

T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
ANADOLU ÜNİVERSİTESİ İLE ORTAK PROGRAM

**PROSTAT KANSERİ İLE İLİŞKİLİ MİRNA'LARIN ETKİLİ OLDUĞU GENLERİN
İN SİLİKO VE DENEYSEL ANALİZLERLE İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

MERVE GÖZTEPE

TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. ONUR EROĞLU

BİLECİK, 2024

10620213

T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
ANADOLU ÜNİVERSİTESİ İLE ORTAK PROGRAM

**PROSTAT KANSERİ İLE İLİŞKİLİ MİRNA'LARIN ETKİLİ OLDUĞU GENLERİN
İN SİLİKO VE DENEYSEL ANALİZLERLE İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

MERVE GÖZTEPE

TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. ONUR EROĞLU

BİLECİK, 2024

10620213

BEYAN

“Prostat kanseri ile ilişkili miRNA’ların etkili olduğu genlerin in siliko ve deneysel analizlerle incelenmesi” adlı doktora tezinin hazırlık ve yazımı sırasında bilimsel araştırma ve etik kurallarına uyduğumu, başkalarının eserlerinden yararlandığım bölümlerde bilimsel kurallara uygun olarak atıfta bulunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, tezin herhangi bir kısmının Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını, aksinin tespit edileceği muhtemel durumlarda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Bu çalışmanın, Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP), TÜBİTAK veya benzeri kuruluşlarca desteklenmesi durumunda; projenin ve destekleyen kurumun adı proje numarası ile birlikte, ETİK KURUL onayı alınması durumunda ise ETİK KURUL tarih karar ve sayı bilgilerinin beyan edilmesi gerekmektedir.			
DESTEK ALINMIŞTIR	☒	DESTEK ALINMAMIŞTIR	☐
Destek alındı ise;			
Destekleyen kurum; TÜBİTAK			
Desteğin Türü		Proje Numarası	
1- BAP (Bilimsel Araştırma Projesi)		221Z332	
2- TÜBİTAK - 1002 Hızlı Destek Programı			
Diğer;.....			
ETİK KURUL onayı var ise;			
ETİK KURUL karar tarih/sayı:		/.....	

Merve Göztepe

Tarih

.....

İmza

.....

ÖN SÖZ

Doktora tez çalışmamın planlanması ve yürütülmesinde tüm bilgi ve tecrübesiyle hiçbir zaman benden desteğini esirgemeyen çok değerli tez danışman hocam, Sayın Doç. Dr. Onur EROĞLU'na değerli katkı ve emekleri için teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Doktora çalışmamı onaylayarak destek veren TÜBİTAK kurumuna teşekkürlerimi sunmak isterim. Proje/tez süresince ihtiyaç duyduğum noktalarda yardımını esirgemeyen elindeki malzemeleri paylaşan Prof. Dr. Hatice Mehtap KUTLU'ya, Prof. Dr. Beyhan DURAK ARAS'a, Doç. Dr. Bilge DEBELEÇ BÜTÜNER'e, Dr. Öğr. Üyesi Işıl Ezgi ERYILMAZ'a, Doç. Dr. Şerif ŞENTÜRK'e ve Doç. Dr. Sinem ÇAĞLAYAN hocalarıma da teşekkürü borç bilirim. Bu süreçte böyle güzel insanlarla tanışmak, birlikte çalışma imkânı bulmak benim için onur vermiştir.

Lisans eğitimimden başlayarak doktora eğitim sürecim boyunca yardım ve desteklerini esirgemeyen Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü tüm öğretim üyelerine değerli katkı ve emekleri için teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Doktora eğitimim ve laboratuvar çalışmalarında yardım ve desteklerini esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Hacer KAYA ÇAKIR'a, Öğr. Gör. Dr. Gülçin ÇETİN KILIÇASLAN'a, Öğr. Gör. Dr. Osman TÜRKYILMAZ'a, Öğr. Gör. Özge KAYGUSUZ İZGÖRDÜ'ye ve tüm asistan ve lisansüstü eğitim gören arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Doktora çalışmam süresince her zaman yanımda olan ve benden desteklerini hiçbir zaman esirgemeyerek bugünlere ulaşmamı sağlayan sevgili babam Yaşar ÇELEN'e, annem Nuray ÇELEN'e ve kız kardeşim Hatice Betül ÇELEN ATAŞ'a yine kayınvalidem Gülser GÖZTEPE'ye ve kayınpederim Celal GÖZTEPE'ye içten sevgilerimle teşekkür ederim. Aynı zamanda çalışmam boyunca her anımda yanımda olan desteklerini esirgemeyen sevgili eşim Emrah GÖZTEPE'ye ve bu süreçte hayatıma da anlam katan bana sevginin en masum ve saf halini gösteren sevgili oğlum Ali Kerem GÖZTEPE'ye en içten saygılarım ve sevgimle teşekkür ederim.

Merve Göztepe

2024

ÖZET

PROSTAT KANSERİ İLE İLİŞKİLİ MİRNA'LARIN ETKİLİ OLDUĞU GENLERİN İN SİLİKO VE DENEYSEL ANALİZLERLE İNCELENMESİ

Prostat kanseri (PKa), dünya çapında erkekler arasında en sık teşhis edilen ikinci kanser ve kanser ölümlerinin önde gelen beşinci nedenidir. PKa'nın zor kısmı tümörün birden fazla sinyal yolunun dahil olduğu heterojen bir hale gelmesidir. Bu durumda, tümörün ilerlemesi ve metastaz yapması kaçınılmazdır. Bu durumun önüne geçilebilmesi için PKa ile ilgili daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Bu sonuçlardan yola çıkarak yapılacak çalışma ile prostat kanseri hücrelerinde miR-375 ve miR-125b-5p'nin ve hedeflerinin hem de bu miRNA'lar veya etkili olduğu düşünülen genlerin PI3K sinyal yolağı üzerindeki etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Projede miR-375 ve miR-125b-5p'nin potansiyel hedeflerinin belirlenmesi amacıyla miRNA hedef tahmin araçları ile tahmini hedef genleri belirlenmiştir. Sonrasında genlerin doğrulanmış olup olmadığı ve sinyal yollarındaki görevleri incelenmiştir. Çalışma dizaynı yapıldıktan sonra miR-375 ve miR-125b-5p mimic/inhibitörleri kullanılarak transfeksiyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. MiRNA'ların ekspresyon seviyesindeki değişikliklerin PKa hücrelerinde hücre canlılığı ve hücre göçü üzerine etkileri incelenmiştir. İlgili genlerin ekspresyon ve protein seviyelerindeki değişikliklerini değerlendirmek amacıyla qRT-PCR ve western blotlama işlemleri yapılmıştır.

Sonuçlar incelendiğinde ise miR-375 ve miR-125b-5p'nin upregülasyonunun hücre canlılığını azalttığı gözlenmiştir. Yara iyileşmesi testinde miR-375 upregülasyonu hücre göçünü engellemezken, miR-125-5p upregülasyonu hücre göçünü azaltmıştır. Bunun aksine her iki miRNA'nın downregülasyonu ise hücre göçünü azaltmıştır. Ekspresyon analizleri ise miR-375'in TSC1'i hedeflemediğini, miR-125b-5p'nin ise CYTH1'i hedefleyebileceğini düşündürmektedir. Aynı zamanda miR-375 ve miR-125b-5p'nin sinyal yolundaki molekülleri etkilediği ve önemli bir düzenleyicisi olabileceği özellikle miR-375'nin mTOR gibi önemli bir molekülü düzenlediği gösterilmiştir. Fakat hücrelerdeki etkileri farklılık göstermektedir.

Sonuç olarak, çalışma sonucunda elde edilen veriler kanser gelişiminde önemli bir yere sahip olan PI3K sinyal yolağının prostat kanseri oluşundaki etkilerinin anlaşılması açısından önemlidir ve literatüre katkı sağlayacaktır. MiRNA'ların biyobelirteç olarak kullanımı veya yeni tedavi seçeneklerinin geliştirilebilmesi açısından önemli bir çalışmadır.

Anahtar Kelimeler: Karsinogenez, Gen Ekspresyonu, MikroRNA'lar, Prostatik Neoplazmlar

ABSTRACT

INVESTIGATION OF PROSTATE CANCER-ASSOCIATED GENES AFFECTED BY MIRNAS BY IN SILICO AND EXPERIMENTAL ANALYSES

Prostate cancer (PCa) is the second most commonly diagnosed cancer among men worldwide and the fifth leading cause of cancer death. Despite its high prevalence, diagnostic methods can lead to misdiagnosis, resulting in unbearable side effects. The difficult part of PCa is that the tumor becomes heterogeneous, with multiple signaling pathways involved. In this case, tumor progression and metastasis are inevitable. More studies on PCa are needed to prevent this situation. Based on these results, the aim of this study is to investigate the effects of miR-375 and miR-125b-5p and their targets and the effects of these miRNAs or genes thought to be effective on the PI3K signaling pathway in prostate cancer cells.

In order to determine the potential targets of miR-375 and miR-125b-5p in the project, estimated target genes were determined by miRNA target prediction tools. Afterwards, whether the genes were validated and their functions in signaling pathways were examined. After the study design, transfection was performed using miR-375 and miR-125b-5p mimics/inhibitors. The effects of changes in the expression level of miRNAs on cell viability and cell migration in PCa cells were examined. qRT-PCR and western blotting were performed to evaluate the changes in the expression and protein levels of the relevant genes.

The results showed that upregulation of miR-375 and miR-125b-5p decreased cell viability. In the wound healing test, miR-375 upregulation did not prevent cell migration, while miR-125b-5p upregulation reduced cell migration. In contrast, downregulation of both miRNAs decreased cell migration. Expression analyses suggested that miR-375 does not target TSC1, while miR-125b-5p may target CYTH1, although no significant change was observed. It has also been shown that miR-375 and miR-125b-5p affect molecules in the signaling pathway and may be an important regulator of signaling pathways, especially miR-375 regulates an important molecule such as mTOR. However, its effects in cells differ.

In conclusion, the data obtained in this study are important in terms of understanding the effects of PI3K signaling pathway, which has an important place in cancer development, on prostate cancer and will contribute to the literature. It is an important study in terms of the use of miRNAs as biomarkers or the development of new treatment options.

Keywords: Carcinogenesis, Gene Expression, MicroRNAs, Prostatic Neoplasms

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖN SÖZ.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
TABLolar LİSTESİ	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	viii
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ	x
GİRİŞ.....	1

BİRİNCİ BÖLÜM

GENEL BİLGİLER

1. GENEL BİLGİLER	6
1.1. Prostat Bezi Anatomi ve Histolojisi.....	6
1.2. Prostat Kanseri Öncesi Maligniteler.....	7
1.3. Prostatik Adenokarsinom İçin Evreleme Sistemleri.....	8
1.4. Prostat Kanseri Başlangıcı ve İlerlemesi	9
1.4.1. Latent ve klinik kanser.....	9
1.5. Prostat Kanseri Genetiği.....	11
1.5.1. Kromozomal değişiklikler.....	11
1.5.2. Androjen reseptörü.....	12
1.5.3. Kastrasyona dirençli prostat kanseri	13
1.5.4. Kalıtım	14
1.5.5. Somatik genetik mutasyonlar.....	16
1.5.6. Tümör baskılayıcı genler	17
1.5.7. Mismatch onarım genleri	19
1.5.8. Onkogenler.....	19
1.5.9. Metastaz	21
1.6. MiRNA'lar ve prostat kanseri.....	21
1.6.1. PKa'da miRNA'ların aberran ekspresyonunun potansiyel mekanizmaları	22
1.6.2. PKa'da miRNA'ların anormal ifadesinin işlevleri.....	24
1.6.3. PKa'da onkogenik miRNA'ların işlevleri.....	24
1.6.4. PKa'da tümör baskılayıcı miRNA'ların işlevleri.....	26
1.6.5. Prostat kanserli hastaların vücut sıvılarındaki miRNA'lar.....	27

1.6.6.	Prostat kanseri teşhisinde mikroRNA'lar	29
1.6.7.	Prostat kanserinin erken teşhisinde mikroRNA	29
1.6.8.	Prostat kanseri için biyobelirteç olarak eksozomal miRNA'lar	30
1.6.9.	Prostat kanserinin prognozunda mikroRNA	31
1.6.10.	Prognostik biyobelirteçler olarak dolaşımdaki miRNA'lar	32
1.6.11.	Terapötik yanıt için biyobelirteç olarak miRNA.....	33
1.6.12.	Prostat kanserinde miR-125b-5p önemi.....	34
1.6.13.	İlaç direncinde miR-125b	36
1.6.14.	Tümör bağışıklığında miR-125b'nin rolü.....	37
1.6.15.	Kanser teşhisi ve prognozunda miR-125b	38
1.6.16.	MiR-125b tarafından düzenlenen sinyal yolları.....	39
1.6.17.	Prostat kanserinde miR-375 önemi	40
1.6.18.	Klinik tedavide miR-375.....	40
1.6.19.	Potansiyel bir teşhis veya prognostik biyobelirteç olarak miR-375	41
1.6.20.	Kanser metastazında miR-375'in mekanizması	42

İKİNCİ BÖLÜM

GEREÇ VE YÖNTEM

2.	GEREÇ VE YÖNTEM	46
2.1.	Kullanılan Cihazlar	46
2.2.	Kullanılan Sarf Malzemeler.....	47
2.3.	Kullanılan Kimyasallar	48
2.4.	Kullanılan Solüsyonlar	50
2.5.	Yöntem	53
2.5.1.	Biyoinformatik analizler	53
2.5.2.	Hücre kültür çalışmaları.....	55
2.5.3.	Transfeksiyon işlemleri.....	57
2.5.3.	Hücre canlılığı testi	58
2.5.4.	Yara iyileşmesi testi	59
2.5.5.	Real -Time-PCR analizleri (qRT-PCR).....	59
2.5.6.	Western blotlama çalışmaları.....	62
2.5.7.	İstatistiksel analiz.....	65

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

SONUÇLAR

3. SONUÇLAR	66
3.1. MiRNA tahmini hedefleri	66
3.2. Deneysel çalışmalarla doğrulanmış miRNA hedefleri	67
3.3. Genlerin ilgili oldukları sinyal yolları ve özellikleri	69
3.4. Hücre Kültürü	75
3.6. miR-125-5p ve miR-375'in Hücre Göçü Üzerine Etkileri	77
3.7. Gen Ekspresyon Analizleri	78
3.7.1. miRNA Ekspresyon Analizleri	78
3.7.2. mRNA Ekspresyon Analizleri	80
3.8. Protein Ekspresyon Analizleri	86

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

TARTIŞMA

4. TARTIŞMA	88
4.1. Sonuç ve Öneriler	96
KAYNAKÇA	99
EKLER	135

TABLÖLER LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1. qPCR mRNA primer dizileri	60
Tablo 2.2. miRNA cDNA dönüşümü ve PCR aşaması için kullanılan primerler	61
Tablo 2.3. cDNA dönüşümü için kullanılan bileşenler ve miktarları	61
Tablo 2.4. cDNA Dönüşümü Reaksiyon Koşulları.....	61
Tablo 2.5. qPCR reaksiyon için gerekli bileşenler ve miktarları	62
Tablo 2.6. qPCR reaksiyon koşulları	62
Tablo 2.7. SDS-PAGE Jel İçeriği ve Konsantrasyonları.....	64
Tablo 3.1. Deneysel çalışmalarla doğrulanmış miR-125b-5p'nin tahmini hedef gen listesi ...	68
Tablo 3.2. Deneysel çalışmalarla doğrulanmış miR-125b-5p'nin tahmini hedef gen listesi ...	69
Tablo 3.3. miR-125b-5p'nin Tahmini Hedef Genlerinin KEGG Pathway Analizleri.....	70
Tablo 3.4. miR-125b-5p'nin Tahmini Hedef Genlerinin Gene Ontology (GO)-Biyolojik Süreç (BP) Analizleri.....	71
Tablo 3.5. miR-125b-5p'nin Tahmini Hedef Genlerinin Gene Ontology (GO)-Hücreyel Komponent (CC) Analizleri	72
Tablo 3.6. miR-125b-5p'nin Tahmini Hedef Genlerinin Gene Ontology (GO)-Moleküler Fonksiyon (MF) Analizleri.....	72
Tablo 3.7. miR-375'in Tahmini Hedef Genlerinin KEGG Pathway Analizleri	74
Tablo 3.8. miR-375'in Tahmini Hedef Genlerinin Gene Ontology (GO)-Biyolojik Süreç (BP) Analizleri	74
Tablo 3.9. miR-375'in Tahmini Hedef Genlerinin Gene Ontology (GO)-Hücreyel Komponent (CC) Analizleri	74
Tablo 3.10. miR-375'in Tahmini Hedef Genlerinin Gene Ontology (GO)-Moleküler Fonksiyon (MF) Analizleri.....	74

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1. Prostatın bölgesel anatomisi.	6
Şekil 1.2. Prostat kanserinin malign öncesi durumları yoluyla ortaya çıkan fenotipik, mikro- çevresel ve moleküler değişiklikler.....	7
Şekil 1.3. İnsan PKA'sı için ilerleme yolu	10
Şekil 1.4. miR-125b'nin hedefi olduğu doğrulanan genler ve görev aldıkları mekanizmalar.	36
Şekil 3.1. TargetScan, miRDB, miRwalk ve Rna22 miRNA hedef tahmin araçları ile belirlenen tahmini hedef gen sayıları.	67
Şekil 3.2. TargetScan, miRDB, miRwalk ve Rna22 miRNA hedef tahmin araçları ile belirlenen tahmini hedef gen sayıları..	67
Şekil 3.3. KEGG Pathway veritabanından elde edilen miR-375 ve miR-125-5p'nin etkili olduğu düşünülen sinyal yolağı özeti.	75
Şekil 3.4. RWPE-1, LNCaP, PC-3 ve DU-145 hücre görüntüleri.	76
Şekil 3.5. PC-3 ve DU-145 hücrelerinde miR-125b-5p ekspresyon değişikliklerinin hücre canlılığına etkisinin gösterilmesi.....	76
Şekil 3.6. PC-3 ve DU-145 hücrelerinde miR-375 ekspresyon değişikliklerinin hücre canlılığına etkisinin gösterilmesi.....	77
Şekil 3.7. DU-145 hücrelerindeki yara iyileşme deneyi sonuçları.	78
Şekil 3.8. RWPE-1 hücrelerinin mimik/inhibitör transfeksiyonu sonrası miR-375 ve miR- 125b-5p miRNA ekspresyon seviyelerinde gözlenen değişiklikler	79
Şekil 3.9. LNCaP hücrelerinin mimik/inhibitör transfeksiyonu sonrası miR-375 ve miR-125b- 5p miRNA ekspresyon seviyelerinde gözlenen değişiklikler.	79
Şekil 3.10. PC-3 hücrelerinin mimik/inhibitör transfeksiyonu sonrası miR-375 ve miR-125b- 5p miRNA ekspresyon seviyelerinde gözlenen değişiklikler.....	80
Şekil 3.11. DU-145 hücrelerinin mimik/inhibitör transfeksiyonu sonrası miR-375 ve miR- 125b-5p miRNA ekspresyon seviyelerinde gözlenen değişiklikler.	80
Şekil 3.12. RWPE-1, LNCaP, PC-3 ve DU-145 hücrelerinde miR-375 mimik/inhibitör uygulaması sonrasında qPCR ile TSC1 gen ekspresyonunun göreceli seviyelerinin analizi... ..	81
Şekil 3.13. RWPE-1, LNCaP, PC-3 ve DU-145 hücrelerinde miR-375 mimik/inhibitör uygulaması sonrasında qPCR ile RHEB gen ekspresyonunun göreceli seviyelerinin analizi.. ..	82
Şekil 3.14. RWPE-1, LNCaP, PC-3 ve DU-145 hücrelerinde miR-375 mimik/inhibitör uygulaması sonrasında qPCR ile PIK3CA gen ekspresyonunun göreceli seviyelerinin analizi	82

Şekil 3.15. RWPE-1, LNCaP, PC-3 ve DU-145 hücrelerinde miR-375 mimik/inhibitör uygulaması sonrasında qPCR ile mTOR gen ekspresyonunun göreceli seviyelerinin analizi.	83
Şekil 3.16. RWPE-1, LNCaP, PC-3 ve DU-145 hücrelerinde miR-125b-5p mimik/inhibitör uygulaması sonrasında qPCR ile ARF1 gen ekspresyonunun göreceli seviyelerinin analizi.	84
Şekil 3.17. RWPE-1, LNCaP, PC-3 ve DU-145 hücrelerinde miR-125b-5p mimik/inhibitör uygulaması sonrasında qPCR ile CYTH1 gen ekspresyonunun göreceli seviyelerinin analizi.	84
Şekil 3.18. RWPE-1, LNCaP, PC-3 ve DU-145 hücrelerinde miR-125b-5p mimik/inhibitör uygulaması sonrasında qPCR ile PLD1 ve PLD2 gen ekspresyonunun göreceli seviyelerinin analizi.	85
Şekil 3.19. RWPE-1, LNCaP, PC-3 ve DU-145 hücrelerinde miR-125b-5p mimik/inhibitör uygulaması sonrasında qPCR ile PIK3CG gen ekspresyonunun göreceli seviyelerinin analizi.	86
Şekil 3.20. PC-3 hücrelerinde miR-375 ve miR-125b-5p mimik/inhibitör uygulaması sonrasında western blotlama ile CYTH1, PLD2 ve TSC1 protein ekspresyonunun göreceli seviyelerinin analizi.	87

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

3' UTR: 3' çevrilmemiş bölge

3 β -HSD: 3 β -hidroksisteroid dehidrojenaz

5' UTR: 5' çevrilmemiş bölge

ABTB1: Ankirin tekrarı ve BTB/POZ alanı içeren protein 1

ADAM11: Metallopeptidaz etki alanı 11

ADT: Androjen yoksunluğu tedavisi

AFP: Alfa fetoprotein

AJCC: Amerikan kanser ortak komitesi

AKAP13: A-kinaz çapa proteini 13

AKR1C3: Aldo-keto redüktaz ailesi 1 üyesi C3

AKT: Serin/Treonin Kinaz 1

ALPK3: Alfa kinaz 3

ANKRD13B: Ankyrin tekrarlama alanı 13b

APC2: Adenomatöz polipozis koli proteini 2

AR: Androjen reseptörü

ARE: Androjen-yanıt elemanları

ARF1: ADP ribozilasyon faktörü 1

ARID3B: AT-zengin etkileşim alanı 3B

ARSI: Arilsülfataz aile üyesi i

ASXL3: ASXL transkripsiyonel düzenleyici 3

ATM: Ataxia-telangiectasia mutasyonlu

ATP10D: ATPaz fosfolipid taşıyıcı 10d

ATXN1: Ataksin 1

ATXN3: Ataksin 3

AUC: Eğri altında kalan alan

BAK1: BCL2 antagonisti/öldürücü 1

BCL2: Apoptoz Düzenleyicisi

BNC2: Basonuclin çinko parmak proteini 2

BP: Biyolojik özellikler

BPH: Benign prostat hiperplazisi

BRCA1: Meme kanseri geni 1

BRCA2: Meme kanseri geni 2

BSN: Bassoon presinaptik sitomatriks proteini

C-MYC: Hücrel miyelositomatoz onkogeni

C15orf39: Kromozom 15 açık okuma çerçevesi 39

C19orf38: Kromozom 19 açık okuma çerçevesi 38

C19orf54: Kromozom 19 açık okuma çerçevesi 54

CC: Hücrel komponent

CDC42SE1: CDC42 küçük efektör protein 1

CDH1: Cadherin 1

CDH5: Kadherin 5

CDK16: Siklin bağımlı kinaz 16

CDK4: Siklin bağımlı kinaz 4

CDK6: Siklin bağımlı kinaz 6

CDKN1B: Sikline bağımlı kinaz inhibitörü 1B

CDS2: Fosfatidat sitidiltransferaz 2

CGREF1: EF-hand domain 1 ile hücre büyüme düzenleyicisi

CHEK2: Checkpoint kinaz 2

CHTF8: Kromozom iletim fidelity faktörü 8

CNIH4: Cornichon ailesi AMPA reseptör yardımcı proteini 4

CNV: Kopya sayısı varyasyonu

COL4A3: Kolajen tip IV alfa 3 zinciri

CORO2B: Koronin 2B

CpG: Sitozin-fosfat-guanin bölgeleri

CRPC: Kastrasyona dirençli prostat kanseri

CSRNPI: Sistein ve serin bakımından zengin nükleer protein 1

CYP17: Sitokrom P450 17A1

CYTH1: Sitohezin-1

DCP1A: DCP1A decapping mRNA 1A

DDP: Sisplatin

DGCR8: Digeorge sendromu kritik bölge 8

DHT: Dihidrotestosteron

DHX33: DEAH-box helikaz 33

DKK3: Dickkopf-3

DNA: Deoksiribonükleik asit

DNMT: DNA metiltransferaz

DOCK3: Sitokinez dedektörü protein 3

DPH2: Diftamid biyosentezi 2

DRAM2: DNA Hasarını Düzenleyen Otofaji Modülatörü 2

DRE: Dijital Rektal Muayene

DVL3: Dishevelled segment polarite proteini 3

E2F2: E2F transkripsiyon faktörü 2

E2F3: E2F Transkripsiyon Faktörü 3

EGF: Epidermal büyüme faktörü

EGFR: Epidermal büyüme faktörü reseptörü

EIF4EBP1: Ökaryotik translasyon başlatma faktörü 4E-bağlayıcı protein 1

ELAC2: Elac ribonükleaz Z 2

ELAVL4: ELAV benzeri RNA bağlayıcı protein 4

ELL: RNA polimeraz II uzama faktörü

EMT: Epitelyal-mezenkimal geçiş

ENTPD1: Ektonükleozid trifosfat difosfohidrolaz-1

ERBB: Eritroblastik onkogen B

ERG: ETS-ilişkili gen

ERK: Hücre dışı sinyalle düzenlenen kinazlar

ETS1: Proto-Oncogene 1, transkripsiyon faktörü

EZF1: E2F transkripsiyon faktörü 1

EZH2: Zeste homolog 2 geliştiricisi

FAM78A: Dizi benzerliği olan aile 78 üye A

FASN: Yağ asidi sentaz

FAT4: Atipik Kadherin 4

FGF: Fibroblast büyüme faktörü

FGFR: Fibroblast büyüme faktörü reseptörü

FNDC3B: Fibronektin Tip III etki alanı içeren 3B

FOXD2: FOXD2 forkhead kutusu D2

FRMD5: FERM etki alanı içeren 5

FZD6: FZD6 frizzled sınıfı reseptör 6

GAB2: GRB2-ilişkili-bağlayıcı protein 2

GAPDH: Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz

GF: Büyüme faktörü

GPR107: G protein bağlantılı reseptör 107

GRSF1: G-zengin RNA dizisi bağlayıcı faktör 1

GSC: Glioblastoma kök hücresi

GSTP1: Glutasyon S-Transferaz Pi 1

H6PD: Heksoz-6-fosfat dehidrojenaz

HDL: yüksek yoğunluklu lipoprotein

HER2: Erb-B2 reseptör tirozin kinaz 2

HGF: Hepatosit büyüme faktörü

HIF: HIF1A hipoksi ile indüklenebilir faktör 1

HNSCC: Baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomu

HOXB13: Homeobox B13

HPC1: Kalıtsal prostat kanseri-1

HPCX: Kalıtsal prostat kanseri, X'e bağlı

HRPC: Hormona dirençli prostat kanseri

IGFR1: İnsülin benzeri büyüme faktörü 1 reseptörü

IGF: İnsülin benzeri büyüme faktörü 1

IL-6: İnterlökin-6

mcRNA: Uzun kodlamayan RNA'lar

ISL2: ISL LIM homeobox 2

KCNIP3: Potasyum voltaj kapılı kanal etkileşimli protein 3

KCTD21: Potasyum kanal tetramerizasyon alanı içeren 21

KLF6: Kruppel-benzeri faktör 6

KPNA6: Karyopherin alt birimi alfa 6

LAC: İnsan akciğer adenokarsinomu

LDL: Düşük yoğunluklu lipoprotein

MAN1B1: Mannosidaz alfa sınıf 1B üye 1

MAP2K7: Mitojenle aktive olan protein kinaz kinaz 7

MAPK: Mitojenle aktive olan protein kinazlar

MARCKS: Myristoylated alanin bakımından zengin protein kinaz C substratı

MEGF8: Çoklu epidermal büyüme faktörü benzeri etki alanları 8

MF: Moleküler fonksiyon

miRNA: Mikrorna

MKNK2: MAP kinazla etkileşen serin/treonin-protein kinaz 2

MKP-1: Mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) fosfataz 1

MLH1: mutL homolog 1

MMP2: matriks metallopeptidaz

mRNA: Mesajcı RNA

MSH1: MUTL protein homolog 1

MTF1: Metal düzenleyici transkripsiyon faktörü 1

MTHFR: Metilen tetrahidrofolat redüktaz

MXI-1: MAX interaktör-1

NCAN: Nörokan

NCLN: Nicalin

ncRNA: Uzun ve kısa protein kodlamayan RNA

NF- κ B: Nükleer faktör kappa B alt birim 1

NIPA1: NIPA magnezyum taşıyıcı 1

NKX3.1: NK3 homeobox 1

NPL: N-asetilnöraminat piruvat liyaz

NR6A1: Nükleer reseptör alt ailesi 6 grup A üye 1

NRXN1: Neureksin 1

NUP210: Nükleoporin 210

OLFML2A: Olfaktomedin benzeri 2A

PCAP: Prostat kanserine yatkınlık

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu

PDCD4: Programlanmış hücre ölümü 4

PDK1: piruvat dehidrojenaz kinaz 1

PDK3: Piruvat dehidrojenaz kinaz 3

PDPK1: Fosfoinositid bağımlı Kinaz-1

PHYHIP: Phytanoyl-CoA 2-hidroksilaz etkileşen protein

PI3K: fosfatidilinositol 3-kinaz 1

PIA: Proliferatif inflamatuvar atrofi

PIAS3: Aktive STAT 3'ün protein inhibitörü

PIK3C2B: Fosfatidilinositol-4-fosfat 3-kinaz katalitik alt birim tip 2 beta

PIK3CA: Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfat 3-kinaz katalitik alt birim alfa

PIK3CG: Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfat 3-kinaz katalitik alt birim gama

PIN: Prostatik intraepitelyal neoplazi

PKa: Prostat kanseri

PLD1: Fosfolipaz D1

PLD2: Fosfolipaz D2

PMM2: Fosfomannomutaz 2

PMS1: PMS1 Homolog 1

PODXL: Podokaliksin gibi

PPARGC1B: Peroksizom proliferatörle aktive edilen reseptör gama koaktivatörü 1-beta

PPM1A: Protein fosfataz 1A

PPP1R12B: Protein fosfataz 1 düzenleyici alt birim 12B

PPT1: Palmitoil-protein tiyoesteraz 1

PRRC1: PRRC1 prolin bakımından zengin sarmal bobin 1

PSA: Prostat Spesifik Antijen

PTC: İnsan papiller tiroid karsinomu

PTEN: Fosfataz ve tensin homologu

RAB3D: RAS onkogen ailesi üyesi

RAD51: RAD51 Rekombinaz

RAF: Proto-onkogen serin/treonin-protein kinaz

RASGEF1A: RasGEF etki alanı aile üyesi 1A

RASGRF2: Ras proteinine özgü guanin nükleotid salma faktörü 2

RBAK: RB ilişkili KRAB çinko parmak

RBM20: Rbm20 RNA bağlayıcı motif proteini 20

RBPJ: İmmünoglobulin kappa J bölgesi için rekombinasyon sinyali bağlayıcı protein

RB: Retinoblastoma

RHEB: Beyinde zenginleştirilmiş Ras homologu

RIT1: CAAX 1 olmaksızın Ras benzeri

RNASEL: Ribonükleaz L

RNF43: RNF43 ring finger proteini 43

ROCK1: rho-ilişkili, coiled-coil içeren protein kinaz 1

RPS6KA1: Ribozomal protein S6 kinaz alfa-1

RUSC2: RUN ve SH3 etki alanı içeren 2

SAMD14: Steril alfa motif alanı içeren 14

SARM1: Steril alfa ve TIR motifi içeren 1

SCLC: Küçük hücreli akciğer kanseri

SCN2B: Sodyum voltaj kapılı kanal beta alt birimi 2

SCN4B: Sodyum kanalı β -alt birimi 4

SESTD1: SEC14 ve spektrin alanı içeren 1

SHOX2: Short-stature homeobox 2

SHTC2: SHOC2 lösinden zengin tekrar scaffold proteini

SLC25A35: Çözünen madde taşıyıcı ailesi 25 üye 35

SLC35C1: Solüt taşıyıcı ailesi 35 üye c1

SLC7A11: Çözünen madde taşıyıcı ailesi 7 üye 11

SMURF1: Smad ubiquitinasyon düzenleyici faktör 1

SNP: Tek nükleotid polimorfizmi

SNX27: Sorting nexin 27

SOCS5: Sitokin sinyalinin baskılayıcısı 5

SP1: Özgüllük proteini 1

SPOP: Benek tipi POZ proteini

SRD5a1: Steroid-5- α -redüktaz tip I

SSTR3: Somatostatin reseptör 3

STAT3: Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü 3

STOX2: Storkhead box 2

SUN1: Sad1 ve UNC84 etki alanı içeren 1

SZRD1: SUZ RNA bağlayıcı alan içeren 1

TACC2: Dönüştürücü asidik sarmal sarmal içeren protein 2

TBC1D16: TBC1 etki alanı aile üyesi 16

TCF4: Transkripsiyon faktörü 4

TCGA: Kanser genom atlası programı

TDG: Timin DNA glikozilaz

TEF: Tirotrof embriyonik faktör

TET2: Tet metilsitozin dioksijenaz 2

TGF- β : Dönüştürücü büyüme faktörü beta 1

TMPRSS2: Transmembran serin proteaz 2

TMZ: Temozolomid

TNPO3: Transportin-3

TPM1: Tropomiyozin alfa-1 zinciri

TRUS: Transrektal ultrason

TSC1: Tüberoskleroz 1

TSTA3: GDP-L-fukoz sentetaz

TYSND1: Tripsin benzeri peroksizomal matriks peptidaz 1

UBE3A: Ubikitin-protein ligaz E3A

UBN1: Ubinüklein 1

WWC2: WW ve C2 alanı içeren 2

XKRX: XK ilişkili X-bağlantılı

YAP1: Yes-ilişkili protein 1

YWHAG: Tirozin 3-monooksijenaz/triptofan 5-monooksijenaz aktivasyon proteini gama

YWHAZ: Tirozin 3-monooksijenaz/triptofan 5-monooksijenaz aktivasyon proteini zeta

ZBTB20: Çinko parmak ve BTB alanı içeren 20

ZBTB34: Çinko parmak ve BTB alanı içeren 34

ZBTB37: Çinko parmak ve BTB alanı içeren 37

ZBTB7A: Çinko parmak ve BTB alanı içeren 7a

ZFP62: Çinko parmak proteini 62

ZFYVE1: Çinko parmak FYVE-tipi içeren 1

ZNF704: Çinko parmak proteini 704

ZNRF3: Zinc and ring finger 3

ZSWIM5: Çinko Parmak SWIM-Tipi İçeren 5

gr: gram

°C: Santigrat derece

dk: Dakika

h: saat

L: Litre

mg: Miligram

ml: mililitre

M: Molar

nm: nanometre

sn: saniye

V: volt

%: Yüzde

μl: Mikrolitre

μM: Mikromolar



GİRİŞ

Prostat kanseri (PKa), 2020'de tahminen 1.414.259 yeni kanser vakası ve 375.314 ölümle dünya çapında erkekler arasında en sık teşhis edilen ikinci kanser ve kanser ölümlerinin önde gelen beşinci nedenidir. İnsidans oranları, geçiş sürecindeki ülkelere göre 3 kat daha yüksektir, mortalite oranları ise daha az değişkendir. Dünya ülkelerinin yarısından fazlasında (112/185) erkeklerde en sık teşhis edilen kanserdir (Sung vd., 2021).

PKa bu kadar yaygın olmasına rağmen, etyolojisi hakkında nispeten çok az şey bilinmektedir. Risk faktörleri, ilerleyen yaş, malignitenin aile öyküsü, belli genetik mutasyonlar (BRCA1 ve BRCA2 gibi) ve hastalıklar (Lynch sendromu) ile sınırlıdır. (Rebbeck vd., 2013). Önemli araştırmalar, PKa'nın gelişimi ve ilerlemesinde androjen reseptörünün (AR) veya diğer önemli genlerin rollerini araştırmaktadır (Misawa, vd., 2016; Wang vd., 2009). Fakat, PKa'nın tümörojenitesini, ilerlemesini veya direnç gelişimini düzenleyen moleküler mekanizmalar ile ilgili belirsizlikler mevcuttur (Testa, Castelli, & Pelosi, 2019).

Vakaların çoğu, ölüme yönelik herhangi bir tehdit olmaksızın sessiz bir seyir sürmektedir. Fakat birçok hasta orta veya yüksek riskli lokalize, lokal olarak ilerlemiş veya metastatik kanser ile başvurmakta ve tedaviye rağmen hastalığa yenik düşmektedir (Teo vd., 2019). Bu nedenlerle PKa çoğu zaman yavaş seyri olan bir hastalık olmasına rağmen uzun vadeli sağlığı tehdit edebilir. PKa'nın erken teşhis edilebilmesi ve etkili tedavi yöntemlerinin geliştirilebilmesi önem arz etmektedir.

PKa, geleneksel olarak dijital rektal muayene (DRE) ve prostata özgü antijen (PSA) kan testi ve ardından transrektal ultrason (TRUS) rehberliğinde biyopsi ile teşhis edilir. PKa heterojen bir hastalık olduğu için, küçük, sessiz, düşük dereceli tümörlerden büyük, agresif, yaşamı tehdit eden tümörlere kadar değişmektedir. Bu nedenle de PKa'da başlangıçta amaç hastalığın varlığını tespit ettikten sonra evreleme ile kanserin yayılımının ve saldırganlığının değerlendirilmesidir. Bu evreleme, prognozu tahmin etmek, tedaviye rehberlik etmek ve hastaların takibini yapmak için çok önemlidir (Descotes, 2019). Fakat bakıldığında bu yaklaşım ileri evreli (klinik olarak anlamlı) PKa'nın eksik tespiti ve düşük evreli (klinik olarak önemsiz) kanserlerin aşırı tespitine sebep olabilmektedir. Sonucunda da klinik olarak önemsiz kansere sahip erkeklerin tedaviden fayda görmediğini gösteren randomize çalışmalara rağmen, bunun belirlenmesi hala bazı erkeklerin aşırı tedavi görmesine neden olmaktadır ve yan etkileri olan radikal tedavi almaktadırlar (Kasivisvanathan vd., 2018). Sonuç olarak veriler tanı yöntemlerinin eksik kaldığını ve etkin tanı yöntemlerinin geliştirilmesi gerektiğini göstermektedir.

PKa'da tedavi seçeneklerine bakıldığında, tümörün derecesine ve evresine bağlı olarak çeşitli tedavi seçenekleri mevcuttur. 5 yıllık sağkalım oranı, lokalize hastalığı olan hastalar için mükemmeldir, ancak ilerlemiş hastalık için önemli ölçüde daha düşüktür. Ne yazık ki çoğu hasta ilaçlara veya radyoterapiye direnç geliştirir ve bu tip kanser genellikle agresiftir ve mevcut tedavi yöntemlerine sınırlı yanıt verir (Razdan, de Souza, & Roberts, 2018). Çoğu PKa, büyüme için androjene ihtiyaç duyar ve androjen yoksunluğu tedavisine (ADT) son derece duyarlıdır (Eisenberger vd., 1998). Bununla birlikte, bu yanıt geçicidir ve hastaların çoğu, kaçınılmaz olarak androjen yoksunluğuna direnç geliştirerek kastrasyona dirençli PKa'ya (CRPC) yol açar. CRPC, kastre serum testosteron seviyelerine rağmen kalıcı tümör büyümesi ile karakterizedir ve bu da önemli hasta ölümlerine yol açar (Tannock vd., 2004). Hücresel düzeyde, CRPC'nin gelişimi, androjen yoksunluğunun neden olduğu strese karşı büyük bir telafi edici yanıt meydana getirir ve kanser hücrelerinin hayatta kalmasına ve ardından düşük testosteron ortamında gelişmesine izin verir. Androjen reseptörü (AR) aktivitesini kastrasyon veya AR antagonistleri kullanarak bloke etmek, olumlu bir yanıt ortaya çıkarır. Bununla birlikte, bu kanserlerin çoğu sonunda nükseder ve hormona dirençli prostat kanserine (HRPC) veya CRPC'ye ilerler (Takayama, Misawa, & Inoue, 2017). Bu süreci yönlendiren moleküler mekanizmaların tam olarak anlaşılması, hastanın hayatta kalmasını etkilemek için CRPC'nin başlatılmasını ve ilerlemesini hedeflemede kritik önem taşır (Edlind & Hsieh, 2014). Belirtildiği gibi AR, prostat bezi gelişiminin önemli bir düzenleyicisi ve PKa gelişiminde çok önemli bir role sahiptir. AR'yi düzenleyen mikroRNA'ların (miRNA) belirlenmesi, gelecekteki terapötiklerin geliştirilmesine yardımcı olacaktır.

MiRNA'lar kodlamayan ribonükleik asitlerdir (RNA'lar), 19-22 nükleotid uzunluğunda, hedef mesajcı RNA'ların (mRNA) 3' çevrilmemiş bölgesine (3'UTR) bağlanarak, mRNA dengesizleşmesine veya translasyonun inhibisyonuna yol açar (He & Hannon, 2004; Lujambio & Lowe, 2012; Mirnezami, vd., 2009). MiRNA'lar aynı zamanda hedef mRNA'ların 5' çevrilmemiş bölgesine (5' UTR) bağlanarak gelişmiş translasyona yol açabilir (Mirnezami vd., 2009). İlginç bir şekilde, her miRNA birkaç yüz mRNA'yı hedefleyebilir, bu nedenle birden fazla fizyolojik süreçte kritik bir rol oynayabilirler. Dolayısıyla, deregülasyonları yaygın zararlı etkilere yol açabilir. Çalışmalar, PKa da dahil olmak üzere bir dizi insan malignitesinde anti-neoplastik tümör baskılayıcılar (downregüle) veya tümör teşvik eden oncomiR'ler (upregüle) olarak hareket ederek kanser başlangıcında, ilerlemesinde ve metastazında etkili çeşitli miRNA'ları ilişkilendirmiştir (Zhang, vd., 2007). MiRNA'lar ayrıca kanser tespiti, ilerlemesi ve tedavi yanıtının potansiyel biyobelirteçleri olarak ilgi çekmiştir (Bertoli, Cava, & Castiglioni,

2015). Son zamanlarda odak, kanser hastalarının çeşitli vücut sıvılarından invazif olmayan bir şekilde izole edilebilen dolaşımdaki miRNA'lara kaymıştır. Biyobelirteçler olarak dolaşan miRNA'ların avantajları arasında 1) ribonükleaz bozunmasına ve yüksek pH dahil fizyolojik koşullara dirençleri, oda sıcaklığında 24 saat inkübasyon ve sık donma-çözülme ve 2) polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tabanlı tekniklerle nispeten kolay miktar tayini (Mitchell vd., 2008) bulunmaktadır.

Çok sayıda çalışma, miRNA ekspresyon profillerinin aynı tümörün alt tiplerini sınıflandırmak için ve normal ve tümör dokuları arasında kaynağı bilinmeyen tümörleri tanımlamak için ayırt edici olabildiğini göstermiştir (Metias, Lianidou, & Yousef, 2009). Artan kanıtlar, yine miRNA'ların serumda çok kararlı bir biçimde tespit edilebileceğini destekleyerek, dolaşımdaki miRNA'ları kanser teşhisi ve takibi için aktif araştırmada yararlı bir alan haline getiriyor. miRNA ekspresyonu, bazı tümör türlerinde klinik sonucu ve prognozu tahmin edebilir veya hastalık nüksü ve metastazlarının belirteçleri olarak kullanılabilir (Metias vd., 2009). Bu nedenle miRNA'lar kanser hastalarının teşhisi, prognozu ve tedavisi için umut verici araçlar olarak ortaya çıkmaktadır. MiRNA'lar birden fazla gen ve sinyal yolunu hedefledikleri için, kanser tedavisi için de potansiyel hedefler olarak karşımıza çıkmaktadır ve miRNA bazlı kanser tedavisi alanında ilerleme kaydedilmektedir (Massillo, vd., 2017).

PKa'da hücre proliferasyonu, farklılaşması ve progresyonu dahil çeşitli süreçlerde değişen miRNA ifadesi farklı çalışmalarla gösterilmiştir (Filella & Foj, 2017). Çalışmamızda da daha önceki çalışmalarda PKa'da ekspresyon değişikliği olduğu gözlenen hsa-miR-375 ve hsa-miR-125b-5p üzerinde durulacaktır. Projemize de konu olan bu miRNA'lar daha önce laboratuvarımızda çalışılmış olup PKa'lı hastalardaki serum örneklerindeki ekspresyon düzeylerine bakılmıştır. Buradan elde edilen veriler normal serum örnekleri ile kıyaslandığında ekspresyon düzeylerinde farklılık gözlenen bu miRNA'ların PKa için önemli olabileceğini düşündürmüştür (Dülgeroğlu & Eroğlu, 2019). Bu nedenle de etki mekanizmalarının veya hedef genlerinin incelenmesinin PKa'nın anlaşılabilmesi açısından önemli olabileceği kanısına varılmıştır. Yapılan çalışmalara bakıldığında miR-375 ekspresyonunun, sağlıklı prostat dokuları ve komşu kanserli olmayan dokularla karşılaştırıldığında agresif prostat tümörü dokularında açıkça artmış olduğu gözlenmektedir (He vd., 2019). Aynı zamanda serum, plazma ve idrar örneklerinde de yapılan araştırmalarda normal kişilere göre kıyaslandığında yüksek bulunmuş fakat dokularla kıyaslandığında kandaki ekspresyon seviyeleri farklılık göstermektedir. Özellikle idrar örneklerinde sapma daha belirgin bulunmuştur (Song vd., 2018).

Bir başka çalışmada, miR-375 ekspresyon seviyelerinde bulunan farklılığın farklı histolojik tipler ile de ilişkili olduğu öne sürülmüştür (He vd., 2019).

Prostat kanser hücrelerine bakıldığında ise miR-375 ekspresyon seviyelerinde farklılık gözlenmektedir. LNCaP ve 22RV1 gibi AR pozitif olan hücrelerde miR-375 ekspresyonu daha yüksekken, DU-145 ve PC-3 gibi AR negatif hücrelerde miR-375 ekspresyon seviyelerinin nispeten daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Fakat normal prostat hücrelerine (RWPE-1) kıyasla prostat kanserli hücrelerde artış mevcuttur (Chu vd., 2014; Costa-Pinheiro vd., 2015). Sonuçlar bize miR-375'in PKa'nın başlamasında ve büyümesinde önemli bir rol oynayan AR ile de ilişkili olduğu göstermektedir (Chu vd., 2014).

Aynı zamanda daha önceki çalışmalarda iyi bilinen bir oncomiR (kanserle ilişkili miRNA) olarak, dolaşımdaki miR-375'in overekspresyonu PKa metaztazı ile ilişkilendirilmiştir (Cheng vd., 2013; Selth vd., 2012; Song vd., 2018). Yine CRPC aşamasında olan hastalarda ileriye dönük çalışmalarla doğrulanması gerekse de dolaşımdaki miRNA'ların CRPC hastalarının prognozu için hassas bir biyobelirteç görevi görebileceğini göstermektedir. Bu noktada CRPC'de hayatta kalma prognozu miR-375 aday olarak gösterilmiştir (Bidarra vd., 2019; Huang vd., 2015; Zedan, vd., 2020).

Öte yandan miR-125b incelendiğinde tümör baskılayıcı olarak tanımlanmış ve prostat kanseri ilerlemesinde önemli bir düzenleyici olarak karşımıza çıkmaktadır. Çalışmalara bakıldığında farklı PKa örneklerinde ekspresyon seviyelerinde çelişkiler mevcuttur. Normal örneklerle kıyaslandığında prostat kanserli doku, serum ve üre örneklerinde miR-125b ekspresyon seviyelerinin downregüle olduğu tespit edilmiştir (Budd vd., 2015; Dülgeroğlu & Eroğlu, 2019; Fredsøe vd., 2018; Giangreco vd., 2013). Fakat androjene duyarlı LNCaP gibi prostat kanseri hücrelerinde ve androjenden bağımsız PC-3 prostat kanser hücrelerine bakıldığında miR-125b ekspresyon seviyelerinin upregüle olduğu gözlenmiştir (Shi vd., 2011, 2007). Buna karşın DU-145 hücrelerinde miR-125b'nin downregüle olduğu tespit edilmiştir (Lee vd., 2005). AR ile ilişkisi incelendiğinde miR-125b'nin AR'nin önemli bir düzenleyicisi olduğuna ve PKa'da anti-androjenlerin ve diğer hormonal tedavilerin etkinliği açısından spesifik sonuçlara sahip olduğuna dair bulgular elde edilmiştir (Yang, vd., 2012). Yine benzer bir çalışmada PC-3 hücrelerinde miR-125b transfeksiyonunun hücre büyümesini uyardığı tespit edilmiştir (Lee, vd., 2005).

AR ve PI3K yolları, PKa'da en yaygın olarak deregüle edilen iki yoldur. PI3K sinyalinin, son gelişmelere rağmen halen ölümcül olan bir PKa türü olan kastrasyona dirençli hastalığın evriminde rol oynadığına dair kanıtlar bulunmaktadır. Erken evredeki PKa'lı

hastaların %40'ında, hastalığı ilerlemiş kişilerin ise %70-100'ünde PI3K-AKT-mTOR sinyal yolunda değişiklikler gözlenmiştir (Crumbaker, Khoja, & Joshua, 2017). Aynı zamanda miR-125b ile de PI3K sinyal yolunun ilişkisi bulunmaktadır ve miR-125b'nin PI3K-AKT ve MAPK/ERK sinyal yolları üzerinden PKa tümörögenezine katkıda bulunduğu yapılan çalışmalarla ortaya koyulmuştur (Budd vd., 2015). MiR-375'in ise pankreas kanserinde PI3K sinyal yolunda görevli olan PDK1'i negatif yönde düzenlediği ve pankreas kanseri hücrelerinin malignant davranışını AKT sinyal yolu üzerinden baskıladığını tespit etmişlerdir (Zhou vd., 2014). Elde edilen sonuçlar bize miR-375 ve miR-125b-5p'nin PI3K sinyal yolunda ve PKa mekanizmasında önemli bir yere sahip olabileceğini göstermektedir.

Bütün bu sonuçlar miR-375 ve miR-125b'nin PKa'yı sağlıklı kontrollerden ayırmak için potansiyel tanı değerine sahip olduğunu ve miRNA tabanlı tedavi için kullanılabilir olduğunu göstermiş olsa da sonuçlar yetersiz kalmakta ve daha fazla araştırma gerekmektedir. Hedeflenen projede bahsedilen noktalardan yola çıkarak, miR-375 ve miR-125b'nin biyoinformatik analizlerle muhtemel hedefleri tespit edilmiştir. Bu miRNA hedefleri yapılan incelemeler sonucunda ise bütün kanserlerde ve PKa'nın ilerlemesinde de etkili olan PI3K sinyal yolunda etkili genler olarak karşımıza çıkmaktadır. Biz çalışmamızda bu hedef genlerin miRNA'lar ile ve PI3K sinyal yolu ile ilişkisini araştırmak ve bu sayede ilgili miRNA'ların hedef genleri belirlenmiş ve PKa mekanizmasında da açık olmayan kısımlar netlik kazanmış olacaktır.

BİRİNCİ BÖLÜM

GENEL BİLGİLER

1. GENEL BİLGİLER

1.1.Prostat Bezi Anatomi ve Histolojisi

Erkeklerde prostat bezi, mesanenin tabanındaki üretrayı çevreleyen ceviz büyüklüğünde bir dokudur ve seminal sıvının önemli bileşenlerini üretir. Yetişkin prostatı fark edilebilir (Shappell vd., 2004) lobüler yapıdan yoksun olsa da McNeal'ın (McNeal, 1988; McNeal, 1981) klasik çalışması insan prostatını merkezi, periüretral geçiş ve periferik bölgelere karşılık gelen zonal bir mimariye ve ön fibromusküler stromaya sahip olarak tanımlamıştır (Timms, 2008). Önemli olarak, en dıştaki periferik bölge en fazla hacmi kaplar ve prostat kansinomlarının çoğunu barındırır (Şekil 1.1). Buna karşılık, yaşlı erkeklerde yaygın olarak görülen kötü huylu olmayan bir durum olan benign prostat hiperplazisi (BPH) geçiş bölgesinden kaynaklanır.



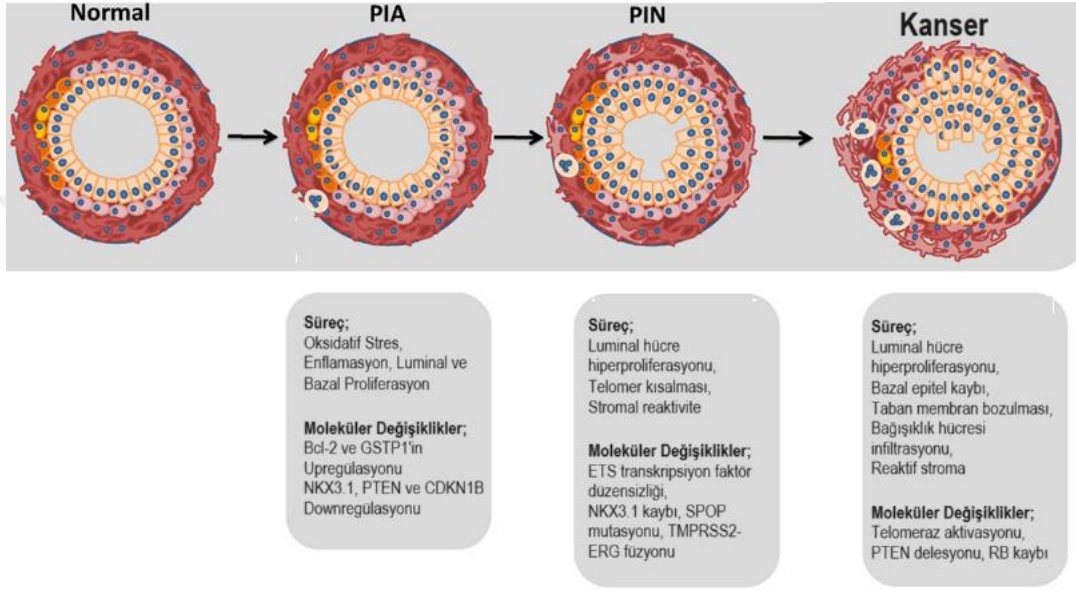
Şekil 1.1. Prostatın bölgesel anatomisi.

