T.C.
İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

PROSTAT KANSERİ HÜCRE DİZİSİNDE PROSTAGLANDİN ENDOPEROKSİT SENTAZ-2, TRANSMEMBRAN SERİN PROTEAZ-4 VE MAGE AİLESİ A3 ÜYESİ GENLERİNİN TRANSKRİPSİYON AŞAMASINDAKİ GEN ANLATIMLARININ KARŞILAŞTIRMALI OLARAK İNCELENMESİ

CEREN AYNACI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DR. ÖĞR. ÜYESİ FİLİZ SAĞLAM

İSTANBUL- 2020

T.C.
İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

PROSTAT KANSERİ HÜCRE DİZİSİNDE PROSTAGLANDİN ENDOPEROKSİT SENTAZ-2, TRANSMEMBRAN SERİN PROTEAZ-4 VE MAGE AİLESİ A3 ÜYESİ GENLERİNİN TRANSKRİPSİYON AŞAMASINDAKİ GEN ANLATIMLARININ KARŞILAŞTIRMALI OLARAK İNCELENMESİ

CEREN AYNACI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DR. ÖĞR. ÜYESİ FİLİZ SAĞLAM

İSTANBUL- 2020

İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ ONAYI

Bu tezin Yüksek Lisans derecesi için gereken tüm şartları sağladığını tasdik ederim.

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Başkanı
Prof. Dr. Veysel Sabri HANÇER

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Semra ŞARDAŞ

Bu tezin Yüksek Lisans / Doktora derecesi için gereken tüm şartları sağladığını tasdik ederim.

Dr. Öğretim Üyesi Filiz SAĞLAM
Danışman

Okuduğumuz ve savunmasını dinlediğimiz bu tezin bir Yüksek Lisans derecesi için gereken tüm kapsam ve kalite şartlarını sağladığını beyan ederiz.

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Veysel Sabri Hançer	İstinye Üniversitesi
Dr. Öğr. Üyesi	İstinye Üniversitesi
Prof. Dr. Matem Tunçdemir	İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa

T.C. İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ ONAYI

ETİK BEYANI

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum "PC3 PROSTAT KANSERİ HÜCRE DİZİSİNDE PROSTAGLANDİN ENDOPEROKSİT SENTAZ-2, TRANSMEMBRAN SERİN PROTEAZ-4 VE MAGE AİLESİ A3 ÜYESİ GENLERİNİN TRANSKRİPSİYON AŞAMASINDAKİ GEN ANLATIMLARININ KARŞILAŞTIRMALI OLARAK İNCELENMESİ" adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.

CEREN AYNACI

16.01.2020

ÖZET

PROSTAT KANSERİ HÜCRE DİZİSİNDE PROSTAGLANDİN ENDOPEROKSİT SENTAZ-2, TRANSMEMBRAN SERİN PROTEAZ-4 VE MAGE AİLESİ A3 ÜYESİ GENLERİNİN TRANSKRİPSİYON AŞAMASINDAKİ GEN ANLATIMLARININ KARŞILAŞTIRMALI OLARAK İNCELENMESİ

Ceren AYNACI
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Yüksek Lisans Programı
Danışman: Dr. Öğretim Üyesi Filiz SAĞLAM

2020

Bu çalışmadaki amaç; PC3 Prostat kanseri hücre dizisinde Prostaglandin Endoperoksit Sentaz-2 (PTGS2), Transmembran Serin Proteaz-4 (TMPRSS4) ve MAGE Ailesi A3 Üyesi (MAGE-A3) genlerinin transkripsiyon düzeyindeki gen anlatımlarının karşılaştırmalı olarak incelenmesidir. Odaklanılan nokta, sağlıklı duruma göre kanserdeki değişimi aydınlatmaktır.

Çalışmada biyogüvenlik kabininde geleneksel hücre kültürü teknikleri, yarı manuel kit ile RNA izolasyonu, termal döngü cihazında sırasıyla cDNA sentezi ve eş zamanlı kantitatif PCR yöntemleri uygulanmıştır. Kültürlenen kanserli hücre hatları hasat edilerek total RNA'ları ayrıştırılıp enzimatik olarak tamamlayıcı DNA'lara dönüştürülmüştür. PTGS2, TMPRSS4 ve MAGE-A3 genlerine özel olarak tasarlanmış olan primerler yardımıyla eş zamanlı PCR uygulanmıştır.

Çalışmanın sonuçlarında 3 kez tekrarlı eş zamanlı PCR sonuçlarının delta delta Ct hesaplaması ile PC3 Prostat kanseri hücre hattına kıyasla PTGS2 geninin anlatımında 50 kat azalış; TMPRSS4 geninin anlatımında 0,47 kat; MAGE-A3 geninin ifadesinde ise 0,16 kat artış saptanmıştır. Bu üç genin kanserde hücre bölünmesi, apoptoz direnci, invazyon, anjiyogenez gibi olaylarda rol alabildiği bilinmektedir. Bu çalışma sonucunda, bu üç genin sinyal yolağında ortak bir etkisi olduğu ve bu üç gen için protein düzeyinde araştırma yapmanın faydalı olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Prostat kanseri, eş-zamanlı PCR, gen anlatımı, PTGS2, TMPRSS4, MAGE-A3

ABSTRACT

COMPERATİVE ANALYSİS OF THE EXPRESSİON ON TRANSCRİPTİON STAGE OF THE PROSTAGLANDİN ENDOPEROXİDE SYNTHASE-2, TMPRRS4 AND MAGE FAMİLY MEMBER-A3 İN PORSTAT CANSER CELL LİNE

Ceren AYNACI
Medical Biology and Genetics Master Program
Advisor: Asst. Prof. Filiz SAĞLAM

2020

The aim of this study was to investigate the expression levels of PTGS2, TMPRSS4 and MAGE-A3 genes in the Prostat cancer cell line which is modeling healthy bronchial epithelium. The focal point is cancerous alteration compared to healthy.

In this study, conventional cell culture techniques in biosafety cabinet, total RNA isolation with semi-manual kit, both cDNA synthesis and real-time quantitative PCR in thermal cycler were applied. Cultured cancerous cell lines were harvested and their RNAs were separated. Total RNAs were enzymatically converted into cDNAs. The real-time PCR was performed with the specific primers have designed for PTGS2, TMPRSS4 and MAGE-A3 genes.

In the results of the study, the delta delta Ct calculation in AProstat cancer cell line, 50 fold increase in PTGS2 gene; 0,47 fold increase in TMPRSS4 gene; 0,16 fold increase in MAGE-A3 gene was observed. These three genes are known to play role in cancer cell division, apoptosis resistance, invasion and angiogenesis. As a result of this study, these three genes are thought to have jointly effect on the signaling pathway. It may be beneficial to investigate on protein level for these three genes to illuminate at this point.

Keywords: Prostat cancer, Real-time PCR, expression, PTGS2, TMPRSS4, MAGE-A3

TEŞEKKÜR

Tez konusunun belirlenmesi, deney aşamaları ve yazım sürecinde bilgi, tecrübe ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Dr. Öğretim Üyesi Süreyya BOZKURT'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarımız boyunca bilgi, öneri ve deney malzemelerindeki yardımları ile bize destek olan Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Başkanı değerli hocamız Prof. Dr. Veysel Sabri HANÇER'e teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarımız boyunca bilgi, öneri ve deney malzemelerindeki yardımları ile bize destek olan değerli hocamız Dr. Öğretim Üyesi Murat BÜYÜKDOĞAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarımız boyunca bilgi, öneri ve deney malzemelerindeki yardımları ile bize destek olan değerli hocamız Dr. Öğretim Üyesi Filiz SAĞLAM'a teşekkürlerimi sunarım.

Deneylerimiz boyunca her şekilde yardım ve desteklerini esirgemeyip bize yoldaşlık eden bölüm arkadaşımız Okan Remzi AKAR'a ve arkadaşımız Hüseyin AYHAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Bugünlere gelmeme vesile olan, beni dünyaya getirip yetiştiren, maddi manevi desteklerini ve sevgilerini göstermeyi hiçbir zaman esirgemeyip her zaman yanımda olduklarını hissettiren değerli ailem; babam Tokay AYNACI, annem Hatice AYNACI'ya ve kardeşim Atakhan AYNACI'ya teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **i**
ABSTRACT ..... **ii**
TEŞEKKÜR ..... **iii**
İÇİNDEKİLER ..... **iv**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **vi**
TABLO LİSTESİ ..... **vii**
KISALTMA LİSTESİ ..... **viii**
GİRİŞ **1**
1. GENEL BİLGİLER **1**
1.1. KANSER 1
1.2. PROSTAT KANSERİ 1
1.2.1. Prostat Kanserinin Belirtileri 2
1.2.2. Prostat Kanserinin Nedenleri ve Risk Faktörleri 3
1.2.3. Anatomi ve Patoloji 5
1.2.4. Prostat Kanseri Genetiği 6
1.2.5. Prostat Kanseri Moleküler Mekanizması 9
1.2. HEDEF GENLER **14**
1.2.1. *PTGS2* (Prostaglandin Endoperoksite Sentetaz-2) 14
1.2.2. *TMPRSS4* (Transmembrane Serine Protease 4) 14
1.2.3. *MAGEA3* (Melanoma-Associated Antigen 3) 15
2. MATERYAL VE METOT **17**
2.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ DENEYLERİ 17
2.1.1. Besiyeri 17
2.1.2. Hücre Soylarının Stoktan Çıkarılması 17
2.1.3. Besiyeri Değiştirme 18
2.1.4. Hücre Soylarının Pasajlanması 18

2.1.5. Hücre Soylarının Stoklanması 18
2.1.6. Hemositometre ile Hücrelerin Sayımı 19
2.2. MOLEKÜLER TEKNİKLER 20
2.2.1. RNA İzolasyonu 20
2.2.2. cDNA Sentezi 22
2.2.3. Primer Dizaynı 23
2.2.4. Eş Zamanlı PCR 24
2.3. Delta delta CT Değerleri Hesaplama 25
3. BULGULAR 27
4. TARTIŞMA VE SONUÇ 31
KAYNAKLAR 40

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 3.1: Hemositometre ile Hücrelerin Sayımı 19

Şekil 3.2: Hemositometre ile Hücrelerin Sayım Yönü 20

Şekil 3.3: PC3 Prostat kanseri hücrelerinin mikroskop altındaki görüntüsü 20

Şekil 4.1: PTGS2 3 kez çalışılıp elde edilen değerin aritmetik ortalaması CT değeri: 30,64 Tm grafiği 28

Şekil 4.2: TMPRSS4 3 kez çalışılıp elde edilen değerin aritmetik ortalaması CT değeri: 27,6 Tm grafiği 29

Şekil 4.3: MAGEA3 3 kez çalışılıp elde edilen değerin aritmetik ortalaması CT değeri:21,63 Tm grafiği 30

TABLO LİSTESİ

Tablo 3.1: RNA izolasyonu için gerekli salf malzeme 21
Tablo 3.2: 20 µL β-ME per 1 mL TRK Lysis Buffer eklenildi 21
Tablo 3.3: PC3 prostat kanseri rna od değeri ve konsantrasyonu.....22
Tablo 3.4: İpsogen RT kit içeriği.....22
Tablo 3.5: Master Mix.....22
Tablo 3.6: Pcr Koşuları 23
Tablo 3.7: Sybr Green Kiti İçeriği 24
Tablo 3.8: Reaksiyon solüsyonlarının hazırlanması 24
Tablo 3.9: PCR döngü koşulları 25
Tablo 4.1: Ct değerleri ile ifade değişim oranını hesaplama sonuçları.....27
Tablo 4.2: PTGS2 genin Ct değerleri ile ifade değişim oranını hesaplama sonuçları 28
Tablo 4.3: TMPRSS4 genin Ct değerleri ile ifade değişim oranını hesaplama sonuçları 29
Tablo 4.4: MEGA-A3 genin Ct değerleri ile ifade değişim oranını hesaplama sonuçları 30

KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
AR	**:**Androjen Reseptör
ATCC	:American Type Tissue Culture Collection
BKİ	:Vücut kitle endeksi
CD47	:Cyclin D47 signal / Siklin D47 sinyali
cDNA	:Complementary DNA
cm	:Santimetre
CDKN1B	**:**Cyclin Deoendent Kinase İnhibitör
C-MYC	**:**proto onkogen
COX2	:Cyclooxygenase-2
Ct	:Cycle of Treshold
DMEM	:Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	:Dimetil sülfoksit
dNTP	:deoksi-Nucleoside triphosphate
DTT	:Dithiothreitol
EGF	:Epidermal büyüme faktörü
EGFR	:Epidermal büyüme faktörü reseptörü
eIF2α	:Eukaryotic Initiation Factor-2-alpha
ER	:Endoplazmik retikulum
ERBB2	:Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene Homolog 2
FBS	:Fetal Bovine Serum
g	:Gravite
GSTP1	**:**Glutathime S-Transferasa Pİ1
HER2	**:**Human epidermal growth factor reseptör 2
M	:Molar
MAGE-A3	:Melanom-associacted antigen-3
Mc	:Melting curve / Erime eğrisi

µl :Mikrolitre

mL :Mililitre

MLH1 **:**Mutl homolog1

mRNA, :Messenger RNA,

MSH2/MSH3/MSH6 **:**Muts homolog2/3/6

MYC :Myelocytomatosis viral oncogene family

NF-κB :Nuclear Factor kappa B

NKX3.1 :Homeobox Protein NK3.1

OD :Optic Density

P53 :Tümör baskılayıcı protein-53

PCR :Polymerase Chain Reaction

PGE2 :Prostaglandin E Synthase-2

PIN :Proliferatif İnflamatuar Atrofi

PMS1/PMS2 **:**homolog1, mismatch repeir sytstem component

PTGS2 :Prostaglandin endoperoxide synthase-2

PTEN :Protein tirozin fosfataz tensin

qPCR :Quantitative Polymerase Chain Reaction

RAS :Rat sarcomavirus oncogene family

RB :Retinablastoma

RP :Radikal prostatektomi

rpm :rounds per minute

RPMI-1640 :Roswell Park Memorial Institute-1640

RTE :Reverse Transciption Enzyme

RT-PCR :Real-Time Polymerase Chain Reaction

SCC45A3 **:**Solute carier family 45 member 3

siRNA **:**small interfering RNA

Tm :Melting temperature / Erime sıcaklığı

TMPRSS :Transmembran serin proteaz

TÜİK :Türkiye İstatistik Kurumu

ΔΔCt :Delta Delta Cycle of Treshold

GİRİŞ

Prostat kanseri oluşumunda karsinogenezi etkileyen genlerin anlatım düzeyi değişimleri, kanserin oluşum mekanizmasının anlaşılması açısından önemlidir. Bu çalışmada, ait oldukları hücresel sinyal veya metabolik yolaklar ile karsinogeneze etki ettikleri bilinen *TMPRSS4, PTGS2* ve *MAGE-A3* genlerinin anlatım düzeyleri transkripsiyonel düzeyde araştırılmıştır. Araştırmada PC3 hücre hattı hücreleri kullanılmıştır. Hücre hatlarından total RNA izolasyonu yapılmış ve komplementer DNA (cDNA) sentezlenmiştir. Sonrasında ilgili gen bölgelerine spesifik primerler ile kantitatif PCR (qPCR) ile genlerin anlatım düzeyleri belirlenmiştir.

1. GENEL BİLGİLER

1.1.KANSER

Kanser önemi giderek artan bir sağlık sorunudur. Ölüm nedeni olarak, kalp ve damar hastalıklarının hemen ardından gelmektedir. Batı toplumlarında her yıl 250-350 kişiden biri kansere yakalanmaktadır. 60 yaşın üzerindeki gurupta ise kanser sıklığı çok artmakta 300 kişide 4-5 civarına yükselmektedir. Ülkemizde kesin istatistikler bulunmamakla birlikte insidansın bunun yarısı kadar olduğu tahmin edilmektedir. Yurdumuzda en sık görülen kanserler erkeklerde akciğer, prostat, kalın barsak, rektum, mide ve pankreas; kadınlarda meme, akciğer, kalın barsak, rektum, serviks, over, mide ve pankreas kanserleri olarak sıralanabilir (Jemal ve ark., 2003).

