerde anlamlı bir şekilde artmıştır ($p<0,0001$). Ayrıca E2F2 geninin ifade seviyesinin, MEG3b plazmidi verilen hücrelerde de boş plazmid verilen hücrelere göre anlamlı bir şekilde arttığı bulunmuştur ($p<0,0001$). Ancak E2F2 geninin ifade düzeyinin, MEG3b plazmidi verilen hücrelerde MEG3 plazmidi verilen hücrelere göre azalması istatistiksel olarak anlamlı değildir. Sonuç olarak E2F2 geninin ifade seviyesi, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları gerçekleştirilen hücrelerde kontrol grubu hücrelere göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştır (Şekil 4.42).



Şekil 4.42. PC-3 prostat kanser hücrelerinde boş, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları sonrası E2F2 geninin göreceli ifade düzeyi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (** $p<0,001$).

4.7.10. GRB2

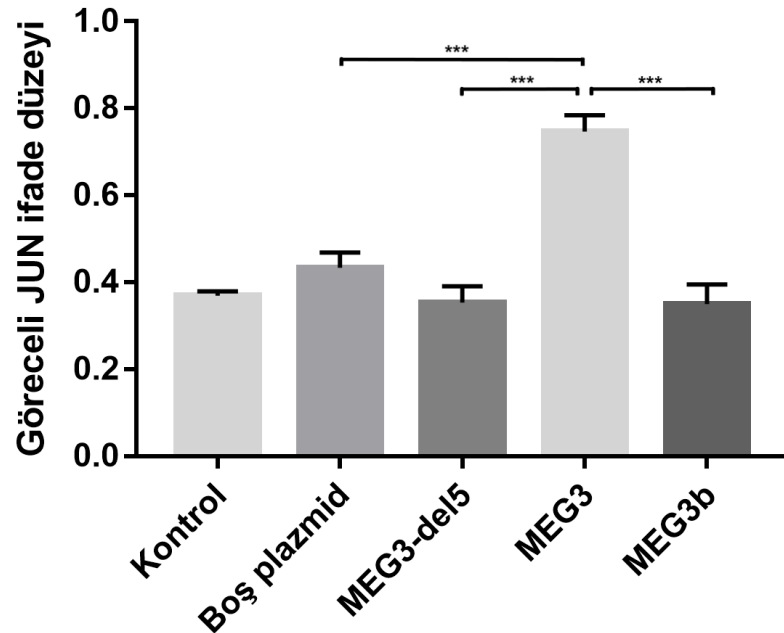
MEG3 ve MEG3b plazmidleri, PC-3 prostat kanser hücrelerine uygun koşullarda transfekte edilerek MEG3 ve MEG3b genlerinin aşırı ifadenmesi sağlanmıştır. Daha sonra, artan MEG3 ve MEG3b ifade seviyesinin GRB2 gen ifade düzeyi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre PC-3 prostat kanser hücrelerinde GRB2 gen ifadesi, MEG3 plazmidi transfekte edilen hücrelerde boş plazmide kıyasla anlamlı bir şekilde azalmıştır ($p=0,0059$). Aynı şekilde GRB2 ifadesi, MEG3-del5 transfekte edilen hücrelere kıyasla MEG3 plazmidi transfekte edilen hücrelerde anlamlı bir şekilde azalmıştır ($p=0,0077$). Ayrıca GRB2 geninin ifade seviyesinin, MEG3b plazmidi verilen hücrelerde de boş plazmid verilen hücrelere göre anlamlı bir şekilde azaldığı bulunmuştur ($p<0,0001$). GRB2 geninin ifade düzeyinin, MEG3b plazmidi verilen hücrelerde MEG3 plazmidi verilen hücrelere göre azalışı istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0,0389$). Sonuç olarak GRB2 geninin ifade seviyesi, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları gerçekleştirilen hücrelerde kontrol grubu hücrelere göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştır (Şekil 4.43).



Şekil 4.43. PC-3 prostat kanser hücrelerinde boş, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları sonrası GRB2 geninin göreceli ifade düzeyi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$).

4.7.11. JUN

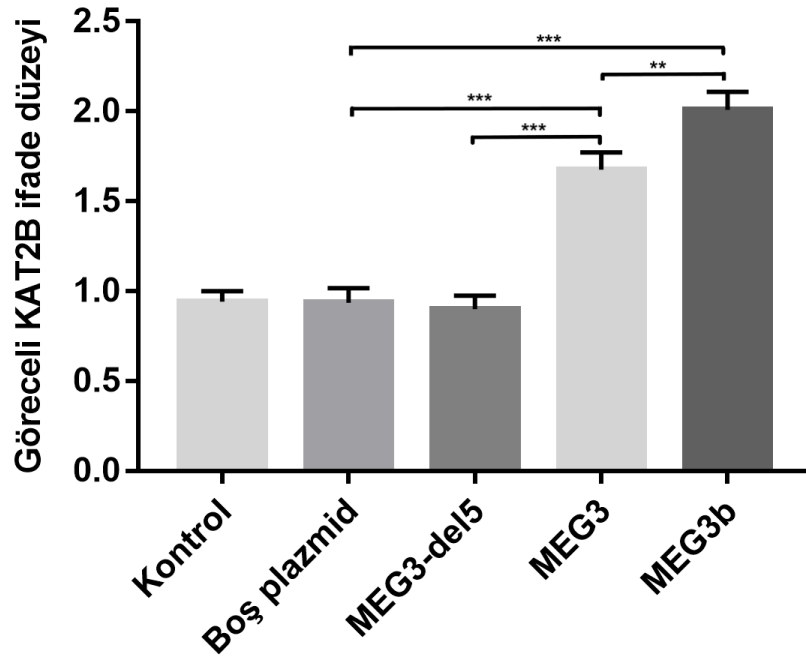
PC-3 prostat kanser hücrelerine MEG3 ve MEG3b plazmidleri uygun koşullarda transfekte edilerek her iki geninin de aşırı ifadenmesi sağlanmıştır. Daha sonra, artan MEG3 ve MEG3b ifade seviyesinin JUN gen ifade düzeyi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre PC-3 prostat kanser hücrelerinde JUN gen ifadesi, MEG3 plazmidi transfekte edilen hücrelerde boş plazmide kıyasla anlamlı bir şekilde artmıştır ($p<0,0001$). Aynı şekilde JUN ifadesi, MEG3-del5 transfekte edilen hücrelere kıyasla MEG3 plazmidi transfekte edilen hücrelerde anlamlı bir şekilde artmıştır ($p<0,0001$). Ancak JUN geninin ifade seviyesinin, MEG3b plazmidi verilen hücrelerde boş plazmid verilen hücrelere göre azalması istatistiksel olarak anlamlı değildir. Ayrıca JUN geninin, MEG3b plazmidi verilen hücrelerde MEG3 plazmidi verilen hücrelere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük ifadeye sahip olduğu tespit edilmiştir ($p<0,0001$). Sonuç olarak JUN geninin ifade seviyesi, MEG3 plazmid transfeksiyonu gerçekleştirilen hücrelerde hem boş plazmid hem de MEG3-del5 plazmidi transfekte edilen hücrelere göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştır (Şekil 4.44).



Şekil 4.44. PC-3 prostat kanser hücrelerinde boş, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları sonrası JUN geninin göreceli ifade düzeyi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (***) $p<0,001$).

4.7.12. KAT2B

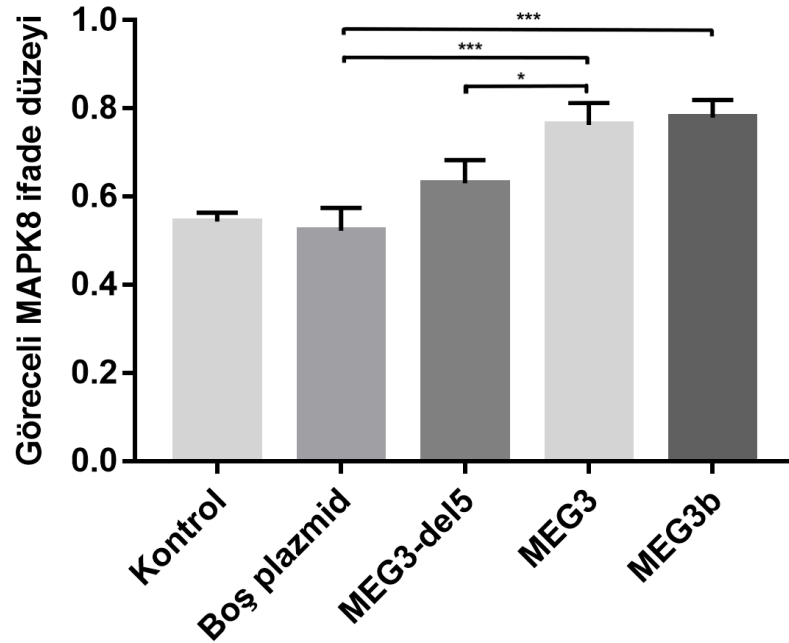
Prostat kanser hücresi olan PC-3 hücrelerinde MEG3 ve onun izoformu olan MEG3b genlerinin ifadeleri plazmid transfeksiyonu aracılığıyla arttırılmış ve artan MEG3 ve MEG3b ifade seviyesinin KAT2B gen ifade düzeyi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre PC-3 prostat kanser hücrelerinde KAT2B gen ifadesi, MEG3 plazmidi transfekte edilen hücrelerde boş plazmide kıyasla anlamlı bir şekilde artmıştır ($p<0,0001$). Aynı şekilde KAT2B ifadesi, MEG3-del5 transfekte edilen hücrelere kıyasla MEG3 plazmidi transfekte edilen hücrelerde anlamlı bir şekilde artmıştır ($p<0,0001$). Bununla birlikte KAT2B geninin ifade seviyesinin MEG3b plazmidi verilen hücrelerde boş plazmid verilen hücrelere göre anlamlı bir şekilde arttığı bulunmuştur ($p<0,0001$). Ayrıca KAT2B geninin, MEG3b plazmidi verilen hücrelerde MEG3 plazmidi verilen hücrelere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek ifadeye sahip olduğu tespit edilmiştir ($p=0,0042$). Sonuç olarak KAT2B geninin ifade seviyesi, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları gerçekleştirilen hücrelerde kontrol grubu hücrelere göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştır (Şekil 4.45).



Şekil 4.45. PC-3 prostat kanser hücrelerinde boş, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları sonrası KAT2B geninin göreceli ifade düzeyi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (** $p<0,01$; *** $p<0,001$).

4.7.13. MAPK8

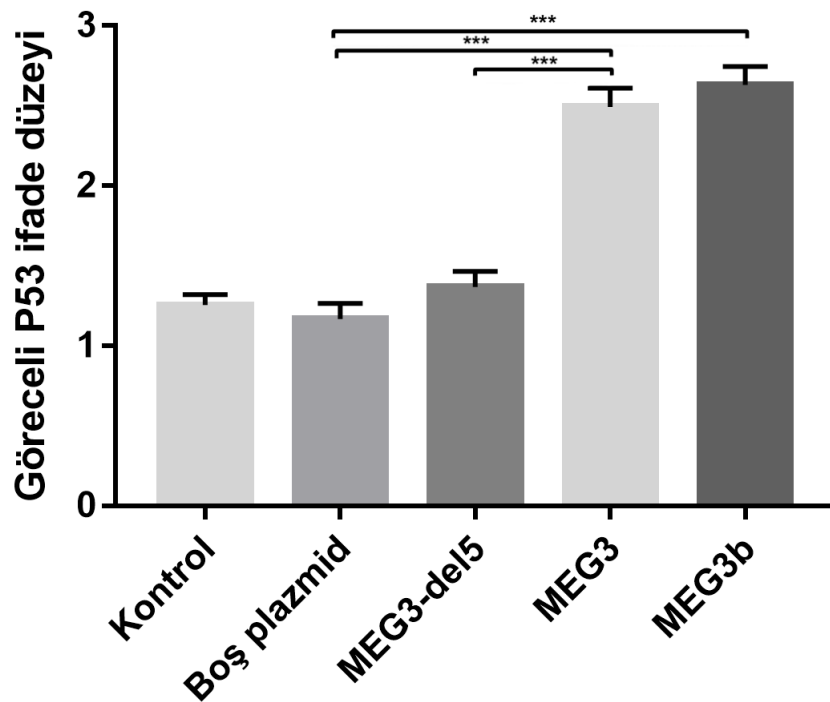
MEG3 ve MEG3b plazmidleri, PC-3 prostat kanser hücrelerine uygun koşullarda transfekte edilerek MEG3 ve MEG3b genlerinin aşırı ifadenmesi sağlanmıştır. Daha sonra, artan MEG3 ve MEG3b ifade seviyesinin MAPK8 gen ifade düzeyi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre PC-3 prostat kanser hücrelerinde MAPK8 gen ifadesi, MEG3 plazmidi transfekte edilen hücrelerde boş plazmide kıyasla anlamlı bir şekilde artmıştır ($p=0,0004$). Aynı şekilde MAPK8 ifadesi, MEG3-del5 transfekte edilen hücrelere kıyasla MEG3 plazmidi transfekte edilen hücrelerde anlamlı bir şekilde artmıştır ($p=0,0278$). Ayrıca MAPK8 geninin ifade seviyesinin, MEG3b plazmidi verilen hücrelerde de boş plazmid verilen hücrelere göre anlamlı bir şekilde arttığı bulunmuştur ($p=0,0003$). Ancak MAPK8 geninin ifade düzeyinin, MEG3b plazmidi verilen hücrelerde MEG3 plazmidi verilen hücrelere göre artışı istatistiksel olarak anlamlı değildir. Sonuç olarak MAPK8 geninin ifade seviyesi, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları gerçekleştirilen hücrelerde kontrol grubu hücrelere göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştır (Şekil 4.46).



Şekil 4.46. PC-3 prostat kanser hücrelerinde boş, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları sonrası MAPK8 geninin göreceli ifade düzeyi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (* $p<0,05$; *** $p<0,001$).

4.7.14. P53

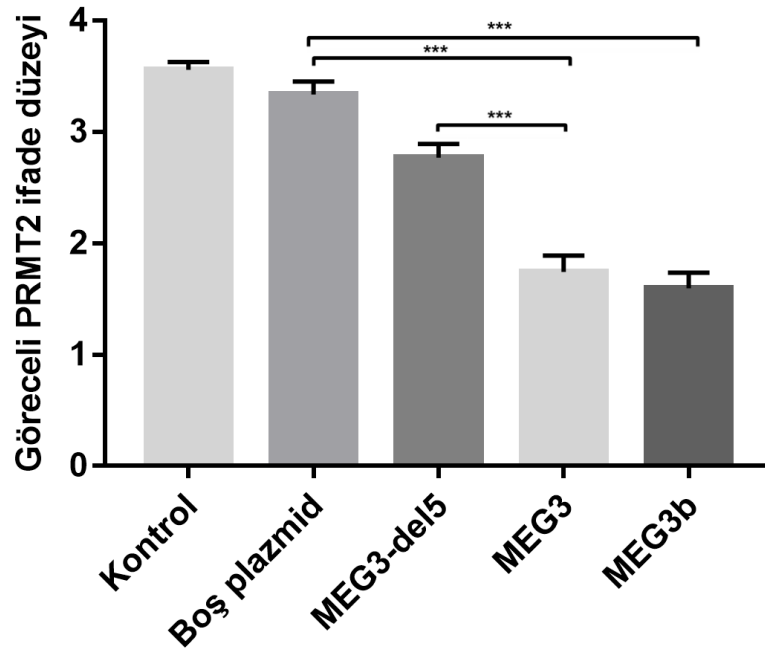
PC-3 prostat kanser hücrelerine MEG3 ve MEG3b plazmidleri uygun koşullarda transfekte edilerek her iki geninin de aşırı ifadelenmesi sağlanmıştır. Daha sonra, artan MEG3 ve MEG3b ifade seviyesinin P53 gen ifade düzeyi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre PC-3 prostat kanser hücrelerinde P53 gen ifadesi, MEG3 plazmidi transfekte edilen hücrelerde boş plazmide kıyasla anlamlı bir şekilde artmıştır ($p<0,0001$). Aynı şekilde P53 ifadesi, MEG3-del5 transfekte edilen hücrelere kıyasla MEG3 plazmidi transfekte edilen hücrelerde anlamlı bir şekilde artmıştır ($p<0,0001$). Ayrıca P53 geninin ifade seviyesinin, MEG3b plazmidi verilen hücrelerde de boş plazmid verilen hücrelere göre anlamlı bir şekilde arttığı bulunmuştur ($p<0,0001$). Ancak P53 geninin ifade düzeyinin, MEG3b plazmidi verilen hücrelerde MEG3 plazmidi verilen hücrelere göre artışı istatistiksel olarak anlamlı değildir. Sonuç olarak P53 geninin ifade seviyesi, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları gerçekleştirilen hücrelerde kontrol grubu hücrelere göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştır (Şekil 4.47).



Şekil 4.47. PC-3 prostat kanser hücrelerinde boş, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları sonrası P53 geninin göreceli ifade düzeyi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (** $p<0,001$).

4.7.15. PRMT2

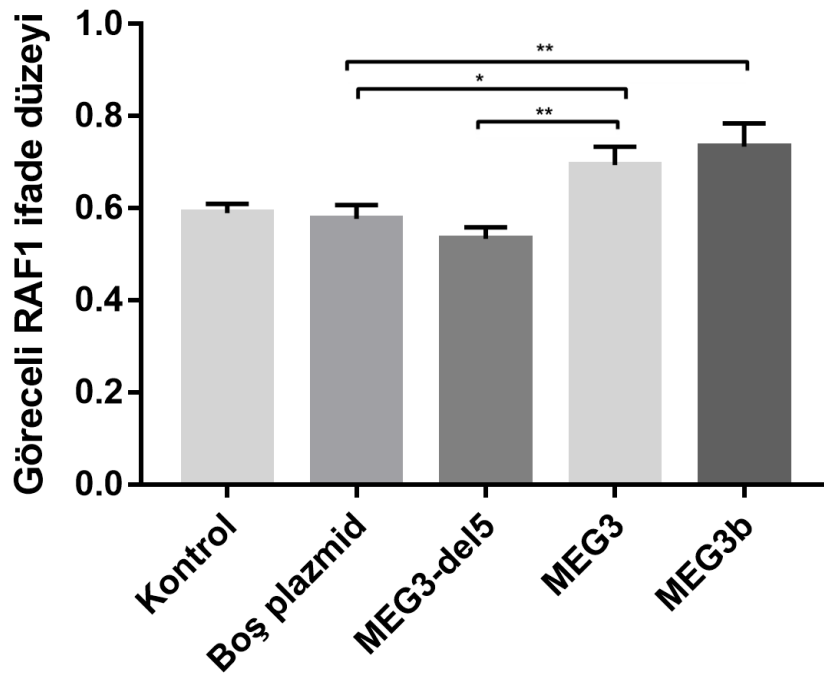
Prostat kanser hücresi olan PC-3 hücrelerinde MEG3 ve onun izoformu olan MEG3b genlerinin ifadeleri plazmid transfeksiyonu aracılığıyla arttırılmış ve artan MEG3 ve MEG3b ifade seviyesinin PRMT2 gen ifade düzeyi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre PC-3 prostat kanser hücrelerinde PRMT2 gen ifadesi, MEG3 plazmidi transfekte edilen hücrelerde boş plazmide kıyasla anlamlı bir şekilde azalmıştır ($p=0,0112$). Aynı şekilde PRMT2 ifadesi, MEG3-del5 transfekte edilen hücrelere kıyasla MEG3 plazmidi transfekte edilen hücrelerde anlamlı bir şekilde azalmıştır ($p=0,0226$). Ayrıca PRMT2 geninin ifade seviyesinin, MEG3b plazmidi verilen hücrelerde de boş plazmid verilen hücrelere göre anlamlı bir şekilde azaldığı bulunmuştur ($p=0,0002$). Ancak PRMT2 geninin ifade düzeyinin, MEG3b plazmidi verilen hücrelerde MEG3 plazmidi verilen hücrelere göre azalışı istatistiksel olarak anlamlı değildir. Sonuç olarak PRMT2 geninin ifade seviyesi, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları gerçekleştirilen hücrelerde kontrol grubu hücrelere göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmıştır (Şekil 4.48).



Şekil 4.48. PC-3 prostat kanser hücrelerinde boş, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları sonrası PRMT2 geninin göreceli ifade düzeyi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (*** $p<0,001$).

4.7.16. RAF1

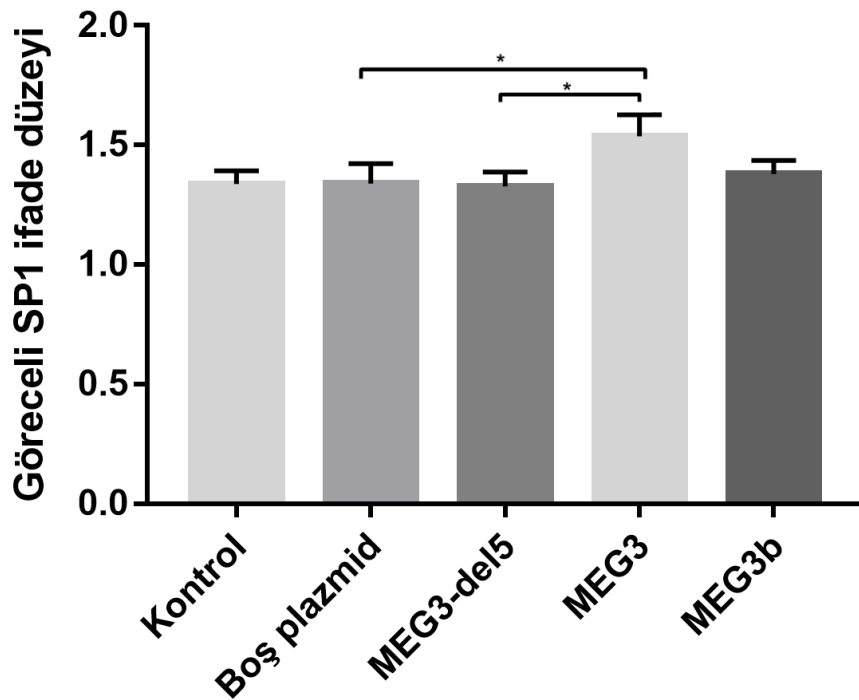
MEG3 ve MEG3b plazmidleri, PC-3 prostat kanser hücrelerine uygun koşullarda transfekte edilerek MEG3 ve MEG3b genlerinin aşırı ifadenmesi sağlanmıştır. Daha sonra, artan MEG3 ve MEG3b ifade seviyesinin RAF1 gen ifade düzeyi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre PC-3 prostat kanser hücrelerinde RAF1 gen ifadesi, MEG3 plazmidi transfekte edilen hücrelerde boş plazmide kıyasla anlamlı bir şekilde artmıştır ($p=0,0156$). Aynı şekilde RAF1 ifadesi, MEG3-del5 transfekte edilen hücrelere kıyasla MEG3 plazmidi transfekte edilen hücrelerde anlamlı bir şekilde artmıştır ($p=0,0018$). Ayrıca RAF1 geninin ifade seviyesinin, MEG3b plazmidi verilen hücrelerde de boş plazmid verilen hücrelere göre anlamlı bir şekilde arttığı bulunmuştur ($p=0,0021$). Ancak RAF1 geninin ifade düzeyinin, MEG3b plazmidi verilen hücrelerde MEG3 plazmidi verilen hücrelere göre artışı istatistiksel olarak anlamlı değildir. Sonuç olarak RAF1 geninin ifade seviyesi, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları gerçekleştirilen hücrelerde kontrol grubu hücrelere göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştır (Şekil 4.49).



Şekil 4.49. PC-3 prostat kanser hücrelerinde boş, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları sonrası RAF1 geninin göreceli ifade düzeyi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (* $p<0,05$; ** $p<0,01$).

4.7.17. SP1

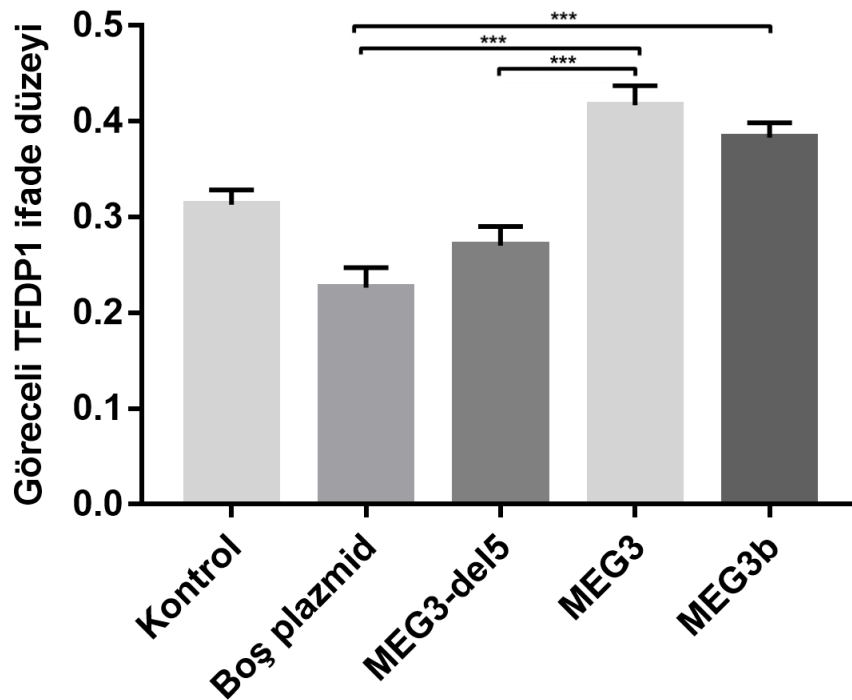
PC-3 prostat kanser hücrelerine MEG3 ve MEG3b plazmidleri uygun koşullarda transfekte edilerek her iki geninin de aşırı ifadenmesi sağlanmıştır. Daha sonra, artan MEG3 ve MEG3b ifade seviyesinin SP1 gen ifade düzeyi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre PC-3 prostat kanser hücrelerinde SP1 gen ifadesi, MEG3 plazmidi transfekte edilen hücrelerde boş plazmide kıyasla anlamlı bir şekilde artmıştır ($p=0,0405$). Aynı şekilde SP1 ifadesi, MEG3-del5 transfekte edilen hücrelere kıyasla MEG3 plazmidi transfekte edilen hücrelerde anlamlı bir şekilde artmıştır ($p=0,0282$). Ancak, SP1 geninin ifade seviyesi MEG3b plazmidi verilen hücrelerde boş plazmid verilen hücrelere göre anlamlı bir değişim göstermemiştir. Benzer şekilde, MEG3 transfekte edilen hücrelere göre MEG3b plazmidi transfekte edilen hücrelerdeki SP1 ifade düzeyindeki azalış istatistiksel olarak anlamlı değildir. Sonuç olarak SP1 geninin ifade seviyesi, MEG3 plazmid transfeksiyonu gerçekleştirilen hücrelerde kontrol grubu hücrelere göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştır (Şekil 4.50).



Şekil 4.50. PC-3 prostat kanser hücrelerinde boş, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları sonrası SP1 geninin göreceli ifade düzeyi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (* $p<0,05$).

4.7.18. TFDP1

Prostat kanser hücresi olan PC-3 hücrelerinde MEG3 ve onun izoformu olan MEG3b genlerinin ifadeleri plazmid transfeksiyonu aracılığıyla arttırılmış ve artan MEG3 ve MEG3b ifade seviyesinin TFDP1 gen ifade düzeyi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre PC-3 prostat kanser hücrelerinde TFDP1 gen ifadesi, MEG3 plazmidi transfekte edilen hücrelerde boş plazmide kıyasla anlamlı bir şekilde artmıştır ($p<0,0001$). Aynı şekilde TFDP1 ifadesi, MEG3-del5 transfekte edilen hücrelere kıyasla MEG3 plazmidi transfekte edilen hücrelerde anlamlı bir şekilde artmıştır ($p<0,0001$). Bununla birlikte TFDP1 geninin ifade seviyesinin MEG3b plazmidi verilen hücrelerde boş plazmid verilen hücrelere göre anlamlı bir şekilde arttığı bulunmuştur ($p<0,0001$). Ancak TFDP1 geninin, MEG3b plazmidi verilen hücrelerde MEG3 plazmidi verilen hücrelere kıyasla azalan ifadesi anlamlı değildir. Sonuç olarak TFDP1 geninin ifade seviyesi, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları gerçekleştirilen hücrelerde kontrol grubu hücrelere göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştır (Şekil 4.51).

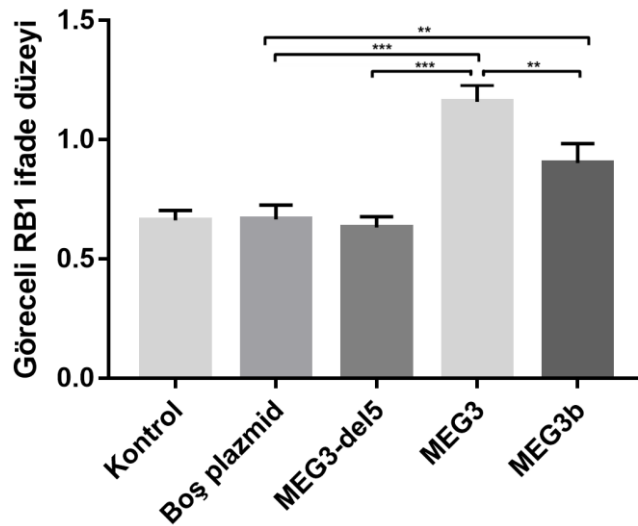


Şekil 4.51. PC-3 prostat kanser hücrelerinde boş, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları sonrası TFDP1 geninin göreceli ifade düzeyi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (** $p<0,001$).