Kaynak: (Gravestock, vd., 2022)

Histolojik düzeyde insan prostatı üç farklılaşmış epitel hücre tipine sahip psödostratifiye bir epitel içerir: luminal, bazal ve nöroendokrin (CS, A, V, PH, & Y, 2002; Hudson, 2004; Peehl, 2005; Shappell vd., 2004; Van Leenders & Schalken, 2003). Luminal epitel hücreleri, protein salgıları üreten ve sitokeratin 8 ve 18 gibi karakteristik belirteçlerin yanı sıra yüksek AR seviyelerini ifade eden polarize kolumnar hücrelerden oluşan sürekli bir tabaka oluşturur. Bazal hücreler luminal epitelin altında bulunur ve P63 ile yüksek moleküler ağırlıklı sitokeratin 5 ve 14'ü ifade eder, ancak AR'yi düşük veya tespit edilemeyen seviyelerde ifade eder. Son olarak, nöroendokrin hücreler, kromogranin A ve sinaptofizin gibi endokrin belirteçleri ifade eden, ancak AR-negatif olan, işlevi bilinmeyen nadir hücrelerdir.

1.2.Prostat Kanseri Öncesi Maligniteler

Mevcut karsinogenez modelleri, "aktive edilmiş" bir malignite öncesi durumun varlığını güçlü bir şekilde savunmaktadır. Prostat, proliferatif inflamatuvar atrofi (PIA) ve prostatik intraepitelyal neoplazi (PIN) dahil olmak üzere neoplastik öncesi bozuklukların nispeten yaygın olduğu bir organdır. Tümörler neredeyse tamamen organın periferik bölgesinde gelişir ve varsayılan malignite öncesi varsayımların bölgesel seçiciliğini taklit eder; PIA ve PIN (De Marzo vd., 2007) (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. Prostat kanserinin malign öncesi durumları yoluyla ortaya çıkan fenotipik, mikro-çevresel ve moleküler değişiklikler.

Kaynak: (Packer & Maitland, 2016).

Başlatıcı bir inflamatuvar saldırının dokuya verdiği hasar PIA'ya yol açar; epitelden fokal rejeneratif hiperproliferatif bir yanıt. PIA'nın PIN bölgeleri ve kanserli dokularla birleştiği gösterilmiştir; bu hem gelişimin alan etkisi hem de karsinogenezde adım adım bozukluk ilerlemesi için daha fazla kanıt sağlamaktadır (De Marzo, vd., 1999; Putzi & De Marzo, 2000). Çalışmaların çoğu, bu atrofik bölgelerin genetik kusurları barındırmadığını (Tomlins vd., 2006) ancak anti-apoptotik *BCL-2* ve koruyucu *GSTP1*'in (De Marzo vd., 1999) her ikisinin de bilinen PKa tümör baskılayıcı genleri ile birlikte upregüle olduğunu göstermiştir; *PTEN*, *NKX3.1* (Bethel vd., 2006) ve *CDKN1B* (Ruska, Sauvageot, & Epstein, 1998) downregüledir. Bu, karsinogenez öncesindeki bir epigenetik aktivasyon olabileceğini düşündürmektedir (Feinberg, Ohlsson, & Henikoff, 2006; Ushijima, 2007). Bu downregüle edilmiş genler aynı zamanda adenokarsinomdaki heterozigot delesyonun da hedefleridir (De Marzo vd., 1999). Çok sayıda

biyopsinin kullanıldığı yeni bir çalışma, prostatit ile PIA arasında bir bağlantı bulmuştur ancak PIA ile düşük dereceli PIN arasında bir geçiş olmamıştır (Vral vd., 2012). Bu nedenle bu teoriyi desteklemek için ek moleküler ve histolojik kanıt gereklidir.

PIN'in prostatın majör kanser öncesi lezyonu olduğuna dair muhtemelen daha güçlü kanıtlar bulunmaktadır (Eminaga vd., 2013). Bu, artmış luminal hücre hiperplazisi ile karakterize edilir ve biyokimyasal, genetik ve fenotipik olarak PKa'ya benzerdir ancak bazal membranda herhangi bir bozulma yoktur (Shen & Abate-Shen, 2010; Tomlins vd., 2006). Epitel çift tabakasındaki hücrelerin göreceli mitotik oranları PIN'de tersine döner ve salgı hücre popülasyonu genişler, bu da PKa'nın anormal farklılaşma programının habercisidir (Bostwick & Qian, 2004). Çok sayıda çalışma, kanserli doku ile PIN dokusunun çakıştığını bildirmiş olup, yine FC teorisini desteklemektedir (Bostwick, 1989; Sakr, vd., 1993). PIN ve PKa'nın ekspresyon profilleri, hastalığın ilerlemesinde tanımlanan diğer herhangi bir aşamada gözlemlenenenden daha büyük bir uyuma sahiptir. Ayrıca Tomlins ve ark. PIN'de ETS transkripsiyon faktörünün yönlendirdiği gen ifadesine güvenildiğini vurgulamıştır. Daha yeni bir çalışma, bazı durumlarda yüksek dereceli PIN (hgPIN) lezyonlarının normal bezleri istila eden retrograd karsinomlar olduğunu tanımlamıştır. Benzersiz *TMPRSS2-ERG* sınır değerlerinin kullanılması yoluyla klonalitenin oluşturulması ve kanser lezyonlarının bitişik hgPIN ile izlenmesi yoluyla, *PTEN* kaybının alt klonalitesi daha sonra kanserdeki moleküler ilerlemeyi işaretlemek için kullanılmıştır. "HgPIN'de *PTEN* delesyonunun tanımlanması, histopatolojik olarak tanımlanan neoplazinin aslında kanserli olduğunu göstermiştir (Haffner vd., 2016). Bu, bitişik PIN'in kanseri başlatan kusurlara sahip olduğunu belirten diğer çalışmalar, *TMPRSS2-ERG* füzyonu (Perner vd., 2007), *SPOP* mutasyonu (Barbieri vd., 2012) ve *NKX3.1* kaybı (Bostwick & Qian, 2004) dahil olmak üzere, aslında patolojik olarak PIN'i taklit eden kanser hücrelerinden oluşabileceğini düşündürmektedir. HgPIN'in PKa'ya dönüşüm oranı da sorgulanmıştır. Bir çalışma, neoplazi tanısından 1 yıl sonra biyopsiyi tekrarlamış ve vakaların yalnızca ~%13'ünün kansere ilerlediğini bulmuştur. Bu yaklaşımın, PIN tanısı üzerine kanser düğümlerini gözden kaçırmış olabilecek çekirdek biyopsilerin hatalı olması ve ayrıca sonraki biyopsiler arasındaki nispeten kısa zaman dilimi dahil olmak üzere sınırlamaları vardır (Herawi, vd., 2006). Çok sayıda moleküler detayın korelasyonu çekici olsa da şu anda PIN'in PKa'ya dönüştüğüne dair mutlak bir kanıtımız olmadığı gerçeği ortadadır

1.3.Prostatik Adenokarsinom İçin Evreleme Sistemleri

Yirminci yüzyılda, PKa için birkaç farklı evreleme sistemi oluşturulmuştur. PKa için uluslararası kabul gören ilk evreleme sistemi 1956 yılında Whitmore tarafından ortaya

koyulmuştur. Evreler harflerle (A-D) sınıflandırılmıştır (Whitmore, 1984). Bu evreleme sistemi Jewett tarafından modifiye edilerek B seviyesi alt bölümlere ayrılmıştır. Jewett, palpe edilebilen nodülü olan hastalarda kansersiz sağkalımın arttığını göstermiştir (Jewett, 1956). 1950'lerin başında, solid tümörler için evreleme sistemleri, hastaların prognozunu analiz etmek ve tümörün son gelişim düzeyini belirlemek için TNM (Tümör - Lenf nodu - Metastaz) sınıflandırmasını dikkate almaya başlamıştır. TNM'nin her bir kategorisi içinde, tümör hacmine veya boyutuna (T1-T4), lenf nodu metastazlarının miktarına ve/veya boyutuna (N0-N3) ve uzak metastazlara (M0-M1) dayalı çeşitli alt seviyeler bulunmaktadır (EK-1) (Burke & Henson, 1993). Başlangıcından bu yana, TNM evreleme sisteminin tümörün klinik-patolojik evresinin daha kesin analizine olanak sağlaması için çeşitli geliştirmeler yapılmıştır (Bostwick, 1997). 1992 yılında AJCC evreleme sistemi TNM evreleme sisteminden geliştirilmiştir ("AJCC Cancer Staging Manual", 2002; Otori, Wheeler, & Scardino, 1994; Schröder vd., 1992). AJCC evreleme sistemi, öncelikle her tümörün belirli bir klinik-patolojik sınıflandırmasına dayanır ve hastaların prognostik olarak farklı gruplara daha kesin bir şekilde sınıflandırılmasına olanak tanımaktadır (Burke & Henson, 1993. Amerikan Kanser Ortak Komitesi (AJCC)'nin yapmış olduğu Prostat kanseri TNM Evrelemesi EK-1'de gösterilmiştir.

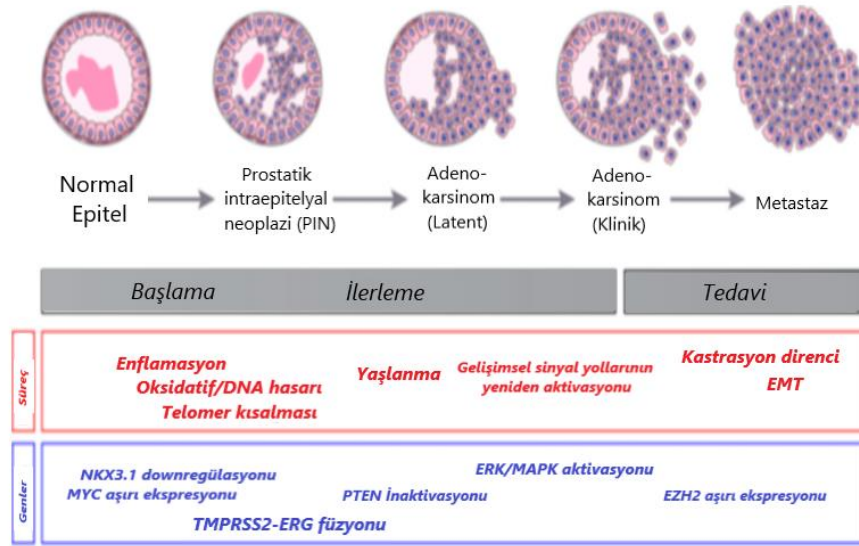
Bir PKa'nın birçok farklı metastaz alanı tanımlanmış olsa da (böbrek, meme, beyin, karaciğer), metastatik yayılım en sık pelvik lenf düğümlerine, kemiklere ve akciğerlere gerçekleşmektedir (Bubendorf vd., 2000; De, vd., 1986). Kemik metastazları esas olarak osteoblastik bir süreçtir.

1.4.Prostat Kanseri Başlangıcı ve İlerlemesi

1.4.1. Latent ve klinik kanser

PKa genellikle multifokal olarak kabul edilir, çünkü primer tümörler genellikle genetik olarak farklı olan birden fazla bağımsız histolojik kanser odağı içermektedir (Aihara, vd., 1994; Bostwick vd., 2000; Clark vd., 2008; Macintosh, vd., 1998; Mehra vd., 2007). Buna karşın, metastatik PKa'nın fenotipik heterojenliğine rağmen (Shah vd., 2004), moleküler ve sitogenetik analizler aynı hastadaki birden fazla metastazın klonal olarak ilişkili olduğunu göstermekte, bu da ilerlemiş PKa'nın monoklonal olduğunu göstermektedir (Wennuan Liu vd., 2009; Mehra vd., 2008). Bu bulgular, metastatik PKa'nın kanser ilerlemesi sırasında bireysel klonların seçici avantajından kaynaklanabileceğini düşündürmektedir; ancak bu klonal evrim süreci, farklı kötü huylu potansiyele sahip hücreleri farklı şekilde hedef alabilen androjen yoksunluğu gibi terapötik müdahalelerin bir sonucunu da olabilmektedir.

PKa'nın heterojenliği, latent ve klinik hastalık arasındaki ayrımı ve PKa ilerlemesi ile yaşlanma arasındaki güçlü korelasyonu anlamak için potansiyel olarak önemlidir (Şekil 1.3). PKa yaşlı erkeklerin bir hastalığı olmasına rağmen, 20'li ve 40'lı yaşlardaki sağlıklı erkeklerden alınan prostat örnekleri üzerinde yapılan çalışmalar, PKa'nın histolojik odaklarının bulunduğunu göstermektedir (Sakr vd., 1994; Shiraishi vd., 1994; Yatani, vd., 1989), bu da kanser başlangıcının nispeten erken bir yaşta gerçekleştiğini düşündürmektedir. PKa'nın multifokal olduğuna dair kanıtlarla birlikte, prostat bezinin, çoğu klinik olarak saptanabilir hastalığa ilerlemeyen latent PKa'ya yol açan çoklu neoplastik dönüşüm olaylarının yeri olabileceği görülmektedir. Klinik PKa'nın latent PKa'dan farklı bir patojenik programdan başladığı düşünülebilir. Alternatif olarak, çoğu latent PKa odağı klinik hastalığa yol açan kritik aktive edici olaylardan geçmeyebilir veya bu odakları subklinik bir durumda tutmaya yetecek kadar aktif baskılama altında kalabilir. PSA taramasının ortaya çıkışı, PKa tanılarında büyük bir artışa yol açmıştır; bunların çoğu muhtemelen hastalığın latent veya indolent halde iken tespit edilebilmektedir ve şu anda daha agresif hale gelecek kanserlerden ayırt edilmesi zordur; bu durum, daha etkili tanı ve yönetim için PKa'nın histolojik değerlendirmesini artıracak gelişmiş moleküler belirteçlere ve/veya diğer yaklaşımlara olan kritik ihtiyacı vurgulamaktadır (Shen & Abate-Shen, 2010) .



Şekil 1.3. İnsan PKa'sı için ilerleme yolu.

Kaynak: (Abate-Shen & Shen, 2000).

1.5.Prostat Kanseri Genetiği

PKa'nın başlamasına ve ilerlemesine yol açan üç ana kromozomal mutasyon türü vardır: genetik yatkınlık genleri, onkogenleri güçlendiren somatik mutasyonlar ve tümör baskılayıcı genlerin işlev kaybına neden olan somatik mutasyonlar.

1.5.1. Kromozomal değişiklikler

Prostat tümör hücrelerinde birçok kromozomal değişiklik bulunmaktadır. Bu değişiklikler PKa gelişimi boyunca meydana gelmektedir. Delesyonlar genellikle genlerin bölgesel işlev kaybına yol açar ve duplikasyonlar genellikle genlerin bölgesel işlev kazanımıyla sonuçlanır. Bununla birlikte, bazı çalışmaların duplikasyon gösterdiği, farklı bir hasta grubunda yapılan diğer çalışmaların ise delesyon gösterdiği birçok bölge vardır. Belirli bir bölgenin hem delesyon hem de duplikasyon bölgelerine sahip olduğu durumlar da vardır. Bu genetik heterojenlik PKa'nın ve genel olarak kanserin tedavisini çok zor hale getirmiştir. Kromozomal segmentlerin delesyonu erken evre tümörlerde bulunur ve baskındır, duplikasyonlar ise tümör geliştikçe ortaya çıkar ve proliferasyonunu ve büyümesini daha da şiddetlendirmektedir. Kromozom 8, 13, 7, 10, 16, 6 ve 17 en sık değişime uğrayan kromozomlardır (Schulz, Burchardt, & Cronauer, 2003). X ve Y kromozomları da birçok değişiklik taşımaktadır. Kromozom 8 en tutarlı değişikliğin bulunduğu yerdir; çoğu vakada 8. kromozomda bir duplikasyon tespit edilmiştir. 13q, bilinen iki tümör baskılayıcı genin (*RB* ve *BRCA2*) bulunduğu, tutarlı bir şekilde gözlenen delesyonların bir başka bölgesidir.

PKa'daki en erken genetik değişikliklerden biri, PKa'nın %50'sinden fazlasında ortaya çıkan ERG onkogeninin aşırı ekspresyonudur (Hermans vd., 2009, 2006; Panagopoulos vd., 2006; Tomlins vd., 2005). Gen füzyonları da çok yaygındır. Gen füzyonları genellikle kromozomal yeniden düzenlemeler nedeniyle meydana gelmektedir. PKa'nın çoğunda *ETS*'nin *TMPRSS2* veya *SLC45A3* ile 5' gen füzyonları bulunmaktadır (Attard vd., 2016). *TMPRSS2* normal prostat bezlerinin epitelinde eksprese edilen bir transmembran proteazdır (Kim, vd., 2006) ve semende bulunmaktadır (Adamo & Lodomery, 2015). *TMPRSS2*'nin 5' UTR'si, ETS transkripsiyon faktörleri ailesinin kodlama bölgesi ile birleşmektedir (Attard vd., 2016). Tomlins ve arkadaşları, *ERG*'nin *TMPRSS2* geninin androjen güdümlü promotörü ile gen füzyonu sonucu PKa'nın yüksek bir oranında aşırı eksprese edildiğini göstermiştir (Tomlins vd., 2008, 2005). Prostat epiteli normalde ERG'yi ifade etmez (Deramaudt, Remy, & Stiegler, 2001). ERG, PKa'da en tutarlı şekilde aşırı eksprese edilen onkogenlerden biridir (Tomlins vd., 2008; Vanaja, vd., 2003) ve aşırı ekspresyonu PIN'den karsinoma geçişte bir sürücü olaydır (Carver vd., 2009). PKa'da, ERG'nin yüksek ekspresyonu ayrıca ileri tümör evresi, yüksek

Gleason skoru, metastaz ve daha kısa sağkalım süreleri ile ilişkilidir (Hägglöf vd., 2014). Androjen kaynaklı *ERG-TMPRSS2* gen füzyonları, hastalığın nüksetmesi ve ameliyattan sonra tümörün nüksetmesi ile ilişkilidir. *ETS-TMPRSS2* füzyonlarının, *RAF-RAS-FGFR* gen füzyonlarının yalnızca *ETS*-negatif tümörlerde meydana gelmesiyle birlikte, belirli genomik aberasyonlardan karşılıklı olarak ayrıldığını belirtmek önemlidir (Packer & Maitland, 2016). Benzer şekilde, *SPINK1* aşırı ekspresyonu, *SPOP* ve *CHDI* mutasyonları gibi yalnızca *ETS*-negatif ise (Packer & Maitland, 2016). *TMPRSS2-ERG* aşırı ekspresyonu, PKa spesifikliğı ve tümör gelişiminin birçok aşamasında aşırı ekspresyonu nedeniyle güçlü bir yeni terapötik hedef olmaya devam etmektedir (Tandefelt, vd., 2014).

1.5.2. Androjen reseptörü

AR, prostat bezinin normal fizyolojik işleyişi için merkezi bir moleküler sinyal yoludur ve prostat bezi lümenindeki salgı epitel hücrelerinin sitoplazmasında bulunur (Kkontis & Liao, 1998). *AR*, X kromozomu üzerinde bulunan *AR* geni tarafından kodlanır, dolayısıyla erkeklerde tek bir alelden oluşur (Tan, vd., 2014). Androjen sinyalinin yokluğunda AR, sitoplazmada ısı şoku proteinleri (HSP-70 ve HSP 90) tarafından tutulur ve bu proteinler AR'nin stabilizasyonunu ve bozunmaya karşı korunmasını sağlar (Velcheti, vd., 2008). Testosteron prostat bezindeki luminal epitel hücrelerine difüze olur ve burada hücre içi 5- α -redüktaz enzimi tarafından dihidrotestosterona (DHT) dönüştürülür. AR, DHT'yi testosterondan 10 kat daha fazla afinite ile bağlar (Velcheti vd., 2008). DHT bağlandıktan sonra AR, HSP'lerden salınır ve kinazların işe alınması yoluyla dimerizasyon ve çapraz fosforilasyona uğrar. Fosforilasyon, AR-androjen kompleksinin nükleer translokasyona ve transkripsiyonel aktivasyona uğramasına izin vererek androjen-yanıt elemanları (ARE) içeren birkaç hedef gene bağlanır (Tan vd., 2014). Bu gen hedefleri hücre proliferasyonu, farklılaşması ve sağkalımında rol oynar (Tan vd., 2014). Normal prostat epitelinde, hücre proliferasyonu oranı ile apoptoz oranı arasında bir denge vardır. Prostatik adenokarsinomda bu denge kaybolur, apoptoz baskılanır ve proliferasyon kontrolsüz kalır. AR'nin yapısal aktivitesi hücre çoğalmasına, büyümesine ve duktal epitelin apoptoz kaybına neden olarak prostatik adenokarsinom tümörigenezine yol açar (Attard vd., 2016).

AR proteinlerinin gerçek uzunluğu, poliglutamin, poli-glisin ve poli-prolin tekrarları nedeniyle değişkendir (Velcheti vd., 2008). Poli-glutamin (CAG) tekrarlarının uzunluğu reseptör aktivitesini etkiler (Tan vd., 2014). Uzunluk 9-36 kalıntı arasında değişmekte olup, ortalama uzunluk 18-22 kalıntı arasındadır (Velcheti vd., 2008). Çeşitli insan epidemiyolojik çalışmaları, daha kısa poli-glutamin tekrarları ile PKa arasında pozitif bir korelasyon bulmuştur.

Yüksek prevalanslı Afro-Amerikan popülasyonunda AR proteinlerinin kısa poliglutamin tekrarlarına sahip olduğu bulunmuştur (Nelson, De Marzo, & Isaacs, 2003). Düşük prevalanslı Asya-Amerikan popülasyonunda ise AR proteinlerinin daha uzun poliglutamin tekrarlarına sahip olduğu bulunmuştur (Nelson vd., 2003). Bu kalıtsal genetik polimorfizm, daha yüksek kalıtsal PKa oranı için bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir (Nelson vd., 2003; Tan vd., 2014). Ayrıca, AR'de meydana gelen ve tümör oluşumunun yayılmasını artıran, tümörün agresifliğini artıran ve androjen ligandlarından tamamen bağımsızlık kazanan çok sayıda somatik değişiklik vardır (Attard vd., 2016).

1.5.3. Kastrasyona dirençli prostat kanseri

CRPC bazı hastalarda görülür. Kimyasal veya cerrahi kastrasyon tedavisi alan hastaların çoğu iyi yanıt verir. Ancak bazı hastalarda kastrasyon direnci ortaya çıkar ve gonadlar artık androjen sağlamasa bile tümör devam eder. Kastrasyon direncinin meydana geldiği mekanizmalar; artmış AR ekspresyonu, gen amplifikasyonu, nokta mutasyonları, adrenal androjenlerin DHT'ye dönüşümünün artması, androjen üretimini artırmak için CYP17A1'in de-novo sentezi ve upregülasyonu ve AR ek varyantlarının sentezi dahil olmak üzere birçok farklı somatik değişiklik türüdür (Attard vd., 2016). AR geni amplifikasyonu CRPC hastalarının yaklaşık %30'unda görülür (Velcheti vd., 2008). Bu, prostat tümör hücrelerinde AR proteinlerinin yüksek seviyelerine neden olarak düşük androjen seviyelerine karşı duyarlılıklarını ve yanıt verebilirliklerini artırmaktadır (Sandhu vd., 2013; Tan vd., 2014). Özellikle *SRD5a1*, *3βHSD* ve *AKR1C3* gibi androjenik dönüşümün hız sınırlayıcı adımlarının enzimatik katalizini düzenleyen lokuslarda artan gen ekspresyonu, CRPC patogenezinin dahil edilmiştir (Chang vd., 2013; Mitsiades vd., 2012; Stanbrough vd., 2006). Nokta mutasyonları ağırlıklı olarak ligand bağlayıcı alanda bulunmaktadır. Bu mutasyonlar düşük seviyelerde androjenlere, androjen olmayan ligandlara ve hatta tedavi olarak kullanılan sentetik anti-androjenlere karşı duyarlılığın artmasına neden olur (Attard vd., 2016; Tan vd., 2014). Glukokortikoidler, progestinler, östrojenler ve dehidroepiandrosteron mutasyona uğramış AR'yi aktive ettiği tespit edilen ligandlardan bazılarıdır (Attard vd., 2016). T877, W741C ve W741L sıklıkla gözlenen nokta mutasyonlarıdır (Velcheti vd., 2008). Ekleme varyasyonu, konstitütif olarak aktif olabilen bir ligand bağlama alanı olmadan AR üretimine yol açabilir (Sandhu vd., 2013; Tan vd., 2014). V7 AR varyantı CRPC ile güçlü bir pozitif korelasyona sahiptir (Tan vd., 2014). Bazı hastaların prostatik adenokarsinom hücrelerinin AR'den tamamen yoksun olduğu ve AR geninin promoter hipermetilasyonu ile susturulmasının katkıda bulunan bir faktör olabileceği bildirilmiştir (Attard vd., 2016; Nelson vd., 2003; Tan vd., 2014).

CRPC'li birçok hasta AR geninde genetik değişiklikler taşımadığından, büyüme faktörlerinin (GF) kastrasyon direncinin kazanıldığı ikincil mekanizmalar olduğuna inanılmaktadır (Velcheti vd., 2008). Kanıtlar, prostat epitelyal ve stromal hücrelerdeki reseptörleriyle birlikte CRPC hastalarının serumunda çok sayıda GF'nin aşırı ekspresyonunu göstermektedir. Bu, "androjenden bağımsız" KRPC mekanizması olarak kabul edilir. Normalde stroma, parakrin peptid sinyalizasyonu yoluyla GF salgılar. CRPC patolojisinde, ilgili reseptörleri ile birlikte FGF, EGF, IGF ve TGF- β 'nın aşırı ekspresyonu vardır (Velcheti vd., 2008). Bu GF'lerin androjenlerin yokluğunda androjene duyarlı genleri aktive ettiği bilinmektedir. Artmış ekspresyonları, genellikle agresif bir şekilde metastaz yapan prostat tümörlerinin daha yüksek dereceleri ile ilişkilidir. Ayrıca, Bonci ve arkadaşları MiR-16/MiR-16 kümesinin kaybının ve MiR-21'in yukarı regülasyonunun PKa metastazının gelişiminde kritik olaylar olduğu sonucuna varmıştır (Bonci vd., 2015). CRPC hastalarının serumlarında yapılan çalışmalarda da sitokin yükselmesi gözlenmiştir. Yüksek IL-6 ve IL-6-R seviyeleri PKa'nın daha agresif formları ile ilişkilendirilmiştir (Packer & Maitland, 2016). IL-6, androjen ligandlarının yokluğunda AR aracılı transkripsiyonu aktive eder (Packer & Maitland, 2016). STAT-3 seviyeleri de CRPC hastalarının serumunda yükselmekte ve AR'nin transkripsiyonel aktivasyonuna yol açmaktadır (Packer & Maitland, 2016). Kastrasyon direnci ve androjen bağımsızlığının elde edildiği, aşırı duyarlılıktan tam bağımsızlığa kadar değişen çeşitli mekanizmalar vardır. Bu durum, CRPC'ye terapötik çözümler bulmanın zorluğuna ve kötü prognozu katkıda bulunmaktadır.

1.5.4. Kalıtım

PKa'nın diğer kanser türlerine göre daha güçlü bir kalıtsal bileşen taşıdığına inanılmaktadır. Monozigotik ve dizigotik ikizlerde yapılan çalışmalar bu fikri tutarlı bir şekilde desteklemiştir (Nelson vd., 2003). Kalıtsal kanserler sporadik kanserlerden erken başlangıç, ailesel kümelenme, otozomal dominant kalıtım ve multifokalite ile ayrılır (Nelson vd., 2003; Schulz vd., 2003). Genellikle, tümör baskılayıcı genlerde ve proto-onkogenlerde kalıtsal mutasyonlar vardır. Kalıtsal geçiş riski, genlerdeki polimorfizmler tarafından da verilmektedir. Birinci dereceden akrabalarında PKa olan erkeklerde risk 2 kat, 60 yaşı altında PKa teşhisi konmuş birinci dereceden akrabaları olan erkeklerde ise 4 kat daha fazladır (Carter, vd., 1992; Edwards & Eeles, 2004; Nelson vd., 2003; Schulz vd., 2003). PKa olan daha fazla akrabaya sahip olmak, riski katlayarak önemli ölçüde artırır (Nelson vd., 2003). Bir erkek kardeşte PKa varsa, monozigotik ikizlerde dizigotik ikizlere göre %50 daha fazla risk vardır (Nelson vd., 2003). Bu veriler, yüksek riskli etnik gruplarla birlikte PKa için derin bir kalıtsal bileşen için

güçlü bir destek sağlamaktadır. 1q24-25 (*HPCI*), 1q42-43 (*PCAP*), Xq27-8 (*HPCX*), 1p36 (*CAPB*), 20q13 (*HPC20*), 17p11 (*ELAC2*) ve 16q23 dahil olmak üzere otozomal dominant kalıtsal PKa genlerini içeren birkaç genomik bölge vardır (Bratt, 2002; Nwosu, vd., 2001; Schulz vd., 2003; Simard vd., 2003).

En yaygın olarak çalışılan kalıtsal gen, kalıtsal prostat kanseri-1 (*HPCI*) gen lokusunda bulunan *RNASEL*'dir (Nelson vd., 2003). *RNASEL*, latent 2'-5' oligoadenilat sentetaz bağımlı bir ribonükleaz olan Ribonükleaz L'yi kodlamaktadır. Bu enzim anti-viral, pro-apoptotik INF ile indüklenen bir endoribonükleazdır. Aktivasyon üzerine hem hücrel RNA'yı hem de viral RNA'yı parçalar. Yaygın mutasyonlar translokasyonlar ve yanlış anlamlı nokta mutasyonlarıdır. Kodon 157'deki dört bazlık bir delesyon, kodon 164'te erken bir kesilmeye yol açar (Nelson vd., 2003; Schulz vd., 2003). En yaygın nokta mutasyonu Glu265X'tir (Schulz vd., 2003). Bu, tamamen devre dışı bırakılmış bir RNaz L enzime veya çok daha düşük aktiviteye sahip bir enzime yol açmaktadır. Her ikisi de patojenlere karşı INF koruma aktivitesini önemli ölçüde etkileyecektir. Çalışmalarda *RNASEL* geninin bazı PKa hastalarında, özellikle de Fin ve Aşkenaz Yahudi kökenli olanlarda mutasyona uğradığı ve kusurlu olduğu bulunmuştur (Nelson vd., 2003). Bu durum, PKa'da viral bir patojenin rol oynama olasılığına işaret edebilir.

8p22'de bulunan makrofaj çöpçü reseptörü 1 (*MSR1*) de kalıtsal bir duyarlılık geni olarak kabul edilmektedir (Hope vd., 2005). Esas olarak makrofaj yüzeylerinde bulunan A sınıfı makrofaj çöpçü reseptörünün alt birimlerini kodlamaktadır. MSR-1, hem oksitlenmiş HDL hem de oksitlenmiş LDL, bakteriyel lipopolisakkarit ve lipoteikoik asit dahil olmak üzere kandaki çok çeşitli ligandları bağlamaktadır (Yu, vd., 2015). Bu çöpçü reseptörler, negatif yüklü lipidlerin oksitlenmiş formlarını bağlar ve patojen maddeleri ve atık maddeleri uzaklaştırma işlevi görmektedir. Çalışmalar, bu reseptörlerin hastaların küçük bir yüzdesinde mutasyona uğradığını ve kusurlu olduğunu ve PKa'da bakteriyel patojen tutulumu olasılığına işaret edebileceğini ortaya koymuştur (Nelson vd., 2003). Metilen tetrahidrofolat redüktaz (*MTHFR*) nükleotid biyosentezinde anahtar bir enzimi kodlar. Metil gruplarının timidin veya adenoilmetiyonin sentezine yönlendirilmesini katalize eder. Ala677Val, C677T ve A1298C polimorfizmlerinin duyarlılık özelliklerinin altında yattığına inanılmaktadır (Li & Xu, 2012).

Steroid-5- α -redüktaz tip II (*SRD5a2*), prostatta 5- α redüktaz enziminin baskın izoformunu kodlar ve prostat hücreleri içinde testosteronu DHT'ye dönüştürür. Ala49Thr, *SRD5a2*'nin içsel aktivitesini artıran kalıtsal bir polimorfik aleldir ve PKa için daha yüksek risk ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Schulz vd., 2003). Daha aktif alellerin hastalar için daha agresif ve daha kötü prognoz ile ilişkili olduğu da gösterilmiştir. *CYP17*, androjenlerin biyosentezinde

anahtar bir enzim olan *cyt P-450c17 α* 'yı kodlar (Attard vd., 2016). Kalıtsal genetik mutasyonlar, prostat kanseri hücrelerinde AR için androjen ligandlarının de-novo sentezinin artmasına neden olur. *BRCA1* ve *BRCA2* tümör baskılayıcı genlerinin mutasyonları da ailesel PKa vakalarında bulunmuştur. *BRCA1*, Deoksiribonükleik asit (DNA) hasarı yanıtı ve onarımı, transkripsiyonel düzenleme ve kromatin modelleme dahil olmak üzere çeşitli hücresel kontrol sistemlerinde kilit bir oyuncudur (Castro & Eeles, 2012). *BRCA2* işlevi, özellikle *RAD51* aktivitesinin düzenlenmesinde DNA rekombinasyonu ve onarım süreçleriyle sınırlıdır (Castro & Eeles, 2012). *BRCA1* veya *BRCA2* kaybı, DNA çift iplikçik kırılmalarının onarılmasında bir eksiklikle bağlantılıdır ve hücrelerin bu lezyonları onarmak için potansiyel olarak mutajenik mekanizmalar kullanmasına yol açar. Bu mutasyonların neden belirli kanser türleriyle (örn. meme, yumurtalık ve prostat) ilişkili olduğunun ardındaki gerçek belirsizliğini korumaktadır. Genç başlangıçlı hastaların yüzde bir ila ikisi germline *BRCA2* mutasyonuna sahiptir. *BRCA2* mutasyonları PKa'ya yakalanma riskini 5-7 kat artırırken, *BRCA1* mutasyonları 3-8 kat artırmaktadır (Attard vd., 2016).

1.5.5. Somatik genetik mutasyonlar

Tanı anında hastalarda birçok somatik mutasyon bulunur. Zaman içinde PKa hücreleri somatik nokta mutasyonları, gen delesyonları ve insersiyonları, amplifikasyonlar, kromozomal yeniden düzenlemeler ve DNA metilasyon durumlarında değişiklikler geçirir. Bu değişiklikler genellikle birkaç on yıl içinde yavaşça birikir. Bu ilerleyici değişiklikler ve mutasyonlar genellikle birlikte çalışarak kalıtsal germ hattı mutasyonlarını şiddetlendirir. PKa'nın oldukça kabul gören bir modeli, kalıtsal mutasyonların tümör oluşumunu başlatırken somatik mutasyonların bunu daha da ilerlettiğidir. Somatik kromozomal değişikliklerde heterojenite vardır ve farklı hastalarda aynı kromozomal bölgelerde farklı tipte lezyonlar gözlenir.

π sınıfı glutatyon S-transferaz (*GSTP1*) toksik hidrofobik ve elektrofilik bileşiklerin konjugasyonunu katalize eden bir antioksidandır. Prostat bezini mutajenlere, karsinojenlere ve oksidatif strese, genomik hasara ve inflamasyona neden olabilen reaktif oksijen türleri ve reaktif nitrojen türleri gibi oksidanlara karşı korur. Sekretuar asiner hücrelerde değil, bazal prostat hücrelerinde eksprese edilir. Çalışmalar *GSTP1* geninin promotör bölgesinde ve 5'-CpG düzenleyici dizisinde hipermetilasyona uğradığını göstermiştir (Martignano vd., 2016; Nelson vd., 2003). Bu, prostatik adenokarsinom doku örneklerinde bulunan en yaygın somatik mutasyonlardan biridir ve tümörigenezdeki en erken olaylardan biridir. Bu, glutatyon S-transferaz antioksidan enziminin transkripsiyonunun ve ekspresyonunun azalmasına yol açar. Bu, PKa'lı hastalarda genellikle hipermetilasyon nedeniyle *GSTP1* ifadesinin bulunmadığını

tespit eden önceki çalışmalardan elde edilen kanıtları desteklemektedir. Bu tip bir mutasyon, hastaları genoma zarar veren strese ve PKa gelişimi sırasında daha fazla genomik istikrarsızlığa maruz bırakır (Martignano vd., 2016; Nelson vd., 2003).

PTEN, bir lipid ve protein fosfataz enzimi olan fosfataz ve tensin homologunu kodlayan bir tümör baskılayıcı gendir. Hücre döngüsünü, hücre proliferasyonunu ve apoptozu düzenler. Ayrıca hücrelerdeki PI3K/ AKT/mTOR yolunu inhibe ederek düzenler. PI3K/AKT'nin kendisi hücre proliferasyonu ve apoptozda rol oynar. PTEN somatik değişiklikler için ortak bir hedeftir. Çalışmalar, *PTEN*'in bazı PKa hastalarında düşük aktivite ile kusurlu olduğunu ve bir tümör içindeki bazı bölgelerin PTEN'den tamamen yoksun olduğunu bulmuştur (Packer & Maitland, 2016). Somatik mutasyonlarının zaman içinde ilerlemesi üzerine, PI3K/AKT aşırı derecede aktive olur ve hücrenin kontrolsüz bir şekilde çoğalmasına ve apoptozdan kaçmasına neden olur. *PTEN* kaybı geç bir olaydır ve tümör oluşumunun başlangıcında değil yayılmasında rol oynadığı varsayılmaktadır (Nelson vd., 2003). *PTEN* kaybı ve 10q kaybı metastatik tümörlerde lokalize olanlara göre daha fazla bulunduğundan metastazı ve androjen bağımsızlığını etkiler (Attard vd., 2016; Nelson vd., 2003).

Sikline bağımlı kinaz inhibitörü 1B (*CDKN1B*), sikline bağımlı kinaz 4'ün (*CDK4*) bir inhibitörü olan p27'yi kodlayan bir tümör baskılayıcı gendir. P27, G1'deki hücreleri durduran bir hücre döngüsü inhibitörüdür. PTEN ile birlikte hücre döngüsünün ilerlemesini ve çoğalmasını düzenler. p27 normalde PI3K/AKT tarafından baskılanır. PTEN, p27'yi artırmak, hücre döngüsünü inhibe etmek, G1'deki hücreyi durdurmak ve proliferasyonu önlemek için PI3K/AKT'yi inhibe edecektir. PTEN kaybı, azalan p27 seviyelerinin etkisini artıracaktır (Ronen vd., 2017). Çalışmalar, hastalarda CDKN1B ekspresyonunun kaybına yol açan 12p12-13'ün somatik kaybını göstermiştir (Nelson vd., 2003). Bu, ileri evrelerdeki hastaların daha büyük bir yüzdesinde bulunur ve en büyük yüzde uzak metastatik tümörlerde bulunur (Nelson vd., 2003). CDKN1B kaybı çok kötü prognozla ilişkilidir.

1.5.6. Tümör baskılayıcı genler

Çoğu kanser gibi, prostat tümörlerinin başlangıcı da tümör baskılayıcı genlerdeki fonksiyon kaybı mutasyonu ile ilişkilidir. Tümörün gelişimi boyunca meydana gelen somatik mutasyonların yanı sıra, tümör baskılayıcı genlerde kalıtsal mutasyonlar da vardır. Tipik olarak, tümör baskılayıcı genlerin bulunduğu bölgelerde kromozomal segment delesyonları bulunur. Tümör baskılayıcı genlerin deaktivasyonu, genin bulunduğu kromozomal segmentin silinmesi, genin doğrudan silinmesi, promoter hipermetilasyonuna bağlı ekspresyon kaybı ve nokta mutasyonları nedeniyle meydana gelir.

Son zamanlarda Nickerson ve ark. on-onbir translokasyon 2'nin (TET2), PKa'da birden fazla mekanizma tarafından değiştirilen bir tümör baskılayıcı olarak görev yaptığını gösterdi: germline kodlamayan riskli SNP'ler ve nadir yanlış anlam ikameleri (Nickerson vd., 2013); somatik dizi değişiklikleri ve CNV (öncelikle kayıp); ve tümörlerde mRNA ifadesinin azalması (Nickerson vd., 2017). PTEN, GSTP1, CDKN1B ve NKX3.1'in tümü, tümörlerin ilerlemesine ve kötüleşmesine yol açan somatik değişiklikler yoluyla devre dışı bırakılır (Attard vd., 2016; Packer & Maitland, 2016). Retinoblastoma (RB), diğer bazı kanserlerde de mutasyona uğrayan veya tamamen silinen önemli bir tümör baskılayıcı geni kodlar. G0/G1 fazında hücre döngüsünü düzenleyen bir nükleer transkripsiyon faktörünü kodlar (Classon & Harlow, 2002). Etkinliği fosforilasyon durumuna bağlıdır. Mitozun sonunda retinoblastoma proteini (pRB) defosforile olur ve aktif hale gelir, G1'den S'ye geçişi inhibe eder. CDK'lar G1'in sonlarında pRB'yi fosforile edecek, böylece onu inhibe edecek ve hücre döngüsünün S fazına ilerlemesine izin verecektir. Mutasyonu kontrolsüz hücre döngüsü ilerlemesine izin verir. RB/p16 yolunun kaybı, bunun erken mi yoksa geç evre olayı mı olduğuna dair karışık veriler göstermiştir (Attard vd., 2016). MAX etkileşimli protein (MXI-1), sarmal-ilmek-sarmal Leu fermuar ailesinin bir tümör baskılayıcı genidir. *C-MYC* ifadesini baskılayarak bir transkripsiyon faktörü olarak işlev görür (Mohler vd., 2002). MAX'ın *c-MYC*'ye bağlanması *c-MYC* yolu için gerekli olduğundan, MAX'ı bağlamak için *c-MYC* ile rekabet eder. 10q bölgesinin silinmesi yoluyla MXI-1'in fonksiyon kaybı vardır, bu da proliferasyonun ve tümör büyümesinin artmasına neden olur (Davies vd., 2002).

P53, “genomun koruyucusu” nükleer transkripsiyon faktörünü kodlayan bir tümör baskılayıcı gendir. Özellikle G1/S ve G2/M kontrol noktalarında hücre döngüsü düzenleyicisi olarak görev yapar. Böylece herhangi bir DNA hasarı varsa hücre döngüsünün ilerlemesini önler. Hastalarda görülen mutasyonların yüzdesi hakkında karışık veriler bulunmaktadır ancak ileri evrelerde daha yaygın, lokalize olanlarda ise daha azdır. Çalışmalar, metastatik tümörlerin çoğunda *p53* delesyonları olduğundan mutasyonların ileri tümörlere, metastaza ve androjen bağımsızlığına yol açtığını göstermiştir (Chappell vd., 2012). Bu fonksiyon kaybı, 17p bölgesinde yer alan diğer genlerle uyum içinde meydana gelir. Dönüştürücü büyüme faktörü $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) normalde hücre proliferasyonunu inhibe etme ve prostatik epitelyal hücrelerde apoptozu indüklemeye işlevi görür. Ancak prostat adenokarsinom hücreleri, TGF- β 'nin aşırı ekspresyonuyla birleşen TGF- $\beta 1$ reseptörlerini eksprese etmez (Fournier vd., 2015; Lee vd., 2012). Bu nedenle, daha ilerlemiş tümörler ve daha büyük metastatik potansiyel ile ilişkili olan prostat tümör hücreleri üzerinde TGF- $\beta 1$ etkisinde bir kayıp vardır (Fournier vd., 2015).

Kruppel benzeri faktör 6 (KLF6), tümör baskılayıcı bir gen olarak işlev gören ve prostat kanseri hücrelerinde sıklıkla aktif olmayan bir çinko parmak transkripsiyon faktörüdür (Liu vd., 2012).

1.5.7. Mismatch onarım genleri

Agresif PKa formları sıklıkla mismatch onarımı (MMR) mekanizmasındaki kusurların bir sonucu olarak polimorfik nükleotid dizisi mutasyonları ile karakterize edilir. Tipik olarak MMR yolu, yüksek düzeyde korunmuş proteinlerin koordineli eylemi yoluyla DNA replikasyonunu takiben mikrosatellit kararsızlığının zararlı etkilerini ortadan kaldırır. Önceki çalışmalar, MMR gen mutasyonlarının kanser patolojisini simgelediğini gösterse de (Chang, vd., 2017; Wang, vd., 2005), *MLH1*, *PMS1*, *PMS2*, *MSH2*, *MSH3* ve *MSH6* genlerinin tümü, prostat tümörünün çoğalması ve yayılmasında spesifik olarak rol oynamıştır (Grindedal vd., 2009; Karayi & Markham, 2004). Toplu olarak, bu gen lokuslarındaki fonksiyon kaybı, PKa epitelindeki zayıflamış DNA onarım aktivitesine katkıda bulunabilir (Karayi & Markham, 2004; Reyes, vd., 2015). Yani *MSH2* ve *MSH6*, dimerleşme eğilimleri nedeniyle ilgi çekici araştırma hedefleridir (Chen vd., 2001). 2014 yılında Prichard ve ark. *MSH2-MSH6* heterodimerindeki ağırlıklı olarak bialelik fonksiyon kaybı mutasyonunun hipermutasyona uğramış, metastatik PKa'yı karakterize ettiğini belirlemek için ekzom dizileme tekniklerinden yararlanmıştır (Pritchard vd., 2014). Ek olarak, CWR22 androjenle düzenlenen tümörijenik hücre hattının bağımsız dizilimi, *MSH2* ve *MSH6* genlerinde homozigot bir silinme olduğunu göstermiştir, bu da PKa'da AR sinyali ile MMR yolu arasında bir etkileşim olduğunu düşündürmektedir (Barretina vd., 2012). *MSH2-MSH6* kompleksinin MMR'deki kesin rolü henüz tam olarak ortaya çıkarılmamış olsa da son çalışmalar bunun DNA Polimeraz α ile etkileşime girdiğini ve aşağı yönlü MMR süreçlerini yönlendirdiğini öne sürdü (Itkonen vd., 2016).

1.5.8. Onkogenler

Proto-onkogenlerdeki mutasyonlar, bunların yapısal olarak aktif onkogen formlarında değişikliklere yol açar. Onkogen mutasyonları, fonksiyon kazanımına yol açan kromozomal bölgelerin çoğalmasından kaynaklanır. Bu mutasyonlar genellikle geç ortaya çıkar ve zamanla birikerek tümörün daha da yayılmasına neden olur. *c-MYC*, hücre büyümesini ve çoğalmasını, hücre döngüsü ilerlemesini, transkripsiyonu, farklılaşmayı ve apoptozu düzenleyen bir transkripsiyon faktörünü kodlar. Proliferasyonu teşvik etmek için siklinleri ve ribozomal proteinleri upregüle eder ve proapoptotik proteinlerin ekspresyonunu downregüle eder. 8q bölgesinin, özellikle ilerlemiş kanserlerde sıklıkla fonksiyon kazanımı kromozomal

anormalliklerine sahip olduğu bulunmuştur. *c-MYC* gen amplifikasyonu daha yüksek dereceli tümörlere, metastaza ve androjene dirençli tümörlere yol açar (Fan vd., 2016).

MAP kinaz fosfataz-1 (MKP-1), mitojenle aktifleşen protein kinaz ailesine özgü bir fosfatazdır. MAPK ailesi, ERK aracılığıyla proliferatif sinyallere ve JNK aracılığıyla proapoptotik sinyallere sahiptir (Ma & Wells, 2014). MKP-1'in ikili özgüllüğü vardır; JNK ve ERK üzerindeki hem fosforile edilmiş tirozin hem de fosforile edilmiş treonin kalıntılarını fosforile eder. Bu kapasitesinde MKP-1, MAPK yolunu inhibe ederek hücreleri ölümden koruyan bir anti-apoptotik proteindir. Aşırı eksprese edildiğinde kontrolsüz hücre proliferasyonunu tetikler (Ma & Wells, 2014). B hücresi lösemi/lenfoma-2 (*BCL-2*), pro-apoptotik bir proteini kodlar. Aşırı ekspresyonu apoptoza ve PKa'nın ilerlemiş formlarına karşı direnç sağlar (Catz & Johnson, 2003; Packer & Maitland, 2016). Telomerazlar kromozom uç kapaklarını uzatan enzimlerdir. Telomerazın aşırı ekspresyonu ve amplifikasyonu, PKa hücrelerinin çoğunda bulunur ve yüksek dereceli kanserlerde maksimum düzeyde eksprese edilir (Packer & Maitland, 2016). β -katenin *CTNNB1* tarafından kodlanır ve transkripsiyon ve hücre yapışmasının düzenleyicisidir. Bazı prostat tümör hücrelerinde, AR içeren hedef genlerin transkripsiyonunu artıran β -katenin aktive edici mutasyonlar gözlemlenmiştir (Chesire, vd., 2002).

RAS, Ras GTPazları kodlayan gendir. Ras'ın amplifikasyonu, özellikle prostatta olmak üzere birçok malign tümör formunda rol oynar. Ayrıca, *RASSF1A*'nın promotör hipermetilasyonu yoluyla çoğu PKa dokusunda aktif olmadığı bulunmuştur (Li, Carroll, & Dahiya, 2005). *DAB2IP* geni, PKa patogenezinde alternatif bir mekanizmada yer almaktadır (Wang, vd., 2016). PKa ile ilişkilendirilmiştir (Duggan vd., 2007). *HER2*, EGFR ailesinden bir reseptör tirozin kinaz olan c-erbB-2'yi kodlar. Aşırı ekspresyonu birçok kanserde bulunur ve geninin amplifikasyonu prostat tümörleriyle ilişkilendirilmiştir (Siampanopoulou, vd., 2013). Ancak karışık bulgular var. Çoğu çalışma metastatik tümörler ve kastrasyon direncindeki rolünü desteklemektedir. *FASN*, yağ asitlerinin sentezinde rol oynayan anahtar bir enzim olan yağ asidi sentazını kodlar. Aşırı ekspresyonu çoğu PKa türünde görülür (Hamada vd., 2014). Birçok kanser, uzun zincirli yağ asitlerinin artan senteziyle ilişkilidir. *FASN*'nin aşırı ekspresyonunun ve yağ asidi sentaz enziminin amplifikasyonunun, hücrelerin apoptozdan kaçmasına izin verdiğine ve hücre proliferasyonunu arttırdığına inanılmaktadır (Huang vd., 2016).

1.5.9. Metastaz

İlerlemiş PKa lokal dokuları istila eder ve bölgesel lenf düğümlerine yayılır. Lokal istila bölgeleri seminal veziküller, mesane ve rektumdur. Metastatik bölgeler kemikler, lenf düğümleri, akciğerler, karaciğer ve beyindir. Metastaz baskılayıcı genler olarak işlev gördüğü görülen çeşitli genler karakterize edilmiştir. Tümör baskılayıcı genler ile metastaz baskılayıcı genler arasındaki ayrımı belirtmek önemlidir: ikincisi spesifik olarak metastatik tümör proliferasyonunu dengeler ancak birincil tümörü etkilemez. *KAI-1/CD82*, bir membran glikoproteinini kodlar ve downregülasyonu, ilerlemiş metastatik prostat tümörleri ile tutarlı bir şekilde ilişkilendirilmiştir (Park vd., 2012). *CDH-1*, kalsiyuma bağımlı, membrana bağlı bir glikoprotein olan epitelyal kaderini (E-cadherin) kodlar. İlerlemiş tümörlerin çoğunda mutasyona uğrayan ve kaybolan bir hücre yapışma molekülüdür (Packer & Maitland, 2016). *CDH-1*, PKa hastalarında sürekli olarak silinen bir bölge olan 16q'da bulunur. 16q bölgesi metastatik baskılama ile ilişkilendirilmiştir (Mashimo vd., 1998).

Metastatik PKa olan erkekler üzerinde yapılan bir çalışma, lokalize PKa olan hastalarla karşılaştırıldığında, buna sahip olmanın, bir DNA onarım geninde germ hattı mutasyonunu kalıtsal olarak alma olasılığının daha yüksek olduğu anlamına geldiğini göstermiştir (Pritchard vd., 2016). Bu, metastaz gelişen PKa hastalarında, DNA onarım genlerindeki germline kalıtsal mutasyonlarla bir bağlantı olduğunu göstermektedir. Çalışmada kullanılan genler daha önce otozomal dominant kansere yatkınlıkla ilişkilendirilmiştir. Bulunan ana mutasyonlar, zararlı delesyonlar ve zararlı yanlış anlamlı mutasyonlardır. *BRCA2*, *ATM*, *CHEK2* ve *BRCA1*, metastatik PKa hastalarında en yaygın kalıtsal germline mutasyonlarıdır (Pritchard vd., 2016).

1.6. MiRNA'lar ve prostat kanseri

MiRNA'lar, hedef mRNA'ların stabilitesini veya çeviri verimliliğini etkileyerek gen ifadesini düzenleyen endojen küçük kodlamayan, tek sarmallı RNA'lardır. Çoğunlukla mRNA'ların 3' UTR ve kodlama bölgelerinde veya 5' UTR'de bulunan bağlanma bölgelerini hedef alırlar (Bartel, 2004; Rigoutsos, 2009) ve mRNA'nın bozulmasına veya translasyonel baskılanmasına neden olurlar. MiRNA'ların hem hücrel temel gelişim hem de tümör oluşumundaki önemini transkripsiyon veya posttranskripsiyon regülasyonu düzeyinde açıklamak için önemli çabalar sarf edilmiştir (Baranwal & Alahari, 2010; Iorio & Croce, 2009; Kloosterman & Plasterk, 2006). Son çalışmalar, miRNA'ların stresle yaşlanmada rol oynadığını da ortaya koymuştur (Liang, Bates, & Wang, 2009). MiRNA'ların düzenleyici etkisi, miRNA'lar ve hedef mRNA'ları arasındaki etkileşim aracılığıyla gerçekleşir ve gen ifadesinin yaklaşık %30'u muhtemelen bu etkileşim yoluyla miRNA'lar tarafından düzenlenir (Bartel, 2004; Shyu,

Wilkinson, & Van Hoof, 2008; Xie vd., 2005). Bununla birlikte, ilgili süreçlerde yer alan düzenleyici bileşenler hakkındaki ayrıntılar büyük ölçüde belirsizliğini korumaktadır. Bireysel miRNA, mRNA'lara kısmi baz eşleşmesi yoluyla 200 hedefi düzenleyebilir (Schaefer, Jung, Kristiansen, vd., 2010), oysa belirli bir hedef muhtemelen hedeflerin 3' UTR'sindeki farklı sayı ve türdeki bağlanma bölgeleri yoluyla birkaç miRNA tarafından modüle edilir (Brennecke, vd., 2005; Filipowicz, Bhattacharyya, & Sonenberg, 2008), bu da bir miRNA'nın hedeflerinin ifadelerini ve işlevlerini etkileyerek çok sayıda biyolojik veya patolojik sinyal yolunu kontrol edebileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle, miRNA'ların neden olduğu düzenleyici yollar hücre içinde çok karmaşık süreçlerdir (Santarpia, Nicoloso, & Calin, 2010; R. Sun, vd., 2009). MiRNA'ların ekspresyonunu ve miRNA'lar tarafından düzenlenen yeni hedefleri araştırmak için çabalar gereklidir.