1.2.PROSTAT KANSERİ

Prostat kanseri, prostat bezindeki hücrelerin kontrol dışı büyümesiyle ortaya çıkar. Kanserli hücreler öncelikle kontrolsüz büyüme göstererek prostat içine yayılır. Ardından prostatı çevreleyen kapsüle uzanır, kapsülü delerek prostat dışına doğru

yayılır. Prostat kanseri, iyi huylu prostat bezi büyümesinden farklı olarak prostatın merkezinden değil, kapsüle yakın, merkezden uzak bölgesinden kaynaklanır.

Bu nedenle prostat kanserinde idrar şikâyetleri daha geç dönemde hastayı rahatsız eder. Büyüme ve yayılma döneminde yakın organlara, lenf sistemine ve kan dolaşımı yoluyla vücudun diğer bölgelerine sıçrayabilir. Prostat kanseri yavaş seyirli ilerledikten sonra, agresif karakter göstererek kemik ve diğer organlara sıçrayabilir (Dearnaley, 1994).

1.2.1. Prostat Kanserinin Belirtileri

Prostat kanserinin belirtileri, hastalığın ilerlemesine bağlı olarak ortaya çıkabilir. Bu bakımdan sinsi karaktere sahip bir hastalıktır.

Özellikle erken dönemlerinde hiç belirti ve şikayet görülmeyebilir. Prostat kanseri belirtileri ortaya çıktığında, hasta bazı tedavi şanslarını kaybedebileceğinden, düzenli doktor kontrollerinin tedavi başarısında önemi büyüktür (Dearnaley, 1994).

Prostat kanseri belirtileri şöyle sıralanabilir;

- İdrar yapma güçlüğü
- İdrar akışında kuvvet azalması
- Menide ya da idrarda kan görülmesi
- Boşalma esnasında ağrı
- Kasık bölgesinde rahatsızlık hissi
- Kemik ağrıları
- Sertleşme bozukluğu

Prostat kanserini haber veren bu belirtiler bazen iyi huylu prostat büyümesinin bir göstergesi de olabilir. Prostat bezinin büyümesine bağlı olarak gelişen benign prostatik hiperplazisinde de benzer belirti ve şikayetler görülebilir. Eğer prostat kanseri vücudun başka bölgelerine ve organlarına yayıldıysa, o alanla ilgili belirtiler de verebilir.

1.2.2. Prostat Kanserinin Nedenleri ve Risk Faktörleri

1.2.2.1. Aile öyküsü ve genetik duyarlılık

Ailede prostat kanseri öyküsü varsa bir erkekte hastalık gelişme riski artar. Bir aile üyesinin etkilendiği risk seviyesi, meme ve prostat kanserlerinde benzerdir. Birinci derecede prostat kanserli akrabaya sahip erkeklerin, prostat kanseri geliştirme riski 2 ila 3 kat artmıştır. Prostat kanserli iki veya daha fazla birinci dereceden akraba olanların prostat kanseri geliştirme riski ise genel popülasyona kıyasla 5 ila 11 kat artmıştır (Yadav ve ark, 2018; Gandhi ve ark, 2018).

70'ten fazla risk alleli (tek nükleotid polimorfizmleri [SNP]) prostat kanseriyle ilişkilendirilmiştir. Bu tür birçok PSA veya ilgili kallikreinleri kodlayan genlerde bulunur. Bu SNP'ler yüksek risk, prostat kanseri teşhisi, hastalıktan kaynaklanan metastazlar veya ölüm riski değerlendirilmesinde kullanılabilir.

Erken başlangıçlı ve ailesel hastalığı olan hastalarda daha yaygın olan *HOX13B* gibi mutasyona uğramış genler tanımlanmıştır, ancak bu varyantlar nadirdir (popülasyonun %0.1'inde görülür) ve hastalığın ölümcül formu ile ilişkili değildir. Buna karşılık, *BRCA-2* mutasyonları taşıyan erkekler, daha agresif ve ölümcül olma olasılığı yüksek olan erken başlangıçlı prostat kanseri ciddi risk taşımaktadır (Yadav ve ark, 2018; Gandhi ve ark, 2018).

Prostat kanserlerinin %9'u kalıtsal olup, prostat kanseri olanların %15'inde hastalık birinci derece erkek akrabalarından geçmektedir. Kadınlarda meme ve yumurtalık kanserleriyle bağlantısı bilinen *BRCA-2* genindeki mutasyonun, erkeklerde prostat kanseri riskini de arttırdığı bildirilmektedir (Yadav ve ark, 2018; Gandhi ve ark, 2018).

1.2.2.2. Genetik olmayan (Çevresel) faktörler

Prostat kanserinde çevresel faktörler genetik faktörlere göre daha etkilidir. Örneğin, Çin'de yaşayan bir Çinlinin prostat kanserine yakalanma riski, bir Amerikalıya göre çok düşükken, aynı Çinli birey Amerika'da uzun süre yaşadığında bir Amerikalıya benzer prostat kanseri riski taşır (Yadav ve ark, 2018; Gandhi ve ark, 2018).

1.2.2.2.1. Yaşın etkisi

Prostat kanseri riski yaşla birlikte artar. 50 yaşın altındaki erkeklerde nadir görülen prostat kanserine, 55 yaşın üzerindeki erkeklerde daha sık rastlanır. Yaşamları boyunca her 6 erkekten 1'ine prostat kanseri tanısı konulabileceği bildirilmektedir (Yadav ve ark, 2018; Gandhi ve ark, 2018).

1.2.2.2.2. Irk Faktörü

Prostat kanserinde ırk faktörü de önemlidir. En çok siyahi erkeklerde görülen prostat kanseri, beyaz ırk erkeklerde az görülür. Asya/ Pasifik adalarında yaşayan erkeklerde ise nadir görülür (Yadav ve ark, 2018; Gandhi ve ark, 2018).

Afrikalı Amerikalı erkeklere daha genç yaşta teşhis edilir ve her evre kategorisinde daha yüksek tümör yükleri, iki kat yüksek metastatik hastalık sıklığı ve düşük sağkalım oranları vardır. Asya kökenli Amerikalılar için insidans ve mortalite oranları anlamlı derecede düşüktür.

Çevresel faktörler ayrıca ölüm riskini de etkiler. Amerika Birleşik Devletleri'ne göç eden Asyalılar, hastalıktan kaynaklanan ve ölüm oranlarını menşeli ülkelere göre daha yüksek oranda yaşıyor ve ölümleri her bir sonraki nesilde artmakta, ancak Afrika ya da Avrupa kökenli erkeklerin oranlarının altında kalmaktadır. " (Yadav ve ark, 2018; Gandhi ve ark, 2018).

1.2.2.2.3. Beslenme

Prostat kanseri üzerinde beslenmenin direkt etkisi kanıtlanamamıştır. Daha önce yapılan araştırmalar, selenyum ve E vitamininin prostat kanseri riskini azaltabileceğini göstermiş olsa da sonradan yapılan araştırmalardan edinilen daha net sonuçlar, her ikisinin de fayda sağlamadığını ortaya koymuştur. Yine de sağlıklı beslenme kanser riskini azalttığı için sağlıksız besinler tüketmek prostat kanseri riskini doğrudan yükseltebilir (Yadav ve ark, 2018; Gandhi ve ark, 2018).

1.2.2.3. Diğer risk faktörleri

Diyet, Takviyeler ve Yaşam Tarzı Faktörleri: Düşük riskli ülkelerden yüksek riskli ülkelere göç eden göçmenlerde görülen prostat kanserinden artan sıklık ve mortalite, genetik risk faktörlerine ek olarak çevresel için de önemli bir rolü desteklemektedir. Birçok epidiolojik çalışma, yüksek yağ tüketimi ile meme, kolon ve prostat kanseri insidansı ve mortalite arasındaki ilişkiyi desteklemektedir.

Obezite agresif prostat kanseri, tedaviden sonra olumsuz sonuçlar ve artmış mortalite ile ilişkilendirilmiştir. Vücut kitle indeksindeki (BKİ) her 5 kg / m^2'lik artışın prostat kanserinden ölüm riskini %15 ila %20 artırdığı bildirilmiştir. Prostat kanseri teşhisi konan erkekler arasında, hastalıktan ölüm riski yüksek BKİ (aşırı kilolu erkekler için 1,5 kat, obez erkekler için 2,7 kat) ile önemli derecede ilişkilidir.

Fiziksel aktivite, prostat kanserinden ölüm riskini azaltabilir. Veriler hastalığın gelişimi için tutarsızdır, ancak tanı konulduktan sonra ikna edicidir. Sigara kullanımı erkeklerde değerlendirildiğinde prostat kanseri ölümü riski ile ilişkili olabileceği belirtilmektedir. Bazı mikro besinlerin, minarellerin ve vitaminlerin prostat kanseri veya hastalıktan kaynaklanan ölümlerin gelişmesinde koruyucu bir etkisi olduğuna dair birçok göstergeye rağmen, kesin kanıt yoktur (Yadav ve ark, 2018; Gandhi ve ark, 2018).

1.2.3. Anatomi ve Patoloji

Prostat, prostat idrar yoluna boşaltan kanallardan sıvı salgılayan lobüler tubuloalveoler bezlerinden oluşan, 20 ila 25 g ağırlığındaki bir ekzokrin organdır.

Akışkan kanalları içerir, geçiş bölgesi üretrayı çevreler ve çevre bölgesi normal bezin büyük kısmını oluşturur. Arka periferik zon rektuma karşı uzanır ve DRE tarafından palpe edilebilen alandır.

Bu bölgesel sınırlar normal postpubescent bir erkeğin prostatında belirsizdir, ancak erkekler yaşlandıkça geçiş bölgesi malign olmayan büyümeden (BPH) genişler. Farklı bölgelerdeki malignite sıklığı mevcut glandüler dokuya orantısızdır. Çok az sayıda kanser merkezi bölgede ortaya çıkar ve sadece %15'i geçiş bölgesinde bulunur; çoğu periferik bölgede ortaya çıkar.

1.2.3.1. Yayılma ve paternleri

Lokalize prostat kanseri, hastaların %85'inde tipik olarak multifokaldir. Kanserlerin çoğu, periferik bölgede kapsülün yakınında ortaya çıkar; çevresindeki kapsül, klinik olarak tespit edilen kanserlerin %80'ine kadar erken ve sık istila edilir. Lokal uzatma, kapsül (radikal prostatektomi [RP] örneğinde gözlendiğinde ölçüye bağlı olarak, "odak" veya "yerleşik" ekstrakapsüler uzama ECE] olarak adlandırılır, ancak kapsülün içindeki kusurlardan uzayabilir. Nörovasküler yapılar ve ejakülatör kanallar bezine veya mesane boynunun bölgesine girer.

Yerel istila seminal vezikülleri veya mesaneyi içerecek şekilde ilerleyebilir veya levator kaslarını istila edebilir. Nadiren tümör, rektal duvara ulaşmak için Denonvilliers'ın fasyasından istila eder. Lenfatik yayılma, belirgin sentinel iniş bölgesi olmayan hipogastrik, obturator, dış iliak, presakral, ortak iliak veya retroperitoneal düğümleri içerebilir. Hematojen yayılma, en sık aksiyal iskeletin kemiklerini ve daha az yaygın olarak akciğer, karaciğer ve diğer yumuşak doku organlarını volvaya çevirir. Kemik için yapılan tercih, tümör hücreleri ve kemik iliği stroması arasındaki benzersiz çift yönlü etkileşimin bir sonucu olarak görünmektedir.

1.2.3.2. Premalign lezyonlar

Prostat kanseri ve ilerlemesi sırasında meydana gelen fenotipik değişiklikler bilinmektedir. En erken prekürsör lezyon, aslında dönüştürülen hücre tipinde olduğu gibi tartışma konusudur. Tanınan değişiklikler, sıklıkla proliferatif inflamatuar atrofi alanlarına bitişik bulunan ve *PIN* olarak adlandırılan bezlerdeki hücrelerin proliferasyonu ile başlar. *PIN*, yapısal olarak iyi huylu görünen asinin içinde sitolojik olarak atipik veya displastik epitel hücrelerinin varlığı ile tanımlanır ve düşük ve yüksek dereceli olarak alt bölümlere ayrılır.

Bazı invaziv karsinomların prekürsöründe sadece yüksek dereceli *PIN* önemlidir. Yüksek dereceli *PIN*, çoğu kanserin ortaya çıktığı periferik bölgede, tercihen kanserin gelişmesi nedeniyle, kanser gelişiminden 10 yıl veya dereceli *PIN*'e sahip prostatlarda, multifokal tümörlere sahip olma eğilimindedir. Prostatik bezleri çevreleyen bazal hücre katmanının kaybedilmesi ve nükleer pleomorfizma ve belirgin çekirdekler ile anaplastik hücresel morfolojinin gelişmesiyle birlikte, tümör bazal membranı istila eder, yayılır ve metastaz yapmaya başlar. Tüm lezyonlar, konağın kullanım ömrü boyunca prostat kanserine yol açmaz.

Adoparsinomun tanısal özelliklerinin bir kısmını fakat hepsini göstermeyen küçük atipik asinin odakları, sonraki prostat biyopsisinde invazif kanserin önemli bir belirleyicisi olan atipik küçük asiner proliferasyonu olarak adlandırılır. Atipik adenomatoz hiperplazi, malign prekürsör lezyon olarak kabul edildi.

1.2.4. Prostat Kanseri Genetiği

Prostat kanserinin başlaması ve ilerlemesine yol açan üç ana mutasyon tipi vardır: genetik yatkın genlerinde oluşan mutasyonlar, onkogenlerin aşırı ifadelenmesini sağlayan somatik mutasyonlar ve tümör baskılayıcı genlerin

fonksiyon kaybına neden olan somatik mutasyonlar (Gandhi ve ark, 2018; Sanhueza ve Kohli, 2018).

1.2.4.1. Kromozomal değişiklikler

Prostat kanserinde birçok kromozomal değişiklik vardır. Bu değişiklikler prostat kanseri boyunca gerçekleşir. Kanser gelişiminde delesyonlar ve duplikasyonlar birçok çalışma grubu arasında art arda bulunduğu yerlerde, delesyonlar genellikle genlerin bölgesel fonksiyon kaybına neden olur ve amplifikasyonlar genellikle genlerin bölgesel fonksiyon kazancıyla sonuçlanır. (Gandhi ve ark, 2018; Sanhueza ve Kohli, 2018).

Prostat kanseri ve genel olarak kanser tedavisini genel olarak çok zorlaştıran bu genetik heterojenitedir. Kromozomal segmentlerin delesyonu erken evre tümörlerde bulunur ve baskındır, ancak tümör geliştikçe amplifikasyonlar meydana gelir ve tümörün çoğalması ve büyümesi daha da şiddetlenir.

Prostat kanserinde anormalliklerin en sık görüldüğü kromozomlar 6, 7, 8, 10, 13, 16 ve 17'dir. Kromozom X ve Y de birçok değişiklik taşır. Kromozom 8, en tutarlı değişimin bulunduğu, 8p'de bir kayıp ve çoğu durumda 8q'de bir kazanç olduğu yerdir. 13q, bilinen iki tümör baskılayıcı genin (*RB* ve *BRCA-2*) bulunduğu, sürekli gözlenen delsyon işlemlerinin olduğu başka bir bölgesidir.

Prostat kanserinde en erken genetik değişikliklerden biri, prostat kanserlerinin %50'sinde ortaya çıkan ERG onkogeninin aşırı ifadesidir. Gen füzyonları da çok yaygındır. Gen füzyonları genellikle kromozomal yeniden düzenlemelerden kaynaklanır. Çoğu prostat kanseri, *TMPRSS2* veya *SLC45A3* ile 5 gen ETS füzyonuna sahiptir (Gandhi ve ark, 2018; Sanhueza ve Kohli, 2018).

1.2.4.2. Somatik genetik mutasyonlar

Tanı anında hastalarda birçok somatik mutasyon bulunur. Zamanla, prostat kanseri hücrelerinde çeşitli nokta mutasyonları, gen delesyonları ve duplikasyonları, amplifikasyonları gibi kromozomal düzenlenmeler ve DNA metilasyon değişiklikleri meydana gelir.

Bu değişiklikler, genellikle birkaç on yılda yavaşça birikir. Oldukça kabul görmüş bir prostat kanseri modeli, kalıtsal mutasyonların tümör oluşumunu başlatması ve somatik mutasyonların daha fazla yayılmasıdır. Somatik kromozomal

değişikliklerde, farklı hastalar için aynı kromozomal bölgelerde gözlenen farklı lezyon tipleri ile heterojenlik vardır. Örneğin *GSTP1*, *PTEN*, *CDKN1B* genlerinde çeşitli somatik mutasyonlar tespit edilmiştir (Gandhi ve ark, 2018; Sanhueza ve Kohli, 2018).