4.8. DU 145 Hücre Hattına Plazmid Transfeksiyonu Sonrası RB1 ve Hedef Genlerinin İfade Analizi

4.8.1. RB1

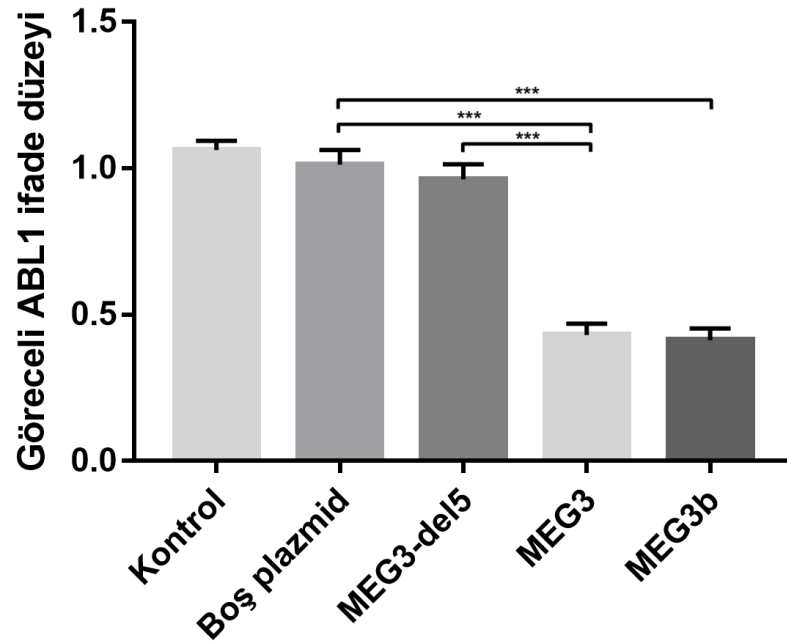
MEG3 ve MEG3b plazmidleri, DU 145 prostat kanser hücrelerine uygun koşullarda transfekte edilerek MEG3 ve MEG3b genlerinin aşırı ifadelenmesi sağlanmıştır. Daha sonra, artan MEG3 ve MEG3b ifade seviyesinin RB1 gen ifade düzeyi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre DU 145 prostat kanser hücrelerinde RB1 gen ifadesi, MEG3 plazmidi transfekte edilen hücrelerde boş plazmide kıyasla anlamlı bir şekilde artmıştır ($p<0,0001$). Aynı şekilde RB1 ifadesi, MEG3-del5 transfekte edilen hücrelere kıyasla MEG3 plazmidi transfekte edilen hücrelerde anlamlı bir şekilde artmıştır ($p<0,0001$). Bununla birlikte RB1 geninin ifade seviyesinin MEG3b plazmidi verilen hücrelerde boş plazmid verilen hücrelere göre anlamlı bir şekilde arttığı bulunmuştur ($p=0,0058$). Ayrıca RB1 geninin, MEG3b plazmidi verilen hücrelerde MEG3 plazmidi verilen hücrelere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük ifadeye sahip olduğu tespit edilmiştir ($p=0,0033$). Sonuç olarak RB1 geninin ifade seviyesi, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları gerçekleştirilen hücrelerde kontrol grubu hücrelere göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştır (Şekil 4.52).



Şekil 4.52. DU 145 prostat kanser hücrelerinde boş, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları sonrası RB1 geninin göreceli ifade düzeyi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (** $p<0,01$; *** $p<0,001$).

4.8.2. ABL1

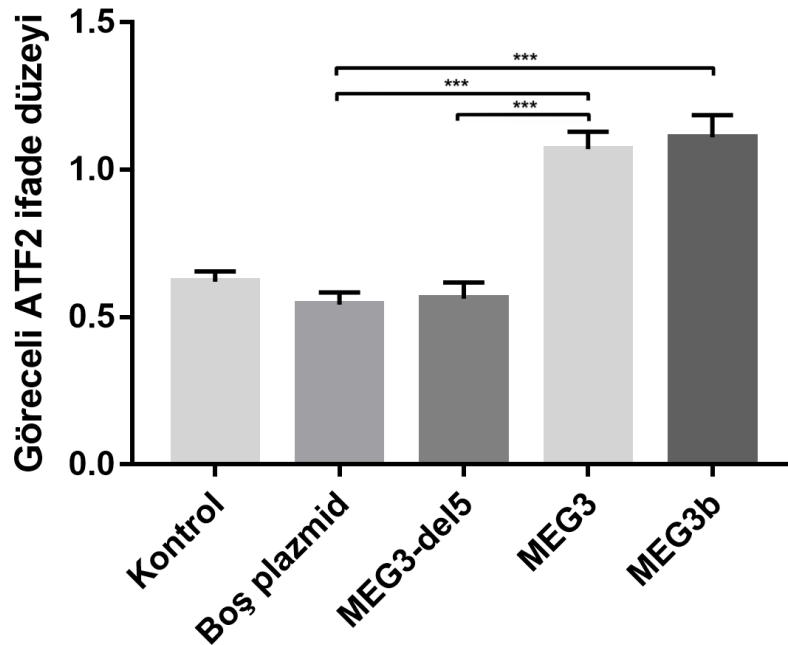
DU 145 prostat kanser hücrelerine MEG3 ve MEG3b plazmidleri uygun koşullarda transfekte edilerek her iki geninin de aşırı ifadelenmesi sağlanmıştır. Daha sonra, artan MEG3 ve MEG3b ifade seviyesinin SP1 gen ifade düzeyi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre PC-3 prostat kanser hücrelerinde ABL1 gen ifadesi, MEG3 plazmidi transfekte edilen hücrelerde boş plazmide kıyasla anlamlı bir şekilde azalmıştır ($p<0,0001$). Aynı şekilde ABL1 ifadesi, MEG3-del5 transfekte edilen hücrelere kıyasla MEG3 plazmidi transfekte edilen hücrelerde anlamlı bir şekilde azalmıştır ($p<0,0001$). Ayrıca ABL1 geninin ifade seviyesinin, MEG3b plazmidi verilen hücrelerde de boş plazmid verilen hücrelere göre anlamlı bir şekilde azaldığı bulunmuştur ($p<0,0001$). Ancak ABL1 geninin ifade düzeyinin, MEG3b plazmidi verilen hücrelerde MEG3 plazmidi verilen hücrelere göre azalışı istatistiksel olarak anlamlı değildir. Sonuç olarak ABL1 geninin ifade seviyesi, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları gerçekleştirilen hücrelerde kontrol grubu hücrelere göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmıştır (Şekil 4.53).



Şekil 4.53. DU 145 prostat kanser hücrelerinde boş, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları sonrası ABL1 geninin göreceli ifade düzeyi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (** $p<0,001$).

4.8.3. ATF2

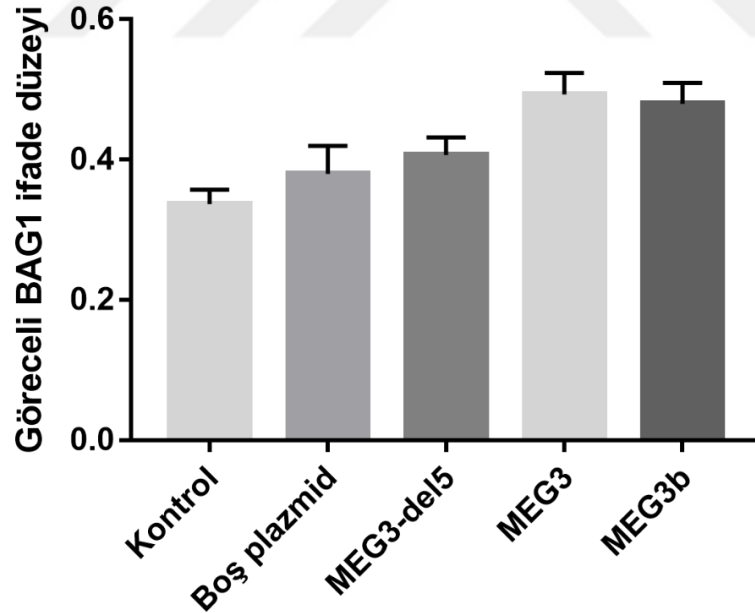
Prostat kanser hücresi olan DU 145 hücrelerinde MEG3 ve onun izoformu olan MEG3b genlerinin ifadeleri plazmid transfeksiyonu aracılığıyla arttırılmış ve artan MEG3 ve MEG3b ifade seviyesinin ATF2 gen ifade düzeyi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre DU 145 prostat kanser hücrelerinde ATF2 gen ifadesi, MEG3 plazmidi transfekte edilen hücrelerde boş plazmide kıyasla anlamlı bir şekilde artmıştır ($p<0,0001$). Aynı şekilde ATF2 ifadesi, MEG3-del5 transfekte edilen hücrelere kıyasla MEG3 plazmidi transfekte edilen hücrelerde anlamlı bir şekilde artmıştır ($p<0,0001$). Ayrıca ATF2 geninin ifade seviyesinin, MEG3b plazmidi verilen hücrelerde de boş plazmid verilen hücrelere göre anlamlı bir şekilde arttığı bulunmuştur ($p<0,0001$). Ancak ATF2 geninin ifade düzeyinin, MEG3b plazmidi verilen hücrelerde MEG3 plazmidi verilen hücrelere göre artışı istatistiksel olarak anlamlı değildir. Sonuç olarak ATF2 geninin ifade seviyesi, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları gerçekleştirilen hücrelerde kontrol grubu hücrelere göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştır (Şekil 4.54).



Şekil 4.54. DU 145 prostat kanser hücrelerinde boş, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları sonrası ATF2 geninin göreceli ifade düzeyi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (***) $p<0,001$).

4.8.4. BAG1

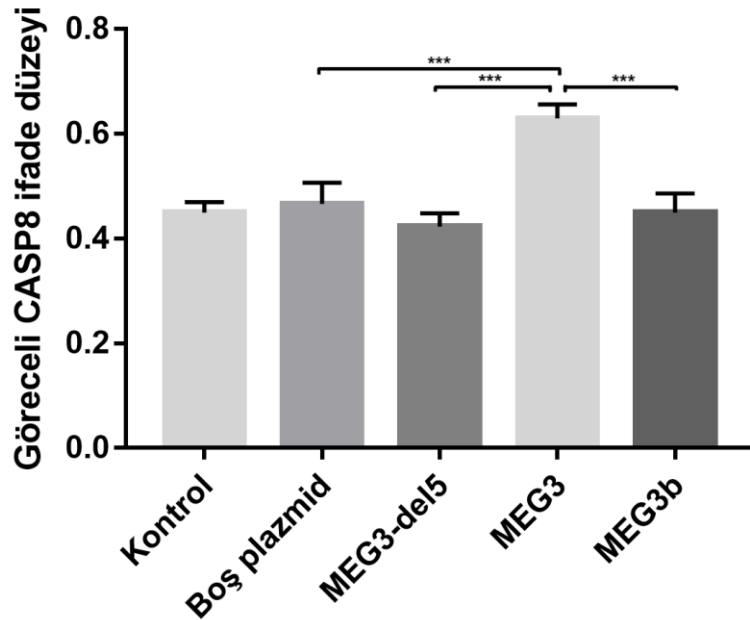
MEG3 ve MEG3b plazmidleri, DU 145 prostat kanser hücrelerine uygun koşullarda transfekte edilerek MEG3 ve MEG3b genlerinin aşırı ifadenmesi sağlanmıştır. Daha sonra, artan MEG3 ve MEG3b ifade seviyesinin BAG1 gen ifade düzeyi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre DU 145 prostat kanser hücrelerinde BAG1 gen ifadesi, MEG3 plazmidi transfekte edilen hücrelerde boş plazmide kıyasla artmıştır. Ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir. Benzer şekilde, MEG3-del5 plazmidi transfekte edilen hücrelere göre MEG3 plazmidi transfekte edilen hücrelerdeki BAG1 ifade seviyesindeki artış istatistiksel olarak anlamlı değildir. MEG3b plazmidi verilen hücrelerde boş plazmid verilen hücrelere göre BAG1 geninin ifadesi artmıştır ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir. Ayrıca BAG1 geni, hem MEG3 hem de MEG3b plazmidi transfekte edilen hücrelerde benzer ifade seviyesine sahiptir. Sonuç olarak BAG1 geninin ifade seviyesi, farklı plazmid transfeksiyonları gerçekleştirilen hücrelerde kontrol grubu hücrelere göre istatistiksel olarak anlamlı bir değişim göstermemiştir (Şekil 4.55).



Şekil 4.55. DU 145 prostat kanser hücrelerinde boş, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları sonrası BAG1 geninin göreceli ifade düzeyi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir.

4.8.5. CASP8

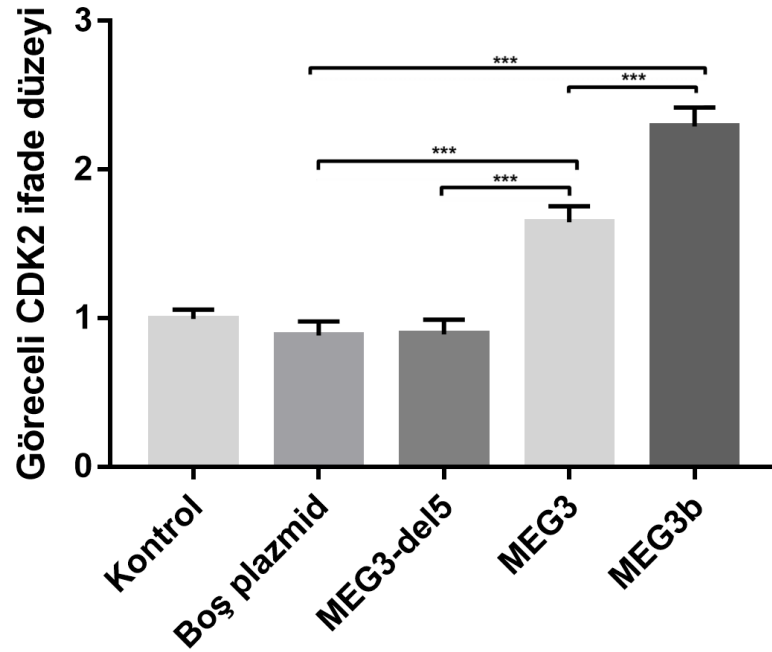
DU 145 prostat kanser hücrelerine MEG3 ve MEG3b plazmidleri uygun koşullarda transfekte edilerek her iki geninin de aşırı ifadenmesi sağlanmıştır. Daha sonra, artan MEG3 ve MEG3b ifade seviyesinin CASP8 gen ifade düzeyi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre DU 145 prostat kanser hücrelerinde CASP8 gen ifadesi, MEG3 plazmidi transfekte edilen hücrelerde boş plazmide kıyasla anlamlı bir şekilde artmıştır ($p=0,0005$). Aynı şekilde CASP8 ifadesi, MEG3-del5 transfekte edilen hücrelere kıyasla MEG3 plazmidi transfekte edilen hücrelerde anlamlı bir şekilde artmıştır ($p<0,0001$). Ancak CASP8 geninin ifade seviyesinin, MEG3b plazmidi verilen hücrelerde boş plazmid verilen hücrelere göre azalması istatistiksel olarak anlamlı değildir. Ayrıca CASP8 geninin, MEG3b plazmidi verilen hücrelerde MEG3 plazmidi verilen hücrelere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük ifadeye sahip olduğu tespit edilmiştir ($p=0,0002$). Sonuç olarak CASP8 geninin ifade seviyesi, MEG3 plazmid transfeksiyonu gerçekleştirilen hücrelerde hem boş plazmid hem de MEG3-del5 plazmidi transfekte edilen hücrelere göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştır (Şekil 4.56).



Şekil 4.56. DU 145 prostat kanser hücrelerinde boş, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları sonrası CASP8 geninin göreceli ifade düzeyi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (** $p<0,001$).

4.8.6. CDK2

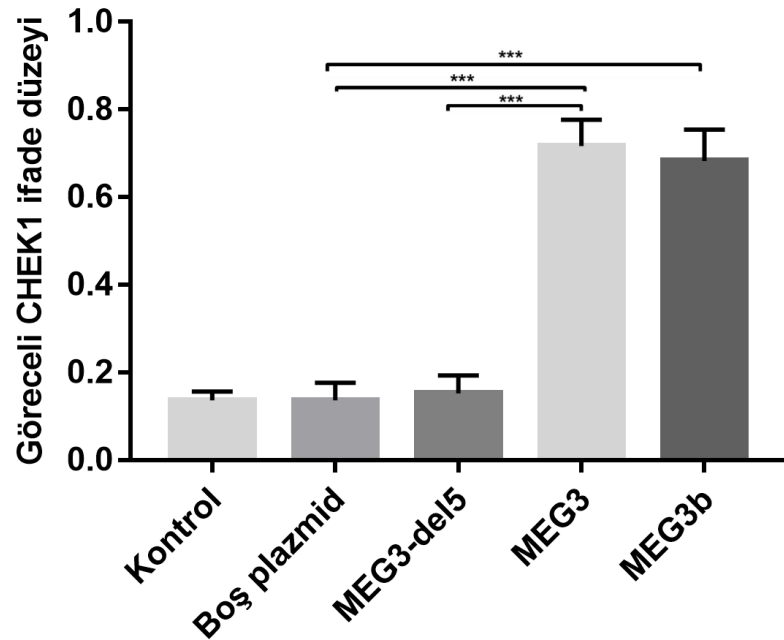
Prostat kanser hücresi olan DU 145 hücrelerinde MEG3 ve onun izoformu olan MEG3b genlerinin ifadeleri plazmid transfeksiyonu aracılığıyla arttırılmış ve artan MEG3 ve MEG3b ifade seviyesinin CDK2 gen ifade düzeyi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre DU 145 prostat kanser hücrelerinde CDK2 gen ifadesi, MEG3 plazmidi transfekte edilen hücrelerde boş plazmide kıyasla anlamlı bir şekilde artmıştır ($p<0,0001$). Aynı şekilde CDK2 ifadesi, MEG3-del5 transfekte edilen hücrelere kıyasla MEG3 plazmidi transfekte edilen hücrelerde anlamlı bir şekilde artmıştır ($p<0,0001$). Bununla birlikte CDK2 geninin ifade seviyesinin MEG3b plazmidi verilen hücrelerde boş plazmid verilen hücrelere göre anlamlı bir şekilde arttığı bulunmuştur ($p<0,0001$). Ayrıca CDK2 geninin, MEG3b plazmidi verilen hücrelerde MEG3 plazmidi verilen hücrelere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek ifadeye sahip olduğu tespit edilmiştir ($p=0,0001$). Sonuç olarak CDK2 geninin ifade seviyesi, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları gerçekleştirilen hücrelerde kontrol grubu hücrelere göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştır (Şekil 4.57).



Şekil 4.57. DU 145 prostat kanser hücrelerinde boş, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları sonrası CDK2 geninin göreceli ifade düzeyi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (** $p<0,001$).

4.8.7. CHEK1

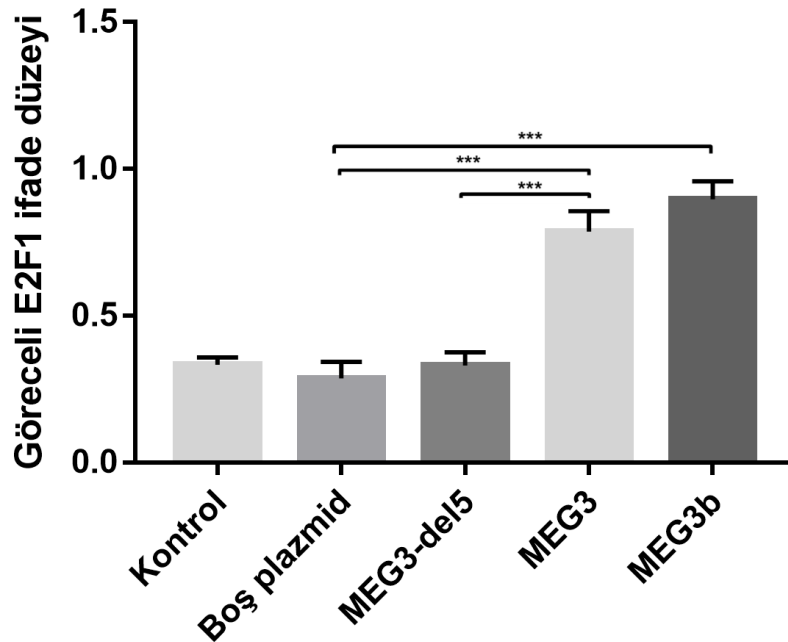
MEG3 ve MEG3b plazmidleri, DU 145 prostat kanser hücrelerine uygun koşullarda transfekte edilerek MEG3 ve MEG3b genlerinin aşırı ifadenmesi sağlanmıştır. Daha sonra, artan MEG3 ve MEG3b ifade seviyesinin CHEK1 gen ifade düzeyi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre DU 145 prostat kanser hücrelerinde CHEK1 gen ifadesi, MEG3 plazmidi transfekte edilen hücrelerde boş plazmide kıyasla anlamlı bir şekilde artmıştır ($p<0,0001$). Aynı şekilde CHEK1 ifadesi, MEG3-del5 transfekte edilen hücelere kıyasla MEG3 plazmidi transfekte edilen hücrelerde anlamlı bir şekilde artmıştır ($p<0,0001$). Ayrıca CHEK1 geninin ifade seviyesinin, MEG3b plazmidi verilen hücrelerde de boş plazmid verilen hücelere göre anlamlı bir şekilde arttığı bulunmuştur ($p<0,0001$). Ancak CHEK1 geninin ifade düzeyinin, MEG3b plazmidi verilen hücrelerde MEG3 plazmidi verilen hücelere göre azalışı istatistiksel olarak anlamlı değildir. Sonuç olarak CHEK1 geninin ifade seviyesi, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları gerçekleştirilen hücrelerde kontrol grubu hücelere göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştır (Şekil 4.58).



Şekil 4.58. DU 145 prostat kanser hücrelerinde boş, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları sonrası CHEK1 geninin göreceli ifade düzeyi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (** $p<0,001$).

4.8.8. E2F1

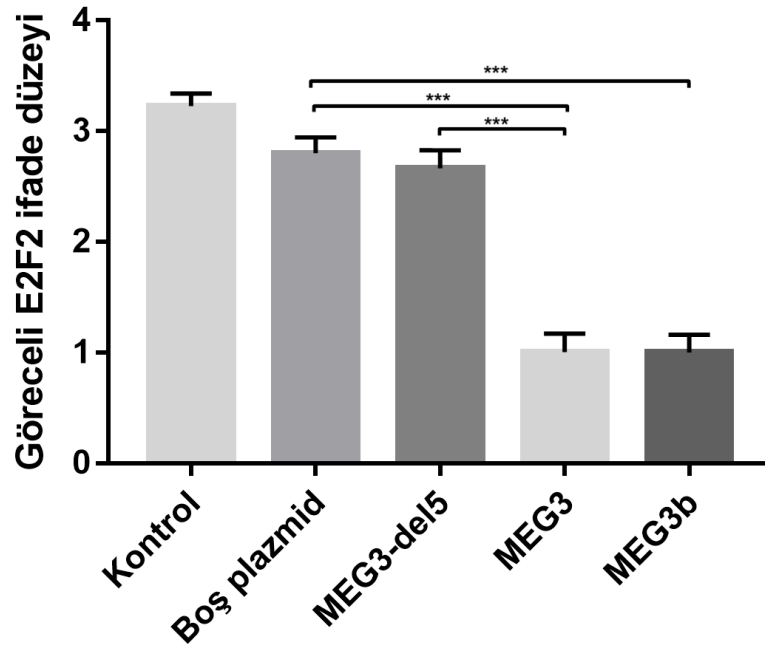
DU 145 prostat kanser hücrelerine MEG3 ve MEG3b plazmidleri uygun koşullarda transfekte edilerek her iki geninin de aşırı ifadenmesi sağlanmıştır. Daha sonra, artan MEG3 ve MEG3b ifade seviyesinin E2F1 gen ifade düzeyi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre DU 145 prostat kanser hücrelerinde E2F1 gen ifadesi, MEG3 plazmidi transfekte edilen hücrelerde boş plazmide kıyasla anlamlı bir şekilde artmıştır ($p<0,0001$). Aynı şekilde E2F1 ifadesi, MEG3-del5 transfekte edilen hücrelere kıyasla MEG3 plazmidi transfekte edilen hücrelerde anlamlı bir şekilde artmıştır ($p<0,0001$). Ayrıca E2F1 geninin ifade seviyesinin, MEG3b plazmidi verilen hücrelerde de boş plazmid verilen hücrelere göre anlamlı bir şekilde arttığı bulunmuştur ($p<0,0001$). Ancak E2F1 geninin ifade düzeyinin, MEG3b plazmidi verilen hücrelerde MEG3 plazmidi verilen hücrelere göre artışı istatistiksel olarak anlamlı değildir. Sonuç olarak E2F1 geninin ifade seviyesi, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları gerçekleştirilen hücrelerde kontrol grubu hücrelere göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştır (Şekil 4.59).



Şekil 4.59. DU 145 prostat kanser hücrelerinde boş, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları sonrası E2F1 geninin göreceli ifade düzeyi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (**p<0,01).

4.8.9. E2F2

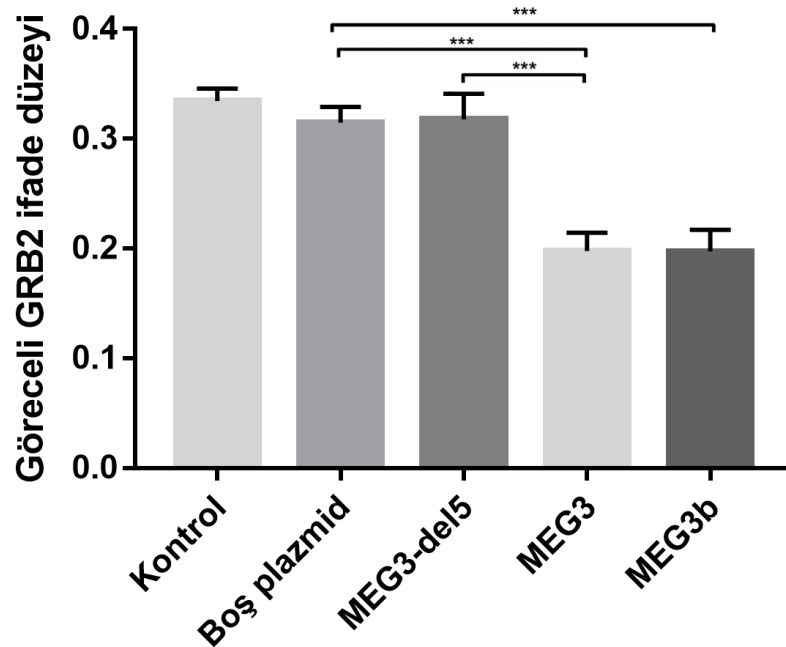
Prostat kanser hücresi olan DU 145 hücrelerinde MEG3 ve onun izoformu olan MEG3b genlerinin ifadeleri plazmid transfeksiyonu aracılığıyla artırılmış ve artan MEG3 ve MEG3b ifade seviyesinin E2F2 gen ifade düzeyi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre DU 145 prostat kanser hücrelerinde E2F2 gen ifadesi, MEG3 plazmidi transfekte edilen hücrelerde boş plazmide kıyasla anlamlı bir şekilde azalmıştır ($p<0,0001$). Aynı şekilde E2F2 ifadesi, MEG3-del5 transfekte edilen hücrelere kıyasla MEG3 plazmidi transfekte edilen hücrelerde anlamlı bir şekilde azalmıştır ($p<0,0001$). Ayrıca E2F2 geninin ifade seviyesinin, MEG3b plazmidi verilen hücrelerde de boş plazmid verilen hücrelere göre anlamlı bir şekilde azaldığı bulunmuştur ($p<0,0001$). Ancak E2F2 geninin ifade düzeyinin, MEG3b plazmidi verilen hücrelerde MEG3 plazmidi verilen hücrelere göre artışı istatistiksel olarak anlamlı değildir. Sonuç olarak E2F2 geninin ifade seviyesi, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları gerçekleştirilen hücrelerde kontrol grubu hücrelere göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştır (Şekil 4.60).



Şekil 4.60. DU 145 prostat kanser hücrelerinde boş, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları sonrası E2F2 geninin göreceli ifade düzeyi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (** $p<0,001$).