MiRNA'ların hedef genleri ile etkileşimi tarafından kontrol edilen karsinom hücrelerinin büyümesi, farklılaşması ve apoptozunun düzenlenmesi son zamanlarda araştırılmıştır (Baranwal & Alahari, 2010; Iorio & Croce, 2009; Kloosterman & Plasterk, 2006). Yüzlerce değişmiş miRNA ifadesinin çoğu insan kanserinin oluşumu ve ilerlemesi ile yakından ilişkili olduğu ve miRNA genlerinin yaklaşık %50'sinin kanserle ilişkili genomik bölgelerde yer aldığı bulunmuştur. Bu süreçlerde miRNA'lar onkogen veya tümör baskılayıcı olarak işlev görebilir (Vrba vd., 2010) ve kanserlerde birincisi genellikle upregüle edilirken, ikincisi downregüle edilir. En sık teşhis edilen malign tümörlerden biri olan ve şu ana kadar Amerika'da erkeklerin ikinci önemli kanser katili olan insan PKa'sında miRNA'ların katılımı (Jemal vd., 2009), son yıllarda miRNA'lar ve hedefleri ile prostat karsinogenezi arasında bir korelasyon olduğunu açıkça göstermiştir (Lu vd., 2008; Musiyenko, Bitko, & Barik, 2008; Shi vd., 2007). Çeşitli miRNA'ların ve hedeflerinin PKa'da anormal şekilde eksprese olduğu ve bu hastalığın gelişiminde, istilasında ve metastazında karşılık gelen yanıtı yol açtığı keşfedilmiştir. Seçilen bazı miRNA'ların değişen ekspresyonları, PKa'nın tanı, prognoz ve sınıflandırma amaçları için biyobelirteçler olarak yararlıdır (Mattie vd., 2006; Porkka vd., 2007; Prueitt vd., 2008). Bu nedenle, karakteristik miRNA anormalliklerinin anlaşılması ve normal miRNA-mRNA düzenleme yollarının geri yüklenmesi, PKa'da yeni terapötik stratejilerin geliştirilmesine katkıda bulunabilir.

1.6.1. PKa'da miRNA'ların aberran ekspresyonunun potansiyel mekanizmaları

MiRNA'ların anormal ifadelerinde sıklıkla olduğu gibi, ortak mekanizmalar arasında miRNA'ların kopya sayısının değiştirilmesi (Zhang vd., 2006), miRNA'ların epigenetik modifikasyonu, özellikle de değişen DNA metilasyonu miRNA'ların susturulmasını tetikler.

Tersine, miRNA'lar epigenetik mekanizma ile hedef gen ifadelerini de düzenler (Rouhi, vd., 2008). Buna ek olarak, DGCR8 bağlanması ve Drosha bölünmesi için kritik olan kök veya eşleşmemiş yan bölgelerde mutasyonlar meydana geldiğinde, öncül miRNA'ların mutasyonları bulunur ve miRNA'ların işlenmesini ve bolluğunu önemli ölçüde etkiler. Bununla birlikte, döngü bölgesinde meydana gelen mutasyonların miRNA'ların işlenmesi üzerinde hiçbir etkisi yoktur (deVere White, vd., 2009). MiRNA işlenmesindeki başarısızlık ve miRNA promotörlerindeki düzensizlik gibi diğer faktörler de miRNA'ların ifadesini etkiler. Bu mekanizmalar, PKa'da ifade düzeyleri düzensiz olan miRNA'ların açıklanmasına da katkıda bulunur. Örneğin, gerekli bir işleme enzimi olan Dicer, PKa'da upregüle olur ve miRNA'ların deregülasyonuna ve klinik evre ve Gleason skoru ile korelasyona yol açar (Chiosea vd., 2006). Şimdiye kadar, PKa'da deregüle olan 50'den fazla miRNA bulunmaktadır (Sun vd., 2009; Volinia vd., 2006). Bazı onkogenik miRNA'lar (miR-221/-222, miR-21 ve miR-125b) ve bazı tümör baskılayıcı miRNA'lar (miR-101, miR-126*, miR-146a, miR-330, miR-34 kümesi ve miR-200 ailesi) dahil olmak üzere anormal şekilde ifade edilen birkaç miRNA'yı gözden geçirdik. MiRNA-200 ailesi sırasıyla kromozom 1 ve 12 üzerinde bulunan iki kümeden oluşur; ilk küme miR-200b, miR-200a ve miR-429'u kodlarken, ikincisi miR-200c ve miR-141'i kodlar. Vrba ve arkadaşları (Vrba vd., 2010) miRNA yakınındaki bir CpG adasının hipermetilasyona uğradığını ve bunun da ilgili miRNA'nın ekspresyonu ile negatif korelasyona sahip olduğunu bulmuştur. PC3 hücrelerinin mir-200c ve mir-141 yakınındaki anormal metillenmiş CpG adası nedeniyle miR 200c ve miR-141 ekspresyonunu kaybettiğine, LnCaP ve DU145 hücrelerinin ise değişmemiş CpG adasından kaynaklanan normal düzeyde miR-200c ve miR-141 eksprese ettiğine dair kanıt sağlamışlardır (Vrba vd., 2010). Neredeyse eş zamanlı olarak, Dicer ekspresyonunun agresif PKa'da upregüle olduğu bulunmuştur (Chiosea vd., 2006), bu da prostat tümörleriyle ilgili miRNA'ların çoğunun yukarı regülasyonunu indükleyen mekanizmalardan biri olabilir. Ek olarak, androjen/AR sinyalizasyonunun PKa'da miRNA'ların düzenlenmesine katkıda bulunduğu bildirilmiştir. Ribas ve arkadaşları (Ribas vd., 2009) tarafından yapılan çalışmalar, androjen kaynaklı AR'nin miR-21 promotörüne bağlandığını ve daha sonra PKa'da androjen bağımlı (AD) hücre büyümesi ve kastrasyon direnci ile ilişkili olduğu düşünülen miR-21'in aşırı ekspresyonu ile sonuçlandığını göstermiştir.

Ayrıca, bazı anormal şekilde ifade edilen miRNA'lar PKa'ya özgüdür ve ifade seviyeleri benign ve malign PKa arasında önemli ölçüde farklıdır. Rokhlin ve arkadaşları (Rokhlin vd., 2008) p53'ün sadece AR pozitif PKa LNCaP hücrelerinde bulunan miR-34'ün aşırı ekspresyonunu indüklediğini, miR-21'in ise androjenden bağımsız (AI) PC-3 ve DU-145

hücrelerinde yüksek seviyede, LNCaP'de ise düşük seviyede olduğunu bulmuştur (Li, vd., 2009). MiRNA'ların PKa'da düzenledikleri hedeflere bağlı olarak onkogen veya tümör baskılayıcı olarak görev yaptıkları belirlenmiştir.

Bununla birlikte, bu çalışmalar, numunelerin ve analitik yöntemlerin kullanımındaki farklılıklar nedeniyle farklı miRNA setleri üretmiştir. Diğer bir faktör ise miRNA hedeflerini analiz etmek ve tanımlamak için hesaplamalı algoritma yöntemlerinin büyük ölçüde kullanılmış olmasıdır. Bu tür hesaplamalı analiz, hedef genlerin kesin olarak tanımlanmasını sağlayamaz. Bir hedef mRNA'nın birden fazla miRNA bağlama bölgesi içermesi ve bir miRNA'nın birden fazla mRNA'yı hedefleyebilmesi alışılmadık bir durum değildir. Sun ve ark. (R. Sun vd., 2009), hedef mRNA'nın azalan bolluğu ile miRNA bağlanma bölgelerinin sayısı ve 3' UTR'nin uzunluğu arasında pozitif bir korelasyon buldu. Görünüşe göre, her miRNA'nın ve PKa'daki hedef genlerinin deneysel olarak doğrulanmasına büyük ölçüde ihtiyaç duyulmaktadır ve bu büyük bir pratik problem olacaktır (Siva vd., 2009).

1.6.2. PKa'da miRNA'ların anormal ifadesinin işlevleri

MiRNA'ların fonksiyonlarını incelemek için yaygın yaklaşımlar, biyolojideki etkilerini doğrulamak için miRNA'ların kazanılması ve kaybedilmesidir. 50'den fazla miRNA'nın anormal şekilde eksprese edilmesine ve PKa'daki hedeflerinin ekspresyonunda ve aktivitesinde değişikliğe yol açmasına rağmen, yalnızca birkaç miRNA'nın PKa'nın başlatılması, ilerlemesi ve metastazında rol oynadığı deneysel olarak belirlenmiştir. Bu diferansiyel olarak eksprese edilen miRNA'lar, onkogenler veya tümör baskılayıcılar olarak işlev görmektedir ve sırasıyla tümör baskılayıcı genleri ve onkogenleri hedeflemektedir (Schaefer, vd., 2010).

1.6.3. PKa'da onkogenik miRNA'ların işlevleri

PKa'da miRNA ekspresyon profillemesi analizi ile birçok miRNA'nın upregüle edildiği bulunmuştur. Onkomirlerin aşırı ekspresyonu, apoptozla ilişkili genleri epigenetik olarak susturur ve ardından tümör büyümesini ve metastazı indükler. MiR-221 ve miR-222'nin (PKa dahil olmak üzere çeşitli insan tümör türlerinde yukarı regülasyonu bildirilen iki yüksek derecede homolog miRNA'nın) PKa'nın gelişiminde ve metastazında rol oynadığı bulunmuştur. İlk gösterge, miR-221/-222 ekspresyonunun AI PCa hücrelerinde in vivo ve in vitro olarak AD PCa hücrelerine göre daha yüksek olduğu bulgusundan gelmektedir (Mercatelli vd., 2008; Siva vd., 2009; Sun vd., 2009); bu bulgu, LNCaP hücreleriyle karşılaştırıldığında PC-3 hücrelerinde nispeten aşırı eksprese edilmiş miR-221/-222'nin gözlemlendiğini göstermektedir. MiR-221 ve miR-222'nin PKa'ya katkıda bulunduğu mekanizmalardan biri, tümör büyümesine yol açan

hedef mRNA p27^{kip1}'e bağlanma yeteneklerinden kaynaklanmaktadır (Galardi vd., 2007; Mercatelli vd., 2008; Sun vd., 2009). Ayrıca miR-221/-222, AI PKa hücrelerinde AR aracılı sinyalleme yanıtını etkileyen mekanizma yoluyla CRPC'nin gelişmesine veya korunmasına katkıda bulunmaktadır (Sun vd., 2009). Ancak PKa'da miR-221/-222'nin ekspresyon düzeyine ilişkin çelişkili veriler de mevcuttur ve androjenin miR-221/-222 üretimini baskıladığı rapor edilmiştir (Ambs vd., 2008).

Bir başka potansiyel onkomir olan miR-21 de akciğer, meme, kolorektal ve PKa'nın solid tümörlerinde aşırı eksprese edilmektedir ve tümör büyümesine, invazivliğine ve metastazına katkıda bulunan önemli bir onkojenik düzenleyici olarak görev yapmaktadır (Sekuklu, Donoghue, & Spillane, 2009; Si vd., 2007). QPCR analizleri, miR-21'in malign, androjenden bağımsız PC-3 ve DU-145 hücrelerinde upregüle edildiğini, androjen bağımlı LNCaP hücrelerinde ise downregüle olduğunu göstermiştir (Li vd., 2009). MiR-21'in etki ettiği mekanizmaya şunlar aracılık edebilir: miristoillenmiş alanin açısından zengin protein kinaz c substratının (MARCKS) yanı sıra PDCD4 ve TPM1'i doğrudan düzenler ve ardından PKa hücrelerinin hareketliliğinin, istilasının ve apoptoz direncinin yükselmesine neden olur (Li vd., 2009). Bu durum, anti-miR-21'in PCa hücrelerinin apoptoza duyarlılığını artırabileceği ve kanser hücrelerinin hareketliliğini ve istilasını olumsuz yönde düzenleyebileceği gözlemlenmektedir (Li vd., 2009). Yakın zamanda yapılan başka bir çalışma, androjen varlığında AR'nin tanımlanmış bir miR-21 promotörü olan miPPR-21'e bağlanabildiğini ve miR-21'in transkripsiyon seviyesinde aşırı ekspresyonuna yol açtığını, dolayısıyla kastrasyon direncine yanıt verdiğini göstermiştir (Ribas vd., 2009).

MiR-125b hücre proliferasyonu için gereklidir (Lee vd., 2005) ve PKa'da upregüle edildiği bulunmuştur. Sentetik olgun miR-125b'nin transfeksiyonu, *BAK1* transkriptinin 3' UTR'sini hedefleyerek androjenden bağımsız PKa hücre büyümesini indüklemeye kapasitesine sahiptir (deVere White vd., 2009; Lee vd., 2005). Bununla birlikte, BAK1'in yalnızca siRNA kullanılarak downregüle edilmesi, hücre büyümesi üzerindeki miR-125b aracılı uyarımı geri getiremez; bu, PKa'da başka miR-125b hedeflerinin mevcut olduğunu düşündürmektedir (deVere White vd., 2009; Shi vd., 2011). Daha sonraki bir rapor, PKa'da miR-125b'nin bir başka spesifik hedefi olan *EIF4EBP1*'i tanımlamıştır (Ozen, vd., 2008). Bu kanıtlar, bireysel bir miRNA'nın farklı yollar aracılığıyla birden fazla hedefi düzenleyebileceği hipotezini doğrulamaktadır.

1.6.4. PKa'da tümör baskılayıcı miRNA'ların işlevleri

Tümör baskılayıcı miRNA'ların kaybı, PKa'nın ilerlemesiyle ilgili başka bir mekanizmadır. Kanser displazisi ile ilişkili, Polikomb Baskılayıcı Kompleks 2 (PRC2)'nin katalitik alt ünitesi olan EZH2, gen susturucu görevi gören bir tür histon metiltransferazdır. Prostat tümörlerinde miR-101 kaybı, EZH2'nin aşırı ekspresyonuyla birlikte görülmektedir. MiR-101'i kodlayan genomik lokusların hem klinik lokalize PKa'da (%37,5) hem de metastatik kanserde (%66,7) kaybolduğu bulunmuştur. MiR-101'in aşırı ekspresyonu, EZH2'nin düşük ekspresyon seviyesiyle hücre büyümesini ve istilacılığı baskılamıştır, oysa EZH2'nin aşırı ekspresyonu, miR-101 tarafından hücre büyümesinin inhibisyonunu kurtarmıştır (Varambally vd., 2008).

PKa ile ilgili diğer bir faktör, *Egfl7* geninin bir intronunun ürünü olan miR-126*'nın doğal yokluğudur. miR-126*'nın ektopik ekspresyonu, PKa hücrelerinin migrasyonunu ve invazivliğini inhibe etmiş, buna prostein ekspresyon seviyesinin azalması da eşlik etmiştir (Musiyenko vd., 2008). Prostein, PSA'lar biridir (Xu vd., 2001) ve PKa hücrelerinin hareketliliğine ve istilacılığına katkıda bulunur. Kanıtlar, miR-126*'nın, prostein mRNA'nın 30 UTR'sini hedefleyerek prostein translasyonunu baskıladığını ileri sürmektedir (Musiyenko vd., 2008). Lin ve diğerleri. (Lin, vd., 2008) PKa dokularında ve hücre hatlarında 8 downregüle ve 3 upregüle edilmiş miRNA'yı analiz etmiş ve 8 upregüle olan miRNA'dan biri olan miR-146a'nın androjen bağımlı hücrelerde çarpıcı biçimde eksprese edildiğini ve androjen bağımsız hücrelerde kaybolduğunu bulmuştur. MiR-146a'nın ekspresyonunun artırılması, *ROCK1*'in susturulması ve ardından PC3 hücrelerinde HA/ROCK1 yolunun inhibe edilmesi yoluyla hücre göçü, istilası, proliferasyonu, anti-apoptoz ve metastazın önemli ölçüde azalmasıyla sonuçlanmıştır; bu, miR-146a'nın PKa'da bir tümör baskılayıcı olarak görev yaptığını düşündürmektedir (Lin vd., 2008) .

Yukarıda belirtildiği gibi, microRNA-200 ailesi, PKa'daki downregülasyonu epigenetik modifikasyondan kaynaklanabilecek bir grup potansiyel tümör baskılayıcı miRNA'dır. Az eksprese edilen miRNA-200 ailesinin, kanserlerin migrasyon ve invazyonuna katılan epitelyalden mezenkimal geçişe (EMT) kritik roller oynadığı doğrulanmıştır. MiR-200c ve miR-141 ekspresyonunu kaybetmiş PC3 hücreleri, miR-200c ve miR-141 yakınındaki anormal metillenmiş CpG adası nedeniyle mezenkimal bir fenotip sergiler ve bu da kanser hücrelerinin istilasına ve metastazına yol açar (Vrba vd., 2010). Transkripsiyon sonrası düzeyde, yeni bir çalışma miRNA-200 ailesinin PKa'nın göçüne ve istilasına katılan PDGF-D aracılı EMT'yi düzenlediğini göstermiştir (Kong vd., 2009).

Ek olarak miR-330, E2F1 seviyesi ile negatif korelasyon gösterir ve sonuçta PKa'da Akt sinyal yolunun baskılanması yoluyla apoptozun aktivasyonuna yol açar (Lee vd., 2009). P53'ün miR-34a/miR-34c aracılı apoptozda rol oynadığı AR pozitif PKa hücrelerinde de bulunmuştur (Rokhlin vd., 2008).

Toplu olarak, bu bulgular PKa'nın başlangıcında, androjen bağımlı durumdan androjenden bağımsız duruma ilerlemesinde, istilasında ve metastazında miRNA'ların rol oynadığını kanıtlamıştır ve PKa'daki düzenleme ağlarının miRNA'ların keşfi nedeniyle daha da karmaşık hale geldiğini gösteren kanıtlar artmaktadır. MiRNA'ların transkripsiyon sonrası seviyede hedeflerine bağlanarak düzenleyici etkisine androjen/AR sinyal yolu, prostata özgü proteinler veya rutin olarak hücre döngüsü kontrol noktaları ve hayatta kalma ile ilgili ortak bileşenlerin paylaşılması veya PKa'da proliferatif sinyal apoptozu yoluyla aracılık edilmektedir. PKa'da miRNA'lar tarafından kontrol edilen gen ekspresyonunun yönlerine ilişkin daha fazla bilgi elde edilmektedir.

1.6.5. Prostat kanserli hastaların vücut sıvılarındaki miRNA'lar

Geçmişte araştırmacılar miRNA'ların dokulardaki kanserle ilişkili genlerin düzenlenmesiyle ilgili olduğundan şüphelenmekteydi. 2008 yılında Lawrie ve ark. (Lawrie vd., 2008) ilk olarak serum gibi vücut sıvılarındaki hücre dışı miRNA'ların invazif olmayan tanı belirteçleri olarak potansiyele sahip olabileceği gerçeğini belirlemiştir. Diffüz büyük B hücreli lenfoma hastalarından alınan serumda miR-155, miR-210 ve miR-21 ekspresyon seviyelerinin normal kontrollerde bulunanlardan önemli ölçüde daha yüksek olduğunu bulmuşlardır. O zamandan beri dolaşımdaki miRNA'lara ilgi artmaktadır. Chen ve ark. (Chen vd., 2008) hücre dışı miRNA'ların insanların serum ve plazmasında mevcut, stabil, tekrarlanabilir ve tutarlı olduğunu göstermiştir. Ayrıca akciğer kanseri, kolorektal kanser ve diyabet gibi her hastalığın serum miRNA'larının spesifik bir ekspresyon modeline sahip olduğunu bulmuşlardır. Bu nedenle, vücut sıvılarında miRNA'ların tespiti, çeşitli kanserlerin potansiyel invazif olmayan tanısal biyobelirteçleri olarak hizmet edebilmektedirler.

2008'de Mitchell ve ark. (Mitchell vd., 2008), tümörden türetilen miRNA'ların dolaşım sistemine girebildiğini ve insan kanserinin önemli kan bazlı biyobelirteçleri olarak serum ve plazmada ölçülebileceğini bildirmiştir. Ayrıca sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında PKa hastalarının serumlarında dolaşımdaki miR-141'in önemli ölçüde arttığını da göstermişlerdir. Son zamanlarda metastatik PKa hastalarının plazmasında miR-141'in upregülasyonu doğrulanmıştır (Agaoglu vd., 2011). Brase ve ark. (Brase vd., 2011) aynı zamanda dolaşımdaki miRNA'ların (miR-375 ve miR-141) ilerlemiş hastalığı olan hastalarda yüksek düzeyde tespit

edildiğini ve düzeylerinin aynı zamanda yüksek Gleason skoru veya lenf nodu pozitif durumuyla korele olduğunu da bulmuştur. Ek olarak, Porkka ve ark. (Porkka vd., 2007) ve Özen ve ark. (Özen vd., 2008) yaptığı çalışmalarda, tümörlerdeki miRNA'lar önemli ölçüde (let-7 ailesi, miR-16, miR-23, miR-99, miR-125, miR-29 ve miR-30'un tümü) downregüle edilmiştir. Ambros ve ark. (Ambros vd., 2008) PKa hücrelerinin normal prostat hücrelerine göre daha yüksek miR-32 seviyeleri ifade ettiğini bulmuşlardır. MiR-32, miR-26a, miR-196a, miR-181a, miR-25, miR-93, miR-92 ve let-7i'nin hepsinin upregüle edildiğini göstermişler ve ayrıca ekstraprostatik hastalık yayılımı, androjen regülasyonu ve protein kodlayan hedef genlerin transkripsiyonu ile ilişkili bazı miRNA'ları tanımlamışlardır. Bu sonuçlar Volinia ve arkadaşlarının bulduğu verilerle kısmen örtüşmektedir (Volinia vd., 2006).

PKa dokularındaki miRNA'lar, normal kontrollerle karşılaştırıldığında kanseri tespit etmek için kullanılabilecek umut verici biyobelirteçler olabilirler. Szczyrba ve ark. (Szczyrba vd., 2010), PKa dokularındaki 33 miRNA'nın, kanser dışı dokularda bulunanlara kıyasla 1,5 kattan fazla upregüle edildiğini veya downregüle edildiğini göstermiştir ve miR-143 ve miR-145'in PKa gelişiminde rol oynayabileceğini öne sürmüşlerdir. Ayrıca Mattie ve ark. (Mattie vd., 2006), PKa hastalarında biyopsi örneklerinde bulunan miRNA'nın, yüksek verimli miRNA ekspresyon profilini kullanarak PKa'yı normal kontrollerden ayırmak için kullanılabileceğini göstermiştir.

Kanser dokularındaki miRNA'lar PKa'nın prognozu için yararlı bir belirteç olabilirler. Tong ve ark. (Tong vd., 2009), 20'sinde prostatektomiden sonraki 2 yıl içinde biyokimyasal nüks görülen ve 20'sinde 10 yıldan fazla nüks olmayan 40 prostatektomi örneğinin (her örneğin malign ve etkilenmemiş alanları) ikili analizini gerçekleştirmişlerdir. 5 miRNA'nın (miR-23b, miR-100, miR-145, miR-221 ve miR-222) kanser dokularında downregüle edildiğini göstermişler; bu da Porkka ve arkadaşlarının bulduğu sonuçlarla uyumludur (Porkka vd., 2007). Ayrıca erken biyokimyasal nüks olan kanser dokularında miR-135b ve miR-194 ekspresyonlarının arttığı görülmüştür. Schaefer ve ark. (Schaefer, vd., 2010) ayrıca 76 PKa doku örneği ile komşu normal doku örnekleri arasındaki eşleşmelerde miRNA ekspresyonu ve klinikopatolojik veriler arasındaki ilişkileri araştırmışlardır.

MiR-16, miR-31, miR-125b, miR-145, miR-149, miR-181b, miR-184, miR-205, miR-221 ve miR-222 gibi downregüle edilmiş 10 miRNA ve miR-96, miR-182, miR-182*, miR-183 ve miR-375 gibi upregüle edilmiş 5 miRNA tanımlamışlardır. Bazı miRNA ifadeleri Gleason skoru ve tümör evresi ile koreledir. miR-96 ekspresyonu ameliyat sonrası nüksleme ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca Spahn ve ark. (Spahn vd., 2010) aynı zamanda BPH ve metastatik

PKa'da miRNA'ların global ekspresyonunu da analiz etmiştir. Bazı miRNA'ların yeni gelenler olduğunu ve miR-221'in downregülasyonun Gleason skoru, ilerleme ve nüks ile ilişkili olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca, PKa'da dokularındaki miRNA imzaları, daha sonraki hastalık evrelerinde postoperatif sonuçları bağımsız olarak tahmin etmek için kullanılabilecek prognostik bir belirteç olabilir (Martens-Uzunova vd., 2012). Dülgeroglu ve Eroglu'nun yaptığı bir çalışmada BPH ve PKa'lı hastaların serum örneklerinden 11 miRNA'nın analizi gerçekleştirmiş ve bu miRNA'lardan 5'ini (miR-375, -125b-5p, -30c-5p, -26b-5p, and let-7c-5p) biyobelirteç adayı olarak değerlendirmişlerdir. Bu miRNA'ların tek tek veya kombine olarak PKa'yı benign durumlardan ayırmak için kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Ayrıca, miRNA'ların tanısal potansiyeline ilişkin veriler kronik prostat grubu dahil edilmeden analiz edildiğinde, BPH ve PKa'yı ayırt etmede daha yüksek bir özgüllük ve duyarlılık elde edilmiştir (Dülgeroğlu & Eroğlu, 2019).

1.6.6. Prostat kanseri teşhisinde mikroRNA'lar

MiRNA, son derece stabil oldukları serum, plazma, idrar, tükürük, anne sütü, gözyaşı ve semen dahil olmak üzere biyolojik sıvıların çoğundan kolayca izole edilebilmektedir. MiRNA'lar, kantitatif gerçek zamanlı PCR (qRT-PCR) yoluyla spesifik ve hassas bir yöntemle küçük bir örnek hacminde kolayca tespit edilebilmektedir (Cortez vd., 2011; Sita-Lumsden, vd., 2013). Pratik bir bakış açısıyla, erken teşhis biyobelirteci, potansiyel olarak agresif hastalığı kanserin hala tedavi edilebilir olduğu aşamada tespit ederken, hafif hastalığın tespitini en aza indirmelidir (Mitchell vd., 2008b). Bu nedenle, miRNA'lar değerli biyobelirteç adaylarıdır çünkü çok çeşitli biyolojik örneklerden tekrarlanabilir bir şekilde ekstrakte edilebilirler ve çeşitli saklama koşullarına karşı kararlıdırlar (Chen vd., 2008). Ayrıca miRNA'lar qRT-PCR, mikroarray ve küçük RNA sekanslama gibi standart tekniklerle kolayca tespit edilebilir ve doğru bir şekilde ölçülebilir (Fabris vd., 2016).

1.6.7. Prostat kanserinin erken teşhisinde mikroRNA

Çeşitli çalışmalar, dolaşımdaki miRNA'ların varlığının PKa teşhisi için doğru biyobelirteçler olarak hizmet edebileceğini göstermektedir (Agaoglu vd., 2011; Daniunaite vd., 2017; Goto vd., 2015; Kelly vd., 2015; Li vd., 2009; Meiers, Shanks, & Bostwick, 2007; Singh, Shukla, & Gupta, 2015; Stuopelyte, vd., 2016; Suzuki, vd., 2012; Torres-Ferreira vd., 2017; Wiggins vd., 2010; Zheng vd., 2014). miR-205 ve miR-214 PKa'da downregüle edilmiş ve PKa'da non-invaziv moleküler biyobelirteç potansiyelini göstermiştir (Srivastava vd., 2013; Stuopelyte vd., 2016). Bir başka örnek miR-21'dir; miR-21'in ekspresyon seviyesi androjenden bağımsız PKa hücrelerinde androjene bağımlı PKa hücrelerine göre çok daha yüksektir (Li vd.,

2009). Bu nedenle, miR-21'in ekspresyon seviyesinin belirlenmesi, PKa'nın evreye özgü sınıflandırılması için kullanılabilir. Ayrıca, idrar ve serum gibi vücut sıvılarından miRNA ekspresyon profili, miRNA'ları yeni biyobelirteçler olarak keşfetmek için kullanılabilir (Mitchell vd., 2008; Wiggins vd., 2010). MiR-21, miR-141 ve miR-221 dahil olmak üzere dolaşımdaki miRNA'lar, yüksek riskli PKa, metastatik PKa ve CRPC olan erkeklerde sürekli olarak artan dolaşımdaki miR- 141 ile en sık deregüle edilir (Agaoglu vd., 2011; Zheng vd., 2014) . Bu miRNA'ların doku biyopsilerinde ve en azından miR-21 için idrarda değiştiğine dikkat etmek önemlidir. İdrarda zenginleştirilmiş diğer iki miRNA (miR-19a ve miR-19b) ile birleştirildiğinde miR-21, PSA'dan daha fazla tanısal güce sahiptir (Goto vd., 2015; Kelly vd., 2015; Stuopelyte vd., 2016). Bu tür çalışmalar, PKa'nın tanı ve prognozu için kan veya doku biyopsilerinden daha az invaziv biyolojik sıvı biyobelirteç kaynaklarının tanısal değerini vurgulamıştır.

PKa'da CpG adası hipermetilasyonunun bir sonucu olarak glutatyon-S-transferaz-pi (GSTP1) ekspresyon kaybı, evre veya dereceden bağımsız olarak tümörlerin büyük çoğunluğunda (>%90) meydana gelir (Meiers vd., 2007). MiR-133a/b, miR-144/144*, miR-153-1/2 ve miR-590- 3p/5p dahil olmak üzere çeşitli miRNA'ların GSTP1 ekspresyonunu düzenlediği tahmin edilmektedir. GSTP1 ekspresyonunu hedefleyen varsayılan miRNA'ların ayrıntılı bir analizi, PKa'nın erken tespiti ve prognozu için avantajlı olabilir (Singh vd., 2015).

Son çalışmalar, miR-155, miR-152 ve miR-137 konak genlerinin promotörle ilişkili CpG adalarının PKa'da sıklıkla hipermetillendiğini, ancak benign dokuda olmadığını göstermektedir (Daniunaite vd., 2017; Torres-Ferreira vd., 2017). Metillenmiş miR-155, miR-152, miR-137 ve miR-31 konak genleri PKa'nın umut verici tanısal ve/veya prognostik biyobelirteçleridir (Daniunaite vd., 2017). Aslında, miR-193b hem doku hem de idrarda PKa'nın tespitinde yüksek duyarlılık ve özgüllük gösterirken, yüksek miR-129-2 ve miR 34b/c metilasyon seviyeleri sırasıyla daha kısa hastalığa özgü ve hastalıksız sağkalım için bağımsız belirleyicilerdir (Torres-Ferreira vd., 2017).

1.6.8. Prostat kanseri için biyobelirteç olarak eksozomal miRNA'lar

Kodlamayan RNA'lar (ncRNA'lar) kan dolaşımına veya idrara salgılanan eksozomlarda da tespit edilebilir. Eksozomlar, uzun kodlamayan RNA'lar (lncRNA'lar) da dahil olmak üzere çeşitli biyomoleküller içeren, hücrel iletişimde rol oynayan ve kanser hücreleri de dahil olmak üzere birçok hücreden salgılanan membranöz veziküllerdir. CRPC hastalarından elde edilen eksozomlarda sncRNA-dizileme ve qPCR doğrulamasının birleştirilmesi CRPC hastalarında azalmış genel sağkalım ile ilişkili eksozomlarda miR-1290 ve miR-375'in artan ekspresyonu

bulunmuştur (Huang vd., 2013). MiR-1290 ve miR-375 düzeylerini, ADT başarısızlık süresini ve CRPC evresi sırasındaki PSA düzeylerini içeren çok değişkenli bir model, yüksek risk skoru olan hastaların düşük risk skoru olan hastalara göre 2,58 kat daha yüksek ölüm riskine sahip olduğu sonucuna varmıştır (Huang vd., 2015; Ramalho-Carvalho, vd., 2016).

Hücre dışı veziküllerin miRNA'sı, hücrelerin miRNA ekspresyon profilini ve kökenlerini yansıtır (Ahadi, vd., 2016). Brase ve arkadaşları, miR-375 ve miR-141'i PKa için uygun belirteçler olarak tanımlayan 60'tan fazla eksozomal miRNA'yı taramıştır (Huang vd., 2013). Eksozomlardaki bu miRNA içeriği, PKa için tanı koymanın yanı sıra hastalık evresini tahmin etmek için de kullanılabilecek potansiyel yeni bir biyobelirteç olarak düşünülebilir (Brase vd., 2011; Skog vd., 2008). Başka bir örnek olarak, miR-21 erken evrede önemli ölçüde yükselir, ancak ileri evre PKa'da yükselmez ve miR-16 metastatik PKa hastalarının plazmasında yukarı doğru düzenlenir, ancak primer veya metastatik PKa dokularında aşağı doğru düzenlenir (Endzeliņš vd., 2016). Ayrıca, metastatik PKa hastalarında kan eksozomlarında başka miRNA'ların da tespit edildiği bildirilmiştir (Li vd., 2016).

MiRNA'lar, PKa hastalarında sağlıklı kontrol ile karşılaştırıldığında plazma ve serum mikroveziküllerinde düzensiz olarak tanımlanmış ve ayrıca hastalık evresi, Gleason skoru ve lenf nodu metastazı ile ilişkilendirilmiştir. Lodes ve arkadaşları, sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında evre 3 ve 4 PKa hastalarından alınan serumda 15 miRNA'nın (miR-16, 92a, 103, 107, 197, 34b, 328, 485-3p, 486-5p, 92b, 574-3p, 636, 640, 766, 885-5p) aşırı eksprese edildiğini bulmuştur. Mahn ve arkadaşları, miR-26a, miR-195 ve let-7i'nin PKa'lı hastalarda upregüle edildiğini bulmuştur (Bryant vd., 2012; Gallo, vd., 2012; Lodes vd., 2009; Mahn vd., 2011).

1.6.9. Prostat kanserinin prognozunda mikroRNA

MiRNA'ların diferansiyel ekspresyonu PKa gelişimi ve ilerlemesi ile ilişkili olduğundan, miRNA ekspresyon modellerinin ölçümü PKa prognozunu iyileştirmek için umut verici bir yaklaşımdır (Fang & Gao, 2014; Matin, vd., 2016). Hasta prognozunun öngörülmesi, PKa'nın klinik yönetiminin önemli bir yönüdür. Bu nedenle, hastaları agresif PKa geliştirme risklerine göre ayırmak için farklı bir miRNA ekspresyon modeli oluşturmak üzere çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Prostat dokusunun diferansiyel miRNA ekspresyon profili çalışmaları, BPH, lokalize ve metastatik PKa'daki miRNA'lar arasında önemli farklılıklar tespit etmiştir. MiRNA'ların (miR-29c, miR-34a ve miR-141) aşağı regülasyonu, düşük (derece 3) Gleason derecelerine kıyasla daha yüksek (derece 5) derecelerde gözlenmiştir (Lichner vd., 2015). Başka bir çalışmada, biyokimyasal nüks riski yüksek olan hastalarda daha düşük miR-331-3p

ve miR-152 seviyeleri tespit edilmiştir (Lichner vd., 2013). İlginç bir şekilde, miR-152 ekspresyonunun Afrikalı-Amerikalı hastalarda, muhtemelen tek nükleotid polimorfizmlerinin varlığı nedeniyle, Kafkasyalı-Amerikalılara kıyasla önemli ölçüde azaldığı bulunmuştur. Ayrıca, miR-152 ekspresyonunun kaybı ve sonuç olarak DNA metiltransferaz 1 (DNMT1) ekspresyonunun artışı prostat tümörlerinin agresifliği ile ilişkilendirilmektedir (Singh, Plaga, & Shukla, 2017; Theodore vd., 2014).

Sun ve arkadaşları, CRPC dokularında miR-221 ve miR-222'nin yüksek ekspresyonunu gözlemlemiş ve miR-221'in tümör metastazında rol oynayan genlerin aşırı ekspresyonunu uyardığını bildirmiştir (T. Sun vd., 2014). Daha yakın zamanda, miR-221/222 kümesi, aşağı regülasyonu CRPC'ye yol açan bir tümör baskılayıcı olarak rapor edilmiştir (Goto vd., 2015). Ambs ve meslektaşları 60 tümör dokusu örneğinde ve 16 kontrolde miRNA'ların genomik profilini çıkarmış ve miR-32, miR-182, miR-31 ve miR-26a'nın en belirgin şekilde aşırı eksprese edilen tümör miRNA'ları olduğunu ve tümör progresyonuna doğrudan dahil olduklarını göstermiştir (Ambs vd., 2008; Huang vd., 2014). Daha yeni çalışmalar, PKa'da rol oynayan sinyalleri düzenleyerek miR-181a ve miR-196a gibi ek miRNA'ların onkojenik rolünü göstermiştir (Huang vd., 2014; Parikh vd., 2014). Buna karşılık, miRNA'ların tümör baskılama yeteneği de PKa'da iyi bir şekilde belgelenmiştir. Düşük riskli, lokalize PKa ve metastatik CRPC'li erkeklerden alınan serum örneklerinin farklı dolaşımdaki miRNA imzaları sergilediği gösterilmiştir (Mitchell vd., 2008).

Gerçekten de miR-21, miR-141 ve miR-375 ekspresyon seviyeleri plazma/serumda artmaktadır ve bu da ilerlemiş PKa olan hastaları kötü prognozla ayırt ediyor gibi görünmektedir (Nguyen vd., 2013; Zhang vd., 2011). Ayrıca, miR-21 serum seviyeleri özellikle dosetaksel bazlı kemoterapiye dirençli hastalarda yükselmektedir (Zhang vd., 2011). İki bağımsız kohortta, GABRE ~ miR-452 ~ miR-224 promotör hipermetilasyonu radikal prostatektomi sonrası biyokimyasal rekürrensi öngörmüştür. Ayrıca, GABRE ~ miR-452 ~ miR-224 metilasyon seviyeleri malign olmayan PKa örneklerini doğru bir şekilde ayırt ederek (AUC: 0,98), bu lokusun idrar bazlı PKa tespiti için uygun olabileceğini düşündürmüştür. GABRE ~ miR-452 ~ miR-224 sadece biyobelirteç potansiyeline sahip olmakla kalmaz, aynı zamanda miR-224 ve miR-452'nin yeniden ifade edilmesi hücre canlılığını, göçünü ve istila yeteneklerini de bozar (Bussemakers vd., 1999; Kristensen vd., 2014).

1.6.10. Prognostik biyobelirteçler olarak dolaşımdaki miRNA'lar

Dolaşımdaki miRNA'lar biyokimyasal rekürrens (BCR) ve CRPC'yi öngörmek için de kullanılabilir. Bu yöndeki kanıtlar, miR-194 ve miR-146b-3p'nin BCR yaşayan hastaların

serumlarında upregüle edildiğini tespit eden bir çalışmadan gelmiştir (Selth vd., 2013). Aynı bir çalışmada, aynı grup tarafından tümörsüz farelere kıyasla ilerlemiş PKa'lı transgenik farelerde 4 serum miRNA'sının (miR 141, miR-298, miR-346 ve miR-375) yüksek konsantrasyonları tespit edilmiştir. Bu miRNA'lar daha sonra ölçülmüş ve sağlıklı kontrollere kıyasla metastatik CRPC'li hastaların serumunda (miR-298 hariç) upregüle oldukları bulunmuştur (Luke A. Selth vd., 2012). Metastatik CRPC ve lokalize PKa olan erkeklerin serum miRNA'larını karşılaştıran bir başka çalışma, hem miR-141 hem de miR-375'i kastrasyon direncinin öngörücü biyobelirteçleri olarak ortaya koymuştur (Nguyen vd., 2013) . Yakın tarihli bir çalışmada, Huang ve ark. miR- 375 ile birlikte eksozomal miR-1290'ı CRPC'de prognostik biyobelirteçler olarak tanımlamıştır (Huang vd., 2013).

Aynı bir çalışmada, idrar miR-1825 ve miR-484'ün PKa'nın tanısal biyobelirteçleri olarak rolü 8 PKa hastası, 12 BPH hastası ve 10 sağlıklı kontrolde analiz edilmiştir, çünkü bu 2 miRNA'nın PKa gelişimi ve ilerlemesiyle ilgili genleri hedef aldığı bulunmuştur (Haj-Ahmad, Abdalla, & Haj-Ahmad, 2014). Başka bir çalışmada, PKa tespiti için idrarda dolaşan miRNA'lar kullanılmıştır. MiR-375 ve miR-148a idrarda önemli ölçüde tespit edilmiştir; miR 375 serum PSA'sından daha iyi tanı gücü göstermiştir (Stuopelyte vd., 2016). MiR-484, PKa hastalarında BPH hastalarına ve sağlıklı kontrollere kıyasla downregüle edilirken, miR-1825'in yukarı regülasyonu farklı karşılaştırmalar arasında değişkenlik göstermiştir. Bu sonuçların PSA değerleri ile birleştirilmesi PKa teşhisinde %40 duyarlılık ve %81 özgüllük göstermiştir. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, miR-483e5p'nin PKa hastalarının idrar örneklerinde sağlıklı erkeklere kıyasla upregüle olduğu bulunmuştur (Korzeniewski vd., 2015). Güzel ve arkadaşları, 23 PKa hastası ve 25 BPH hastasından alınan prostatik salgı örneklerinde miR-361e3p, miR-133b ve miR-221'in aşağı regülasyonunu ve miR- 203'ün yukarı regülasyonunu tespit etmiştir. İlginç bir şekilde, miR-203'ün primer prostat tümörlerinde ve metastatik PKa hücre hatlarında downregüle olduğu ve tümör baskılayıcı rolü olduğu bildirilmiştir (Chen vd., 2010; Viticchiè vd., 2011).

1.6.11. Terapötik yanıt için biyobelirteç olarak miRNA

Kemoterapi ve radyasyon terapisi de dahil olmak üzere çeşitli tedavi yöntemlerine terapötik yanıt olarak miRNA'ların önemi artık yaygın olarak kabul edilmektedir. Radyasyon tedavisine yanıt olarak değişen bir miRNA imzasının kanıtı, androjene duyarlı ve refrakter PKa hücre hatlarında önemli ölçüde downregüle edilen 6 miRNA (miR- 512, miR-196a, miR-133b, miR-143, miR-145b ve miR-218) sergilemiştir (Chen vd., 2010). Özellikle, miR-521'in belirgin şekilde downregüle edildiği ve zorunlu aşırı ekspresyonunun hücreleri in vitro olarak

radoterapiye duyarlı hale getirdiği kaydedilmiştir (Josson, vd., 2008). Li ve arkadaşları, miR-106b'nin tedaviyi izlemek için kullanılabileceğini, çünkü aşırı ekspresyonunun, hücre döngüsü kinaz inhibitörü p21/Waf1'in düzenlenmesi yoluyla radyoterapiyi takiben PKa hücrelerinde hücre döngüsü durmasını geçersiz kılmak için yeterli olduğunu göstermiştir (Josson vd., 2008). Başka bir çalışma, miR-106b'nin çoklu PKa hücrelerinde radyasyondan koruyucu rolünü ve miR-890 ve miR-740 3p'nin güçlü radyasyon hassaslaştırıcıları olarak rolünü doğrulamıştır (B. Li vd., 2011).

İleri evre PKa için, cerrahi ve/veya androjen yoksunluğu tedavisinin başarısızlığından sonra, standart bakım tedavisi taksan bazlı kemoterapiyi içerir. OnkomiR miR-21'in PKa tedavisinde taksanlara verilen yanıtın kontrolünde temel bir rol oynadığı gösterilmiştir. Gerçekten de miR-21 ekspresyonunun, dosetaksel bazlı kemoterapiye dirençli hormona dirençli PKa olan hastalarda serumda önemli ölçüde daha yüksek olduğu bulunmuştur (Shi vd., 2010). İlginç bir şekilde, in-vitro sonuçlar, androjen deprivasyon tedavisine yanıt veren ve vermeyen olarak ikiye ayrılan 96 CRPC hastasında dosetaksele dirençli hücre hatlarının 6 miRNA'nın (miR-200c, miR-200b, miR-146a, miR-222, miR-301b ve miR-20a) imza ekspresyonunu gösterdiğini ve anti-androjenlerin geri çekilmesi ve kemoterapinin başlaması (Lin vd., 2014).

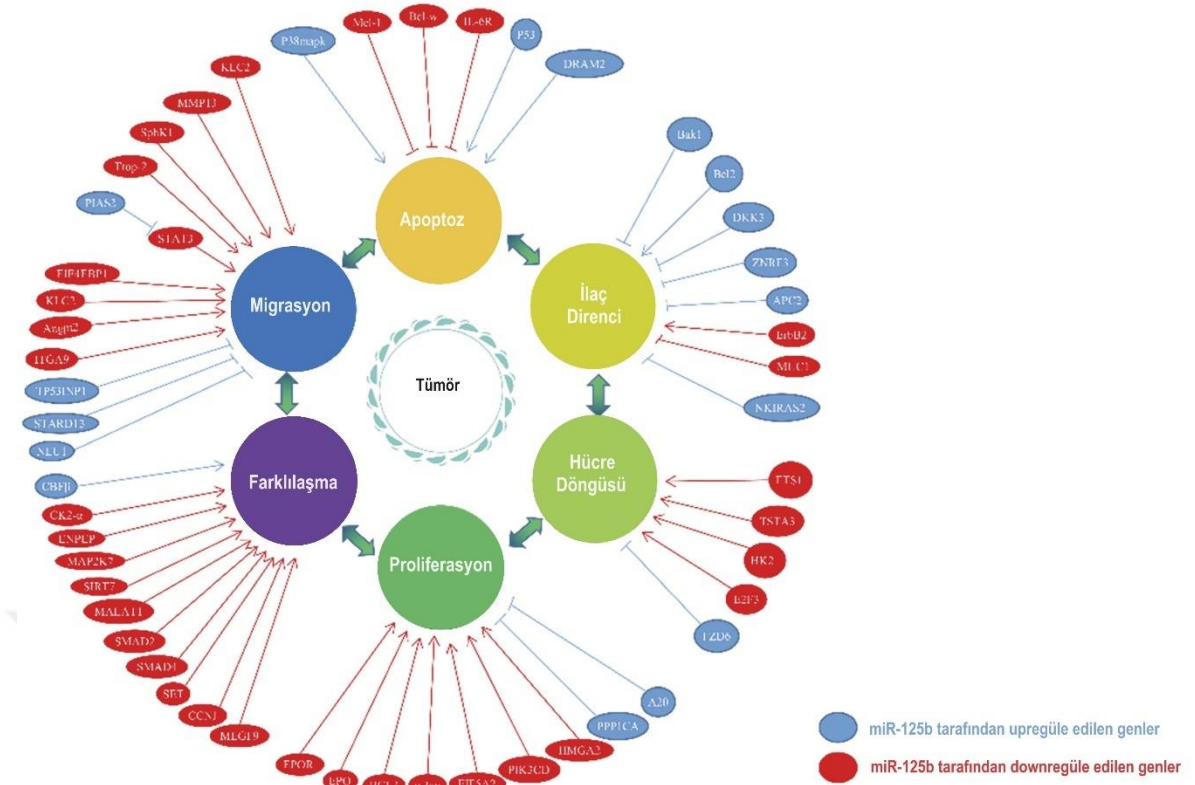
PKa tedavisi için umut verici görünen bir diğer miRNA, TP53 ile bilinen korelasyonu nedeniyle miR-34a'dır. Kojima ve arkadaşları, apoptotik yolağın modülasyonu yoluyla PKa hücrelerinde paklitaksel direnci ve miR-34a arasındaki ilişkiyi bildirmiştir. TP53, miR-34a'nın promotör bölgesini transaktive eder ve yukarı regülasyonu hücre döngüsünün durmasına ve CDK4, CDK6, CYCD1 ve E2F3 dahil olmak üzere farklı doğrulanmış hedeflerin aşağı akış modülasyonuna yol açar. MiR-34a, PKa hücrelerinde hem apoptotik yollar hem de epitelyal-mezenkimal geçiş ile ilişkilendirilmiştir; genomik lokusu kanserde sıklıkla metillenerek aşağı regülasyonuna yol açar. Hem miR-34a hem de miR-34c'nin aşırı ekspresyonu, PKa hücre hatlarında doksorubisin tedavisine yanıt olarak P53 aracılı apoptozun artmasıyla sonuçlanır (Kojima, vd., 2010; Kojima, Goto, & Naya, 2017; Rokhlin vd., 2008).

1.6.12. Prostat kanserinde miR-125b-5p önemi

Bir onkogen olarak miR-125b'nin upregülasyonu nazofarenks karsinomu (Yuan vd., 2017; Zheng vd., 2017), retinoblastom (RB) (Bai vd., 2016), glioblastom (Chen vd., 2014; Haemmig vd., 2014; Huang vd., 2016; Shi vd., 2014; Wu vd., 2013), az farklılaşmış küçük hücreli dışı akciğer kanseri (Li vd., 2015), akut lenfoblastik lösemi (ALL) (Liu vd., 2016), akut miyeloid lösemi (AML) (Lin vd., 2011), ve mide kanseri gibi çeşitli kanser türlerinde bildirilmiştir (Chang vd., 2016; Liu vd., 2021; Sui vd., 2017). Öte yandan, miR-125b, bir tümör

baskılayıcı olarak, aşağıdaki kanserlerde downregüle edilmektedir: küçük hücreli dışı akciğer kanseri (M. Wang vd., 2015), özofageal skuamöz hücreli karsinom (Feng vd., 2017; Mei vd., 2017), anaplastik tiroid kanseri (Bu vd., 2017), mesane kanseri (Avellini vd., 2017; Han vd., 2013; Huang vd., 2011; Wu vd., 2013; Zhao vd., 2015), hepatoselüler karsinom (Tsang vd., 2014; Zhou vd., 2016; Zhou vd., 2015), melanom (Kappelman, vd., 2013; Zhang vd., 2016), yumurtalık kanseri (Guan, vd., 2011; Lee, Kim, & Jeon, 2016; Ying vd., 2016), osteosarkom (L. hong Liu vd., 2011; F. Wang, Yu, vd., 2016; Y. Wu vd., 2017), kondrosarkom (Tang vd., 2016), meme kanseri (Feliciano vd., 2013; Hong vd., 2016; Klinge vd., 2011; Rajabi vd., 2010; Sun vd., 2016; Tang vd., 2012; Zhang vd., 2011), safra kesesi kanseri (Yang vd., 2017), endometrioid endometriyal kanser (Shang, Lu, & Meng, 2012), kolorektal kanser (Fujino vd., 2017; Zhang vd., 2017), multipl miyelom (Gao vd., 2018) ve Ewing sarkomu (Li vd., 2014).

MiR-125b'nin işlevi, farklı moleküler bağlamlara ve tümör mikro ortamına bağlı olarak farklı kanserlerde farklılık göstermektedir. Günümüzde, çeşitli biyolojik sinyal yollarını kapsayan ve farklı kanserlerde proliferasyon, farklılaşma, göç, apoptoz, hücre döngüsü ve ilaç direnci gibi birçok malign fenotipin oluşumunu etkileyen birçok genin miR-125b'nin hedef genleri olduğu doğrulanmıştır (Şekil 1.4). MiR-125b'yi upregüle eden tümörlerde, pro-apoptotik genlerin ve proliferasyonu ve istilayı engelleyen genlerin inhibe edilmesiyle tümör oluşumu teşvik edilmektedir. Tersine, miRNA-125b'nin downregüle edildiği tümörlerde tümör oluşumu, proliferasyonu, farklılaşmayı ve apoptoz inhibisyonunu destekleyen genlerin inhibisyonunun azaltılmasıyla desteklenmektedir (Wang, Zeng, & Jiang, 2020).



Şekil 1.4. miR-125b'nin hedefi olduğu doğrulanmış genler ve görev aldıkları mekanizmalar

Kaynak: (Wang vd., 2020)

1.6.13. İlaç direncinde miR-125b

Tümör oluşumu mekanizmasında olduğu gibi miR-125b'nin ilaç direnci mekanizmasında da iki tarafı vardır. Çoklu ilaç direnci (MDR), nazofarenks karsinomlu hastaların başarılı tedavisinde önemli bir klinik engeldir. Yuan ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, ana nazofarenks karsinomu hücreleriyle karşılaştırıldığında sisplatine (DDP) dirençli hücrelerde miR-125b ekspresyon seviyelerinde önemli bir azalma gözlenmiştir. Çalışmanın sonuçları, miR-125b'nin, anti-apoptotik faktör BCL-2'nin ekspresyon seviyelerini modüle ederek nazofarenks karsinomu hücrelerinin DDP'ye duyarlılığını düzenleyebileceğini göstermektedir. Ek olarak Tang ve arkadaşları, miR-125b'nin, kondrosarkomda ErbB2'yi hedef alarak ve böylece glikoz metabolizmasını inhibe eden bir tümör baskılayıcı görevi gördüğünü bulmuşlardır. Sonuçlar, miR-125b'nin kondrosarkom hasta dokularında ve doksorubisin dirençli hücrelerde normal dokulara kıyasla downregüle edildiğini göstermiştir. MiR-125'in aşırı ekspresyonu, doğrudan ErbB2 aracılı glikoliz yukarı regülasyonunu hedefleyerek ana ve doksorubisine dirençli hücrelerde doksorubisin duyarlılığını artırmıştır (Tang vd., 2016).