1.2.4.3. Tümör baskılayıcı genler

Çoğu kanserde olduğu gibi, prostat tümörlerinin başlangıcı, tümör baskılayıcı genlerde fonksiyon kaybı mutasyonuyla ilişkilidir. Tümör gelişimi boyunca, tümör baskılayıcı genler çeşitli somatik delesyonlarla fonksiyonsuz hale gelebildiği gibi, kalıtsal olarakta fonksiyonsuz hale gelebilirler. Tümör baskılayıcı genler, genin bulunduğu bir kromozomal segmentin delesyonu, genin doğrudan delesyonu, promoter hipermetilasyonu nedeniyle ifade kaybına uğrayabilir.

Son zamanlarda, Nickerson ve ark. *TET2*'nin, prostat kanserinde, çoklu mekanizmalarla değiştirilen bir tümör baskılayıcı olarak görev yaptığını gösterdi. Bundan başka *PTEN*, *GSTP1*, *CDKN1B* ve *NKX3.1* ve Retinoblastoma (RB) prostat gelişiminde fonksiyon kaybına uğrayan diğer tümör baskılayıcı genlerdir (Gandhi ve ark, 2018; Sanhueza ve Kohli, 2018).

1.2.4.4. Yanlış eşleşme onarım genleri

Agresif prostat kanserinde, çoğunlukla yanlış eşleşme onarımı (MMR) mekanizmalarında kusurlar meydana gelmektedir ve bunun sonucu olarak da nükleotit sekansı mutasyonları oluşmaktadır. *MLH1*, P*MS1*, P*MS*2, *MSH2*, *MSH3* ve *MSH6* genlerinin tümünün, prostatik tümör çoğalması ve çoğalmasında spesifik olarak rol oynadığı gösterilmiştir.

Toplu olarak, bu gen lokuslarında fonksiyon kaybı, prostat kanseri epitelinde zayıflatılmış DNA onarım aktivitesine katkıda bulunabilir. 2014 yılında, Prichard ve ark. *MSH2-MSH6* heterodimerinde meydana gelen biallelik bir fonksiyon kaybı mutasyonu varlığını, metastatik prostat kanserinde göstermişlerdir (Gandhi ve ark, 2018; Sanhueza ve Kohli, 2018).

1.2.4.5. Onkogenler

Proto-onkogenlerdeki mutasyonlar, yapıcı aktif onkogen formlarında değişikliklere yol açar. Onkojen mutasyonları, fonksiyon kazanımına neden olan kromozomal bölgelerin çoğalmasından kaynaklanır. Bu mutasyonlar genellikle geç

ortaya çıkar ve tümörü daha da ilerletmek için zamanla birikir. *c-MYC*, *MAPK* yolağında rol alan proteinler *HER2*, *EGFR*, *DAB2IP*, *RASSF1*, *CTNNB1* Prostat kanseri gelişiminde rol alan onkogenlerdir (Gandhi ve ark, 2018; Sanhueza ve Kohli, 2018).

1.2.4.6. Polimorfizmler

SNP dizi teknolojisindeki gelişmeler, prostat kanseri riski üzerinde ılımlı etkisi olan çoklu lokasyonlardaki ortak varyantları tanımlamak için nispeten yeni ve güçlü araçlar olarak ortaya çıkmıştır. 2008 yılında, Zheng ve ark. insan genomunda çeşitlilik gösteren birçok bölgenin prostat kanseri ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Bireysel varyasyon riski düşük olsa da, çoklu varyasyonların kümülatif etkisi, çok daha fazladır.

Bu varyasyonlar bir SNP'den kaynaklanmaktadır. Prostat kanseri ile ilişkili 30'dan fazla SNP vardır. İsveçli erkeklerden yapılan bir çalışmada, yüksek oranda prostat kanseri riski ile ilişkili olan beş kromozomal bölgede değişkenler bulunmuştur. Üç değişken 8q24'te, bir değişken 17q12'de, bir değişken 17q24'te tespit edilmiştir. Çalışma ayrıca, daha fazla biriken SNP'nin daha yüksek bir prostat kanseri ilişkisine yol açtığını göstermiştir (Gandhi ve ark, 2018; Sanhueza ve Kohli, 2018).

1.2.5. Prostat Kanseri Moleküler Mekanizması

1.2.5.1. Androjen reseptörü

Androjen reseptörü (AR), prostat bezinin normal fizyolojik işleyişi için merkezi bir moleküler sinyal yoludur ve prostat bezi lümeninin salgı epitel hücrelerinin sitoplazmasında bulunur. AR, X kromozomunda bulunan ve böylece erkeklerde tek bir alelden oluşan AR geni tarafından kodlanır. Kodlayan dizide üç alanlı sekiz ekzon bulunur: N ′ terminal transkripsiyon aktivasyon domeni, iki çinko parmağından oluşan DNA bağlama domeni ve C ′ ligand bağlama domeni. Erkek androjenlerini bağlayan ve transkripsiyon faktörü olarak görev yapan 919 amino asit uzunluğunda bir protein reseptörünü kodlar. Androjen sinyallemesi olmadığında, AR, sitoplazmada, AR'nin bozunmasından stabilizasyon ve koruma sağlayan ısı şok proteinleri (HSP-70 ve HSP-90) ile elde edilir. Testosteron lümen epiteli içine yayılır (Trapman, 2001).

Prostat bezindeki hücreler, hücre içi 5-a-redüktaz enzimi tarafından dihidrotestosterona (DHT) dönüştürülür. AR, DHT'yi testosterondan 10 kat daha fazla afinite ile bağlar. DHT'nin bağlanması üzerine, AR, HSP'lerden salınır ve kinazların alımı yoluyla dimerizasyon ve çapraz fosforilasyona uğrar. Fosforilasyon, AR-androjen kompleksinin nükleer translokasyona ve transkripsiyonel aktivasyona girmesine izin verir, androjen yanıt elemanları (ARE) içeren birkaç hedef gene bağlanır. Bu gen hedefleri hücre çoğalmasında, farklılaşmasında ve hayatta kalmasında rol oynar.

Normal prostat epitelinde, oranın arasında bir denge vardır. Prostat adenokarsinomunda, bu denge apoptozun baskılanması ve proliferasyonun kontrol edilmemesi ile kaybedilir. Hücre proliferasyonuna, büyümesine ve apoptozis duktal epitel kaybına neden olan ve prostatik adenokarsinom tümörijenezi ile sonuçlanan AR'nin yapıcı aktivitesidir. AR proteinlerinin gerçek uzunluğu, poliglutamin, poli-glisin ve poli-prolin tekrarları nedeniyle değişkendir. Poli-glutamin (CAG) tekrarı, reseptör aktivitesini etkiler. Uzunluk 9 ila 36 arasında değişmekte olup, ortalama 18 ila 22 arasında değişmektedir. Bazı insan epidemiyolojik araştırmaları, kısa poli-glutamin tekrarları ve prostat kanseri arasında pozitif bir ilişki bulmuştur. Yüksek prevalanslı Afrika kökenli Amerikalı popülasyonunda, AR proteinlerinin kısa poliglutamin tekrarlarına sahip olduğu bulunmuştur. Düşük prevalanslı popülasyonunda, AR proteinlerinin daha uzun poli-glutamin tekrarlarına sahip olduğu bulunmuştur. Bu kalıtsal genetik polimorfizm, yüksek kalıtsal prostat kanseri oranı için bir risk faktörüdür. Ayrıca, AR'de tümörijenezin ilerlemesini artıran, tümörün agresifliğini artıran ve androjen ligandlarından tamamen bağımsızlık kazanan birçok somatik değişiklik vardır (Trapman, 2001).

Esas olarak testiste üretilen erkek seks hormonları veya androjenler, testosteron ve metabolit 5alfa-dihidrotestosteron, prostat gelişiminde ve yetişkin prostatın yapısının ve işlevinin korunmasında önemli bir rol oynamaktadır. Androjenlerin biyolojik işlevine androjen reseptörü tarafından aracılık edilir.

Başlangıçta, çoğu prostat tümörünün büyümesi androjene bağımlıdır. Sonuç olarak, endokrin manipülasyon birçok farklı rejimleri, kimyasal veya cerrahi kastrasyon ile, veya (androjen, anti-androjen karşıtları tarafından androjen reseptör fonksiyon abluka de testosteron tükenmesi amaçlayan gelişmiş hastalık için tedavi olarak uygulanmıştır. Endokrin tedavi palyatif tedavi olarak önemli olsa da sonuçta

tüm endokrin manipüle tümörler tedaviye dirençli bir aşamaya geçerler. Mevcut endokrin tedavilerin başarısızlığını açıklamak ve iyileştirilmiş terapötik rejimler tasarlayabilmek için androjene bağımlı tümörlerde androjen reseptör fonksiyonunun moleküler mekanizmaları ve endokrin tedaviye dirençli prostat kanserinin moleküler mekanizmaları anlaşılmalıdır.

Androjen reseptörü, nüklear reseptör transkripsiyon faktörlerinin büyük bir ailesinin bir üyesidir. Protein, birkaç moleküler fonksiyon, DNA bağlayıcı etki alanı, bir veya iki transaktivasyon etki alanı ile modüler bir yapıya sahiptir. Önemli olarak, androgen reseptör geni X kromozomunda bulunur. Sonuç olarak, erkeklerde androjen reseptör genindeki değişiklikler hücredeki işlevini önemli ölçüde etkileyebilir. Androjenlerin yokluğunda, androjen reseptörü esas olarak sitoplazmada bulunur, ancak androjen uyarımı üzerine protein hızla çekirdeğe göç eder.

Androjen reseptör homodimerleri, hedef genlerin düzenleyici bölgelerindeki koognat DNA bağlanma alanlarına bağlanır ve koaktivatörler ile etkileşim halinde, genel transkripsiyon faktörleri ve RNA polimeraz II kararlı bir transkripsiyon başlatma kompleksi oluşur. Bu, hedef genlerin sıkı bir şekilde düzenlenmiş ifadesini sağlar. İyi bilinen serum markörü PSA, sıkıca androjen düzenlenmiş bir genin prototipi olarak düşünülebilir. Anti-androjenler veya antagonistler, androjen reseptörünün ligand bağlama alanına bağlanmak için agonistik androjenlerle rekabet eder. Antagonistlerin, proteinin transaktivasyon fonksiyonunu inhibe eden ligand bağlayıcı etki alanında anormal bir konformasyonel değişime neden olduğuna dair kanıtlar vardır (Trapman, 2001).

Androjen reseptör fonksiyonunda önemli bir soru, spesifik hedef genlerinin karakterizasyonu ile ilgilidir. Prostatta androjen receptörün çoklu fonksiyonları ve karmaşık ifade deseni nedeniyle, bu soruya basit bir cevap verilemez. Hücre döngüsü stimülasyonunda (hücre proliferasyonu) doğrudan androjen düzenlenmiş genler, apoptozun bastırılması (hücre sağkalımı) ve prostat fonksiyonu (farklılaşma) önerilmiştir.

Hücre döngüsü regülasyonunda yer alan aday androjen hedef genleri siklin bağımlı kinazlardır (*CDK2*, *CDK*4, *p16NK4a*, *P27KIPI* ve *P21 Cıpl*). *Bcl-2*, apoptozda yer alan en önemli aday androjen genidir. Bununla birlikte, incelenecek genlerin paneli tam olmaktan uzaktır ve daha fazla değerlendirmeye ihtiyaç duyar.

Benzer şekilde, androjenlerin, hücre proliferasyonunu dolaylı olarak etkileyebilecek büyüme faktörleri, sitokinler ve reseptörlerinin ekspresyonu üzerindeki etkisi daha ayrıntılı olarak incelenmelidir. Transkripsiyonel profilleme için yüksek verimli teknoloji, diğer önemli androjen hedef genler hakkındaki bilgimizi hızla artırmaktadır.

Endokrin tedaviye dirençli prostat tümörlerinin büyümesi esasen iki moleküler mekanizma ile açıklanabilir. Bir prostat tümörünün androjen uyarılmış büyümesinin, androjen reseptöründen bağımsız bir sinyal transdüksiyon yolu ile düzenlenen bir mekanizma ile atlanması mümkündür. Bu tümörlerde androjen reseptör ekspresyonu azaltılabilir veya androjen reseptörü inaktive edilebilir. Endokrin tedaviye dirençli tümörler, androjenden bağımsız olan bir tümör hücresi alt popülasyonunun büyümesinden de kaynaklanabilir.

İkincisi, androjen reseptörüne bağlı büyümenin uyarlanmasıyla endokrin tedaviye dirençli prostat tümörleri ortaya çıkabilir. Lokal ilerleyici ve metastatik endokrin tedaviye dirençli tümörlerin büyük çoğunluğu androjen reseptör ifadesini gösterdiğinden, bu son olasılık artık yaygın olarak kabul edilmektedir. Prostat tümörlerinde ağırlıklı olarak nüklear lokalizasyonu, androjen reseptörünün işlevsel olarak aktif bir konformasyonundan yana olduğunu savunulur. Endokrin terapi direncinin androjen reseptörüne bağımlı mekanizmaları, androjen reseptör aşırı ekspresyonu, androjen reseptör mutasyonu, androjen reseptörünün liganddan bağımsız aktivasyonu ve spesifik koaktivatörlerin ekspresyonunun veya özelliklerinin modifikasyonunu içerebilir.

Androjen reseptör aşırı ekspresyonu, androjen reseptör geninin amplifikasyonunun bir sonucu olabilir. Gerçektende, in situ hibridizasyon deneyleri, tekrarlayan tümörlerin yaklaşık yüzde 30'unda androjen reseptör gen amplifikasyonunu göstermiştir. Daha da önemlisi, androjen reseptör gen amplifikasyonu, endokrin tedaviden önce tümörlerde değil, ağırlıklı olarak endokrin tedavi sırasında nispeten geç nükseden tümörlerde tespit edilmiştir.

Endokrin tedaviye dirençli prostat kanserinde fonksiyonel olarak aktif bir androjen reseptörünü açıklayabilecek ikinci bir mekanizma, androjen reseptör fonksiyonlarının mutasyonla modifikasyonudur. Bazı çalışmalar, androjen reseptörünün amino-terminal alanındaki bir glutamin uzunluğunun, prostat kanseri

riski ile ters yönde ilişkili olduğunu göstermektedir. Androjen reseptör genindeki nokta mutasyonları primer tümörlerde ve metastatik tümörlerde değişen sıklıkta tanımlanmıştır. Bu mutasyonların çoğunun androjen reseptör fonksiyonu üzerindeki etkisi ayrıntılı olarak araştırılmamıştır.

Çoğu bilgi, ligand bağlayıcı etki alanındaki amino asit ikamelerinde mevcuttur. Klasik örnek olarak, *LNCaP* prostat kanseri hücre hattındaki androjen reseptör geni, ligand bağlayıcı etki alanındaki pozisyonunda bir treonine sahiptir. Bu modifikasyon, reseptörün ligand özgüllüğü ve transaktivasyon fonksiyonu üzerinde dramatik bir etkiye sahiptir. Mutasyona uğramış androjen reseptör sadece testosteron ve Sa-dihidrotestosterona değil, aynı zamanda çoğu anti-androgenlere ve östradiol ve progesteron gibi doğal düşük afinite ligandlarına da yanıt verir. Aynı mutasyon, prostat kanseri tümörlerinde de saptanmıştır.

Sonuç olarak, androjen reseptör mutasyonları, antiandrojen tedavisi altındaki hastalardan endokrin terapiye dirençli tümörlerde tespit edildi. Son zamanlarda, pozisyonundaki histidin bir lösin, androjen reseptörünü kortizole duyarlı hale getirdiği bulunmuştur.

Ligand bağlama alanının üç boyutlu yapısı aydınlatıldığından, androjen reseptor mutasyonlarının ligand özgüllüğü üzerindeki etkisinin güvenilir bir açıklaması verilebilir. Şimdiye kadar, sadece sınırlı sayıda endokrin tedaviye dirençli hasta incelenmiştir. Bu nedenle, androjen reseptör mutasyonlarının sıklığı belirlenmeye devam etmektedir. Bugüne kadar yayınlanan veriler metastatik hastalıkta mutasyon sıklığının yüzde 15 veya daha az olduğunu göstermektedir. Geç evre prostat kanserinde büyük olasılıkla androjen reseptör mutasyonları, genetik istikrarsızlığın sonucu olabilecek fonksiyonel mutasyonlar ve rastgele mutasyonların bir karışımını temsil eder. Prostat tümör hücreleri tarafından endokrin terapiden kaçmanın üçüncü bir mekanizması, androjen reseptörün hormondan bağımsız aktivasyonu ile olabilir. Model sistemlerde, androjen reseptörünün çeşitli kinazlar ve büyüme faktörleri ve sitokinler tarafından aktive edilebileceği gösterilmiştir. Bununla birlikte, androjen reseptörün hormondan bağımsız aktivasyonunun hastada prostat tümörü büyümesi için önemli olup olmadığı hala bilinmemektedir (Trapman, 2001).