4.8.10. GRB2

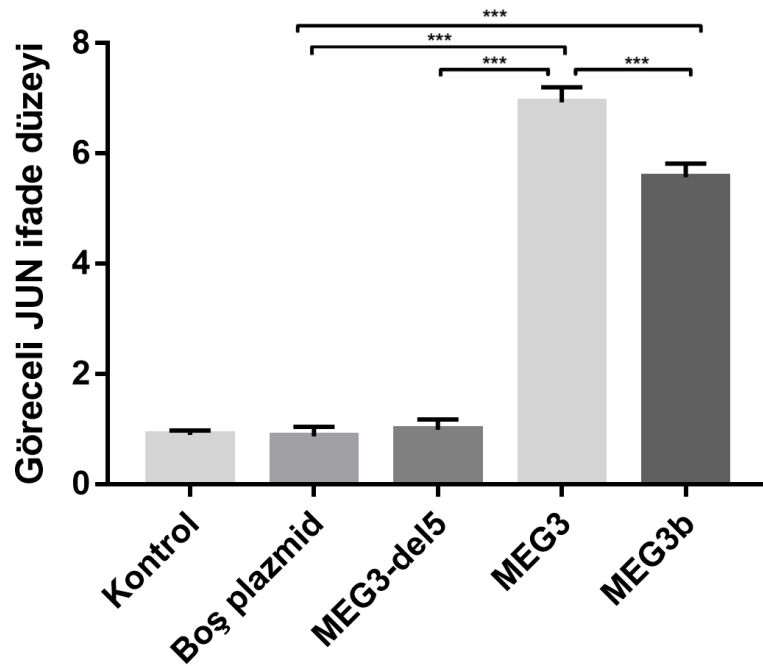
MEG3 ve MEG3b plazmidleri, DU 145 prostat kanser hücrelerine uygun koşullarda transfekte edilerek MEG3 ve MEG3b genlerinin aşırı ifadenmesi sağlanmıştır. Daha sonra, artan MEG3 ve MEG3b ifade seviyesinin GRB2 gen ifade düzeyi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre DU 145 prostat kanser hücrelerinde GRB2 gen ifadesi, MEG3 plazmidi transfekte edilen hücrelerde boş plazmide kıyasla anlamlı bir şekilde azalmıştır ($p<0,0001$). Aynı şekilde GRB2 ifadesi, MEG3-del5 transfekte edilen hücrelere kıyasla MEG3 plazmidi transfekte edilen hücrelerde anlamlı bir şekilde azalmıştır ($p<0,0001$). Ayrıca GRB2 geninin ifade seviyesinin, MEG3b plazmidi verilen hücrelerde de boş plazmid verilen hücrelere göre anlamlı bir şekilde azaldığı bulunmuştur ($p<0,0001$). Ancak GRB2 geninin ifade düzeyinin, MEG3b plazmidi verilen hücrelerde MEG3 plazmidi verilen hücrelere göre artışı istatistiksel olarak anlamlı değildir. Sonuç olarak GRB2 geninin ifade seviyesi, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları gerçekleştirilen hücrelerde kontrol grubu hücrelere göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştır (Şekil 4.61).



Şekil 4.61. DU 145 prostat kanser hücrelerinde boş, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları sonrası GRB2 geninin göreceli ifade düzeyi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (** $p<0,001$).

4.8.11. JUN

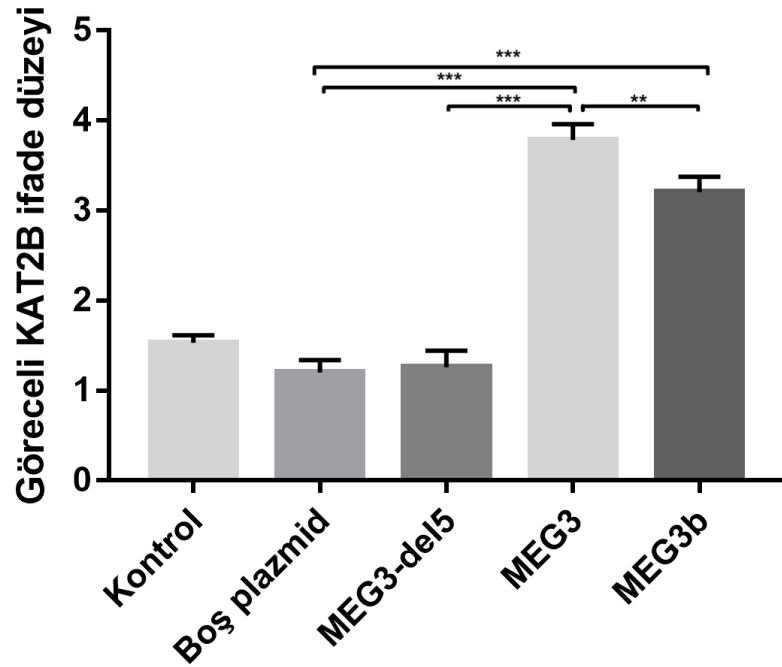
DU 145 prostat kanser hücrelerine MEG3 ve MEG3b plazmidleri uygun koşullarda transfekte edilerek her iki geninin de aşırı ifadenmesi sağlanmıştır. Daha sonra, artan MEG3 ve MEG3b ifade seviyesinin JUN gen ifade düzeyi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre DU 145 prostat kanser hücrelerinde JUN gen ifadesi, MEG3 plazmidi transfekte edilen hücrelerde boş plazmide kıyasla anlamlı bir şekilde artmıştır ($p<0,0001$). Aynı şekilde JUN ifadesi, MEG3-del5 transfekte edilen hücrelere kıyasla MEG3 plazmidi transfekte edilen hücrelerde anlamlı bir şekilde artmıştır ($p<0,0001$). Bununla birlikte JUN geninin ifade seviyesinin MEG3b plazmidi verilen hücrelerde boş plazmid verilen hücrelere göre anlamlı bir şekilde arttığı bulunmuştur ($p<0,0001$). Ayrıca JUN geninin, MEG3b plazmidi verilen hücrelerde MEG3 plazmidi verilen hücrelere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük ifadeye sahip olduğu tespit edilmiştir ($p<0,0001$). Sonuç olarak JUN geninin ifade seviyesi, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları gerçekleştirilen hücrelerde kontrol grubu hücrelere göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştır (Şekil 4.62).



Şekil 4.62. DU 145 prostat kanser hücrelerinde boş, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları sonrası JUN geninin göreceli ifade düzeyi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (***) $p<0,001$).

4.8.12. KAT2B

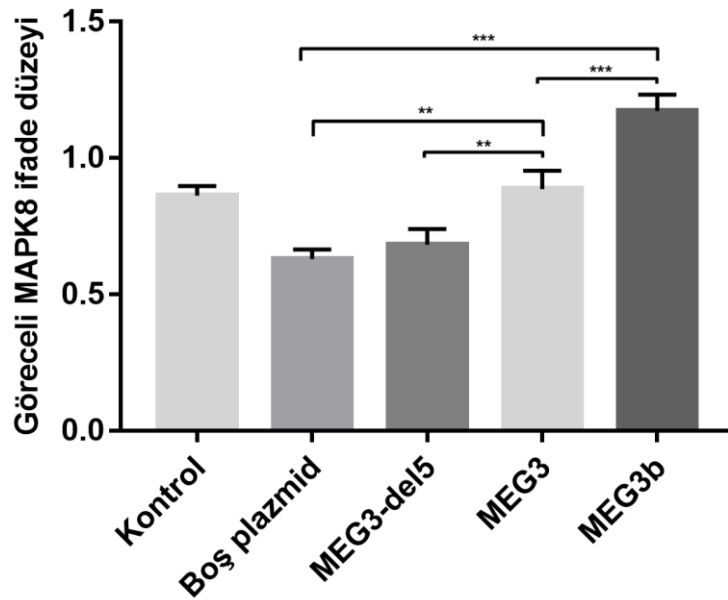
Prostat kanser hücresi olan DU 145 hücrelerinde MEG3 ve onun izoformu olan MEG3b genlerinin ifadeleri plazmid transfeksiyonu aracılığıyla arttırılmış ve artan MEG3 ve MEG3b ifade seviyesinin KAT2B gen ifade düzeyi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre DU 145 prostat kanser hücrelerinde KAT2B gen ifadesi, MEG3 plazmidi transfekte edilen hücrelerde boş plazmide kıyasla anlamlı bir şekilde artmıştır ($p<0,0001$). Aynı şekilde KAT2B ifadesi, MEG3-del5 transfekte edilen hücrelere kıyasla MEG3 plazmidi transfekte edilen hücrelerde anlamlı bir şekilde artmıştır ($p<0,0001$). Ayrıca KAT2B geninin ifade seviyesinin, MEG3b plazmidi verilen hücrelerde de boş plazmid verilen hücrelere göre anlamlı bir şekilde arttığı bulunmuştur ($p<0,0001$). KAT2B geninin ifade düzeyinin, MEG3b plazmidi verilen hücrelerde MEG3 plazmidi verilen hücrelere göre azalışı istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0,0070$). Sonuç olarak KAT2B geninin ifade seviyesi, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları gerçekleştirilen hücrelerde kontrol grubu hücrelere göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştır (Şekil 4.63).



Şekil 4.63. DU 145 prostat kanser hücrelerinde boş, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları sonrası KAT2B geninin göreceli ifade düzeyi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (** $p<0,01$; *** $p<0,001$).

4.8.13. MAPK8

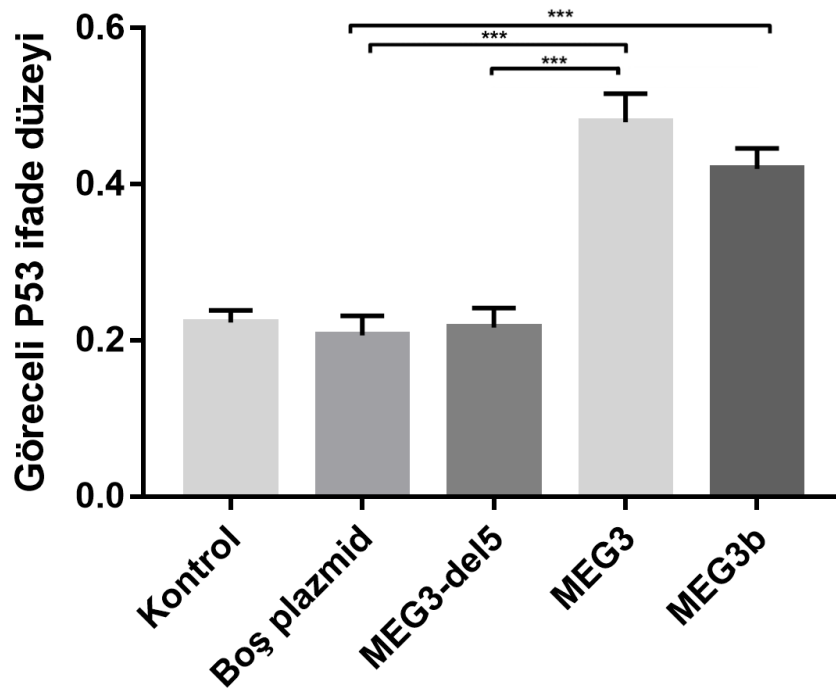
MEG3 ve MEG3b plazmidleri, DU 145 prostat kanser hücrelerine uygun koşullarda transfekte edilerek MEG3 ve MEG3b genlerinin aşırı ifadenmesi sağlanmıştır. Daha sonra, artan MEG3 ve MEG3b ifade seviyesinin MAPK8 gen ifade düzeyi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre DU 145 prostat kanser hücrelerinde MAPK8 gen ifadesi, MEG3 plazmidi transfekte edilen hücrelerde boş plazmide kıyasla anlamlı bir şekilde artmıştır ($p=0,0011$). Aynı şekilde MAPK8 ifadesi, MEG3-del5 transfekte edilen hücrelere kıyasla MEG3 plazmidi transfekte edilen hücrelerde anlamlı bir şekilde artmıştır ($p=0,0059$). Bununla birlikte MAPK8 geninin ifade seviyesinin MEG3b plazmidi verilen hücrelerde boş plazmid verilen hücrelere göre anlamlı bir şekilde arttığı bulunmuştur ($p<0,0001$). Ayrıca MAPK8 geninin, MEG3b plazmidi verilen hücrelerde MEG3 plazmidi verilen hücrelere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek ifadeye sahip olduğu tespit edilmiştir ($p=0,0004$). Sonuç olarak MAPK8 geninin ifade seviyesi, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları gerçekleştirilen hücrelerde kontrol grubu hücrelere göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştır (Şekil 4.64).



Şekil 4.64. DU 145 prostat kanser hücrelerinde boş, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları sonrası MAPK8 geninin göreceli ifade düzeyi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (** $p<0,01$; *** $p<0,001$).

4.8.14. P53

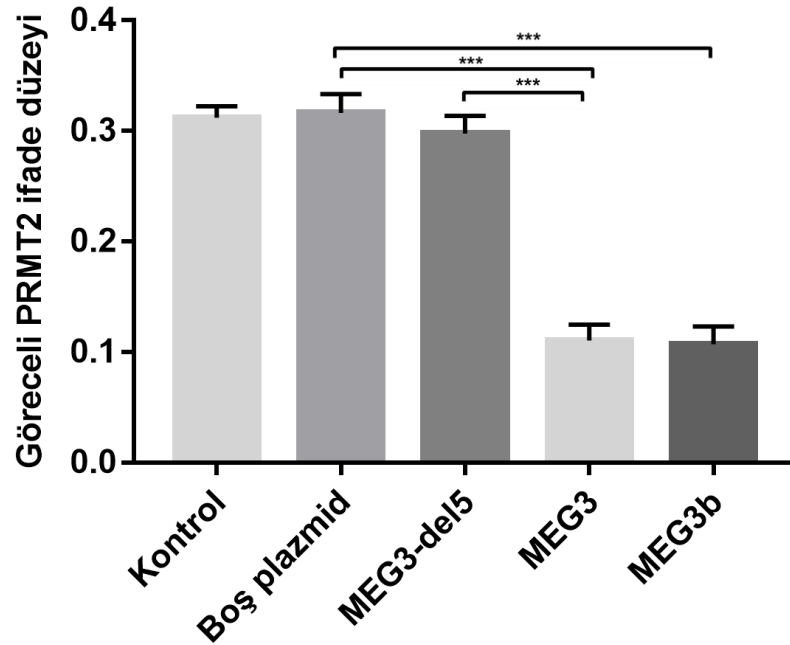
DU 145 prostat kanser hücrelerine MEG3 ve MEG3b plazmidleri uygun koşullarda transfekte edilerek her iki geninin de aşırı ifadenmesi sağlanmıştır. Daha sonra, artan MEG3 ve MEG3b ifade seviyesinin P53 gen ifade düzeyi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre DU 145 prostat kanser hücrelerinde P53 gen ifadesi, MEG3 plazmidi transfekte edilen hücrelerde boş plazmide kıyasla anlamlı bir şekilde artmıştır ($p<0,0001$). Aynı şekilde P53 ifadesi, MEG3-del5 transfekte edilen hücrelere kıyasla MEG3 plazmidi transfekte edilen hücrelerde anlamlı bir şekilde artmıştır ($p<0,0001$). Ayrıca P53 geninin ifade seviyesinin, MEG3b plazmidi verilen hücrelerde de boş plazmid verilen hücrelere göre anlamlı bir şekilde arttığı bulunmuştur ($p<0,0001$). Ancak P53 geninin ifade düzeyinin, MEG3b plazmidi verilen hücrelerde MEG3 plazmidi verilen hücrelere göre azalışı istatistiksel olarak anlamlı değildir. Sonuç olarak P53 geninin ifade seviyesi, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları gerçekleştirilen hücrelerde kontrol grubu hücrelere göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştır (Şekil 4.65).



Şekil 4.65. DU 145 prostat kanser hücrelerinde boş, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları sonrası P53 geninin göreceli ifade düzeyi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (** $p<0,001$).

4.8.15. PRMT2

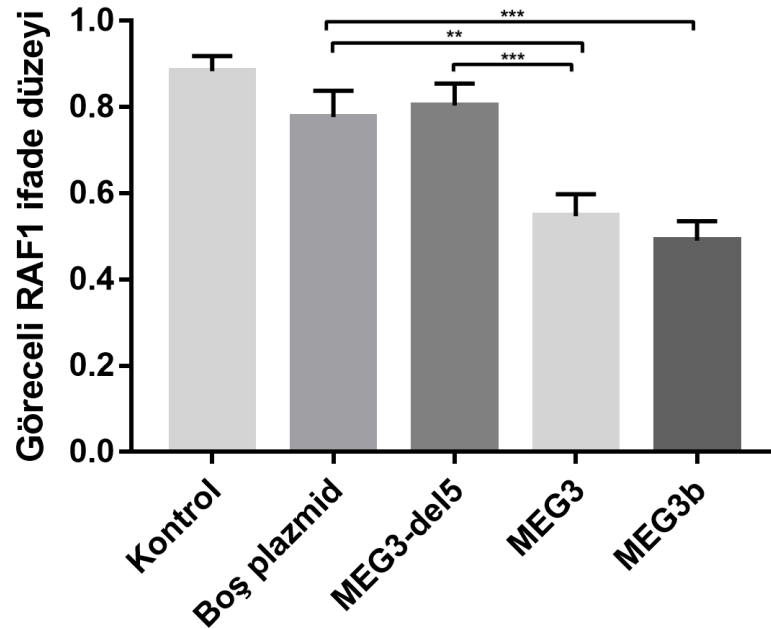
Prostat kanser hücresi olan DU 145 hücrelerinde MEG3 ve onun izoformu olan MEG3b genlerinin ifadeleri plazmid transfeksiyonu aracılığıyla arttırılmış ve artan MEG3 ve MEG3b ifade seviyesinin PRMT2 gen ifade düzeyi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre DU 145 prostat kanser hücrelerinde PRMT2 gen ifadesi, MEG3 plazmidi transfekte edilen hücrelerde boş plazmide kıyasla anlamlı bir şekilde azalmıştır ($p=0,0026$). Aynı şekilde PRMT2 ifadesi, MEG3-del5 transfekte edilen hücrelere kıyasla MEG3 plazmidi transfekte edilen hücrelerde anlamlı bir şekilde azalmıştır ($p=0,0032$). Ayrıca PRMT2 geninin ifade seviyesinin, MEG3b plazmidi verilen hücrelerde de boş plazmid verilen hücrelere göre anlamlı bir şekilde azaldığı bulunmuştur ($p=0,0001$). Ancak PRMT2 geninin ifade düzeyinin, MEG3b plazmidi verilen hücrelerde MEG3 plazmidi verilen hücrelere göre azalışı istatistiksel olarak anlamlı değildir. Sonuç olarak PRMT2 geninin ifade seviyesi, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları gerçekleştirilen hücrelerde kontrol grubu hücrelere göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştır (Şekil 4.66).



Şekil 4.66. DU 145 prostat kanser hücrelerinde boş, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları sonrası PRMT2 geninin göreceli ifade düzeyi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (** $p<0,001$).

4.8.16. RAF1

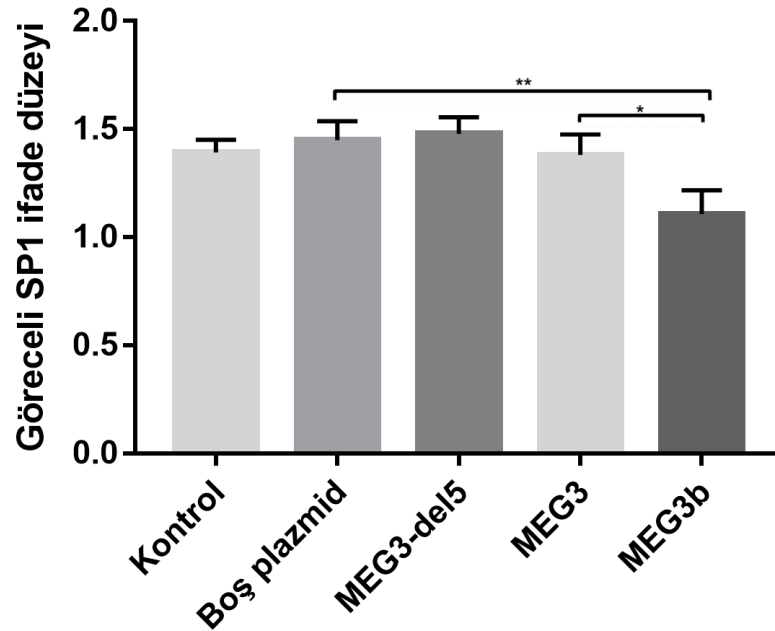
MEG3 ve MEG3b plazmidleri, DU 145 prostat kanser hücrelerine uygun koşullarda transfekte edilerek MEG3 ve MEG3b genlerinin aşırı ifadenmesi sağlanmıştır. Daha sonra, artan MEG3 ve MEG3b ifade seviyesinin RAF1 gen ifade düzeyi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre DU 145 prostat kanser hücrelerinde RAF1 gen ifadesi, MEG3 plazmidi transfekte edilen hücrelerde boş plazmide kıyasla anlamlı bir şekilde azalmıştır ($p=0,0015$). Aynı şekilde RAF1 ifadesi, MEG3-del5 transfekte edilen hücrelere kıyasla MEG3 plazmidi transfekte edilen hücrelerde anlamlı bir şekilde azalmıştır ($p=0,0006$). Ayrıca RAF1 geninin ifade seviyesinin, MEG3b plazmidi verilen hücrelerde de boş plazmid verilen hücrelere göre anlamlı bir şekilde azaldığı bulunmuştur ($p=0,0003$). Ancak RAF1 geninin ifade düzeyinin, MEG3b plazmidi verilen hücrelerde MEG3 plazmidi verilen hücrelere göre azalışı istatistiksel olarak anlamlı değildir. Sonuç olarak RAF1 geninin ifade seviyesi, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları gerçekleştirilen hücrelerde kontrol grubu hücrelere göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştır (Şekil 4.67).



Şekil 4.67. DU 145 prostat kanser hücrelerinde boş, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları sonrası RAF1 geninin göreceli ifade düzeyi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$).

4.8.17. SP1

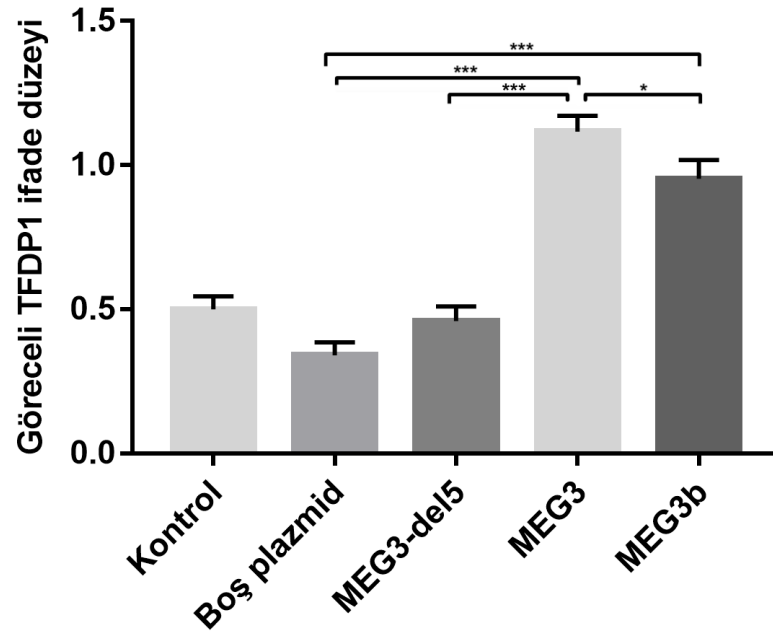
DU 145 prostat kanser hücrelerine MEG3 ve MEG3b plazmidleri uygun koşullarda transfekte edilerek her iki geninin de aşırı ifadenmesi sağlanmıştır. Daha sonra, artan MEG3 ve MEG3b ifade seviyesinin SP1 gen ifade düzeyi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre DU 145 prostat kanser hücrelerinde SP1 gen ifadesi, MEG3 plazmidi transfekte edilen hücrelerde boş plazmide kıyasla anlamlı bir değişim göstermemiştir. Aynı şekilde SP1 ifadesi, MEG3-del5 transfekte edilen hücrelere kıyasla MEG3 plazmidi transfekte edilen hücrelerde anlamlı bir değişim göstermemiştir. Ancak SP1 geninin ifade seviyesinin, MEG3b plazmidi verilen hücrelerde de boş plazmid verilen hücrelere göre anlamlı bir şekilde azaldığı bulunmuştur ($p=0,0049$). Benzer şekilde SP1 geninin ifade düzeyinin, MEG3b plazmidi verilen hücrelerde MEG3 plazmidi verilen hücrelere göre azalışı istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0,0215$). Sonuç olarak SP1 geninin ifade seviyesi, MEG3b plazmid transfeksiyonu gerçekleştirilen hücrelerde kontrol grubu hücrelere göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmıştır (Şekil 4.68).



Şekil 4.68. DU 145 prostat kanser hücrelerinde boş, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları sonrası SP1 geninin göreceli ifade düzeyi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (* $p<0,05$; ** $p<0,01$).

4.8.18. TFDP1

Prostat kanser hücresi olan DU 145 hücrelerinde MEG3 ve onun izoformu olan MEG3b genlerinin ifadeleri plazmid transfeksiyonu aracılığıyla arttırılmış ve artan MEG3 ve MEG3b ifade seviyesinin TFDP1 gen ifade düzeyi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre DU 145 prostat kanser hücrelerinde TFDP1 gen ifadesi, MEG3 plazmidi transfekte edilen hücrelerde boş plazmide kıyasla anlamlı bir şekilde artmıştır ($p<0,0001$). Aynı şekilde TFDP1 ifadesi, MEG3-del5 transfekte edilen hücrelere kıyasla MEG3 plazmidi transfekte edilen hücrelerde anlamlı bir şekilde artmıştır ($p<0,0001$). Ayrıca TFDP1 geninin ifade seviyesinin, MEG3b plazmidi verilen hücrelerde de boş plazmid verilen hücrelere göre anlamlı bir şekilde arttığı bulunmuştur ($p<0,0001$). TFDP1 geninin ifade düzeyinin, MEG3b plazmidi verilen hücrelerde MEG3 plazmidi verilen hücrelere göre azalışı istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0,233$). Sonuç olarak TFDP1 geninin ifade seviyesi, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları gerçekleştirilen hücrelerde kontrol grubu hücrelere göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştır (Şekil 4.69).



Şekil 4.69. DU 145 prostat kanser hücrelerinde boş, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları sonrası TFDP1 geninin göreceli ifade düzeyi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir (* $p<0,05$; *** $p<0,001$).

4.9. Plazmid Transfeksiyonları Sonrası RB1 ve Hedef Genlerin İfade Değişimleri

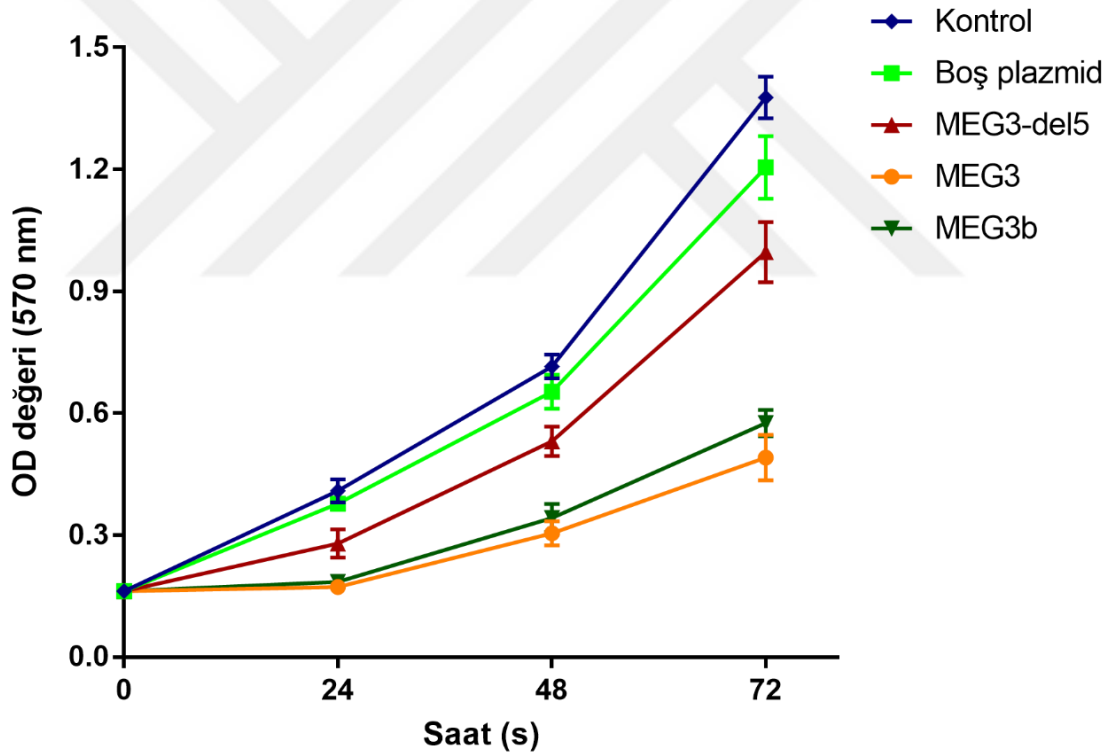
PC-3 ve DU 145 prostat kanser hücre hatlarında plazmid transfeksiyonu sonrasında MEG3 ve izoformu MEG3b overekspresyonu ile RB1 ve hedef genlerin ifade düzeylerindeki değişim özet halinde Tablo 4.2’de gösterilmiştir.