Buna karşılık miR-125b'nin, normal beyin dokuları ve glioblastom dokularıyla karşılaştırıldığında glioblastoma kök hücrelerinde (GSC'ler) aşırı eksprese edildiği

bulunmuştur. GSC'lerde temozolomid (TMZ) tedavisinden önce miR-125b'nin baskılanması, tek başına TMZ tedavisine kıyasla hücre çoğalmasının daha fazla inhibisyonu ile sonuçlanmış ve bir çalışma, miR-125b'nin Bak1'i hedefleyerek TMZ direncini arttırdığını göstermiştir (Chen vd., 2014). Benzer şekilde Haemmig ve arkadaşları, miR-125b'yi aşırı eksprese eden glioblastom hücrelerinin, her ikisi de NF- κ B aktivitesine katkıda bulunan TNFAIP3 ve NKIRAS2'yi hedefleyerek artan NF- κ B aktivitesi ve anti-apoptotik aktivite ve hücre döngüsü genlerinin upregülasyon sergilediğini göstermiştir. Bu, glioblastom hücrelerinin TNFa ve TMZ kaynaklı apoptoza karşı direnciyle önemli ölçüde ilişkilidir (Haemmig vd., 2014). Ayrıca, Shi ve arkadaşları, bir miR-125b inhibitörünün, PIAS3'ü hedefleyerek GSC'lerde TMZ'nin anti-istila aktivitesini arttırdığını göstermiştir; bu durum apoptozun baskılanmasına katkıda bulunmuştur. STAT3 transkripsiyonel aktivitesi ve ardından MMP-2 ve MMP-9'in ekspresyonunu azaltmıştır (Shi vd., 2014). Dikkat çekici bir şekilde miR-125b aşırı ekspresyonu, TMZ ile tedavi edilen hastaların genel hayatta kalma süresinin kısalması ile açıkça ilişkilendirilmiştir. Kanıtlar, miR-125b'nin glioblastom hastalarında TMZ yanıtının bir göstergesi olabileceğini düşündürmektedir.

Son zamanlarda yapılan çalışmalar, miR-125b'nin, downstream sinyal düzenleyicileri veya paralel yolları aktive ederek ERBB hedefli tedavilere dirençle ilişkili olduğunu göstermiştir (Migliore & Giordano, 2013; Nam, vd., 2012; Sui vd., 2017). Kolorektal kanserde setuksimab direnci üzerine yapılan araştırmada, lncRNA MIR100HG'den türetilen miR-100 ve miR-125b'nin setuksimab dirençli hücrelerde aşırı eksprese edildiği bulunmuştur. MiR-100 ve miR-125b, beş Wnt/ β -katenin negatif regülatörünü koordineli olarak bastırarak, bu da Wnt sinyalinin ve setuksimab direncinin artmasına neden olmuştur. Bu mekanizmada miR-125b, DKK3, ZNRF3, RNF43 ve APC2'yi inhibe etmiştir. LncRNA TINCR'nin miR-125b'yi süngerlediği ve HER-2'yi serbest bıraktığı, bunun da meme kanserinde trastuzumab direncine yol açtığı rapor edilmiştir (Dong vd., 2019).

1.6.14. Tümör bağışıklığında miR-125b'nin rolü

MiR-125b ayrıca tümör bağışıklığında da önemli bir rol oynamaktadır. Çalışmalar miR-125b'nin T hücreleri, B hücreleri, DC hücreleri ve makrofajlar gibi bağışıklık hücrelerinin düzenlenmesinde rol oynadığını göstermiştir. MiR-125b, T hücresi çoğalmasında ve aktivasyonunu düzenler, saf CD4 T hücrelerinde yüksek oranda eksprese edilir ve T hücresi bağışıklık tepkisini inhibe edebilir; miR-125b ise T hücresi apoptozunu destekleyebilmektedir (Rossi vd., 2011; Zhu vd., 2019). Tümör hastalarının B hücrelerinde miR-125b'nin aşırı ekspresyonu, olgunlaşmamış B hücrelerinin kemik iliğinden kana salınmasını önlemektedir.

miR-125b'nin aşırı ekspresyonu ayrıca pre-B hücrelerinin gelişiminde kusurlara yol açar ve miR-125b, birincil B hücrelerinin plazma hücrelerine farklılaşmasını engellemektedir (Li vd., 2018).

Makrofajlar iki farklı makrofaj tipine (M1 ve M2) polarize edilebilir. M1 tipi inflamatuvar yanıtı teşvik ederken, M2 tipi inflamatuvar yanıtı inhibe etmektedir. MiR-125b, makrofajların polarizasyonunu düzenler ve M1 makrofajlarında yüksek düzeyde eksprese edilir ve IRF4'i hedefleyerek tümör immün yanıtlarını desteklemektedir (Chaudhuri vd., 2011). Bir yumurtalık kanseri araştırmasında, miR-125b ile kaplanmış nanopartiküller, periton boşluğundaki tümörle ilişkili makrofajları (TAM'ler) M1 makrofajlarına repolarize etmiştir. Paklitaksel ile birleştirilen nanopartiküller, tek başına pasitaksel ile karşılaştırıldığında yumurtalık kanserine karşı etkinliği arttırmıştır (Parayath, vd., 2019). MiR-125b'yi kapsülleyen nanopartiküller ayrıca küçük hücreli dışı akciğer kanserinde TAM'leri başarıyla M1 fenotipine yeniden programlamıştır ve bu immünoterapide önemli bir rol oynayabilir (Parayath vd., 2018).

1.6.15. Kanser teşhisi ve prognozunda miR-125b

Katı dokulardaki veya dolaşımdaki miRNA'lar, tümörlerin tanısı ve prognozu için temel olarak kullanılabilirler. Şu anda hepatoselüler karsinom için mevcut olan tümör belirteçlerinin klinik önemi çok azdır. Zuo ve arkadaşları, alfa fetoprotein (AFP) ile birlikte serum miRNA panelinin (miR-125b dahil) erken evre hepatoselüler karsinom tanısı için tek bir belirteçle karşılaştırıldığında daha yüksek bir duyarlılığa (%82) ve özgüllüğe (%75) sahip olduğunu öne sürmüştür (Zuo vd., 2016). 90'ı hepatoselüler karsinomlu ve 60'ı kansersiz olmak üzere 150 hastada dört miRNA'nın serum ekspresyonu değerlendirilmiştir. Sonuçlar, miR-125b, miR-223, miR-27a ve miR-26a kombinasyonunun, AFP negatif deneklerde hepatoselüler karsinom grubunu kanser olmayan gruptan ayırmada 0,874'lük bir eğri altında kalan alan (AUC) ile değerli bir biyobelirteç olarak hizmet edebileceğini göstermiştir. Ayrıca miR-125b'nin kanser teşhisindeki tanısal doğruluğu, 8 nitelikli çalışmadan çeşitli kanser türlerine sahip 695 hasta ve 370 sağlıklı kontrolün dahil edildiği bir meta-analizle değerlendirilmiştir. Bu meta-analizde miR-125b'nin kanser tanısındaki duyarlılığı ve özgüllüğü sırasıyla %82 ve %77 idi. 0,84'lük yüksek AUC, genel teşhis doğruluğunun yüksek seviyesini yansıtmaktadır (Wei, vd., 2016).

Çalışmalar, miR-125b'nin yüksek ekspresyonunun, HER2-pozitif mide kanserli hastalarda bağımsız ve kötü prognostik bir faktör olabileceğini öne sürmüştür. Wu ve arkadaşları, 50 mide kanseri hastasının ve 6 mide kanseri hücre hattının taze dokularında miR-125b ekspresyonunu tespit etmiştir. MiR-125b in situ hibridizasyon yöntemiyle tespit edilerek klinikopatolojik tanısı ve klinik parametreleri incelenmiştir. Sonuçlar, mide kanseri olan ve

yüksek miR-125b ekspresyonu seviyelerine sahip hastaların 5 yıllık sağkalım oranının, evre I, II ve III'te düşük ekspresyon seviyelerine sahip hastalarından önemli ölçüde düşük olduğunu göstermiştir. Ayrıca miR-125b'nin mide kanseri dokularındaki bu yüksek ekspresyon seviyesi, lenf nodu ve uzak metastazlarla ilişkilendirilmiştir (Liu vd., 2021). Sui ve arkadaşları toplam 132 mide kanseri örneği ve 38 kanser olmayan örnek toplamış ve analiz edilen sonuçlar, HER2-pozitif mide kanseri ve daha yüksek miR-125b ekspresyonu olan hastaların genel sağkalım oranının, daha düşük miR-125b ekspresyonu olanlara kıyasla önemli ölçüde azaldığını göstermiştir (P=0,034).

Birçok çalışma, miR-125b'nin meme kanserinde prognozu tahmin etmek için bir biyobelirteç olduğunu göstermiştir (Liu vd., 2017; Luo vd., 2017; Sun vd., 2016; Vilquin vd., 2015). Sun ve arkadaşları, meme kanserinde miR-125b'yi analiz etmek için bir çalışma yapmışlar ve 175 çift taze meme kanseri ve normal kontrol örneği sağlayan hastaları 80 ay boyunca takip etmişler. Sonuçlar, TSTA3'ün miR-125b tarafından yüksek oranda düzenlendiğini, meme kanseri dokularında ve tümör hücrelerinde yüksek oranda eksprese edildiğini ve TNM aşamasıyla yakından ilişkili olduğunu göstermiştir. TSTA3'ü aşırı eksprese eden hastaların hayatta kalma oranları düşüktür (Sun vd., 2016). 2019'da yapılan bir çalışma, tedavi edilmemiş meme kanseri hastalarının kanında miR-125b'nin upregüle olduğunu göstermişlerdir. Meme kanseri hastaları ile normal kadınları plazmadaki miR-125b miktarına göre ayırt edebilmişlerdir (AUC = 0,85) (Incoronato vd., 2019).

Ek olarak miR-125b ve CA153 kombinasyonu, tek başına CA153'e kıyasla daha iyi teşhis doğruluğu (%89'a karşı %70) sağlamıştır. Meme kanseri prognozunda, birleşik TCGA ve METABRIC veri tabanlarındaki analiz, yüksek miR-125b'li hastaların daha iyi prognoza sahip olduğunu göstermiştir. Ayrıca ince bağırsak nöroendokrin tümörlerinde (SBNET'ler), dört serum miRNA'sı (miR-125b, -362, -425 ve -500a) SBNET'lerde yüksek tanısal değere sahiptir. SBNET'in cerrahi rezeksiyon sonrası etkinliği değerlendirilmiş ve sonuçlar, miR-125b-5p'nin hastalığı olmayan hastalarda normal seviyelere döndüğünü ve ameliyattan bir ay sonra rezidüel tümörleri olan hastalarda upregüle edildiğini göstermiştir (Malczewska vd., 2021).

1.6.16. MiR-125b tarafından düzenlenen sinyal yolları

Yukarıda belirtildiği gibi miR-125b, farklı kanserlerde farklı roller oynayabilir ve miR-125b'nin antikanser veya pro-kanser işlevi de farklı sinyal yolları tarafından düzenlenebilir. Kanser teşviki açısından miR-125b, DRAM2 ve P53'ü hedefleyebilir ve ardından P53 tümör baskılayıcı sinyal yolunu inhibe edebilir (Sui vd., 2014; Wu vd., 2013). Ek olarak miR-125b, NF-κB sinyal yolunu aktive etmek için A20'yi hedefleyebilir ve STAT3 ile Wnt sinyal yolunu

aktive etmek için FZD6'yı hedefleyebilir (Huang vd., 2016; Kim vd., 2012; Liu vd., 2016; Z. Zheng vd., 2017). Tümör baskılayıcılar olarak miR-125b, PI3K/Akt, TGF β ve ERBB2/Her2 sinyalizasyonunu teşvik edebilir (Ferracin vd., 2013; Funa vd., 2015; Liu vd., 2019; Tripathi vd., 2013).

1.6.17. Prostat kanserinde miR-375 önemi

PKa, prostat epitelinde malign tümör lezyonlarının varlığından kaynaklanır (Chang, vd., 2014). Esas olarak 70-80 yaş arası erkeklerde ortaya çıktığı bilinmektedir (Liu, vd., 2019). Simin ve ark. TCGA veri tabanını analiz etmiş ve insan kanserli olmayan bitişik dokularla karşılaştırıldığında, PKa dokularında miR-375 ekspresyonunun önemli ölçüde arttığını doğrulamıştır (He vd., 2019). Ek olarak, biyoenformatik analiz, miR-375'in hedef genlerinin, PKa hücre göçünü ve EMT'yi inhibe etmek için esas olarak gen transkripsiyonu ve ubikuitin aracılı proteolizde rol oynadığını göstermiştir (He vd., 2019). Xiaoyi ve arkadaşları, 100 PKa hastasının kan örneklerini analiz etmiş ve sağkalım oranları ile PKa için prognostik biyobelirteç olarak işlev görebilecek miR-375 ekspresyonu arasında anlamlı bir ilişki olduğunu bulmuşlardır (Selth vd., 2017). Ek olarak, in vivo ksenograft fare modeli miR-375 ile transfekte edilen grubun docetaxel tedavisinin etkisinin azaldığını göstermiştir; bu da muhtemelen miR-375 ve hedef genlerin ilaç direnci gelişimindeki rolünden kaynaklanmaktadır (Huang vd., 2015). Semptomatik tedavi elde etmek için kandaki miR-375 seviyelerini analiz ederek PKa ve BPH olan hastaları ayırt etmek de mümkündür (Wach vd., 2015). Öte yandan, DNA metilasyonunun gen ifadesini engellemede önemli bir rol oynadığı bilinmektedir ve AR'nin ve toplam DNA metiltransferazların (DNMT'ler) ifadesi miR-375 promotörünün metilasyonunu değiştirerek miR-375'in ifadesini düzenleyebilir (Wang vd., 2016).

1.6.18. Klinik tedavide miR-375

MiRNA, endojen genler tarafından kodlanan kodlamayan tek sarmallı bir RNA türüdür. Bir miRNA, minimum yan etki ve daha iyi klinik tedavi etkileri ile birden fazla hedef geni ve yolu düzenleyebilir. MiR-375 çoğu kanserde bir tümör baskılayıcı olarak görev yapar. MiRNA mimikleri veya inhibitörleri aracılığıyla miR-375 ekspresyonunun in vivo veya in vitro düzenlenmesi yeni bir tedavi türü olarak araştırılmaktadır (Fan vd., 2017). Örneğin, insan nazofarenks karsinomu hücrelerinin miR-375 mimik ile transfeksiyonu, migrasyon ve invazyon yeteneklerinde önemli bir azalma ile sonuçlanmıştır (Jia-Yuan vd., 2020). Lentivirüs enfeksiyonu ile oluşturulan miR-375 aşırı eksprese eden insan meme kanseri hücrelerinin sadece kanser kök hücrelerini azaltmakla kalmayıp aynı zamanda insan meme kanseri hücrelerinin adriamisine direncini de azalttığı bulunmuştur (Zhao vd., 2020). Başka bir

çalışmada, miR-375 öncüllerinin insan kolorektal kanser hücrelerine stabil transfeksiyonunun, çıplak farelerde kolorektal kanser hücrelerinin ilaç direncini tersine çevirerek tümör oluşumunu inhibe edebileceği bulunmuştur (Xu vd., 2019). Bu gözlemler, miR 375 analoglarının kanserin klinik tedavisinde kullanımı için teorik bir temel sağlamaktadır. Bununla birlikte, miR-375'i hedef hücrelere verimli, güvenli ve sürdürülebilir bir şekilde iletme yöntemlerini belirlemek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Bu nedenle, lipozomları, eksozomları, polimerleri, dendrimerleri, mezogözenekli silika nanopartikülleri ve metal bazlı nanopartikülleri hedefleme verimliliğini artırmak için çeşitli etkili dağıtım sistemleri tasarladık (Boca vd., 2020). Daha fazla intratümöral birikim, gelişmiş endozomal kaçış yeteneği, daha fazla terapötik etki ve azaltılmış sistemik toksisite nedeniyle, bu nanopartikül aracılı miRNA iletimi evrensel ve değerli bir taşıyıcı haline gelmiştir (Boca vd., 2020). Polimer taşıyıcı yavaş salınım, düşük toksisite ve bozunması zor bir yapı sunmaktadır (Yan, vd., 2016). Vücudun dolaşım sistemine girdikten sonra, ilacı hedefe iletmek üzere hazırladığı gösterilmiştir (Immordino, Dosio, & Cattel, 2006). Xue ve arkadaşları, P-glikoprotein (P-gp) aşırı ekspresyonunun insan karaciğer kanserinde ilaç direncine neden olduğunu ve miR-375'in P-gp ekspresyonunu inhibe ettiğini bulmuştur (Xue vd., 2017). Bu nedenle, doksorubisin hidroklorür (DOX) ve miR-375 (LHD/miR-375) içeren lipid kaplı içi boş mezogözenekli silika nanopartiküller (LH) kullanılarak karaciğer kanseri hücrelerine ve dokularına verilmiş, in vivo ve in vitro çalışmalar LHD/miR-375'in önemli toksisite üretmeden tümörlerin büyümesini etkili bir şekilde engellediğini ortaya koymuştur (Xue vd., 2017). Ayrıca, lipid kapsüllü kalsiyum karbonat nanopartiküllerine (LCC-DOX/miR-375 NPs) birlikte yüklenen miR-375 ve DOX, ksenograft farelerde ortak anti-tümör yeteneği göstermiş ve insan LCC'sinin direncini azaltmıştır (Zhao vd., 2017). Bununla birlikte, nanopartikül taşıyıcılarının da belirli bir kısıtlayıcı etkiye sahip olduğu bulunmuştur; ayrıca immünojenisite ve toksisiteye de yol açabilirler. Bu nedenle, gelecekte daha iyi klinik uygulama için miRNA iletim vektörünün sürekli olarak optimize edilmesine acil ihtiyaç vardır (Xin vd., 2017).

1.6.19. Potansiyel bir teşhis veya prognostik biyobelirteç olarak miR-375

MiR-375 çeşitli kanserlerde anormal şekilde eksprese edildiğinden, hücrede miRNA ekspresyonunu tespit ederek karsinogenezi tahmin etmek mümkündür. MiR-375'in kanserdeki rolü üzerine yapılan önceki çalışmalara göre, miR-375'in teşhis veya prognostik amaçlarla bir araç olarak kullanılmasına yönelik bir girişimde bulunulmuştur. Örneğin, insan karaciğer kanserinde miR-375'in azaltılmış ekspresyonunun, lenf nodu metastazı ve TNM evrelemesi ile ilişkili olduğu ve karaciğer kanseri tanısı için bir referans biyobelirteç görevi görebileceği

bulunmuştur (Xie, vd., 2017). Ek olarak miR-375, Çin'de görülme sıklığının yüksek olduğu bölgelerde özofagus kanseri olan hastaların prognostik hayatta kalma süresini tahmin etmek için bir biyobelirteç olarak kullanılabilir ve hastaların hayatta kalma oranıyla doğru orantılı olduğu bulunmuştur (He vd., 2017). MiR-375 seviyesi aynı zamanda kanserin evresiyle de ilişkilidir. Çalışma, insan gliomalarında miR-375 ekspresyonunun azaldığını ve patolojik derecenin kötüleştiğini buldu; bu nedenle insan gliomalarının kötü prognostik belirteci olarak kullanılabilir (Chang vd., 2012). Diğer kanserlerde miR-375 ayrıca kemorezistans yanıtı için potansiyel bir biyobelirteç görevi görmüştür. Örneğin miR-375'in ekspresyonu, insan küçük hücreli akciğer kanseri (SCLC) kemorezistans hücrelerinde önemli ölçüde artmış ve etkili kemoterapiden sonra azalmıştır. Kemoterapi sırasında SCLC hastalarının direncindeki değişiklikleri izlemek için kullanılabilir (Li vd., 2020). Çalışma, insan metastatik CRPC hücrelerinde miR-375'in artan ekspresyonunun Docetaxel'in kemoterapötik etkisinde bir azalmaya yol açtığını ve miR-375'in mCRPC aşamasında kemoterapi direncinin potansiyel bir biyobelirteci olarak rolünü vurguladığını bulmuştur (Wang, vd., 2016).

Kan glukoz metabolizmasındaki bozulmanın hücre solunumunda bozulmaya ve anaerobik glikolizde artışa yol açarak normal hücrelerin kanserleşmesine neden olduğu bilinmektedir. Ayrıca miR-375, pankreatik adacık gelişiminde önemli bir miRNA'dır. İnsülin salgılanmasını etkileyerek glikoz homeostazına katılabilir. Örneğin, MIN6 hücrelerinde miR-375'in aşırı ekspresyonu, glikoz kaynaklı insülin sekresyonunu inhibe edebilir. Bu nedenle miR-375 diyabet tedavisi için potansiyel bir biyobelirteç olabilir (Lu vd., 2021). Kanser hücrelerinde, glikoz tercihen aerobik glikoliz yoluyla metabolize edilerek glikoliz ve laktik asit üretimini artırır. Çalışmalar, miR-375'in insan baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomu (HNSCC) kanser hücrelerinde sıklıkla bir tümör baskılayıcı olarak davrandığını göstermiştir, bunun nedeni muhtemelen miR-375'in aşırı ekspresyonunun insülin sekresyonunu teşvik etmesi ve HNSCC hastalarında kan glukoz metabolizmasını iyileştirmesidir; bu nedenle, HNSCC hastaları için prognostik bir sağkalım belirteci olarak kullanılabilir (Avilés-Jurado vd., 2021).

MiR 375'in potansiyel bir tanısal veya prognostik biyobelirteç olarak kullanılmasına ilişkin birçok çalışma olmasına rağmen, klinik örnek verileri miR-375'in klinik bir biyobelirteç olarak kullanılması sürecini hala hızlandırmaktadır.

1.6.20. Kanser metastazında miR-375'in mekanizması

Kanser tedavisindeki en büyük zorluklardan biri kanser hücresi metastazı ve istilası sorununu çözmektir (Hanniford vd., 2020). EMT, epitelyal hücre tipinden mezenkimal hücre tipine geçişi ifade eder (Mak vd., 2016). EMT'nin tümör kökü, metastaz ve tedaviye direnç ile

ilişkili olduğu, tümör invazyonu ve uzak yayılım için önemli bir faktör olduğu ve dolayısıyla kanser gelişiminde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (Pastushenko vd., 2018). EMT'nin düzenlenmesi, TGF- β ailesini, Wnt sinyali, Notch, Smad, HGF, FGF ve HIF'yi ve diğer sinyal yollarını içeren karmaşık bir ağdır (Pastushenko vd., 2021). Son çalışmalar, miR-375 inhibitör tedavisinin insan gastrik kanser hücrelerinin EMT'sini destekleyebildiğini ve bunun da karsinogenezi etkilediğini göstermiştir (Guo vd., 2019). E-cadherinin, büyüme ve gelişme sırasında hücrelerin seçici toplanmasında hayati bir rol oynadığı bilinmektedir (Qin vd., 2019). E-cadherin aracılı hücre yapışması ve hücre bağlantılarının kaybı, hücrelerin birincil tümörden ayrılmasına ve uzak bölgelere göç etmesine neden olabilir (Petrova, Schecterson, & Gumbiner, 2016). Çalışmalar, miR-375'in, insan rahim ağzı kanseri hücrelerinin (SiHa, CaSki) EMT'sini arttırmak için E-cadherin 3'-UTR'ye bağlanabildiğini göstermiştir (Shen vd., 2014). miR-375 veya E-cadherin ekspresyonunun tersine çevrilmesi, insan rahim ağzı kanserinde paklitaksel kaynaklı ilaç direncinin üstesinden gelme potansiyeline sahiptir (Shen vd., 2014). Ayrıca miR-375, transkripsiyon faktörü YAP1 ile etkileşime girerek çeşitli PKA hücre hatlarının invazyonunu ve migrasyonunu inhibe etme potansiyeline de sahiptir, ancak ZEB1 de miR-375'in transkripsiyonunu inhibe edebilir (Selth vd., 2017). Ayrıca Sp1 transkripsiyon faktörü (SP1), tümör oluşumu için önemli olan, her yerde bulunan bir nükleer transkripsiyon faktörüdür (Kolesnikoff vd., 2014). SP1'in miR-375'in downstream hedefi olduğu bilinmektedir, bu nedenle miR-375, MMP2, vimentin, snail, β -katenin, N-kaderin gibi EMT ile ilişkili genleri inhibe etmek için SP1'i hedefler, böylece insan kolorektal kanser hücrelerinin (DLD1, HCT8) göçünü ve istilasını inhibe eder (Cui vd., 2016). HOXB13 yüksek düzeyde korunmuş bir transkripsiyon faktörüdür; HOXB13'ün anormal ekspresyonu karsinogenez ile ilişkilidir (Zhu vd., 2020). HOXB13'ün aşırı ekspresyonunun, kanser kök hücre fenotipinin oluşumuna ve MCF-7 hücrelerinin EMT'sinin artmasına yol açtığı gösterilmiştir (Fu vd., 2017). Dual lusiferaz deney sonuçları miR-375'in HOXB13 ekspresyonunu inhibe edebildiğini ve insan meme kanseri hücrelerinin göçünü ve istilasını ve tamoksifen direncini inhibe edebildiğini doğrulamıştır (Fu vd., 2017). Son çalışmalar, ASH1, insan LC hücrelerinde miR-375'in yukarı yöndeki düzenleyicisi olduğunu göstermiştir (Nishikawa vd., 2011). MiR-375'in downstream geni olan YWHAZ'ın azalmış ifadesinin, hastaların iyileşme oranı ve EMT'deki azalma ile önemli bir ilişki olduğu gösterilmiştir, ASH1-miR-375-YWHAZ, insan LC hücrelerini etkileyen bir sinyal eksenini hareket eder (Zhao vd., 2018). De ve arkadaşları, düşük E-cadherin ekspresyonuna sahip insan yumurtalık kanseri hücrelerinin daha güçlü bir göç ve invazyon yeteneğine sahip olduğunu göstermiştir (Rea vd., 2018). EMT faktörü SNAI1'in E-cadherin transkripsiyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Zhang vd., 2011). İn vitro ve in vivo

deneylerin sonuçları, miR-375'in tümör mikroçevresinde yer alması nedeniyle, miR-375'in SNAIL1 ekspresyonunu hedefleyerek SKOV3 hücrelerinin EMT'sini zayıflattığını göstermiştir (De vd., 2016). İnsan papiller tiroid karsinomu (PTC) dokuları ve hücre dizilerinin miR-375'in azalmış ekspresyonunu sergilediği rapor edilmiştir (Wang, vd., 2016). MiR-375 ekspresyonunun inhibe edilmesinin, insan PTC hücre dizilerinin ve EMT'nin çoğalmasını ve istilasını teşvik ettiği gösterilmiştir (Chen, vd., 2020). MiR-375'in aşırı ekspresyonundan sonra, sonuçların çelişkili olduğu bulunmuştur, ancak spesifik mekanizmanın daha fazla aydınlatılması gerekmektedir (Chen vd., 2020). Ayrıca, uzun kodlamayan RNA ROR1-AS1'in (ROR1 AS1) miR-375 aracılığıyla insan akciğer adenokarsinom (LAC) hücrelerinde EMT'yi zayıflattığı gösterilmiştir ve bu da LAC tedavisi için yeni bir fikir olabilir (Xu, vd., 2019).

Ek olarak miR-375, EMT sürecini yalnızca bazı genler aracılığıyla değil aynı zamanda bazı sinyal yolları aracılığıyla da düzenler (Gan vd., 2017). Örneğin, miR-375'in, YWHAZ'ı (14-3-3ζ) hedefleyerek insan gastrik kanser hücrelerinin göçünü, istilasını ve EMT'sini inhibe ettiği ve Wnt/β-katenin sinyal yolunun aktivasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Guo vd., 2019). Önceki çalışmalar, protein kinaz B (AKT) sinyal yolunun, çeşitli insan tümör hücrelerinde EMT sürecinin upstream yolu olarak görev yaptığını göstermiştir (Jiang, vd., 2019). İnsan LSCC hücrelerinde miR-375'in, hücre göçünü ve istilasını engellemek için AKT sinyal yolu yoluyla E-kadherin, vimentin ve Snail2'nin protein ekspresyonunu düzenlediği, IGF1R'nin ise AKT sinyal yolunun negatif düzenleyicisi olarak görev yaptığı gösterilmiştir (Wang, vd., 2016). Çalışmalar ayrıca miR-375'in Kısa SHOX2'nin protein ekspresyonunu azaltabileceğini ve insan meme kanseri hücrelerinin proliferasyonunu inhibe edebileceğini göstermiştir, birçok meme kanseri hücre hattı SHOX2'nin EMT'nin bir indükleyicisi olarak hareket ettiğini ve ayrıca TGF-β sinyal yolu yoluyla EMT'yi etkileyen bir TGF-β reseptörü I (TβR-1) transkripsiyon faktörü olarak hareket ettiğini göstermiştir (Hong vd., 2014). Ek olarak, miR-375'in oldukça agresif insan Merkel hücreli karsinom hücrelerinde önemli ölçüde azaldığı bilinmektedir ve miR-375'in susturulmasının, Notch yolu ile ilişkili proteinlerin (Notch2 ve RBPJ) ekspresyonunu inhibe ettiği ve EMT'yi teşvik ettiği gösterilmiştir (Kumar vd., 2018). Ancak bazı çalışmaların sonuçları, insan Merkel hücreli karsinom hücre hatlarında miR-375'in neredeyse tamamen yok edilmesinin hücre gelişimi üzerinde hiçbir etkisi olmadığını göstermiştir (Abraham vd., 2016). Ayrıca, onkojenik sinyal yolları (Hippo ve EMT) üzerinde belirgin etkilere neden olmamıştır, bu da miR-375'in Merkel hücreli karsinom hücrelerinde bir tümör baskılayıcı gen olarak hareket etme olasılığının düşük olduğu anlamına gelmektedir

(Fan, vd., 2020). Bunun nedeni muhtemelen kanser hücrelerinde süngerimsi miR-375'in başka uzun kodlamayan RNA'larının bulunmasıydı.

Bütün bu sonuçlar miR-375 ve miR-125b'nin PKa'yı sağlıklı kontrollerden ayırmak için potansiyel tanı değerine sahip olduğunu ve miRNA tabanlı tedavi için kullanılabilir olduğunu göstermiş olsa da sonuçlar yetersiz kalmakta ve daha fazla araştırma gerekmektedir. Bahsedilen noktalardan yola çıkarak, çalışmada miR-375 ve miR-125b-5p'nin biyoinformatik analizlerle muhtemel hedefleri tespit edilmesi ve belirlenen genlerin hedefi olup olmadığının deneysel çalışmalarla doğrulanması ve muhtemel hedeflerinin yer aldığı sinyal yoluna etkilerinin incelenmesi hedeflenmiştir. Bu sayede hem PKa'nın oluşum mekanizmaları ve gelişimi ile ilgili bilinmeyen kısımlar aydınlatılmış olacak hem de miR-375 ve miR-125b-5p'nin PKa üzerindeki etki mekanizması ile ilgili kısımlar netlik kazanmış olacaktır. Sonuçlar miRNA'ların PKa tanısının koyulması, metastaz mekanizmasının anlaşılması, hastalığın prognozunun takibi veya yeni tedavi seçeneklerinin geliştirilmesi gibi aşamalarda kullanılabilmesine yönelik çalışmalara alt yapı oluşturacaktır.

İKİNCİ BÖLÜM

GEREÇ VE YÖNTEM

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1.Kullanılan Cihazlar

-20 °C soğutmalı buzdolabı (Uğur)

+4 °C soğutmalı buzdolabı (Regal, Arçelik)

-80 °C soğutmalı buzdolabı (Panasonic)

Steril Kabin (Scanlaf-Mars Safety Classe 2)

CO₂ İnkübatör (Memmert- INCOmed 153)

Etüv (Jeio Tech-IB-01E)

Real-Time PCR Cihazı (Agilent - AriaMx)

Otoklav Cihazı (HMC Hiclave HG-80)

Su banyosu (Jeio tech- BS 11)

Santrifüj (Nüve-NF 800)

Soğutmalı Santrifüj (Thermo Scientific- MicroCL 21R)

pH metre (İnolab-PH 7110)

Hassas Terazı (Ohaus-Pioneer)

Manyetik karıştırıcı (Mtops MS300Hs)

Rotator (Biosan Multi Bio RS-24)

PCR Cihazı (Applied Biosystems – 2720 Thermal Cycler)

Spin Cihazı (DZG SCIENCE -MC6000)

Transfer Cihazı (Hofer - TE70X)

Dikey elektroforez sistemi (Cleaver Scientific Mini Vertical systems)

Güç Kaynağı (Wealtec- Elite 3000 Plus)

Kemilüminesans Görüntüleme Cihazı (Syngene G:Box Chemi XRQ)

İnverted Mikroskop (Nikon-Eclipse TS100)

Mikroskop Kamerası (ToupCam- XCAM)
Buz Makinası (Model-2446)
Nanodrop Cihazı (Shimadzu- BioSpec-nano)
Mikroplaka Okuyucu (Thermo Scientific-Multiscan Go)
Sonikatör (Bandelin HD2200)
Distile su cihazı (MES)
Vorteks (Jeio tech- Lab companion)

2.2.Kullanılan Sarf Malzemeler

Pipet Seti (Nichiryo – Nichipet EXII)
Pipet uçları -1000, 200 ve 10 µl (Biosigma)
Toplama Tüpü- 1,5 ve 2 ml (Biosigma)
Falkon tüp – 15 ve 50 ml (Fıratmed)
T25 kültür flaskı (Sarstedt)
T75 kültür flaskı (Sarstedt)
Cryo vial -1,8 ml (Greiner)
96 kuyucuklu plate (Greiner)
6 kuyucuklu plate (Greiner)
Filtre -0,22 µm (İsolab)
Cam şişe - 500 ve 1000 ml (İsolab)
Erlen (İsotherm)
Beher (İsotherm)
Mezür - 100, 250 ve 1000 ml (İsotherm)
8’li PCR tüpü (Biologix)
PCR Tüpü (Biologix)
Enjektör – 5 ve 10 ml (Ayset)
Thoma lamı (Marienfeld Superior)

PVDF Membran (Merck Millipore)

2.3.Kullanılan Kimyasallar

RPMI 1640 Besiyeri (Sartorius)

DMEM-F12 Besiyeri (PAN Biotech)

DMEM High Glucose (Capricorn Scientific)

K-SFM Kit (Gibco)

Trypsin (Capricorn Scientific)

Penisilin/Streptomisin (Biological Industries)

Fetal Bovine Serum (Capricorn Scientific)

NaCl (Sodyum Klorür)

Bovine Serum Albumin (BSA) (Carlo Elba)

Na₂HPO₄ (Merck Millipore)

KH₂PO₄ (Merck Millipore)

KCl (Potasyum Klorür)

HCl (Merck Millipore)

SDS (Sodyum dodesil sülfat) (Sigma)

APS (Amonyum Persülfat) (Thermo Scientific)

Tris-HCl (AppliChem)

Tris base (Sigma)

Methanol (İsolab)

NaOH (Mediko Kimya)

Glycine (Fisher Bioreagents)

TEMED (Biofroxx)

Tween 20 (Merck)

Bradford Reagent (Eco-tech Biotechnology)

2x Laemmli (Yüklem) Tamponu (Sigma)

Protein Ladder (Thermo Scientific)

10X RIPA buffer (Cell Signaling Technology)

ECL (Thermo Scientific)

PMSF (Cell Signaling Technology)

RNA İzolasyon kiti (A.B.T Laboratory Industries)

miRNA İzolasyon kiti (A.B.T Laboratory Industries)

cDNA dönüşüm kiti (A.B.T Laboratory Industries)

Sybr Green Master Mix (A.B.T Laboratory Industries)

Akrilamid:Bisakrilamid (Serva)

miR-375 stem loop primer (Oligomer)

miR-125b-5p stem loop primer (Oligomer)

miR-125b-5p forward primer (Oligomer)

miR-375 Forward primer (Oligomer)

U6 forward ve Reverse Primer (Oligomer)

Universal Reverse primer (Oligomer)

Random hexamer (A.B.T Laboratory Industries)

TSC1 forward ve reverse primer (Oligomer)

CYTH1 forward ve reverse primer (Oligomer)

ARF1 forward ve reverse primer (Oligomer)

PLD1 forward ve reverse primer (Oligomer)

PLD2 forward ve reverse primer (Oligomer)

GAPDH forward ve reverse primer (Oligomer)

RHEB forward ve reverse primer (Oligomer)

MTOR forward ve reverse primer (Oligomer)

PIK3CA forward ve reverse primer (Oligomer)

PIK3CG forward ve reverse primer (Oligomer)

Transfeksiyon Reagent (ABP Biosciences)
miR-375 precursor miRNA (Ambion)
miR-125b-5p precursor miRNA (Ambion)
miRNA mimic negatif kontrol (Ambion)
miR-375 inhibitor (Ambion)
miR-125b-5p inhibitör (Ambion)
miRNA inhibitör negatif kontrol (Ambion)
Opti-Mem Serum-free besiyeri (Gibco)
Dimetilsülfoksit (DMSO) (Fisher Bioreagents)
Kristal Viyole (Mediko Kimya)
TSC1 Primer Antikor (ABclonal)
CYTH1 Primer Antikor (ABclonal)
B-aktin Primer Antikor (Cell Signaling Technology)
PLD2 Primer Antikor (ABclonal)
Anti-Rabbit Sekonder Antikor (Cell Signaling Technology)
Anti-Mouse Sekonder Antikor (Cell Signaling Technology)

2.4.Kullanılan Solüsyonlar

1X Fosfat Buffer Saline (PBS) Solüsyonu Hazırlama – 1 L

8 gr NaCl, 0.2 gr KCl, 1.44 gr Na₂HPO₄ ve 0.24 gr KH₂PO₄ tartılmış ve 800 ml dH₂O içerisinde çözünmesi sağlanmıştır. Ardından pH: 7.4 olacak şekilde ayarlanmıştır. Su miktarı 1 L'ye tamamlanmış ve steril etmek için otoklavlanmıştır. Kullanılmak üzere +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

1X Tripsin Hazırlama – 10 ml

1 ml 10X tripsin solüsyonuna 9 ml 1X PBS solüsyonu eklenerek hazırlanmıştır. Hazırlanan solüsyon kullanılmak üzere +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

Fetal Bovine Serum (FBS) İnaktivasyonu

Halihazırda elimizde bulunan FBS solüsyonu kullanımdan önce inaktive edilmiştir. İşlem için su banyosu kullanılmıştır. Önceden 56 °C'ye gelmesi sağlanan su banyosu içerisinde FBS solüsyonu 30 dakika boyunca inkübe edilerek inaktivasyonu sağlanmıştır. Ardından falkon tüplere bölünerek -20 °C'ye kaldırılmıştır.

1X RIPA Buffer

1X RIPA buffer hazırlamak için öncelikle 10X RIPA buffer seyreltilir. 100 µl 10X RIPA buffer üzerine 900 µl ddH₂O eklenir. Kullanımdan hemen önce ise 1 mM olacak şekilde PMSF eklenir.

10X Yürütme Tamponu – 1 L

30 gr Tris, 144 gr glisin ve 10 g SDS 800 ml dH₂O içerisinde çözündürülmüştür. Tamponun pH değeri 8,3'e ayarlanmıştır. Ayarlama işleminden sonra dH₂O ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır. Kullanılmak üzere +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

1X Yürütme Tamponu – 1 L

Hazırlanan 10X yürütme tamponundan seyreltme yapılarak hazırlanmıştır. 1 L'lik 1X yürütme tamponu için 100 ml 10X yürütme tamponu üzerine 900 ml dH₂O eklenmiştir.

10X Transfer Tamponu – 1 L

30.2 gr Tris ve 144 gr Glisin 800 ml dH₂O içerisinde çözündürülmüştür. Çözdürme işleminden sonra dH₂O ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

1X Transfer Tamponu – 1 L

Hazırlanan 10X transfer tamponundan seyreltme yapılarak hazırlanmıştır. 1 L'lik transfer tamponu için 100 ml 10X transfer tamponu üzerine 200 ml Methanol (MetOH) ve 700 ml dH₂O eklenmiştir.

%10 Amonyum persülfat (APS) – 1 ml

Solüsyonu hazırlamak için 100 mg APS tartılmış ve 1 ml dH₂O içerisinde çözündürülmüştür.

%10 Sodyum dodesil sülfat (SDS) – 10 ml

Solüsyonu hazırlamak için 1 gr SDS tartılmış ve 10 ml dH₂O içerisinde çözündürülmüştür.

0,5 M Tris-HCl (pH: 6.8) – 100 ml

6.05 gr Tris 70 ml distile su içerisinde çözündürülmüştür. pH değeri 6.8' ayarlanmış ve total hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan solüsyon kullanılmak üzere +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

1,5 M Tris-HCl (pH: 8.8) – 100 ml

18.17 gr Tris 70 ml distile su içerisinde çözündürülmüştür. pH değeri 8.8' ayarlanmış ve total hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan solüsyon kullanılmak üzere +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

10X TBS – 1 L

10X TBS solüsyonunu hazırlamak için 24 gr Tris-HCl, 5,6 g Tris ve 88 gr NaCl tartılmış ve 900 ml dH₂O içerisinde çözündürülmüştür. pH 7.6 olacak şekilde ayarlandıktan sonra hacmi 1 L'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan solüsyon kullanılmak üzere +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

1X TBS-T – 1 L

Hazırlanan 10X TBS solüsyonu seyreltilerek hazırlanmıştır. 100 ml 10X TBS solüsyonu üzerine 900 ml dH₂O ve 1 ml Tween 20 eklenmiştir.

%5 Süt Tozu – 50 ml

2.5 gr yağsız süt tozu 50 ml 1X TBS-T içerisinde çözündürülerek hazırlanır. Taze hazırlanması tercih edilir.

Primer Antikor

Hazırlanan primer antikor oranları 1:500 olacak şekilde ayarlanmıştır. 5 ml primer antikor solüsyonu için 4990 ml %5 süt tozu içerisine 10 µl primer antikor eklenmiştir.

Sekonder Antikor

Hazırlanan primer antikor oranları 1:5000 olacak şekilde ayarlanmıştır. 5 ml primer antikor solüsyonu için 4999 ml %5 süt tozu içerisine 1 µl primer antikor eklenmiştir.

%0,5 Kristal Viyole Solüsyonu – 50 ml

Solüsyonu hazırlamak için 0,125 gr kristal viyole tartılmış ve 50 ml dH₂O içerisinde çözündürülmüştür.

2.5.Yöntem

2.5.1. Biyoinformatik analizler

Çalışma tasarımı planlanırken PKa'daki ekspresyon düzeyleri bilinen miRNA'lar ile bir çalışma planlanmıştır. Dülgeroğlu'nun 2019 yılında yaptığı tez çalışmasında 12 adet miRNA (miR-375, miR-93-5p, miR-125b-5p, miR-30c-5p, miR-26b-5p, miR-181a2-3p, miR-221-3p, miR-222-3p, miR-141-3p, miR-331-3p, miR-223-3p, let-7c-3p) ekspresyon düzeyleri incelenmiş ve 6 miRNA'nın (miR-375, -125b-5p, -30c-5p, -26b-5p, 223-3p ve let-7c-5p) ekspresyon düzeyleri downregüle bulunmuştur (Dülgeroğlu & Eroğlu, 2019). Yapılan literatür çalışmaları neticesinde 4 miRNA'nın (miR-30c-5p, -26b-5p, 125b-5p, let7c-5p) PKa ile çalışmaları bulunmasına rağmen hedef genleri ile ilgili herhangi bir çalışma olmadığı belirlenmiştir. Diğer iki miRNA (miR-375 ve -125b-5p) ile yapılan çalışmalar ise kısıtlıdır. Doktora tez çalışması kapsamında yapılan ön biyoinformatik analizler neticesinde miR-375 ve miR-125b-5p ile çalışılmaya karar verilmiştir. Biyoinformatik araçlar yardımıyla hedef genleri ile ilgili oldukları sinyal yolları araştırılmıştır.

Öncelikle 4 farklı miRNA hedef tahmin aracı (TargetScan, miRDB, rna22 ve miRWlak) kullanılarak miR-375 ve miR-125b-5p'nin hedef tahminleri gerçekleştirilmiştir. Her bir hedefi çalışmak çok fazla maliyet gerektirmektedir. Aynı zamanda deneysel çalışmalardaki doğruluğu artırabilmek ve gen sayılarını aza indirebilmek adına 4 farklı programda ortak çıkan gen listeleri elde edilmiştir. Öncelikle listedeki daha önceki çalışmalarda hedefi olduğu belirlenen genler doğrulanmış miRNA hedeflerinin yer aldığı miRTarBase veritabanı ile değerlendirilmiş ve elenmiştir. Son aşamada ise genlerin ilgili oldukları sinyal yolları ve biyolojik özellikleri incelenmiştir. Son aşamada ise bu veriler ışığında deneysel olarak çalışılması planlanan genlere karar verilmiş ve deney dizaynı yapılmıştır.

2.5.1.1. MiRNA hedef genlerinin belirlenmesi

MiRNA hedef tahmini için çok sayıda araç bulunmaktadır ve her gün yenileri eklenmektedir. Kullanılan araçlar belirlenirken literatürde en çok tercih edilen tahmin araçları tercih edilmiştir. Kullanılan araçların özellikleri aşağıda açıklanmıştır. Özellikleri açıklanan miRNA hedef tahmin araçları kullanılarak miR-375 ve miR-125b-5p'nin hedef tahminleri gerçekleştirilmiştir. Her program analizinden elde edilen gen listeleri <https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/> web sitesine yüklenmiş ve 4 programda ortak olarak bulunan gen listesi çıkarılmıştır.

TargetScan Human Release 8.0 (https://www.targetscan.org/vert_80/), her miRNA'nın tohum bölgesiyle eşleşen korunmuş 8mer, 7mer ve 6mer bölgelerin varlığını arayarak miRNA'ların biyolojik hedeflerini tahmin eden bir araçtır (Lewis, Burge, & Bartel, 2005). Analiz esnasında yalnızca korunmuş bölgeleri dahil etmeyi seçmek mümkündür. Ayrıca tohum eşleştirme kararlılığı, 3' kompensatuar eşleştirme ve hedef bölge çokluğu gibi diğer özellikler de değerlendirilebilmektedir. Varsayılan hedefler daha sonra, bölgelerin tüm özellikleri dikkate alınarak kümülatif puanlar kullanılarak hesaplanan tahmini hedefleme etkinliğine göre sıralanmaktadır. Ayrıca, TargetScan tahmin edilen komplekslerin serbest enerjisini değerlendirmek için ikincil yapıyı da tahmin etmektedir (Agarwal, Bell, Nam, & Bartel, 2015).

RNA22 (Miranda vd., 2006) diğer algoritmalarından birkaç yönden farklıdır: deneysel olarak doğrulanmış heterodublekslerle değil, bilinen miRNA'larla çalıştırılır; bir heterodubleksin tohum bölgesinde G:U yalpalamaları ve çıkıntılarının kombinasyonlarına izin verir; ve bir hedefin genomlar arasında korunmasına dayanmaz ve gerektirmez. RNA22, kanonik olmayan hedeflerin yanı sıra 3' UTR ötesindeki hedefleri de başarıyla tahmin etmiştir (Duursma, Kedde, Schrier, Le Sage, & Agami, 2008; Lal vd., 2008, 2009; Tay, Zhang, Thomson, Lim, & Rigoutsos, 2008).

miRDB (<https://mirdb.org/>), miRNA hedef tahmini ve işlevsel ek açıklamalar için kullanılan çevrimiçi bir veritabanıdır. miRDB'deki tüm hedefler, yüksek verimli dizileme deneylerinden elde edilen binlerce miRNA-hedef etkileşimini analiz ederek geliştirilen bir biyoinformatik aracı olan MirTarget tarafından tahmin edilmiştir. MiRNA bağlanması ve hedefin downregülasyonu ile ilişkili ortak özellikler tanımlanmış ve makine öğrenim yöntemleri ile miRNA hedeflerini tahmin etmek için kullanılmıştır (Yuhao Chen & Wang, 2020).

miRWalk (<http://mirwalk.uni-hd.de/>), tahmin edilen ve deneysel olarak doğrulanmış miRNA-hedef etkileşim çiftlerini barındıran, açık erişimli kapsamlı bir kaynaktır. Bu veri tabanı, üç genomun (insan, fare ve sıçan) bilinen tüm genlerinin tam dizisi içinde olası miRNA bağlanma bölgesi tahminlerini elde etmeyi sağlamaktadır. Ayrıca, on farklı tahmin veri setinden elde edilen miRNA bağlanma bölgelerinin karşılaştırmalı bir platformu, miRNA-gen yolağının genetik ağlarına ve miRNA-gen-İnsanda Çevrimiçi Mendel Kalıtım bozukluğu etkileşimlerine bütünsel bir bakış ve deneysel olarak doğrulanmış benzersiz bilgiler (örn. hücre hatları, hastalıklar, miRNA işleme proteinleri) gibi birçok yeni özelliği de entegre etmektedir (Dweep, Gretz, & Sticht, 2014).

2.5.1.2. Doğrulanmış miRNA hedeflerinin belirlenmesi

Literatürde daha önce deneysel çalışmalarla miRNA hedefi olduğu doğrulanan genlerin analiz edilebilmesi için PICTAR2, miRTarBase gibi veritabanları bulunmaktadır. Bununla birlikte hem öngörülen hem de doğrulanmış miRNA hedef analizlerine aynı anda ulaşabileceğimiz miRNet gibi veritabanları da yer almaktadır. Çalışmam kapsamında doğrulanmış miRNA hedeflerine ulaşmak amacıyla miRTarBase veritabanından yararlanılmıştır.

Bir veri tabanı olarak miRTarBase (https://mirtarbase.cuhk.edu.cn/~miRTarBase/miRTarBase_2022/php/index.php), miRNA'ların işlevsel çalışmalarıyla ilgili araştırma makalelerini filtrelemek için metnin sistematik olarak ilgili literatürün manuel olarak incelenmesiyle toplanan 360 binden fazla miRNA-hedef etkileşimi içermektedir. Genel olarak, toplanan MTI'lar deneysel olarak reporter assay, western blot, microarray ve yeni nesil dizileme deneyleri ile doğrulanmıştır. miRTarBase, en büyük miktarda doğrulanmış MTI'yı içerirken, daha önce geliştirilmiş diğer benzer veritabanlarıyla karşılaştırarak en güncel koleksiyonu da sağlamaktadır.

2.5.1.3. Genlerin ilgili oldukları sinyal yolları ve özelliklerinin belirlenmesi

Genlerin etkileşimde olduğu sinyal yolları ve özelliklerini belirlemek amacıyla KEGG Pathway Veritabanı (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) ve DAVID Veritabanı (<https://david.ncifcrf.gov/tools.jsp>) kullanılarak görev aldıkları hücresel süreçler ve hücredeki moleküler fonksiyonları gibi durumlar ile ilgili verilerin analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler ışığında miR-375 ve miR-125b-5p için çalışılacak genler ve ilgili sinyal yolu belirlenmiş ve ilgili sinyal yolunun bir özeti Biorender programı (<https://www.biorender.com/>) aracılığıyla oluşturulmuştur.

2.5.2. Hücre kültür çalışmaları

Çalışmada kullanılan RWPE-1, LNCaP ve PC-3 hücreleri Ege Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi'nde görev yapmakta olan Doç. Dr. Bilge DEBELEÇ BÜTÜNER ve Bursa Uludağ Üniversitesi, Tıp Fakültesi'nde görev yapmakta olan Dr. Öğr. Üyesi Işıl Ezgi ERYILMAZ'dan temin edilmiştir. DU-145 hücreleri ise Eskişehir Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi'nde görev yapmakta olan Prof. Dr. Hatice Mehtap KUTLU'dan temin edilmiştir.

2.5.2.1. Hücre açma

Öncelikle – 80 °C’de muhafaza edilen hücre dışarı alınarak erimesi sağlanmıştır. Eriyen hücreler 5 ml taze besiyeri içeren falkon tüp içerisine aktarılmıştır. Ardından 700 rpm’de 5 dk santrifüj edilmiştir. Üzerindeki besiyeri uzaklaştırılmış ve pellet 1 ml taze besiyeri içerisinde çözündürülmüştür. Hazırlanan hücreler besiyeri içeren T25 veya T75 flask içerisine aktarılmıştır. CO₂’li inkübatöre (Memmert- INCOmed 153) alınarak büyümeleri beklenmiştir. Bütün hücrelerde aynı işlem basamakları uygulanmıştır.

2.5.2.2. Hücrelerin dondurulup saklanması

RWPE-1 hücrelerinin dondurulması

RWPE-1 hücrelerinden hücre stoğu hazırlamak için hücre pasajlama işlemi gerçekleştirilmiş ve hücreler toplanmıştır. Toplanan hücrelerin sayımı yapıldıktan sonra 1x10⁶ cell/ml olacak şekilde hücreler cryo vial içerisine alınmıştır. Üzerine 750 µl besiyeri olacak şekilde K-SFM tam besiyeri, 150 µl FBS ve 100 µl DMSO eklenmiştir. Ardından hücre bilgileri (Hücre adı, Pasaj no vb.) etiketlendikten sonra – 80 °C’ye kaldırılmıştır.

LNCaP hücrelerinin dondurulması

LNCaP hücrelerinden hücre stoğu hazırlamak için hücre pasajlama işlemi gerçekleştirilmiş ve hücreler toplanmıştır. Toplanan hücrelerin sayımı yapıldıktan sonra 1x10⁶ cell/ml olacak şekilde hücreler cryo vial içerisine alınmıştır. Üzerine 950 µl besiyeri olacak şekilde RPMI tam besiyeri ve 50 µl DMSO eklenmiştir. Ardından hücre bilgileri (Hücre adı, Pasaj no vb.) etiketlendikten sonra – 80 °C’ye kaldırılmıştır.

PC-3 ve DU-145 hücrelerinin dondurulması

PC-3 ve DU-145 hücrelerinden hücre stoğu hazırlamak için hücre pasajlama işlemi gerçekleştirilmiş ve hücreler toplanmıştır. Toplanan hücrelerin sayımı yapıldıktan sonra 1x10⁶ cell/ml olacak şekilde hücreler cryo vial içerisine alınmıştır. Üzerine 900 µl besiyeri olacak şekilde RPMI tam besiyeri ve 100 µl DMSO (%10) eklenmiştir. Ardından hücre bilgileri (Hücre adı, Pasaj no vb.) etiketlendikten sonra – 80 °C’ye kaldırılmıştır.

2.5.2.3. Hücre pasajlama

Çalışmada kullanılmak üzere normal prostat epitel hücresi RWPE-1, androjen-duyarlı LNCaP prostat kanser hücresi, androjen-duyarsız PC-3 ve DU-145 prostat kanser hücresi büyütülmüştür. RWPE-1, LNCaP ve DU-145 hücreleri, %10 FBS (fetal bovine serum), 100 U/mL penisilin ve 100 µg/mL streptomisin içeren RPMI 1640 besiyerinde kültüre edilirken,

PC-3 hücreleri %10 FBS (fetal bovine serum), 100 U/mL penisilin ve 100 µg/mL streptomisin içeren DMEM-F12 besiyerinde büyütülmüştür. Hücreler %5 CO₂ varlığında 37 °C'de inkübatörde tutulmuştur. Hücreler deneyler süresince başarılı bir şekilde büyütülmüştür. Hücreler uygun koşullarda dondurulmuş ve gerektiğinde dondurulmuş hücrelerden açılması ile kültürlerin devamlılığı sağlanmıştır.