1.2. HEDEF GENLER

1.2.1.*PTGS2* (Prostaglandin Endoperoksite Sentetaz-2)

Bu gen, nöronal poliglutamilaz kompleksinin bir bileşeni olan bir proteini kodlar, bu da C-terminal tübülün kuyruklarına glutamat reidülerine translasyon sonrası eklenmesinde rol oynar. Alternatif olarak, bu gen için çoklu izoformları kodlayan eklenmiş transkript varyantları gözlemlenmiştir.

1.2.2.*TMPRSS4* (Transmembrane Serine Protease 4)

Bu gen, serin proteaz ailesinin bir üyesini kodlar. Serin proteazların, genellikle insan hastalıkları ve rahatsızlıklarına yol açan çeşitli biyolojik işlemlerde yer aldığı bilinmektedir. Bu gen, pankreas karsinomunda aşırı eksprese edilen bir gen olarak tanımlanmıştır. Kodlanan protein, bir N-terminal ankraj sekansı ve serin proteaz alanını içeren bir glikozile edilmiş hücre dışı bölge ile zara bağlıdır. Bu gen için farklı izoformları kodlayan çoklu transkript varyantları bulunmuştur.

Son çalışmalar, hemaglutinin bölünmesinin aracılık ettiği influenza virüslerinin yayılmasıyla ilişkili *TMPRSS4* aktivitesi hakkında önemli veriler sağlamıştır. Çeşitli kanserlerin ilerlemesi ve metastatik potansiyeli, muhtemel bir teşhis markörü olması, artan *TMPRSS4* ifadesi ile uyumludur. Bununla birlikte, *TMPRSS4*'ten terapötik bir hedef olarak yararlanabilmek için, zebra balığı embriyolarında belirli bir morfolino yıkımıyla yapıldığı gibi fizyolojik düzeyi ile ilgili daha fazla veriye ihtiyaç vardır.

Proteoliz, peptid bağlarının spesifik hidrolizinin aracılık ettiği düzenleyici bir mekanizmadır. Bu post-translasyonel modifikasyondan ötürü, sayısız proteinin rolü, hücre büyümesi, apoptoz, protein salgılanması, fagositoz, sinyal iletimi ve hücre dışı matris oluşur. İnsanlarda, genlerin %2'den fazlası 700'den fazla proteaz ve proteaz inhibitörleri içeren karmaşık bir sistem kodlamaktadır.

Proteaz aktivitesinin düzenlenmesi, artrit, kanser ve nörojeneratif ve kardiyovasküler hastalıklar dahil olmak üzere farklı patolojilerle ilgilidir (Aberasturi ve Calvo, 2015).

Matriptaz, furin veya stromelisin gibi kanserde klinik potansiyeli olan diğer proteazlar arasında, *TMPRSS4* yeni bir potansiyel aday olarak ortaya çıkabilir. *TMPRSS4* şu anda embriyo gelişimi vekanser olmak üzere temel olarak iki fonksiyonda yer almaktadır. Zebra balığı embriyosunda, bu proteaz, organojenez için gereklidir, çünkü morfolinolar kullanılarak yapılan *TMPRSS4* azalması, rahatsız edici bir iskelet kası oluşumu, yavaşlayan bir kalp atışı ve dejenere olmuş bir vasküler sistem de dahil olmak üzere doku gelişimi ve hücre farklılaşmasında ciddi kusurlara neden olduğu görülmüştür. Bu sonuç, *TMPRSS4*'ün organ gelişiminde rol alan adhezyon moleküllerinin aktivitesini değiştirebileceğini göstermektedir. Nakavt ve transgenik farelerin üretilmesi, bu proteazın sağlıklı ve patolojik koşullarda, insan hastalıkları için daha kuvvetli bir şekilde dahil edilmesine çalışılmasını sağlayacaktır (Aberasturi ve Calvo, 2015).

1.2.3.*MAGEA3* (Melanoma-Associated Antigen 3)

Bu gen, *MAGEA* gen ailesinin bir üyesidir. Bu ailenin üyeleri, birbirlerine %50 ila %80 oranında özdeşlik gösteren proteinleri kodlar. *MAGEA* genlerinin promotörleri ve ilk ekzonları, bu gen ailesinin varlığının, aynı fonksiyonun, farklı transkripsiyonel kontroller altında eksprese edilmesini sağladığına işaret ederek, oldukça değişkenlik gösterir. *MAGEA* genleri, Xq28 kromozomal konumunda kümelenir. Diskeratoz konjenita gibi bazı kalıtsal hastalıklar ilişkilendirilmiştir.

Melanom Antijen Gen (*MAGE*) ailesi, kanserde ve hedeflerde biyobelirteçler olarak 40 insan proteininin bir alt kümesi, testis ekspresyonunu sınırlandırılmış ve immünojenik olabilecekleri kanserde anormal şekilde eksprese edilen kanser testis antijenleri (CTA) olarak sınıflandırılır. Toplu olarak, *MAGE*'lerin, diğerleri arasında, kolon, melanom, beyin, akciğer, prostat ve meme dahil olmak üzere birçok tümör tipinde geniş bir şekilde eksprese edildiği bulunmuştur (Weon ve Potts 2015).

Uzun yıllar boyunca, *MAGE* CTA'lara potansiyel kanser immünoterapisine odaklanılmıştır. Bununla birlikte, bu yaklaşım çok az başarılı olmuştur ve son zamanlardaki zorluklarla karşılaşmıştır. Bu proteinlerin ayrıntılı fonksiyonel çalışmaları ortaya çıkmaya başlamış ve kanserde ekspresyonunun, kanserdeki global

genomik dengesizlikten kaynaklanan spesifik olmayan, ilerleyici promoter demetilasyonu nedeniyle basit olmadığını göstermektedir.

MAGE genleri, daha kötü klinik prognoz, artmış tümör büyümesi, metastaz ve kök hücre benzeri popülasyonlarda zenginleşme dahil agresif kanserlerin işaretleriyle ilişkili alanlardır. Önemli olarak, fonksiyonel çalışmalar bazı *MAGE* CTA'ların örtüşmeyen onkojenik sürücü aktivitesine sahip olabileceğini göstermiştir. Bu nedenle *MAGE* CTA'ları, çok çeşitli kanserleri tedavi etmek için kansere özgü terapötikler geliştirmek için yeni bir yol sağlayabilir (Weon ve Potts 2015).

2. MATERYAL VE METOT

PC-3, (ATCC CRL-1435) barkot numaralı, 62 yaşındaki erkek bir beyaz ırktan alınan, IV. derece prostatik bir adenokarsinomun kemik metastazından başlatılmış bir hücre hattıdır.

Bu hücre hattında karyotip model sayıdaki 62 kromozomla triploide yakındır. Her hücrede yaygın olarak bulunan yaklaşık 20 marker kromozomu vardır: ve normal N2, N3, N4, N5, N12 ve N15 bulunamamıştır. Q-band analizi ile normal Y kromozomu tespit edilememiştir. Bu hücre çizgisi uygun bir transfeksiyon hostudur, sıvı azot buhar fazında saklanmıştır.

Bu çalışmada, metastatik alandan türetilmiş olan PC-3 insan prostat kemik dokusu dondurulmuş morfolojik epitel doku olarak kullanıldı.

2.1.HÜCRE KÜLTÜRÜ DENEYLERİ

PC-3(ATCC CRL-1435) barkotlu PC-3, 62 yaşındaki bir kafkaslı beyazdan alınan 4. Derece prostatik bir adenokarinomun kemik metastası, dondurulmuş morfolojik epitel, metastatik alandan türetilmiş prostat doku hücreleri kullanıldı.

2.1.1. Besiyeri

RPMI-1640 içerisinde %10 FBS (fetal bovine serum) ve %1 Penicilin/streptomisin olacak şekilde hazırlandı.

2.1.2. Hücre Soylarının Stoktan Çıkarılması

Hücreleri çoğaltmak amacıyla kriyovialler -80 ℃ den alınarak sıcak su banyosunda hızlı bir şekilde çözüldü. Hücre süspansiyonu; ilgili hücrenin büyütülmesinde kullanılan besiyeri içerisine alınarak falkon tüp, 21 ℃ 800rpm'de 5dk santrifüj edildi. Sonra süpernatant kısmı aspire edildi ve hücre peleti üzerine 1ml besiyeri ilave edilerek hücrelerin süspansiyon hale gelmesi sağlandı. Hücre

süspansiyonu, içerisinde 5ml besiyeri bulunan 25cm^2'lik flasklara alınarak 37 ℃'de, %5 CO_2 içeren ortamda inkübe edildi.

2.1.3. Besiyeri Değiştirme

Flask içerisindeki besiyeri uzaklaştırılarak (aspire edilerek) 1X PBS; 25 cm^2'lik flask içerisine 2 ml, 75 cm^2'lik flask içerisine 4 ml ilave edildi ve hücrelerin yüzeylerinin hafifçe yıkanması sağlandı. PBS ortamdan aspire edilerek uzaklaştırıldıktan sonra 25 cm^2'lik flask içerisine 5 ml, 75 cm^2'lik flask içerisine 10 ml taze besiyeri eklendi.

2.1.4. Hücre Soylarının Pasajlanması

Hücre soyları, flask yüzeyini %60-70 kapladıklarında (konfluent olduklarında) flask içerisindeki besiyeri aspire edildi. Hücrelerin serumdan arındırılması için 25 cm^2'lik flask içerisine 2 ml 1X PBS ilave edilir ve hücrelerin yüzeylerinin hafifçe yıkanması sağlandı. PBS ortamdan aspire edilerek uzaklaştırıldıktan sonra flask yüzeyine yapışan hücrelerin yüzeyden ayrılmaları için 0,5 ml %0,05 Tripsin-EDTA solüsyonu kullanıldı ve hücreler 37 ℃'de, %5 CO_2'li ortamda 5 dk inkübe edildi. Mikroskopla bakıldığında flask yüzeyinden ayrıldığı kabul edilen hücrelere, tripsinin inhibe edilmesi için on katı kadar besiyeri ilave edilir. Böylece tripsinin hücreleri yüzeyden ayırdıktan sonra hücre membranlarına zarar vermeye başlaması engellenmiş olundu. Flask içerisindeki hücre süspansiyonu, içerisinde besiyeri bulunan 15 ml'lik falkon tüp içerisine alınır. 21 ℃ 800 rpm'de 5dk santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant kısım aspire edildi ve elde edilen hücre peleti 1ml besiyerinde çözündükten sonra hücre süspansiyonu 75 cm^2'lik flasklara alınarak 37 ℃'de, %5 CO_2 içeren ortamda inkübasyona bırakıldı. Bu şekilde hücreler istenilen sayıya gelene kadar çoğalmaları sağlanmış olundu.

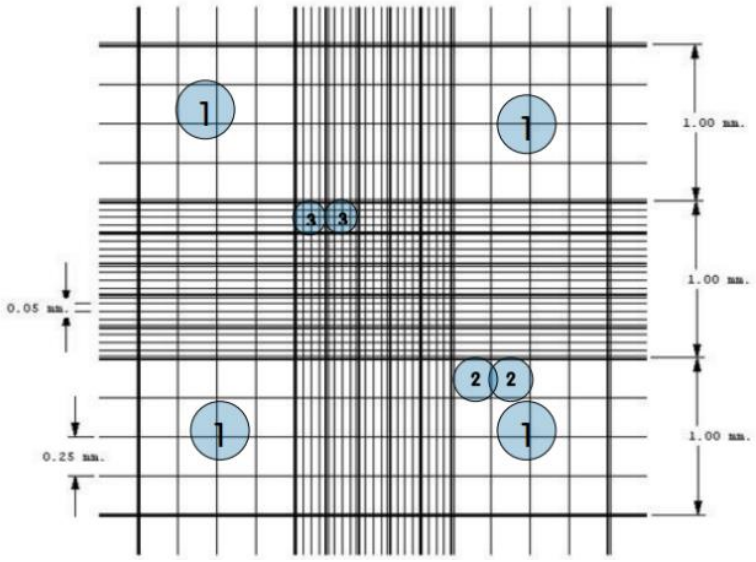
2.1.5. Hücre Soylarının Stoklanması

Hücreler konfluent olduklarında flask içerisindeki besiyeri aspire edilerek ortamdan uzaklaştırılır. Hücreler 1X PBS ile hafifçe yıkandıktan sonra PBS aspire edilerek uzaklaştırılır ve hücrelerin flask yüzeyinden kalkmalarını sağlamak için %0,05 Tripsin-EDTA solüsyonu eklenir. Hücreler 37ºC'de, %5 CO_2'li ortamda 5dk inkübasyona bırakılır. Mikroskopla bakıldığında flask yüzeyinden ayrıldığı kabul edilen hücrelere, tripsinin inhibe edilmesi için on katı kadar besiyeri ilave edildi. Flask içerisindeki hücre süspansiyonu içerisinde besiyeri bulunan 15ml'lik falkon tüp

içerisine alınarak 21 ℃ 800rpm'de 5dk santrifüj yapılır ve sonra süpernatant kısım aspire edildi. Pelet üzerine her bir kriyovial için 1.5ml dondurucu medium (5ml DMSO + 5ml FBS + 40ml DMEM) karanlık ortamda ilave edilerek hücre süspansiyonu kriyovialler içerisine dağıtılır ve hemen -80 ℃'ye kaldırıldı.

2.1.6. Hemositometre ile Hücrelerin Sayımı

Hücre sayımında; tripsinizasyon işlemi sonucunda elde edilen hücre süspansiyonundan 10µl alınır ve üzerine eşit miktarda %0,5 tripan konarak iyice karışmaları sağlandı. Bu karışımdan 10µl alınarak thoma lamına koyulur ve mikroskopta bu lam üzerinde beş alanda hücre sayımı yapılır. Bulunan sayı sulandırma katsayısı ile çarpılarak 1ml besiyerinde ne kadar hücre olduğu hesaplandı.



Şekil 2.1. Hemositometre ile Hücrelerin Sayımı

1 büyük karenin hacmi; 0,1 cm x 0,1 cm = 0,01 cm^2

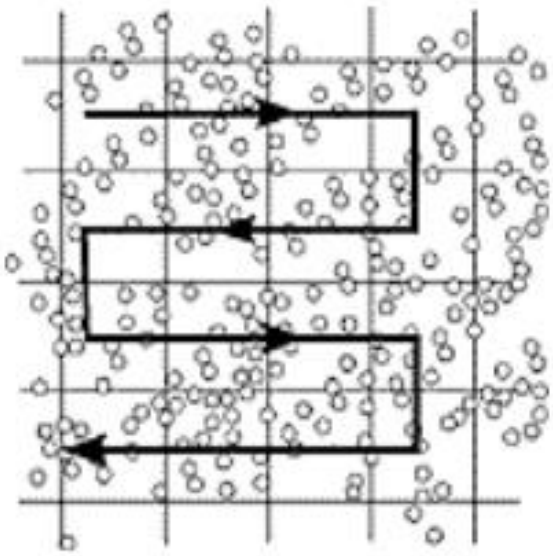
Bölmenin derinliği; 0,1mm= 0,01 cm

0,01 cm^2*0,01 cm = 0,0001 cm^3 = 0,0001ml = 0,1 µl

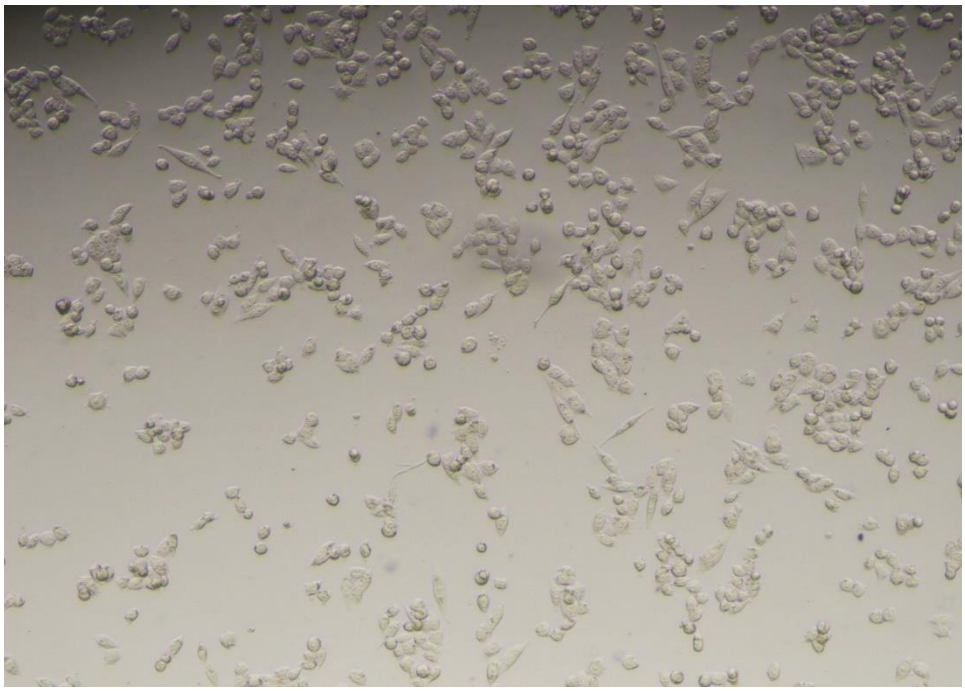
$$\text{Konsantrasyon (hücre/ml)} = \frac{\text{Hücre sayısı x } 10.000}{\text{Sayılan alan x Dilüsyon}}$$

Sulandırma katsayısı (dilüsyon); 1:10 dilüsyon için; 0,1

1:100 dilüsyon için; 0,01



Şekil 2.2. Hemositometre ile Hücrelerin Sayım Yönü



Şekil 2.3. PC3 Prostat kanseri hücrelerinin mikroskop altındaki görüntüsü

PC3 Prostat kanseri hücrelerini çoğaltıp kullanana kadar -80 derecede saklanıldı.