Tablo 4.2. Plazmid transfeksiyonları sonrası RB1 ve hedef genlerin ifade değişimleri.

Gen	PC-3		DU 145	
	MEG3	MEG3b	MEG3	MEG3b
RB1	Arttı	Değişmedi	Arttı	Arttı
ABL1	Azaldı	Azaldı	Azaldı	Azaldı
ATF2	Değişmedi	Azaldı	Arttı	Arttı
BAG1	Arttı	Değişmedi	Değişmedi	Değişmedi
CASP8	Arttı	Arttı	Arttı	Değişmedi
CDK2	Arttı	Arttı	Arttı	Arttı
CHEK1	Arttı	Azaldı	Arttı	Arttı
E2F1	Arttı	Arttı	Arttı	Arttı
E2F2	Arttı	Arttı	Azaldı	Azaldı
GRB2	Azaldı	Azaldı	Azaldı	Azaldı
JUN	Arttı	Değişmedi	Arttı	Arttı
KAT2B	Arttı	Arttı	Arttı	Arttı
MAPK8	Arttı	Arttı	Arttı	Arttı
P53	Arttı	Arttı	Arttı	Arttı
PRMT2	Azaldı	Azaldı	Azaldı	Azaldı
RAF1	Arttı	Arttı	Azaldı	Azaldı
SP1	Arttı	Değişmedi	Değişmedi	Azaldı
TFDP1	Arttı	Arttı	Arttı	Arttı

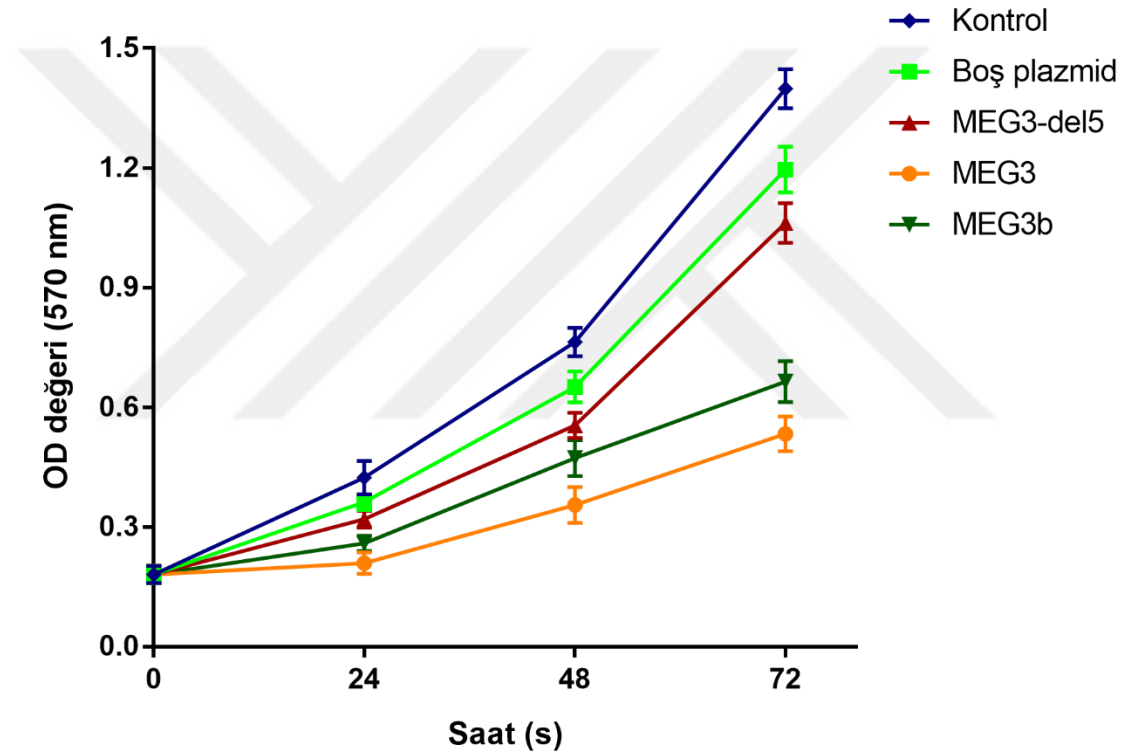
4.10. Plazmid Transfeksiyonlarının Prostat Kanser Hücrelerinin Proliferasyonu Üzerine Etkisi

PC-3 prostat kanser hücre hattında, boş plazmid, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları sonrasında elde edilen hücre proliferasyon grafiği Şekil 4.70’de gösterilmiştir. MEG3 ve MEG3b plazmidleriyle transfeke edilen PC-3 hücre gruplarında 24, 48 ve 72 saat ölçümlerine göre hücre çoğalması kontrol, boş plazmid ve MEG3-del5 verilen hücrelere kıyasla azalmıştır. Hücre çoğalmasındaki 48 ve 72. saatlerdeki düşüş istatistiksel olarak da anlamlıdır ($p < 0,01$). Ayrıca MEG3-del5 verilen hücrelerin çoğalması da boş plazmid verilen hücrelere göre daha düşük seviyededir ama MEG3 ve MEG3b plazmidini verenlere göre daha yüksek seviyededir. Sonuç olarak, MEG3 ve MEG3b PC-3 prostat kanser hücrelerinin çoğalmasını baskılamıştır.



Şekil 4.70. Plazmid transfeksiyonlarının PC-3 prostat kanser hücrelerinin hücre çoğalması üzerine olan etkilerinin MTT testi ile gösterilmesi. Kontrol; Uygulama yapılmamış, boş plazmid; MEG3 genini içermeyen boş plazmid, MEG3-del5; MEG3 geninin ilk 450 bazlık bölgesinin delesyona uğramış halini içeren plazmid, MEG3; MEG3 genini içeren plazmid, MEG3b; MEG3 izoformunu içeren plazmid.

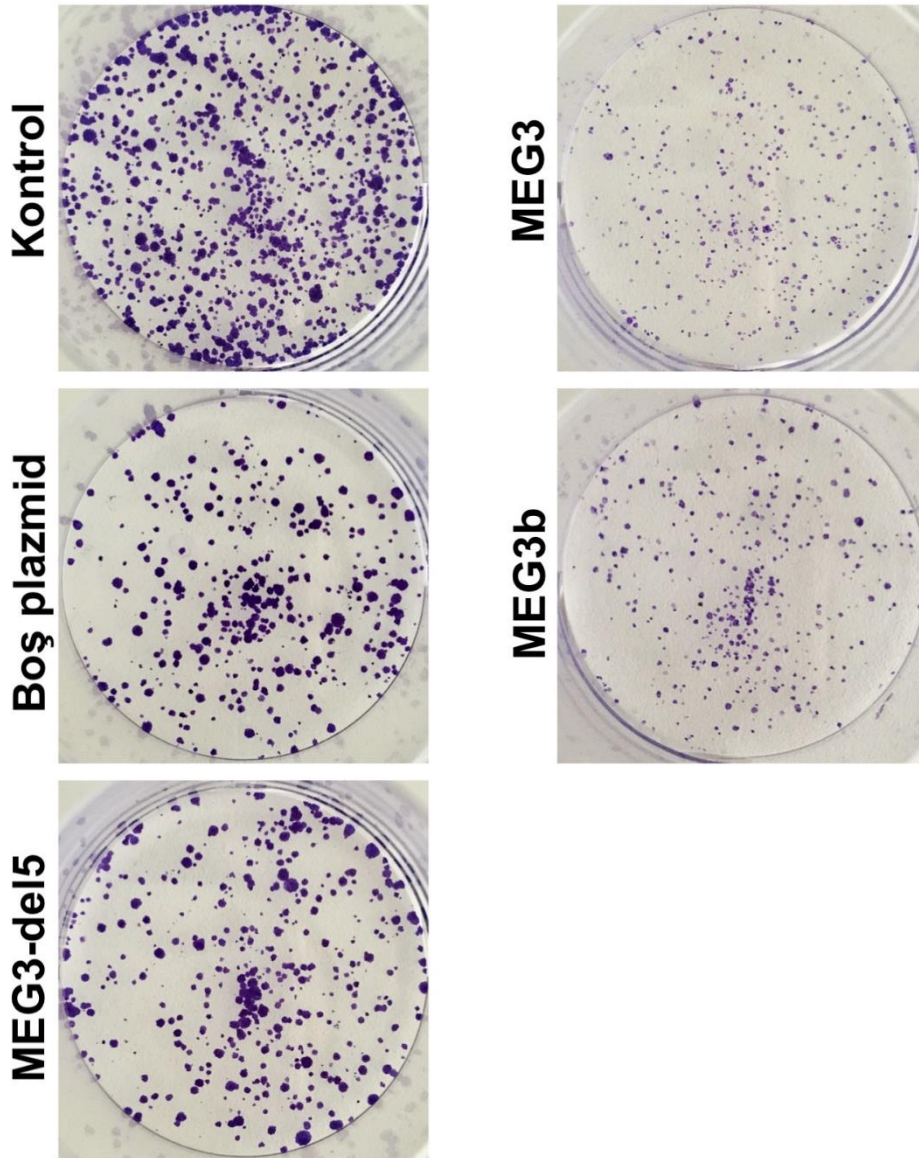
DU 145 prostat kanser hücre hattında, boş plazmid, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonları sonrasında elde edilen hücre proliferasyon grafiği Şekil 4.71’de gösterilmiştir. MEG3 ve MEG3b plazmidleriyle transfekte edilen DU 145 hücre gruplarında 24, 48 ve 72 saat ölçümlerine göre hücre çoğalması kontrol, boş plazmid ve MEG3-del5 verilen hücrelere kıyasla azalmıştır. Hücre çoğalmasındaki 48 ve 72. saatlerdeki düşüş istatistiksel olarak da anlamlıdır ($p < 0,01$). Ayrıca MEG3-del5 verilen hücrelerin çoğalması da boş plazmid verilen hücrelere göre daha düşük seviyededir ama MEG3 ve MEG3b plazmid verene göre daha yüksek seviyededir. Sonuç olarak, MEG3 ve MEG3b DU 145 prostat kanser hücrelerinin çoğalmasını baskılamıştır.



Şekil 4.71. Plazmid transfeksiyonlarının DU 145 prostat kanser hücrelerinin hücre çoğalması üzerine olan etkilerinin MTT testi ile gösterilmesi. Kontrol; Uygulama yapılmamış, boş plazmid; MEG3 genini içermeyen boş plazmid, MEG3-del5; MEG3 geninin ilk 450 bazlık bölgesinin delesyona uğramış halini içeren plazmid, MEG3; MEG3 genini içeren plazmid, MEG3b; MEG3 izoformunu içeren plazmid.

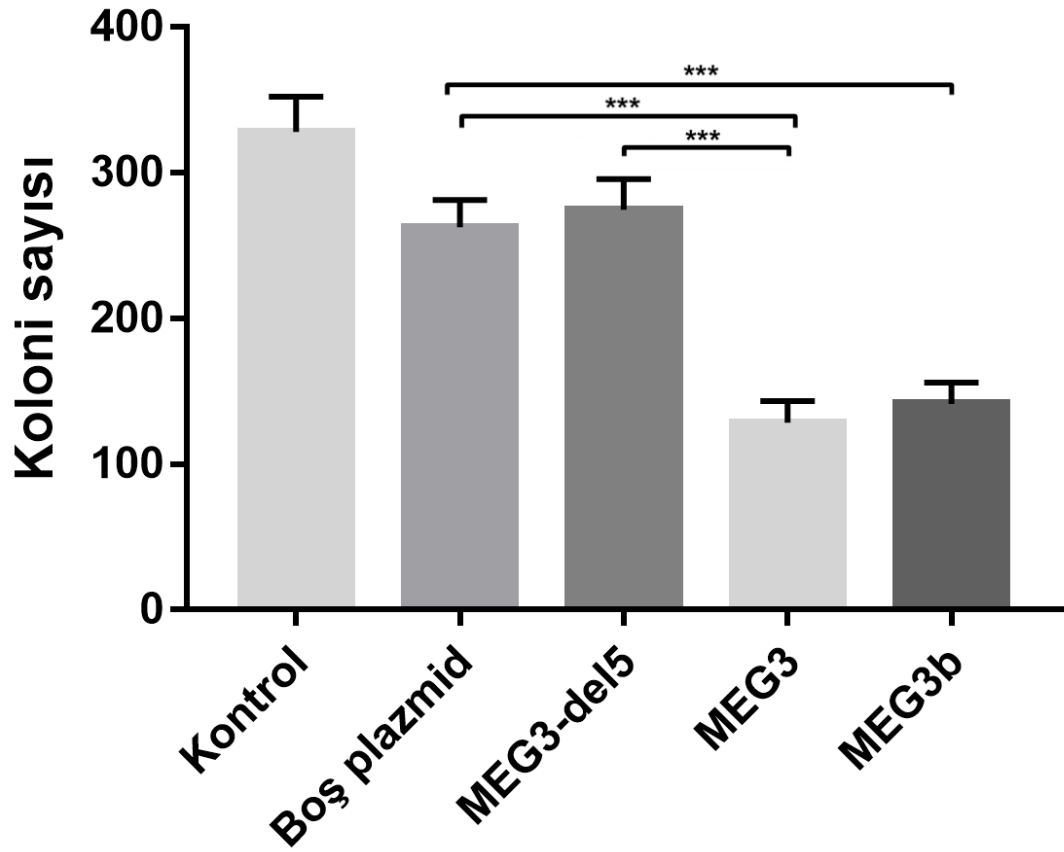
4.11. Plazmid Transfeksiyonlarının Prostat Kanser Hücrelerinin Koloni Oluşturma Kapasiteleri Üzerine Etkisi

PC-3 prostat kanser hücre hattına, boş plazmid, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonlarının PC-3 hücrelerinin koloni oluşum yeteneği üzerindeki etkileri Şekil 4.72’de ve transfeksiyon sonrası koloni analiz grafiği Şekil 4.73’de verilmiştir.



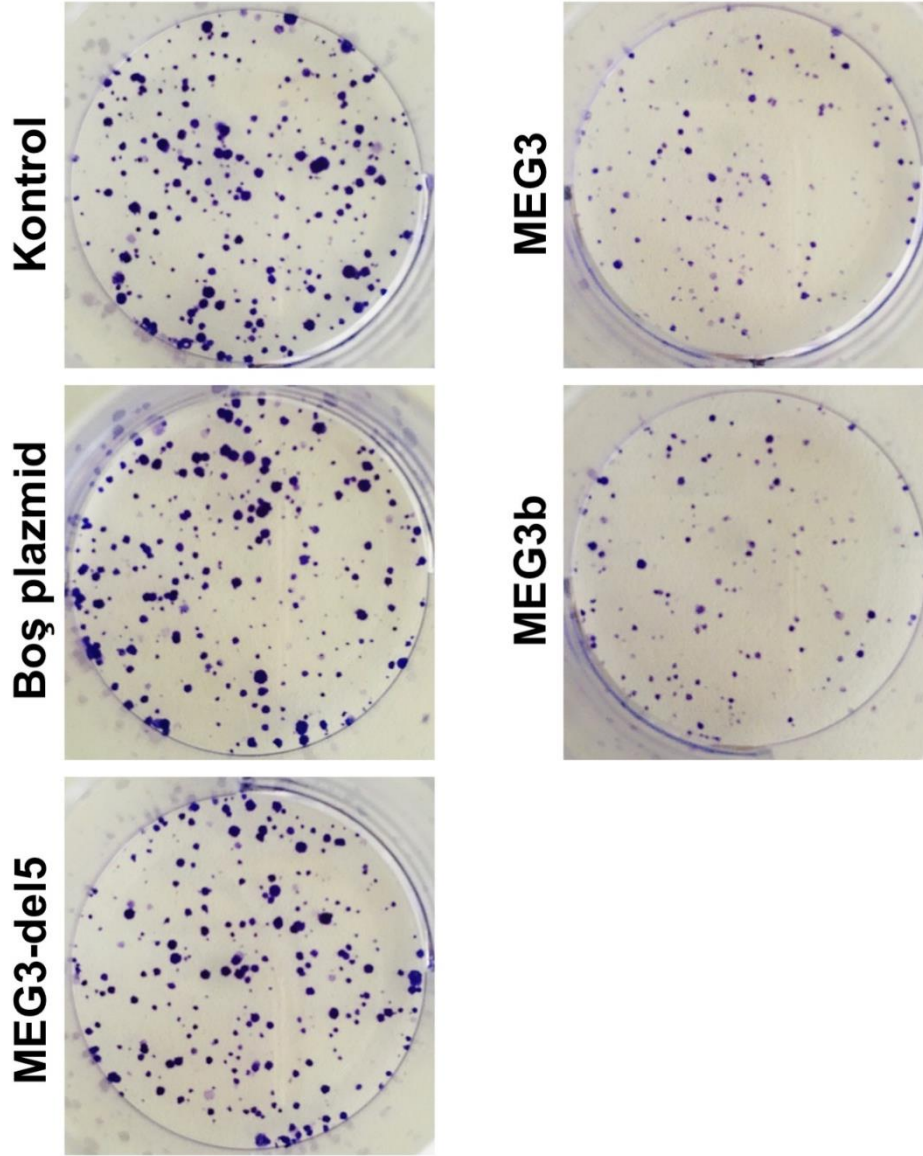
Şekil 4.72. Plazmid transfeksiyonlarının PC-3 prostat kanser hücrelerinin koloni oluşturma kapasiteleri üzerine olan etkisi.

MEG3 ve MEG3b ile transfekte edilen hücre gruplarında kontrol, boş plazmid ve MEG3-del5 plazmidini transfekte edilmiş deney gruplarına kıyasla koloni oluşturma yeteneği büyük oranda baskılanmıştır. Elde edilen bu veriler istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,0001$). MEG3-del5 ile transfekte edilen hücre grubunda kontrol ve boş plazmidle transfekte edilmiş deney gruplarına kıyasla koloni oluşturma yeteneğinde değişim olmamıştır. Sonuç olarak, MEG3 ve MEG3b PC-3 prostat kanser hücrelerinin koloni oluşturma kapasitelerini baskılamıştır.



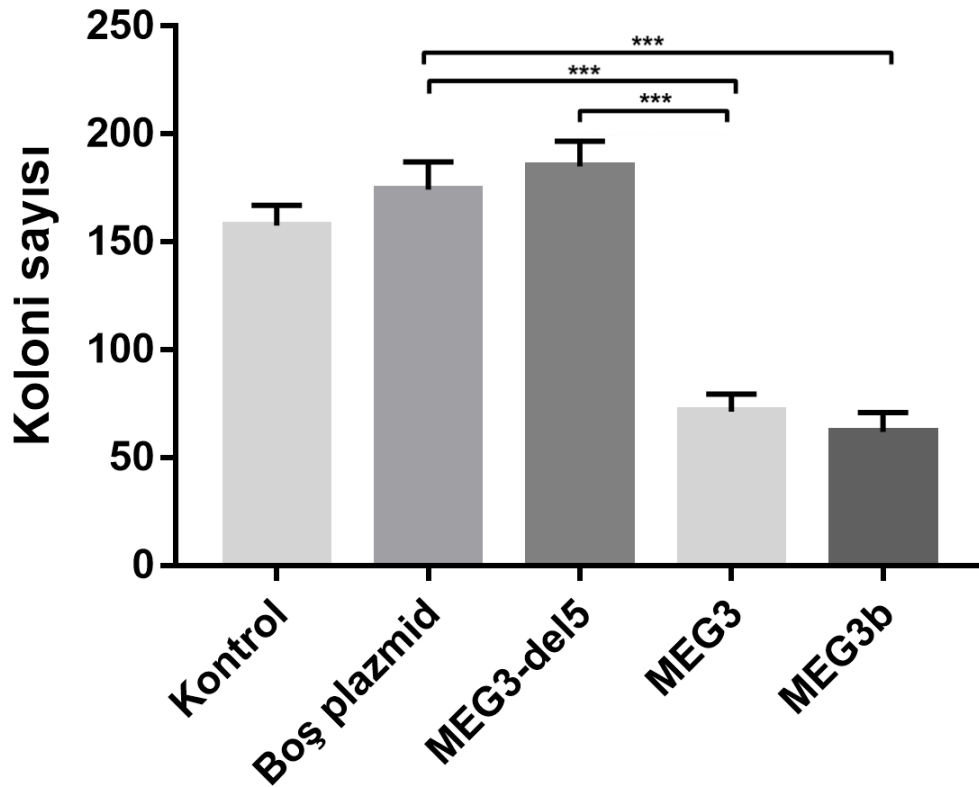
Şekil 4.73. PC-3 prostat kanser hücrelerinde boş, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonlarının hücrelerin koloni oluşturma kapasitesi üzerindeki etkisi. Kontrol; Uygulama yapılmamış, boş plazmid; MEG3 genini içermeyen boş plazmid, MEG3-del5; MEG3 geninin ilk 450 bazlık bölgesinin delesyona uğramış halini içeren plazmid, MEG3; MEG3 genini içeren plazmid, MEG3b; MEG3 izoformunu içeren plazmid.

DU-145 prostat kanser hücre hattına, boş plazmid, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b transfeksiyonunun DU-145 hücrelerinin koloni oluşum yeteneği üzerindeki etkileri Şekil 4.74’de ve transfeksiyon sonrası koloni analiz grafiği Şekil 4.75’de verilmiştir.



Şekil 4.74. Plazmid transfeksiyonlarının DU 145 prostat kanser hücrelerinin koloni oluşturma kapasiteleri üzerine olan etkisi.

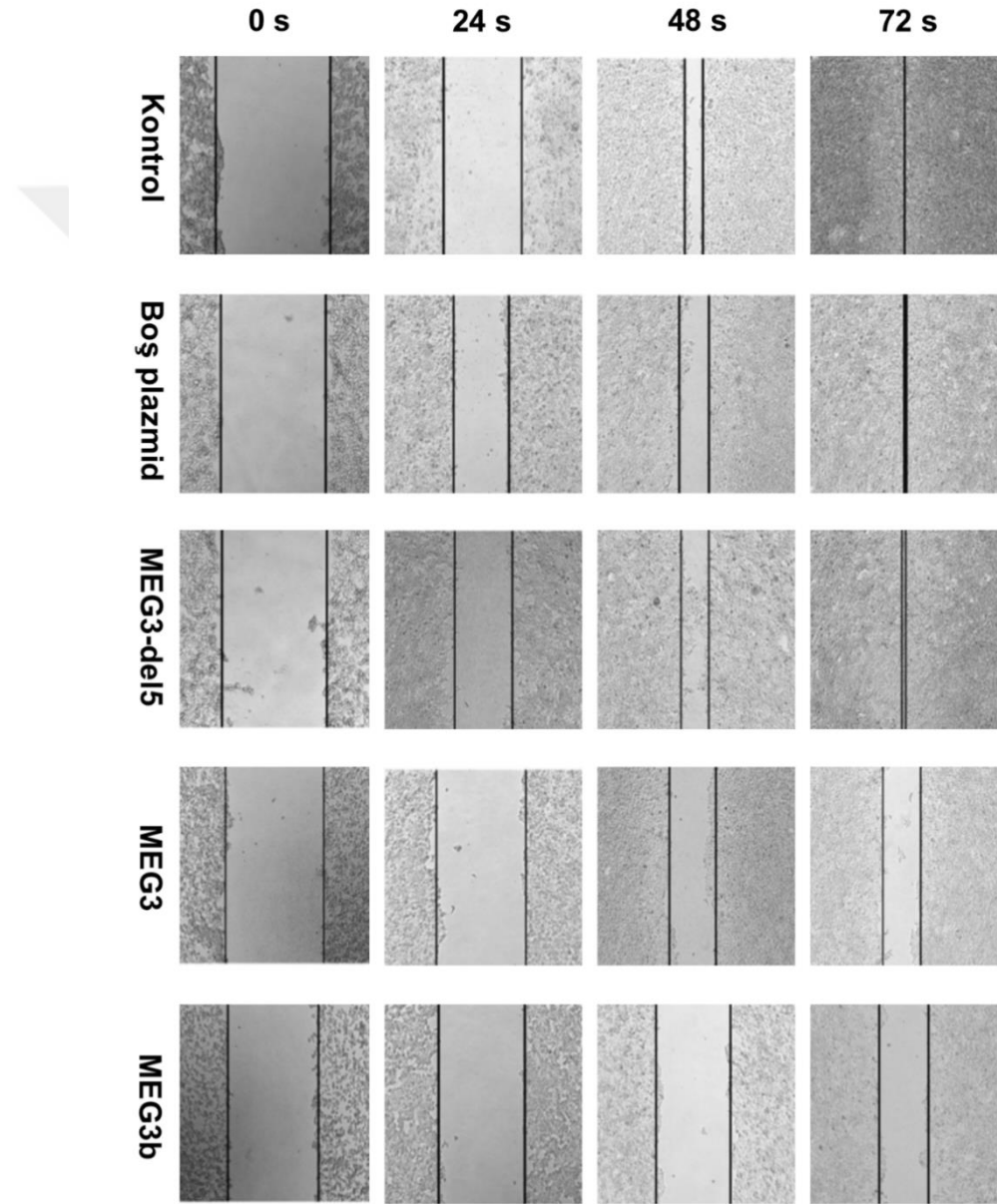
MEG3 ve MEG3b ile transfekte edilen hücre gruplarında kontrol, boş plazmid ve MEG3-del5 plazmidini transfekte edilmiş deney gruplarına kıyasla koloni oluşturma yeteneği büyük oranda baskılanmıştır. Elde edilen bu veriler istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,0001$). MEG3-del5 ile transfekte edilen hücre grubunda kontrol ve boş plazmidle transfekte edilmiş deney gruplarına kıyasla koloni oluşturma yeteneğinde değişim olmamıştır. Sonuç olarak, MEG3 ve MEG3b PC-3 prostat kanser hücrelerinin koloni oluşturma kapasitelerini baskılamıştır.



Şekil 4.75. DU 145 prostat kanser hücrelerinde boş, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonlarının hücrelerin koloni oluşturma kapasitesi üzerindeki etkisi. Kontrol; Uygulama yapılmamış, boş plazmid; MEG3 genini içermeyen boş plazmid, MEG3-del5; MEG3 geninin ilk 450 bazlık bölgesinin delesyona uğramış halini içeren plazmid, MEG3; MEG3 genini içeren plazmid, MEG3b; MEG3 izoformu olan MEG3b genini içeren plazmid.

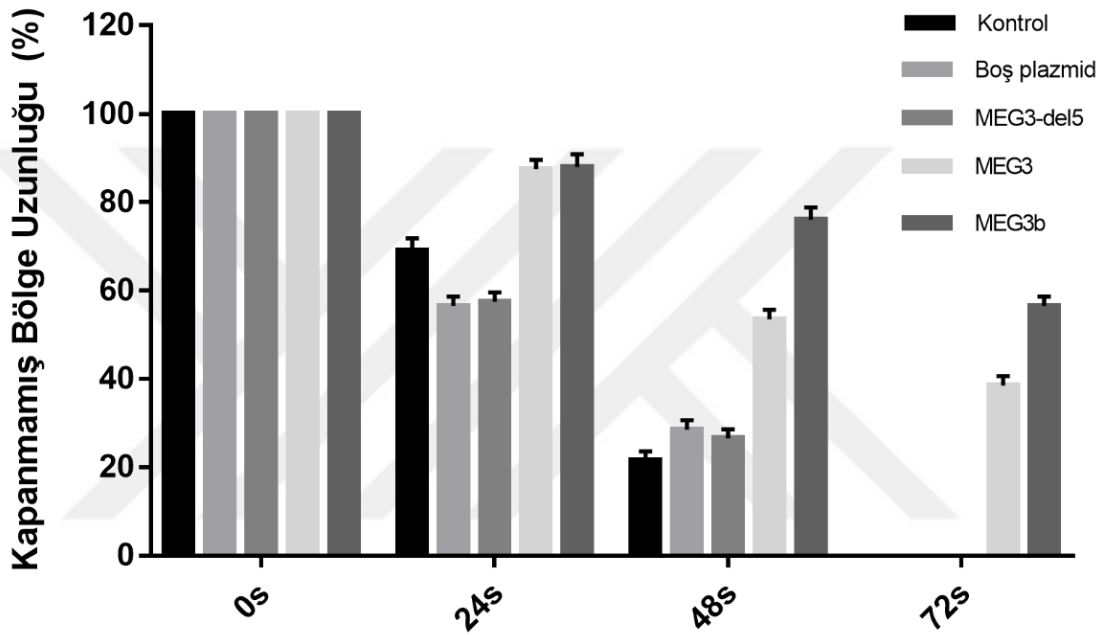
4.12. Plazmid Transfeksiyonlarının Prostat Kanser Hücrelerinin Yara İyileşmesi Üzerine Etkisi

PC-3 prostat kanser hücre hattına, boş plazmid, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b transfeksiyonu sonrasında migrasyon tayini için oluşturulan yaranın kapanma süreci elde Şekil 4.76' da verilmiştir. Yara kapanma sürecinin analizi için yapılan istatistiksel analizler sonucunda elde edilen grafik Şekil 4.77' de verilmiştir.