Pasajlama işlemi hücreler %80 üzerinde yoğunluğa ulaştığında gerçekleştirilmiştir. Öncelikle flask içerisinden besiyeri uzaklaştırılmıştır. Ardından T75 flask için 2 ml, T25 flask için 1 ml 1X PBS eklenerek yıkama işlemi yapılmıştır. 1X PBS uzaklaştırıldıktan sonra 1 ml (T75 ise) veya 500 µL (T25 ise) 1X Tripsin solüsyonu eklenmiş ve flask inkübatörde 5 dk inkübe edilmiştir. Hücrelerin kalkıp kalkmadığı kontrol edildikten sonra tripsini inaktive etmek amacıyla üzerine 1:1 oranında taze besiyeri eklenmiştir. RWPE-1 hücreleri için farklı olarak 1:2 oranında olacak şekilde saf FBS ile inaktivasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Hücreler 15 ml falkon tüplere toplandıktan sonra 1200 rpm'de 5 dk santrifüj işlemi uygulanmıştır. Santrifüjden sonra besiyeri uzaklaştırılmış ve pellet üzerine 1 ml taze besiyeri eklenmiştir. Süspansiyon homojen hale getirildikten sonra hücre sayımı yapılmıştır. İhtiyaca göre hücrelerin bir kısmı tekrar flasklara ekimi yapılmış, bir kısmı deneylerde kullanılmış hücre kaldı ise de saklamak üzere dondurulmuştur.

2.5.2.4. Hücre sayımı

Hücre sayımı yapmak için santrifüj işleminden sonra 1 ml taze besiyeri içerisinde homojen hale getirilen hücreler kullanılmıştır. Hücrelerin tamamen homojen hale gelmesi sağlandıktan sonra thoma lamına 10 µl hücre yüklenmiş ve inverted mikroskopta hücre oranına göre karelerin tamamı veya farklı noktalardan seçilen 4 büyük kare sayılmıştır. Elde edilen hücre sayısından yola çıkarak sulandırma katsayısı ve sayılan karelerin toplamı dikkate alınarak total hücre miktarı hesaplanmıştır.

2.5.3. Transfeksiyon işlemleri

MiR-375 ve miR-125b-5p'nin hedef genlerinin belirlenebilmesi ve PI3K sinyal yolağı üzerindeki etkilerinin anlaşılabilmesi amacıyla miR-375 ve miR-125b-5p'ye ait mimic/inhibitör uygulaması yapılarak upregüle/downregüle edilmesi sağlanmıştır. Transfeksiyon kontrolünün sağlanması için miRNA mimic/inhibitör negatif kontrol (thermo fisher scientific) çalışmaya dahil edilmiştir. Uygulama esnasında Lipoectamine 3000 Protokolü (A.B.P. Biosciences) uygulama esaslarına göre transfeksiyon işlemleri gerçekleştirilmiştir.

Hücrelerin bir gece öncesinde 3×10^5 hücre/kuyucuk olacak şekilde 6 kuyucuklu kültür plate'lerine ekimi yapılmıştır. Hücreler gece boyunca %5 CO₂ varlığında 37 °C'de inkübatörde tutulmuştur. Transfeksiyon verimliliğinin incelenebilmesi için her hücre için ayrı ayrı farklı konsantrasyonlarda miRNA ve transfeksiyon ajanı kullanılarak 96 kuyucuklu kültür platelerine deneme setleri kurulmuştur. Bu amaçla KIF11/Eg5 siRNA çalışmaya dahil edilmiş ve transfeksiyon optimizasyonu sağlanmıştır. KIF11/Eg5'in yıkıldığı adherent hücreler mitotik arrest nedeniyle yuvarlanmış bir fenotip gösterirler. Yavaş büyüyen hücrelerin bu fenotipi göstermesi 72 saat sürebilmektedir. Bu nedenle de hücreler 24 saatlik aralıklarla incelenerek transfeksiyon verimliliği ve optimizasyonu yapılmıştır. Protokol oluşturulduktan sonra deneylere başlanmıştır. Protokol doğrultusunda 2 ayrı mix hazırlanmıştır. İlk olarak 125 µl opti-mem içerisine 7,5 µl Lipofactamine 3000 eklendi ve dilue edildi. İkinci olarak ise 75 pmol mimic/inhibitör 125 µl opti-mem içerisinde dilüe edildi. Bu şekilde 5 dk beklendi ve iki solüsyon birbirine karıştırılarak 20 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Ardından kültür plateleri içerisindeki medya uzaklaştırıldı. Hücrelerin üzerine 2 ml penisilin/streptomisin içermeyen taze besiyeri eklendi. Hazırlanan karışımlar yavaşça damla damla besiyeri üzerine eşit bir şekilde dağıtıldı. Plate nazikçe sağa sola çevrilerek karışması sağlandı. Hücreler inkübatöre kaldırıldı. Uygulama sonrasında miRNA ve mRNA ekspresyonlarının incelenebilmesi için hücrelerden 48. saatte miRNA ve RNA izolasyonu yapıldı.

2.5.3. Hücre canlılığı testi

MiR-375 ve miR-125b-5p'nin hücre canlılığı üzerine etkilerinin anlaşılabilmesi için PC-3 ve DU-145 hücrelerine transfeksiyon uygulaması yapılmıştır. 96 kuyucuklu plate'lere her örnek üç tekrarlı olacak şekilde uygulama yapılmıştır. Transfeksiyondan 48 saat sonra sonuçlar değerlendirilmek üzere örnekler işlemlerden geçirilmiştir. Çeşme suyunda nazikçe 2 kez kuyucuklar yıkandı. Sıvı toplandıktan sonra kültür kabı ters çevrilip peçete serilmiş zemine vuruldu. 50 µl %0,5'lik kristal viyole solüsyonu eklendi ve oda sıcaklığında kapaklı bir şekilde çalkalayıcıda 20 dakika bekletildi. 4 kere çeşme suyunda yıkandı. Arta kalan sıvı toplanıp peçete serilmiş zemine kültür kabı ters bir şekilde nazikçe vuruldu. Kapaksız olarak oda sıcaklığında en az 2 saat kültür kabı bekletildi her kuyucuğa 200 µl metil alkol eklendi ve kapaklı olarak 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Ölçümler 570 nm dalga boyunda ELİZA okuyucu ile yapıldı. Bulunan ölçümler negatif kontrol gurubundaki örneklerle normalleştirildi. Çıkan değerler hücrenin canlı kalanını gösterdi.

2.5.4. Yara iyileşmesi testi

Hücrelerin göçünü değerlendirmek amacıyla DU-145 hücrelerine yara iyileşmesi testi uygulanmıştır. Bu amaç doğrultusunda 6 kuyucuklu kültür platelerine 0.5×10^6 cell/well olacak şekilde hücre ekimi gerçekleştirilmiştir. Ekimi yapılan hücreler CO₂'li inkübatöre kaldırılmış ve gece boyunca inkübe edilmiştir. Hücreler %95 yoğunluğa ulaştığında sarı pipet ucu yardımıyla hücrelerin ortasında bir yara oluşturulmuştur. Ardından miR-375 ve miR-125b-5p mimic ve inhibitörleri ve onların negatif kontrolleri uygulanmıştır. 0, 24 ve 48 saatlerde hücrelerden inverted mikroskop yardımıyla görüntüler toplanmıştır. Alınan görüntüler incelenerek göç eden hücre oranları değerlendirilmiştir. Hücre göçünü değerlendirirken ImageJ yazılımı (Version 1.53; National Institutes of Health) kullanılmıştır. Yara genişlikleri belirlendikten sonra kontrollerle kıyaslanarak göreceli olarak hücre göç oranları hesaplanmıştır.

2.5.5. Real -Time-PCR analizleri (qRT-PCR)

2.5.5.1. Primer dizaynı

PIK3CA, PIK3CG, TSC1, CYTH1, PLD1, PLD2, ARF1, mTOR ve RHEB genine ait ekspresyon primerlerinin tasarlanması amacıyla öncelikle genlerin, mRNA transkriptine ait dizi NCBI-Gene (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>) ve ENSEMBL (<https://www.ensembl.org/index.html>) veritabanlarından ulaşılmıştır. Primer dizaynı için <https://primer3.ut.ee/> programı kullanılmıştır. Genlerden primer dizaynı yapılırken intron bölgesinden olmamasına ekson bölgesi olmasına dikkat edilmiştir. Aynı zamanda primerler farklı eksonlarda olacak şekilde dizayn edilmiştir. Primer dizaynında, dizayn edilen primerlerin NCBI-Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) programında blast yapılarak hedef geni %100 vermesine, sonrasındaki çakışma gösteren bölgelerin % benzerliklerinin %70' den az olmasına dikkat edilmiştir. Spesifikliği arttırmak için farklı ekzonları içermesine, forward (ileri) ve reverse (geri) primerlerin Tm değerlerinin yakın olmasına, primer uzunluklarının 20-25 bazı geçmemesine, ürün büyüklüğünün 300 baz çiftini geçmemesine dikkat edilmiştir. Aynı zamanda primerlerin GENOME BROWSER (<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>) web sitesinden in-silico PCR ile istenilen ürünü oluşturup oluşturmadığı da kontrol edilmiştir. Dizayn edilen dizi bilgileri Tablo 2.1.'de verilmiştir.

Tablo 2.1. qPCR mRNA primer dizileri

Primer Adı	Forward	Reverse
GAPDH	AGAAGGCTGGGGCTCATTTG	AGGGGCCATCCACAGTCTTC
CYTH1	CCAGCGATATTGTCAGTGCAA	GCAATGAACCTCTCCACAGTG
PIK3CG	AGTCCAGACACTATCAGCAGAG	CTAAAGCTTTCGGGGAGTTGAG
ARF1	CATCTTCGCAACCTCTTCAAG	GTTCTTGTAAGTCCACGGTTCC
PLD1	CTCTCCGGCTGTCCAATAAAAG	GGATGCGGATAAAGGCTTTGTA
PLD2	TTCTGGCCAATCTATGAGCTTCA	CAAGCGGACAGAATACAGAGTG
TSC1	CCATGCTACCAATGATTCCACA	GAAGTTGCAAGGGTACATTCCA
PIK3CA	AGAAGCTGTGGATCTTAGGGAC	ACCCAGATCACCCTATTATTTC
RHEB	AGTTGATCAGATAAATGGACAAGA	TGGAGTATGTCTGAGGAAAGATAGA
mTOR	CAGATGCCAATGAGAGGAAAGG	GTACTCAGCGGTAAAAGTGTC

2.5.5.2. RNA izolasyonu aşaması

Real-Time PCR çalışmalarında kullanılmak üzere transfeksiyon işlemi uygulanmış ve uygulanmamış RWPE-1, LNCaP, PC-3 ve DU-145 hücrelerinden miRNA ve RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. mirVana™ PARIS™ Kit (Part Number AM1556) kullanılacağı için kite ait protokol aşamaları uygulanacaktır. Bu doğrultuda Cell Disruption Buffer yardımıyla hücrelerin parçalanması sağlanacaktır. Ardından parçalanmış hücreler RNA ve protein izolasyonu için bölünecektir. RNA izolasyonu için olan ayrılan hücrelere 1:1 oranında 2X Denaturing Solution eklenecek ve 5 dk. buzda beklenilecektir. Daha sonra tüpün içerisindeki sıvı hacminin 1.25'i oranında %100'lük etanol eklenecektir. Örneğin tamamı toplama tüpüne yerleştirilen filtreye aktarılacaktır. Santrifüj aşamasından sonra yıkama işlemleri uygulanacaktır. Son aşamada ise elution buffer kullanılarak RNA örnekleri toplanacaktır. İzole edilen RNA konsantrasyonu ve saflığı OD260/280 oranında spektrofotometrede belirlenecektir.

2.5.5.3. cDNA dönüştürme

Transfeksiyon sonrasında izolasyonu yapılan miRNA ve RNA örneklerine cDNA dönüştürme uygulanmıştır. cDNA dönüştürme için miR-cDNA Synthesis Kit (A.B.T. Laboratory Industry) kullanılmıştır. MiRNA cDNA dönüştürme yapılırken reaksiyona stem-loop primerler (Tablo 2.2.) dahil edilmiştir. MRNA cDNA dönüştürme için ise random hexamer kullanılmıştır. Reaksiyon bileşenlerinin miktarları Tablo 2.3.'te gösterilmiştir. RT aşaması Tablo 2.4.'te belirtilen reaksiyon koşulları uygulanarak gerçekleştirilmiştir.

Tablo 2.2. miRNA cDNA dönüşümü ve PCR aşaması için kullanılan primerler

Primer Adı	Baz Dizisi
miR-125b-5p Stem-loop	GTCGTATCCAGTGCCTGTCGTGGAGTCGGCAATTGCACTGGATACGACTCACAA
miR-375 Stem-loop	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCACTGGATACGACTCACGC
U6 Stem-loop	CTCAACTGGTGTCTGTGAGTCGGCAATTCAGTTGAGAACCATAC
miR-125b-5p Forward	GTTTCCTGAGACCCTAAC
miR-375 Forward	AGCCGTTTGTTCGTTTCGGCT
Universal Reverse	GTGCAGGGTCCGAGGT
U6 Forward	TCGCTTCGGCAGCACATATACT
U6 Reverse	AACGCTTCACGAATTTGCGTGTC

Tablo 2.3. cDNA dönüşümü için kullanılan bileşenler ve miktarları

20 µl reaksiyon için gerekli bileşenler	miRNA için	mRNA için
10X Reaksiyon Buffer	2 µl	2 µl
20X dNTP mix	1 µl	1 µl
Stem-loop miRNA primer (5 µM)	2 µl	-
Random Hexamer	-	2 µl
Reverse Transkriptaz	1 µl	1 µl
RNAse İnhibitor	0,5 µl	0,5 µl
miRNA Kalıbı	10 µl	-
mRNA Kalıbı	-	10 µl
Nükleaz Free Su	3,5 µl	3,5 µl
Toplam Hacim	20 µl	20 µl

Tablo 2.4. cDNA Dönüşümü Reaksiyon Koşulları

Aşamalar	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
1. Step	25	10 dk.	1
2. Step	37	120 dk.	1
3. Step	85	5 dk.	1
4. Step	4	∞	1

2.5.5.4. qRT-PCR Aşaması

MiR-375 ve miR-125b-5p'nin hedef genleri (*TSC1* ve *CYTH1*) ve PI3K sinyal yolağında etkili genlerin (*PIK3CA*, *PIK3CG*, *RHEB*, *mTOR*, *PLD1*, *PLD2*, *ARF1*) mRNA seviyelerini incelemek amacıyla hücrelerden elde edilen RNA örneklerine qRT-PCR işlemi uygulanmıştır. Aynı zamanda transfeksiyon sonrası endojen miRNA ifadesinin kontrolü için transfeksiyon uygulanan ve uygulanmayan hücrelerden elde edilen RNA örneklerinden miR-375 ve miR-125b-5p ekspresyon seviyeleri de incelenmiştir. qRT-PCR aşaması için, Tablo

2.5.'te belirtilen bileşenler kullanılarak reaksiyon hazırlanmıştır. Reaksiyon döngüsü Tablo 2.6.'da verilmiştir. Kullanılan primerlere ait dizi bilgileri Tablo 2.1 ve Tablo 2.2'de belirtilmiştir. İlgili genlerin ekspresyon seviyelerinin kontrolünün ve normalizasyonun sağlanması amacıyla çalışmaya *GAPDH* housekeeping geni dahil edilmiştir. Aynı şekilde miRNA ekspresyon seviyelerinin kontrolü ve normalizasyonu için de U6 çalışmada kullanılmıştır. Relatif ekspresyon $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 'ye göre hesaplanmıştır. Her bir örnek için farklı hücre hatlarından elde edilen RNA'lar kullanılacağından (RWPE-1, LNCaP ve PC3 hücreleri) biyolojik replikalar ile birlikte teknik replikalar da kullanılmış olup üç tekrarlı olacak şekilde işlemler gerçekleştirilmiştir.

Tablo 2.5. qPCR reaksiyon için gerekli bileşenler ve miktarları

10 µl reaksiyon için gerekli bileşenler	Hacim	Final Konsantrasyonu
A.B.T. 2X qPCR SYBR Master Mix	5 µl	1X
Forward Primer	1 µl	0,5 µM
Reverse Primer	1 µl	0,5 µM
miRNA-mRNA cDNA Kalıbı	3 µl	cDNA örnekleri 3 kat seyreltme yapıp eklendi
Toplam Hacim	10 µl	

Tablo 2.6. qPCR reaksiyon koşulları

PCR Aşamaları	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Başlangıç Denatürasyonu	95	300 sn.	1
Denatürasyon	95	30 sn.	40
Annealing	60	60 sn.	
Melting Curve	65	30 sn.	1

2.5.6. Western blotlama çalışmaları

miR-375 ve miR-125b-5p transfeksiyonu yapılan PKa hücrelerinden protein izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzole edilen örneklerden CYTH1, TSC1 ve PLD2 proteinlerinin ekspresyon seviyeleri araştırılmıştır. Sonuçların optimizasyonunu sağlamak amacıyla housekeeping gen olan β -aktin kontrol olarak kullanılmıştır. Deney basamakları aşağıda açıklanmıştır.

2.5.6.1. Protein izolasyonu

Öncelikle protein izolasyonu aşamasında kullanılan tüm reaktifler ve lizatlar soğuk tutulmuştur. Transfeksiyon işlemi uygulandıktan sonra hücreler 37 °C inkübatörde 48 h süreyle

bekletilmiştir. Ardından besiyeri uzaklaştırılmış ve Flask/Plate 1X PBS ile yıkanmıştır. Yıkama işlemi birkaç kez gerçekleştirilmiştir. Yıkama işleminden sonra 13.200 rpm'de 2 dk santrifüj işlemi yapılmıştır. Hücre sayısına göre 1X RIPA buffer (+PMSF) hücre pelleti üzerine eklenmiştir. Hücrelerin homojen hale gelmesi için köpürmemesine dikkat ederek pipetaj yapılmış ve ardından 5 dk buz üzerinde ependorflar inkübe edilmiştir. Daha sonra 15 dk vorteksenerek hücrenin parçalanması sağlanmıştır. Vorteks işleminden sonra +4 °C sıcaklıkta 15 dk 13.200 rpm'de santrifüj işlemi yapılmıştır. İşlem tamamlandıktan sonra süpernatant temiz bir epp'a alınmıştır. Örnekler -80 °C'ye kaldırılmıştır.

2.5.6.2. Bradford assay

Elde edilen protein örnek konsantrasyonunun belirlenmesi için bradford assay uygulanmıştır. BSA (2mg/ml) kullanarak standart eğri oluşturulmuştur. Öncelikle artan konsantrasyonlarda BSA dilüsyonları hazırlanmıştır. Her dilüsyondan 3 tekrarlı olacak şekilde 100 µl Bradford Reagent üzerine 2 µl eklenmiştir. İzole edilen protein örneklerinden de aynı şekilde 2 µl eklenmiştir. Ardından 10 dk karanlıkta inkübe edilmiş ve 595 nm dalga boyunda ölçüm yapılmıştır. Elde edilen değerlerden standart eğri oluşturulmuş ve $y=ax+b$ ve R^2 değerleri elde edilmiştir. Protein konsantrasyonları belirlenmiştir.

2.5.6.3. Protein denatürasyonu

Konsantrasyonları belirlenen protein örnekleri 3x Laemmli buffer kullanılarak 95 °C'de 5 dk denatüre edilmiştir. Bunun için öncelikle ihtiyaca göre 1:1 oranında protein ve 3x Laemmli buffer karıştırılmış ve ardından daha önceden 95 °C'ye getirilen su banyosunda 5 dk boyunca denatürasyonları sağlanmıştır. Bu sayede örnekler jele yüklenmeye hazır hale getirilmiştir.

2.5.6.4. SDS-PAGE

İncelenecek olan proteinlerin kDa'larına göre %12 ve %7,5'luk separating jeller hazırlanmıştır. Aynı zamanda %4'lük stacking jel kullanılmıştır. Jel içerikleri Tablo 2.7.'de verilmiştir. Hazırlanan jellere denatüre edilen protein örneklerinden 80 µg olacak şekilde her bir kuyucuğa yükleme yapılmıştır. Ayrıca her bir deney seti için 1 µl protein marker kullanılmıştır. Örnek yükleme tamamlandıktan sonra 90 V bir saat ardından 120 V'da yaklaşık 3 saat örneklerin yürümesi sağlanmıştır. SDS-PAGE aşamasından sonra transfer aşamasına geçilmiştir.

Tablo 2.7. SDS-PAGE Jel İçeriği ve Konsantrasyonları

	%12'lik Jel (10 ml)	%7,5 Jel (10 ml)	%4'lük Jel (5 ml)
dH ₂ O	3,3 ml	4,85 ml	1,68 ml
Tris-HCl (1,5 M)	2,5 ml	2,5 ml	-
Tris-HCl (0,5 M)	-	-	1,25 ml
Akrilamid/Bisakrilamid	4 ml	2,5 ml	2 ml
%10 SDS	100 µl	100 µl	50 µl
%10 APS	100 µl	100 µl	50 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl

2.5.6.5. Membrana transfer

SDS-PAGE işlemi tamamlandıktan sonra örneklerin membrana transferini sağlamak amacıyla yarı-ıslak transfer sistemi kullanılmıştır. Bu amaç için öncelikle kullanılacak membranlar 30 sn boyunca MetOH'da aktive edilmiştir. Ardından 1X transfer buffer içerisine alınmıştır. Jeller ise 10 dk boyunca 1X transfer buffer ile muamele edilmiştir. Cihaz içerisine sırasıyla iki kat transfer kâğıdı, membran, jel, tekrar iki kat transfer kâğıdı olacak şekilde yerleştirilmiştir. En altta ve her katmanda olmak üzere 1X transfer buffer ile ıslatılmıştır. Ardından cihaz ayarlanıp 300 V'da 1 saat transfer işlemi yapılmıştır.

2.5.6.6. Antikor ile muamele

Antikor ile muamele etmeden önce transfer işlemi tamamlanan membranlara %5 süt tozunda bir saat bloklama işlemi yapılmıştır. Ardından uygulanacak 1:1000 oranında hazırlanan primer antikor içerisine alınmış ve +4 C'de bir gece inkübe edilmiştir. Primer antitordan alınan rnekler 1X TBS-T ile 5 dk sreylealkalayıcı da yıkanmıştır. Bu işlem üç kez tekrarlanmıştır. Ardından 1:5000 oranında hazırlanan sekonder antikor içerisine alınan membranlar 4 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İşlem tamamlandıktan sonra aynı şekilde 1X TBS-T ile 5 dk boyuncaalkalayıcıda yıkanmıştır.

2.5.6.7. Görüntüleme

Sekonder antikor işleminde sonra yıkanan membranlar görüntüleme için hazırlanmıştır. İşlem için ECL kullanılmıştır. Kit içeriğinde yer alan Luminol/Enhancer ve Stable Peroxide Buffer 1:1 oranında karıştırılacak ECL buffer hazır edilmiştir. Kullanılana kadar karanlıkta muhafaza edilmiştir. Membranların üzerini kaplayacak şekilde her membrana ECL eklenmiş ve karanlıkta 1 dk beklenmiştir. Ardından kemiluminesans görüntüleme sistemi kullanarak örnekler görüntülenmiştir. Elde edilen sonuçlar İmage J programı kullanılarak analiz edilmiştir.

2.5.7. İstatistiksel analiz

Grupların karşılaştırılmasında bağımsız t testi kullanılacak ve anlamlı değişimler için p değeri ($<0,05$) belirlenmiştir. MRNA değerleri olarak “Ct” değerleri kullanılacak ve hesaplamalarda $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülünden yararlanılmıştır. Hücre Canlılığı, Yara İyileşmesi, Real time PCR ve Western Blotting karşılaştırmalarının istatistiksel değerlendirmeleri GarphPad Prism 9 istatistik programı ile analiz edilmiştir. Analiz için t testi kullanılmıştır.



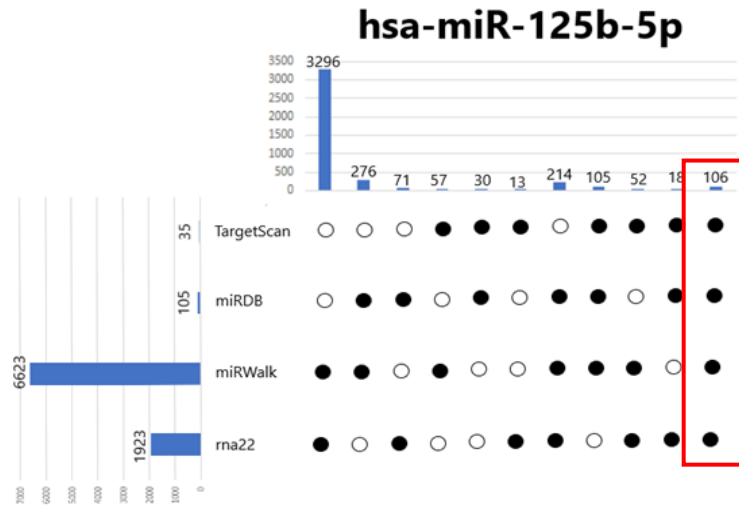
ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

SONUÇLAR

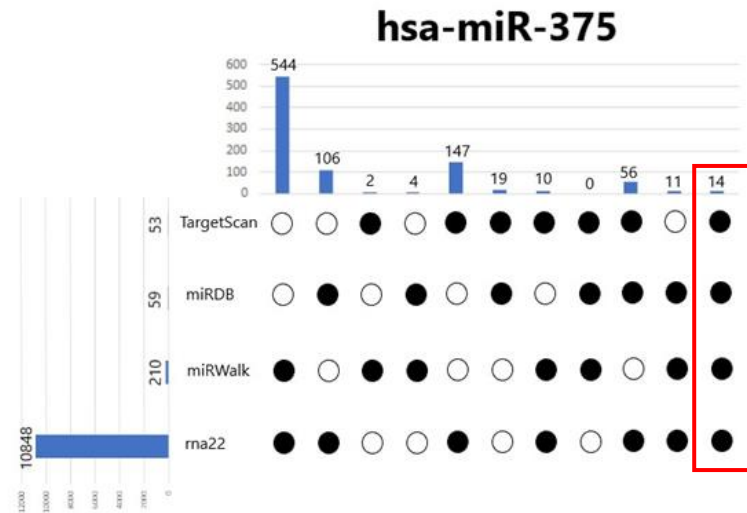
3. SONUÇLAR

3.1.MiRNA tahmini hedefleri

MiRNA hedef tahmin araçları kullanılarak miR-375 ve miR-125b-5p'nin tahmini mRNA hedefleri tespit edilmiştir. Bu amaç doğrultusunda analizlerin birinci aşamasında miRNA hedef tahmini için farklı verileri kullanan 4 farklı program (miRWalk, TargetScan, miRDB ve rna22) kullanılmıştır. Her program ile ilgili miRNA'ların hedefi olabilecek gen listeleri sıralanmıştır. Daha sonra bu listeler karşılaştırılarak 4 programda da ortak (aynı) olan genlere odaklanılmıştır. Şekil 3.1 ve Şekil 3.2'de ortak gen sayıları siyah noktalarla temsil edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre miR-125b-5p için 106 gen, miR-375 için ise 14 gen tespit edilmiştir (Şekil 3.1 ve Şekil 3.2). Tahmini miR-125b-5p hedefi olarak belirlenen 106 gen: *SH3TC2, ZNF704, ARID3B, NUP210, DOCK3, BAK1, NPL, ETS1, SSTR3, MTF1, CDH5, ATXN1, KCNIP3, C19orf38, ATP10D, RBM20, UBN1, DHX33, RASGRF2, XKRX, OLFML2A, ZSWIM5, SARMI1, NCAN, ALPK3, SLC25A35, ZFYVE1, DPH2, NRXN1, RAB3D, ZBTB37, ABTB1, FRMD5, PRRC1, NR6A1, E2F2, CHTF8, PMM2, SMURF1, MKNK2, RPS6KA1, CDC42SE1, TBC1D16, KCTD21, MAN1B1, NIPA1, SCN2B, SUN1, ZBTB7A, RBAK, PDK3, RASGEF1A, PODXL, FNDC3B, ZBTB34, CSRNPI, CDK16, GPR107, SZRD1, MAP2K7, ATXN3, RUSC2, TDG, TEF, ZFP62, FOXD2, AKAP13, NCLN, TYSND1, FAM78A, C19orf54, FAT4, SCN4B, CDS2, BSN, PHYHIP, SAMD14, ARSI, SESTD1, C15orf39, PPM1A, ANKRD13B, CGREF1, CYTH1, GAB2, DVL3, KPNA6, PPP1R12B, TACC2, RIT1, YWHAG, CORO2B, PPT1, ASXL3, PIK3C2B, ELL, SNX27, COL4A3, SLC35C1, DCPIA, GRSF1, STOX2, ENTPD1, H6PD, MEGF8, ADAM11. Tahmini miR-375 hedefi olarak belirlenen 14 gen: *SOCS5, PPARGC1B, PDPK1, CNIH4, ELAVL4, TNPO3, UBE3A, BNC2, ISL2, SLC7A11, WWC2, ZBTB20, TCF4, TSC1. Hedef tahmini yapılırken 4 farklı miRNA hedef tahmin programının kullanılması belirlenen genlerin bizim projemizde yer alan miRNA'ların hedeflerinin olma olasılığını ve projeden sonuç alma ihtimalimizi büyük ölçüde artırmaktır.**



Şekil 3.1. TargetScan, miRDB, miRwalk ve Rna22 miRNA hedef tahmin araçları ile belirlenen tahmini hedef gen sayıları.



Şekil 3.2. TargetScan, miRDB, miRwalk ve Rna22 miRNA hedef tahmin araçları ile belirlenen tahmini hedef gen sayıları.

3.2.Deneysel çalışmalarla doğrulanmış miRNA hedefleri

Analizler sonucunda belirlenen miR-125b-5p (106 gen) ve miR-375 (14 gen) içerisinde doğru olarak genleri eleyebilmek amacıyla miRTarBase Veritabanı kullanılarak genler incelenmiştir. Yapılan analizlerde miR-125b-5p'nin ve tahmini hedefi olarak belirlemiş olduğumuz *ARID3B*, *BAK1*, *ETS1*, *MTF1*, *CDH5*, *ATXN1*, *ZFYVE1*, *ABTB1*, *E2F2*, *MKNK2*, *RPS6KA1*, *MAN1B1*, *ZBTB7A*, *MAP2K7*, *TDG*, *TEF*, *C19orf54*, *C15orf39*, *STOX2* genleri çeşitli deneysel çalışmalarda (Reporter Assay, qPCR, Western Blotlama, Mikroarray, NGS gibi) doğrulanmıştır. Çalışmaların hangi organizmada veya hangi deneylerle yapıldığına dair bilgiler

Tablo 3.1.'de verilmiştir. Aynı şekilde miR-375 için de tahmini hedef olarak belirlemiş olduğumuz *PDK1*, *CNIH4*, *ELAVL4*, *TNPO3*, *UBE3A*, *WWC2* genleri deneysel olarak doğrulanmıştır. Çalışmaların hangi organizmada veya hangi deneylerle yapıldığına dair bilgiler Tablo 3.2.'de verilmiştir.

Tablo 3.1. Deneysel çalışmalarla doğrulanmış miR-125b-5p'nin tahmini hedef gen listesi

Validasyon Yöntemleri													
ID	Tür (miRNA)	Tür (Hedef)	miRNA	Hedef	Güçlü Kanıtlar			Daha Az Güçlü Kanıtlar				Makale Sayısı	
					Reporter Assay	Western Blot	qPCR	Mikroarray	NGS	pSILAC	Diğer		ChIP-Seq
MIRT004796	Mus musculus	Mus musculus	mmu-miR-125b-5p	Arid3b				✓			✓		1
MIRT006719	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-125b-5p	ARID3B	✓								1
MIRT002394	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-125b-5p	BAK1	✓	✓	✓				✓		6
MIRT005914	Homo sapiens	Mus musculus	hsa-miR-125b-5p	Bak1	✓	✓	✓						1
MIRT006095	Mus musculus	Mus musculus	mmu-miR-125b-5p	Bak1	✓	✓	✓						1
MIRT006387	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-125b-5p	ETS1	✓								2
MIRT046066	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-125b-5p	MTF1					✓				1
MIRT052977	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-125b-5p	CDH5		✓	✓						1
MIRT005007	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-125b-5p	ATXN1					✓		✓		1
MIRT046077	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-125b-5p	ZFYVE1					✓				1
MIRT004791	Mus musculus	Mus musculus	mmu-miR-125b-5p	Abtb1				✓			✓		1
MIRT006910	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-125b-5p	ABTB1	✓	✓	✓						1
MIRT006974	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-125b-5p	E2F2	✓	✓	✓						1
MIRT003997	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-125b-5p	MKNK2				✓			✓		1
MIRT006430	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-125b-5p	RPS6KA1	✓	✓	✓						2
MIRT438070	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-125b-5p	MAN1B1	✓	✓	✓						1
MIRT739376	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-125b	ZBTB7A								✓	1
MIRT004799	Mus musculus	Mus musculus	mmu-miR-125b-5p	Map2k7	✓			✓			✓		1
MIRT734747	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-125b-5p	MAP2K7	✓		✓						0
MIRT046007	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-125b-5p	TDG					✓				1
MIRT006081	Homo sapiens	Mus musculus	hsa-miR-125b-5p	Tef		✓	✓						1
MIRT046057	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-125b-5p	TEF					✓				1
MIRT046079	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-125b-5p	C19orf54					✓				1
MIRT046063	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-125b-5p	C15orf39					✓				1
MIRT546392	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-125b-5p	STOX2					✓			✓	4

Tablo 3.2. Deneysel çalışmalarla doğrulanmış miR-375'in tahmini hedef gen listesi

Validasyon Yöntemleri													
ID	Tür (miRNA)	Tür (Hedef)	miRNA	Hedef	Güçlü Kanıtlar			Daha Az Güçlü Kanıtlar				Makale Sayısı	
					Reporter Assay	Western Blot	qPCR	Mikroarray	NGS	pSILAC	Diğer		CHIP-Seq
MIRT000055	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-375	PDK1	✓	✓	✓				✓		5
MIRT005021	Rattus norvegicus	Rattus norvegicus	rno-miR-375-3p	Pdk1	✓	✓					✓		3
MIRT595545	Mus musculus	Mus musculus	mmu-miR-375-3p	Cnih4					✓				1
MIRT748906	Mus musculus	Mus musculus	mmu-miR-375	Cnih4								✓	1
MIRT005543	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-375	ELAVL4	✓	✓	✓	✓			✓		5
MIRT008821	Mus musculus	Mus musculus	mmu-miR-375-3p	Elavl4	✓	✓	✓	✓			✓		5
MIRT019682	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-375	TNPO3				✓					1
MIRT019860	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-375	UBE3A				✓	✓			✓	3
MIRT020064	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-375	WWC2				✓					1

3.3.Genlerin ilgili oldukları sinyal yolları ve özellikleri

Mir-125b-5p ve miR-375'in tahmini hedefi olarak tespit edilne genlerin hücredeki biyolojik özellikleri ve ilişkili oldukları sinyal yollarını incelemek amacıyla KEGG Pathway ve DAVID veritabanı analizleri gerçekleştirilmiştir. MiR-125b-5p hedefi olarak belirlenen genlerin Pathway analizlerini incelediğimizde Salmonella enfeksiyonu, kronik myeloid lösemi, endoplazmik retikulumda protein işleme süreci, MAPK sinyal yolu, küçük hücreli akciğer kanseri, Epstein-Barr virüs enfeksiyonu, nörodejenerasyon yolları-multiple hastalıklar gibi sinyal yollarında görev aldıkları görülmüştür. Tablo 3.3.'te hangi genlerin hangi sinyal yolları ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. DAVID veritabanından elde edilen analizlerde ise genlerin gene ontology (GO) - Biyolojik Süreçler (BP), Hücresel Component (CC) ve moleküler fonksiyonları (MF) ile ilgili veriler toplanmıştır. Yer aldıkları biyolojik süreçlere bakıldığında RNA polimeraz II promotöründen transkripsiyonun pozitif düzenlenmesi, Rho proteini sinyal iletiminin düzenlenmesi, kimyasal sinaptik iletim, RNA polimeraz II promotöründen transkripsiyonun düzenlenmesi, hücre döngüsünün düzenlenmesi, sinyal iletimi, kalp kası hücresi aksiyon potansiyeli sırasında membran depolarizasyonu, sinaptik vezikül kümelenmesi, peptidil-serin fosforilasyonu, nükleer ihracat, strese hücresel tepkinin düzenlenmesi, hücre çoğalmasının negatif düzenlenmesi, kasılmada yer alan kalp kası hücresi aksiyon potansiyeli, uzuv morfogenez, NMDA reseptör aktivitesinin düzenlenmesi, Ras proteini sinyal iletimi sinapsta protein lokalizasyonu, mitotik hücre döngüsünün G1/S geçişinde yer alan

transkripsiyonun düzenlenmesi ve dönüştürücü büyüme faktörü beta reseptör sinyal yolunun negatif regülasyonu gibi süreçlerde görev aldıkları belirlenmiştir (Tablo 3.4). Hücresel komponent olarak yer aldıkları bölgeler ise zar, nükleoplazma, sinaptik vezikül, endoplazmik retikulum, nükleer içirme gövdesi, erken endozom, voltaj kapılı sodyum kanalı kompleksi, sitoplazma, schaffer yan - CA1 sinapsı, PML gövdesi ve akson gibi hücresel yapılardır (Tablo 3.5). Moleküler fonksiyonları ise transkripsiyonel aktivatör aktivitesi, transkripsiyon faktörü aktivitesi, fosfatidilinositol-3,4-bisfosfat bağlanması, fosfatidilinositol-3-fosfat bağlanması, kalp kası hücresi aksiyon potansiyelinde yer alan voltaj kapılı sodyum kanalı aktivitesi, diziye özgü DNA bağlanması, magnezyum, kalsiyum iyonu bağlama, guanil-nükleotid değişim faktörü aktivitesi, voltaj kapılı iyon kanalı aktivitesi, çekirdek promotörü proksimal bölge dizisine özgü DNA bağlanması, protein bağlanması, protein serin/treonin kinaz aktivitesi ve küçük GTPaz bağlanması gibi fonksiyonlara sahip oldukları belirlenmiştir (Tablo 3.6).

Tablo 3.3. miR-125b-5p'nin Tahmini Hedef Genlerinin KEGG Pathway Analizleri

Terim	Sayısı	PValue	Genler
Salmonella enfeksiyonu	5	0,03	<i>PODXL, BAK1, MAP2K7, CYTH1, PIK3C2B</i>
Kronik miyeloid lösemi	3	0,05	<i>E2F2, BAK1, GAB2</i>
Endoplazmik retikulumda protein işleme	4	0,05	<i>ATXN3, BAK1, MAN1B1, MAP2K7</i>
MAPK sinyal yolu	5	0,06	<i>PPM1A, RASGRF2, RPS6KA1, MKNK2, MAP2K7</i>
Küçük hücreli akciğer kanseri	3	0,08	<i>COL4A3, E2F2, BAK1</i>
Epstein-Barr virüs enfeksiyonu	4	0,08	<i>ENTPD1, E2F2, BAK1, MAP2K7</i>
Nörodejenerasyon yolları - çoklu hastalıklar	6	0,08	<i>ATXN3, ATXN1, DVL3, BAK1, MAP2K7, ZFYVE1</i>

Tablo 3.4. miR-125b-5p'nin Tahmini Hedef Genlerinin Gene Ontology (GO)-Biyolojik Süreç (BP) Analizleri

Terim	Sayı	PValue	Genler
RNA polimeraz II promotöründen transkripsiyonun pozitif düzenlenmesi	14	0,01	<i>CSRNP1, FOXD2, ARID3B, ETS1, STOX2, NR6A1, TEF, ZFP62, MTF1, ASXL3, RPS6KA1, KPNA6, DVL3, E2F2</i>
Rho protein sinyal iletiminin düzenlenmesi	3	0,01	<i>CDC42SE1, AKAP13, RASGRF2</i>
Kimyasal sinaptik iletim	5	0,04	<i>ATXN3, NRXN1, RPS6KA1, BSN, SCN2B</i>
RNA polimeraz II promotöründen transkripsiyonun düzenlenmesi	15	0,04	<i>CSRNP1, FOXD2, ZBTB37, ZBTB34, ARID3B, ETS1, STOX2, NR6A1, TEF, ZFP62, ZNF704, MTF1, E2F2, RBAK, ZBTB7A</i>
Hücre döngüsünün düzenlenmesi	5	0,04	<i>PPM1A, CGREF1, E2F2, BAK1, CDK16</i>
Sinyal iletimi	12	0,05	<i>CDC42SE1, RIT1, SNX27, KCNIP3, NRXN1, RPS6KA1, SARM1, GAB2, PPP1R12B, OLFML2A, MAP2K7, YWHAG</i>
Kalp kası hücresi aksiyon potansiyeli sırasında membran depolarizasyonu	2	0,06	<i>SCN4B, SCN2B</i>
Sinaptik vezikül kümelenmesi	2	0,06	<i>NRXN1, BSN</i>
Peptidil-serin fosforilasyonu	4	0,06	<i>RPS6KA1, MKNK2, PDK3, BAK1</i>
Nükleer taşıma	2	0,06	<i>AKAP13, ATXN1</i>
Strese karşı hücreyel yanıtın düzenlenmesi	2	0,07	<i>BAK1, CORO2B</i>
Hücre çoğalmasının negatif düzenlenmesi	6	0,07	<i>CDH5, CGREF1, COL4A3, BAK1, ETS1, SSTR3</i>
Kasılmada rol oynayan kalp kası hücresi aksiyon potansiyeli	2	0,07	<i>SCN4B, SCN2B</i>
Uzuv morfogenez	2	0,07	<i>BAK1, MEGF8</i>
NMDA reseptör aktivitesinin düzenlenmesi	2	0,07	<i>NRXN1, RASGRF2</i>
Ras proteini sinyal iletimi	3	0,07	<i>RIT1, RASGEF1A, RASGRF2</i>
Sinaps protein lokalizasyonu	2	0,08	<i>NRXN1, BSN</i>
Mitotik hücre döngüsünün G1/S geçişinde yer alan transkripsiyonun düzenlenmesi	2	0,08	<i>E2F2, CDK16</i>
Dönüştürücü büyüme faktörü beta reseptör sinyal yolunun negatif düzenlenmesi	3	0,09	<i>PPM1A, SMURF1, ZBTB7A</i>
Sodyum iyonu transmembran taşıyıcı aktivitesinin düzenlenmesi	2	0,09	<i>SCN4B, SCN2B</i>

Tablo 3.5. miR-125b-5p'nin Tahmini Hedef Genlerinin Gene Ontology (GO)-Hücreyel Komponent (CC) Analizleri

Terim	Sayı	PValue	Genler
Membran	28	0,012	ANKRD13B, ATP10D, ZFYVE1, PIK3C2B, AKAP13, CDH5, NCLN, SNX27, PODXL, KPNA6, YWHAG, ENTPD1, NUP210, FNDC3B, NIPA1, TYSND1, CORO2B, PPM1A, RIT1, FRMD5, COL4A3, PPT1, GPR107, FAT4, MAN1B1, MEGF8, DCP1A, CDS2
Nükleoplazma	29	0,023	ELL, ATP10D, ETS1, PIK3C2B, CDH5, ATXN3, CHTF8, ATXN1, SNX27, DHX33, TDG, UBN1, RPS6KA1, MKNK2, KPNA6, E2F2, SMURF1, ZBTB37, PMM2, ZBTB34, ARID3B, PPM1A, NR6A1, MTF1, GPR107, TACC2, GRSF1, PPP1R12B, RBAK
Sinaptik Vezikül	4	0,024	RAB3D, PPT1, BSN, CDK16
Endoplazmik Retikulum	11	0,051	H6PD, KCNIP3, NRXN1, RASGRF2, COL4A3, ATP10D, BAK1, MAN1B1, ZFYVE1, PIK3C2B, CDS2
Nuclear inclusion body	2	0,056	ATXN3, ATXN1
Erken Endozom	5	0,063	ANKRD13B, SNX27, NIPA1, GPR107, TBC1D16
Voltaj-Kapılı Sodyum Kanal Kompleksi	2	0,079	SCN4B, SCN2B
Sitoplazma	35	0,083	CDC42SE1, ANKRD13B, DOCK3, ETS1, PHYHIP, PIK3C2B, AKAP13, STOX2, ATXN3, SAMD14, ATXN1, PRRC1, DHX33, PODXL, RPS6KA1, MKNK2, KPNA6, MAP2K7, ZBTB7A, YWHAG, CYTH1, SUN1, SMURF1, PMM2, GAB2, CORO2B, SSTR3, ABTB1, MTF1, SARM1, TACC2, GRSF1, PPP1R12B, DCP1A, CDK16
schaffer yan - CA1 sinapsı	3	0,085	SNX27, NRXN1, BSN
PML Gövdesi	3	0,092	TDG, MKNK2, UBN1
Akson	5	0,095	SMURF1, PPT1, ADAM11, SARM1, BSN

Tablo 3.6. miR-125b-5p'nin Tahmini Hedef Genlerinin Gene Ontology (GO)-Moleküler Fonksiyon (MF) Analizleri

Terim	Sayısı	PValue	Genler
Transkripsiyonel aktivatör aktivitesi, RNA polimeraz II transkripsiyon düzenleyici bölge dizisine özgü bağlanma	9	0,00	STOX2, CSRNP1, FOXD2, NR6A1, TEF, ZFP62, MTF1, E2F2, ETS1
Sekansa özgü çift sarmallı DNA bağlanması	9	0,01	FOXD2, NR6A1, TEF, ZNF704, MTF1, ZBTB37, E2F2, ETS1, ZBTB7A
Transkripsiyon faktörü aktivitesi, diziye özgü DNA bağlanması	9	0,01	CSRNP1, FOXD2, NR6A1, TEF, ZNF704, MTF1, E2F2, ETS1, ZBTB7A
Fosfatidilinositol-3,4-bisfosfat bağlanması	3	0,01	SESTD1, GAB2, ZFYVE1
RNA polimeraz II çekirdek promotör proksimal bölge dizisine özgü DNA bağlanması	13	0,02	FOXD2, KCNIP3, ZBTB37, ZBTB34, ETS1, NR6A1, TEF, ZFP62, ZNF704, MTF1, E2F2, RBAK, ZBTB7A
Fosfatidilinositol-3-fosfat bağlanması	3	0,02	SNX27, SESTD1, ZFYVE1
Kalp kası hücresi aksiyon potansiyelinde yer alan voltaj kapılı sodyum kanalı aktivitesi	2	0,03	SCN4B, SCN2B

Diziye özgü DNA bağlanması	6	0,03	<i>CSRNP1, FOXD2, NR6A1, TEF, E2F2, ETS1</i>
Magnezyum İyon Bağlama	5	0,03	<i>PPM1A, TDG, RPS6KA1, ATP10D, MAP2K7</i>
Guanil-nükleotid değişim faktörü aktivitesi	5	0,03	<i>AKAP13, DOCK3, RASGEF1A, RASGRF2, CYTH1</i>
Voltaj Kapılı İyon Kanal Aktivitesi	3	0,03	<i>KCNIP3, SCN4B, SCN2B</i>
Çekirdek promotör proksimal bölge dizisine özgü DNA bağlanması	3	0,04	<i>ELL, MTF1, E2F2</i>
Protein Aktivitesi	74	0,04	<i>CSRNP1, DOCK3, ELL, RAB3D, ETS1, ZFYVE1, PIK3C2B, AKAP13, CDH5, RUSC2, RPS6KA1, KPNA6, PDK3, BSN, YWHAG, FOXD2, SUN1, ENTPD1, NUP210, NIPA1, ZBTB34, GAB2, SSTR3, PPM1A, FRMD5, MTF1, COL4A3, RBM20, PPP1R12B, SCN4B, NRXN1, ATP10D, NPL, ATXN3, ATXN1, NCLN, PRRC1, SNX27, DHX33, PODXL, KCTD21, ZNF704, DPH2, TDG, UBN1, MKNK2, DVL3, E2F2, ARS1, BAK1, MAP2K7, ZBTB7A, CYTH1, TBC1D16, CGREF1, FAM78A, SMURF1, KCNIP3, PMM2, ARID3B, CORO2B, ABTB1, RIT1, TEF, SESTD1, PPT1, SARM1, FAT4, MEGF8, RBAK, GRSF1, DCP1A, CDK16, CDS2</i>
Protein Serin/Theroinin Kinaz Aktivitesi	6	0,05	<i>RPS6KA1, MKNK2, PDK3, ALPK3, MAP2K7, CDK16</i>
Küçük GTPaz Bağlama	5	0,06	<i>CDC42SE1, AKAP13, DOCK3, RUSC2, DVL3</i>
Kalsiyum İyon Bağlama	8	0,09	<i>CDH5, CGREF1, KCNIP3, NRXN1, NCAN, FAT4, MAN1B1, MEGF8</i>

miR-375 hedefi olarak belirlenen genlerin Pathway analizlerini incelediğimizde kanserde kolin metabolizması, insülin direnci, AMPK sinyal yolu, insülin sinyal yolu ve otofaji gibi sinyal yollarında görev aldıkları görülmüştür. Tablo 3.7’de hangi genlerin hangi sinyal yolları ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. DAVID veritabanından elde edilen analizlerde ise genlerin gene ontology (GO) - Biyolojik Süreçler (BP), Hüresel Component (CC) ve moleküler fonksiyonları (MF) ile ilgili veriler toplanmıştır. Yer aldıkları biyolojik süreçlere bakıldığında oksidatif stres kaynaklı nöron ölümünün negatif düzenlenmesi, kokaine yanıt, çağrışimsal öğrenme, epidermal büyüme faktörü reseptörü sinyal yolu, RNA polimeraz II promotöründen transkripsiyonun pozitif düzenlenmesi, sinaptik iletimin modülasyonu gibi süreçlerde görev aldıkları belirlenmiştir (Tablo 3.8). Hüresel komponent olarak yer aldıkları bölgeler ise hücre iskeleti, çekirdek, büyüme konisi gibi hüresel yapılardır (Tablo 3.9). Moleküler fonksiyonunun ise sadece diziye özgü çift sarmallı DNA bağlanması fonksiyonuna sahip olduğu belirlenmiştir (Tablo 3.10).

Tablo 3.7. miR-375'in Tahmini Hedef Genlerinin KEGG Pathway Analizleri

Term	Count	PValue	Genes
Kanserde kolin metabolizması	2	0,068	<i>PDPK1, TSC1</i>
İnsülin direnci	2	0,074	<i>PDPK1, PPARGC1B</i>
AMPK sinyal yolu	2	0,083	<i>PDPK1, TSC1</i>
İnsülin sinyal yolu	2	0,093	<i>PDPK1, TSC1</i>
Otofaji	2	0,096	<i>PDPK1, TSC1</i>

Tablo 3.8. miR-375'in Tahmini Hedef Genlerinin Gene Ontology (GO)-Biyolojik Süreç (BP) Analizleri

Term	Count	PValue	Genes
Oksidatif stres kaynaklı nöron ölümünün negatif düzenlenmesi	2	0,009	<i>TSC1, SLC7A11</i>
Kokaine yanıt	2	0,020	<i>ELAVL4, UBE3A</i>
Çağrışimsal öğrenme	2	0,024	<i>ELAVL4, TSC1</i>
Epidermal büyüme faktörü reseptörü sinyal yolu	2	0,034	<i>PDPK1, SOCS5</i>
RNA polimeraz II promotöründen transkripsiyonun pozitif düzenlenmesi	4	0,044	<i>ISL2, UBE3A, TCF4, PPARGC1B</i>
Sinaptik iletimin modülasyonu	2	0,055	<i>UBE3A, SLC7A11</i>

Tablo 3.9. miR-375'in Tahmini Hedef Genlerinin Gene Ontology (GO)-Hücreyel Komponent (CC) Analizleri

Term	Count	PValue	Genes
hücre iskeleti	3	0,045	<i>ELAVL4, TSC1, SLC7A11</i>
çekirdek	8	0,055	<i>ISL2, BNC2, PDPK1, ZBTB20, TSC1, UBE3A, TCF4, PPARGC1B</i>
büyüme konisi	2	0,084	<i>ELAVL4, TSC1</i>

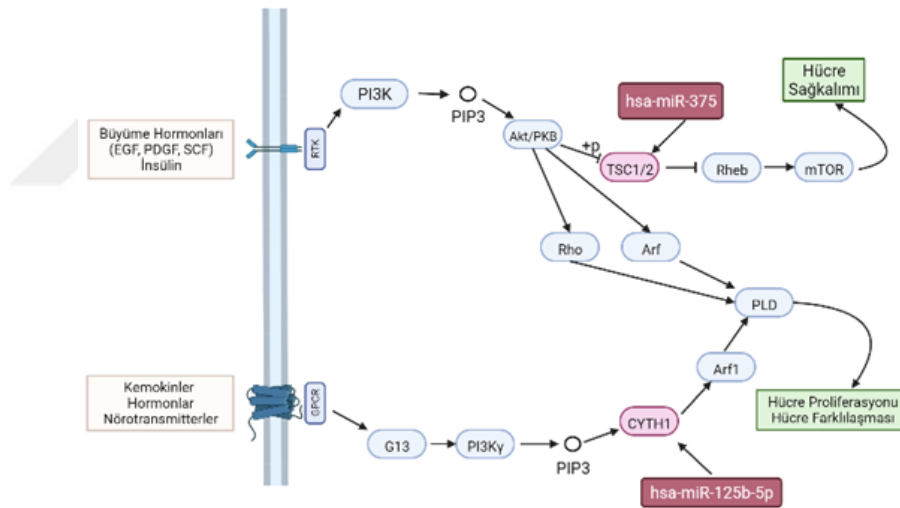
Tablo 3.10. miR-375'in Tahmini Hedef Genlerinin Gene Ontology (GO)-Moleküler Fonksiyon (MF) Analizleri

Term	Count	PValue	Genes
Diziye özgü çift sarmallı DNA bağlanması	3	0,055	<i>ISL2, ZBTB20, TCF4</i>

KEGG Pathway veritabanı (<https://www.kegg.jp>) gibi veritabanları kullanılarak yapılan daha ayrıntılı analizlerde miR-125b-5p ve miR-375'in tahmini olarak hedefi olarak belirlenen genlerin ilişkili olduğu sinyal yolları daha ayrıntılı olarak incelenmiştir. Buradan elde edilen sonuçlar PI3K sinyal yoluna yönlendirmiştir. MiRNA hedef tahmin programlarında ortak olan genlerden miR-125b-5p için *CYTH1*, *CYTH2*, *GAB2* ve *GRB10* ve miR-375 için ise *TSC1* ve *PDPK1* ile genlerinin PI3K sinyal yolunda görevli oldukları yapılan incelemelerle

belirlenmiştir. *ITGA10*, *GAB2* gibi genler PI3K'nın uyarımını gerçekleştirirken, *TSC1*, *CYTH1* gibi genler ise PI3K sinyalleri tarafından uyarılan genler arasında yer almaktadır.