2.2.MOLEKÜLER TEKNİKLER

2.2.1. RNA İzolasyonu

Total RNA izolasyonu Omega Biotek RNA izolasyon kiti katalog numarası: R6834 kiti uyularak yapıldı.

Tablo 2.1. RNA izolasyonu için gerekli salf malzeme

Product	**R6834**
Pürifikasyon	5 adet
HiBind® RNA Mini Kolonlar	5 adet
2 mL Koleksiyon Tüpleri	10 adet
TRK Liziz Tapon	5 mL
RNA Yıkama Solüsyonu I	5 mL
RNA Yıkama Solüsyonu II	5 mL
Nüklear Maddelerden Arındırılmış Su	2 mL

RNA izolasyonuna ≤ 10^6 hücre ile başlanıldı. 10^6 - 10^7 mg …… 700 ul hücre kullanıldı.

Tablo 2.2. 20 µL β-ME per 1 mL TRK Lysis Buffer eklenildi

Amount of Tissue	Amount of TRK Lysis Buffer
≤ 15 mg	350 µL
20-30 mg	700 µL

PC3 Prostat doku kültüründen elde ettiğimiz hücreleri -80 ℃ den çıkarıldı ve sıcak su banyosunda eritildi. 12.000 g de 5 dk santrifüj edildi. Şeffaf süpernatant ependorfa aktarıldı. 1 hacim ethanol (%70'lik) vortekslendi. Kolonlu tüp hazırlanıldı 700 ul örnek kolona aktarıldı. 10.00 g de 1 dk santrifüj edildi. Tüpe inen sıvı döküldü. Tekrar 10.00 g de 1dk santrifüj edildi. Tüpe inen sıvı döküldü.

500 ul Wash Buffer 1 eklenip 10.00 g de 30 sn santrifüj edildi. Tüpe inen sıvı döküldü. 500 ul Wash Buffer 2 eklendi (%100'lük etanol ile dilüe edilen wash buffer 2). 10.000 g de 1 dk santrifüj edildi. Tüpe inen sıvı döküldü. Tekrar 10.00 g de 1 dk santrifüj edildi. Tüpe inen sıvı döküldü. Boş ependorf ile kolonu 2-3 dk maksimum g de santrifüj edildi. Kolon boş ependorfa alındı. 40-70 ul NFW eklenildi. Maksimum g de 2 dakika santrifüj edildi. Sonuç olarak RNA elde edildi.

Total RNA kullanılacağı zamana kadar -80 ℃ de saklanır.

2.2.1.1. RNA Miktar Ölçümü

RNA ölçümü spectrostar nano ölçüm cihazı ile yapıldı. LVİS plate ilk olarak blank olarak 2 ul nukleaz içermeyen su koyuldu sonra 2 ul PC-3 örneği konulup cihaza yerleştirildi.

Tablo 2.3. PC3 prostat kanseri RNA OD değeri ve konsantrasyonu

	Od değeri (260/280)	Konsantrasyonu (ng/ml)
Blank	-	-
PC3	1.8	63.43

2.2.2. cDNA Sentezi

Çalışmada araştırılan genlerin ifade düzeylerini belirlemek amacıya ters tanskripsiyon yöntemi ile RNA'lar komplementer DNA'ya (cDNA) çevrildi. Bu işlem için RNA dan cDNA sentezi İpsogen RT Kit 33 no: 679923 kiti kullanılarak yapıldı.

Tablo 2.4. İpsogen RT kit içeriği

COMP	NUMxCONT
RT Tampon	1 x 180 ul
Random primer	1 x 190 ul
DTT 0.1 M	1 x 45 ul
Ters traskriptaz	1 x 36 ul
dNTP 10Mm	1 x 72 ul
RNase inhibitör	1 x 18 ul

Tablo 2.5. Master Mix

5 x RT buffer	5M
dNTP	2M
Random primer	5,25M
RNase inhibitör	0,5M
Ters transkripta	1M
DTT	1,25M

İlk olarak 20 M RNA 0.2'lik tüplere alındı ,65 ℃ de 5 dk inkübe edildi. 1 dk buzda bekletilip şoklandı. Üstüne 30 M mix konulup pipetajlandı. PCR yerleştirildi.

Tablo 2.6. Pcr Koşuları

25.0 ℃	10 DK
50.0 ℃	60 DK
85.0 ℃	5 DK
4.0 ℃	∞

cDNA elde edildi, -20 ℃ de saklanıldı.

2.2.3. Primer Dizaynı

Primer, Oligonükleotid: DNA amplifikasyonunda kullanılan, DNA'ya tamamlayıcı olan kısa dizilerdir. Primerler, ilgili firmalardan ticari olarak sentezletilir ve satın alınır. Satın alınan primerler liyofilize halde tüplerde olduğu için primerler sulandırılarak kullanıldı. Her bir primer belli bir konsantrasyon için 250 ml dH2O tüplere konuldu ve uzunca vortekslendi. 100 pm oldu. Bize 10 pm lazım. 10 pm için her bir birimer için ayrı ayrı 20 ml stoktan ayrı tüplere alınır ve üstüne 180 ml dH2O eklenip hazırlandı.

Kullanılan primer dizileri:

TMPRSS4 For: 5' CCTGGCGAGTATCATCATTGTG 3'

TMPRSS4 Rev: 3' GATCGGTCCTTGGAGAGGCG 5'

PTGS2 For: 5' ATCATTCACCAGGCAAATTGC 3'

PTGS2 Rev: 3' GGCTTCAGCATAAAGCGTTTG 5'

MAGE-A3 For: 5' AAGCCGGCCCAGGCTCGGT 3'

MAGE-A3 Rev: 3' GCTGGGCAATGGAGACCCAC 5'

2.2.4. Eş Zamanlı PCR

SYBR Green qPCR master mix kiti (Hibrigen, İstanbul) kullanılarak qPCR yapıldı.

Hibrigen SYBR Green içeriği;

Tablo 2.7. Sybr Green Kiti İçeriği

100mM KCL
4Mm MgCL2
400 Um dNTP
0,1 U/uM Taq DNA Polimeraz
1x SYBR Green
Diğer optimize tampon çözeltileri

Tablo 2.8. Reaksiyon solüsyonlarının hazırlanması

Bileşen	Hacim	Son konsantrasyon
2x SYBR Green qPCR Mix	25Um	1x
Forward primer (10uM)	2uM	0,4uM
Rever primer (10uM)	2uM	0,4uM
Kalıp DNA	Değişken	10pg-1ug
Su (nükleaz içermeyen)	50 uM tamamlayacak kadar	-

PC3 Prostat kanseri hücresinde her bir gen için ayrı ayrı forward primerden 1,5 ml, reverse primerden 1,5 ml 2x sybr green mix den 10ml nüklaz free sudan 4ml, cDNA'dan 4 ml olacak şekilde bir buçukluk ependorflara mikropipet yardımıyla malzemeler konularak karıştırılıp cihaza yerleştirildi ve cihaz çalışıtırıldı.

Tablo 2.9. PCR döngü koşulları

İlk denatürasyon	94 ℃	4 dk
36 döngü	95 ℃ 58 ℃ 72 ℃	30 sn 30sn 30sn -florasan ölçümü bu adımda
Erime eğrisi analizi		

Pcr koşulları kullanılarak *TPGS2, TMPRSS4* VE *MAGEA3* genlerini hedefleri çoğaltılıp ifade düzeylerini incelenir.

2.3.Delta delta CT Değerleri Hesaplama

Floresan değerlerinin eşik değerini geçtiği noktaya eşik döngüsü (Ct, Cp) denir.

$2^{-(\Delta\Delta Ct)}$

$\Delta\Delta Ct:[(Ct_{tumor}-Ct_{housekeeping})-(Ct_{normal}-Ct_{housekeeping})]$

Ct değeri, sistemin floresan miktarındaki artışı farketmeye başladığı ve PCR ürününün log-lineer fazda eksponensiyal olarak artmaya başladığı zamandır.

Bir primer seti ya da prob seti için bütün PCR ürünlerinin aynı erime sıcaklığına sahip olması beklenir. Kontaminasyon, spesifik olmayan bir çoğalma ve primer dimer oluşumu gibi kalıntılar farklı erime sıcaklığına sahiptirler.

Eş zamanlı PCR ile ürünleri agaroz jelde koşturmadan, erime sıcaklığı grafiklerinden faydalanarak spesifik olmayan bağlanmaları ve primer dimerleri saptamak mümkündür.

İstenen her bir genin Ct değeri, house-keeping denen ifade seviyesi bir hücrede her zaman aynı olan genin Ct değerinden çıkartılır. Bu değere, “delta Ct” denmektedir. Sonrasında deney gurubunun delta Ct değerleri, kontrol gurubunun delta Ct değerlerinden sırasıyla çıkartılarak “delta delta Ct” değerleri bulunur. Bu değerler ise deney gurubunun kontrol gurubuna kıyasla, araştırılan genlerdeki house-keeping genine nazaran ifade seviyesindeki değişimi göstermektedir. Bu değerlerin

her bir replikasyon döngüsündeki artan veya azalan kat sayısını bulmak için ise 2 üzeri negatif kuvveti alınmaktadır.

Ct = ΔCt (Tümör örneği)- ΔCt (normal ortalama)

Hem tümör hem de normal örnekler için ortalama kat değişimini hesaplanır. Bu ikisi arasındaki oran, tümör ve normal numuneler arasındaki değişimdir.

ΔΔCT = ΔCT (bir hedef örnek) −ΔCT (bir referans örnek) = (CT D - CT B) - (CT C - CT A).

Bu yöntemin nihai sonucu, referans genine normalize edilmiş olan bir referans numuneye göre hedef numunedeki hedef gen ekspresyonunun kat değişimi olarak sunulur. Bağıl gen ekspresyonu genellikle referans numuneler için 1'e ayarlanır, çünkü ΔΔ CT 0'a eşittir.

Gen ifadelerinin analizi, üç bağımsız tekrarlı deneyin sonucunda elde edilen Ct değerlerinin ortalaması alınarak yapılmıştır. Bu çalışmada *GAPDH* geni referans gen olarak kulanılmıştır. Öncelikle araştırılmak istenen ilgili genin Ct değeri, referans genin Ct değerinden çıkartılarak normalize edilmiş ve delta Ct (ΔCt) değeri hesaplanmıştır. Sonrasında kontrol grubunun ΔCt değerleri, deney grubunun ΔCt değerlerinden çıkartılarak ΔΔCt değeri bulunmuştur. Gen ifadelerinin kat cinsinden artan ya da azalan değerleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ olarak hesaplanmıştır. Bu anlatım aşağıda formülize edilmiştir.

$\Delta Ct = Ct_{(kontrol)} - Ct_{(referans)}$

$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(hedef)} - \Delta Ct_{(kontrol)}$

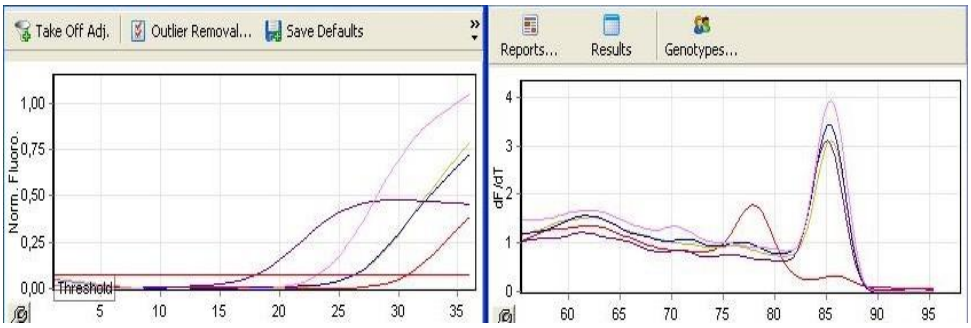
Kat değişimi = $2^{-\Delta\Delta Ct}$

3. BULGULAR

Tablo 3.1. Ct değerleri ile ifade değişim oranını hesaplama sonuçları

	Pc3				
	Ortalama Ct değeri	**Delta Ct ΔCt (Pc3)**	**Delta Ct ΔCt (Kontrol)**	**Delta Dleta Ct Hesaplanması ΔΔCt**	**Ekspresyon Değişimi**
GAPDH **(house-keeping gen)**	**29,31**				
PTGS2	**30,64**	**-2,01**	**3,17**	**5,18**	**50 ↓**
TMPRSS4	**27,6**	**1,03**	**-0,04**	**-1,07**	**0,47 ↑**
MAGE-A3	**21,63**	**7**	**4,39**	**-2,61**	**0,16 ↑**

PC3 Prostat hücre hattında *PTGS2*, *TMPRSS4* ve *MAGE-A3* geninin Ct değerleri 3 kez çalışılıp elde edilen değerin aritmetik ortalaması delta delta Ct yöntemi ile miktar analizi yapıldı. İstenen genin Ct değeri, house-keeping denen ifade seviyesi bir hücrede her zaman aynı olan genin Ct değerinden çıkartıldı. Bu değere, "delta Ct" denildi. Sonrasında deney gurubunun delta Ct değerleri, kontrol gurubunun delta Ct değerlerinden sırasıyla çıkartılarak "delta delta Ct" değerleri bulundu. Bu değerler ise deney gurubunun kontrol gurubuna kıyasla, araştırılan genlerdeki house-keeping genine nazaran ifade seviyesindeki değişimi göstermektedir. Bu değerlerin her bir replikasyon döngüsündeki artan veya azalan kat sayısını bulmak için ise 2 üzeri negatif kuvveti alındı.