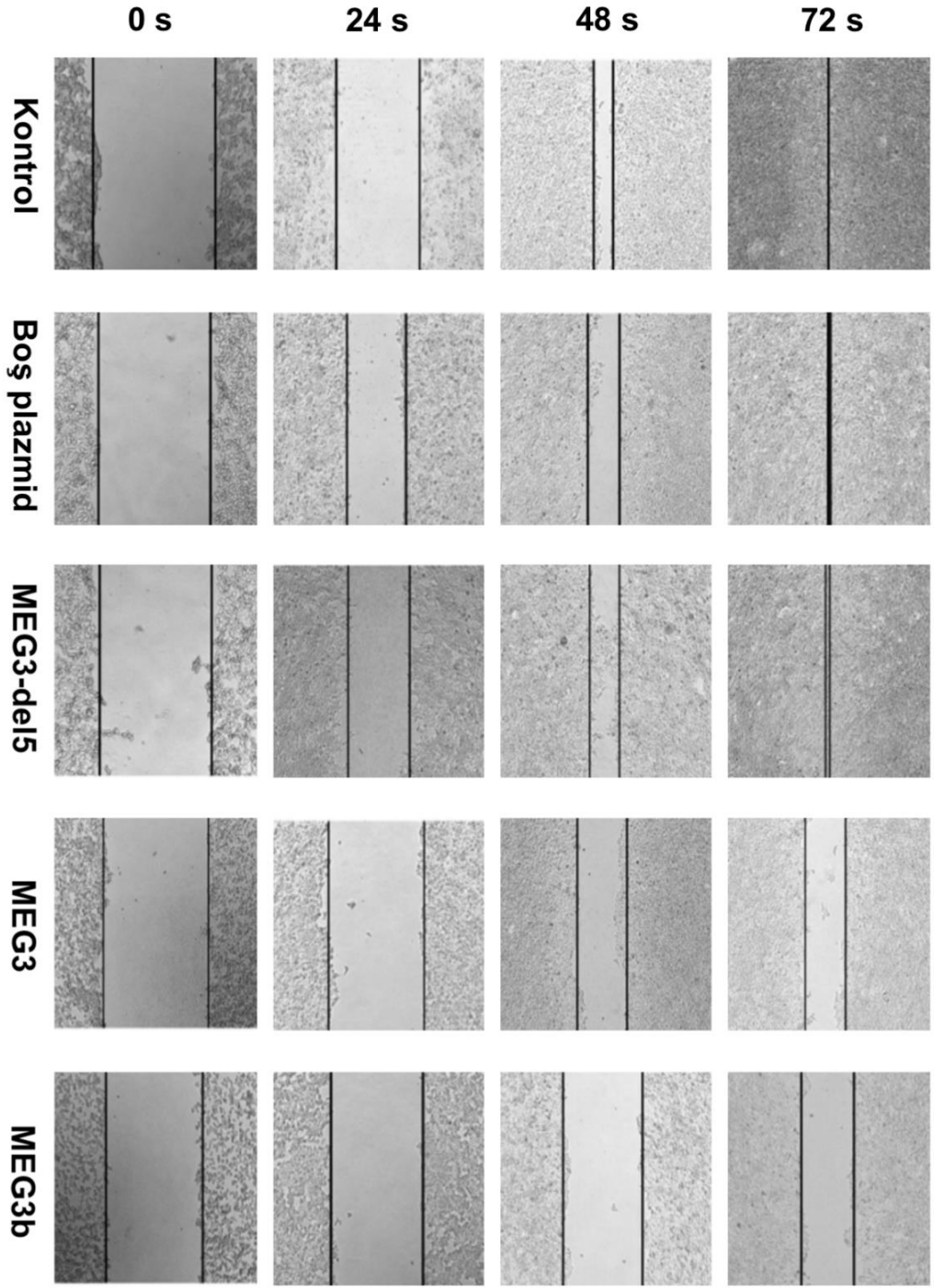
Şekil 4.76. Plazmid transfeksiyonlarının PC-3 prostat kanser hücrelerinin yara iyileştirme kapasiteleri üzerine olan etkisi.

Migrasyon tayini için oluşturulan 24, 48 ve 72 saat aralıklı deney gruplarının tamamında her bir plazmid transfeksiyonu kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlıdır. MEG3 ve MEG3b plazmidleriyle transfekte edilen PC-3 hücre gruplarında oluşturulan yara 24, 48 ve 72 saat ölçümlerine göre kontrol, boş plazmid ve MEG3-del5 ile transfekte edilen hücrelere kıyasla daha geç kapanmıştır. Buradan elde edilen verilere göre MEG3 ve MEG3b transfeksiyonu yapılmış hücrelerde migrasyon hızı azalmıştır. Elde edilen veriler istatistiksel olarak anlamlıdır.



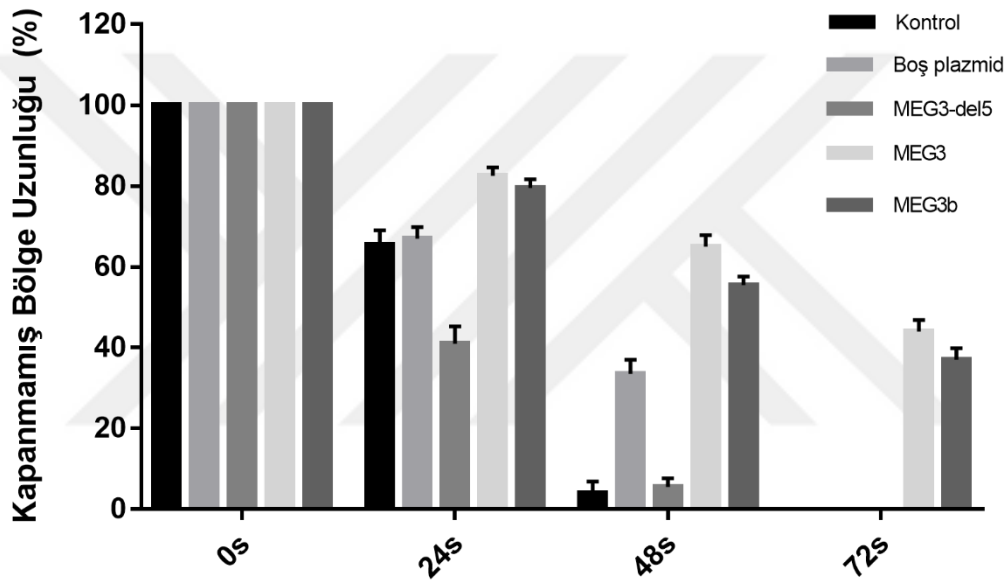
Şekil 4.77. PC-3 prostat kanser hücrelerinde boş, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonlarının hücre yara iyileşme kapasitesi üzerindeki etkisi. Kontrol; Uygulama yapılmamış, boş plazmid; MEG3 genini içermeyen boş plazmid, MEG3-del5; MEG3 geninin ilk 450 bazlık bölgesinin delesyona uğramış halini içeren plazmid, MEG3; MEG3 genini içeren plazmid, MEG3b; MEG3 izoformu olan MEG3b genini içeren plazmid.

DU-145 prostat kanser hücre hattına, boş plazmid, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b transfeksiyonu sonrasında migrasyon tayini için oluşturulan yaranın kapanma süreci elde Şekil 4.78’de verilmiştir. Yara kapanma sürecinin analizi için yapılan istatistiksel analizler sonucunda elde edilen grafik Şekil 4.79’ da verilmiştir.



Şekil 4.78. Plazmid transfeksiyonlarının DU 145 prostat kanser hücrelerinin yara iyileştirme kapasiteleri üzerine olan etkisi.

Migrasyon tayini için oluşturulan 24, 48 ve 72 saat aralıklı deney gruplarının tamamında her bir plazmid transfeksiyonu kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlıdır. MEG3 ve MEG3b plazmidleriyle transfekte edilen DU-145 hücre gruplarında oluşturulan yara 24, 48 ve 72 saat ölçümlerine göre kontrol, boş plazmid ve MEG3-del5 ile transfekte edilen hücelere kıyasla daha geç kapanmıştır. Buradan elde edilen verilere göre MEG3 ve MEG3b transfeksiyonu yapılmış hücrelerde migrasyon hızı azalmıştır. Elde edilen veriler istatistiksel olarak anlamlıdır.



Şekil 4.79. DU 145 prostat kanser hücrelerinde boş, MEG3-del5, MEG3 ve MEG3b plazmid transfeksiyonlarının hücre yara iyileşme kapasitesi üzerindeki etkisi. Kontrol; Uygulama yapılmamış, boş plazmid; MEG3 genini içermeyen boş plazmid, MEG3-del5; MEG3 geninin ilk 450 bazlık bölgesinin delesyona uğramış halini içeren plazmid, MEG3; MEG3 genini içeren plazmid, MEG3b; MEG3 izoformu olan MEG3b genini içeren plazmid.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Prostat kanseri, dünya çapında erkekler arasında en yaygın ikinci ve en agresif beşinci neoplazmdır. Amerika ve Batı Avrupa'da en yaygın kanserdir ve bu bölgelerde yaşayan yaklaşık yedi erkekten birine, yaşamları boyunca prostat kanseri teşhisi konmaktadır (151). Yakın zamandaki GLOBOCAN verilerine göre, 2018 yılında dünya çapında tahmini 1.276.000 prostat kanseri vakası vardı; bu, 29.3/100.000 erkek insidans oranına eşittir ve tüm kanser teşhislerinin %7,1' ini oluşturmaktadır (62). ABD'deki doktorlar, özellikle ürologlar, 1992'de yıllık PSA testini kabul ettikten kısa bir süre sonra, prostat kanseri kaynaklı ölüm oranı düşmeye başlamıştır. PSA taramasının yoğunluğu, prostat kanseri insidansını açıkça etkiledi ve hem sessiz vakaları hem de sonunda metastatik hastalığa ilerleyebilecek birçok vakayı aydınlattı (1, 152).

Cerrahisi başarısız olan erkekler genellikle orta veya yüksek dereceli prostat kanserine sahiptir ve çoğu anti-androjen tedavisi almaya devam eder (153). Yaygın metastatik hastalık kanıtı bulunana kadar anti-androjen tedavisinin başlatılmadığı 1992 öncesi dönemle karşılaştırıldığında, çoğu erkek artık hastalıklarının seyrinde çok daha erken anti-androjen tedavisi almaktadır (154). Ancak, mümkün olduğu kadar erken prostat kanseri bulmaya çalışılmamalı, bunun yerine klinik ilerleme belirtileri gösteren kanserler aranmalı ve bunlar sistemik bir terapi ile erken tedavi edilmelidir (155). Mevcut PSA tarama uygulamaları, kabul edilebilir bir halk sağlığı önlemi olamayacak kadar çok sayıda sessiz hastalık vakasını tanımlamaktadır (156). Ne yazık ki, şu anda mevcut biyolojik belirteçler kimin aktif sürveyans için iyi bir aday olduğunu ve kime daha agresif tedavi önerilmesi gerektiğini belirleyemiyor (157).

Prostat kanseri, geçtiğimiz 170 yıl içinde seçici belirteç yoksunluğu ve tedavi yöntemlerindeki sıkıntılar sebebiyle, nadir görülen bir hastalıktan, en sık teşhis edilen bir kanser türüne dönüşmüştür (158). Tüm bu gelişmeler göz önüne alındığında, prostat kanserinin erken teşhisinde bilinen yöntemlerin yeterli olmadığı ve tedavisinde de kullanılan yöntemlerin sonuç almada kişiden kişiye değişmesi sebebiyle yanlış ölümlere varacak durumlara sebebiyet vermektedir. Bu nedenle prostat kanserinin teşhisinde PSA'nın tespit ettiği geniş ve sorunsuz kitleyi, zorlu tedavi şartlarına gerçekten ihtiyaç duyan kitleye düşürmek ve alternatif tedavi yöntemleri geliştirebilmek için yeni

stratejilerin araştırılması gerekmektedir. Prostat kanserinin oluşumu, ilerlemesi ve hastalığın seyrindeki temel moleküler mekanizmaların aydınlatılması, hastalığın teşhis ve tedavisinde yaşanan zorlukları aşabilecek yeni alternatifler bulunmasına olanak sağlayacaktır.

Normal prostat ve prostat kanserinin transkripsiyonel düzenlenmesi hakkındaki bilgilerimiz, son yirmi yılda muazzam bir şekilde artmıştır. Büyük ölçekli genomik analizler ve fonksiyonel deneyler sayesinde, artık hangi transkripsiyon faktörlerinin prostat homeostazını sürdürmek için önemli olduğunu ve hangilerinin prostat kanserinin başlaması ve ilerlemesinde rol oynadığını biliyoruz (159). Bununla birlikte, çoğu durumda, klinik olarak ilgili genetik arka plan, hastalık evresi veya çevresel bağlamlarda yer alan transkripsiyonel mekanizmalar hakkında kritik bilgilere sahip değiliz (160).

RB1 (RB Transcriptional Corepressor 1) tarafından sentezlenen pRB proteini ve onunla etkileşimde bulunan diğer genler, çeşitli RNA'lar ve proteinler, hücre döngüsünün ilerlemesinde kritik bir rol oynamaktadır ve RB1 yolağı birçok insan kanserinde bozulmuştur (161). Mitojenik veya onkojenik bir sinyalin yokluğunda, hipofosforile edilmiş pRb, hücre döngüsünün duraksamasına neden olan birkaç hücre döngüsü düzenleyici genin ifadesini bloke eden, transkripsiyon faktörlerinin E2F ailesi ile bir kompleks oluşturur. RB1'in genetik delesyonu, mutasyonu veya inaktivasyonu, E2F komplekslerinin oluşmasını engeller, böylece hücre döngüsü ilerlemesini ve proliferasyonunu destekler (135). pRb' nin bu kanonik işlevi iyi karakterize edilmiş olmasına rağmen, son çalışmalar pRb' nin apoptoz, farklılaşma ve epitelden mezenkime geçiş gibi ek hücrel süreçlerin düzenlenmesinde rol oynadığını ortaya koymuştur (34, 131). Ancak, hem E2F'ye bağlı hem de bağımsız mekanizmalar, RB1'in bu kadar çeşitli hücrel süreçleri nasıl kontrol edebildiğini henüz tam olarak açıklayamamaktadır.

Kodlamayan RNA'lar da transkripsiyon faktörleri ve diğer proteinler gibi hücrel süreçlerde düzenleyici rollere sahiptir. LncRNA'lar, protein kodlayan mRNA'larla bazı benzerlikler paylaşan, ancak genellikle proteinleri kodlamayan benzersiz bir RNA sınıfıdır. Bir zamanlar transkripsiyonel gürültü olarak kabul edilirken, son on yılın araştırma verileri LncRNA'ları önemli biyolojik rollere sahip yaygın bir ncRNA sınıfı olarak vurgulamıştır (162, 163). LncRNA'lar genellikle kanserde anormal şekilde ifade edilir. Olası mekanizmalar arasında onkojenik mutasyonlar, SNP'ler, kopya sayısı

varyasyonu (CNV) ve anormal DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları bulunur (164, 165). Özellikle kanser için en kapsamlı lncRNA kataloglarından biri, normal ve tümör dokularından ve hücre dizilerinden elde edilen 7256 RNA-seq verisiyle oluşturulan miTranscriptome kataloğudur. Bu katalogda, prostat kanserine özgü 727 lncRNA dahil olmak üzere 58648 lncRNA tanımlanmıştır (162). Prostat kanseri tümörünün ve iyi huylu dokunun RNA ifade profillerini karşılaştıran transkriptomik çalışmalar, PCAT1, PCAT14, PVT1, PCAN-R1 ve PCAN-R2 dahil olmak üzere yüzlerce prostat kanseriyle ilişkili lncRNA'yı ortaya çıkarmıştır (165, 166). Genom çapında fonksiyonel ekranlarla prostat kanseri eşleşmesinde düzensiz ek lncRNA'ların keşfi, prostat kanserinde klinik olarak etkili lncRNA'ların geniş bir repertuarını ortaya çıkaracaktır.

MEG3 (Maternally Expressed Gene 3), 14q32 kromozomal bölgede yer alan ve birçok normal dokuda ifade gösteren bir lncRNA'dır. Bununla birlikte, çoğu insan tümöründe ve tümörden türetilmiş hücre hatlarında sıklıkla ifadesi tamamen kaybolmuş veya mutasyona uğramış ya da düşük seviyede ifade edilmektedir (29, 126). Yüksek MEG3 ifade seviyesinin transfeksyonla sağlanması, tümör hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ederken apoptozu ve otofajiyi de indüklemektedir. Dolayısıyla bu bulgular, MEG3'ün tümör baskılayıcı aktiviteye sahip lncRNA' lardan biri olduğunu göstermektedir(129). Bu tez çalışmasında 20 çeşit sağlıklı insan dokusu ve 30 farklı kanser ve normal hücre hattı kullanarak daha geniş bir MEG3 gen ifade profili oluşturuldu. Bu veriye göre normal doku ve hücrelere kıyasla neredeyse tüm kanserler hücrelerinde MEG3 ifadesi ya kaybolmuş ya da çok düşük seviyededir. Elde edilen MEG3 gen ifade profili sayesinde; PNT1A normal prostat hücre hattı ve normal prostat dokuya kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük MEG3 ifadesine sahip PC-3 ve DU 145 prostat kanser hücreleri çalışmamızda kullanmak üzere seçildi ($p < 0,0001$).

Daha önceki bir çalışmamızda osteosarkom hücrelerinde miR-664'ü baskılayarak MEG3 ifadesinin arttığını ve bu artışın osteosarkom hücrelerinin migrasyonunu baskıladığını göstermiştik (167). MEG3 ifade düzeyinin kanser hücrelerinin çoğalması, göçü ve apoptozunda etkili olabileceğini destekleyen bir çalışma olmuştur. Bu çalışmamızda ise prostat kanser hücrelerinde MEG3 geninin ifade seviyesini plazmid transfeksyonu ile artırmayı hedefledik. Artan MEG3 ifadesinin hem RB1 ve hedef gen ifadeleri üzerindeki etkisi hem de prostat kanser hücrelerinin çoğalması ve migrasyonu üzerindeki etkisi araştırıldı.

LncRNA'ların birincil dizisinin kararlılığı azdır ancak ikincil ve üçüncül yapısının kararlılığı çok yüksektir. Yapılan çalışmalarda lncRNA'nın ikincil yapısının biyolojik işlevleri ile ilişkili olabileceği bildirilmektedir (168). MEG3 alternatif kırılıma nedeniyle MEG3b de dahil olmak üzere en az 12 farklı izoforma sahiptir. MEG3b ve MEG3 farklı ekzonlar içerdikleri için ikincil yapıları benzer motifler içerse de bazı katlanma motifleri birbirlerinden farklılık göstermektedir (125). Bu nedenle MEG3b, MEG3'ten farklı biyolojik işlev gösterebilme potansiyelini sahiptir. Aynı zamanda ikincil yapılarındaki farklı motifler, etkileşime girebilecekleri genler bakımından da farklılıklara neden olacaktır. Bu nedenle bu tez çalışmasında MEG3 ile beraber MEG3b'nin de plazmid transfeksiyonu ile ifadesi seviyesi artırıldı. Artan MEG3b ifadesinin de hem RB1 ve hedef gen ifadeleri üzerindeki etkisi hem de prostat kanser hücrelerinin çoğalması ve migrasyonu üzerindeki etkisi araştırıldı.

Bu çalışmada öncelikle MEG3, RB1 ve RB1 hedefi olan 17 genin prostat kanser hücre hatlarında ve sağlıklı insan prostat dokusunda gen ifade seviyeleri tespit edildi. Buradan elde edilen sonuçlara göre, MEG3 ve RB1 sağlıklı dokuya göre prostat kanser hücrelerinde anlamlı bir şekilde düşük ifadeye sahiptir. Literatürde MEG3'ün prostat kanserindeki rolü ile ilgili çok kısıtlı çalışma bulunmaktadır. Luo ve arkadaşları 2015 yılında (31), Wu ve arkadaşları 2019 yılında (169) ve son olarak Zhou ve arkadaşları 2020 yılında (170) yaptıkları çalışmalarda MEG3 geninin prostat kanserinde düşük ifadeye sahip olduğunu ve bununla hücre proliferasyonunu artırdığını göstermişlerdir. Benzer şekilde, bazı çalışmalarda prostat kanserinde RB1 ifadesinin kaybolduğu veya çok düşük olduğu tespit edilmiştir (171, 172). Tüm bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar bulgularımızı desteklemektedir. Kruer ve arkadaşları ise akciğer kanserinde yaptıkları bir çalışmada RB1-DNMT1(DNA methyltransferase 1) yolağının MEG3 ifade kaybına neden olduğunu ve bunun da akciğer kanser hücrelerinin çoğalmasını tetiklediğini göstermiştir (40). Bu çalışma aynı zamanda RB1 ve MEG3 arasındaki ilişkiyi gösteren ilk ve tek çalışmadır. Çalışma konumuzu oluştururken bu ilişkiyi temel alarak MEG3 genin tümör baskılayıcı olması, önemli hücre döngü proteinleriyle doğrudan ilişkisi olması, RB1 hedef genleriyle de etkileşim halinde olabileceğini düşündürmüştür.

MEG3'ün hücre çoğalmasını baskıladığı mekanizmalar halen araştırılmaktadır. Zhou ve arkadaşları başlangıçta MEG3'ü bir p53 aktivatörü olarak karakterize etmiş ve MEG3'ün p53 hedef geni GDF15'in ifadesini artırdığını bulmuştur. İlginç bir şekilde, bu çalışma

ayrıca MEG3'ün hücre çoğalmasını p53'ten bağımsız bir şekilde baskıladığını göstermiştir. Bu da MEG3'ün hücre çoğalmasında ek bir yolla işlev gördüğünü göstermiştir (144). Lu ve arkadaşları ise MEG3'ün hücre proliferasyonunu en azından kısmen p53'ün aktivasyonu ile baskıladığını gösterdi (173). Mondal ve arkadaşları tarafından daha yeni bir çalışmada MEG3'ün, RNA-DNA tripleks yapılarının oluşumu yoluyla kromatini hedefleyerek, TGF-B sinyal yolağı spesifik olarak düzenlediğini gösterdi. Bu üçlü yapılar, MEG3'ün kromatin ile etkileşime girebildiği ve çeşitli hedef genlerin ifadesini etkileyebileceği genel bir mekanizmayı temsil edebilir (174). Bu çalışmalar, pRb ve p53 düzenlemesi ile TGF- B yolağı gibi birçok aşağı yolak arasında ek bir bağlantı sağlamaktadır. Aynı zamanda MEG3 ve RB1 genleri p53, MDM2 gibi birçok genle ortak ilişkili oldukları için seçilen 17 gen ile MEG3 arasında da bir etkileşim potansiyeli bulunmaktadır. Sonuç olarak tüm bu veriler ışığında biyoinformatik veri tabanları kullanarak RB1 geninin hedefi olan ve literatürde daha önce MEG3 geni ile aralarında herhangi bir ilişki bulunmayan 17 farklı gen çalışmaya dahil edildi ve MEG3 overekspresyonunun bu genlerin ifade düzeyleri üzerindeki etksi araştırıldı.

ABL1 (Abelson tirozin-protein kinaz 1), reseptör olmayan bir tirozin kinazıdır (175). Çoğunlukla Philadelphia kromozomunu barındıran lösemilerde rol oynamasıyla bilinir. Son çalışmalar, ABL1'in ayrıca herhangi bir füzyon onkoproteini içermeyen bağımsız bir mekanizma ile melanom, göğüs kanseri, yumurtalık kanseri ve akciğer kanseri gibi katı tümörlerin gelişiminde önemli bir rol oynadığını göstermiştir (176). Biriken kanıtlar, ABL1 aktivasyonunun prostat kanserinin ilerlemesini desteklediğini göstermektedir(176). Bu çalışmada ise PC-3 ve DU 145 prostat kanser hücrelerinde plazmid transfeksiyonuyla MEG3 ve MEG3b ifadeleri artırıldı. Her iki hücrede de artan MEG3 ve MEG3b ifadesi, ABL1 gen ifadesini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde baskılamıştır. Prostat kanserinde ABL1 ifadesinin baskılanması için kullanılmak üzere geliştirilen dasatinib ve bosutinib Abl kinaz inhibitörleri klinik test aşamasındadır (177, 178). Bu çalışmalar prostat kanserinde tedavide ABL1'in baskılanmasının ne kadar kritik olduğunu göstermektedir. Tüm bu gelişmelere rağmen ABL1 geninin ifade düzensizliğine neden olan moleküler mekanizma hala aydınlatılamamıştır. Literatürde MEG3 ve ABL1 geni arasında henüz herhangi bir ilişki ortaya konulmamıştır. Bu bakımdan bulgularımız prostat kanserinde ABL1 ifadesini baskılayan moleküler mekanizmanın aydınlatılmasına katkı sunacak ve hastalığın tedavisinde yeni bir alternatif oluşturabilecektir.

ATF2 (Activating Transcription Factor 2), JUN ve FOS transkripsiyon faktör ailelerinin üyeleriyle heterodimerleşen ATF/CREB bZIP transkripsiyon faktörleri ailesinin bir üyesidir (179). ATF2 aktivasyonu, çeşitli doku tiplerinde kanser oluşumunda rol oynayan siklin A, siklin D ve MMP-2 dahil olmak üzere çeşitli transkripsiyonel hedeflerin ifade artışına neden olur (180). ATF2 prostat kanseri, melanom, küçük hücreli olmayan akciğer karsinomu ve pankreas kanserinde önemli bir onkojen olarak görev yaparken (181-183), ATF2 habisi olmayan deri ve meme kanserinde tümör baskılayıcı fonksiyonlar sergiler (181, 184). Bu durum kanser biyolojisinde ATF2'nin değişken bir role sahip olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, ATF2 ifadesinin lncRNA'lar tarafından düzenlenip düzenlenmediği belirsizliğini korumaktadır. Bu çalışmada ATF2 gen ifadesinin MEG3 ve MEG3b tarafından değiştiği gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, DU 145 hücrelerinde lncRNA MEG3 ve MEG3b'nin overekspresyonu ATF2 ifadesini artırırken, PC-3 hücrelerinde MEG3 overekspresyonu ATF2 ifadesini etkilememiş ancak MEG3b overekspresyonu ATF2 ifade seviyesini düşürmüştür. DU 145 ve PC-3 hücrelerindeki MEG3, MEG3b overekspresyonunun ATF2 üzerindeki farklı etkisi, her iki hücredeki RB1 durumundan kaynaklanıyor olabilir. Hem PC-3 hem de DU-145 androjen bağımsız prostat kanser hücre hattıdır. Ancak her iki hücre işlevsel p53 ve RB1 durumları nedeniyle birbirlerinden ayrılmaktadır. DU 145 prostat kanser hücre hattında, RB1 geninden sentezlenen mRNA, 21. ekzonunun 105 nükleotidini içermediği için daha kısa uzunlukta bir Rb proteini sentezlenir (185). Rb proteini bu nedenle DU 145 hücrelerinde işlevsel değildir. ATF2 aynı zamanda RB1 ile karşılıklı etkileşime sahiptir (186). Bu çalışmalar ATF2 ifadesinin işlevsel Rb proteini varlığında MEG3 ve MEG3b ifade artışından farklı etkilenme nedenini açıklayabilir. DU 145 hücrelerinde, MEG3 ve MEG3b overekspresyonuyla birlikte işlevsel Rb protein seviyesi de artırılarak ATF2 seviyesi incelenebilir. Ayrıca DU 145 hücrelerinde p53 işlevseldir. PC-3 hücre hattında ise durum bunun tam tersidir. PC-3 işlevsel Rb proteinine sahipken, p53 mutasyona uğramıştır (187). Maekawa ve ark. fare tümör modelleriyle yaptıkları bir çalışmada p53'ün mutant olduğu durumda ATF2'nin tümör baskılayıcı rol oynadığını belirtmiştir (181). PC-3 hücrelerinde MEG3 ve MEG3b ifade artışının ATF2 ifadesinde farklı etki göstermesinin nedeni de hücrelerde p53'ün mutasyona uğraması olabilir. Sonuç olarak prostat kanserinde MEG3 geninin ATF2 ile olan ilişkisi RB1 ve P53 ile genişletilerek çalışılmalıdır.

BAG1 (BAG Cochaperone 1), hücre sinyalinde, ısı şok yanıtında, hücrenin hayatta kalması ve apoptozunda rol oynayan çok fonksiyonlu bir gendir (188). BAG-1, tümör oluşumunda önemli bir hayatta kalma yanlısı gendir. Birçok kanserde BAG1 ifadesi düzensizdir ve çeşitli hücre tiplerinde apoptozu engellediği gösterilmiştir (189). Krajewska ve ark. BAG1 ifadesinin prostat kanserinin agresif davranışını artırdığını göstermiştir(190). Bu çalışmada PC-3 prostat kanser hücre hattında MEG3 overekspresyonu BAG1 ifade düzeyini artırmıştır. Ancak PC-3 hücrelerinde MEG3b overekspresyonu ile DU 145 hücrelerinde MEG3 ve MEG3b overekspresyonu BAG1 gen ifadesinde anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır. PC-3 ve DU 145 hücrelerinde MEG3 overekspresyonlarının BAG1 ifadesi üzerindeki farklı etki göstermesinde her iki hücredeki işlevsel Rb ve p53 farkı neden olmuş olabilir. Bu nedenle BAG1 ve MEG3 arasındaki etkileşimin daha detaylı çalışılması gerekmektedir.