MiR-375'in hedef geni olarak tespit edilen *TSC1* geni büyüme hormonları ve insülin tarafından uyarılan PI3K sinyal yolunda görev alan bir moleküldür. Uyarılan PI3K ve onun lipid ürünü fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfatın (PIP3) uyarımını gerçekleştirerek AKT'yi aktive eder. AKT ise *TSC1*'i baskılayarak mTOR üzerinden hücre sağkalımı gibi önemli mekanizmalara aracılık eder. Bir diğer molekülümüz *CYTH1* ise kemokinler, hormonlar ve nörotransmitterler tarafından aktive edilen PI3K ile uyarılır. *Cytl1* proteini ise ARF1 üzerinden PLD sinyal yolunu aktive eder. Uyarılan PLD ise MAPK sinyal yolunu indükleyerek hücre proliferasyonu ve hücre farklılaşması gibi önemli mekanizmaların düzenlenmesinde görev almaktadır. Biorender Programı ile oluşturulan sinyal yolunun özetinin şematik gösterimi Şekil 3.3'te gösterilmiştir. Yapılacak olan projemizde bu genler arasından literatürde çalışma bulunmayan *TSC1* ve *CYTH1* geninin çalışılmasına karar verilmiştir.

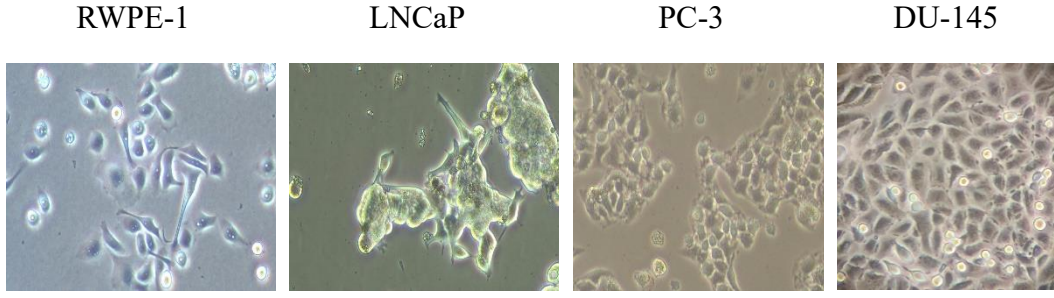


Şekil 3.3. KEGG Pathway veritabanından elde edilen miR-375 ve miR-125-5p'nin etkili olduğu düşünülen sinyal yolağı özeti.

Kaynak: (<https://www.biorender.com/>)

3.4.Hücre Kültürü

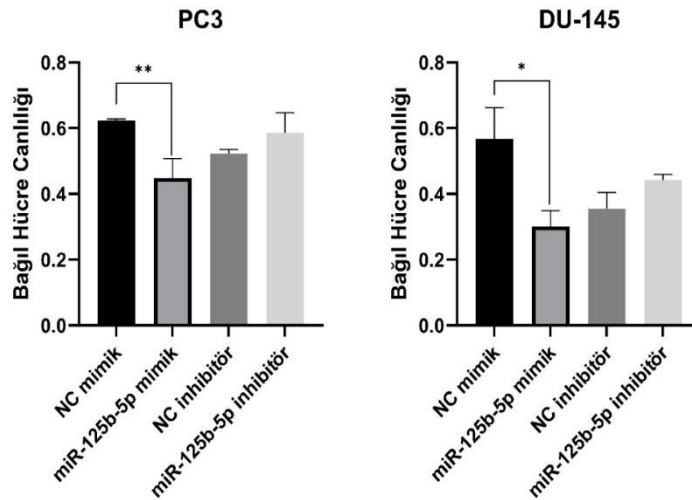
RWPE-1 (normal prostat epitel hücresi), androjen-duyarlı LNCaP prostat kanser hücresi, androjen-duyarsız PC-3 ve DU-145 prostat kanser hücreleri uygun kültür koşullarında büyütülmüştür ve deneylerde kullanılmıştır. Şekil 3.4.'te hücrelere ait görüntüler yer almaktadır. Hücre görüntüleri inverted mikroskop (Nikon TS100) kullanarak çekilmiştir. Görüntüler 10X büyütme ile elde edilmiştir.



Şekil 3.4. RWPE-1, LNCaP, PC-3 ve DU-145 hücre görüntüleri.

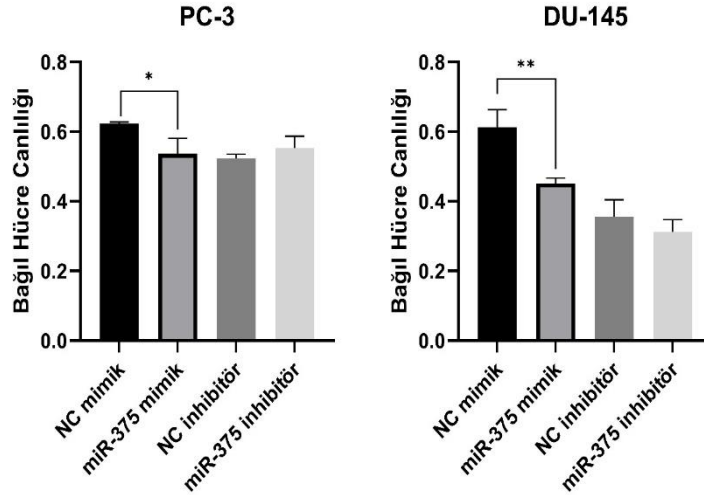
3.5.miR-125b-5p ve miR-375'in Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri

MiR-375 ve miR-125b-5p transfeksiyon uygulamasının PC-3 ve DU-145 hücrelerinde hücre canlılığına etkisinin incelenmesi amacıyla hücrelere kristal viyole ile hücre canlılığı testi uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar neticesinde PC-3 ve DU-145 hücrelerinin her ikisinde de etkilerinin benzer olduğu görülmüştür. MiR-125b-5p mimik ve inhibitör uygulanan PC-3 ve DU-145 hücrelerindeki sonuçlar incelendiğinde miR-125b-5p ekspresyon artışının hücre canlılığını baskıladığı görülmektedir (sırasıyla $p<0,05$, $p<0,01$). MiR-125b-5p ekspresyonunun baskılanması ise her iki hücrede de anlamlı düzeyde bir farklılığa sebep olmamıştır (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. PC-3 ve DU-145 hücrelerinde miR-125b-5p ekspresyon değişikliklerinin hücre canlılığına etkisinin gösterilmesi.

Mimik ve inhibitör uygulaması ile ekspresyonu düzenlenen miR-375'in PC-3 ve DU-145 hücrelerindeki sonuçları incelendiğinde ise ekspresyon artışının miR-125b-5p'deki sonuçlara benzer şekilde hücre canlılığını baskıladığı görülmektedir (sırasıyla $p<0,05$, $p<0,01$). MiR-375 ekspresyonunun baskılanması ise anlamlı düzeyde bir farklılığa sebep olmamıştır (Şekil 3.6).



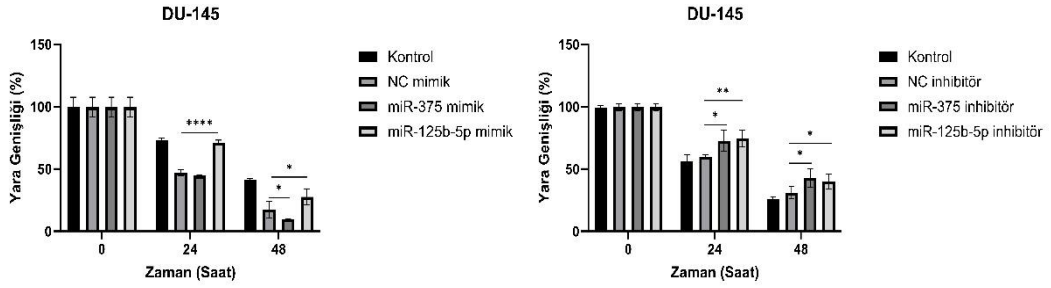
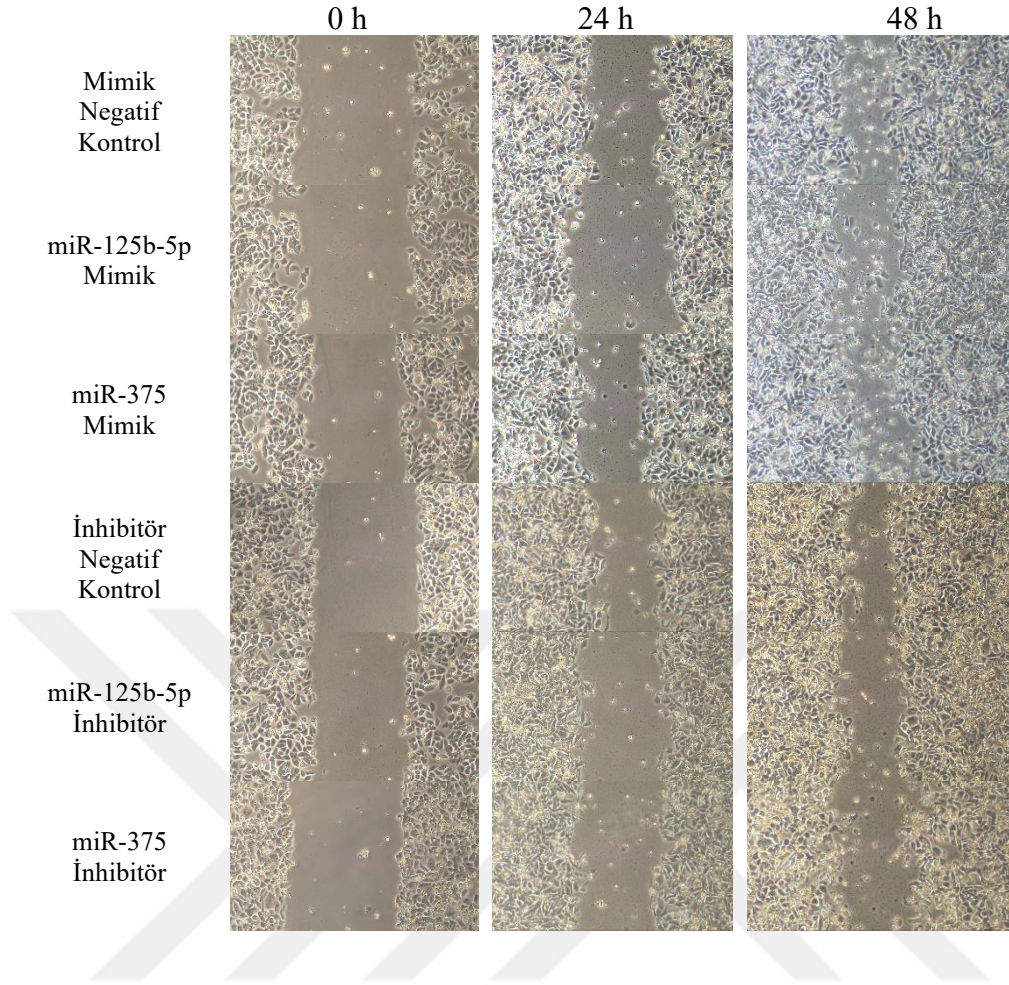
Şekil 3.6. PC-3 ve DU-145 hücrelerinde miR-375 ekspresyon değişikliklerinin hücre canlılığına etkisinin gösterilmesi.

3.6.miR-125-5p ve miR-375'in Hücre Göçü Üzerine Etkileri

Bu çalışmada, DU-145 hücrelerinde miR-125b-5p ve miR-375'in hücre göçü üzerine etkisini araştırmak için yara iyileşme deneyi kullanılmıştır. Yara genişliği elde edilmiş, 0, 24 ve 48. saatlerde yara oluşumundan sonra ölçümler gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar, mimik ve inhibitör negatif kontrole kıyasla yara genişliğindeki değişikliklere göre değerlendirilmiştir. Anlamlılık seviyeleri student t-testi kullanılarak $p < 0,05$ olarak belirlenmiştir.

İncelendiğinde miR-125b-5p'nin ekspresyon artışının negatif kontrole kıyaslandığında DU-145 hücrelerinde hem 24 ve 48. saatlerde yara genişliğinin artmasına neden olmuştur (sırasıyla $p < 0,001$, $p < 0,05$). miR-125b-5p'nin ekspresyonundaki azalma ise negatif kontrole kıyaslandığında hücre göçünü azaltmış ve hem 24 hem de 48. saatlerde yara genişliğinin artmasına yol açmıştır (sırasıyla $p < 0,01$, $p < 0,05$) (Şekil 3.7).

miR-375 mimik ve inhibitörleri uygulanan DU-145 hücrelerindeki sonuçlar değerlendirildiğinde, miR-375 ekspresyon artışı DU-145 hücrelerini 24. saatte anlamlı düzeyde etkilememiştir. Ancak yara genişliği 48. saatte azalmıştır ($p < 0,05$) (Şekil 3.7). Burada ilgi çekici olan, miR-375 ekspresyonunun baskılanması sonucu DU-145 hücrelerinde hem 24 saat hem de 48 saatte yara genişliğindeki artıştır ($p < 0,05$) (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. DU-145 hücrelerindeki yara iyileşme deneyi sonuçları.

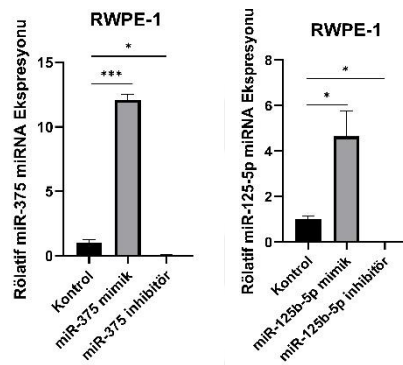
3.7.Gen Ekspresyon Analizleri

3.7.1.miRNA Ekspresyon Analizleri

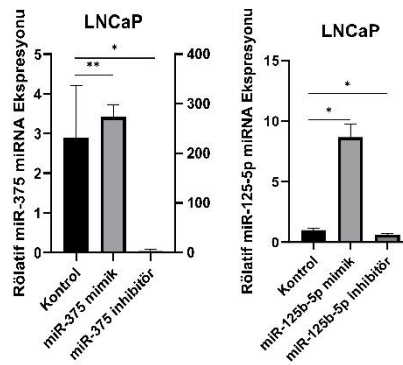
Projedeki amaç doğrultusunda miR-375 ve miR-125b-5p'nin PKa hücreleri üzerinde PI3K sinyal yoluna etkilerinin incelenebilmesi için öncelikle transfeksiyon yoluyla hücrelere ilgili miRNA'lara ait mimik/inhibitörler uygulanmıştır. Uygulama esnasında öncelikle transfeksiyon işleminin optimizasyonu gerçekleştirilmiş ve bunun üzerine asıl deneyler kurulmuştur. MiRNA ekspresyonları U6 geni kullanılarak normalleştirilmiştir. Veriler $2^{-\Delta\Delta Ct}$

yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir. Gruplar arasındaki farkları incelemek için Student's t-Testi kullanılmıştır. Kontrol grubu ile kıyaslandığında örnekler arasındaki anlamlılık düzeyleri $<0,05$ olanlar anlamlı kabul edilmiştir.

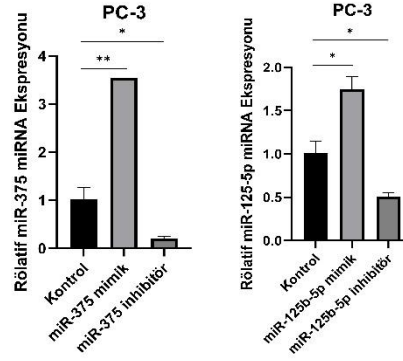
Elde edilen sonuçlar Şekil 3.8., Şekil 3.9., Şekil 3.10. ve Şekil 3.11.'de verilmiştir. Veriler incelendiğinde kontrol grubu ile kıyaslandığında her üç hücrede de mimik uygulanan örneklerde miR-375 ve miR-125b-5p seviyelerinin artış gösterdiği, inhibitör uygulanan örneklerde ise azalma olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar neticesinde gen ekspresyonlarını incelemek üzere RNA izolasyonu yapılması amacıyla deney setleri kurulmuş ve ilgili genlerin ekspresyon seviyeleri qPCR çalışmaları ile incelenmiştir.



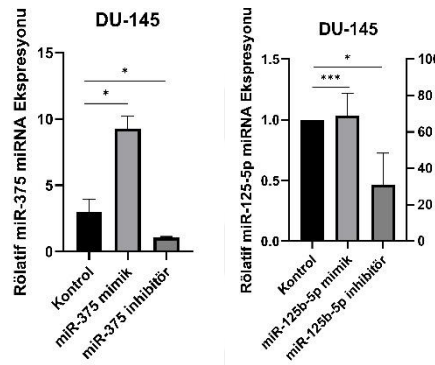
Şekil 3.8. RWPE-1 hücrelerinin mimik/inhibitör transfeksiyonu sonrası miR-375 ve miR-125b-5p miRNA ekspresyon seviyelerinde gözlenen değişiklikler.



Şekil 3.9. LNCaP hücrelerinin mimik/inhibitör transfeksiyonu sonrası miR-375 ve miR-125b-5p miRNA ekspresyon seviyelerinde gözlenen değişiklikler.



Şekil 3.10. PC-3 hücrelerinin mimik/inhibitör transfeksiyonu sonrası miR-375 ve miR-125b-5p miRNA ekspresyon seviyelerinde gözlenen değişiklikler.

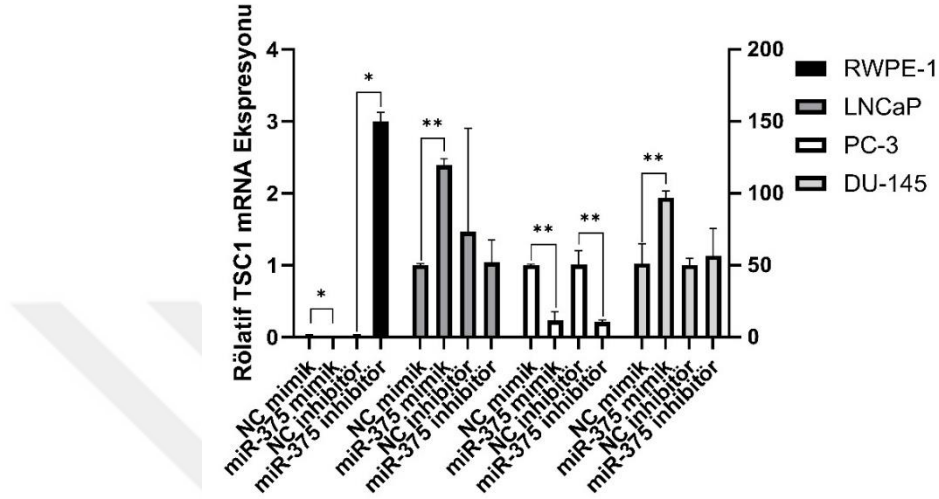


Şekil 3.11. DU-145 hücrelerinin mimik/inhibitör transfeksiyonu sonrası miR-375 ve miR-125b-5p miRNA ekspresyon seviyelerinde gözlenen değişiklikler.

3.7.2. mRNA Ekspresyon Analizleri

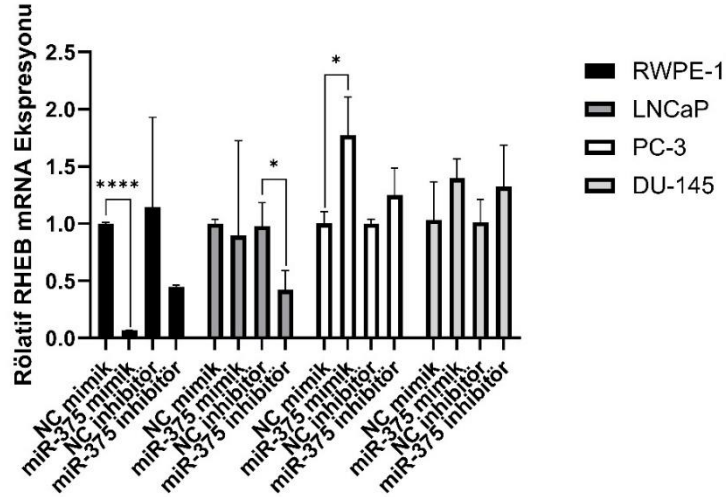
MiR-375'in hedeflediği genlerin bulunduğu sinyal yolunda yer alan *TSC1*, *PIK3CA*, *RHEB* ve *mTOR* genlerinin mRNA seviyelerinin araştırılması amacıyla mimikler ve inhibitörlerin uygulandığı örneklerden elde edilen RNA'lara qPCR işlemi uygulanmıştır. Veriler 2- $\Delta\Delta C_t$ yöntemiyle analiz edilmiş, *GAPDH* ile normalize edilmiştir. $p < 0,05$ değerinin altındaki değerler anlamlı kabul edilmiştir. P değerleri Student t testi ile hesaplanmıştır. Aynı zamanda kontrol amacıyla öncesinde mimik/inhibitör uygulanan örneklerin miRNA seviyelerinin artırılıp/azaltıldığı gösterilmiştir. Kontrol amacıyla aynı zamanda herhangi bir işlem uygulanmayan hücre grubu ve mimik/inhibitör'lere ait pozitif kontrollere de qPCR işlemi uygulanmıştır. Fakat değerlendirmeler negatif kontroller üzerinden yapıldığı için sonuçlar içerisinde sunulmamıştır. MiR-375'in hedefi olduğu düşünülen *TSC1* geninin qPCR sonuçları incelendiğinde mimik ve inhibitör negatif kontrolü uygulanan örneklerle kıyaslandığında her üç hücrede de farklı ekspresyon seviyeleri gösterdiği görülmektedir. Bakıldığında mimik uygulanan örneklerde RWPE-1 ve PC-3 hücrelerinde *TSC1* mRNA seviyelerinde anlamlı bir

azalma (sırasıyla $p<0,05$, $p<0,01$) gözlenirken, LNCaP ve DU-145 hücrelerinde anlamlı düzeyde bir artış ($p<0,01$) gözlenmiştir. İnhibitör uygulanan hücrelerde ise RWPE-1 hücresinde anlamlı bir artış ($p<0,05$) gözlenirken, PC-3 hücresinde anlamlı düzeyde azalma ($p<0,01$) gözlenmiştir. LNCaP ve DU-145 hücrelerinde ise anlamlı düzeyde bir değişiklik olmamıştır (Şekil 3.12).



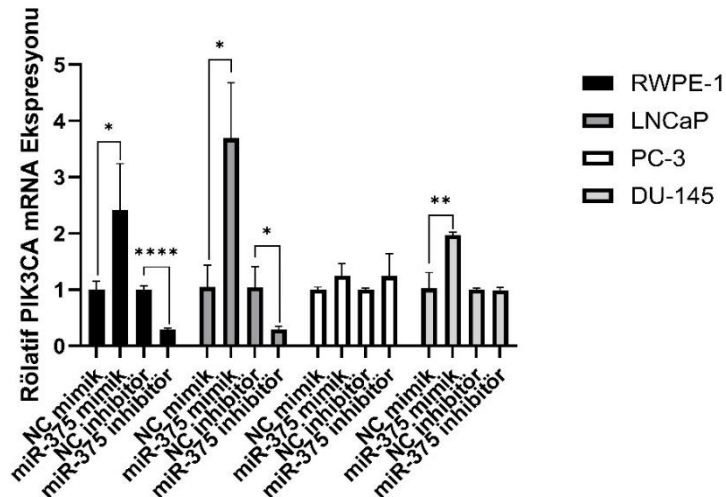
Şekil 3.12. RWPE-1, LNCaP, PC-3 ve DU-145 hücrelerinde miR-375 mimik/inhibitör uygulaması sonrasında qPCR ile *TSC1* gen ekspresyonunun göreceli seviyelerinin analizi.

MiR-375'in hedefi olduğu düşünülen sinyal yolunda görevli olan *RHEB* geninin qPCR sonuçları incelendiğinde mimik ve inhibitör negatif kontrolü uygulanan örneklerle kıyaslandığında tüm hücrelerin farklı ekspresyon seviyeleri gösterdiği görülmektedir. Bakıldığında mimik uygulanan örneklerde RWPE-1 hücrelerinde anlamlı düzeyde azalma ($p<0,0001$) gözlenirken, PC-3 hücrelerinde anlamlı düzeyde artış ($p<0,05$) gözlenmektedir. Buna karşılık LNCaP hücrelerinde anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. İnhibitör uygulanan örnekler incelendiğinde ise RWPE-1 ve PC-3 hücrelerinde anlamlı düzeyde bir farklılık gözlenmezken, LNCaP hücrelerinde *RHEB* mRNA seviyelerinin azaldığı ($p<0,05$) gözlenmektedir. DU-145 hücrelerinde ise mimik/inhibitör uygulanan hücrelerin hiçbirisinde anlamlı değişiklik gözlenmemiştir (Şekil 3.13).



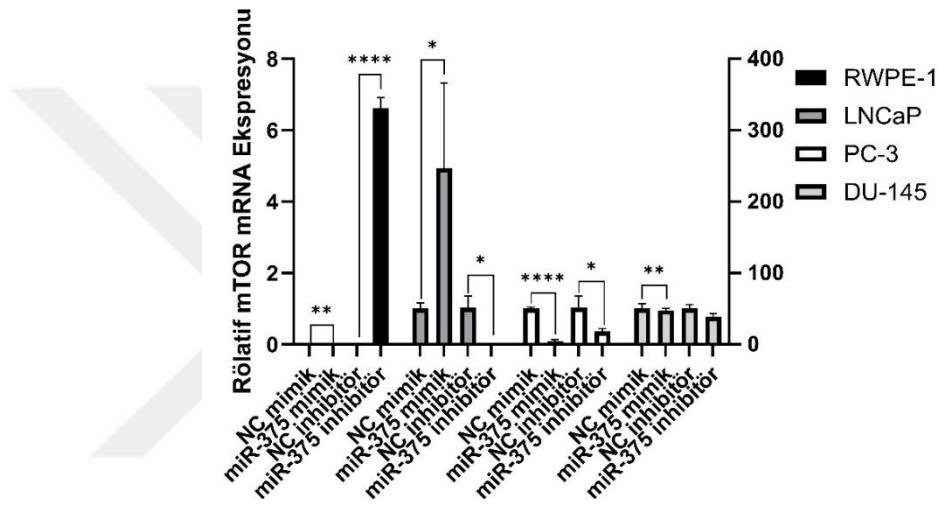
Şekil 3.13. RWPE-1, LNCaP, PC-3 ve DU-145 hücrelerinde miR-375 mimik/inhibitör uygulaması sonrasında qPCR ile *RHEB* gen ekspresyonunun göreceli seviyelerinin analizi.

PI3K sinyal yolunda görevli olan Sınıf IA PI3K'nın katalitik alt ünitesi olan p110 α (PIK3CA)'nın qPCR sonuçları incelendiğinde mimik ve inhibitör negatif kontrolü uygulanan örneklerle kıyaslandığında RWPE-1 ve LNCaP hücreleri benzer sonuçlar sergilerken, PC-3 hücrelerinde gözlenen ekspresyon seviyeleri farklılık göstermiş ve anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Mimik uygulanan hücreler incelendiğinde negatif kontrolle kıyaslandığında RWPE-1, LNCaP ve DU-145 hücrelerinde anlamlı düzeyde artış (sırasıyla $p<0,05$, $p<0,05$, $p<0,01$) göze çarpmaktadır. Aynı şekilde inhibitör uygulanan örnekler incelendiğinde her iki hücrede de azalma (sırasıyla $p<0,0001$, $p<0,05$) gözlenmektedir (Şekil 3.14).



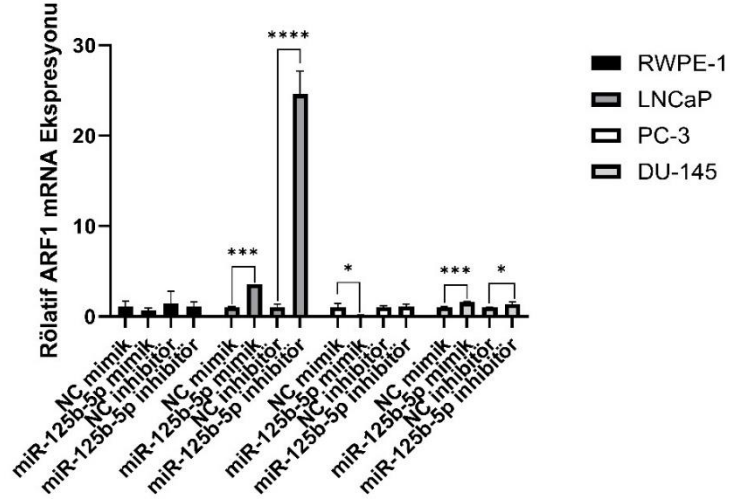
Şekil 3.14. RWPE-1, LNCaP, PC-3 ve DU-145 hücrelerinde miR-375 mimik/inhibitör uygulaması sonrasında qPCR ile *PIK3CA* gen ekspresyonunun göreceli seviyelerinin analizi.

PI3K sinyal yolunda görevli olan bir diğer sinyal molekülü olan *mTOR* geninin qPCR sonuçları incelendiğinde mimik ve inhibitör negatif kontrolü uygulanan örneklerle kıyaslandığında her üç hücrede de farklı ekspresyon seviyeleri gösterdiği görülmektedir. Örnekler ayrı ayrı analiz edildiğinde mimik uygulanan örneklerde sonuçlar negatif kontrol uygulananlarla kıyaslandığında RWPE-1 ve PC-3 hücrelerinde anlamlı düzeyde azalma (sırasıyla $p<0,01$, $p<0,0001$) gözlenirken, LNCaP hücrelerinde artış ($p<0,05$) göze çarpmaktadır. İnhibitör uygulanan örneklerde ise RWPE-1 hücrelerinde artış ($p<0,0001$) gözlenirken, LNCaP ve PC-3 hücrelerinde azalma ($p<0,05$) olduğu gözlenmiştir. DU-145 hücrelerinde ise herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir (Şekil 3.15).



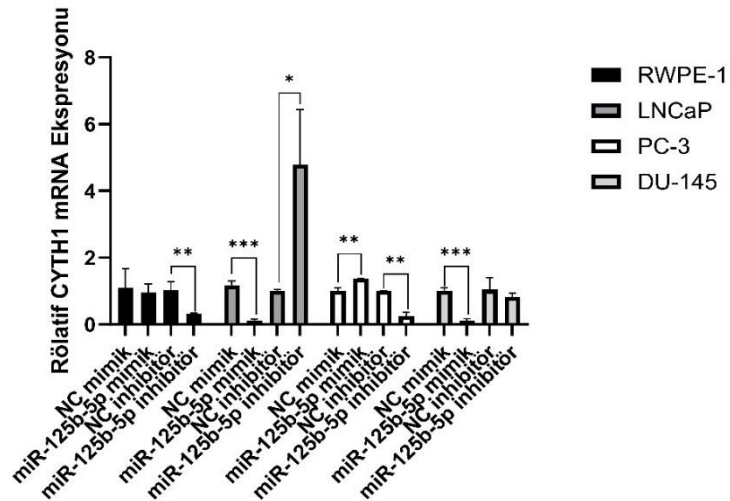
Şekil 3.15. RWPE-1, LNCaP, PC-3 ve DU-145 hücrelerinde miR-375 mimik/inhibitör uygulaması sonrasında qPCR ile *mTOR* gen ekspresyonunun göreceli seviyelerinin analizi.

Çalışmamızda yer alan diğer miRNA ilişkilendirilen sinyal yolunda görev alan genlerin ekspresyon seviyeleri de qPCR yöntemi ile incelenmiştir. Bu doğrultuda miR-125b-5p mimik/inhibitör transfeksiyonu yapılan örneklerden RNA izolasyonu yapılmış ve cDNA dönüşümü sonrasında ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler incelenmiştir. Sonuçlar tek tek incelendiğinde *ARF1* geninin mRNA seviyelerinde hücreler arasında farklılıklar olduğu göze çarpmaktadır. RWPE-1 hücrelerinde mimik/inhibitör uygulanan örneklerde anlamlı düzeyde bir değişiklik gözlenmemiştir. Buna karşılık mimik uygulanan örneklerde LNCaP ve DU-145 hücrelerinde artış gözlenirken ($p<0,001$), PC-3 hücrelerinde azalma ($p<0,05$) göze çarpmaktadır. İnhibitör uygulanan örneklerde ise LNCaP ve DU-145 hücrelerinde *ARF1*'in mRNA seviyelerinin artış (sırasıyla $p<0,0001$ ve $p<0,05$) gösterdiğini görmekteyiz (Şekil 3.16).



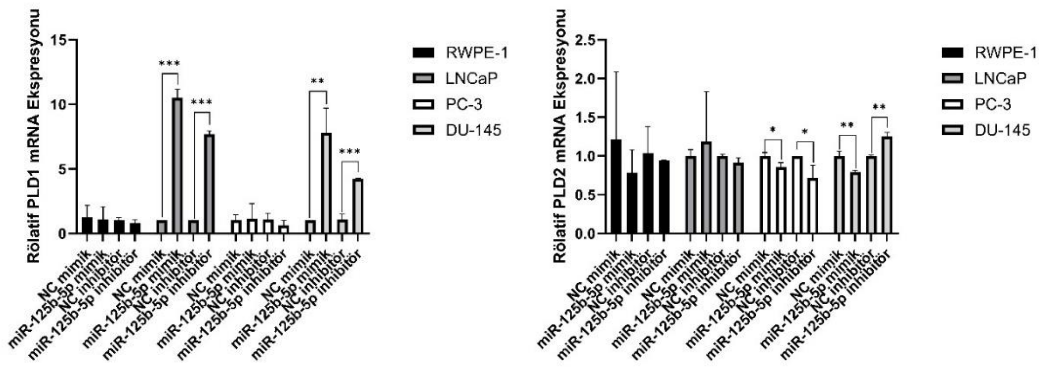
Şekil 3.16. RWPE-1, LNCaP, PC-3 ve DU-145 hücrelerinde miR-125b-5p mimik/inhibitör uygulaması sonrasında qPCR ile *ARF1* gen ekspresyonunun göreceli seviyelerinin analizi.

CYTH1 geninin mRNA ekspresyon seviyelerinin incelenmesi yapıldığında her üç hücrede farklı ekspresyon seviyeleri gösterdiği göze çarpmaktadır. Mimik uygulanan örneklerle bakıldığında RWPE-1 hücrelerinde anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. LNCaP ve DU-145 hücrelerinde azalma ($p < 0,001$), PC-3 hücrelerinde ise artış gözlenmektedir ($p < 0,01$). İnhibitör uygulananlarda ise RWPE-1 ve PC-3 hücrelerinde azalma meydana gelirken ($p < 0,01$), LNCaP hücrelerinde artış gözlenmiştir ($p < 0,05$). Bunun yanı sıra inhibitör uygulanan DU-145 hücrelerinde ise değişiklik gözlenmemiştir (Şekil 3.17).



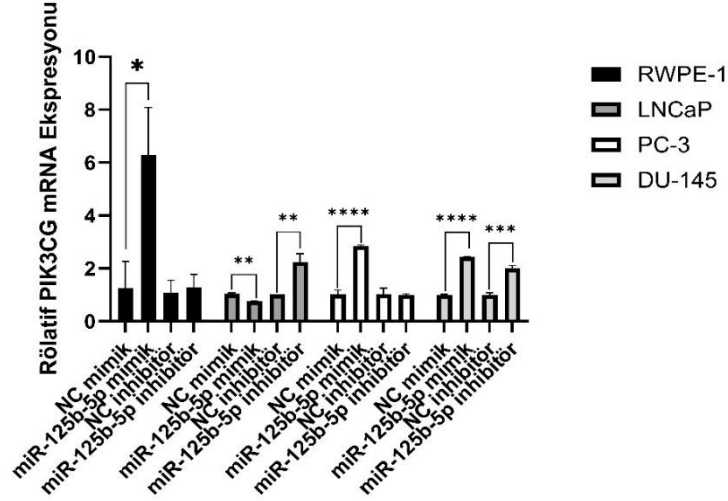
Şekil 3.17. RWPE-1, LNCaP, PC-3 ve DU-145 hücrelerinde miR-125b-5p mimik/inhibitör uygulaması sonrasında qPCR ile *CYTH1* gen ekspresyonunun göreceli seviyelerinin analizi.

Sinyal yolunun kilit moleküllerinden *PLD1* ve *PLD2*'nin mRNA ekspresyon seviyeleri üzerine miR-125b-5p'nin etkisi incelendiğinde anlamlı düzeyde değişiklik fazla olmamıştır. *PLD1* geninde sadece LNCaP hücrelerinde mimik ve inhibitör uygulanan her iki hücrede de artış gözlenmiştir ($p<0,001$). Diğer iki hücrede bir değişiklik gözlenmemiştir. *PLD2* geninde ise sadece PC-3 hücrelerinde mimik ve inhibitör uygulanan örneklerde anlamlı düzeyde azalma meydana gelirken ($p<0,05$), diğer iki hücrede değişiklik gözlenmemiştir. DU-145 hücreleri incelendiğinde ise mimik uygulanan örneklerde *PLD1* geninde artış gözlenirken ($p<0,01$), *PLD2* geninde azalma meydana gelmiştir ($p<0,01$). İnhibitör uygulanan örneklerde ise hem *PLD1* hem de *PLD2* geninde artış gözlenmiştir (sırasıyla $p<0,001$ ve $p<0,01$) (Şekil 3.18).



Şekil 3.18. RWPE-1, LNCaP, PC-3 ve DU-145 hücrelerinde miR-125b-5p mimik/inhibitör uygulaması sonrasında qPCR ile *PLD1* ve *PLD2* gen ekspresyonunun göreceli seviyelerinin analizi.

Son olarak Sınıf IB PI3K katalitik alt ünitesi p110 γ (PIK3CG)'nın mRNA ekspresyon seviyelerinin incelenmesi yapılmıştır. Elde edilen qPCR sonuçları değerlendirilmiştir. Sonuçlar neticesinde mimik uygulanan örnekler bakıldığında RWPE-1, PC-3 ve DU-145 hücrelerinin artış gösterdiği (sırasıyla $p<0,05$, $p<0,0001$, $p<0,0001$) gözlenirken, LNCaP hücrelerinde azalma ($p<0,01$) meydana gelmiştir. İnhibitör uygulanan örneklerin incelenmesi yapıldığında ise RWPE-1 ve PC-3 hücrelerinde anlamlı bir değişiklik meydana gelmezken, LNCaP ve DU-145 hücrelerinde anlamlı düzeyde artış (sırasıyla $p<0,01$, $p<0,0001$) olduğu gözlenmektedir (Şekil 3.19.).



Şekil 3.19. RWPE-1, LNCaP, PC-3 ve DU-145 hücrelerinde miR-125b-5p mimik/inhibitör uygulaması sonrasında qPCR ile *PIK3CG* gen ekspresyonunun göreceli seviyelerinin analizi.

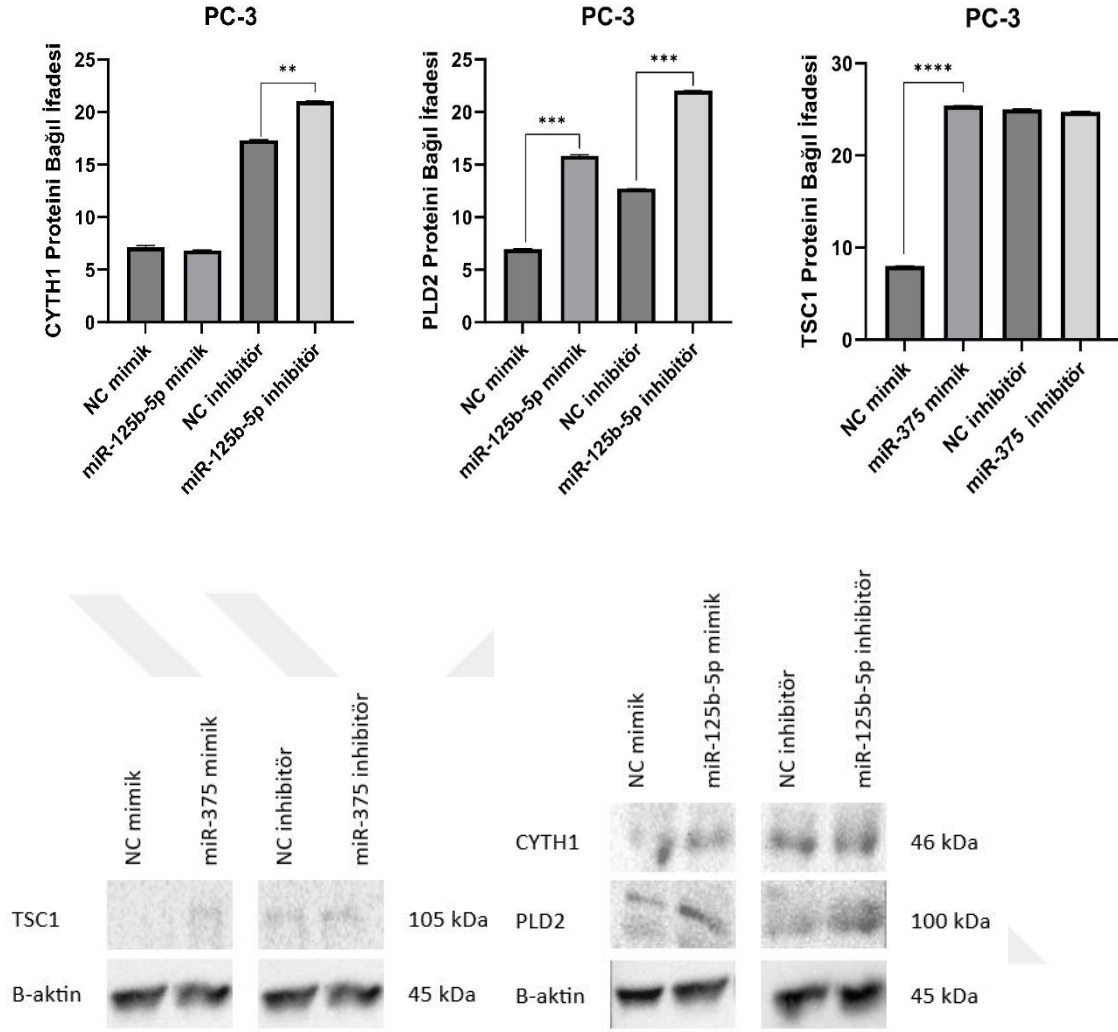
3.8. Protein Ekspresyon Analizleri

miR-375'in ve miR-125b-5p'nin hedeflediği genlerin bulunduğu sinyal yolunda yer alan Tsc1, Cyth1, Pld2 protein seviyelerinin araştırılması amacıyla mimikler ve inhibitörlerin uygulandığı PC-3 hücrelerinden elde edilen protein örneklerine western blotlama işlemi uygulanmıştır. Veriler Image J programı kullanılarak analiz edilmiştir. Kontrol olarak β -aktin kullanılmış ve değerler normalize edilmiştir. $p < 0,05$ değer altındaki değerler anlamlı kabul edilmiştir. P değerleri Student t testi ile hesaplanmıştır.

Elde edilen veriler neticesinde Cyth1 protein ekspresyonları negatif kontrollerle kıyaslandığında miR-125b-5p ekspresyon artışı farklılığa sebep olmazken, miR-125b-5p ekspresyonundaki azalma Cyth1 proteininin ekspresyon seviyelerini artırmıştır ($p < 0,01$) (Şekil 3.20).

miR-125b-5p mimik/inhibitörleri uygulanan hücrelerden elde edilen protein örneklerindeki Pld2 protein ekspresyon seviyelerindeki değişimler incelendiğinde miR-125b-5p'nin ekspresyon artışı da azalması Pld2'nin protein seviyelerinin artmasına sebep olmuştur ($P < 0,001$) (Şekil 3.20).

MiR-375 mimik/inhibitörleri uygulanan hücrelerden elde edilen protein örneklerindeki Tsc1 protein ekspresyon seviyelerindeki değişimler incelendiğinde miR-375 ekspresyon artışı Tsc1 protein seviyelerini artırmıştır ($p < 0,0001$). Aksine miR-375 ekspresyon seviyelerindeki azalma Tsc1 protein seviyelerinde anlamlı düzeyde bir farklılığa yol açmamıştır (Şekil 3.20).



Şekil 3.20. PC-3 hücrelerinde miR-375 ve miR-125b-5p mimik/inhibitör uygulaması sonrasında western blotlama ile Cyth1, Pld2 ve Tsc1 protein ekspresyonunun göreceli seviyelerinin analizi.

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

TARTIŞMA

4. TARTIŞMA

Literatürde çok fazla çalışma olmasına rağmen şu anda mevcut olan rejimlerin hiçbiri tümörün ilerlemesini ve metastaz yapmasını durduramamaktadır. Geri dönüşü olmayan bir noktaya ulaşıldığında ise PKa'nın tedavisi zorlu olmaya devam etmekte ve bu da kaçınılmaz olarak geriye kalan tek önlem olan palyatif tedaviye yol açmaktadır. Bu aşamadan önce tedavi mümkündür. Asıl mesele, geri dönüşü olmayan noktaya, farkına varılmadan ulaşılamamasıdır. Sonuç olarak, herhangi bir tümör belirtisini erken tespit etmek için dikkatli ve özenli bir tarama yapılması zorunludur. PSA testi ne yazık ki çok fazla gereksiz biyopsi nedeniyle itibarını kaybetmiş durumda ve bu da dayanılmaz yan etkilere neden olmaktadır. Geri dönüşü olmayan noktaya ulaştıktan sonra tümör, birden fazla sinyal yolunun dahil olduğu heterojen bir hale gelmektedir. Bu durumda, etkilenen yollardan bir veya daha fazlasının aktif olması, tümörün ilerlemesine ve metastaz yapmasına izin verebilecek başka bir yola geçmesini engelleyememektedir.

Bu sonuçlardan yola çıkarak çalışmada laboratuvarımızda yapılan çalışmalarda PKa'lı hastalardan alınan serum örneklerinde downregüle bulunan miR-375 ve miR-125b-5p'ye odaklanmak istedik (Dülgeroğlu & Eroğlu, 2019). Bu iki miRNA hem PKa gelişimine etki etmekte hem de metastatik PKa için biyobelirteç olma olasılığı yüksektir (Budd vd., 2015; Huang vd., 2015). Buradan yola çıkarak bu iki miRNA'nın daha önceki çalışmalarda da PI3K/Akt/mTOR sinyal yolundaki etkilerinin olduğu bilindiğinden bu sinyal yoluna odaklanılmıştır.

Öncelikle yapılan biyoinformatik analizlerle miRNA hedef programları kullanılarak miR-375 ve miR-125b-5p'nin hedeflediği genler listelenmiştir. Daha sonra bu genlerin etkili oldukları sinyal yolları araştırılmış ve içlerinden miR-375'in hedefi olduğu düşünülen *TSC1* geni ve miR-125b-5p'nin hedefi olduğu düşünülen *CYTH1* geni belirlenmiştir. Bu iki genin ortak özelliği PI3K molekülünün etki gösterdiği mTOR ve PLD sinyal yolunda görev almalarıdır (Şekil 3.3). Yaptığımız bu çalışmada bu sinyal yolunda etkili olan moleküllerin miR-375 ve miR-125b-5p'nin ekspresyon değişikliklerinden ne kadar etkilendiğini incelemektir. qPCR çalışmaları yardımıyla *PIK3CA*, *TSC1*, *mTOR*, *RHEB*, *PLD1*, *PLD2*, *ARF1*, *CYTH1*, *PIK3CG* gibi PI3K sinyal yolunda görev alan genlerin miR-375 ve miR-125b-5p mimic/inhibitörleri kullanılarak ekspresyon seviyelerinin artırılması/azaltılması sonrasında

mRNA düzeylerindeki değişimler ve Tsc1, Cyth1 ve Pld2'nin ise protein seviyeleri araştırılmıştır.

Çalışma için RWPE-1 (normal prostat epitel hücresi), LNCaP (prostat kanseri hücresi, AR+, hormona duyarlı), PC-3 ve DU-145 (prostat kanseri hücresi, AR-, kastrasyona dirençli) olmak üzere dört farklı karakterde hücre tercih edilmiştir (Saranyutanon vd., 2020). AR reseptörü dışında LNCaP ve PC-3, DU-145 hücrelerinde moleküler profil de göze çarpmaktadır. LNCaP hücreleri *P53* wild-type *PTEN* kayıp iken, PC-3 ve DU-145 hücrelerinde ise *P53* mutanttır (Chappell vd., 2012). *PTEN* ise DU-145 hücrelerinde heterozigot durumda fakat PC-3 hücrelerinde bulunmamaktadır (Boyacıoğlu, 2018; Rosser vd., 2004). Aynı zamanda çalışmada normal hücre ile kıyaslayarak oradaki farklılıkları da görmek istedik.

MiR-375 ikili bir role sahiptir ve hem onkomiR hem de tümör baskılayıcı olarak hareket edebilir. Costa-Pinheiro ve ark. miR-375 ekspresyon seviyelerinin prostat kanserinin ileri evrelerinde, özellikle lenf nodu metastazı olan hastalarda yüksek olduğunu göstermiştir (Costa-Pinheiro vd., 2015). Ayrıca bir çalışmada AR yokluğu ile DNMT aktivitesi arasında ters bir etki olduğu ve DNMT'nin miR-375 promotörünün metilasyon seviyelerini değiştirerek miR-375'i düzenlediği gösterilmiştir (Chu vd., 2014). Gan ve arkadaşları, miR-375'in yüksek AR seviyelerinin kastrasyona dirençli prostat kanseri için yeni bir terapötik hedef olabileceğini bildirmiştir (Gan vd., 2022). LNCaP ve 22Rv1 gibi AR'ye duyarlı hücrelerin daha yüksek miR-375 ekspresyon seviyelerine sahip olduğu, DU-145 ve PC-3 gibi AR'ye duyarsız hücrelerin ise daha düşük seviyeler sergilediği bulunmuştur (Chu vd., 2014).

Çalışmamızda, miR-375'in androjen reseptörüne duyarsız prostat kanseri hücrelerinde hücre canlılığı ve göçü üzerindeki etkilerini araştırmak istedik. Androjen reseptörüne duyarsız DU-145 ve PC-3 hücrelerinde artan miR-375 ekspresyonu hücre canlılığını baskılamıştır. Buna karşılık, DU-145 hücrelerine uygulanan migrasyon deneylerinde, artan miR-375 seviyeleri 48 saatte migrasyonda artışa neden olurken, azalan miR-375 seviyeleri 24 ve 48 saatte migrasyonu azaltmıştır. Farklı çalışmalarda da çelişkili sonuçlar göze çarpmaktadır. Fan ve ark.'larının yaptığı bir çalışmada merkel hücre karsinomu hücrelerinde miR-375'in knockdown edilmesi hücre canlılığı ve onkogenik sinyal yollarında herhangi bir etkiye sebep olmamıştır (K. Fan vd., 2020). Zheng ve ark.'ların solunum yolu epitel hücrelerinde yaptığı bir çalışmada ise miR-375 over ekspresyonunun deksametazon tedavisini etkileyerek hücre canlılığını, migrasyonu ve apoptoz üzerindeki etkilerini tersine çevirdiği gösterilmiş ve miR-375'in downregülasyonun solunum yolu epitel hücrelerinde terapötik bir hedef olarak kullanılabileceğini öne sürmüşlerdir (Zheng, Li, & Gao, 2022). Bakıldığında hücredeki sinyalizasyon farklılıklarının miR-375'in

etkilerini değiştirebileceğini söylenebilir. Artan miR-375 ifadesinin hücre canlılığını azaltıp göçü artırması, miR-375'in prostat kanseri hücrelerindeki ikili rolüne işaret etmektedir. Bu deneyler AR-duyarsız hücrelere uygulanmış olup, altta yatan mekanizmanın anlaşılması için deneylerin AR-duyarlı hücreler üzerinde kullanılması veya AR seviyelerinin düzenlenerek etkinin araştırılması gerektiği dşnlmektedir.

Gen ekspresyon analizinden elde edilen sonuçlar incelendiğinde farklı hücrelerde aynı genlerin farklı ekspresyon seviyeleri gösterdiği gözlenmiştir. Farklı ekspresyon seviyeleri gözlenmesinin nedenlerinden bir tanesi hücrelerin moleküler profillerinin daha önce de bahsedildiği gibi farklılık göstermesinden kaynaklandığı dşnlmektedir. Daha açık ifade etmek gerekirse, LNCaP ve PC-3 hücrelerinde PTEN ekspresyonun kayıp olduğu, DU-145 hücrelerinde ise heterozigot olduğu bilinmektedir. PTEN'in bir özelliği PI3K'nın negatif düzenleyicisi olan tümör baskılayıcı bir gen olmasıdır (Liu vd., 2020). PTEN, PI3K tarafından üretilen fosfatidilinositol-(3,4,5)-trifosfatın (PIP3) parçalanmasını katalize ederek PI3K yolunda önemli bir rol oynamaktadır. Bu durum downregüle hedeflerini, özellikle protein kinaz B'yi (PKB/Akt), hücre sağkalımını ve proliferasyonunu inhibe etmektedir. Aynı zamanda PTEN, hücre döngüsünün S fazına giren hücrelerin baskılanması ve siklin E/cdk2 kompleksine alınan p27'nin (Kip1) upregülasyonu yoluyla hücre döngüsünün düzenlemesine katkıda bulunmaktadır. PTEN ayrıca hücre dışı sinyalle ilişkili kinaz - mitojenle aktive olan protein kinaz (ERK-MAPK) yolunun düzenlenmesi ve fokal adezyon kinazın (FAK) defosforilasyonu yoluyla hücre gn ve hareketliliğini de düzenlemektedir (Hlobilkov, vd., 2003). PTEN'in PKB/Akt'yi etkilediği göz önünde bulundurulduğunda çalışmamızın da konusu olan PI3K sinyal yolunda etkili moleküllerin *mTOR*, *RHEB*, *TSC1*, *PIK3CA* gibi moleküllerin ekspresyon seviyelerinin de PTEN mutant olan durumlarda farklılık göstermesi olasıdır. Çalışmada yer alan hücrelerde bahsedildiği gibi *PTEN* ekspresyon durumları farklılık göstermektedir ve birçok önemli mekanizmada yer almasından dolayı da eksikliği hücredeki moleküler süreçleri etkilemektedir. MiR-375'in tahmini hedef genlerinin yer aldığı sinyal yolu da PI3K/Akt/mTOR sinyali gibi önemli bir sağkalım yoludur ve *PTEN* ekspresyonundaki farklılıklar miR-375'in hücrelerdeki etkilerinde farklılıkların oluşmasına neden olduğu dşnlmektedir.