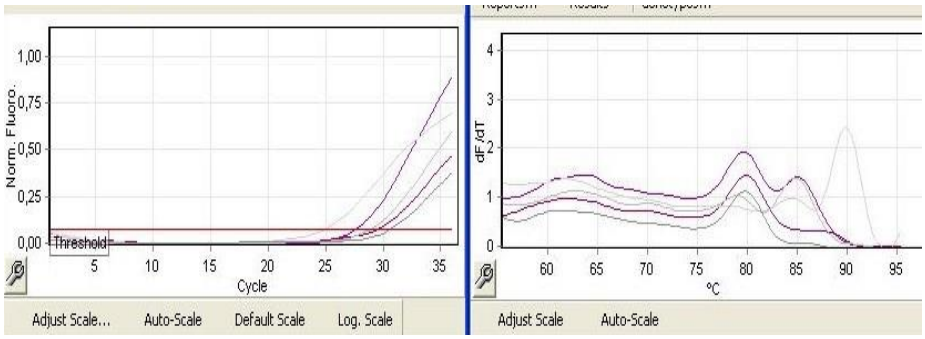


Şekil 3.1. *PTGS2* 3 kez çalışılıp elde edilen değerin aritmetik ortalaması CT değeri: 30,64 Tm grafiği

Tablo 3.2. *PTGS2* genin Ct değerleri ile ifade değişim oranını hesaplama sonuçları

	Pc3				
	Ortalama Ct değeri	**Delta Ct ΔCt (Pc3)**	**Delta Ct ΔCt (Kontrol)**	**Delta Dleta Ct Hesaplanması ΔΔCt**	**Ekspresyon Değişimi**
***GAPDH* (house-keeping gen)**	**29,31**				
PTGS2	**30,64**	**-2,01**	**3,17**	**5,18**	**50 ↓**

Tablo 4.2 ve şekil 4.1'e göre, housekeeping gen *GAPDH* olmak üzere, Pc3 prostat hücre hattında *PTGS2* geninin ifade seviyeleri verilmiştir. Yapılan gerçek zamanlı PCR analizi sonuçlarına göre genin ifade seviyesinde de azalış gözlemlenmiştir. Analiz, üç tekrarlı deney seti halinde gerçekleştirilmiş olup, esas alınacak değer için üçünün ortalaması alınmıştır. Çalışmanın sonuçlarına dair Ct (soldaki) ve Tm (sağdaki) grafikleri ve delta delta Ct (ΔΔCt) hesaplaması ile genlerin ifade azalış oranı Pc3 prostat hücre hattı için, *PTGS2* geninde 50 kat olarak saptanmıştır.

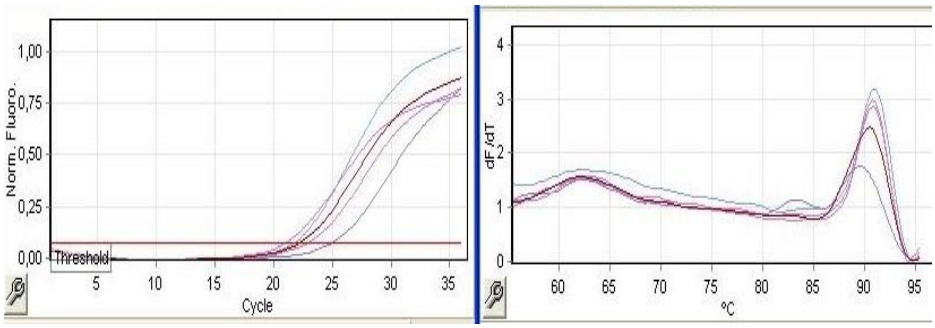


Şekil 3.2. *TMPRSS4* 3 kez çalışılıp elde edilen değerin aritmetik ortalaması CT değeri: 27,6 Tm grafiği

Tablo 3.3. *TMPRSS4* genin Ct değerleri ile ifade değişim oranını hesaplama sonuçları

	Pc3				
	Ortalama Ct değeri	**Delta Ct ΔCt (Pc3)**	**Delta Ct ΔCt (Kontrol)**	**Delta Dleta Ct Hesaplanması ΔΔCt**	**Ekspresyon Değişimi**
GAPDH **(house-keeping gen)**	**29,31**				
TMPRSS4	**27,6**	**1,03**	**-0.04**	**-1,07**	**0,47 ↑**

Tablo 4.3 ve şekil 4.2'ye göre, housekeeping gen *GAPDH* olmak üzere, Pc3 prostat hücre hattında *TMPRSS4* geninin ifade seviyeleri verilmiştir. Yapılan gerçek zamanlı PCR analizi sonuçlarına göre genin ifade seviyesinde de artış gözlemlenmiştir. Analiz, üç tekrarlı deney seti halinde gerçekleştirilmiş olup, esas alınacak değer için üçünün ortalaması alınmıştır. Çalışmanın sonuçlarına dair Ct (soldaki) ve Tm (sağdaki) grafikleri ve delta delta Ct (ΔΔCt) hesaplaması ile genlerin ifadeartış oranı Pc3 prostat hücre hattı için, *TMPRSS4* geninde 0,47 kat olarak saptanmıştır.



Şekil 3.3. *MAGEA3* 3 kez çalışılıp elde edilen değerin aritmetik ortalaması CT değeri:21,63 Tm grafiği

Tablo 3.4. *MEGA-A3* genin Ct değerleri ile ifade değişim oranını hesaplama sonuçları

	Pc3				
	Ortalama Ct değeri	**Delta Ct ΔCt (Pc3)**	**Delta Ct ΔCt (Kontrol)**	**Delta Dleta Ct Hesaplanması ΔΔCt**	**Ekspresyon Değişimi**
GAPDH **(house-keeping gen)**	**29,31**				
MAGE-A3	**21,63**	**7**	**4,39**	**-2,61**	**0,16 ↑**

Tablo 4.4. ve şekil 4.3'e göre, housekeeping gen *GAPDH* olmak üzere, Pc3 prostat hücre hattında *MEGA-A3* geninin ifade seviyeleri verilmiştir. Yapılan gerçek zamanlı PCR analizi sonuçlarına göre genin ifade seviyesinde de artış gözlemlenmiştir. Analiz, üç tekrarlı deney seti halinde gerçekleştirilmiş olup, esas alınacak değer için üçünün ortalaması alınmıştır. Çalışmanın sonuçlarına dair Ct (soldaki) ve Tm (sağdaki) grafikleri ve delta delta Ct (ΔΔCt) hesaplaması ile genlerin ifadeartış oranı Pc3 prostat hücre hattı için, *MEGA-A3* geninde 0,16 kat olarak saptanmıştır.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Prostat kanseri yaşlı erkeklerde en sık tanı alan ve erkeklerdeki kanser sebebiyle ölümlerin ikinci sık sebebidir. Özellikle son yıllarda prostat kanserinin insidansı ve mortalitesi artış göstermektedir (Siegel ve ark., 2013) Lokalize prostat kanseri için radikal prostatektomi ve radyasyon terapisi tek efektif tedavi seçeneği olmakta iken metastatik hastalıklarda efektif bir tedavi seçeneği yoktur. Prostat kanserinin büyümesi ve metastazı moleküler genetik mutasyonlarla ilişkili olduğu için özellikle metastatik hastalıkta rol oynayan kritik genlerin aydınlatılması tedavi modalitelerinin ve terapötik hedef moleküllerinin bu genler üzerinde geliştirilmesini sağlayabilir (Jianwei ve ark, 2018).

Transmembran proteaz serin 4 (*TMPRSS4*), bir tip 2 transmembran serin proteazdır ki küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, meme kanseri, servikal kanser, mide kanseri ve kolon kanseri gibi çeşitli kanserlerde ekspresyon artışı olduğu gösterilmiştir (Kim ve Lee, 2014; Chikaishi ve ark., 2014). Artmış TMPRSS4 ekspresyonu anjiojenez, invazyon ve metastaz dahil olmak üzere kanser progresyonunda önemli bir rol oyanamaktadır (Choi ve ark., 2008). Bu durum da malignensilerde terapötik ajan olarak kullanılabileceğini gösterir (Aberasturi ve Calvo, 2015). Aynı şekilde TMPRSS4 ekspresyonu kolorektal kanserlerde hastalık evresinin ilerlemesi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Huang ve ark., 2014). Hayvan modellerinde akciğer kanserinde anlamlı olarak artmış metastaz ile ilişkilendirilmiştir (Larzabal ve ark., 2011). In-vitro hücresel çalışmalarda da *TMPRSS4* seviyelerinin akciğer ve kolon kanser hücrelerinde düşürülmesi kanser hücrelerinin invazyon ve proliferasyonunu inhibe ederken, *TMPRSS4*'ün artmış ekspresyonu kolon kanser hücrelerinin invazivliğini, motilitesini ve adezivliğini sağladığı kanıtlanmıştır (Jung ve ark., 2008). Yapılan çalışmalarda, *TMPRSS4* ile aktive edilen kolon ve akciğer kanser hücrelerinin, kanser hücrelerinin epitelyalden mezenkimale geçişi ile sonuçlanan fokal adezyon kinaz, ekstraselüler sinyaller ile regule kinaz ve protein kinaz B gibi çeşitli sinyal yolaklarının aktivasyonunda rol

aldığı gösterilmiştir (Kim ve ark, 2010). Yakın tarihli bir çalışma, *TMPRSS4*'ü yüksek oranda eksprese eden tümörleri olan prostat kanseri hastaların, diğer hastalara göre önemli ölçüde daha az hastalıksız sağ kalım oranlarına sahip olduğunu göstermiştir (Taylor ve ark., 2010; Shi ve ark., 2014). Ancak *TMPRSS4*'ün biyolojik rolü henüz yeteri kadar ortaya çıkarılamamıştır.

Jianwei ve ark. (2018) yaptıkları bir çalışmada *TMPRSS4*'ün artmış ekspresyonu PC3 prostat kanseri hücrelerinin migrasyonunu sağladığı, aynı zamanda *TMPRSS4* yolağının inhibe edilmesiyle de bu göçün tersine döndüğünü göstermiştir. Aynı çalışmada TMPRSS4, TWIST ekspresyonunu arttırarak EMT progresyonu üzerinden N-kaderin ekspresyonunu arttırırken, *STAT3* fosforilasyonu yoluyla da E-Kaderinin ekspresyonunu azaltmaktadır. *TWIST1*'in inhibe edilmesi, *TMPRSS4* tarafından indüklenen PC3 migrasyonunu anlamlı olarak azaltmıştır. Ayrıca *STAT3*'ünde inhibe edilmesi *TMPRSS4*'ün neden olduğu *TWIST1* ekspresyonu ve aktivitesini etkili bir şekilde azaltmıştır. Tüm bu olaylar *TMPRSS4*'ün *STAT3* aktivasyonuna ve ardından *TWIST1* ekspresyonunu arttırarak prostat kanser hücrelerinin migrasyonunu sağladığını tespit etmişlerdir.

Shi ve ark. (2014) *TMPRSS4*'ün prostat kanserli hastalardaki klinik önemi üzerine yaptıkları çalışmada 73 prostat kanseri bulunan tümör dokuları incelemiş ve kanser dokusu içermeyen hücreler ile karşılaştırıldığında *TMPRSS4*'ün prostat kanserli dokulardaki seviyesinin anlamlı olarak daha yüksek olduğunu bulmuştur. TMPRSS4'ün artmış ekspresyonunun TNM evrelemesine göre ileri evre tümörlerle anlamlı olarak ilişkili olduğunu bulunmuştur.

Jung ve ark. (2008) ile Kim ve ark.'nın (2010) yaptıkları çalışmalarda *TMPRSS4*'ün tümör hücrelerinin invazyonunda, migrasyonunda ve metastazında rol oynadıklarını, Min ve ark. (2014) ise *TMPSS4*'ün transkripsiyon faktörünü aktive eden protein-1 (AP-1)'i aktive ederek kanser hücrelerinin invazyonunu sağladığını bulmuşlardır. Lee ve ark.'nın (2016) yaptıkları çalışmada ise prostat kanseri hücrelerinde *TMPRSS4* ile ilişkili hücresel fonksiyonları ve altta yatan mekanizmalar araştırılmıştır. Buldukları sonuçlar çerçevesinde *TMPRSS4*'ün epitelyalden mezankimale geçişi indükleyen transkripsiyon faktörü olan Slug ile c-Jun ve aktive edici transkripsiyon faktör-2 (ATF-2)'den oluşan AP-1aktvaasyonu yoluyla siklin D1'i indükleyerek PC3 prostat kanser hücrelerinin invazyon ve proliferasyonuna neden olduğunu göstermişlerdir. PC-3 hücrelerinde sadece c-Jun değil Slug proteinin

de *TMPRSS4* ilişkili proliferasyon ve invazyon için gerekli olduğu gösterilmiştir. Ayrıca Slug ekspresyonunun prostat kanser hücrelerinde c-Jun ve siklin D1 ekspresyonu ile pozitif korele olduklarını ancak diğer epitelyalden mezenkimale giçişi indükleyen transkripsiyon faktörleri ile korele olmadığını tespit etmişlerdir.

Bizim bulduğumuz sonuçlarda da *TMPRSS4*'ün prostat kanseri hücrelerindeki ekspresyonu üzerine yapılan çalışmalarda olduğu gibi PC3 prostat hücre hattında *TMPRSS4* geninin ekspresyonunun 0,47 kat artmış olduğu saptanmıştır.

MAGE-A, kanser testis antijeni gen ailesine dahil olan insanlarda normal germ hücrelerinde (testis dokusunda bulunan ve X kromozomu ilişkili olan) ve bir takım insan tümör hücrelerinde ifade edilen tümör ilişkili bir proteindir (Simpson ve ark., 2005). İlk MAGE-A proteini insan melanoma tümör antijeni olarak bulunmuştur ancak sonradan yaklaşık tüm kanserlerde ifadesi olduğu anlaşılmıştır (Bruggen, 1991). MAGE-A proteinin keşfinden itibaren *MAGE-A*'nın tümöre spesifik ifadesi tümör aşılarının geliştirilmesinde kullanılmıştır (Meek ve Marcar, 2012). Son zamanlarda yapılan çalışmalar *MAGE-A* ifadesinin tümör hücrelerinin onkogenezine ve kemoterapiye direncine aktif olarak katkıda bulunabileceğini göstermektedir (Ladelfa ve ark., 2012). Tutarlı olarak yapılan klink gözlemler göstermiştir ki MAGE-A gen ifadesi ile kötü prognoz arasında bir korelasyon vardır (Xu ve ark., 2015; Ayooub ve ark., 1997). Son yıllarda farklı *MAGE-A* proteinlerinin SKIP proteinleri (Laduron ve ark., 2004), p53 tümör baskılayıcı proteini (Monte ve ark., 2006), Mdm2 (Marcar ve ark., 2015), PML-IV (Peche ve ark., 2012), E2F1 (Su ve ark., 2013) ve AMPK (Pineda ve ark., 2015) gibi hedef proteinlerin kanser ilişkili yolaklarında anahtar düzenleyici rol oynadığı gösterilmiştir (Laiseca, 2017).

MAGE kanser testis antijenlerinin son yıllarda yapılan çalışmalarda tümörogenezde de rol aldığı gösterilmiştir (Weon ve Potts., 2015). Kanser hücrelerinin hayatta kalmaları için meme, akciğer, kolon (Pineda ve ark., 2015), mast hücreleri (Yang ve ark., 2007-a), multiple myeloma (Atanackovic ve ark., 2010) ve melanom kanseri (Yang ve ark., 2007-b) gibi bazı kanserlerde *MAGE-A*'lara ve *MAGE-C*'lere bağımlı oldukları bulunmuştur. Kanser hücrelerinde *MAGE-A3* ve *–C2* ekspresyonunun in-vitro çalışmalarda tümörün invazivliğini arttırdığı gösterilmiştir (Liu ve ark., 2008; Yang ve ark., 2014). Ayrıca *MAGE*'ler in vivo çalışmalarda tümör oluşumunu arttırmıştır. MAGE-A3'ün insan tirodi karsinomu hücrelerindeki

artmış ifadesinin artmış tümör büyümesi ve akciğerlere metastazla ilişkili olduğu (Liu ve ark., 2008) ve *MAGE-C*'nin in vivo inhibisyonunun metastatik melanom hücrelerinde tümör formasyonunu ertelediği bulunmuştur (Bhatia ve ark., 2013), *MAGE*'lerin nasıl fonksiyon gösterdiği üzerine yapılan çalışmalarda *MAGE-A3* ve -*A6*'nın diğer *MAGE*'lerin tersine p53 mutasyonu ile ilişkili olmadığı bu genlerin TRIM28 ile yaptıkları ligaz kompleksinin hücresel enerji sensöründe ve regülasyonunda rol oynayan tümör supressör AMPK'nın alfa katalitik alt birimini ubikutin reaksiyonuna sokarak AMPK proteinin yıkımını ve tümör hücrelerinde protein seviyelerinin gerilemesini sağlamaktadır (Pineda ve ark., 2015; Hardie ve ark., 2012; Hardie, 2015). Ayrıca AMPK'nın *MAGE-A3* ve *A6* yoluyla regülasyonunun azaltılması otofaji seviyelerinin anlamlı olarak azalmasıyla ve mTOR sinyal yolağının artmış regülasyonuyla sonuçlanmaktadır. Bu olaylar da tümör formasyonu ve gelişimi için optimal bir çevre sağlamaktadır (Choi ve ark., 2013; Wei ve ark., 2013; White, 2012).