CASP8'in (Caspase 8) hücre ölüm sinyaliyle indüklenen apoptozun başlamasında rol oynadığı bilinmektedir. Bu nedenle, CASP8 ifadesinin artırılması, kanser tedavisinde etkili bir alternatif olabilir (191). Bu çalışmada prostat kanser hücrelerinde artan MEG3 ifadesi CASP8 ifadesini istatistiksel olarak anlamlı bir düzeyde artırmıştır. Buna rağmen DU 145 hücrelerinde MEG3b ifade artışı CASP8 ifadesinde anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır. MEG3 ve MEG3b farklı birer ekzon içerdikleri için ikincil yapılarında farklı katlanmalar oluşmaktadır(125). Bu durumda MEG3 ve MEG3b'nin CASP8 ile doğrudan veya dolaylı etkileşiminde bu farklı motiflerin hedef ürünlerdeki farklılığa neden olmasından kaynaklanıyor olabilir. Sonuç olarak literatürde MEG3 ve CASP8 arasında henüz herhangi bir etkileşim bulunmamaktadır. Elde ettiğimiz sonuç CASP8 ve MEG3 arasında doğrudan veya dolaylı bir şekilde etkileşim olabileceğini göstermektedir.

CDK2 (Cyclin Dependent Kinase 2), Ser/Thr kinazların sikline bağımlı kinaz ailesinin bir üyesidir ve hücre döngüsündeki düzenleyicilerin önemli bir bileşenidir (192). Cdk2-siklin E kompleksi, hücrelerin G1'den S fazına geçişi için gereklirken, Cdk2 ve siklin A arasındaki bağlanma, S fazı boyunca ilerlemek için gereklidir(193). Lu ve ark. prostat kanserinde androjen bağımlı ve bağımsız hücrelerde CDK2 gen ifadesini incelemiştir. Bu çalışmaya göre androjen bağımsız prostat kanser hücresi PC-3'te CDK2 protein ve mRNA ifade düzeyi androjen muamelesi öncesi ve sonrasında belirgin bir düzeydedir ve hücre çoğalmasını tetiklemektedir (194). Bu çalışmada kullandığımız hücreler PC-3 ve DU 145 androjen bağımsız prostat kanser hücreleridir ve çok düşük seviyede AR

ifadesine sahiptir. Çalışmamızda normal prostat dokuya göre PC-3 ve DU 145 hücrelerinde CDK2 gen ifadesi daha düşük seviyededir ama bu bulguyla örtüşecek şekilde her üç örnekte de belirgin bir ifade seviyesi vardır. LNCaP, PC-3 ve DU 145'in aksine androjen bağımlı prostat kanser hücre hattıdır. MEG3 ve MEG3b'nin plazmid transfeksiyonuyla ifade artışı sonucunda CDK2 ifadesinin de anlamlı bir seviyede arttığı bulunmuştur. Literatürde daha önce MEG3 ve CDK2 arasında doğrudan veya dolaylı bir ilişki kurulmamıştır. Bu bakımdan elde edilen veriler CDK2'nin ifade seviyesine etki eden moleküler mekanizmanın aydınlatılmasına katkı sunacaktır. Bununla birlikte Lu ve ark. belirttiği androjen bağımlı ve bağımsız hücrelerdeki CDK2 düzeyindeki farklılık nedeniyle, MEG3 overekspresyonunun CDK2 üzerindeki etkisini LNCaP androjen bağımlı hücre hattında da incelemek farklı bir bakış açısı sunabilir.

CHEK1 (Checkpoint Kinase 1), çeşitli hücre döngüsü kontrol noktalarına katılan, replikasyon sırasında DNA bütünlüğünün korunmasında rol alan ve DNA tamir sürecinin anahtar düzenleyicisi olan bir gendir (195). Yüksek CHEK1 ifadesi birçok kanser türünde tanımlanmıştır (196, 197). Bu çalışmada da CHEK1 ifade düzeyi PC-3 ve DU 145 prostat kanser hücrelerinde ve normal prostat dokuda analiz edildi ve kanserde yüksek gen ifadesine sahip olduğu bulundu. Prostat kanserinde MEG3 ile CHEK1 arasında potansiyel bir ilişki olup olmadığını araştırmak için PC-3 ve DU 145 hücrelerinde MEG3 ve MEG3b ifadeleri artırıldı. Buna göre, PC-3 hücrelerinde MEG3 ifade artışı CHEK1 ifade düzeyinde anlamlı bir artışa neden olmuştur. Ancak MEG3b overekspresyonu CHEK1 ifadesinde anlamlı bir düşüş sağlamıştır. MEG3 ve izoformu MEG3b farklı birer ekzon içermektedir ve bu da farklı ikincil yapı ve farklı etkileşimlere neden olmaktadır (125). Bu nedenle CHEK1 ifadesi üzerinde MEG3 ve izoformu MEG3b overekspresyonunun farklı etki göstermesindeki neden ikincil yapılarının farklı olmasından kaynaklanmış olabilir. DU 145 hücrelerinde hem MEG3 hem de MEG3b overekspresyonu ile CHEK1 ifadesinin anlamlı bir şekilde artmıştır. PC-3 ve DU 145 hücrelerinde MEG3b overekspresyonlarının CHEK1 ifadesi üzerindeki farklı etki göstermesinde her iki hücredeki işlevsel Rb ve p53 farkı neden olmuş olabilir. Gottifredi ve ark. p53'ün E2F1 aracılı CHEK1 ifadesini baskıladığını göstermiştir (198). Bir başka çalışmada Witkiewicz ve ark. işlevsel RB1 yokluğunda CHEK1 baskılama mekanizmasının işlevsel RB1 durumuna göre daha az etkili olduğunu belirtmiştir (199). Bu durum MEG3b ifade artışı sonucunda, normal p53 ve mutant Rb proteinine sahip DU 145 hücrelerinde CHEK1 ifade artışını; işlevsel Rb ve mutant p53 proteinine sahip PC-3 hücrelerinde CHEK1 ifadesinin

düşüşünü açıklayabilir. Sonuç olarak, elde edilen bu veriler, MEG3 ve MEG3b ile CHEK1 arasında potansiyel bir etkileşim olabileceğini göstermiştir.

E2F1(E2F Transcription Factor 1), apoptoz, hücre göçü ve invazyonu, DNA onarımı, farklılaşmasının yanı sıra hücre döngüsünü içeren bir dizi hücresel süreçte yer alan bir transkripsiyon faktörüdür (200, 201). Prostat kanserinde E2F1 hem mRNA hem protein düzeyinde yüksek ifadeye sahiptir (202). Normal prostat doku, PC-3 ve DU 145 prostat kanser hücrelerinde yaptığımız E2F1 gen ifade analiz sonuçlarımız da bu çalışmayla örtüşmektedir. E2F1 ifadesi prostat kanser hücrelerinde normal prostat dokuya kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur. Bununla birlikte, PC-3 ve DU 145 prostat kanser hücrelerinde MEG3 ve MEG3b overekspresyonu, E2F1 ifade seviyesini artırmıştır. Literatürde henüz MEG3 ve E2F1 arasında bir etkileşim bildirilmemiştir. E2F1 kanser biyolojisinde hem tümör baskılayıcı hem de onkojenik rol oynayan bir transkripsiyon faktörüdür (203). MEG3 geni de tümör baskılayıcı bir lncRNA olarak kabul edilmektedir. Bu bağlamda prostat kanserinde MEG3 overekspresyonunun E2F1'in tümör baskılayıcı rolüne katkıda bulunduğu düşünülebilir. Elde edilen sonuçlar, MEG3 ile E2F1 arasında doğrudan veya dolaylı bir etkileşim olabileceğini göstermektedir.

E2F2 (E2F Transcription Factor 2), G1'den S fazına geçişin bir düzenleyicisi olarak iyi karakterize edilmiş E2F transkripsiyon faktörleri ailesinin bir üyesidir (204) . E2F1 ve E2F2, hücre döngüsü kontrolünde ve kanser biyolojisinde karmaşık bir role sahiptir. E2F2 de tıpkı E2F1 gibi tümör baskılayıcı veya onkojenik olarak ikili davranış sergiler (205). Bu çalışmada PC-3 ve DU 145 prostat kanser hücre hatlarında plazmid aracılı MEG3 ve MEG3b overekspresyonu gerçekleştirilerek E2F2 gen ifadesi üzerindeki etkisi araştırıldı. MEG3 ve MEG3b overekspresyonu PC-3 hücre hattında E2F2 ifade seviyesini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırırken, DU 145 hücrelerinde E2F2 ifadesini anlamlı bir şekilde düşürmüştür. Her iki prostat kanser hücre hattında MEG3 overekspresyonunun farklı etki göstermesinin başlıca sebebi PC-3 hücre hattında normal Rb ve mutant p53 varken DU 145 hücre hattında mutant Rb ve normal p53 ifadesinin olması olabilir. Çünkü Tsantoulis ve ark. E2F'lerin ikili rolünün, E2F aktivite seviyesine bağlı olsa da, aynı zamanda pRb ve p53'ün varlığı veya yokluğundan da büyük ölçüde etkilendiğini belirtmiştir (206). Bu durumun aydınlatılabilmesi için PC-3 hücre hattında işlevsel p53 ve DU 145 hücre hattında işlevsel Rb düzeyi artırılarak MEG3

overekspresyonunun E2F2 üzerindeki etkisi araştırılabilir. Literatürde henüz MEG3 ve E2F2 arasında bir etkileşim olduğuna dair herhangi bir çalışma yoktur. Sonuç olarak elde edilen bulgular E2F2 düzenlenme mekanizmasının aydınlatılmasına katkı sağlayabilir.

GRB2 (Growth Factor Receptor Bound Protein 2), EGFR'ye bağlanarak fosforilasyonunu kolaylaştıran ve AKT/ERK sinyal yolağının transdüksiyonunda yer alan bir adaptördür (207). GRB2 ve sinyal transdüksiyonunun, hücre çoğalmasını ve hücre motilitesini artırdığı ve hücre döngüsünün kontrolünün kaybolmasına katkıda bulunduğunu bilinmektedir. Bununla birlikte yüksek GRB2 gen ifadesi kanser ilerlemesi ve kötü prognozu ile ilişkilidir (208). Sonuç olarak, kanserde GRB2 gen ifade seviyesinin baskılanması önemli bir terapötik hedef olabilir. PC-3 ve DU 145 prostat kanser hücre hatlarında plazmid transfeksiyonu ile MEG3 ve MEG3b ifade seviyeleri artırılarak GRB2 ifade düzeyi üzerindeki etkisi araştırıldı. PC-3 prostat kanser hücre hattında, MEG3 ve MEG3b overekspresyonu sonucunda GRB2 gen ifade düzeyi anlamlı bir şekilde azalmıştır. Benzer şekilde DU 145 prostat kanser hücrelerinde de hem MEG3 hem de MEG3b overekspresyonu GRB2 gen ifade düzeyini anlamlı bir şekilde azaltmıştır. Sonuç olarak MEG3 ve MEG3b overekspresyonun GRB2 ifade düzeyini anlamlı bir seviyede düşürmesi prostat kanser hücrelerinin çoğalması ve göçünün baskılanmasında etkili olabilir. Bu bakımdan elde ettiğimiz veriler literatürde az sayıdaki GRB2 prostat kanseri ilişkisine de katkı sağlayacaktır.

JUN (AP-1 Transcription Factor Subunit) hücre proliferasyonu, apoptoz, hayatta kalma, tümörijeniz gibi çok sayıda hücresel süreçte rol alan transkripsiyon faktörü AP-1'in bileşenlerinden biridir (209, 210). Aktive edilmiş c-JUN, onkogeneze ve kanser ilerlemesinin yanı sıra aşırı ifadesi apoptozu tetiklemektedir (211). Kanser biyolojisindeki bu birbirine zıt JUN etkisi, hücreden hücreye ve AP-1'i aktive eden moleküllerin özelliklerine göre değişiklik gösterir. Bu tez çalışmasında PC-3 ve DU 145 prostat kanser hücre hatlarında plazmid aracılı MEG3 ve MEG3b overekspresyonunun JUN gen ifadesi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. PC-3 hücrelerinde MEG3b overekspresyonu JUN ifade düzeyinde anlamlı bir değişiklik yapmamıştır. Ancak MEG3 overekspresyonu JUN ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış sağlamıştır. MEG3 ve izoformu MEG3b farklı birer ekzon içermektedir ve bu da farklı ikincil yapı ve farklı etkileşimlere neden olmaktadır (125). Bu nedenle JUN gen ifadesi üzerinde MEG3 ve izoformu MEG3b overekspresyonunun farklı etki göstermesindeki neden ikincil yapılarının farklı

olmasından kaynaklanmış olabilir. DU 145 hücrelerinde hem MEG3 hem de MEG3b overekspresyonu ile JUN ifadesinin anlamlı bir şekilde artmıştır. MEG3 geni tümör baskılayıcı bir lncRNA olarak kabul edilmektedir. Bu bağlamda prostat kanserinde MEG3 overekspresyonunun JUN'un apoptoz başlangıcındaki rolüne katkıda bulunduğu düşünülebilir. Literatürde henüz MEG3 ve JUN arasında doğrudan veya dolaylı bir etkileşim üzerine herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bulgularımız JUN'un apoptoz tetikleme sürecindeki moleküler mekanizmanın aydınlatılmasına katkı sunabilir.

KAT2B (Lysine Acetyltransferase 2B), TGF- β sinyal yolağında önemli bir histon asetiltransferaz (HAT) epigenetik faktördür (212). KAT2B, histonların modifikasyonu için açığa çıkan lizinleri asetile edebilir. Aynı zamanda hücre büyümesi veya farklılaşmasında rol alan birçok diziye özgü faktöre bağlanan önemli bir nükleer epigenetik faktördür (213). Bunun yanı sıra prostat kanserinde, KAT2B androjen reseptör sinyalinin düzenlenmesi için ko-aktivatör rolü oynamaktadır (214). Bu çalışmada, normal prostat dokusuna kıyasla DU-145 ve PC-3 hücre hatlarında KAT2B ifadesi düşük bulunmuştur. Transfeksiyondan sonra, DU-145 ve PC-3 hücre hatlarında MEG3 ve MEG3b'nin ifadesindeki artış, her iki hücre hattında da KAT2B geninin ifadesinde artışa neden olmuştur. KAT2B ile MEG3 arasındaki ilişkiye dair literatürde herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu bağlamda bulgularımız MEG3 ve KAT2B arasında doğrudan veya dolaylı bir etkileşim olabileceğini göstermektedir.

MAPK8 (Mitogen-Activated Protein Kinase 8), JNK ailesinin bir üyesidir. Cilt tümörü gelişimini baskılayıcı bir role sahiptir (215). Son zamanlarda alzheimer hastalığı, felç, obezite ve tip II diyabet gibi hastalıkların pato-fizyolojisinde rol oynadığı da gösterilmiştir (216). Bunların yanı sıra MAPK8'in prostat kanserinde farklı yollar üzerinden hem tümör baskılayıcı hem de onkogenik etkilerinin bulunduğu dair bilgiler mevcuttur (217). MAPK8 ve MEG3 arasındaki ilişkiye dair literatürde herhangi bir veri mevcut değildir. Bu çalışmada PC-3 ve DU 145 prostat kanser hücre hatlarında plazmid transfeksiyonu ile gerçekleştirilen MEG3 ve MEG3b overekspresyonu, MAPK8 gen ifade düzeyinde anlamlı bir artışa neden olmuştur. LncRNA MEG3'ün tümör baskılayıcı bir gen olduğu göz önüne alındığında, MEG3 ve MEG3b overekspresyonu sonucunda artan MAPK8 ifadesinin de prostat kanserinde daha çok tümör baskılayıcı rolünün etkili olması beklenebilir. Sonuç olarak, elde edilen bu veri MAPK8 geninin MEG3 ve MEG3b ile doğrudan veya dolaylı bir etkileşime sahip olabileceğini göstermektedir.

P53 (Tumor Protein P53), kromozom 17p13 üzerinde bulunan ve p53 proteinini kodlayan bir gendir (218). P53, hücre döngüsünün önemli bir düzenleyicisidir. P53 fonksiyonundaki değişiklikler, apoptozun baskılanmasına ve hücre proliferasyonun artmasına yol açar (219). P53 prostat kanseri de dahil olmak üzere birçok kanser türünde tam olarak işlevsel değildir (220). P53 ile MEG3 arasındaki ilişki birkaç farklı çalışmada ortaya konmuştur (221, 222). Ancak P53 ile MEG3 ve MEG3b arasındaki ilişki prostat kanserinde henüz çalışılmamıştır. Bu çalışmada PC-3 ve DU 145 prostat kanser hücre hatlarında plazmid aracılı MEG3 ve MEG3b overekspresyonu P53 gen ifade seviyesini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırmıştır. Elde edilen bu bulgular, literatürdeki P53 MEG3 ilişkisini inceleyen çalışmalar ile birlikte bu tez çalışmasının da tutarlı olduğunu destekler niteliktedir.

PRMT2 (Protein Arginine Methyltransferase 2), çeşitli kanserlerin gelişiminde rol oynayan protein arjinin metil-transferaz ailesinin bir üyesidir. PRMT2 birçok tümörde aşırı ifade edilir. HCC hücre hatlarında PRMT2'nin yokluğu, hücre büyümesini inhibe etmiş ve apoptozu uyarmıştır (223). PRMT2'nin prostat kanseri hücreleri üzerindeki etkilerine dair çalışmalar oldukça sınırlıdır. Zhu ve ark. yaptıkları çalışmada DU-145 hücrelerinde PRMT2'nin hücre canlılığı üzerinde etkilerini araştırmıştır (224). Ancak PRMT2'nin, PC-3 prostat kanseri hücrelerindeki etkisine dair literatürde herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ayrıca MEG3 ile PRMT2 arasındaki ilişkiye dair literatür verisi bulunmamaktadır. Çalışmamızda, normal prostat dokusuna kıyasla DU-145 ve PC-3 hücre hatlarında PRMT2 ifadesi düşük bulunmuştur. Transfeksiyondan sonra, hem DU-145 hem de PC-3 hücre hattındaki MEG3 ve MEG3b'nin overekspresyonu, PRMT2 geninin ifade seviyesini azaltmıştır. Prostat kanseri hücrelerinde MEG3 aracılı PRMT2 ifadesindeki azalma, hücre çoğalmasını ve migrasyonu azaltıcı yönde etki göstermiştir. Ancak elde ettiğimiz bulguların ileriki çalışmalarla farklı prostat kanseri hücre hatları kullanılarak da desteklenmesi PRMT2 ile MEG3 arasındaki ilişkiye dair daha kesin sonuçlar elde edilmesine imkan sağlayabilir.

RAF1 (Raf-1 Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase), RAS tarafından aktive edilen MAPK yolağının temel yanıt elemanıdır (225). Büyüme faktörleri ve mitojenler ile gen ifadesini düzenlemek ve apoptozu önlemek için Ras / Raf / MEK / ERK sinyal kaskadını kullanır. RAF1 dahil olmak üzere bu yolağın bazı bileşenleri, insan kanserinde mutasyona uğrar veya anormal şekilde ifade edilir (226). Çalışmamızda PC-3 prostat kanser hücre

hatlarında plazmid transfeksiyonuyla artan MEG3 ve MEG3b gen ifade düzeyi, RAF1 gen ifade düzeyinde anlamlı bir artışa neden olmuştur. Ancak, DU 145 prostat kanser hücre hattında MEG3 ve MEG3b overekspresyonu, RAF1 gen ifade düzeyini anlamlı bir şekilde düşürmüştür. PC-3 ve DU 145 hücrelerinde MEG3 ve MEG3b overekspresyonlarının, RAF1 gen ifadesi üzerinde farklı etki göstermesinde her iki hücredeki işlevsel Rb ve p53 farkı neden olmuş olabilir. Sonuç olarak, prostat kanserinde RAF1 geni ile MEG3 ve MEG3b arasında doğrudan veya dolaylı bir etkileşim olabilir.

SP1 (Sp1 Transcription Factor), androjen reseptörü (AR), cMet ve FAS dahil olmak üzere prostat kanseri ile ilişkili anahtar genlerin düzenlenmesinde rol almaktadır. AR, prostat tümörögenezinde önemli rol oynar. AR gen dizi analizi, transkripsiyon başlangıç bölgesinin upstream yönünde çok sayıda SP1 bağlanma bölgesinin varlığını göstermiştir (227). Bu çalışmada PC-3 prostat kanser hücre hatlarında transfeksiyon aracılı MEG3 overekspresyonu, SP1 gen ifade düzeyinde anlamlı bir artışa neden olurken MEG3b overekspresyonu SP1 gen ifade düzeyinde anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır. MEG3 ve izoformu MEG3b farklı birer ekzon içermektedir ve bu da farklı ikincil yapı ve farklı etkileşimlere neden olmaktadır (125). Bu nedenle SP1 ifadesi üzerinde MEG3 ve izoformu MEG3b overekspresyonunun farklı etki göstermesindeki neden ikincil yapılarının farklı olmasından kaynaklanmış olabilir. DU 145 prostat kanser hücre hattında ise MEG3b overekspresyonu, SP1 gen ifade düzeyinde anlamlı bir düşüşe neden olurken MEG3 overekspresyonu SP1 gen ifade düzeyinde anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır. PC-3 ve DU 145 prostat kanserinde MEG3 ve MEG3b'nin SP1 ifadesi üzerindeki bu farklı yöndeki etkisi detaylıca araştırılmalıdır. Elde ettiğimiz sonuçlar prostat kanserinde SP1 gen ifadesinin hem MEG3 hem de MEG3b ifade düzeyiyle ilişkili olabileceğini göstermektedir.

TFDP1 (Transcription Factor Dp-1), tarafından kodlanan Dp-1 proteini E2F1'e bağlanarak etki göstermektedir. E2F1 ve TFDP1'in birlikte ekspresyonu siklin A ve siklin E seviyelerinde bir artışa yol açsa da, yalnız TFDP1 ekspresyonunun indüklenmesi hücre döngüsüne girişi teşvik etmekte başarısız olmaktadır. E2F1/TFDP1 heterodimeri p53'den bağımsız ve bağımlı olarak apoptozu uyarabilir (228). TFDP1'in prostat kanserindeki rolüne dair çalışmalar oldukça sınırlıdır. Bununla beraber TFDP1, hem RB1 ve hem de P53 ile ilişkilidir. Çalışmamızda, normal prostat dokusuna kıyasla DU-145 ve PC-3 hücre hatlarında TFDP1 ifadesi düşük bulunmuştur. Transfeksiyondan sonra, hem DU-145 hem

de PC-3 hücre hattında MEG3 ve MEG3b'nin ifadesindeki artış, TFDP1 geninin ifadesinde artışa neden olmuştur. Çalışmamız prostat kanser hücrelerinde MEG3 ve MEG3b'nin overekspresyonunun TFDP1 üzerindeki etkilerini ortaya koymuştur. Elde ettiğimiz veriler doğrultusunda çalışmamız, TFDP1'in prostat kanser hücrelerinde MEG3 ve MEG3b genleriyle ilişkili olabileceğini göstermiştir. Ayrıca p53 ve RB1 ile ilgili elde ettiğimiz bulgular da göz önüne alındığında MEG3'ün TFDP1 üzerindeki etkisi sonuçlarımızı destekler niteliktedir. TFDP1 ile MEG3'ün doğrudan veya dolaylı etkileşimine dair bulguların ileriki çalışmalarla desteklenmesi, prostat kanserinde MEG3'ün RB1 yolağındaki işlevinin çözümlenmesine katkıda bulunabilir. Elde ettiğimiz bu veriler ilk defa çalışmamızla beraber literatüre kazandırılmıştır.

Bu tez çalışmasında, PC-3 ve DU 145 prostat kanser hücrelerinde MEG3 ile birlikte izoformu olan MEG3b ve MEG3-del5 (MEG3'ün ilk 450 bazlık bölgesi yok) plazmidlerinin transfeksiyonu gerçekleştirilerek hücrelerin çoğalması, migrasyonu ve koloni oluşturma kapasiteleri üzerine olan etkisi araştırıldı. Hem PC-3 hem de DU 145 hücrelerinde MEG3 ve MEG3b overekspresyonu, prostat kanser hücrelerinin çoğalmasını, migrasyonunu ve koloni oluşturma kapasitelerini baskılamıştır. Luo ve ark. MEG3'ün prostat kanser hücrelerinin çoğalmasını baskıladığını ve apoptozu desteklediğini belirtmiştir (31). Bu çalışma elde ettiğimiz bulguları desteklemektedir. Bununla birlikte MEG3b'nin prostat kanser hücreleri üzerindeki çoğalmayı baskılayıcı etkisi üzerine literatürde herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. MEGb prostat kanser ilişkisi ilk defa bu tezde çalışılmıştır. Bu nedenle, MEG3 ile birlikte MEG3b'nin de prostat kanserinde tümör baskılayıcı bir lncRNA olarak rol aldığı düşünülebilir.

Sonuç olarak, prostat kanser hücrelerinde hem MEG3 hem de izoformu MEG3b'nin ifade seviyesi plazmid transfeksiyonu aracılığıyla artırılarak RB1 ve hedef genlerinin ifade değişimleri araştırılmıştır. PC-3 ve DU 145 prostat kanser hücre hatlarına, MEG3 ve MEG3b overekspresyonuna göre gen ifadelerindeki değişim özet halinde Tablo 4.2'de gösterilmiştir. Bu genler prostat kanserinin moleküler mekanizmasının aydınlatılmasında birer potansiyel hedef olabilir. Ayrıca hedef genlerin ifadelerindeki farklı sonuçların analizleri, androjen bağımlı ve bağımsız prostat kanser hücre hatlarındaki farklılık, yine prostat kanser hücre hatlarının işlevsel p53 ve Rb durumları, lncRNA'ların ikincil yapılarının işlevsel farkı (MEG3-MEG3b) ve genlerin kanserdeki dual rolleri gibi birçok kompleks durumun gen ifade seviyesi üzerindeki etkisine dair literatüre katkıda

bulunacaktır. Bununla birlikte MEG3 ve MEG3b overekspresyonu prostat kanser hücrelerinin çoğalmasını, koloni oluşturma kapasitesini ve migrasyonunu baskılamıştır. MEG3 ile birlikte MEG3b de prostat kanserinin teşhisi için bir biyolojik belirteç, zor ve karmaşık tedavisi için ise terapötik bir aday olabilir.



6. KAYNAKLAR

1. Bray, F., J. Ferlay, I. Soerjomataram, R.L. Siegel, L.A. Torre, and A. Jemal, Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 2018. 68(6): p. 394-424.
2. Kessler, B. and P. Albertsen, The natural history of prostate cancer. *Urol Clin North Am*, 2003. 30(2): p. 219-26.
3. Bostwick, D.G., H.B. Burke, D. Djakiew, S. Euling, S.M. Ho, J. Landolph, H. Morrison, B. Sonawane, T. Shifflett, D.J. Waters, and B. Timms, Human prostate cancer risk factors. *Cancer*, 2004. 101(10 Suppl): p. 2371-490.
4. Markozannes, G., I. Tzoulaki, D. Karli, E. Evangelou, E. Ntzani, M.J. Gunter, T. Norat, J.P. Ioannidis, and K.K. Tsilidis, Diet, body size, physical activity and risk of prostate cancer: An umbrella review of the evidence. *Eur J Cancer*, 2016. 69: p. 61-69.
5. Attard, G., C. Parker, R.A. Eeles, F. Schroder, S.A. Tomlins, I. Tannock, C.G. Drake, and J.S. de Bono, Prostate cancer. *Lancet*, 2016. 387(10013): p. 70-82.
6. Gleason, D.F. and G.T. Mellinger, Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *J Urol*, 1974. 111(1): p. 58-64.
7. Scher, H.I. and C.L. Sawyers, Biology of progressive, castration-resistant prostate cancer: directed therapies targeting the androgen-receptor signaling axis. *J Clin Oncol*, 2005. 23(32): p. 8253-61.
8. Smith, M.R., R. Cook, K.A. Lee, and J.B. Nelson, Disease and host characteristics as predictors of time to first bone metastasis and death in men with progressive castration-resistant nonmetastatic prostate cancer. *Cancer*, 2011. 117(10): p. 2077-85.
9. Hamdy, F.C., J.L. Donovan, J.A. Lane, M. Mason, C. Metcalfe, P. Holding, M. Davis, T.J. Peters, E.L. Turner, R.M. Martin, J. Oxley, M. Robinson, J. Staffurth, E. Walsh, P. Bollina, J. Catto, A. Doble, A. Doherty, D. Gillatt, R. Kockelbergh,

- H. Kynaston, A. Paul, P. Powell, S. Prescott, D.J. Rosario, E. Rowe, D.E. Neal, and T.S.G. Protec, 10-Year Outcomes after Monitoring, Surgery, or Radiotherapy for Localized Prostate Cancer. *N Engl J Med*, 2016. 375(15): p. 1415-1424.
10. Saad, F., K.N. Chi, A. Finelli, S.J. Hotte, J. Izawa, A. Kapoor, W. Kassouf, A. Loblaw, S. North, R. Rendon, A. So, N. Usmani, E. Vigneault, and N.E. Fleshner, The 2015 CUA-CUOG Guidelines for the management of castration-resistant prostate cancer (CRPC). *Can Urol Assoc J*, 2015. 9(3-4): p. 90-6.
 11. Vlachostergios, P.J., L. Puca, and H. Beltran, Emerging Variants of Castration-Resistant Prostate Cancer. *Curr Oncol Rep*, 2017. 19(5): p. 32.
 12. Benafif, S. and R. Eeles, Genetic predisposition to prostate cancer. *British medical bulletin*, 2016. 120(1): p. 75-89.
 13. Ahmed, M. and R. Eeles, Germline genetic profiling in prostate cancer: latest developments and potential clinical applications. *Future science OA*, 2016. 2(1).
 14. Taylor, R.A., M. Fraser, J. Livingstone, S.M.G. Espiritu, H. Thorne, V. Huang, W. Lo, Y.-J. Shiah, T.N. Yamaguchi, and A. Sliwinski, Germline BRCA2 mutations drive prostate cancers with distinct evolutionary trajectories. *Nature communications*, 2017. 8(1): p. 1-10.
 15. Xu, J., E.M. Lange, L. Lu, S.L. Zheng, Z. Wang, S.N. Thibodeau, L.A. Cannon-Albright, C.C. Teerlink, N.J. Camp, and A.M. Johnson, HOXB13 is a susceptibility gene for prostate cancer: results from the International Consortium for Prostate Cancer Genetics (ICPCG). *Human genetics*, 2013. 132(1): p. 5-14.
 16. Rubin, M.A. and F. Demichelis, The Genomics of Prostate Cancer: emerging understanding with technologic advances. *Modern pathology*, 2018. 31(1): p. 1-11.
 17. Ambros, V., The functions of animal microRNAs. *Nature*, 2004. 431(7006): p. 350-5.
 18. Garzon, R., G.A. Calin, and C.M. Croce, MicroRNAs in Cancer. *Annu Rev Med*, 2009. 60: p. 167-79.
 19. Gibb, J., S. Hayley, M.O. Poulter, and H. Anisman, Effects of stressors and immune activating agents on peripheral and central cytokines in mouse strains that differ in stressor responsivity. *Brain Behav Immun*, 2011. 25(3): p. 468-82.