Bir diğer farklılığa neden olan sebebin ise aynı sinyal yolunda etkili olan *PDK1* geninden kaynaklı olduğu dşnlmektedir. Daha nceki yapılan çalışmalarda *PDK1*'in miR-375'in hedefi olduğu gösterilmiştir (Zhou vd., 2014). *PDK1*'in farklı substratları farklı sinyal yolaklarında yer almaktadır ve bu moleküllerin fosforilasyonu için spesifik mekanizmaları vardır (Leslie, Biondi, & Alessi, 2001; Leroux, Schulze, & Biondi, 2018). *PDK1*, insülin ve

büyüme faktörleri ile PI3K aşağı yönlü sinyalizasyonunda anahtar bir rol oynamaktadır (Fruman, vd., 2017; Vanhaesebroeck, & Alessi, 2000). PI3K'nın lipid ikinci haberci ürünü olan PIP3 çoğu kanser hücresinde yapısal olarak yükselmekte ve bu da aşağı yönlü sinyalizasyonun artmasına neden olmaktadır. PDK1 molekülünün PI3K sinyal yolu üzerinden Akt molekülünü uyardığını (Gagliardi, Puliafito, & Primo, 2018) da göz önünde bulundurursak mimic/inhibitör uygulamaları ile miR-375 seviyelerinde meydana gelen değişimler PDK1'i de etkileyecektir. Bunun sonucunda sinyal yolunda yer alan diğer moleküllerin ekspresyon seviyeleri de değişiklik gösterecektir.

Yapılan çalışmada miRNA tahmin araçları ile yapılan analizlerde miR-375'in tahmini hedef olarak tespit edilen *TSC1* geninin ekspresyon analizlerini incelediğimizde miR-375 ekspresyon artışı ve azalma farklı hücrelerde *TSC1* ekspresyon seviyelerini farklı düzeylerde etkilemiştir. Protein analizlerinde de miR-375 ekspresyon artışı Tsc1 protein seviyelerini artırırken, miR-375'in baskılanması bir değişikliğe sebep olmamıştır. Bu sonuçlar gen ekspresyon analizleri ile zıtlık göstermektedir. Fakat protein analizleri sadece PC-3 hücrelerinde çalışıldığı için genel anlamda bize fikir verememektedir. Bizim yaptığımız bu çalışma miR-375'in *TSC1* üzerine etkilerini inceleyen ilk çalışmadır. *TSC1*'in görevi hücre büyümesi ve çoğalmasının merkezi bir destekleyicisi olan mTOR'u inhibe etmektir (Matthew, vd., 2009). *TSC1* ile birlikte *TSC2* bir kompleks oluşturarak işlev görmektedir. Bu kompleks, mTOR aktivatörü olarak görev yapan küçük bir GTP bağlayıcı protein olan Rheb'i düzenleyerek mTOR sinyalini inhibe etmek görev almaktadır. *TSC1/TSC2* kompleksi, AMP Kinaz aracılığıyla düşük hücrel enerji seviyeleri tarafından aktive edilmektedir. *TSC1* veya *TSC2*'nin tek başına mutasyonu kompleksi bozmak ve işlevini bozmak için yeterli olmaktadır ve bu da mTOR yolunun yapısal aktivasyonuna yol açmaktadır (Jülich, & Sahin, 2014). Bakıldığında, genotoksik stres, bilinen negatif düzenleyicileri olan PTEN, *TSC2* ve AMPK β 1 ve AMPK α 'nın p53'e bağlı upregülasyonu yoluyla mTOR aktivitesini inhibe edebilmektedir (Feng, vd., 2007; Budanov, & Karin, 2008). Sonuç olarak *TSC1* ve *TSC2* ekspresyon seviyelerinde oluşabilecek farklılıklar, *PTEN* veya *P53* gibi düzenleyici genlerdeki mutasyonlar *TSC1* aktivitesini ve dolayısıyla ekspresyon seviyelerini de etkileyecektir. *TSC1*'in etki mekanizmasının tam anlaşılabilmesi için *TSC2* geni ile birlikte çalışılması ve bu sinyalizasyonu etkileyen Akt, AMPK gibi diğer genlerle birlikte çalışılması gerekmektedir. Yukarıda bahsi geçen sebeplerden dolayı ekspresyon analizleri net bir sonuç vermediğinden *TSC1*'in miR-375'in hedefi olup olamayacağı hakkında yanıt oluşturamamakla birlikte doğrudan hedefi olmadığı düşünülmektedir.

Mevcut araştırmada *TSC1* gibi *RHEB* ifade düzeylerinin farklı hücrelerde farklı seviyelerde ifade edildiği bulunmuştur. Rheb'in etki mekanizmasına bakıldığında sonuçlar şaşırtmamaktadır. Rheb, G-proteinlerinin Ras süper ailesi içerisinde yer almaktadır. Yapılan alışmalar, Rheb'in işlevlerinden birinin büyümeye yol açan mTOR'u aktive etmek olduğunu ortaya koymaktadır. Bunun yanı sıra, Rheb'in mTOR'dan bağımsız ek işlevleri olduğu gösterilmiştir. Ras süper ailesi G-proteinleri genellikle birden fazla downstream sinyal yolağını aktive etmektedir. Bu nedenle, Rheb'in birden fazla downstream efektörünün olduğu düşünölmektedir (Parmar, & Tamanoi, 2010). Ayrıca, TSC/Rheb sinyalizasyonunun perinökleer aggresom oluşumuna katkı sağladığı bildirilmiştir. TSC mutant hücrelerde aggresom oluşumu kusurludur ve yanlış katlanmış proteinlerin birikmesi üzerine apoptoza uğrarlar (Zhou, vd., 2009). Rheb'in önerilen diğer downstream efektörleri arasında PLD1 bulunmaktadır. PLD1'in ise mTOR'un aktivasyonunda önemli görevi vardır (Sun, vd., 2008). Sonuçlara genel olarak bakıldığında bahsi geçen sinyal moleküllerinin birbirleri ile veya farklı moleküllerle etkileşimleri bulunmaktadır ve halen aydınlatılamayan mekanizmalar da vardır. Bu nedenle sebep-sonuç ilişkisi kurabilmek için her bir molekülün daha ayrıntılı çalışmalarla analiz edilmesi gerekmektedir.

şaşırtıcı olan ise *PIK3CA* uyarımındaki artışa rağmen LNCAP hücreleri hariç tüm hücrelerde miR-375 aşırı ekspresyonu ile mTOR'un baskılandığının gözlenmesidir. Aynı sinyal yolunda yer alan *TSC1*, *PIK3CA* veya *RHEB* ekspresyonlarındaki farklılıklar bizi bir sonuca götürmese de miR-375 ekspresyon artışının böyle bir sonuca ulaştırması önemli bir bulgudur. Literatürü incelediğimizde, sinyal yolundaki farklı genetik değişikliklerden kaynaklanan anormal mTOR sinyali, çeşitli kanser türlerinde yaygın olarak görölmektedir. Hiperaktivasyon üzerine mTOR sinyali, tümör başlangıcına ve ilerlemesine katkıda bulunan hücre çoğalmasını ve metabolizmasını teşvik eden önemli bir yoldur. Ek olarak, mTOR farklı yollarla otofajiyi de negatif olarak düzenlemektedir (Tian, Li, & Zhang, 2019). Bu nedenle, mTOR'un baskılanması PKa açısından önemli bir bulgudur. Böylece, miR-375 ekspresyonunun artırılması ile mTOR'un baskılanması spesifik tedavi seçeneği olarak geliştirilip kullanılabilir. Bu verilere göre, miR-375'in prostat kanseri için bir tümör baskılayıcı olarak hareket edebileceği sonucuna varabiliriz. Bununla birlikte, PI3K-mTOR sinyal yolağı üzerindeki etkilerini ortaya çıkarmak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Shi ve arkadaşları (Shi vd., 2007) tarafından yapılan birkaç çalışma, miR-125'in PKa'daki rolüne dair kanıt sağlamıştır. PKa örneklerinde miR-125b ekspresyonunun orta ila yüksek düzeyde arttığını, androjene maruz kalmanın ise PKa hücre hatlarında miR-125b'yi

upregüle ettiğini göstermişlerdir. Bu sonuçlar miR-125b'nin onkogenik bir etkiye sahip olduğunu ve PKa patogeneze katkıda bulunduğunu göstermiştir. Fu ve Cao, qRT-PCR kullanarak PKa hücre hatlarında ve insan PCa biyopsi örneklerinde miR-125a-5p'nin ekspresyon seviyelerini araştırmış ve PCa hücre hatlarında miR-125a-5p'nin upregülasyonunu rapor etmiştir (Fu & Cao, 2015). Benzer şekilde, Balkan ve ark. ilk olarak PCa hücre hattındaki miR-125b ekspresyon seviyesini RT-qPCR ile değerlendirmiş ve miR-125b ekspresyon seviyesinin PKa hücre kültüründe genel olarak upregüle olduğunu bulmuşlardır (Balkan, 2023). Bu bilgiler değerlendirildiğinde miR-125b-5p PKa'da ekspresyon değişikliğine uğrayan ve PKa gelişimine katkısı olabilecek bir miRNA'dır. Çalışmamızın diğer kısmında ise bu verilerden yola çıkarak miR-125b-5p'nin PI3K, PLD sinyal kaskadındaki etkilerini incelemek istedik.

Çalışmamızda, aynı zamanda miR-125b-5p'nin androjen reseptörüne duyarsız prostat kanseri hücrelerinde hücre canlılığı ve göçü üzerindeki etkileri de araştırılmıştır. Androjen reseptörüne duyarsız DU-145 ve PC-3 hücrelerinde artan miR-125b-5p ekspresyonu hücre canlılığını baskılamıştır. Hücre göçü üzerine etkileri incelendiğinde ise miR-125b-5p ekspresyon artışı da azalması da DU-145 hücrelerinde 24 ve 48. saatlerde hücre göçünü baskılamıştır. Çalışmamıza ek olarak, Li ve ark. meme kanseri hücrelerinde miR-125b-5p aşırı ekspresyonu ile hücre proliferasyonu, koloni oluşturma yeteneği, hücre göçü ve hücre invazyonunun baskılanabileceğini göstermiştir (Li, vd., 2018). Ayrıca Hua ve ark.'larının yapmış olduğu bir diğer çalışmada ise miR-125b-5p'nin aşırı eksprese edilmesi Huh7 ve SK-Hep-1 hücrelerinin proliferasyonunu, göçünü ve invazyonunu kısıtladığı bulunmuştur (Hua vd., 2019). Bu sonuçlar ve çalışmamızda elde ettiğimiz veriler miR-125b-5p'nin tümör baskılayıcı yönünün kuvvetli olduğunu destekler niteliktedir. PKa için de veriler önemlidir ve yapılan analizler PKa için literatüre eklenen ilk çalışmadır.

Yapılan gen ekspresyon analizleri neticesinde biyoinformatik analizlerle miR-125b-5p tahmini hedefi olarak belirlenen *CYTH1* ve ilişkili olduğu genlerin ekspresyon seviyelerindeki değişimler incelenmiştir. Sonuçlar kısmında daha ayrıntılı bir şekilde bahsedildiği gibi *CYTH1* ekspresyon seviyeleri de hücrelerde farklılıklar göstermektedir. Ek olarak, elde edilen protein analizlerinde gen ekspresyon analizlerinin aksine miR-125b-5p seviyelerinin Cyth1 protein seviyelerinin azalmasına yol açtığı gözlenmiştir. Net veriler olmasa da sonuçlar *CYTH1*'in miR-125b-5p hedefi olabileceğini göstermektedir. *CYTH1* etki mekanizması ile ilgili ve hatta kanserdeki etkileri üzerine literatürde fazla bilgi bulunmamaktadır. *CYTH1* proteinleri her yerde bulunur ve hücre yayılması ve adhezyonu, kemotaksis, protein iletişimi ve hücre iskeleti yeniden düzenlemeleri gibi çeşitli işlevlerde görev alır. Bunlardan yalnızca bazıları ARF'leri

aktive etme yeteneklerine bağılı görünmektedir (Pacheco-Rodriguez, Moss, & Vaughan, 2005). Zhang ve ark.'larının yaptığı bir çalışmada siRNA'nın sitohesin-1 ile etkileşiminin prostat kanserinde IGFR sinyalinin azalmasına yol açtığını ve CYTH1'in prostat kanserinin tedavisi için yeni bir moleküler hedef olarak hizmet edebileceğini göstermişlerdir (Weizhong vd., 2011). Rak ve ark.'ları ise hematopoetik kök hücrelerle ilgili yaptığı bir çalışmada CYTH1'in hematopoetik kök hücrelerde yapışma ve engraftmanın yeni bir ana düzenleyicisi olduğu bildirilmiştir (Rak vd., 2017). Bahsedildiğı zere CYTH1'in etki mekanizması ile ilgili bilgiler çok kısıtlıdır ve yapılan bu çalışma miR-125b-5p'nin CYTH1 zerine etkileri ile ilgili yapılan ilk çalışmadır. Aynı zamanda hedefi olabileceğini destekleyen sonuçlar da PKa'nın oluşum mekanizmasının anlaşılabilmesi açısından önemlidir.

CYTH1'in etkileşimde olduğu genlerden birisi olan ARF1'in ekspresyon seviyeleri de çalışmamızda incelenmiştir. Yapılan analizler ARF1'in LNCaP ve DU-145 hücrelerinde her iki durumda da arttığını göstermiştir. PC-3 hücrelerinde ise miR-125-5p artışı ile birlikte ARF1 ekspresyonu azalmaktadır. ARF1, Golgi aparatının yapısının ve işlevinin korunmasında merkezi bir rol oynar ve meme, prostat ve yumurtalık kanserlerinde yüksek oranda ifade edilmektedir (Davis vd., 2016; Gu vd., 2017; Schlienger, Ramirez, & Claing, 2015). Aynı zamanda ARF1, hücre içi ve hücreler arası sinyalizasyon, hücre döngüsü düzenlemesi ve DNA onarımının yanı sıra nekroz ve apoptozda önemli bir işleve sahiptir (D'Souza-Schorey & Chavrier, 2006; Gu vd., 2017). Prostat kanserinde ARF1, MAPK aktivasyonunu ve hücre büyümesini kontrol ederek tümörigenezi teşvik ettiği de gösterilmiştir (Davis vd., 2016). Miyelom hücrelerinde, ARF1 ekspresyonu hücre çoğalmasını teşvik eder ve hücre adhezyonunu inhibe ederek çoğalma ve hücre yapışması aracılı ilaç direncini kontrol etmektedir (Xiaohong Xu vd., 2017). ARF1, yumurtalık tümörlerinde, komşu kanserli olmayan dokularla karşılaştırıldığında yukarı doğru düzenlenir ve aşırı ekspresyonu, PI3K yolağı aracılığıyla yumurtalık kanseri hücre proliferasyonu ve göçü ile ilişkilendirilmiştir (Gu vd., 2017).

Özetlemek gerekirse, ARF1 hücrede birçok sinyalizasyonda görev almaktadır. Bu etkilerinden dolayı da tmrogeneze de etkisi olan bir proteindir. Kendisi önemli bir düzenleyici molekül olmasıyla birlikte Arf protein fonksiyonunun uzamsal-zamansal kontrolünü sağlayan mekanizmalar da bulunmaktadır. Bu mekanizmalar, Arf-GTP bağlanması ve GTP hidrolizi düzenleyicileridir. Arf1 G proteini, guanin nükleotid değişim faktörleri (GEF'ler) tarafından Arf'den GDP nükleotid salınımını katalizleyerek aktive edilmektedir. Hücrelerde daha bol bulunan GTP'nin bağlanması, küçük G proteininde konformasyonel değişikliklere yol açarak efektör adı verilen çok sayıda proteinle etkileşime girmesini

sağlamaktadır (Jackson, 2018). Yani sonuç olarak, ARF1'in etkilerinin anlaşılabilmesi için ARF-GTP bağlanmalarında etkili mekanizmaların anlaşılmasında yatmaktadır.

PLD'nin işlevi ve aktivitesi büyük ölçüde nörotransmitterlere, hormonlara, küçük monomerik GTPazlara ve lipidlere bağlıdır ve bunlar tarafından düzenlenir. Giderek artan sayıda araştırma, PLD aktivitesinin kanser dokularında ve hücrelerinde önemli ölçüde arttığını ve sinyal iletimi, hücre proliferasyonu ve anti-apoptotik süreçlerde kritik bir rol oynadığını göstermiştir. Buna ek olarak, son çalışmalar PLD'nin Sp1, NFκB, TCF4, ATF-2, NFATc2 ve EWS-Fli gibi inflamasyon ve karsinogeneze katkıda bulunan proteinlerin downstream transkripsiyonel hedefi olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, hücrelerde PLD'nin ekspresyonunu veya aktivitesini inhibe eden bileşikler, inflamasyonu azaltmada ve kemoterapi sırasında dirençli kanserleri hassaslaştırmada potansiyel olarak yararlı olabileceği düşünülmektedir. Yaptığımız çalışmada MiR-125b-5p'deki ekspresyon değişikliklerinin PLD1 ve PLD2 üzerindeki etkilerine baktığımızda miR-125b-5p ekspresyonu artışı/azalması hücrelerde diğer moleküllerde olduğu farklı ekspresyon seviyeleri göstermelerine neden olmuştur. PLD1 ve PLD2 gibi genlerin ekspresyon seviyelerinin Rho, Arf, R-Ras gibi birçok molekül tarafından düzenlendiği bilinmektedir (Bruntz, Lindsley, & Brown, 2014). Bu çoklu düzenlenmeden kaynaklı olarak da sinyal yollarındaki etkileşimler değişebilmekte ve farklı etkiler gözlemlenebilmektedir.

Özetle, miR-375 ve miR-125b-5p PKA için önemli olabilecek iki miRNA'dır. Hücre canlılığını ve göçünü baskıladıkları çalışmamızda gösterilmiştir. Biyoinformatik analizlerle miRNA'ların tahmini hedefi olarak belirlenen TSC1 ve CYTH1'in yaptığımız deneylerle doğrulanması yapılamamış olsa da CYTH1'in miR-125b-5p hedefi olabileceğini destekleyen sonuçlar elde edilmiştir. Aynı zamanda miR-375'in mTOR gibi kanser mekanizmasında önemli role sahip olan moleküllerin de düzenlenmesinde görev aldığı gösterilmiştir. LNCaP hücresi hariç diğer hücrelerde baskılanıyor olması AR duyarsız hücreler için tedavi seçeneği olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Yukarıda da tartışıldığı üzere *ARF1*, *PLD1*, *PLD2*, *RHEB* gibi genlerdeki etkilerinin anlaşılabilmesi için daha fazla çalışmaya gerek vardır ve her birisi ayrı bir çalışma konusu olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu mekanizmaların aydınlatılması ile birlikte hem PKA mekanizması daha netlik kazanmış olacaktır. Aynı zamanda günümüzde de yaygın hale gelmeye başlayan kişiselleştirilmiş tedaviler açısından önemli moleküller olabilecek niteliktedir. Etki mekanizmalarının aydınlatılması ile birlikte tedavi seçeneği olarak da kullanılabileceklerdir.

4.1.Sonuç ve Öneriler

Doktora tez çalışması kapsamında aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır:

1. İlk aşamada PKa üzerinde etkisi olduğu daha önceki çalışmalarda bildirilen miR-375 ve miR-125-5p'nin biyoinformatik analizlerle tahmini hedefleri belirlenmiştir. Analizler sonucunda TSC1'in miR-375'in hedefi olabileceği, CYTH1'in ise miR-125-5p'nin hedefi olabileceği tespit edilmiştir.
2. miR-375 ve miR125b-5p ekspresyonundaki artışın AR duyarsız PC3 ve DU-145 hücrelerinde hücre canlılığını baskıladığı gözlenmiştir.
3. MiR-375 ve miR-125b-5p'nin hücre göçü üzerine etkilerine bakıldığında miR-375 ekspresyon artışı AR duyarsız DU-145 hücrelerinde 48. saatte hücre göçünü artırmış, miR-125b-5p ekspresyon artışı ise hem 24. hem de 48. saatte hücre göçünü azaltmıştır.
4. miR-375 ve miR-125b-5p ekspresyonundaki azalma ise AR duyarsız DU-145 hücrelerinde 24. ve 48. saatte hücre göçünü azaltmıştır.
5. RWPE-1, LNCaP, PC3 ve DU-145 hücrelerine miR-375 ve miR-125b-5p mimik uygulaması sonucu miR-375 ve miR-125b-5p ekspresyon seviyelerindeki artış gösterilmiştir.
6. RWPE-1, LNCaP, PC3 ve DU-145 hücrelerine miR-375 ve miR-125b-5p inhibitör uygulaması sonucu miR-375 ve miR-125b-5p ekspresyon seviyelerindeki azalma gösterilmiştir.
7. miR-375 mimik/inhibitörleri uygulanan hücrelerde *TSC1* düzeylerinde farklı ekspresyon seviyeleri gözlenmiştir. Mimik uygulanan örneklerde RWPE-1 ve PC3 hücrelerinde azalma varken, LNCaP ve DU-145 hücrelerinde ekspresyon seviyelerinde artış gözlenmiştir. İnhibitör uygulanan örneklerde ise RWPE-1 hücrelerinde artış, PC-3 hücrelerinde ise azalma meydana gelmiştir. LNCaP ve DU-145 hücrelerinde anlamlı bir değişiklik olmamıştır.
8. Aynı zamanda miR-375 mimik/inhibitörleri uygulanan PC-3 hücrelerinde Tsc1 protein seviyeleri de incelenmiştir. Sonucunda ise mimik uygulanan örneklerde Tsc1 protein seviyelerinin arttığı, inhibitör uygulanan hücrelerde ise anlamlı bir değişiklik olmadığı görülmüştür.
9. MiR-375 mimik/inhibitörleri uygulanan hücrelerde *PIK3CA* ekspresyon seviyeleri de incelenmiştir. Mimik uygulanan hücrelerde RWPE-1, LNCaP ve DU-145 hücrelerinde *PIK3CA* ekspresyon seviyelerinde artış gözlenmiştir. PC-

3 hücrelerinde ise anlamlı bir değişiklik olmamıştır. İnhibitör uygulanan hücrelerde ise RWPE-1 ve LNCaP hücrelerinde *PIK3CA* ekspresyon seviyelerinde azalma gözlenirken, PC-3 ve DU-145 hücrelerinde anlamlı bir değişiklik meydana gelmemiştir.

10. MiR-375 mimik/inhibitörleri uygulanan hücrelerde aynı zamanda *mTOR* ekspresyon seviyelerine de bakılmıştır. Yapılan analizlerde mimik uygulanan hücrelerde LNCaP hücrelerinde *mTOR* seviyeleri artış gösterirken, RWPE-1, PC-3 ve DU-145 hücrelerinde baskılanmıştır. İnhibitör uygulanan hücrelerde ise RWPE-1 hücrelerinde artış meydana gelirken, LNCaP ve PC-3 hücrelerinde ekspresyon seviyeleri baskılanmıştır. DU-145 hücrelerinde ise anlamlı bir değişiklik meydana gelmemiştir.
11. MiR-125b-5p'nin mimik/inhibitörleri uygulanan hücrelerde aynı zamanda biyoinformatik analizlerle miR-125b-5p'nin hedefi olarak belirlenen *CYTH1*'in ekspresyon seviyeleri incelenmiştir. MiR-125b-5p mimik uygulanan LNCaP ve DU-145 hücrelerinde *CYTH1* ekspresyon seviyelerinin azaldığı, PC-3 hücrelerinde ise artış gösterdiği görülmüştür. RWPE-1 hücrelerinde anlamlı bir değişiklik meydana gelmemiştir. MiR-125b-5p inhibitörü uygulanan RWPE-1 ve PC-3 hücrelerinde *CYTH1* ekspresyon seviyeleri azalmış, LNCaP hücrelerinde ise artış göstermiştir. DU-145 hücrelerinde ise anlamlı bir değişiklik meydana gelmemiştir.
12. Aynı zamanda miR-125b-5p mimik/inhibitör uygulanan PC-3 hücrelerinde Cyth1 protein seviyeleri de incelenmiştir. Mimik uygulanan hücrede anlamlı bir değişiklik meydana gelmemiş, inhibitör uygulana hücrede Cyth1 protein seviyeleri artış göstermiştir.
13. MiR-125b-5p'nin mimik/inhibitörleri uygulanan hücrelerde *PLD1* ekspresyon seviyeleri incelenmiştir. Hem mimik hem de inhibitör uygulanan LNCaP ve DU-145 hücrelerin de *PLD1* ekspresyon seviyeleri artış göstermiştir. RWPE-1 ve PC-3 hücrelerinde anlamlı bir değişiklik meydana gelmemiştir.
14. MiR-125b-5p'nin mimik/inhibitörleri uygulanan hücrelerde *PLD2* ekspresyon seviyeleri de incelenmiştir. Mimik uygulanan PC-3 ve DU-145 hücrelerinde *PLD2* ekspresyon seviyeleri azalmıştır. RWPE-1 ve LNCaP hücrelerinde anlamlı bir değişiklik meydana gelmemiştir. İnhibitör uygulanan hücrelerde ise PC-3 hücrelerinde *PLD2* ekspresyon seviyelerinde azalma gözlenirken, DU-145

hücrelerinde artış meydana gelmektedir. Aynı şekilde RWPE-1 ve LNCaP hücrelerinde anlamlı bir değişiklik meydana gelmemiştir.

15. Bununla birlikte miR-125b-5p mimik/inhibitör uygulanan PC-3 hücrelerinde Pld2 protein seviyeleri de incelenmiştir. Hem mimik hem de inhibitör uygulanan hücrede Pld2 protein seviyeleri artış göstermiştir.
16. MiR-125b-5p'nin mimik/inhibitörleri uygulanan hücrelerde *ARF1* ekspresyon seviyeleri değerlendirilmiştir. Mimik uygulanan LNCaP ve DU-145 hücrelerinde *ARF1* ekspresyon seviyeleri artış gösterirken, PC-3 hücrelerinde azalmıştır. RWPE-1 hücrelerinde ise anlamlı bir değişiklik meydana gelmemiştir. İnhibitör uygulanan LNCaP ve DU-145 hücrelerinde ise *ARF1* ekspresyon seviyelerinde artış gözlenirken, RWPE-1 ve PC-3 hücrelerinde anlamlı bir değişiklik meydana gelmemiştir.

Yukarıda ayrıntılı bir şekilde bahsedilen sonuçlardan yola çıktığımızda, qRT-PCR ve western blotlama sonuçları miRNA'ların farklı ekspresyon profillerine sahip hücrelerde farklı etkilerinin olabileceğini göstermiştir. Bu farklılıklar olsa da miR-375 ve miR-125b-5p'nin hücre canlılığını ve migrasyonu baskılaması tümör gelişimini baskılayabileceklerini ve PKa için tümör baskılayıcı miRNA'lar olarak görev alabileceklerini göstermiştir.

PKa'nın oldukça heterojen bir kanser olması ve kullanmış olduğumuz hücrelerdeki gen ekspresyon profillerinin de aynı olmamasından kaynaklı olarak miRNA'ların farklı etki gösterdikleri görülmüştür. MiRNA'ların bu genler üzerindeki etkilerinin anlaşılabilmesi için PI3K-Akt-mTOR sinyal yolunun ve PLD sinyal yolunun daha ayrıntılı çalışılmasına ihtiyaç vardır. Burada görev alan genlerin birçok düzenlenme mekanizması ve etki ettikleri birden fazla gen bulunmaktadır. MiRNA'ların etki mekanizmalarının anlaşılabilmesi için her birisinin ayrı ayrı incelenmesi değerlendirilmesi gerekmektedir. Bu sayede miRNA'ların PKa açısından önemi ve sinyal yollarındaki etkileri daha net anlaşılabilir. Böylelikle PKa'nın heterojen bir kanser olmasından dolayı her hastanın aynı tedaviye yanıt vermemesi veya direnç gelişiminin oluşması gibi durumların önüne geçilebilecektir. Günümüzde kişiselleştirilmiş tedaviler geliştirilmeye devam etmektedir. Çalışmamızda elde etmiş olduğumuz sonuçlar miR-375 ve miR-125b-5p'nin göstermiş olduğu etkilerden dolayı PKa için güçlü terapötikler olabileceğini ve geliştirilmesi ile birlikte kişiselleştirilmiş tedavi amacıyla kullanılabileceklerini göstermiştir.

KAYNAKÇA

- Abate-Shen, C., & Shen, M. M.** (2000). Molecular genetics of prostate cancer. *Genes & Development*, 14(19), 2410-2434.
- Abraham, K. J. vd.** (2016). Roles for miR-375 in Neuroendocrine Differentiation and Tumor Suppression via Notch Pathway Suppression in Merkel Cell Carcinoma. *The American journal of pathology*, 186(4), 1025-1035.
- Adamo, P., & Lodomery, M. R.** (2015). The oncogene ERG: a key factor in prostate cancer. *Oncogene*, 35(4), 403-414.
- Agaoglu, F. Y vd.** (2011). Investigation of miR-21, miR-141, and miR-221 in blood circulation of patients with prostate cancer. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 32(3), 583-588.
- Agarwal, V. vd.** (2015). Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *eLife*, 4.
- Ahadi, A. vd.** (2016). Long non-coding RNAs harboring miRNA seed regions are enriched in prostate cancer exosomes. *Scientific Reports*, 6(1), 1-14.
- Aihara, M. vd.** (1994). Heterogeneity of prostate cancer in radical prostatectomy specimens. *Urology*, 43(1), 60-66.
- AJCC Cancer Staging Manual.** (2002). *AJCC Cancer Staging Manual*.
- Ambs, S. vd.** (2008). Genomic profiling of microRNA and messenger RNA reveals deregulated microRNA expression in prostate cancer. *Cancer research*, 68(15), 6162-6170.
- Attard, G. vd.** (2016). Prostate cancer. *Lancet (London, England)*, 387(10013), 70-82.
- Avellini, C. vd.** (2017). The trophoblast cell surface antigen 2 and miR-125b axis in urothelial bladder cancer. *Oncotarget*, 8(35), 58642-58653.
- Avilés-Jurado, F. X. vd.** (2021). Circulating microRNAs modulating glycolysis as non-invasive prognostic biomarkers of HNSCC. *European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies (EUFOS) : affiliated with the German Society for Oto-Rhino-Laryngology - Head and Neck Surgery*, 278(5), 1585-1594.

- Bai, S., Tian, B. vd.** (2016). MicroRNA-125b promotes tumor growth and suppresses apoptosis by targeting DRAM2 in retinoblastoma. *Eye (London, England)*, 30(12), 1630-1638.
- Balkan, E.** (2023). INTERNATIONAL JOURNAL OF MEDICAL BIOCHEMISTRY Expression of miRNAs in prostate cancer cell lines and prostate epithelial cell lines. *Int J Med Biochem*, 6(3), 179-184.
- Baranwal, S., & Alahari, S. K.** (2010). miRNA control of tumor cell invasion and metastasis. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 126(6), 1283.
- Barbieri, C. E. vd.** (2012). Exome sequencing identifies recurrent SPOP, FOXA1 and MED12 mutations in prostate cancer. *Nature Genetics*, 44(6), 685-689.
- Barretina, J. vd.** (2012). The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature*, 483(7391), 603-607.
- Bartel, D. P.** (2004). MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell*, 116(2), 281-297.
- Bertoli, G., Cava, C., & Castiglioni, I.** (2015). Micrnas: New biomarkers for diagnosis, prognosis, therapy prediction and therapeutic tools for breast cancer. *Theranostics*, 5(10), 1122-1143.
- Bethel, C. R. vd.** (2006). Decreased NKX3.1 Protein Expression in Focal Prostatic Atrophy, Prostatic Intraepithelial Neoplasia, and Adenocarcinoma: Association with Gleason Score and Chromosome 8p Deletion. *Cancer Research*, 66(22), 10683-10690.
- Bidarra, D. vd.** (2019). Circulating MicroRNAs as Biomarkers for Prostate Cancer Detection and Metastasis Development Prediction. *Frontiers in Oncology*, 9.
- Boca, S. vd.** (2020). Nanoscale delivery systems for microRNAs in cancer therapy. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 77(6), 1059-1086.
- Bonci, D. vd.** (2015). A microRNA code for prostate cancer metastasis. *Oncogene*, 35(9), 1180-1192.
- Bostwick, D. G.** (1989). The pathology of early prostate cancer. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 39(6), 376-393.
- Bostwick, D. G.** (1997). Staging Prostate Cancer-1997:Current Methods and Limitations. *European Urology*, 32(3), 2-14.

- Bostwick, D. G., & Qian, J.** (2004). High-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Modern Pathology*, 17(3), 360-379.
- Bostwick, D. G. vd.** (2000). Independent Origin of Multiple Foci of Prostatic Intraepithelial Neoplasia Comparison with Matched Foci of Prostate Carcinoma. *Cancer*, 83(9), 1995-2002.
- Boyacıoglu, S. O.** (2018). Role of PTEN in modulating preventive effect of 3, 4-dhpea against oxidative stress. *Sağlık Bilimleri Dergisi*, 27(1), 48-54.
- Brase, J. C. vd.** (2011). Circulating miRNAs are correlated with tumor progression in prostate cancer. *International journal of cancer*, 128(3), 608-616.
- Bratt, O.** (2002). Hereditary Prostate Cancer: Clinical Aspects. *The Journal of Urology*, 168(3), 906-913.
- Brennecke, J. vd.** (2005). Principles of microRNA-target recognition. *PLoS biology*, 3(3), 0404-0418.
- Bruntz, R. C., Lindsley, C. W., & Brown, H. A.** (2014). Phospholipase D Signaling Pathways and Phosphatidic Acid as Therapeutic Targets in Cancer. *Pharmacological Reviews*, 66(4), 1033.
- Bryant, R. J. vd.** (2012). Changes in circulating microRNA levels associated with prostate cancer. *British journal of cancer*, 106(4), 768-774.
- Bu, Q. vd.** (2017). MiR-125b inhibits anaplastic thyroid cancer cell migration and invasion by targeting PIK3CD. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 88, 443-448.
- Bubendorf, L. vd.** (2000). Metastatic patterns of prostate cancer: An autopsy study of 1,589 patients. *Human Pathology*, 31(5), 578-583.
- Budanov, A. V., & Karin, M.** (2008). p53 target genes sestrin1 and sestrin2 connect genotoxic stress and mTOR signaling. *Cell*, 134(3), 451-460.
- Budd, W. T. vd.** (2015). Dual action of miR-125b as a tumor suppressor and OncomiR-22 promotes prostate cancer tumorigenesis. *PLoS ONE*, 10(11).
- Burke, H. B., & Henson, D. E.** (1993). Criteria for prognostic factors and for an enhanced prognostic system. *Cancer*, 72(10), 3131-3135.

Bussemakers, M. J. G. vd. (1999). DD3: a new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer. *Cancer Research*, 59(23), 5975-5979.

Carter, B. S., vd. (1992). Mendelian inheritance of familial prostate cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(8), 3367-3371.

Carver, B. S. vd. (2009). ETS rearrangements and prostate cancer initiation. *Nature*, 457(7231).

Castro, E., & Eeles, R. (2012). The role of BRCA1 and BRCA2 in prostate cancer. *Asian journal of andrology*, 14(3), 409-414.

Catz, S. D., & Johnson, J. L. (2003). BCL-2 in prostate cancer: a minireview. *Apoptosis: an international journal on programmed cell death*, 8(1), 29-37.

Chang, A. J. vd. (2014). High-risk prostate cancer-classification and therapy. *Nature reviews. Clinical oncology*, 11(6), 308-323.

Chang, C. vd. (2012). Correlation of microRNA-375 downregulation with unfavorable clinical outcome of patients with glioma. *Neuroscience letters*, 531(2), 204-208.

Chang, K. H. vd. (2013). A gain of function mutation in DHT synthesis in castration-resistant prostate cancer. *Cell*, 154(5), 1074.

Chang, L. vd. (2017). Expending Role of Microsatellite Instability in Diagnosis and Treatment of Colorectal Cancers. *Journal of gastrointestinal cancer*, 48(4), 305-313.

Chang, S. vd. (2016). MicroRNA-125b promotes invasion and metastasis of gastric cancer by targeting STARD13 and NEU1. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 37(9), 12141-12151.

Chappell, W. H. vd. (2012). p53 expression controls prostate cancer sensitivity to chemotherapy and the MDM2 inhibitor Nutlin-3. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 11(24), 4579-4588.

Chaudhuri, A. A. vd. (2011). MicroRNA-125b potentiates macrophage activation. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 187(10), 5062-5068.

Chen, D. vd. (2020). Knockdown of LINC02471 Inhibits Papillary Thyroid Carcinoma Cell Invasion and Metastasis by Targeting miR-375. *Cancer management and research*, 12, 8757-8771.

- Chen, F. vd.** (2010). Inhibition of c-FLIP expression by miR-512-3p contributes to taxol-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma cells. *Oncology reports*, 23(5), 1457-1462.
- Chen, J. vd.** (2014). miR-125b inhibitor enhance the chemosensitivity of glioblastoma stem cells to temozolomide by targeting Bak1. *Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 35(7), 6293-6302.
- Chen, X. vd.** (2008). Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Research*, 18(10), 997-1006.
- Chen, Y. vd.** (2001). Defects of DNA mismatch repair in human prostate cancer. *Cancer research*, 61(10), 4112-4121.
- Chen, Yuhao, & Wang, X.** (2020). miRDB: an online database for prediction of functional microRNA targets. *Nucleic Acids Research*, 48(D1), D127.
- Cheng, H. H. vd.** (2013). Circulating microRNA Profiling Identifies a Subset of Metastatic Prostate Cancer Patients with Evidence of Cancer-Associated Hypoxia. *PLoS ONE*, 8(7).
- Chesire, D. R. vd.** (2002). In vitro evidence for complex modes of nuclear beta-catenin signaling during prostate growth and tumorigenesis. *Oncogene*, 21(17), 2679-2694.
- Chiosea, S. vd.** (2006). Up-Regulation of Dicer, a Component of the MicroRNA Machinery, in Prostate Adenocarcinoma. *The American Journal of Pathology*, 169(5), 1812.
- Chu, M. vd.** (2014). Androgen receptor is negatively correlated with the methylation-mediated transcriptional repression of miR-375 in human prostate cancer cells. *Oncology Reports*, 31(1), 34-40.
- Clark, J. vd.** (2008). Complex patterns of ETS gene alteration arise during cancer development in the human prostate. *Oncogene*, 27(14), 1993-2003.
- Classon, M., & Harlow, E.** (2002). The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer. *Nature reviews. Cancer*, 2(12), 910-917.
- Cortez, M. A. vd.** (2011). MicroRNAs in body fluids--the mix of hormones and biomarkers. *Nature reviews. Clinical oncology*, 8(8), 467-477.
- Costa-Pinheiro, P. vd.** (2015). MicroRNA-375 plays a dual role in prostate carcinogenesis. *Clinical Epigenetics*, 7(1), 1-14.

- Crumbaker, M., Khoja, L., & Joshua, A. M.** (2017). AR Signaling and the PI3K Pathway in Prostate Cancer. *Cancers*, 9(4).
- Cui, F. vd.** (2016). miR-375 inhibits the invasion and metastasis of colorectal cancer via targeting SP1 and regulating EMT-associated genes. *Oncology reports*, 36(1), 487-493.
- Daniunaite, K. vd.** (2017). Clinical significance of miRNA host gene promoter methylation in prostate cancer. *Human molecular genetics*, 26(13), 2451-2461.
- Davies, M. A. vd.** (2002). Adenoviral-mediated expression of MMAC/PTEN inhibits proliferation and metastasis of human prostate cancer cells. *Clinical cancer research*, 8(6), 1904-1914.
- Davis, J. E. vd.** (2016). ARF1 promotes prostate tumorigenesis via targeting oncogenic MAPK signaling. *Oncotarget*, 7(26), 39834.
- De, A. vd.** (2016). Emblica officinalis extract downregulates pro-angiogenic molecules via upregulation of cellular and exosomal miR-375 in human ovarian cancer cells. *Oncotarget*, 7(21), 31484-31500.
- De Marzo, A. M. vd.** (1999). Proliferative Inflammatory Atrophy of the Prostate: Implications for Prostatic Carcinogenesis. *The American Journal of Pathology*, 155(6), 1985-1992.
- De Marzo, A. M. vd.** (2007). Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nature Reviews Cancer*, 7(4), 256-269.
- De la monte, S. M., Moore, G. W., & Hutchins, G. M.** (1986). Metastatic behavior of prostate cancer: cluster analysis of patterns with respect to estrogen treatment. *Cancer*, 58(4), 985-993.
- Deramaudt, T. B., Remy, P., & Stiegler, P.** (2001). Identification of interaction partners for two closely-related members of the ETS protein family, FLI and ERG. *Gene*, 274(1-2), 169-177.
- Descotes, J. L.** (2019). Diagnosis of prostate cancer. *Asian journal of urology*, 6(2), 129-136.
- Dong, H. vd.** (2019). Activation of LncRNA TINCR by H3K27 acetylation promotes Trastuzumab resistance and epithelial-mesenchymal transition by targeting MicroRNA-125b in breast Cancer. *Molecular Cancer*, 18(1), 1-18.
- D'Souza-Schorey, C., & Chavrier, P.** (2006). ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(5), 347-358.

- Duggan, D. vd.** (2007). Two genome-wide association studies of aggressive prostate cancer implicate putative prostate tumor suppressor gene DAB2IP. *Journal of the National Cancer Institute*, 99(24), 1836-1844.
- Duursma, A. M. vd.** (2008). miR-148 targets human DNMT3b protein coding region. *RNA*, 14(5), 872.
- Dülgeroğlu, Y., & Eroğlu, O.** (2019). Diagnostic performance of microRNAs in the circulation in differential diagnosis of BPH, chronic prostatitis and prostate cancer. *Turkish Journal of Biochemistry*, 44(4), 417-425.
- Dweep, H., Gretz, N., & Sticht, C.** (2014). MiRWalk database for miRNA-target interactions. *Methods in Molecular Biology*, 1182, 289-305.
- Edlind, M. P., & Hsieh, A. C.** (2014). PI3K-AKT-mTOR signaling in prostate cancer progression and androgen deprivation therapy resistance. *Asian journal of andrology*, 16(3), 378.
- Edwards, S. M., & Eeles, R. A.** (2004). Unravelling the genetics of prostate cancer. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics*, 129C(1), 65-73.
- Eisenberger, M. A. vd.** (1998). Bilateral Orchiectomy with or without Flutamide for Metastatic Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine*, 339(15), 1036-1042.
- Eminaga, O., vd.** (2013). High-Grade Prostatic Intraepithelial Neoplasia (HGPIN) and topographical distribution in 1,374 prostatectomy specimens: Existence of HGPIN near prostate cancer. *The Prostate*, 73(10), 1115-1122.
- Endzeliņš, E. vd.** (2016). Diagnostic, prognostic and predictive value of cell-free miRNAs in prostate cancer: a systematic review. *Molecular Cancer*, 15(1), 1-13.
- Etzioni, R. vd.** (2008). Quantifying the role of PSA screening in the US prostate cancer mortality decline. *Cancer Causes and Control*, 19(2), 175-181.
- Fabris, L. vd.** (2016). The Potential of MicroRNAs as Prostate Cancer Biomarkers. *European urology*, 70(2), 312-322.
- Fan, K. vd.** (2020). Highly Expressed miR-375 is not an Intracellular Oncogene in Merkel Cell Polyomavirus-Associated Merkel Cell Carcinoma. *Cancers*, 12(3).

- Fan, L. vd.** (2016). Regulation of c-Myc expression by the histone demethylase JMJD1A is essential for prostate cancer cell growth and survival. *Oncogene*, 35(19), 2441.
- Fan, Y. P. vd.** (2017). MiR-375 and Doxorubicin Co-delivered by Liposomes for Combination Therapy of Hepatocellular Carcinoma. *Molecular therapy. Nucleic acids*, 7, 181-189.
- Fang, Y. X., & Gao, W. Q.** (2014). Roles of microRNAs during prostatic tumorigenesis and tumor progression. *Oncogene*, 33(2), 135-147.
- Feinberg, A. P., Ohlsson, R., & Henikoff, S.** (2006). The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nature Reviews Genetics*, 7(1), 21-33.
- Feliciano, A. vd.** (2013). miR-125b acts as a tumor suppressor in breast tumorigenesis via its novel direct targets ENPEP, CK2- α , CCNJ, and MEGF9. *PloS one*, 8(10).
- Feng, J. vd.** (2017). MicroRNA-125b targeted STAT3 to inhibit laryngeal squamous cell carcinoma cell growth and motility. *Oncology Letters*, 14(1), 480.
- Feng, Z., vd.** (2007). The regulation of AMPK β 1, TSC2, and PTEN expression by p53: stress, cell and tissue specificity, and the role of these gene products in modulating the IGF-1-AKT-mTOR pathways. *Cancer research*, 67(7), 3043-3053.
- Ferracin, M. vd.** (2013). MiR-125b targets erythropoietin and its receptor and their expression correlates with metastatic potential and ERBB2/HER2 expression. *Molecular Cancer*, 12(1), 1-10.
- Filella, X., & Foj, L.** (2017). miRNAs as novel biomarkers in the management of prostate cancer. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 55(5), 715-736.
- Filipowicz, W., Bhattacharyya, S. N., & Sonenberg, N.** (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nature Reviews Genetics*, 9(2), 102-114.
- Fournier, P. G. J. vd.** (2015). The TGF- β Signaling Regulator PMEPA1 Suppresses Prostate Cancer Metastases to Bone. *Cancer cell*, 27(6), 809-821.
- Foster, C. S. vd.** (2002). Prostatic stem cells. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 197(4), 551-565.
- Fredsøe, J. vd.** (2018). Diagnostic and Prognostic MicroRNA Biomarkers for Prostate Cancer in Cell-free Urine. *European Urology Focus*, 4(6), 825-833.

- Fruman, D. A. vd.** (2017). The PI3K pathway in human disease. *Cell*, 170(4), 605-635.
- Fu, H. vd.** (2017). miR-375 inhibits cancer stem cell phenotype and tamoxifen resistance by degrading HOXB3 in human ER-positive breast cancer. *Oncology reports*, 37(2), 1093-1099.
- Fu, Y., & Cao, F.** (2015). MicroRNA-125a-5p regulates cancer cell proliferation and migration through NAIF1 in prostate carcinoma. *OncoTargets and therapy*, 8, 3827-3835.
- Funa, N. S., vd.** (2015). β -Catenin Regulates Primitive Streak Induction through Collaborative Interactions with SMAD2/SMAD3 and OCT4. *Cell stem cell*, 16(6), 639-652.
- Gagliardi, P. A., Puliafito, A., & Primo, L.** (2018). PDK1: At the crossroad of cancer signaling pathways. *Seminars in cancer biology*, 48, 27-35.
- Galardi, S. vd.** (2007). miR-221 and miR-222 expression affects the proliferation potential of human prostate carcinoma cell lines by targeting p27Kip1. *The Journal of biological chemistry*, 282(32), 23716-23724.
- Gallo, A. vd.** (2012). The Majority of MicroRNAs Detectable in Serum and Saliva Is Concentrated in Exosomes. *PLOS ONE*, 7(3), e30679.
- Gan, J. vd.** (2022). MicroRNA-375 is a therapeutic target for castration-resistant prostate cancer through the PTPN4/STAT3 axis. *Experimental & Molecular Medicine*, 54(8), 1290.
- Gan, T. Q. vd.** (2017). Clinical Value and Prospective Pathway Signaling of MicroRNA-375 in Lung Adenocarcinoma: A Study Based on the Cancer Genome Atlas (TCGA), Gene Expression Omnibus (GEO) and Bioinformatics Analysis. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*, 23, 2453-2464.
- Gann, P. H. vd.** (1996). Prospective Study of Sex Hormone Levels and Risk of Prostate Cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 88(16), 1118-1126.
- Gao, D., vd.** (2018). The mechanism study of miR-125b in occurrence and progression of multiple myeloma. *Cancer Medicine*, 7(1), 134.
- Giangreco, A. A. vd.** (2013). Tumor suppressor microRNAs, miR-100 and -125b, are regulated by 1,25-dihydroxyvitamin D in primary prostate cells and in patient tissue. *Cancer Prevention Research*, 6(5), 483-494.

- Goto, Y. vd.** (2015). MicroRNA expression signature of castration-resistant prostate cancer: the microRNA-221/222 cluster functions as a tumour suppressor and disease progression marker. *British Journal of Cancer*, 113(7), 1055-1065.
- Gravestock, P. vd.** (2022). Prostate cancer diagnosis: Biopsy approaches. *Exon Publications*, 141-168.
- Grindedal, E. M. vd.** (2009). Germ-line mutations in mismatch repair genes associated with prostate cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 18(9), 2460-2467.
- Gu, G. vd.** (2017). Overexpression of ARF1 is associated with cell proliferation and migration through PI3K signal pathway in ovarian cancer. *Oncology reports*, 37(3), 1511-1520.
- Guan, Y. vd.** (2011). MiR-125b targets BCL3 and suppresses ovarian cancer proliferation. *International journal of cancer*, 128(10), 2274-2283.
- Guo, F. vd.** (2019). miR-375-3p/YWHAZ/ β -catenin axis regulates migration, invasion, EMT in gastric cancer cells. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*, 46(2), 144-152.
- Haemmig, S. vd.** (2014). miR-125b controls apoptosis and temozolomide resistance by targeting TNFAIP3 and NKIRAS2 in glioblastomas. *Cell death & disease*, 5(6).
- Haffner, M. C. vd.** (2016). Molecular evidence that invasive adenocarcinoma can mimic prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) and intraductal carcinoma through retrograde glandular colonization. *The Journal of Pathology*, 238(1), 31-41.
- Hägglöf, C., vd.** (2014). TMPRSS2-ERG Expression Predicts Prostate Cancer Survival and Associates with Stromal Biomarkers. *PLoS ONE*, 9(2), 86824.
- Haj-Ahmad, T. A., Abdalla, M. A. K., & Haj-Ahmad, Y.** (2014). Potential Urinary Protein Biomarker Candidates for the Accurate Detection of Prostate Cancer among Benign Prostatic Hyperplasia Patients. *Journal of Cancer*, 5(2), 103-114.
- Hamada, S. vd.** (2014). Increased fatty acid synthase expression in prostate biopsy cores predicts higher Gleason score in radical prostatectomy specimen. *BMC Clinical Pathology*, 14(1), 1-6.
- Han, Y. vd.** (2013). Hsa-miR-125b suppresses bladder cancer development by down-regulating oncogene SIRT7 and oncogenic long non-coding RNA MALAT1. *FEBS Letters*, 587(23), 3875-3882.

- Hanniford, D. vd.** (2020). Epigenetic Silencing of CDR1as Drives IGF2BP3-Mediated Melanoma Invasion and Metastasis. *Cancer cell*, 37(1), 55-70.e15.
- He, L., & Hannon, G. J.** (2004). MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature reviews genetics*, 5(7), 522-531.
- He, S. vd.** (2019). The expression of miR-375 in prostate cancer: A study based on GEO, TCGA data and bioinformatics analysis. *Pathology Research and Practice*, 215(6), 152375.
- He, Y. vd.** (2017). Evaluation of miR-21 and miR-375 as prognostic biomarkers in oesophageal cancer in high-risk areas in China. *Clinical & experimental metastasis*, 34(1), 73-84.
- Herawi, M. vd.** (2006). Risk of Prostate Cancer on First Re-Biopsy Within 1 Year Following a Diagnosis of High Grade Prostatic Intraepithelial Neoplasia is Related to the Number of Cores Sampled. *The Journal of Urology*, 175(1), 121-124.
- Hermans, K. G. vd.** (2009). Overexpression of prostate-specific TMPRSS2(exon 0)-ERG fusion transcripts corresponds with favorable prognosis of prostate cancer. *Clinical Cancer Research*, 15(20), 6398-6403.
- Hermans, K. G. vd.** (2006). TMPRSS2:ERG Fusion by Translocation or Interstitial Deletion Is Highly Relevant in Androgen-Dependent Prostate Cancer, But Is Bypassed in Late-Stage Androgen Receptor–Negative Prostate Cancer. *Cancer Research*, 66(22), 10658-10663.
- Hlobilková, A. vd.** (2003). The mechanism of action of the tumour suppressor gene PTEN. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia*, 147(1), 19-25.
- Hong, L. vd.** (2016). miR-125b inhibited epithelial–mesenchymal transition of triple-negative breast cancer by targeting MAP2K7. *OncoTargets and therapy*, 9, 2639.
- Hong, S. vd.** (2014). SHOX2 Is a Direct miR-375 Target and a Novel Epithelial-to-Mesenchymal Transition Inducer in Breast Cancer Cells. *Neoplasia*, 16(4), 279-290.e5.
- Hope, Q. vd.** (2005). Macrophage scavenger receptor 1 999C> T (R293X) mutation and risk of prostate cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 14(2), 397-402.
- Hua, S. vd.** (2019). MiR-125b-5p inhibits cell proliferation, migration, and invasion in hepatocellular carcinoma via targeting TXNRD1. *Cancer Cell International*, 19(1), 1-11.

Huang, F. vd. (2014). MiR-196a Promotes Pancreatic Cancer Progression by Targeting Nuclear Factor Kappa-B-Inhibitor Alpha. *PLOS ONE*, 9(2), e87897.

Huang, L. vd. (2011). MicroRNA-125b suppresses the development of bladder cancer by targeting E2F3. *International journal of cancer*, 128(8), 1758-1769.

Huang, M. vd. (2016). Diet-induced alteration of fatty acid synthase in prostate cancer progression. *Oncogenesis*, 5(2), e195-e195.

Huang, T. vd. (2016). A regulatory circuit of miR-125b/miR-20b and Wnt signalling controls glioblastoma phenotypes through FZD6-modulated pathways. *Nature communications*, 7(1), 12885.

Huang, X. vd. (2015). Exosomal miR-1290 and miR-375 as prognostic markers in castration-resistant prostate cancer. *European Urology*, 67(1), 33-41.