Çeşitli kanserlerdeki MAGE ekspresyonu üzerine yapılan çalışmalarda prediktif değerinin düşük klinik sonuçlarla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Örneğin *MEGA-A3* ve –A9 ekpresyonu anlamlı olarak küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde azalmış sağ kalım ile ilişkilidir (Gure ve ark., 2005; Zhang ve ark., 2015). Meme kanserindeki *MAGE-A3*, -A6 ve –C2 ifadesinin anlamlı olarak östrojen ve progesteron negatif durumlar ile ilişkli olduğu, daha yüksek tümör derecesi ve daha kötü klinik sonuçlar ile korele olduğu gösterilmiş (Yang ve ark, 2014; Ayyoub ve ark, 2014). NY-ESO-1 ve *MAGE-A3* ifadesi akciğer kanserli 523 hastada kötü prognozla ilişkilendirilmiştir (Gure ve ark., 2005). Gastrointestinal kanserler üzerine yapılan bir başka çalışmada *MAGE-A1,-A3, A4* ve NY-ESO-1 antijen pozitif tümörlerin anlamlı olarak daha kısa sağ kalım ile ilişkili olduğu bulunmuş (Perez ve ark., 2011). Over kanserlerinde de *MAGE-A1, -A4, -A9* ve *-A10* ekspresyonunun kötü prognozla ilişkili olduğu gösterilmiştir (Daudi ve ark., 2014; Xu ve ark., 2015; Yakirevich ve ark., 2003). Benzer bulgular *MAGE-A4* ve *–A9* ekspresse eden mesane kanseri için de raporlanmıştır. MAGE'ler ayrıca tedavi sonrasında artmış rekürrens oranlarıyla ilişkilidir. Mide karsinomlarında *MAGE-A1-6* ekspresyonu kanser rezesiyonu sonrasında peritoneal kalıntılarla bu durum da hastalıksız sağ kalımda anlamlı olarak azalma ile ilişkilendirilmiştir (Jeon ve ark., 2014). Hepatoselüler karsinomlarda da *MAGE-A9* ifadesi anlamlı olarak azalmış hastalıksız sağ kalım ile

artmış tümör evresi, metastaz, portal ven invazyonu ve genel sağ kalım ile korele olduğu bulunmuştur (Gu ve ark., 2014). Suyama ve ark. (2010) tarafından prostat kanserinde kanser testis antijenleri üzerine yapılan çalışmada CT-X antijenlerinden olan *MAGE A/CSAG* alt ailesininin artmış regülasyonu primer prostat kanserinde görülmezken kastrat rezistans prostat kanserinde olduğu ve prostat kanserli hücrelerin evresi ve derecesi arttıkça bu antijenlerin ekspresyon düzeyinin arttığı tespit edilmiştir.

Das ve Senapati'nin (2019) *MAGE-A3*'ün pankreatik kanser hücrelerindeki fonksiyonel ve mekanistik rolünün araştırıldığı bir çalışmada, PCA hücrelerinde *MAGEA3* aşırı ifadesinin hücre proliferasyonu değiştirmediği ancak büyüme faktörü yoksunluğu sırasında ve ayrıca sitotoksik ilaçların varlığında hücrelerin hayatta kalmasını sağladığı gösterilmiştir. Bununla birlikte, *MAGEA3* pozitif hücrelerde *MAGEA3*'ün azalması, büyüme faktörü yoksunluğu ve ayrıca sitotoksik ilaçların varlığında artışının azalmasına ve apoptozun artmasına neden olduğu bulunmuştur. İn vivo ksenograft çalışmasında, *MAGEA3*'ün aşırı ekspresyonunun tümör büyümesini desteklediğini aynı şekilde azalmasının da tümörün ilerlemesini engellediğini ortaya koydu. Mekanik olarak, in vitro ve in vivo çalışmalarında *MAGEA3*'ün makro-otofajiyi azaltarak ve CCL2 ve survivin gibi sağ kalımı arttırıcı molekülleri aşırı eksprese ederek tümör oluşumunu teşvik edici bir rol oynadığını ortaya koymuştur.

MAGE-A3'ün aşrı ifadesi üzerine yapılan çalışmalarda Patard ve ark. (1995) mesane kanserli hücrelerin %35'inde Dyrskjøt ve ark. (2012) ise üreteliyal karsinomların %43'ünde *MAGE-A3* ifadesi olduğunu bulmuşlardır. Çeşitli çalışmalarda da *MAGE-A3*'ün tümör hücrelerindeki ifade oranı %25 ile %58 arasında değiştiği görülmektedir (Dyrskjøt ve ark., 2012). Hudolin ve ark. (2006) tarafından bening ve kanseröz prostatik dokular üzerine yapılan çalışmada *MAGE-A1* karsinom örneklerinin %10.8'inde, *MEGA-A3* ve –A4 %85.9 ve NY-ESO-1 %84.8 örnekte tespit edilmiştir. Eynde ve Bruggen (1997) prostat tümörlerinin %15'inde *MEGA-A* ekspresyonu olduğunu bulmuştur. Kufer ve ark. (2002) ise prostat karsinomlarının %70'inden fazlasında *MEGA-A* ekspresyonu olduğunu kanıtlamıştır. Chen ve ark. (1997) kanser testis antijenlerinin prostat kanserlerinin %25'inde Nakada ve ark. (2003) ise %38'inde olduğunu tespit etmişlerdir.

Yapılan sınırlı sayıdaki çalışmalarda protat kanser hücrelerinde çok farklı oranlarda MAGE-A3 ekspresyon oranları bulunmuştur. Bulunan sonuçlarda ise PC3 prostat hücre hattı için *MEGA-A3* genindeki artış oranı 0,16 kat olarak saptanmıştır. Bulunan bu sonuçun, prostat kanser hücrelerinde *MEGA-A3* geni ve ilişkili proteinlerin tümörogenezde rol oynayabileceğini göstermekte olduğunu düşünmekteyim.

Siklooksijenaz (*COX*) olarak da bilinen *PTGS,* enflamatuar prostaglandinlerin sentezinde hız sınırlayıcı aşamayı katalize eden bir enzimdir. *COX*, araşidonik asidi biyolojik olarak aktif olan birçok eikozanoide metabolize eden bir bifonksiyonel entegral membran enzimidir. 1. Kromozomun q25.2-q25.3 bülgesinde bulunan *PTGS2* geni, prostat kanseri riski için aday bir gendir (Kosaka ve ark., 1994). *PTGS2* ise araşidonik asidi hücre çoğalmasında rol oynayan ve inflamasyonun potent mediyatörleri olan prostaglandinlere dönüştüren indüklenebilir bir enzimdir. *PTGS2*'nin ifadesini, hem transkripsiyonel hem de post-transkripsiyonel olarak büyüme faktörleri, sitokinler ve karsinogenler dahil olmak üzere birkaç hücre dışı uyarının kontrolü altındadır (Hla ve ark., 1999). Araştırmalar sonucunda *PTGS2*'nin hücre proliferasyonu, apoptozis, immün baskılayıcı, tümör progresyonu ve metastaz süreçlerinde rol oynadığı gösterilmiştir (Liu ve ark., 1998; Lee ve ark., 2002; Pruthi ve ark., 2003; Wang ve ark., 2007). Tüm bu olaylar da neoplazmların oluşumunu ve gelişimini sağlamaktadır.

COX enziminin *COX-1* ve *COX-2* olmak üzere 2 izoenzimi vardır. *COX-1* daha çok normal hücre aktivitesinde fizyolojik ve platelet agregasyonu gibi homostatik fonksiyonlarda rol alırken *COX-2* ise birçok hücrede daha düşük seviyelerde bulunarak hücrenin IL-1 ve TNF-α gibi proinflamatuar uyarılara maruz kalması sonucunda hızlı ve acil olarak cevap vermesini sağlamaktadır (Vane ve ark., 1998; Hla ve ark., 1999). *COX-2*'nin prostat kanserindeki rolü yeteri kadar araştırılmış olmasa da, kolon (Dannenberg, 1999; Dubois ve ark., 1998) ve meme (Hwang ve ark., 1998) kanseri dahil diğer kanser türlerinin oluşumunda etkili olduğu gösterilmiştir. Çeşitli histopatolojik incelemelerde kanser dokuları ile normal dokular ile karşılaştırıldığında, artmış prostaglandin ifadelerinin sıklıkla görüldüğü ortaya çıkarılmıştır (Smalley ve DuBois, 1997). *COX-2*'nin kolonik epitelyal hücrelerdeki aşırı ifadesi apoptozisi önleyerek tümör hücrelerinin adhezyonunu, invazivliğini ve anjiojenezi arttırır (Tsujii ve DuBois, 1995; Tsujii ve ark., 1997). Prostat kanser

hücrelerinde PGE_2 tedavisinin *COX-2* ekspresyonunu arttırdığı (Tjandrawinata ve ark., 1997) ve prostat kanser hücrelerinden elde edilen tromboksan-A2'nin anjiojenezi regüle ettiği gösterilmiştir (Nie ve ark., 2000).

COX, prostat fizyolojisinde de önemli bir rol oynamaktadır. Diğer dokular ile karşılaştırıldığında *COX-2* ifadesinin en yüksek seviyesi prostat hücrelerinde görülmektedir (O'Neill ve Ford-Hutchinson, 1993). Prostaglandinlerin erkek üreme sisteminde temel fonksiyonları vardır (Eliasson, 1968). Prostaglandinler hem prostat hem de seminal vizküllerin üretimi sonucunda semende çok yüksek seviyelerde bulunur (Bendvold ve ark., 1985). Prostaglandinler semende spremlerin canlılığının korunmasını ve fertilizasyon için kadınların immün cevabının düzenlenmesini sağlayabilmektedirler (Kelly ve ark., 1997). Böylece *COX-2*'nin ekspresyonu protatin normal hemostaz ve fonksiyonları için önemlidir.

COX-2 seviyeleri birçok tümör tipinde normal dokular ile karşılaştırıldığında daha yüksek seviyelerde bulunmuştur (Vane ve ark., 1998; Dannenberg ve ark., 1999; Dubois ve ark., 1998). Ancak Subbarayan ve ark. (2001) tarafından *COX-2* ifadesi üzerine yapılan çalışmada diğer kanser türlerinden farklı olarak normal prostat hücreleri ile karşılaştırıldığında prostat kanseri hücrelerinde daha az *COX-2* ifadesi ile karşılaşılmıştır. Bazal *COX-2* mRNA ve protein seviyeleri normal prostat epitelyal hücrelerde daha yüksek iken, tümör hücrelerinde daha düşük olarak bulunmuştur. Ayrıca çalışmada *COX-2* seviyeleri tümör hücrelerinde daha az iken TNF-α ile stimulasyon sonucunda tümör hücrelerinde *COX-2* seviyesinin arttığını bunun da tümörogenezde rol alabileceğini gösterilmiştir. Bu sonuçlarla benzer şekilde Lim ve ark. (1999) da normal prostat epitelyal hücrelerde *COX-2*'nin yüksek bazal ekspresyon gösterdiği ancak LNCaP ve PC-3 prostat hücre hattında *COX-2* üretimine rastlamamışlardır. Hong ve ark. (1999) da bu bulgularla korele olarak COX-1'i LNCaP, PC-3 ve DU145 dahil üç prostat hücre hattında tespit etmelerine rağmen COX-2'yi sadece DU145 prostat hücre hattında gözlemlemişlerdir. *PTGS2* geninin polimorfizmleri ve prostat kanseri riski üzerine yapılan çalışmalar da incelenirse; Yang ve ark.'nın (2013) 24,716 olgunun incelendiği meta-analiz çalışmasında 8473T>C (*PTGS2*'nin 3' UTR alanındaki rs5275) polimorfizmin prostat kanseri ile ilişkili olmadığı bulunmuştur, Murad ve ark.'nın (2009) yaptıkları meta-analiz çalışmasında da benzer şekilde -899G>C (*PTGS2*'nin promoter alanındaki rs20417) polimorfizmin de postat kanser gelişiminde bir risk faktörü

olduğu ile alakalı bir sonuca ulaşmadılarını raporlanmştı. Dossus ve ark.'nın (2009) yürüttüğü *PTGS2* ve IL6 genetik varyasyonların prostat ve meme kanserindeki riskinin araştırıldığı geniş çaplı kohort çalışmalarında, 6292 meme kanseri, 8008 prostat kanseri ve 8604 kontrol grubunda IL6 polimorfizminin hem meme hem de prostat kanseri için artmış risk oluştururken *PTGS2* polimorfizminin sadece meme kanserinde artmış risk oluşturduğu bulunmuş ancak prostat kanseriyle *PTGS2* polimorfizmi arasında bir ilişki bulunamamıştır.

COX-2 ekspresyonun prostat kanserli hücrelerde normal prostat hücrelerine göre daha az ekspresyonunu gösteren çalışmaların yanı sıra *COX-2*'nin prostat kanserli hücrelerde daha fazla ekspresse edildiğini iddia eden yayınlar da bulunmaktadır. Edwards ve ark.'nın (2004) prostat kanserinde *HER2* ve *COX2* ekpresyonunun araştırıldığı çalışmada *COX-2* ekspresyonunun prostat kanserinde arttığını ve bu ekspreyon düzeyinin tümörün evresi arttıkça daha fazla olduğunu bulmuşlardır. Bin ve ark.'nın (2011) Çin popülasyonunda prostat kanserli hücrelerde *COX-2* ekspresyonunun araştırıldığı çalışmasında ise *COX-2* ifadesinin prostat kanserli hücrelerde çevre non-tümoral dokulara göre anlamlı olarak fazla ekpresse edildiğini ve bu ekpresyon düzeyinin düşük metastatik prostatik hücre hatlarına (PC3, DU-145 ve LNCaP) göre yüksek metastatik prostat hücre hattında (PC-3 M) daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir. Nithipatikom ve ark. (2002) da PC-3 yüksek invaziv hücrelerde PC-3 düşük invaziv hücrelere göre *COX-2*'nin 3 kat fazla ekspresse edildiğini ve PGE_2 seviyelerinin de 2,5 kat fazla olduğunu bulmuşlardır.

COX-2'nin (yani *PTGS2*) farklı çalışmalarda farklı düzeylerde ifade edildiği bulunmuştur. Prostat kanserli hücrelerde normal dokulara göre fazla ekpresse edildiğini gösteren çalışmalar olduğu gibi, prostat kanserli hücrelerde normal prostat dokusuna göre daha az ekspresse edildiğini gösteren çalışmalar da olmuştur. Bu farklılık normal prostat dokusunda *COX-2*'nin temel fonksiyonlarının bulunması sebebiyle zaten fazla eksprese edilmesinden kaynaklanabilir. Ayrıca *COX-2*'nin farklı hücre hatlarında farklı ekspresyonu çalışmalar arasındaki farklılığın sebebi olabilir. Bulunan sonuçlarda da PC3 prostat hücre hattında *PTGS2* geninin ekspresyonunun normal hücreler ile kıyaslandığında 50 kat azaldığı saptanmıştır. Ancak Subbarayan ve ark. (2001) belirttiği gibi *PTGS2* geninin ekspresyonunun azalması *COX-2*'nin prostat kanseri oluşumunda rol almadığını göstermez. Çünkü Subbarayan ve ark. (2001) yaptıkları çalışmada prostat kanserli hücrelerde

ekspresyon azalması tespit etmelerine rağmen TNFα maruziyeti sonucunda *COX-2* seviyelerinde artış olduğunu göstermişlerdir. *COX-2*'nin prostat kanserinin gelişiminde, metastazında, invazivliğinde aldığı rolün araştırılması için daha fazla çalışmaların yapılması önerilmektedir.

Sonuç olarak prostat kanserinin genetik ve moleküler temellerinin aydınlatılması hem terapötik ajanların keşfedilmesine hem de altta yatan patofizyolojik ve tümörogenez mekanizmalarının aydınlatılmasında gelecek çalışmalara yol gösterecektir. Bu çalışma sonuçları çerçevesinde *TMPRSS4* ve *MAGE-A3* genlerinde prostat kanserli dokuda ekspresyon artışı saptanmışken *PTGS2* geninde ise ekspresyon azalması saptanmıştır.

Bu çalışma sonuçları çerçevesinde *TMPRSS4* ve *MAGE-A3* genlerinde prostat kanserli dokuda ekspresyon artışı saptanmışken *PTGS2* geninde ise ekspresyon azalması saptanmıştır.