20. Schmitz, S.U., P. Grote, and B.G. Herrmann, Mechanisms of long noncoding RNA function in development and disease. *Cell Mol Life Sci*, 2016. 73(13): p. 2491-509.
21. Schmitt, A.M. and H.Y. Chang, Long Noncoding RNAs in Cancer Pathways. *Cancer Cell*, 2016. 29(4): p. 452-463.
22. Kandoth, C., M.D. McLellan, F. Vandin, K. Ye, B. Niu, C. Lu, M. Xie, Q. Zhang, J.F. McMichael, M.A. Wyczalkowski, M.D.M. Leiserson, C.A. Miller, J.S. Welch, M.J. Walter, M.C. Wendl, T.J. Ley, R.K. Wilson, B.J. Raphael, and L. Ding, Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature*, 2013. 502(7471): p. 333-339.
23. Xia, H. and K.M. Hui, Mechanism of cancer drug resistance and the involvement of noncoding RNAs. *Curr Med Chem*, 2014. 21(26): p. 3029-41.
24. Prensner, J.R., M.K. Iyer, O.A. Balbin, S.M. Dhanasekaran, Q. Cao, J.C. Brenner, B. Laxman, I.A. Asangani, C.S. Grasso, H.D. Kominsky, X. Cao, X. Jing, X. Wang, J. Siddiqui, J.T. Wei, D. Robinson, H.K. Iyer, N. Palanisamy, C.A. Maher, and A.M. Chinnaiyan, Transcriptome sequencing across a prostate cancer cohort identifies PCAT-1, an unannotated lincRNA implicated in disease progression. *Nat Biotechnol*, 2011. 29(8): p. 742-9.
25. Bussemakers, M.J., A. van Bokhoven, G.W. Verhaegh, F.P. Smit, H.F. Karthaus, J.A. Schalken, F.M. Debruyne, N. Ru, and W.B. Isaacs, DD3: a new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer. *Cancer Res*, 1999. 59(23): p. 5975-9.
26. Prensner, J.R., M.K. Iyer, A. Sahu, I.A. Asangani, Q. Cao, L. Patel, I.A. Vergara, E. Davicioni, N. Erho, M. Ghadessi, R.B. Jenkins, T.J. Triche, R. Malik, R. Bedenis, N. McGregor, T. Ma, W. Chen, S. Han, X. Jing, X. Cao, X. Wang, B. Chandler, W. Yan, J. Siddiqui, L.P. Kunju, S.M. Dhanasekaran, K.J. Pienta, F.Y. Feng, and A.M. Chinnaiyan, The long noncoding RNA SchLAP1 promotes aggressive prostate cancer and antagonizes the SWI/SNF complex. *Nat Genet*, 2013. 45(11): p. 1392-8.
27. Schuster-Gossler, K., P. Bilinski, T. Sado, A. Ferguson-Smith, and A. Gossler, The mouse Gtl2 gene is differentially expressed during embryonic development,

encodes multiple alternatively spliced transcripts, and may act as an RNA. *Dev Dyn*, 1998. 212(2): p. 214-28.

28. Lin, S.P., N. Youngson, S. Takada, H. Seitz, W. Reik, M. Paulsen, J. Cavaille, and A.C. Ferguson-Smith, Asymmetric regulation of imprinting on the maternal and paternal chromosomes at the *Dlk1-Gtl2* imprinted cluster on mouse chromosome 12. *Nat Genet*, 2003. 35(1): p. 97-102.
29. Zhou, Y., X. Zhang, and A. Klibanski, MEG3 noncoding RNA: a tumor suppressor. *J Mol Endocrinol*, 2012. 48(3): p. R45-53.
30. Gejman, R., D.L. Batista, Y. Zhong, Y. Zhou, X. Zhang, B. Swearingen, C.A. Stratakis, E.T. Hedley-Whyte, and A. Klibanski, Selective loss of MEG3 expression and intergenic differentially methylated region hypermethylation in the MEG3/DLK1 locus in human clinically nonfunctioning pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*, 2008. 93(10): p. 4119-25.
31. Luo, G., M. Wang, X. Wu, D. Tao, X. Xiao, L. Wang, F. Min, F. Zeng, and G. Jiang, Long Non-Coding RNA MEG3 Inhibits Cell Proliferation and Induces Apoptosis in Prostate Cancer. *Cell Physiol Biochem*, 2015. 37(6): p. 2209-20.
32. Gao, Y., P. Huang, and J. Zhang, Hypermethylation of MEG3 promoter correlates with inactivation of MEG3 and poor prognosis in patients with retinoblastoma. *J Transl Med*, 2017. 15(1): p. 268.
33. Henley, S.A. and F.A. Dick, The retinoblastoma family of proteins and their regulatory functions in the mammalian cell division cycle. *Cell Div*, 2012. 7(1): p. 10.
34. Dick, F.A. and S.M. Rubin, Molecular mechanisms underlying RB protein function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013. 14(5): p. 297-306.
35. Di Fiore, R., A. D'Anneo, G. Tesoriere, and R. Vento, RB1 in cancer: different mechanisms of RB1 inactivation and alterations of pRb pathway in tumorigenesis. *J Cell Physiol*, 2013. 228(8): p. 1676-87.
36. Sharma, A., W.S. Yeow, A. Ertel, I. Coleman, N. Clegg, C. Thangavel, C. Morrissey, X. Zhang, C.E. Comstock, A.K. Witkiewicz, L. Gomella, E.S. Knudsen, P.S. Nelson, and K.E. Knudsen, The retinoblastoma tumor suppressor

- controls androgen signaling and human prostate cancer progression. *J Clin Invest*, 2010. 120(12): p. 4478-92.
37. Sharma, A., C.E. Comstock, E.S. Knudsen, K.H. Cao, J.K. Hess-Wilson, L.M. Morey, J. Barrera, and K.E. Knudsen, Retinoblastoma tumor suppressor status is a critical determinant of therapeutic response in prostate cancer cells. *Cancer Res*, 2007. 67(13): p. 6192-203.
 38. Grasso, C.S., Y.M. Wu, D.R. Robinson, X. Cao, S.M. Dhanasekaran, A.P. Khan, M.J. Quist, X. Jing, R.J. Lonigro, J.C. Brenner, I.A. Asangani, B. Ateeq, S.Y. Chun, J. Siddiqui, L. Sam, M. Anstett, R. Mehra, J.R. Prensner, N. Palanisamy, G.A. Ryslik, F. Vandin, B.J. Raphael, L.P. Kunju, D.R. Rhodes, K.J. Pienta, A.M. Chinnaiyan, and S.A. Tomlins, The mutational landscape of lethal castration-resistant prostate cancer. *Nature*, 2012. 487(7406): p. 239-43.
 39. Taylor, B.S., N. Schultz, H. Hieronymus, A. Gopalan, Y. Xiao, B.S. Carver, V.K. Arora, P. Kaushik, E. Cerami, B. Reva, Y. Antipin, N. Mitsiades, T. Landers, I. Dolgalev, J.E. Major, M. Wilson, N.D. Socci, A.E. Lash, A. Heguy, J.A. Eastham, H.I. Scher, V.E. Reuter, P.T. Scardino, C. Sander, C.L. Sawyers, and W.L. Gerald, Integrative genomic profiling of human prostate cancer. *Cancer Cell*, 2010. 18(1): p. 11-22.
 40. Kruer, T.L., S.M. Dougherty, L. Reynolds, E. Long, T. de Silva, W.W. Lockwood, and B.F. Clem, Expression of the lncRNA Maternally Expressed Gene 3 (MEG3) Contributes to the Control of Lung Cancer Cell Proliferation by the Rb Pathway. *PLoS One*, 2016. 11(11): p. e0166363.
 41. Torre, L.A., F. Bray, R.L. Siegel, J. Ferlay, J. Lortet-Tieulent, and A. Jemal, Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*, 2015. 65(2): p. 87-108.
 42. Etzioni, R., R. Gulati, A. Tsodikov, E.M. Wever, D.F. Penson, E.A. Heijnsdijk, J. Katcher, G. Draisma, E.J. Feuer, H.J. de Koning, and A.B. Mariotto, The prostate cancer conundrum revisited: treatment changes and prostate cancer mortality declines. *Cancer*, 2012. 118(23): p. 5955-63.
 43. Buzzoni, C., A. Auvinen, M.J. Roobol, S. Carlsson, S.M. Moss, D. Puliti, H.J. de Koning, C.H. Bangma, L.J. Denis, M. Kwiatkowski, M. Lujan, V. Nelen, A. Paez, M. Randazzo, X. Rebillard, T.L. Tammela, A. Villers, J. Hugosson, F.H.

- Schroder, and M. Zappa, Metastatic Prostate Cancer Incidence and Prostate-specific Antigen Testing: New Insights from the European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer. *Eur Urol*, 2015. 68(5): p. 885-90.
44. Grozescu, T. and F. Popa, Prostate cancer between prognosis and adequate/proper therapy. *J Med Life*, 2017. 10(1): p. 5-12.
 45. Barry, M.J. and L.H. Simmons, Prevention of Prostate Cancer Morbidity and Mortality: Primary Prevention and Early Detection. *Med Clin North Am*, 2017. 101(4): p. 787-806.
 46. Brooks, J.D., S.E. Eggener, and W.M. Chao, Anatomy of the rectourethralis muscle. *Eur Urol*, 2002. 41(1): p. 94-100.
 47. McNeal, J.E., The zonal anatomy of the prostate. *Prostate*, 1981. 2(1): p. 35-49.
 48. Costello, A.J., M. Brooks, and O.J. Cole, Anatomical studies of the neurovascular bundle and cavernosal nerves. *BJU Int*, 2004. 94(7): p. 1071-6.
 49. Kourambas, J., D.G. Angus, P. Hosking, and S.T. Chou, A histological study of Denonvilliers' fascia and its relationship to the neurovascular bundle. *Br J Urol*, 1998. 82(3): p. 408-10.
 50. Walsh, P.C. and P.J. Donker, Impotence following radical prostatectomy: insight into etiology and prevention. *J Urol*, 1982. 128(3): p. 492-7.
 51. Walsh, P.C. and H. Lepor, The role of radical prostatectomy in the management of prostatic cancer. *Cancer*, 1987. 60(3 Suppl): p. 526-37.
 52. Adams, J., The case of scirrhus of the prostate gland with corresponding affliction of the lymphatic glands in the lumbar region and in the pelvis. *Lancet*, 1853. 1(1): p. 393-393.
 53. Greenlee, R.T., M.B. Hill-Harmon, T. Murray, and M. Thun, Cancer statistics, 2001. *CA Cancer J Clin*, 2001. 51(1): p. 15-36.
 54. Schottenfeld, D. and J.F. Fraumeni Jr, *Cancer epidemiology and prevention*. 2006: Oxford University Press.
 55. Denmeade, S.R. and J.T. Isaacs, A history of prostate cancer treatment. *Nat Rev Cancer*, 2002. 2(5): p. 389-96.

56. Huggins, C., R. Stevens, and C.V. Hodges, Studies on prostatic cancer: II. The effects of castration on advanced carcinoma of the prostate gland. *Archives of surgery*, 1941. 43(2): p. 209-223.
57. Panigrahi, G.K., P.P. Praharaj, H. Kittaka, A.R. Mridha, O.M. Black, R. Singh, R. Mercer, A. van Bokhoven, K.C. Torkko, C. Agarwal, R. Agarwal, Z.Y. Abd Elmageed, H. Yadav, S.K. Mishra, and G. Deep, Exosome proteomic analyses identify inflammatory phenotype and novel biomarkers in African American prostate cancer patients. *Cancer Med*, 2019. 8(3): p. 1110-1123.
58. Fleshner, K., S.V. Carlsson, and M.J. Roobol, The effect of the USPSTF PSA screening recommendation on prostate cancer incidence patterns in the USA. *Nat Rev Urol*, 2017. 14(1): p. 26-37.
59. Howard, D.H., Declines in prostate cancer incidence after changes in screening recommendations. *Arch Intern Med*, 2012. 172(16): p. 1267-8.
60. Potosky, A.L., B.A. Miller, P.C. Albertsen, and B.S. Kramer, The role of increasing detection in the rising incidence of prostate cancer. *JAMA*, 1995. 273(7): p. 548-52.
61. Gaylis, F.D., J.E. Choi, Z. Hamilton, P. Dato, E. Cohen, R. Calabrese, H. Prime, A. Rosenbaum, and A.K. Kader, Change in prostate cancer presentation coinciding with USPSTF screening recommendations at a community-based urology practice. *Urol Oncol*, 2017. 35(11): p. 663 e1-663 e7.
62. Ferlay J, E.M., Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, Bray F, Global cancer observatory: cancer today. 2020.
63. Epidemiology of prostate cancer in Europe. 2015.
[https:// ec.europa.eu/jrc/en/publication/epidemiology-prostatecancer- europe](https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/epidemiology-prostatecancer-europe)
Erişim Tarihi:13.01.2020
64. De Angelis, R., M. Sant, M.P. Coleman, S. Francisci, P. Baili, D. Pierannunzio, A. Trama, O. Visser, H. Brenner, E. Ardanaz, M. Bielska-Lasota, G. Engholm, A. Nennecke, S. Siesling, F. Berrino, R. Capocaccia, and E.-W. Group, Cancer survival in Europe 1999-2007 by country and age: results of EURO CARE--5-a population-based study. *Lancet Oncol*, 2014. 15(1): p. 23-34.

65. Prostate Cancer Survival Rates. 2018.
<https://www.pcf.org/about-prostate-cancer/what-is-prostate-cancer/prostate-cancer-survival-rates/>. Erişim Tarihi:15.01.2020
66. Wang, M.C., L.A. Valenzuela, G.P. Murphy, and T.M. Chu, Purification of a human prostate specific antigen. *Invest Urol*, 1979. 17(2): p. 159-63.
67. Stamey, T.A., N. Yang, A.R. Hay, J.E. McNeal, F.S. Freiha, and E. Redwine, Prostate-specific antigen as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate. *N Engl J Med*, 1987. 317(15): p. 909-16.
68. Carter, H.B., J.D. Pearson, E.J. Metter, L.J. Brant, D.W. Chan, R. Andres, J.L. Fozard, and P.C. Walsh, Longitudinal evaluation of prostate-specific antigen levels in men with and without prostate disease. *JAMA*, 1992. 267(16): p. 2215-20.
69. Carter, H.B., P.C. Albertsen, M.J. Barry, R. Etzioni, S.J. Freedland, K.L. Greene, L. Holmberg, P. Kantoff, B.R. Konety, M.H. Murad, D.F. Penson, and A.L. Zietman, Early detection of prostate cancer: AUA Guideline. *J Urol*, 2013. 190(2): p. 419-26.
70. Cooner, W.H., B.R. Mosley, C.L. Rutherford, Jr., J.H. Beard, H.S. Pond, W.J. Terry, T.C. Igel, and D.D. Kidd, Prostate cancer detection in a clinical urological practice by ultrasonography, digital rectal examination and prostate specific antigen. *J Urol*, 1990. 143(6): p. 1146-52; discussion 1152-4.
71. Catalona, W.J., J.P. Richie, F.R. Ahmann, M.A. Hudson, P.T. Scardino, R.C. Flanigan, J.B. DeKernion, T.L. Ratliff, L.R. Kavoussi, B.L. Dalkin, W.B. Waters, M.T. MacFarlane, and P.C. Southwick, 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): p. 1283-90.
72. Gleason, D.F., Classification of prostatic carcinomas. *Cancer Chemother Rep*, 1966. 50(3): p. 125-8.
73. Mills, S.E., D.G. Bostwick, W.M. Murphy, and M.A. Weiss, A symposium on the surgical pathology of the prostate. *Pathol Annu*, 1990. 25 Pt 2: p. 109-58.

74. Humphrey, P.A., Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate. *Mod Pathol*, 2004. 17(3): p. 292-306.
75. Wilson, K.M., E.L. Giovannucci, and L.A. Mucci, Lifestyle and dietary factors in the prevention of lethal prostate cancer. *Asian J Androl*, 2012. 14(3): p. 365-74.
76. Cancer Stat Facts: Prostate Cancer. 2020.
<https://seer.cancer.gov/statfacts/html/prost.html> Erişim Tarihi: 12.01.2020
77. Bethesda, M., SEER Cancer Statistics Review, 1975-2013. 2016.
https://seer.cancer.gov/csr/1975_2015/. Erişim Tarihi: 14.01.2020
78. Wu, I. and C.S. Modlin, Disparities in prostate cancer in African American men: what primary care physicians can do. *Cleve Clin J Med*, 2012. 79(5): p. 313-20.
79. Hosain, G.M., M. Sanderson, X.L. Du, W. Chan, and S.S. Strom, Racial/ethnic differences in predictors of PSA screening in a tri-ethnic population. *Cent Eur J Public Health*, 2011. 19(1): p. 30-4.
80. Okobia, M.N., J.M. Zmuda, R.E. Ferrell, A.L. Patrick, and C.H. Bunker, Chromosome 8q24 variants are associated with prostate cancer risk in a high risk population of African ancestry. *Prostate*, 2011. 71(10): p. 1054-63.
81. Haiman, C.A., G.K. Chen, W.J. Blot, S.S. Strom, S.I. Berndt, R.A. Kittles, B.A. Rybicki, W.B. Isaacs, S.A. Ingles, J.L. Stanford, W.R. Diver, J.S. Witte, S.J. Chanock, S. Kolb, L.B. Signorello, Y. Yamamura, C. Neslund-Dudas, M.J. Thun, A. Murphy, G. Casey, X. Sheng, P. Wan, L.C. Pooler, K.R. Monroe, K.M. Waters, L. Le Marchand, L.N. Kolonel, D.O. Stram, and B.E. Henderson, Characterizing genetic risk at known prostate cancer susceptibility loci in African Americans. *PLoS Genet*, 2011. 7(5): p. e1001387.
82. Robbins, C.M., S. Hooker, R.A. Kittles, and J.D. Carpten, EphB2 SNPs and sporadic prostate cancer risk in African American men. *PLoS One*, 2011. 6(5): p. e19494.
83. Hatcher, D., G. Daniels, I. Osman, and P. Lee, Molecular mechanisms involving prostate cancer racial disparity. *Am J Transl Res*, 2009. 1(3): p. 235-48.
84. Chu, L.W., J. Ritchey, S.S. Devesa, S.M. Quraishi, H. Zhang, and A.W. Hsing, Prostate cancer incidence rates in Africa. *Prostate Cancer*, 2011. 2011: p. 947870.

85. Hsing, A.W., L. Tsao, and S.S. Devesa, International trends and patterns of prostate cancer incidence and mortality. *Int J Cancer*, 2000. 85(1): p. 60-7.
86. Lehrer, S., E.J. Diamond, S. Stagger, N.N. Stone, and R.G. Stock, Serum insulin level, disease stage, prostate specific antigen (PSA) and Gleason score in prostate cancer. *Br J Cancer*, 2002. 87(7): p. 726-8.
87. Venkateswaran, V., A.Q. Haddad, N.E. Fleshner, R. Fan, L.M. Sugar, R. Nam, L.H. Klotz, and M. Pollak, Association of diet-induced hyperinsulinemia with accelerated growth of prostate cancer (LNCaP) xenografts. *J Natl Cancer Inst*, 2007. 99(23): p. 1793-800.
88. Abe, R. and S. Yamagishi, AGE-RAGE system and carcinogenesis. *Curr Pharm Des*, 2008. 14(10): p. 940-5.
89. Gennigens, C., C. Menetrier-Caux, and J.P. Droz, Insulin-Like Growth Factor (IGF) family and prostate cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2006. 58(2): p. 124-45.
90. Huggins, C. and C.V. Hodges, Studies on prostatic cancer: I. The effect of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. 1941. *J Urol*, 2002. 168(1): p. 9-12.
91. Kyprianou, N., H.F. English, and J.T. Isaacs, Programmed cell death during regression of PC-82 human prostate cancer following androgen ablation. *Cancer Res*, 1990. 50(12): p. 3748-53.
92. Ahmad, I., O.J. Sansom, and H.Y. Leung, Advances in mouse models of prostate cancer. *Expert Rev Mol Med*, 2008. 10: p. e16.
93. Gallagher, R.P. and N. Fleshner, Prostate cancer: 3. Individual risk factors. *CMAJ*, 1998. 159(7): p. 807-13.
94. Ferris-i-Tortajada, J., J. Garcia-i-Castell, O. Berbel-Tornero, and J.A. Ortega-Garcia, [Constitutional risk factors in prostate cancer]. *Actas Urol Esp*, 2011. 35(5): p. 282-8.
95. Muller, R.L., E.F. Faria, G.F. Carvalhal, R.B. Reis, E.C. Mauad, A.L. Carvalho, and S.J. Freedland, Association between family history of prostate cancer and positive biopsies in a Brazilian screening program. *World J Urol*, 2013. 31(5): p. 1273-8.

96. Malathi, K., B. Dong, M. Gale, Jr., and R.H. Silverman, Small self-RNA generated by RNase L amplifies antiviral innate immunity. *Nature*, 2007. 448(7155): p. 816-9.
97. Zhou, A., J. Paranjape, T.L. Brown, H. Nie, S. Naik, B. Dong, A. Chang, B. Trapp, R. Fairchild, C. Colmenares, and R.H. Silverman, Interferon action and apoptosis are defective in mice devoid of 2',5'-oligoadenylate-dependent RNase L. *EMBO J*, 1997. 16(21): p. 6355-63.
98. Schlager, R., D.J. Choe, K.R. Brown, H.M. Thaker, and I.R. Singh, XMRV is present in malignant prostatic epithelium and is associated with prostate cancer, especially high-grade tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. 106(38): p. 16351-6.
99. Camp, N.J. and S.V. Tavtigian, Meta-analysis of associations of the Ser217Leu and Ala541Thr variants in ELAC2 (HPC2) and prostate cancer. *Am J Hum Genet*, 2002. 71(6): p. 1475-8.
100. Xu, J., S.L. Zheng, A. Komiya, J.C. Mychaleckyj, S.D. Isaacs, J.J. Hu, D. Sterling, E.M. Lange, G.A. Hawkins, A. Turner, C.M. Ewing, D.A. Faith, J.R. Johnson, H. Suzuki, P. Bujnovszky, K.E. Wiley, A.M. DeMarzo, G.S. Bova, B. Chang, M.C. Hall, D.L. McCullough, A.W. Partin, V.S. Kassabian, J.D. Carpten, J.E. Bailey-Wilson, J.M. Trent, J. Ohar, E.R. Bleecker, P.C. Walsh, W.B. Isaacs, and D.A. Meyers, Germline mutations and sequence variants of the macrophage scavenger receptor 1 gene are associated with prostate cancer risk. *Nat Genet*, 2002. 32(2): p. 321-5.
101. Erkkö, H., B. Xia, J. Nikkila, J. Schleutker, K. Syrjäkoski, A. Mannermaa, A. Kallioniemi, K. Pylkas, S.M. Karppinen, K. Rapaakko, A. Miron, Q. Sheng, G. Li, H. Mattila, D.W. Bell, D.A. Haber, M. Grip, M. Reiman, A. Jukkola-Vuorinen, A. Mustonen, J. Kere, L.A. Aaltonen, V.M. Kosma, V. Kataja, Y. Soini, R.I. Drapkin, D.M. Livingston, and R. Winqvist, A recurrent mutation in PALB2 in Finnish cancer families. *Nature*, 2007. 446(7133): p. 316-9.
102. Gallagher, D.J., M.M. Gaudet, P. Pal, T. Kirchhoff, L. Balistreri, K. Vora, J. Bhatia, Z. Stadler, S.W. Fine, V. Reuter, M. Zelefsky, M.J. Morris, H.I. Scher, R.J. Klein, L. Norton, J.A. Eastham, P.T. Scardino, M.E. Robson, and K. Offit,

- Germline BRCA mutations denote a clinicopathologic subset of prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 2010. 16(7): p. 2115-21.
103. Xu, J., D. Meyers, D. Freije, S. Isaacs, K. Wiley, D. Nusskern, C. Ewing, E. Wilkens, P. Bujnovszky, G.S. Bova, P. Walsh, W. Isaacs, J. Schleutker, M. Matikainen, T. Tammela, T. Visakorpi, O.P. Kallioniemi, R. Berry, D. Schaid, A. French, S. McDonnell, J. Schroeder, M. Blute, S. Thibodeau, H. Gronberg, M. Emanuelsson, J.E. Damber, A. Bergh, B.A. Jonsson, J. Smith, J. Bailey-Wilson, J. Carpten, D. Stephan, E. Gillanders, I. Amundson, T. Kainu, D. Freas-Lutz, A. Baffoe-Bonnie, A. Van Aucken, R. Sood, F. Collins, M. Brownstein, and J. Trent, Evidence for a prostate cancer susceptibility locus on the X chromosome. *Nat Genet*, 1998. 20(2): p. 175-9.
 104. Stanford, J.L., L.M. FitzGerald, S.K. McDonnell, E.E. Carlson, L.M. McIntosh, K. Deutsch, L. Hood, E.A. Ostrander, and D.J. Schaid, Dense genome-wide SNP linkage scan in 301 hereditary prostate cancer families identifies multiple regions with suggestive evidence for linkage. *Hum Mol Genet*, 2009. 18(10): p. 1839-48.
 105. Benafif, S., Z. Kote-Jarai, R.A. Eeles, and P. Consortium, A Review of Prostate Cancer Genome-Wide Association Studies (GWAS). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2018. 27(8): p. 845-857.
 106. Wang, G., D. Zhao, D.J. Spring, and R.A. DePinho, Genetics and biology of prostate cancer. *Genes Dev*, 2018. 32(17-18): p. 1105-1140.
 107. Consortium, E.P., An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature*, 2012. 489(7414): p. 57-74.
 108. Cech, T.R. and J.A. Steitz, The noncoding RNA revolution-trashing old rules to forge new ones. *Cell*, 2014. 157(1): p. 77-94.
 109. Consortium, E.P., The ENCODE (ENCyclopedia Of DNA Elements) Project. *Science*, 2004. 306(5696): p. 636-40.
 110. Guttman, M. and J.L. Rinn, Modular regulatory principles of large non-coding RNAs. *Nature*, 2012. 482(7385): p. 339-46.
 111. Adams, B.D., E. Anastasiadou, M. Esteller, L. He, and F.J. Slack, The Inescapable Influence of Noncoding RNAs in Cancer. *Cancer Res*, 2015. 75(24): p. 5206-10.