Huang, X. vd. (2013). Characterization of human plasma-derived exosomal RNAs by deep sequencing. *BMC Genomics*, 14(1), 1-14.

Hudson, D. L. (2004). Epithelial stem cells in human prostate growth and disease. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, 7(3), 188-194.

Immordino, M. L., Dosio, F., & Cattel, L. (2006). Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. *International Journal of Nanomedicine*, 1(3), 297.

Incoronato, M. vd. (2019). Circulating miRNAs in Untreated Breast Cancer: An Exploratory Multimodality Morpho-Functional Study. *Cancers*, 11(6), 876.

Iorio, M. V., & Croce, C. M. (2009). MicroRNAs in cancer: small molecules with a huge impact. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 27(34), 5848-5856.

Itkonen, H. M. vd. (2016). Human DNA polymerase α interacts with mismatch repair proteins MSH2 and MSH6. *FEBS letters*, 590(23), 4233-4241.

Jackson, C. L. (2018). Activators and effectors of the small G protein Arf1 in regulation of Golgi dynamics during the cell division cycle. *Frontiers in cell and developmental biology*, 6, 29.

- Jemal, A. vd.** (2009). Cancer statistics, 2009. *CA: a cancer journal for clinicians*, 59(4), 225-249.
- Jewett, H. J.** (1956). Significance of the palpable prostatic nodule. *Journal of the American Medical Association*, 160(10), 838-839.,
- Jiang, G. B. vd.** (2019). COX-2 potentiates cisplatin resistance of non-small cell lung cancer cells by promoting EMT in an AKT signaling pathway-dependent manner. *European review for medical and pharmacological sciences*, 23(9), 3838-3846.
- Jia-Yuan, X. vd.** (2020). miR-375 Inhibits the Proliferation and Invasion of Nasopharyngeal Carcinoma Cells by Suppressing PDK1. *BioMed Research International*, 2020.
- Josson, S. vd.** (2008). Radiation modulation of microRNA in prostate cancer cell lines. *The Prostate*, 68(15), 1599-1606.
- Jülich, K., & Sahin, M.** (2014). Mechanism-based treatment in tuberous sclerosis complex. *Pediatric neurology*, 50(4), 290-296.
- Kappelmann, M. vd.** (2013). MicroRNA miR-125b controls melanoma progression by direct regulation of c-Jun protein expression. *Oncogene*, 32(24), 2984-2991.
- Karayi, M. K. & Markham, A. F.** (2004). Molecular biology of prostate cancer. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, 7(1), 6-20.
- Kasivisvanathan, V., vd.** (2018). MRI-Targeted or Standard Biopsy for Prostate-Cancer Diagnosis. *New England Journal of Medicine*, 378(19), 1767-1777.
- Kelly, B. D. vd.** (2015). A Circulating MicroRNA Signature as a Biomarker for Prostate Cancer in a High Risk Group. *Journal of clinical medicine*, 4(7), 1369-1379.
- Kim, S. W. vd.** (2012). MicroRNAs miR-125a and miR-125b constitutively activate the NF- κ B pathway by targeting the tumor necrosis factor alpha-induced protein 3 (TNFAIP3, A20). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(20), 7865-7870.
- Kim, T. S. vd.** (2006). Phenotypic Analysis of Mice Lacking the Tmprss2-Encoded Protease. *Molecular and Cellular Biology*, 26(3), 965-975.

- Klinge, C. M. vd.** (2011). Targeting the intracellular MUC1 C-terminal domain inhibits proliferation and estrogen receptor transcriptional activity in lung adenocarcinoma cells. *Molecular cancer therapeutics*, 10(11), 2062-2071.
- Kloosterman, W. P., & Plasterk, R. H. A.** (2006). The diverse functions of microRNAs in animal development and disease. *Developmental cell*, 11(4), 441-450.
- Kojima, K., vd.** (2010). MiR-34a attenuates paclitaxel-resistance of hormone-refractory prostate cancer PC3 cells through direct and indirect mechanisms. *The Prostate*, 70(14), 1501-1512.
- Kojima, S., Goto, Y., & Naya, Y.** (2017). The roles of microRNAs in the progression of castration-resistant prostate cancer. *Journal of human genetics*, 62(1), 25-31.
- Kokontis, J. M., & Liao, S.** (1998). Molecular Action of Androgen in the Normal and Neoplastic Prostate. *Vitamins and Hormones*, 55(C), 219-307.
- Kolesnikoff, N. vd.** (2014). Specificity protein 1 (Sp1) maintains basal epithelial expression of the miR-200 family: implications for epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of biological chemistry*, 289(16), 11194-11205.
- Kong, D. vd.** (2009). miR-200 regulates PDGF-D-mediated epithelial-mesenchymal transition, adhesion, and invasion of prostate cancer cells. *Stem cells*, 27(8), 1712-1721.
- Korzeniewski, N. vd.** (2015). Identification of cell-free microRNAs in the urine of patients with prostate cancer. *Urologic oncology*, 33(1), 16.e17-16.e22.
- Kozomara, A., & Griffiths-Jones, S.** (2014). miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Research*, 42(D1), D68-D73.
- Kristensen, H. vd.** (2014). Hypermethylation of the GABRE~miR-452~miR-224 promoter in prostate cancer predicts biochemical recurrence after radical prostatectomy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 20(8), 2169-2181.
- Kumar, S. vd.** (2018). MiR-375 Regulation of LDHB Plays Distinct Roles in Polyomavirus-Positive and -Negative Merkel Cell Carcinoma. *Cancers*, 10(11).
- Lal, A. vd.** (2008). p16INK4a Translation Suppressed by miR-24. *PLOS ONE*, 3(3), e1864.

- Lal, A. vd.** (2009). miR-24 Inhibits cell proliferation by targeting E2F2, MYC, and other cell-cycle genes via binding to “seedless” 3’UTR microRNA recognition elements. *Molecular cell*, 35(5), 610-625.
- Lawrie, C. H. vd.** (2008). Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *British journal of haematology*, 141(5), 672-675.
- Lee, C. vd.** (2012). TGF- β mediated DNA methylation in prostate cancer. *Translational Andrology and Urology*, 1(2), 78.
- Lee, K. H. vd.** (2009). MicroRNA-330 acts as tumor suppressor and induces apoptosis of prostate cancer cells through E2F1-mediated suppression of Akt phosphorylation. *Oncogene*, 28(38), 3360-3370.
- Lee, M., Kim, E. J., & Jeon, M. J.** (2016). MicroRNAs 125a and 125b inhibit ovarian cancer cells through post-transcriptional inactivation of EIF4EBP1. *Oncotarget*, 7(8), 8726-8742.
- Lee, Y. S. vd.** (2005). Depletion of human micro-RNA miR-125b reveals that it is critical for the proliferation of differentiated cells but not for the down-regulation of putative targets during differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 280(17), 16635-16641.
- Leroux, A. E., Schulze, J. O., & Biondi, R. M.** (2018). AGC kinases, mechanisms of regulation and innovative drug development. *In Seminars in cancer biology*, 48, 1-17.
- Leslie, N. R., Biondi, R. M., & Alessi, D. R.** (2001). Phosphoinositide-regulated kinases and phosphoinositide phosphatases. *Chemical reviews*, 101(8), 2365-2380.
- Lewis, B. P., Burge, C. B., & Bartel, D. P.** (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, 120(1), 15-20.
- Li, B. vd.** (2011). Down-regulation of microRNA 106b is involved in p21-mediated cell cycle arrest in response to radiation in prostate cancer cells. *The Prostate*, 71(6), 567-574.
- Li, G. vd.** (2018). Epigenetic silencing of miR-125b is required for normal B-cell development. *Blood*, 131(17), 1920-1930.
- Li, J., You, T., & Jing, J.** (2014). MiR-125b inhibits cell biological progression of Ewing’s sarcoma by suppressing the PI3K/Akt signalling pathway. *Cell proliferation*, 47(2), 152-160.

- Li, L. C., Carroll, P. R., & Dahiya, R.** (2005). Epigenetic changes in prostate cancer: implication for diagnosis and treatment. *Journal of the National Cancer Institute*, 97(2), 103-115.
- Li, M., vd.** (2020). Circulating miR-92b and miR-375 for monitoring the chemoresistance and prognosis of small cell lung cancer. *Scientific Reports*, 10(1), 12705.
- Li, Q. vd.** (2015). MicroRNA-125b promotes tumor metastasis through targeting tumor protein 53-induced nuclear protein 1 in patients with non-small-cell lung cancer. *Cancer Cell International*, 15(1), 84.
- Li, T. vd.** (2009). MicroRNA-21 directly targets MARCKS and promotes apoptosis resistance and invasion in prostate cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 383(3), 280-285.
- Li, X. L., & Xu, J. H.** (2012). MTHFR polymorphism and the risk of prostate cancer: a meta-analysis of case-control studies. *Prostate cancer and prostatic diseases*, 15(3), 244-249.
- Li, Y. vd.** (2018). miR-125b-5p inhibits breast cancer cell proliferation, migration and invasion by targeting KIAA1522. *Biochemical and biophysical research communications*, 504(1), 277-282.
- Li, Z. vd.** (2016). Exosomal microRNA-141 is upregulated in the serum of prostate cancer patients. *OncoTargets and therapy*, 9, 139.
- Liang, R., Bates, D. J., & Wang, E.** (2009). Epigenetic Control of MicroRNA Expression and Aging. *Current Genomics*, 10(3), 184.
- Lichner, Z. vd.** (2015). miRNAs dysregulated in association with Gleason grade regulate extracellular matrix, cytoskeleton and androgen receptor pathways. *The Journal of pathology*, 237(2), 226-237.
- Lichner, Z. vd.** (2013). MicroRNA signature helps distinguish early from late biochemical failure in prostate cancer. *Clinical chemistry*, 59(11), 1595-1603.
- Lim, L. P. vd.** (2005). Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*, 433(7027), 769-773.
- Lin, H. M. vd.** (2014). Circulating microRNAs are associated with docetaxel chemotherapy outcome in castration-resistant prostate cancer. *British journal of cancer*, 110(10), 2462-2471.

- Lin, K. Y. vd.** (2011). miR-125b, a target of CDX2, regulates cell differentiation through repression of the core binding factor in hematopoietic malignancies. *The Journal of biological chemistry*, 286(44), 38253-38263.
- Lin, S. L. vd.** (2008). Loss of mir-146a function in hormone-refractory prostate cancer. *RNA*, 14(3), 417.
- Liu, B. vd.** (2017). Serum miR-21 and miR-125b as markers predicting neoadjuvant chemotherapy response and prognosis in stage II/III breast cancer. *Human pathology*, 64, 44-52.
- Liu, J. vd.** (2020). MicroRNAs that regulate PTEN as potential biomarkers in colorectal cancer: a systematic review. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 146(4), 809-820.
- Liu, L. vd.** (2011). miR-125b suppresses the proliferation and migration of osteosarcoma cells through down-regulation of STAT3. *Biochemical and biophysical research communications*, 416(1-2), 31-38.
- Liu, S. Q. vd.** (2019). Sphingosine kinase 1 promotes the metastasis of colorectal cancer by inducing the epithelial-mesenchymal transition mediated by the FAK/AKT/MMPs axis. *International Journal of Oncology*, 54(1), 41.
- Liu, Weijun, & Wang, X.** (2019). Prediction of functional microRNA targets by integrative modeling of microRNA binding and target expression data. *Genome Biology*, 20(1), 1-10.
- Liu, W. vd.** (2009). Copy number analysis indicates monoclonal origin of lethal metastatic prostate cancer. *Nature medicine*, 15(5), 559-565.
- Liu, X. vd.** (2019). Trends and age-period-cohort effect on incidence and mortality of prostate cancer from 1990 to 2017 in China. *Public Health*, 172, 70-80.
- Liu, X. vd.** (2012). KLF6 loss of function in human prostate cancer progression is implicated in resistance to androgen deprivation. *The American journal of pathology*, 181(3), 1007-1016.
- Liu, Y. vd.** (2021). Genome Instability-Related miRNAs Predict Survival, Immune Landscape, and Immunotherapy Responses in Gastric Cancer. *Journal of Immunology Research*, 2021.
- Liu, Z. vd.** (2016). miR-125b regulates differentiation and metabolic reprogramming of T cell acute lymphoblastic leukemia by directly targeting A20. *Oncotarget*, 7(48), 78667-78679.

- Lodes, M. J. vd.** (2009). Detection of Cancer with Serum miRNAs on an Oligonucleotide Microarray. *PLOS ONE*, 4(7), e6229.
- Lu, Z. vd.** (2008). MicroRNA-21 promotes cell transformation by targeting the programmed cell death 4 gene. *Oncogene*, 27(31), 4373-4379.
- Lu, Z. vd.** (2021). miR-375 promotes pancreatic differentiation in vitro by affecting different target genes at different stages. *Stem Cells International*, 2021.
- Lujambio, A., & Lowe, S. W.** (2012). The microcosmos of cancer. *Nature*, 482(7385), 347-355.
- Luo, Y. vd.** (2017). Elevated microRNA-125b levels predict a worse prognosis in HER2-positive breast cancer patients. *Oncology Letters*, 13(2), 867.
- Ma, B., & Wells, A.** (2014). The mitogen-activated protein (MAP) kinases p38 and extracellular signal-regulated kinase (ERK) are involved in hepatocyte-mediated phenotypic switching in prostate cancer cells. *The Journal of biological chemistry*, 289(16), 11153-11161.
- Macintosh, C. A. vd.** (1998). Precise microdissection of human prostate cancers reveals genotypic heterogeneity. *Cancer research*, 58(1), 23-28.
- Mahn, R. vd.** (2011). Circulating microRNAs (miRNA) in serum of patients with prostate cancer. *Urology*, 77(5), 1265.e9-1265.e16.
- Mak, M. P. vd.** (2016). A patient-derived, pan-cancer EMT signature identifies global molecular alterations and immune target enrichment following epithelial-to-mesenchymal transition. *Clinical Cancer Research*, 22(3), 609-620.
- Malczewska, A. vd.** (2021). Circulating microRNAs in small-bowel neuroendocrine tumors: a potential tool for diagnosis and assessment of effectiveness of surgical resection. *Annals of surgery*, 274(1), e1-e9.
- Martens-Uzunova, E. S. vd.** (2012). Diagnostic and prognostic signatures from the small non-coding RNA transcriptome in prostate cancer. *Oncogene*, 31(8), 978-991.
- Martignano, F. vd.** (2016). GSTP1 Methylation and Protein Expression in Prostate Cancer: Diagnostic Implications. *Disease Markers*, 2016.
- Mashimo, T. vd.** (1998). Human chromosome 16 suppresses metastasis but not tumorigenesis in rat prostatic tumor cells. *Cancer research*, 58(20), 4572-4576.

- Massillo, C. vd.** (2017). Implications of microRNA dysregulation in the development of prostate cancer. *Reproduction (Cambridge, England)*, 154(4), R81-R97.
- Matin, F. vd.** (2016). MicroRNA Theranostics in Prostate Cancer Precision Medicine. *Clinical chemistry*, 62(10), 1318-1333.
- Matthew, E. M., vd.** (2009). The p53 target Plk2 interacts with TSC proteins impacting mTOR signaling, tumor growth, and chemosensitivity under hypoxic conditions. *Cell Cycle*, 8(24), 4168-4175.
- Mattie, M. D. vd.** (2006). Optimized high-throughput microRNA expression profiling provides novel biomarker assessment of clinical prostate and breast cancer biopsies. *Molecular Cancer*, 5, 24.
- McNeal, J. E.** (1988). Normal histology of the prostate. *The American journal of surgical pathology*, 12(8), 619-633.
- McNeal, John E.** (1981). The zonal anatomy of the prostate. *The Prostate*, 2(1), 35-49.
- Mehra, R. vd.** (2007). Heterogeneity of TMPRSS2 gene rearrangements in multifocal prostate adenocarcinoma: molecular evidence for an independent group of diseases. *Cancer research*, 67(17), 7991-7995.
- Mehra, R. vd.** (2008). Characterization of TMPRSS2-ETS Gene Aberrations in Androgen Independent Metastatic Prostate Cancer. *Cancer research*, 68(10), 3584.
- Mei, L. L. vd.** (2017). miR-125b-5p functions as a tumor suppressor gene partially by regulating HMGA2 in esophageal squamous cell carcinoma. *PLOS ONE*, 12(10), e0185636.
- Meiers, I., Shanks, J. H., & Bostwick, D. G.** (2007). Glutathione S-transferase pi (GSTP1) hypermethylation in prostate cancer: review. *Pathology*, 39(3), 299-304.
- Mercatelli, N. vd.** (2008). The inhibition of the highly expressed miR-221 and miR-222 impairs the growth of prostate carcinoma xenografts in mice. *PloS one*, 3(12).
- Metias, S. M., Lianidou, E., & Yousef, G. M.** (2009). MicroRNAs in clinical oncology: at the crossroads between promises and problems. *Journal of clinical pathology*, 62(9), 771-776.
- Migliore, C., & Giordano, S.** (2013). Resistance to targeted therapies: a role for microRNAs? *Trends in molecular medicine*, 19(10), 633-642.

- Miranda, K. C. vd.** (2006). A pattern-based method for the identification of MicroRNA binding sites and their corresponding heteroduplexes. *Cell*, 126(6), 1203-1217.
- Mirnezami, A. H. F. vd.** (2009). MicroRNAs: key players in carcinogenesis and novel therapeutic targets. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)*, 35(4), 339-347.
- Misawa, A. vd.** (2016). Androgen-induced long noncoding RNA (lncRNA) SOCS2-AS1 promotes cell growth and inhibits apoptosis in prostate cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, 291(34), 17861-17880.
- Mitchell, P. S. vd.** (2008). Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(30), 10513-10518.
- Mitsiades, N. vd.** (2012). Distinct patterns of dysregulated expression of enzymes involved in androgen synthesis and metabolism in metastatic prostate cancer tumors. *Cancer Research*, 72(23), 6142-6152.
- Mohler, J. L. vd.** (2002). Identification of differentially expressed genes associated with androgen-independent growth of prostate cancer. *The Prostate*, 51(4), 247-255.
- Musiyenko, A., Bitko, V., & Barik, S.** (2008). Ectopic expression of miR-126*, an intronic product of the vascular endothelial EGF-like 7 gene, regulates protein translation and invasiveness of prostate cancer LNCaP cells. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 86(3), 313-322.
- Nam, S. vd.** (2012). An integrative analysis of cellular contexts, miRNAs and mRNAs reveals network clusters associated with antiestrogen-resistant breast cancer cells. *BMC Genomics*, 13(1), 1-8.
- Nelson, W. G., De Marzo, A. M., & Isaacs, W. B.** (2003). Prostate cancer. *The New England journal of medicine*, 349(4), 366-381.
- Nguyen, H. C. N. vd.** (2013). Expression differences of circulating microRNAs in metastatic castration resistant prostate cancer and low-risk, localized prostate cancer. *The Prostate*, 73(4), 346-354.
- Nickerson, M. L. vd.** (2017). TET2 binds the androgen receptor and loss is associated with prostate cancer. *Oncogene*, 36(15), 2172-2183.

- Nickerson, M. L. vd.** (2013). Somatic alterations contributing to metastasis of a castration-resistant prostate cancer. *Human mutation*, 34(9), 1231-1241.
- Nishikawa, E. vd.** (2011). miR-375 is activated by ASH1 and inhibits YAP1 in a lineage-dependent manner in lung cancer. *Cancer research*, 71(19), 6165-6173.
- Nwosu, V. vd.** (2001). Heterogeneity of genetic alterations in prostate cancer: evidence of the complex nature of the disease. *Human Molecular Genetics*, 10(20), 2313-2318.
- Ohori, M., Wheeler, T. M., & Scardino, P. T.** (1994). The new American joint committee on cancer and international union against cancer TNM classification of prostate cancer. *Cancer*, 74(1), 104-114.
- Ozen, M. vd.** (2008). Widespread deregulation of microRNA expression in human prostate cancer. *Oncogene*, 27(12), 1788-1793.
- Pacheco-Rodriguez, G., Moss, J., & Vaughan, M.** (2005). Cytohesin-1: structure, function, and ARF activation. *Methods in enzymology*, 404, 184-195.
- Packer, J. R., & Maitland, N. J.** (2016). The molecular and cellular origin of human prostate cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1863(6), 1238-1260.
- Panagopoulos, I. vd.** (2006). Confirmation of the high frequency of the TMPRSS2/ERG fusion gene in prostate cancer. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 45(7), 717-719.
- Parayath, N. N. vd.** (2019). Improved anti-tumor efficacy of paclitaxel in combination with MicroRNA-125b-based tumor-associated macrophage repolarization in epithelial ovarian cancer. *Cancer letters*, 461, 1-9.
- Parayath, N. N., Parikh, A., & Amiji, M. M.** (2018). Repolarization of Tumor-Associated Macrophages in a Genetically Engineered Non-small Cell Lung Cancer Model by Intraperitoneal Administration of Hyaluronic Acid-Based Nanoparticles Encapsulating MicroRNA-125b. *Nano letters*, 18(6), 3571-3579.
- Parikh, A. vd.** (2014). microRNA-181a has a critical role in ovarian cancer progression through the regulation of the epithelial-mesenchymal transition. *Nature communications*, 5.
- Park, J. J. vd.** (2012). KAI1 suppresses HIF-1 α and VEGF expression by blocking CDCP1-enhanced Src activation in prostate cancer. *BMC cancer*, 12.

- Parmar, N., & Tamanoi, F.** (2010). Rheb G-Proteins and the Activation of mTORC1. In *The Enzymes* (Vol. 27, pp. 39-56). Academic Press.
- Pastushenko, I. vd.** (2018). Identification of the tumour transition states occurring during EMT. *Nature*, 556(7702).
- Pastushenko, I. vd.** (2021). Fat1 deletion promotes hybrid EMT state, tumour stemness and metastasis. *Nature*, 589(7842), 448-455.
- Peehl, D. M.** (2005). Primary cell cultures as models of prostate cancer development. *Endocrine-related cancer*, 12(1), 19-47.
- Perner, S. vd.** (2007). TMPRSS2-ERG fusion prostate cancer: An early molecular event associated with invasion. *American Journal of Surgical Pathology*, 31(6), 882-888.
- Petrova, Y. I., Schecterson, L., & Gumbiner, B. M.** (2016). Roles for E-cadherin cell surface regulation in cancer. *Molecular biology of the cell*, 27(21), 3233-3244.
- Porkka, K. P. vd.** (2007). MicroRNA expression profiling in prostate cancer. *Cancer research*, 67(13), 6130-6135.
- Pritchard, C. C. vd.** (2016). Inherited DNA-Repair Gene Mutations in Men with Metastatic Prostate Cancer. *The New England journal of medicine*, 375(5), 443-453.
- Pritchard, C. C. vd.** (2014). Complex MSH2 and MSH6 mutations in hypermutated microsatellite unstable advanced prostate cancer. *Nature communications*, 5(1), 4988.
- Prueitt, R. L. vd.** (2008). Expression of microRNAs and protein-coding genes associated with perineural invasion in prostate cancer. *The Prostate*, 68(11), 1152-1164.
- Putzi, M. J., & De Marzo, A. M.** (2000). Morphologic transitions between proliferative inflammatory atrophy and high-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Urology*, 56(5), 828-832.
- Qin, E. C. vd.** (2019). Graphene oxide substrates with N-cadherin stimulates neuronal growth and intracellular transport. *Acta biomaterialia*, 90, 412-423.
- Rajabi, H. vd.** (2010). Mucin 1 oncoprotein expression is suppressed by the miR-125b oncomir. *Genes and Cancer*, 1(1), 62-68.
- Rak, J. vd.** (2017). Cytohesin 1 regulates homing and engraftment of human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*, 129(8), 950-958.

- Ramalho-Carvalho, J. vd.** (2016). Deciphering the function of non-coding RNAs in prostate cancer. *Cancer metastasis reviews*, 35(2), 235-262.
- Razdan, A., de Souza, P., & Roberts, T. L.** (2018). Role of MicroRNAs in Treatment Response in Prostate Cancer. *Current Cancer Drug Targets*, 18(10), 929-944.
- Rea, K. vd.** (2018). Simultaneous E-cadherin and PLEKHA7 expression negatively affects E-cadherin/EGFR mediated ovarian cancer cell growth. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 37, 1-16.
- Rebeck, T. R. vd.** (2013). Global Patterns of Prostate Cancer Incidence, Aggressiveness, and Mortality in Men of African Descent. *Prostate Cancer*, 2013, 1-12.
- Reyes, G. X. vd.** (2015). New insights into the mechanism of DNA mismatch repair. *Chromosoma*, 124(4), 443-462.
- Ribas, J. vd.** (2009). miR-21: an androgen receptor-regulated microRNA that promotes hormone-dependent and hormone-independent prostate cancer growth. *Cancer research*, 69(18), 7165-7169.
- Rigoutsos, I.** (2009). New tricks for animal microRNAs: targeting of amino acid coding regions at conserved and nonconserved sites. *Cancer research*, 69(8), 3245-3248.
- Rokhlin, O. W. vd.** (2008). MicroRNA-34 mediates AR-dependent p53-induced apoptosis in prostate cancer. *Cancer biology & therapy*, 7(8), 1288-1296.
- Ronen, S. vd.** (2017). PTEN loss and p27 loss differ among morphologic patterns of prostate cancer, including cribriform. *Human pathology*, 65, 85-91.
- Rosser, C. J. vd.** (2004). Adenoviral-mediated PTEN transgene expression sensitizes Bcl-2-expressing prostate cancer cells to radiation. *Cancer Gene Therapy*, 11(4), 273-279.
- Rossi, R. L. vd.** (2011). Distinct microRNA signatures in human lymphocyte subsets and enforcement of the naive state in CD4⁺ T cells by the microRNA miR-125b. *Nature immunology*, 12(8), 796-803.
- Rouhi, A. vd.** (2008). MiRNAs, epigenetics, and cancer. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society*, 19(7-8), 517-525.
- Ruska, K. M., Sauvageot, J., & Epstein, J. I.** (1998). Histology and cellular kinetics of prostatic atrophy. *The American journal of surgical pathology*, 22(9), 1073-1077.

- Sakr, W. A. vd.** (1994). High grade prostatic intraepithelial neoplasia (HGPIN) and prostatic adenocarcinoma between the ages of 20-69: an autopsy study of 249 cases. *In Vivo (Athens, Greece)*, 8(3), 439-443.
- Sakr, W. A. vd.** (1993). The Frequency of Carcinoma and Intraepithelial Neoplasia of the Prostate in Young Male Patients. *The Journal of Urology*, 150(2), 379-385.
- Sandhu, S. K. vd.** (2013). Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors for the treatment of advanced germline BRCA2 mutant prostate cancer. *Annals of Oncology*, 24(5), 1416-1418.
- Santarpia, L., Nicoloso, M., & Calin, G. A.** (2010). MicroRNAs: a complex regulatory network drives the acquisition of malignant cell phenotype. *Endocrine-related cancer*, 17(1).
- Saranyutanon, S. vd.** (2020). Cellular and Molecular Progression of Prostate Cancer: Models for Basic and Preclinical Research. *Cancers*, 12(9), 1-26.
- Schaefer, A. vd.** (2010). MicroRNAs and cancer: current state and future perspectives in urologic oncology. *Urologic oncology*, 28(1), 4-13.
- Schaefer, A. vd.** (2010). Diagnostic and prognostic implications of microRNA profiling in prostate carcinoma. *International journal of cancer*, 126(5), 1166-1176.
- Schlienger, S., Ramirez, R. A. M., & Claing, A.** (2015). ARF1 regulates adhesion of MDA-MB-231 invasive breast cancer cells through formation of focal adhesions. *Cellular signalling*, 27(3), 403-415.
- Schröder, F. H. vd.** (1992). The TNM classification of prostate cancer. *The Prostate. Supplement*, 4(4 S), 129-138.
- Schulz, W. A., Burchardt, M., & Cronauer, M. V.** (2003). Molecular biology of prostate cancer. *Molecular human reproduction*, 9(8), 437-448.
- Sekuklu, S. D., Donoghue, M. T. A., & Spillane, C.** (2009). miR-21 as a key regulator of oncogenic processes. *Biochemical Society transactions*, 37(4), 918-925.
- Selth, L. A. vd.** (2017). A ZEB1-miR-375-YAP1 pathway regulates epithelial plasticity in prostate cancer. *Oncogene*, 36(1), 24-34.
- Selth, L. A. vd.** (2013). Circulating microRNAs predict biochemical recurrence in prostate cancer patients. *British journal of cancer*, 109(3), 641-650.

Selth, L. A. vd. (2012). Discovery of circulating microRNAs associated with human prostate cancer using a mouse model of disease. *International Journal of Cancer*, 131(3), 652-661.

Shah, R. B. vd. (2004). Androgen-independent prostate cancer is a heterogeneous group of diseases: lessons from a rapid autopsy program. *Cancer research*, 64(24), 9209-9216.

Shang, C., Lu, Y. M., & Meng, L. R. (2012). MicroRNA-125b down-regulation mediates endometrial cancer invasion by targeting ERBB2. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*, 18(4).

Shappell, S. B. vd. (2004). Prostate pathology of genetically engineered mice: definitions and classification. The consensus report from the Bar Harbor meeting of the Mouse Models of Human Cancer Consortium Prostate Pathology Committee. *Cancer research*, 64(6), 2270-2305.

Shen, M. M., & Abate-Shen, C. (2010). Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges. *Genes & Development*, 24(18), 1967-2000.

Shen, Y. vd. (2014). miR-375 Mediated Acquired Chemo-Resistance in Cervical Cancer by Facilitating EMT. *PLOS ONE*, 9(10), e109299.

Shi, G. H. vd. (2010). Involvement of microRNA-21 in mediating chemo-resistance to docetaxel in androgen-independent prostate cancer PC3 cells. *Acta pharmacologica Sinica*, 31(7), 867-873.

Shi, L. vd. (2014). miR-125b inhibitor may enhance the invasion-prevention activity of temozolomide in glioblastoma stem cells by targeting PIAS3. *BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy*, 28(1), 41-54.

Shi, X. B. vd. (2011). MiR-125b promotes growth of prostate cancer xenograft tumor through targeting pro-apoptotic genes. *Prostate*, 71(5), 538-549.

Shi, X. B. vd. (2007). An androgen-regulated miRNA suppresses Bak1 expression and induces androgen-independent growth of prostate cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(50), 19983-19988.

Shiraishi, T. vd. (1994). The frequency of latent prostatic carcinoma in young males: the Japanese experience. *In Vivo (Athens, Greece)*, 8(3), 445-447.

Shyu, A. Bin, Wilkinson, M. F., & Van Hoof, A. (2008). Messenger RNA regulation: to translate or to degrade. *The EMBO journal*, 27(3), 471-481.

- Si, M. L. vd.** (2007). miR-21-mediated tumor growth. *Oncogene*, 26(19), 2799-2803.
- Siampanopoulou, M. vd.** (2013). Profiling serum HER-2/NEU in prostate cancer. *Hippokratia*, 17(2), 108.
- Simard, J. vd.** (2003). Prostate cancer susceptibility genes: lessons learned and challenges posed. *Endocrine-related cancer*, 10(2), 225-259.
- Singh, S., Plaga, A., & Shukla, G. C.** (2017). Racial disparities: disruptive genes in prostate carcinogenesis. *Frontiers in bioscience (Scholar edition)*, 9(2), 244-253.
- Singh, S., Shukla, G. C., & Gupta, S.** (2015). MicroRNA Regulating Glutathione S-Transferase P1 in Prostate Cancer. *Current Pharmacology Reports*, 1(2), 79-88.
- Sita-Lumsden, A. vd.** (2013). Circulating microRNAs as potential new biomarkers for prostate cancer. *British Journal of Cancer*, 108(10), 1925.
- Siva, A. C. vd.** (2009). Molecular assays for the detection of microRNAs in prostate cancer. *Molecular Cancer*, 8(1), 1-12.
- Skog, J. vd.** (2008). Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nature cell biology*, 10(12), 1470-1476.
- Song, C. J. vd.** (2018). The potential of microRNAs as human prostate cancer biomarkers: A meta-analysis of related studies. *Journal of Cellular Biochemistry*, 119(3), 2763-2786.
- Spahn, M. vd.** (2010). Expression of microRNA-221 is progressively reduced in aggressive prostate cancer and metastasis and predicts clinical recurrence. *International journal of cancer*, 127(2), 394-403.
- Srivastava, A. vd.** (2013). MicroRNA profiling in prostate cancer--the diagnostic potential of urinary miR-205 and miR-214. *PloS one*, 8(10).
- Stanbrough, M. vd.** (2006). Increased Expression of Genes Converting Adrenal Androgens to Testosterone in Androgen-Independent Prostate Cancer. *Cancer Research*, 66(5), 2815-2825.
- Steele, C. B. vd.** (2017). Prostate cancer survival in the United States by race and stage (2001-2009): Findings from the CONCORD-2 study. *Cancer*, 123, 5160-5177.
- Steinberg, G. D. vd.** (1990). Family history and the risk of prostate cancer. *The Prostate*, 17(4), 337-347.

- Stuopelyte, K. vd.** (2016). Detection of miRNAs in urine of prostate cancer patients. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 52(2), 116-124.
- Sui, M. vd.** (2017). Upregulation of miR-125b is associated with poor prognosis and trastuzumab resistance in HER2-positive gastric cancer. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 14(1), 657.
- Sui, X., vd.** (2014). p38 and JNK MAPK pathways control the balance of apoptosis and autophagy in response to chemotherapeutic agents. *Cancer letters*, 344(2), 174-179.
- Sun, R. vd.** (2009). Global gene expression analysis reveals reduced abundance of putative microRNA targets in human prostate tumours. *BMC Genomics*, 10(1), 1-14.
- Sun, T. vd.** (2014). MiR-221 promotes the development of androgen independence in prostate cancer cells via downregulation of HECTD2 and RAB1A. *Oncogene*, 33(21), 2790-2800.
- Sun, T. vd.** (2009). The role of microRNA-221 and microRNA-222 in androgen-independent prostate cancer cell lines. *Cancer research*, 69(8), 3356-3363.
- Sun, Y. vd.** (2016). Oncogenic potential of TSTA3 in breast cancer and its regulation by the tumor suppressors miR-125a-5p and miR-125b. *Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 37(4), 4963-4972.
- Sun, Y., vd.** (2008). Phospholipase D1 is an effector of Rheb in the mTOR pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(24), 8286-8291.
- Sung, H. vd.** (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, caac.21660.
- Suzuki, H. vd.** (2012). DNA methylation and microRNA dysregulation in cancer. *Molecular oncology*, 6(6), 567-578.
- Szczyrba, J. vd.** (2010). The microRNA profile of prostate carcinoma obtained by deep sequencing. *Molecular cancer research : MCR*, 8(4), 529-538.
- Takayama, K. I., Misawa, A., & Inoue, S.** (2017). Significance of microRNAs in androgen signaling and prostate cancer progression. *Cancers*, 9(8), 102.
- Tan, M. E. vd.** (2014). Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. *Acta Pharmacologica Sinica*, 36(1), 3-23.

- Tandefelt, D. G. vd.** (2014). ETS fusion genes in prostate cancer. *Endocrine-Related Cancer*, 21(3), 143-152.
- Tang, F. vd.** (2012). MicroRNA-125b Induces Metastasis by Targeting STARD13 in MCF-7 and MDA-MB-231 Breast Cancer Cells. *PLoS ONE*, 7(5), 35435.
- Tang, X. Y. vd.** (2016). miR-125b acts as a tumor suppressor in chondrosarcoma cells by the sensitization to doxorubicin through direct targeting the ErbB2-regulated glucose metabolism. *Drug Design, Development and Therapy*, 10, 571.
- Tannock, I. F. vd.** (2004). Docetaxel plus Prednisone or Mitoxantrone plus Prednisone for Advanced Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine*, 351(15), 1502-1512.
- Tay, Y. vd.** (2008). MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. *Nature*, 455(7216), 1124-1128.
- Teo, M. Y., Rathkopf, D. E., & Kantoff, P.** (2019). Treatment of Advanced Prostate Cancer. *Annual Review of Medicine*, 70(1), 479-499.
- Testa, U., Castelli, G., & Pelosi, E.** (2019). Cellular and Molecular Mechanisms Underlying Prostate Cancer Development: Therapeutic Implications. *Medicines*, 6(3), 82.
- Theodore, S. C. vd.** (2014). MicroRNA profiling of novel African American and Caucasian Prostate Cancer cell lines reveals a reciprocal regulatory relationship of miR-152 and DNA methyltransferase 1. *Oncotarget*, 5(11), 3512-3525.
- Tian, T., Li, X., & Zhang, J.** (2019). mTOR signaling in cancer and mTOR inhibitors in solid tumor targeting therapy. *International journal of molecular sciences*, 20(3), 755.
- Timms, B. G.** (2008). Prostate development: a historical perspective. *Differentiation*, 76(6), 565-577.
- Tomlins, S. A. vd.** (2008). Role of the TMPRSS2-ERG Gene Fusion in Prostate Cancer. *Neoplasia*, 10(2), 177-IN9.
- Tomlins, S. A. vd.** (2006). Integrative molecular concept modeling of prostate cancer progression. *Nature Genetics*, 39(1), 41-51.
- Tomlins, S. A. vd.** (2005). Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science*, 310(5748), 644-648.

Tong, A. W. vd. (2009). MicroRNA profile analysis of human prostate cancers. *Cancer gene therapy*, 16(3), 206-216.

Torres-Ferreira, J. vd. (2017). MiR-193b promoter methylation accurately detects prostate cancer in urine sediments and miR-34b/c or miR-129-2 promoter methylation define subsets of clinically aggressive tumors. *Molecular cancer*, 16(1).

Tripathi, V. vd. (2013). Long noncoding RNA MALAT1 controls cell cycle progression by regulating the expression of oncogenic transcription factor B-MYB. *PLoS genetics*, 9(3).

Tsang, F. H. vd. (2014). Prognostic marker microRNA-125b inhibits tumorigenic properties of hepatocellular carcinoma cells via suppressing tumorigenic molecule eIF5A2. *Digestive diseases and sciences*, 59(10), 2477-2487.

Ushijima, T. (2007). Epigenetic field for cancerization. *Journal of biochemistry and molecular biology*, 40(2), 142-150.

URL 1, Venny 2.1 [Erişim: 15.05.2021 <https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>]

URL 2, TargetScan Release 7.1 (2012). Prediction of microRNA targets [Erişim: 20.04.2021 https://www.targetscan.org/vert_80/]

URL 3, miRDB (2015), Online database for miRNA target prediction and functional annotations. [Erişim: 21.04.2021 <https://mirdb.org/>]

URL 4, miRWalk, An open-source platform providing an intuitive interface that generates predicted and validated miRNA-binding sites of known genes of human, mouse, rat, dog and cow. [Erişim: 20.04.2021 <http://mirwalk.uni-hd.de/>]

URL 5, miRTarBase, The experimentally validated microRNA-target interactions database. [Erişim: 21.05.2021 https://mirtarbase.cuhk.edu.cn/~miRTarBase/miRTarBase_2022/php/index.php]

URL 6, KEGG, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. [Erişim: 10.07.2021 <https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>]

URL 7, The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) provides a comprehensive set of functional annotation tools for investigators to understand the biological meaning behind large lists of genes. [Erişim: 05.08.2021 <https://david.ncifcrf.gov/tools.jsp>]

URL 8, Biorender, BioRender is revolutionizing how science is communicated, one graphic at a time [Erişim: 25.08.2021 <https://www.biorender.com/>]

URL 9, NCBI, National Library of Medicine [Erişim: 09.07.2023 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>]

URL 10, ENSEMBL Release 111 (2014), Ensembl is a genome browser for vertebrate genomes that supports research in comparative genomics, evolution, sequence variation and transcriptional regulation. [Erişim: 10.07.2023 <https://www.ensembl.org/index.html>]

URL 11, NCBI- Basic Local Alignment Search Tool. BLAST finds regions of similarity between biological sequences. [Erişim: 09.07.2023 <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>]

URL 12, UCSC In-Silico PCR, In-Silico PCR searches a sequence database with a pair of PCR primers, using an indexing strategy for fast performance. [Erişim: 17.07.2023 <https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>]

Van Leenders, G. J. L. H., & Schalken, J. A. (2003). Epithelial cell differentiation in the human prostate epithelium: Implications for the pathogenesis and therapy of prostate cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 46, 3-10.

Vanaja, D. K. vd. (2003). Transcriptional silencing of zinc finger protein 185 identified by expression profiling is associated with prostate cancer progression. *Cancer Research*.

Vanhaesebroeck, B., & Alessi, D. R. (2000). The PI3K–PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochemical Journal*, 346(3), 561-576.

Varambally, S. vd. (2008). Genomic loss of microRNA-101 leads to overexpression of histone methyltransferase EZH2 in cancer. *Science (New York, N.Y.)*, 322(5908), 1695-1699.

Velcheti, V. vd. (2008). Pathogenesis of Prostate Cancer: Lessons from Basic Research. *The Ochsner Journal*, 8(4), 213.

Vilquin, P. vd. (2015). MicroRNA-125b upregulation confers aromatase inhibitor resistance and is a novel marker of poor prognosis in breast cancer. *Breast Cancer Research*, 17(1), 1-20.

Viticchiè, G. vd. (2011). MiR-203 controls proliferation, migration and invasive potential of prostate cancer cell lines. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 10(7), 1121-1131.

- Volinia, S. vd.** (2006). A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(7), 2257-2261.
- Vral, A. vd.** (2012). Topographic and quantitative relationship between prostate inflammation, proliferative inflammatory atrophy and low-grade prostate intraepithelial neoplasia: a biopsy study in chronic prostatitis patients. *International journal of oncology*, 41(6), 1950-1958.
- Vrba, L. vd.** (2010). Role for DNA Methylation in the Regulation of miR-200c and miR-141 Expression in Normal and Cancer Cells. *PLOS ONE*, 5(1), e8697.
- Wach, S. vd.** (2015). The combined serum levels of miR-375 and urokinase plasminogen activator receptor are suggested as diagnostic and prognostic biomarkers in prostate cancer. *International journal of cancer*, 137(6), 1406-1416.
- Wang, B. vd.** (2016). DAB2IP regulates EMT and metastasis of prostate cancer through targeting PROX1 transcription and destabilizing HIF1 α protein. *Cellular Signalling*, 28(11), 1623-1630.
- Wang, B. vd.** (2016). miR-375 and miR-205 Regulate the Invasion and Migration of Laryngeal Squamous Cell Carcinoma Synergistically via AKT-Mediated EMT. *BioMed Research International*, 2016.
- Wang, C. F. vd.** (2005). Detection of germline mutations of hMLH1 and hMSH2 based on cDNA sequencing in China. *World journal of gastroenterology*, 11(42), 6620-6623.
- Wang, F. vd.** (2016). MiR-125b Functions as a Tumor Suppressor and Enhances Chemosensitivity to Cisplatin in Osteosarcoma. *Technology in cancer research & treatment*, 15(6), NP105-NP112.
- Wang, J. vd.** (2012). B-raf activation cooperates with PTEN loss to drive c-Myc expression in advanced prostate cancer. *Cancer Research*, 72(18), 4765-4776.
- Wang, M. vd.** (2015). High expression of kinesin light chain-2, a novel target of miR-125b, is associated with poor clinical outcome of elderly non-small-cell lung cancer patients. *British journal of cancer*, 112(5), 874-882.
- Wang, Q. vd.** (2009). Androgen Receptor Regulates a Distinct Transcription Program in Androgen-Independent Prostate Cancer. *Cell*, 138(2), 245-256.

- Wang, X. Z. vd.** (2016). Over-expression of microRNA-375 inhibits papillary thyroid carcinoma cell proliferation and induces cell apoptosis by targeting ERBB2. *Journal of pharmacological sciences*, 130(2), 78-84.
- Wang, Ying, Zeng, G., & Jiang, Y.** (2020). The Emerging Roles of miR-125b in Cancers. *Cancer management and research*, 12, 1079-1088.
- Wang, Y. vd.** (2016). miR-375 induces docetaxel resistance in prostate cancer by targeting SEC23A and YAP1. *Molecular cancer*, 15, 1-11.
- Wei, X. T. vd.** (2016). Serum MicroRNA-125b as a Potential Biomarker for Glioma Diagnosis. *Molecular neurobiology*, 53(1), 163-170.
- Weizhong, Z. vd.** (2011). Inhibition of cytohesin-1 by siRNA leads to reduced IGFR signaling in prostate cancer. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 44(7), 642-646.
- Whitmore, W. F.** (1984). Natural History and Staging of Prostate Cancer. *Urologic Clinics of North America*, 11(2), 205-220.
- Wiggins, J. F. vd.** (2010). Development of a lung cancer therapeutic based on the tumor suppressor microRNA-34. *Cancer research*, 70(14), 5923-5930.
- White, R. W. D. vd.** (2009). MicroRNAs and their potential for translation in prostate cancer. *In Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 27(3), 307-311.
- Wu, D. vd.** (2013). microRNA-125b inhibits cell migration and invasion by targeting matrix metalloproteinase 13 in bladder cancer. *Oncology Letters*, 5(3), 829.
- Wu, N. vd.** (2013). MiR-125b acts as an oncogene in glioblastoma cells and inhibits cell apoptosis through p53 and p38MAPK-independent pathways. *British Journal of Cancer*, 109(11), 2853-2863.
- Wu, Y. vd.** (2017). miR-125b suppresses the aerobic glycolysis of osteosarcoma HOS cells by downregulating the expression of hexokinase-2. *Xi bao yu fen zi Mian yi xue za zhi= Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*, 33(10), 1365-1370.
- Xie, D. vd.** (2017). Expression and prognostic significance of miR-375 and miR-221 in liver cancer. *Oncology Letters*, 14(2), 2305.
- Xie, X. vd.** (2005). Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals. *Nature*, 434(7031), 338-345.

- Xin, Y. vd.** (2017). Nano-based delivery of RNAi in cancer therapy. *Molecular Cancer*, 16(1), 1-9.
- Xu, J. vd.** (2001). Identification and Characterization of Prostein, a Novel Prostate-specific Protein 1. *CANCER RESEARCH*, 61, 1563-1568.
- Xu, N. vd.** (2019). Long noncoding RNA ROR1-AS1 enhances lung adenocarcinoma metastasis and induces epithelial-mesenchymal transition by sponging miR-375. *Journal of B.U.ON. : Official Journal of the Balkan Union of Oncology*, 24(6), 2273-2279.
- Xu, X. vd.** (2017). ADP-ribosylation factor 1 (ARF1) takes part in cell proliferation and cell adhesion-mediated drug resistance (CAM-DR). *Annals of hematology*, 96, 847-858.
- Xu, X. vd.** (2019). miR-375-3p suppresses tumorigenesis and partially reverses chemoresistance by targeting YAP1 and SP1 in colorectal cancer cells. *Aging (Albany NY)*, 11(18), 7357.
- Xue, H. vd.** (2017). Delivery of miR-375 and doxorubicin hydrochloride by lipid-coated hollow mesoporous silica nanoparticles to overcome multiple drug resistance in hepatocellular carcinoma. *International journal of nanomedicine*, 12, 5271-5287.
- Yan, Q. vd.** (2016). Construction of polymer-paclitaxel conjugate linked via a disulfide bond. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, 58, 580-585.
- Yang, D. vd.** (2017). miR-125b-5p enhances chemotherapy sensitivity to cisplatin by down-regulating Bcl2 in gallbladder cancer. *Scientific reports*, 7.
- Yang, X. vd.** (2012). MiR-125b regulation of androgen receptor signaling via modulation of the receptor complex co-repressor NCOR2. *BioResearch Open Access*, 1(2), 55-62.
- Yatani, R. vd.** (1989). Latent prostatic carcinoma: pathological and epidemiological aspects. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 19(4), 319-326.
- Ying, X. vd.** (2016). MicroRNA-125b Suppresses Ovarian Cancer Progression via Suppression of the Epithelial-Mesenchymal Transition Pathway by Targeting the SET Protein. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 39(2), 501-510.
- Yu, X. vd.** (2015). Scavenger Receptors: Emerging Roles in Cancer Biology and Immunology. *Advances in cancer research*, 128, 309.

- Yuan, T. Z. vd.** (2017). microRNA-125b reverses the multidrug resistance of nasopharyngeal carcinoma cells via targeting of Bcl-2. *Molecular medicine reports*, 15(4), 2223-2228.
- Zedan, A. H. vd.** (2020). Circulating miR-141 and miR-375 are associated with treatment outcome in metastatic castration resistant prostate cancer. *Scientific Reports*, 10(1).
- Zhang, B. vd.** (2007). microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Developmental biology*, 302(1), 1-12.
- Zhang, H. L. vd.** (2011). Serum miRNA-21: elevated levels in patients with metastatic hormone-refractory prostate cancer and potential predictive factor for the efficacy of docetaxel-based chemotherapy. *The Prostate*, 71(3), 326-331.
- Zhang, J. vd.** (2016). MicroRNA-125b suppresses the epithelial-mesenchymal transition and cell invasion by targeting ITGA9 in melanoma. *Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 37(5), 5941-5949.
- Zhang, L. vd.** (2006). microRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(24), 9136-9141.
- Zhang, W. vd.** (2011). Four and a half LIM protein 2 (FHL2) negatively regulates the transcription of E-cadherin through interaction with Snail1. *European Journal of Cancer*, 47(1), 121-130.
- Zhang, Y. vd.** (2011). miR-125b is methylated and functions as a tumor suppressor by regulating the ETS1 proto-oncogene in human invasive breast cancer. *Cancer research*, 71(10), 3552-3562.
- Zhao, J. F. vd.** (2018). The ASH1-miR-375-YWHAZ Signaling Axis Regulates Tumor Properties in Hepatocellular Carcinoma. *Molecular therapy. Nucleic acids*, 11, 538-553.
- Zhao, P. vd.** (2017). MiR-375 delivered by lipid-coated doxorubicin-calcium carbonate nanoparticles overcomes chemoresistance in hepatocellular carcinoma. *Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine*, 13(8), 2507-2516.
- Zhao, Q. vd.** (2020). MiR-375 inhibits the stemness of breast cancer cells by blocking the JAK2/STAT3 signaling. *European journal of pharmacology*, 884, 173359.

- Zhao, X. vd.** (2015). MiRNA-125b inhibits proliferation and migration by targeting SphK1 in bladder cancer. *American Journal of Translational Research*, 7(11), 2346.
- Zheng, Q. vd.** (2014). Investigation of miR-21, miR-141, and miR-221 expression levels in prostate adenocarcinoma for associated risk of recurrence after radical prostatectomy. *The Prostate*, 74(16), 1655-1662.
- Zheng, X., Li, C., & Gao, X.** (2022). Overexpression of miR-375 reverses the effects of dexamethasone on the viability, migration, invasion and apoptosis of human airway epithelial cells by targeting DUSP6. *International Journal of Molecular Medicine*, 49(3).
- Zheng, Z. vd.** (2017). MiR-125b regulates proliferation and apoptosis of nasopharyngeal carcinoma by targeting A20/NF- κ B signaling pathway. *Cell Death & Disease*, 8(6), e2855.
- Zhou, H. C. vd.** (2016). MicroRNAs miR-125b and miR-100 suppress metastasis of hepatocellular carcinoma by disrupting the formation of vessels that encapsulate tumour clusters. *The Journal of pathology*, 240(4), 450-460.
- Zhou, J. N. vd.** (2015). MicroRNA-125b attenuates epithelial-mesenchymal transitions and targets stem-like liver cancer cells through small mothers against decapentaplegic 2 and 4. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 62(3), 801-815.
- Zhou, J. vd.** (2014). MicroRNA-375 targets PDK1 in pancreatic carcinoma and suppresses cell growth through the Akt signaling pathway. *International Journal of Molecular Medicine*, 33(4), 950-956.
- Zhou, X., vd.** (2009). Rheb controls misfolded protein metabolism by inhibiting aggresome formation and autophagy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(22), 8923-8928.
- Zhu, L. vd.** (2020). Loss of HOXB3 correlates with the development of hormone receptor negative breast cancer. *PeerJ*, 8, e10421.
- Zhu, Y. vd.** (2019). miR-125b-5p and miR-99a-5p downregulate human $\gamma\delta$ T-cell activation and cytotoxicity. *Cellular & molecular immunology*, 16(2), 112-125.
- Zuo, D. vd.** (2016). Combination of miR-125b and miR-27a enhances sensitivity and specificity of AFP-based diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 37(5), 6539-6549.

EKLER

EK-1

Tablo-1: Prostat kanserinin AJCC TNM Evrelemesi

Evre	Tanımı
Primer Tümör, Klinik (T)	
TX	Primer tümör değerlendirilemez
T0	Primer tümör bulgusu yok
T1	Palpe edilemeyen veya görüntüleme ile görülemeyen klinik olarak belirgin olmayan tümör T1a: Çıkarılan dokunun %5'inde veya daha azında tümör insidental histolojik bulgusu T1b: Çıkarılan dokunun %5'inden fazlasında tümör insidental histoloji bulgusu T1c: İğne biyopsisi ile tanımlanan tümör [örn. PSA seviyeleri]
T2	Prostat içinde sınırlı tümör T2a: Tümör bir lobun yarısını veya daha azını tutar T2b: Tümör bir lobun yarısından fazlasını tutar ancak her ikisini birden tutmaz T2c: Tümör her iki lobu da içerir
T3	Tümör prostat kapsülü boyunca uzanır T3a: Ekstrakapsüler uzanım (tek taraflı veya iki taraflı) T3b: Tümör seminal vezikül(ler)i istila eder
T4	Tümör sabittir veya seminal vezikül(ler) dışındaki komşu yapıları istila eder: mesane boynu, eksternal sfinkter, rektum, levator kasları, pelvik duvar veya yukarıdakilerin tümü
Primer tümör, patolojik (pT)	

pT2 ^c	Organ sınırlı pT2a: Tek taraflı, bir lobun yarısını veya daha azını içeren pT2b: Tek taraflı, bir lobun yarısından fazlasını tutan ancak her iki lobu da tutmayan pT2c: Bilateral
pT3	Ekstraprostatik uzanım pT3a: Ekstraprostatik uzanım pT3b: Seminal vezikül invazyonu
pT4	Mesane, rektum invazyonu
Bölgesel lenf düğümleri (N)	
NX	Bölgesel lenf nodları değerlendirilemez
N0	Bölgesel lenf nodu metastazı yok
N1	Bölgesel lenf nodu veya nodlarında metastaz
Uzak Metastaz (M)	
M0	Kanser prostatın ötesine yayılmamıştır
M1	Kanser prostatın ötesine yayılmıştır M1a: kanser uzak lenf düğümüne yayılmış M1b: kanser kemiğe yayılmış M1c: kanserin kemik hastalığı olsun veya olmasın başka bir organa veya bölgeye yayılmış olması