112. Slack, F.J. and A.M. Chinnaiyan, The Role of Non-coding RNAs in Oncology. *Cell*, 2019. 179(5): p. 1033-1055.
113. Adams, B.D., C. Parsons, L. Walker, W.C. Zhang, and F.J. Slack, Targeting noncoding RNAs in disease. *J Clin Invest*, 2017. 127(3): p. 761-771.
114. Derrien, T., R. Johnson, G. Bussotti, A. Tanzer, S. Djebali, H. Tilgner, G. Guernec, D. Martin, A. Merkel, D.G. Knowles, J. Lagarde, L. Veeravalli, X. Ruan, Y. Ruan, T. Lassmann, P. Carninci, J.B. Brown, L. Lipovich, J.M. Gonzalez, M. Thomas, C.A. Davis, R. Shiekhatter, T.R. Gingeras, T.J. Hubbard, C. Notredame, J. Harrow, and R. Guigo, The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome Res*, 2012. 22(9): p. 1775-89.
115. Lagarde, J., B. Uszczynska-Ratajczak, S. Carbonell, S. Perez-Lluch, A. Abad, C. Davis, T.R. Gingeras, A. Frankish, J. Harrow, R. Guigo, and R. Johnson, High-throughput annotation of full-length long noncoding RNAs with capture long-read sequencing. *Nat Genet*, 2017. 49(12): p. 1731-1740.
116. Yao, R.W., Y. Wang, and L.L. Chen, Cellular functions of long noncoding RNAs. *Nat Cell Biol*, 2019. 21(5): p. 542-551.
117. Quinn, J.J. and H.Y. Chang, Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function. *Nat Rev Genet*, 2016. 17(1): p. 47-62.
118. Ward, M., C. McEwan, J.D. Mills, and M. Janitz, Conservation and tissue-specific transcription patterns of long noncoding RNAs. *J Hum Transcr*, 2015. 1(1): p. 2-9.
119. Li, J., H. Tian, J. Yang, and Z. Gong, Long Noncoding RNAs Regulate Cell Growth, Proliferation, and Apoptosis. *DNA Cell Biol*, 2016. 35(9): p. 459-70.
120. Bach, D.H. and S.K. Lee, Long noncoding RNAs in cancer cells. *Cancer Lett*, 2018. 419: p. 152-166.
121. Ma, L., V.B. Bajic, and Z. Zhang, On the classification of long non-coding RNAs. *RNA Biol*, 2013. 10(6): p. 925-33.
122. Wong, C.M., F.H. Tsang, and I.O. Ng, Non-coding RNAs in hepatocellular carcinoma: molecular functions and pathological implications. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2018. 15(3): p. 137-151.

123. McDonel, P. and M. Guttman, Approaches for Understanding the Mechanisms of Long Noncoding RNA Regulation of Gene Expression. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2019. 11(12).
124. Morlando, M., M. Ballarino, and A. Fatica, Long Non-Coding RNAs: New Players in Hematopoiesis and Leukemia. *Front Med (Lausanne)*, 2015. 2: p. 23.
125. Zhang, X., K. Rice, Y. Wang, W. Chen, Y. Zhong, Y. Nakayama, Y. Zhou, and A. Klibanski, Maternally expressed gene 3 (MEG3) noncoding ribonucleic acid: isoform structure, expression, and functions. *Endocrinology*, 2010. 151(3): p. 939-47.
126. Miyoshi, N., H. Wagatsuma, S. Wakana, T. Shiroishi, M. Nomura, K. Aisaka, T. Kohda, M.A. Surani, T. Kaneko-Ishino, and F. Ishino, Identification of an imprinted gene, Meg3/Gtl2 and its human homologue MEG3, first mapped on mouse distal chromosome 12 and human chromosome 14q. *Genes Cells*, 2000. 5(3): p. 211-20.
127. He, Y., Y. Luo, B. Liang, L. Ye, G. Lu, and W. He, Potential applications of MEG3 in cancer diagnosis and prognosis. *Oncotarget*, 2017. 8(42): p. 73282-73295.
128. Greife, A., J. Knievel, T. Ribarska, G. Niegisch, and W.A. Schulz, Concomitant downregulation of the imprinted genes DLK1 and MEG3 at 14q32.2 by epigenetic mechanisms in urothelial carcinoma. *Clin Epigenetics*, 2014. 6(1): p. 29.
129. Ghafouri-Fard, S. and M. Taheri, Maternally expressed gene 3 (MEG3): A tumor suppressor long non coding RNA. *Biomed Pharmacother*, 2019. 118: p. 109129.
130. Viana, M.C., W.C. Tavares, A.C. Brant, M. Boroni, and H.N. Seuanez, The human retinoblastoma susceptibility gene (RB1): an evolutionary story in primates. *Mamm Genome*, 2017. 28(5-6): p. 198-212.
131. Indovina, P., E. Marcelli, N. Casini, V. Rizzo, and A. Giordano, Emerging roles of RB family: new defense mechanisms against tumor progression. *J Cell Physiol*, 2013. 228(3): p. 525-35.
132. Fiorentino, F.P., I. Marchesi, and A. Giordano, On the role of retinoblastoma family proteins in the establishment and maintenance of the epigenetic landscape. *J Cell Physiol*, 2013. 228(2): p. 276-84.

133. Riley, D.J., E.Y. Lee, and W.H. Lee, The retinoblastoma protein: more than a tumor suppressor. *Annu Rev Cell Biol*, 1994. 10: p. 1-29.
134. Paggi, M.G., A. Felsani, and A. Giordano, Growth control by the retinoblastoma gene family. *Methods Mol Biol*, 2003. 222: p. 3-19.
135. Giacinti, C. and A. Giordano, RB and cell cycle progression. *Oncogene*, 2006. 25(38): p. 5220-7.
136. Asghar, U., A.K. Witkiewicz, N.C. Turner, and E.S. Knudsen, The history and future of targeting cyclin-dependent kinases in cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov*, 2015. 14(2): p. 130-46.
137. Knudsen, E.S., S.C. Pruitt, P.A. Hershberger, A.K. Witkiewicz, and D.W. Goodrich, Cell Cycle and Beyond: Exploiting New RB1 Controlled Mechanisms for Cancer Therapy. *Trends Cancer*, 2019. 5(5): p. 308-324.
138. Sherr, C.J. and F. McCormick, The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell*, 2002. 2(2): p. 103-12.
139. Fribourg, A.F., K.E. Knudsen, M.W. Strobeck, C.M. Lindhorst, and E.S. Knudsen, Differential requirements for ras and the retinoblastoma tumor suppressor protein in the androgen dependence of prostatic adenocarcinoma cells. *Cell Growth Differ*, 2000. 11(7): p. 361-72.
140. Taneja, S.S., S. Ha, and M.J. Garabedian, Androgen stimulated cellular proliferation in the human prostate cancer cell line LNCaP is associated with reduced retinoblastoma protein expression. *J Cell Biochem*, 2001. 84(1): p. 188-99.
141. Yuan, X., T. Li, H. Wang, T. Zhang, M. Barua, R.A. Borgesi, G.J. Bubley, M.L. Lu, and S.P. Balk, Androgen receptor remains critical for cell-cycle progression in androgen-independent CWR22 prostate cancer cells. *Am J Pathol*, 2006. 169(2): p. 682-96.
142. Hofman, K., J.V. Swinnen, G. Verhoeven, and W. Heyns, E2F activity is biphasically regulated by androgens in LNCaP cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001. 283(1): p. 97-101.
143. Frolov, M.V. and N.J. Dyson, Molecular mechanisms of E2F-dependent activation and pRB-mediated repression. *J Cell Sci*, 2004. 117(Pt 11): p. 2173-81.

144. Zhou, Y., Y. Zhong, Y. Wang, X. Zhang, D.L. Batista, R. Gejman, P.J. Ansell, J. Zhao, C. Weng, and A. Klibanski, Activation of p53 by MEG3 non-coding RNA. *J Biol Chem*, 2007. 282(34): p. 24731-42.
145. Mosmann, T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 1983. 65(1-2): p. 55-63.
146. Liang, C.C., A.Y. Park, and J.L. Guan, In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc*, 2007. 2(2): p. 329-33.
147. Franken, N.A., H.M. Rodermond, J. Stap, J. Haveman, and C. van Bree, Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc*, 2006. 1(5): p. 2315-9.
148. Biological General Repository for Interaction Datasets.
<https://thebiogrid.org/> Erişim Tarihi: 06.04.2019
149. RNAfold Web Server.
<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>
Erişim Tarihi: 01.12.2019
150. DisplayR
<https://www.displayr.com> Erişim Tarihi: 17.11.2019
151. Noone, A.M., K.A. Cronin, S.F. Altekruse, N. Howlader, D.R. Lewis, V.I. Petkov, and L. Penberthy, Cancer Incidence and Survival Trends by Subtype Using Data from the Surveillance Epidemiology and End Results Program, 1992-2013. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2017. 26(4): p. 632-641.
152. Catalona, W.J., D.S. Smith, T.L. Ratliff, K.M. Dodds, D.E. Coplen, J.J. Yuan, J.A. Petros, and G.L. Andriole, Measurement of prostate-specific antigen in serum as a screening test for prostate cancer. *N Engl J Med*, 1991. 324(17): p. 1156-61.
153. Kim, E.H. and A.D. Bullock, Surgical Management for Prostate Cancer. *Mo Med*, 2018. 115(2): p. 142-145.
154. Welch, H.G. and P.C. Albertsen, Reconsidering Prostate Cancer Mortality - The Future of PSA Screening. *N Engl J Med*, 2020. 382(16): p. 1557-1563.

155. Brenes Bermudez, F.J. and A. Alcantara Montero, [Early detection or screening in the prevention of prostate cancer?]. *Semergen*, 2017. 43(2): p. 100-108.
156. Jemal, A., S.A. Fedewa, J. Ma, R. Siegel, C.C. Lin, O. Brawley, and E.M. Ward, Prostate Cancer Incidence and PSA Testing Patterns in Relation to USPSTF Screening Recommendations. *JAMA*, 2015. 314(19): p. 2054-61.
157. Wolf, A.M., R.C. Wender, R.B. Etzioni, I.M. Thompson, A.V. D'Amico, R.J. Volk, D.D. Brooks, C. Dash, I. Guessous, K. Andrews, C. DeSantis, R.A. Smith, and C. American Cancer Society Prostate Cancer Advisory, American Cancer Society guideline for the early detection of prostate cancer: update 2010. *CA Cancer J Clin*, 2010. 60(2): p. 70-98.
158. Johansson, J.E., O. Andren, S.O. Andersson, P.W. Dickman, L. Holmberg, A. Magnuson, and H.O. Adami, Natural history of early, localized prostate cancer. *JAMA*, 2004. 291(22): p. 2713-9.
159. Fitzgerald, K.A., J.C. Evans, J. McCarthy, J. Guo, M. Prencipe, M. Kearney, W.R. Watson, and C.M. O'Driscoll, The role of transcription factors in prostate cancer and potential for future RNA interference therapy. *Expert Opin Ther Targets*, 2014. 18(6): p. 633-49.
160. Baumgart, S.J., E. Nevedomskaya, and B. Haendler, Dysregulated Transcriptional Control in Prostate Cancer. *Int J Mol Sci*, 2019. 20(12).
161. Dick, F.A., D.W. Goodrich, J. Sage, and N.J. Dyson, Non-canonical functions of the RB protein in cancer. *Nat Rev Cancer*, 2018. 18(7): p. 442-451.
162. Iyer, M.K., Y.S. Niknafs, R. Malik, U. Singhal, A. Sahu, Y. Hosono, T.R. Barrette, J.R. Prensner, J.R. Evans, S. Zhao, A. Poliakov, X. Cao, S.M. Dhanasekaran, Y.M. Wu, D.R. Robinson, D.G. Beer, F.Y. Feng, H.K. Iyer, and A.M. Chinnaiyan, The landscape of long noncoding RNAs in the human transcriptome. *Nat Genet*, 2015. 47(3): p. 199-208.
163. Chiu, H.S., S. Somvanshi, E. Patel, T.W. Chen, V.P. Singh, B. Zorman, S.L. Patil, Y. Pan, S.S. Chatterjee, N. Cancer Genome Atlas Research, A.K. Sood, P.H. Gunaratne, and P. Sumazin, Pan-Cancer Analysis of lncRNA Regulation Supports Their Targeting of Cancer Genes in Each Tumor Context. *Cell Rep*, 2018. 23(1): p. 297-312 e12.

164. Guo, H., M. Ahmed, F. Zhang, C.Q. Yao, S. Li, Y. Liang, J. Hua, F. Soares, Y. Sun, J. Langstein, Y. Li, C. Poon, S.D. Bailey, K. Desai, T. Fei, Q. Li, D.H. Sendorek, M. Fraser, J.R. Prensner, T.J. Pugh, M. Pomerantz, R.G. Bristow, M. Lupien, F.Y. Feng, P.C. Boutros, M.L. Freedman, M.J. Walsh, and H.H. He, Modulation of long noncoding RNAs by risk SNPs underlying genetic predispositions to prostate cancer. *Nat Genet*, 2016. 48(10): p. 1142-50.
165. Kumegawa, K., R. Maruyama, E. Yamamoto, M. Ashida, H. Kitajima, A. Tsuyada, T. Niinuma, M. Kai, H.O. Yamano, T. Sugai, T. Tokino, Y. Shinomura, K. Imai, and H. Suzuki, A genomic screen for long noncoding RNA genes epigenetically silenced by aberrant DNA methylation in colorectal cancer. *Sci Rep*, 2016. 6: p. 26699.
166. Du, Z., T. Fei, R.G. Verhaak, Z. Su, Y. Zhang, M. Brown, Y. Chen, and X.S. Liu, Integrative genomic analyses reveal clinically relevant long noncoding RNAs in human cancer. *Nat Struct Mol Biol*, 2013. 20(7): p. 908-13.
167. Sahin, Y., Z. Altan, K. Arman, E. Bozgeyik, M. Koruk Ozer, and A. Arslan, Inhibition of miR-664a interferes with the migration of osteosarcoma cells via modulation of MEG3. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017. 490(3): p. 1100-1105.
168. Johnsson, P., L. Lipovich, D. Grander, and K.V. Morris, Evolutionary conservation of long non-coding RNAs; sequence, structure, function. *Biochim Biophys Acta*, 2014. 1840(3): p. 1063-71.
169. Wu, M., Y. Huang, T. Chen, W. Wang, S. Yang, Z. Ye, and X. Xi, LncRNA MEG3 inhibits the progression of prostate cancer by modulating miR-9-5p/QKI-5 axis. *J Cell Mol Med*, 2019. 23(1): p. 29-38.
170. Zhou, Y., H. Yang, W. Xia, L. Cui, R. Xu, H. Lu, D. Xue, Z. Tian, T. Ding, Y. Cao, Q. Shi, and X. He, LncRNA MEG3 inhibits the progression of prostate cancer by facilitating H3K27 trimethylation of EN2 through binding to EZH2. *J Biochem*, 2020. 167(3): p. 295-301.
171. Burkhart, D.L., K.L. Morel, A.V. Sheahan, Z.A. Richards, and L. Ellis, The Role of RB in Prostate Cancer Progression. *Adv Exp Med Biol*, 2019. 1210: p. 301-318.

172. Udayakumar, T., M.M. Shareef, D.A. Diaz, M.M. Ahmed, and A. Pollack, The E2F1/Rb and p53/MDM2 pathways in DNA repair and apoptosis: understanding the crosstalk to develop novel strategies for prostate cancer radiotherapy. *Semin Radiat Oncol*, 2010. 20(4): p. 258-66.
173. Lu, K.H., W. Li, X.H. Liu, M. Sun, M.L. Zhang, W.Q. Wu, W.P. Xie, and Y.Y. Hou, Long non-coding RNA MEG3 inhibits NSCLC cells proliferation and induces apoptosis by affecting p53 expression. *BMC Cancer*, 2013. 13: p. 461.
174. Mondal, T., S. Subhash, R. Vaid, S. Enroth, S. Uday, B. Reinius, S. Mitra, A. Mohammed, A.R. James, E. Hoberg, A. Moustakas, U. Gyllensten, S.J. Jones, C.M. Gustafsson, A.H. Sims, F. Westerlund, E. Gorab, and C. Kanduri, MEG3 long noncoding RNA regulates the TGF-beta pathway genes through formation of RNA-DNA triplex structures. *Nat Commun*, 2015. 6: p. 7743.
175. Pendergast, A.M., The Abl family kinases: mechanisms of regulation and signaling. *Adv Cancer Res*, 2002. 85: p. 51-100.
176. Greuber, E.K., P. Smith-Pearson, J. Wang, and A.M. Pendergast, Role of ABL family kinases in cancer: from leukaemia to solid tumours. *Nat Rev Cancer*, 2013. 13(8): p. 559-71.
177. Yu, E.Y., G. Wilding, E. Posadas, M. Gross, S. Culine, C. Massard, M.J. Morris, G. Hudes, F. Calabro, S. Cheng, G.C. Trudel, P. Paliwal, and C.N. Sternberg, Phase II study of dasatinib in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 2009. 15(23): p. 7421-8.
178. Rabbani, S.A., M.L. Valentino, A. Arakelian, S. Ali, and F. Boschelli, SKI-606 (Bosutinib) blocks prostate cancer invasion, growth, and metastasis in vitro and in vivo through regulation of genes involved in cancer growth and skeletal metastasis. *Mol Cancer Ther*, 2010. 9(5): p. 1147-57.
179. Lopez-Bergami, P., E. Lau, and Z. Ronai, Emerging roles of ATF2 and the dynamic AP1 network in cancer. *Nat Rev Cancer*, 2010. 10(1): p. 65-76.
180. Vlahopoulos, S.A., S. Logotheti, D. Mikas, A. Giarika, V. Gorgoulis, and V. Zoumpourlis, The role of ATF-2 in oncogenesis. *Bioessays*, 2008. 30(4): p. 314-27.

181. Maekawa, T., T. Shinagawa, Y. Sano, T. Sakuma, S. Nomura, K. Nagasaki, Y. Miki, F. Saito-Ohara, J. Inazawa, T. Kohno, J. Yokota, and S. Ishii, Reduced levels of ATF-2 predispose mice to mammary tumors. *Mol Cell Biol*, 2007. 27(5): p. 1730-44.
182. Shah, M., A. Bhoumik, V. Goel, A. Dewing, W. Breitwieser, H. Kluger, S. Krajewski, M. Krajewska, J. Dehart, E. Lau, D.M. Kallenberg, H. Jeong, A. Eroshkin, D.C. Bennett, L. Chin, M. Bosenberg, N. Jones, and Z.A. Ronai, A role for ATF2 in regulating MITF and melanoma development. *PLoS Genet*, 2010. 6(12): p. e1001258.
183. Ricote, M., I. Garcia-Tunon, F. Bethencourt, B. Fraile, P. Onsurbe, R. Paniagua, and M. Royuela, The p38 transduction pathway in prostatic neoplasia. *J Pathol*, 2006. 208(3): p. 401-7.
184. Bhoumik, A., B. Fichtman, C. Derossi, W. Breitwieser, H.M. Kluger, S. Davis, A. Subtil, P. Meltzer, S. Krajewski, N. Jones, and Z. Ronai, Suppressor role of activating transcription factor 2 (ATF2) in skin cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. 105(5): p. 1674-9.
185. Bookstein, R., J.Y. Shew, P.L. Chen, P. Scully, and W.H. Lee, Suppression of tumorigenicity of human prostate carcinoma cells by replacing a mutated RB gene. *Science*, 1990. 247(4943): p. 712-5.
186. Vale-Cruz, D.S., Q. Ma, J. Syme, and P.A. LuValle, Activating transcription factor-2 affects skeletal growth by modulating pRb gene expression. *Mech Dev*, 2008. 125(9-10): p. 843-56.
187. Tang, Y. and C. Eng, p53 down-regulates phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 protein stability partially through caspase-mediated degradation in cells with proteasome dysfunction. *Cancer Res*, 2006. 66(12): p. 6139-48.
188. Townsend, P.A., A. Stephanou, G. Packham, and D.S. Latchman, BAG-1: a multi-functional pro-survival molecule. *Int J Biochem Cell Biol*, 2005. 37(2): p. 251-9.
189. Sharp, A., S.J. Crabb, P.A. Townsend, R.I. Cutress, M. Brimmell, X.H. Wang, and G. Packham, BAG-1 in carcinogenesis. *Expert Rev Mol Med*, 2004. 6(7): p. 1-15.

190. Krajewska, M., B.C. Turner, A. Shabaik, S. Krajewski, and J.C. Reed, Expression of BAG-1 protein correlates with aggressive behavior of prostate cancers. *Prostate*, 2006. 66(8): p. 801-10.
191. Stupack, D.G., Caspase-8 as a therapeutic target in cancer. *Cancer Lett*, 2013. 332(2): p. 133-40.
192. Morgan, D.O., Principles of CDK regulation. *Nature*, 1995. 374(6518): p. 131-4.
193. Malumbres, M. and M. Barbacid, Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem Sci*, 2005. 30(11): p. 630-41.
194. Lu, S., S.Y. Tsai, and M.J. Tsai, Regulation of androgen-dependent prostatic cancer cell growth: androgen regulation of CDK2, CDK4, and CKI p16 genes. *Cancer Res*, 1997. 57(20): p. 4511-6.
195. Enders, G.H., Expanded roles for Chk1 in genome maintenance. *J Biol Chem*, 2008. 283(26): p. 17749-52.
196. Verlinden, L., I. Vanden Bempt, G. Eelen, M. Drijkoningen, I. Verlinden, K. Marchal, C. De Wolf-Peeters, M.R. Christiaens, L. Michiels, R. Bouillon, and A. Verstuyf, The E2F-regulated gene Chk1 is highly expressed in triple-negative estrogen receptor /progesterone receptor /HER-2 breast carcinomas. *Cancer Res*, 2007. 67(14): p. 6574-81.
197. Xu, J., Y. Li, F. Wang, X. Wang, B. Cheng, F. Ye, X. Xie, C. Zhou, and W. Lu, Suppressed miR-424 expression via upregulation of target gene Chk1 contributes to the progression of cervical cancer. *Oncogene*, 2013. 32(8): p. 976-87.
198. Gottifredi, V., O. Karni-Schmidt, S.S. Shieh, and C. Prives, p53 down-regulates CHK1 through p21 and the retinoblastoma protein. *Mol Cell Biol*, 2001. 21(4): p. 1066-76.
199. Witkiewicz, A.K., S. Chung, R. Brough, P. Vail, J. Franco, C.J. Lord, and E.S. Knudsen, Targeting the Vulnerability of RB Tumor Suppressor Loss in Triple-Negative Breast Cancer. *Cell Rep*, 2018. 22(5): p. 1185-1199.
200. Ishida, S., E. Huang, H. Zuzan, R. Spang, G. Leone, M. West, and J.R. Nevins, Role for E2F in control of both DNA replication and mitotic functions as revealed from DNA microarray analysis. *Mol Cell Biol*, 2001. 21(14): p. 4684-99.

201. Ginsberg, D., E2F1 pathways to apoptosis. *FEBS Lett*, 2002. 529(1): p. 122-5.
202. Davis, J.N., K.J. Wojno, S. Daignault, M.D. Hofer, R. Kuefer, M.A. Rubin, and M.L. Day, Elevated E2F1 inhibits transcription of the androgen receptor in metastatic hormone-resistant prostate cancer. *Cancer Res*, 2006. 66(24): p. 11897-906.
203. Johnson, D.G., The paradox of E2F1: oncogene and tumor suppressor gene. *Mol Carcinog*, 2000. 27(3): p. 151-7.
204. Dimova, D.K. and N.J. Dyson, The E2F transcriptional network: old acquaintances with new faces. *Oncogene*, 2005. 24(17): p. 2810-26.
205. Johnson, D.G. and J. Degregori, Putting the Oncogenic and Tumor Suppressive Activities of E2F into Context. *Curr Mol Med*, 2006. 6(7): p. 731-8.
206. Tsantoulis, P.K. and V.G. Gorgoulis, Involvement of E2F transcription factor family in cancer. *Eur J Cancer*, 2005. 41(16): p. 2403-14.
207. Ooft, M.L., W.W. Braunius, P. Heus, I. Stegeman, P.J. van Diest, W. Grolman, C.I. Zuur, and S.M. Willems, Prognostic significance of the EGFR pathway in nasopharyngeal carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Biomark Med*, 2015. 9(10): p. 997-1010.
208. Giubellino, A., T.R. Burke, Jr., and D.P. Bottaro, Grb2 signaling in cell motility and cancer. *Expert Opin Ther Targets*, 2008. 12(8): p. 1021-33.
209. Shaulian, E. and M. Karin, AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene*, 2001. 20(19): p. 2390-400.
210. Abate, C. and T. Curran, Encounters with Fos and Jun on the road to AP-1. *Semin Cancer Biol*, 1990. 1(1): p. 19-26.
211. Xu, C., G. Shen, X. Yuan, J.H. Kim, A. Gopalkrishnan, Y.S. Keum, S. Nair, and A.N. Kong, ERK and JNK signaling pathways are involved in the regulation of activator protein 1 and cell death elicited by three isothiocyanates in human prostate cancer PC-3 cells. *Carcinogenesis*, 2006. 27(3): p. 437-45.
212. Bartke, T. and T. Kouzarides, Decoding the chromatin modification landscape. *Cell Cycle*, 2011. 10(2): p. 182.

213. Shahbazian, M.D. and M. Grunstein, Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation. *Annu Rev Biochem*, 2007. 76: p. 75-100.
214. Chmelar, R., G. Buchanan, E.F. Need, W. Tilley, and N.M. Greenberg, Androgen receptor coregulators and their involvement in the development and progression of prostate cancer. *Int J Cancer*, 2007. 120(4): p. 719-33.
215. She, Q.B., N. Chen, A.M. Bode, R.A. Flavell, and Z. Dong, Deficiency of c-Jun-NH(2)-terminal kinase-1 in mice enhances skin tumor development by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Res*, 2002. 62(5): p. 1343-8.
216. Strle, K., S.R. Broussard, R.H. McCusker, W.H. Shen, J.M. LeClerc, R.W. Johnson, G.G. Freund, R. Dantzer, and K.W. Kelley, C-jun N-terminal kinase mediates tumor necrosis factor-alpha suppression of differentiation in myoblasts. *Endocrinology*, 2006. 147(9): p. 4363-73.
217. Xu, R. and J. Hu, The role of JNK in prostate cancer progression and therapeutic strategies. *Biomed Pharmacother*, 2020. 121: p. 109679.
218. Isobe, M., B.S. Emanuel, D. Givol, M. Oren, and C.M. Croce, Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. *Nature*, 1986. 320(6057): p. 84-5.
219. Vogelstein, B., D. Lane, and A.J. Levine, Surfing the p53 network. *Nature*, 2000. 408(6810): p. 307-10.
220. Ozaki, T. and A. Nakagawara, Role of p53 in Cell Death and Human Cancers. *Cancers (Basel)*, 2011. 3(1): p. 994-1013.
221. Zhang, Y., J. Wu, H. Jing, G. Huang, Z. Sun, and S. Xu, Long noncoding RNA MEG3 inhibits breast cancer growth via upregulating endoplasmic reticulum stress and activating NF-kappaB and p53. *J Cell Biochem*, 2019. 120(4): p. 6789-6797.
222. Zhu, J., S. Liu, F. Ye, Y. Shen, Y. Tie, J. Zhu, L. Wei, Y. Jin, H. Fu, Y. Wu, and X. Zheng, Long Noncoding RNA MEG3 Interacts with p53 Protein and Regulates Partial p53 Target Genes in Hepatoma Cells. *PLoS One*, 2015. 10(10): p. e0139790.

223. Hu, G., C. Yan, P. Xie, Y. Cao, J. Shao, and J. Ge, PRMT2 accelerates tumorigenesis of hepatocellular carcinoma by activating Bcl2 via histone H3R8 methylation. *Exp Cell Res*, 2020: p. 112152.
224. Zhu, S., Y. Xu, M. Song, G. Chen, H. Wang, Y. Zhao, Z. Wang, and F. Li, PRDM16 is associated with evasion of apoptosis by prostatic cancer cells according to RNA interference screening. *Mol Med Rep*, 2016. 14(4): p. 3357-61.
225. Stefan, E. and K. Bister, MYC and RAF: Key Effectors in Cellular Signaling and Major Drivers in Human Cancer. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2017. 407: p. 117-151.
226. McCubrey, J.A., L.S. Steelman, W.H. Chappell, S.L. Abrams, E.W. Wong, F. Chang, B. Lehmann, D.M. Terrian, M. Milella, A. Tafuri, F. Stivala, M. Libra, J. Basecke, C. Evangelisti, A.M. Martelli, and R.A. Franklin, Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta*, 2007. 1773(8): p. 1263-84.
227. Sankpal, U.T., S. Goodison, M. Abdelrahim, and R. Basha, Targeting Sp1 transcription factors in prostate cancer therapy. *Med Chem*, 2011. 7(5): p. 518-25.
228. Hitchens, M.R. and P.D. Robbins, The role of the transcription factor DP in apoptosis. *Apoptosis*, 2003. 8(5): p. 461-8.

ÖZGEÇMİŞ

17 Ağustos 1990 yılında Gaziantep’te doğdu. İlköğretimini Özel Gül Ortaokulu’nda ve lise öğrenimini A.K. Akınal Anadolu Lisesi’nde tamamladı. 2009 yılında Fatih Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü’nde lisans eğitimine başladı. 2012 yılında Gaziantep Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı’nda ve 2013 yılında İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı’nda yaz stajı yaptı. 2014 Bahar Döneminde lisanstan dereceyle mezun oldu. 2014-2016 yılları arasında Gaziantep Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans öğrenimini tamamladı. Aynı yıl Gaziantep Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik doktora programına başladı. Doktora öğrenimi boyunca TÜBİTAK BİDEB 2211/A Genel Yurtiçi Doktora Bursu aldı.