TMPRSS4 ve *MAGE-A3* gen ekspresyon artışı kanser hüclerinde hücre bölünmesi, apoptoz direnci, invasyon, anjiyogenez gibi olayları etkileyerek prostat kanser hücresi üzerinde rol oynadığı gösterilmiştir.

PTGS2 geninde ki ekspresyon azalışının başka bir genin aktivasyonunu artırarak kansere neden olabileceği düşünülmektedir fakat *PTGS2* geninde ki ekspresyon azalışının karsinogenez üzerindeki olası etkilerinin araştırılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

Aberasturi, A.L. ve Calvo, A. (2015). TMPRSS4: an emerging potential therapeutic target in cancer. *British Journal of Cancer,* 112: 4–8.

Ayyoub, M., Scarlata, CM., Hamai, A., Pignon, P. ve Valmori, D. (2014). Expression of MAGE-A3/6 in primary breast cancer is associated with hormone receptor negative status, high histologic grade, and poor survival. *Journal of immunotherapy,* 37(2):73-6.

Bendvold, E. Svanborg, K., Bygdeman, M. ve Noren, S. (1985). On the origin of prostaglandins in human seminal fluid. *International journal of andrology,* 8(1):37-43.

Bin, W., He, W., Feng, Z., Xiangdong, L., Yong, C., Lele, K. et al. (2011). Prognostic relevance of cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in Chinese patients with prostate cancer. *Acta histochemica,* 113(2):131-6.

Bhatia, N., Xiao, TZ., Rosenthal, KA., Siddiqui, IA., Thiyagarajan, S., Smart, B. et al. (2013). MAGE-C2 promotes growth and tumorigenicity of melanoma cells, phosphorylation of KAP1, and DNA damage repair. *Journal of Investigative Dermatology,* 133(3):759-67.

Bruggen, P.V.D., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., Van den Eynde, B. et al. (1991). A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science (New York, NY),* 254(5038):1643-7.

Chen, YT., Scanlan, MJ., Sahin, U., Türeci, Ö., Gure, AO., Tsang, S. et al. (1997). A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proceedings of the National Academy of Sciences,* 94(5):1914-8.

Chikaishi, Y., Uramoto, H., Koyanagi, Y., Yamada, S., Yano, S. ve Tanaka, F. (2016). TMPRSS4 expression as a marker of recurrence in patients with lung cancer. *Anticancer research,* 36(1):121-7.

Choi, AM., Ryter, SW. ve Levine, B. (2013) Autophagy in human health and disease. *New England Journal of Medicine,* 368(7):651-62.

Choi, SY., Shin, HC., Kim, SY. ve Park, YW. (2008). Role of TMPRSS4 during cancer progression. *Drug news & perspectives,* 21(8):417-23.

Dannenberg, AJ. ve Zakim, D., editors. (1999). Chemoprevention of colorectal cancer through inhibition of cyclooxygenase-2. *Seminars in oncology;*

Das, B. ve Senapati. S. (2019). Functional and mechanistic studies reveal MAGEA3 as a pro-survival factor in pancreatic cancer cells. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research,* 38(1):294.

Daudi, S., Eng, KH., Mhawech-Fauceglia, P., Morrison, C., Miliotto, A., Beck, A. et al. (2014). Expression and immune responses to MAGE antigens predict survival in epithelial ovarian cancer. *PloS one,* 9(8):e104099.

Dearnaley, D.P. (1994). Cancer of the prostate. *BMJ,* 308(6931): 780–784.

Dossus, L., Kaaks, R., Canzian, F., Albanes, D., Berndt, SI., Boeing, H. et al. (2009). PTGS2 and IL6 genetic variation and risk of breast and prostate cancer: results from the Breast and Prostate Cancer Cohort Consortium (BPC3). *Carcinogenesis,* 31(3):455-61.

Dubois, RN., Abramson, SB., Crofford, L., Gupta, RA., Simon, LS., A. Van De Putte, LB. et al. (1998). Cyclooxygenase in biology and disease. *The FASEB journal,* 12(12):1063-73.

Dyrskjøt, L., Zieger, K., Lildal, TK., Reinert, T., Gruselle, O., Coche, T. et al. (2012). Expression of MAGE-A3, NY-ESO-1, LAGE-1 and PRAME in urothelial carcinoma. *British journal of cancer,* 107(1):116.

Edwards, J., Mukherjee, R., Munro, A., Wells, A., Almushatat, A., Bartlett, J. (2004). HER2 and COX2 expression in human prostate cancer. European Journal of *Cancer,* 40(1):50-5.

Eliasson, R. (1968). Biochemical analyses of human semen in the study of the physiology and pathophysiology of the male accessory genital glands. *Fertility and sterility*, 19(3):344-50.

Eynde BJVD, van der Bruggen P. (1997). T cell defined tumor antigens. *Current opinion in immunology*, 9(5):684-93.

Gandhi, J., Afridi, A., Vatsia, S., Joshi, G., Joshi, G., Kaplan. SA., et al. (2018). The molecular biology of prostate cancer: current understanding and clinical implications. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 21(1):22-36.

Gu, X., Fu, M., Ge, Z., Zhan, F., Ding, Y., Ni, H., et al. (2014). High expression of MAGE-A9 correlates with unfavorable survival in hepatocellular carcinoma. *Scientific reports*, 4:6625.

Gure, AO., Chua, R., Williamson, B., Gonen, M., Ferrera, CA., Gnjatic, S., et al. (2005). Cancer-testis genes are coordinately expressed and are markers of poor outcome in non–small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research*, 11(22):8055-62.

Hardie, DG. (2015). Molecular pathways: is AMPK a friend or a foe in cancer? *Clinical Cancer Research*, 21(17):3836-40.

Hardie, DG., Ross, FA., Hawley, SA. (2012). AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nature reviews Molecular cell biology*, 13(4):251.

Hla, T., Bishop-Bailey, D., Liu, CH., Schaefers, HJ., Trifan, OC. (1999). Cyclooxygenase-1 and -2 isoenzymes. *Int J Biochem Cell Biol*, 31(5):551-7.

Hong, SH., Avis, I., Vos, MD., Martínez, A., Treston, AM., Mulshine, JL. (1999). Relationship of arachidonic acid metabolizing enzyme expression in epithelial cancer cell lines to the growth effect of selective biochemical inhibitors. *Cancer research*, 59(9):2223-8.

Huang, A., Zhou, H., Zhao, H., Quan, Y., Feng, B. ve Zheng, M. (2014). TMPRSS4 correlates with colorectal cancer pathological stage and regulates cell proliferation and self-renewal ability. *Cancer biology & therapy*, 15(3):297-304.

Hudolin, T., Juretic, A., Spagnoli, GC., Pasini, J., Bandic, D., Heberer, M. et al. (2006). Immunohistochemical expression of tumor antigens MAGE-A1, MAGE-

A3/4, and NY-ESO-1 in cancerous and benign prostatic tissue. *The Prostate,* 66(1):13-8.

Hwang, D., Byrne, J., Scollard, D. ve Levine, E. (1998). Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human breast cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 90(6):455-60.

Jemal, A., Murray, T., Samuels, A. et al. (2003). Cancer statistics. *CACancer J Clin*, 53:526.

Jeon, CH., Kim, IH. ve Chae, HD. (2014). Prognostic value of genetic detection using CEA and MAGE in peritoneal washes with gastric carcinoma after curative resection: result of a 3-year follow-up. *Medicine (Baltimore),* 93(11).

Jianwei, Z., Qi, L., Quanquan, X., Tianen, W. ve Qingwei W. (2018). TMPRSS4 upregulates TWIST1 expression through STAT3 activation to induce prostate cancer cell migration. *Pathology & Oncology Research*. 24(2):251-7.

Jung, H., Lee, K., Park, S., Park, J., Jang, Y., Choi, S. et al. (2008). TMPRSS4 promotes invasion, migration and metastasis of human tumor cells by facilitating an epithelial–mesenchymal transition. *Oncogene.* 27(18):2635.

Kelly, R. ve Critchley, H. (1997). Immunomodulation by human seminal plasma: a benefit for spermatozoon and pathogen? *Human reproduction (Oxford, England)*, 12(10):2200-7.

Kim, S., Kang, HY., Nam, EH., Choi, MS., Zhao, XF., Hong, CS. et al. (2010). TMPRSS4 induces invasion and epithelial–mesenchymal transition through upregulation of integrin α5 and its signaling pathways. *Carcinogenesis*, 31(4):597-606.

Kim, S. ve Lee, JW. (2014). Membrane proteins involved in epithelial-mesenchymal transition and tumor invasion: studies on TMPRSS4 and TM4SF5. *Genomics & informatics*, 12(1):12.

Kosaka, T., Miyata, A., Ihara, H., Hara, S., Sugimoto, T., Takeda, O. et al. (1994). Characterization of the human gene (PTGS2) encoding prostaglandin-endoperoxide synthase 2. *European Journal of Biochemistry*, 221(3):889-97.

Kufer, P., Zippelius, A., Lutterbüse, R., Mecklenburg, I., Enzmann, T., Montag, A. et al. (2002). Heterogeneous expression of MAGE-A genes in occult

disseminated tumor cells: a novel multimarker reverse transcription-polymerase chain reaction for diagnosis of micrometastatic disease. *Cancer research*, 62(1):251-61.

Ladelfa, MF., Peche, LY., Toledo, MF., Laiseca, JE., Schneider, C. ve Monte, M. (2012). Tumor-specific MAGE proteins as regulators of p53 function. *Cancer letters*, 325(1):11-7.

Laduron, S., Deplus, R., Zhou, S., Kholmanskikh, O., Godelaine, D., De Smet, C. et al. (2004). MAGE-A1 interacts with adaptor SKIP and the deacetylase HDAC1 to repress transcription. *Nucleic acids research.* 32(14):4340-50.

Laiseca, JE., Ladelfa, MF., Cotignola, J., Peche, LY., Pascucci, FA., Castaño, BA. et al. (2017). Functional interaction between co-expressed MAGE-A proteins. *PloS one*, 12(5):e0178370-e.

Larzabal, L., Nguewa, P., Pio, R., Blanco, D., Sanchez, B., Rodriguez, M. et al. (2011). Overexpression of TMPRSS4 in non-small cell lung cancer is associated with poor prognosis in patients with squamous histology. *British journal of cancer*, 105(10):1608.

Liu, XH., Yao, S., Kirschenbaum, A. ve Levine, AC. (1998). NS398, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis and down-regulates bcl-2 expression in LNCaP cells. *Cancer research*, 58(19):4245-9.

Lee, DW., Sung, MW., Park, SW., Seong, WJ., Roh, JL., Park, B. et al. (2002). Increased cyclooxygenase-2 expression in human squamous cell carcinomas of the head and neck and inhibition of proliferation by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Anticancer research*, 22(4):2089-96.

Lee, Y., Ko, D., Min, HJ., Kim, SB., Ahn, HM., Lee, Y. et al. (2016). TMPRSS4 induces invasion and proliferation of prostate cancer cells through induction of Slug and cyclin D1. *Oncotarget.* 7(31):50315.

Liu, W., Cheng, S., Asa, SL. ve Ezzat, S. (2008). The melanoma-associated antigen A3 mediates fibronectin-controlled cancer progression and metastasis. *Cancer research*, 68(19):8104-12.

Marcar, L., Ihrig, B., Hourihan, J., Bray, SE., Quinlan, PR., Jordan, LB. et al. (2015). MAGE-A Cancer/Testis Antigens Inhibit MDM2 Ubiquitylation Function and Promote Increased Levels of MDM4. *PLoS One,* 10(5):e0127713.

Meek, DW. ve Marcar, L. (2012). MAGE-A antigens as targets in tumour therapy. *Cancer letters.* 324(2):126-32.

Min, HJ., Lee, Y., Zhao, XF., Park, YK., Lee, MK., Lee, JW. et al. (2014). TMPRSS4 upregulates uPA gene expression through JNK signaling activation to induce cancer cell invasion. *Cellular signalling,* 26(2):398-408

Monte, M., Simonatto, M., Peche, LY., Bublik, DR., Gobessi, S., Pierotti, MA. et al. (2006). MAGE-A tumor antigens target p53 transactivation function through histone deacetylase recruitment and confer resistance to chemotherapeutic agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* 103(30):11160-5.

Murad, A., Lewis, S., Smith, GD., Collin, S., Chen, L., Hamdy, F. et al. (2009). PTGS2–899G> C and prostate cancer risk: a population-based nested case–control study (ProtecT) and a systematic review with meta-analysis. *Prostate cancer and prostatic diseases,* 12(3):296.

Nakada, T., Noguchi, Y., Satoh, S., Ono, T., Saika, T., Kurashige, T. et al. (2003). NY-ESO-1 mRNA expression and immunogenicity in advanced prostate cancer. *Cancer Immunity Archive,* 3(1):10.

Nie, D., Lamberti, M., Zacharek, A., Li, L., Szekeres, K., Tang, K. et al. (2000). Thromboxane A2 regulation of endothelial cell migration, angiogenesis, and tumor metastasis. *Biochemical and biophysical research communications,* 267(1):245-51.

Nithipatikom, K., Isbell, MA., Lindholm, PF., Kajdacsy-Balla, A., Kaul, S., Campell, WB. (2002). Requirement of cyclooxygenase-2 expression and prostaglandins for human prostate cancer cell invasion. *Clinical & experimental metastasis,* 19(7):593-601.

O'Neill, GP. Ve Ford-Hutchinson, AW. (1993). Expression of mRNA for cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human tissues. *FEBS letters,* 330(2):157-60.

Patard, JJ., Brasseur, F., Gil-Diez, S., Radvanyi, F., Marchand, M., François, P., et al. (1995). Expression of MAGE genes in transitional-cell carcinomas of the urinary bladder. *International journal of cancer*, 64(1):60-4.

Peche, LY., Scolz, M., Ladelfa, MF., Monte, M., Schneider, C. (2012). MageA2 restrains cellular senescence by targeting the function of PMLIV/p53 axis at the PML-NBs. *Cell Death Differ,*19(6):926-36.

Perez, D., Hauswirth, F., Jäger, D., Metzger, U., Samartzis, E. P., Went, P., & Jungbluth, A. (2011). Protein expression of cancer testis antigens predicts tumor recurrence and treatment response to imatinib in gastrointestinal stromal tumors. International journal of cancer, 128(12), 2947-2952.

Pineda, CT., Ramanathan, S., Fon Tacer, K., Weon, JL., Potts, MB., Ou, YH. et al. (2015). Degradation of AMPK by a cancer-specific ubiquitin ligase. *Cell*, 160(4):715-28.

Pruthi, RS., Derksen, E. ve Gaston, K. (2003). Cyclooxygenase-2 as a potential target in the prevention and treatment of genitourinary tumors: a review. *The Journal of urology.* 169(6):2352-9.

Sanhueza, C. ve Kohli, M. (2018). Clinical and Novel Biomarkers in the Management of Prostate Cancer, *Current Treatment Options in Oncology.* 19:8.

Shi, G., Yang, X., Dai, B., Zhang, H., Shen, Y., Zhu, Y. et al. (2014). Clinical significance of TMPRSS4 in prostate cancer. *International journal of clinical and experimental pathology*, 7(11):8053.

Siegel R, Naishadham D, Jemal A. (2013). Cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians*, 63(1):11-30.

Simpson, AJ., Caballero, OL., Jungbluth, A., Chen, YT., Old, LJ. (2005). Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nature reviews Cancer*, 5(8):615-25.

Smalley, WE. ve DuBois, RN. (1997). Colorectal cancer and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Advances in pharmacology.* 39: 1-20.

Su, S., Minges, JT., Grossman, G., Blackwelder, AJ., Mohler, JL., Wilson, EM. (2013). Proto-oncogene activity of melanoma antigen-A11 (MAGE-A11)

regulates retinoblastoma-related p107 and E2F1 proteins. *The Journal of biological chemistry*, 288(34):24809-24.

Subbarayan, V., Sabichi, AL., Llansa, N., Lippman, SM., Menter DG. (2001). Differential expression of cyclooxygenase-2 and its regulation by tumor necrosis factor-α in normal and malignant prostate cells. *Cancer research.* 61(6):2720-6.

Suyama, T., Shiraishi, T., Zeng, Y., Yu, W., Parekh, N., Vessella, RL. et al. (2010). Expression of cancer/testis antigens in prostate cancer is associated with disease progression. *The Prostate*, 70(16):1778-87.

Taylor, BS., Schultz, N., Hieronymus, H., Gopalan, A., Xiao, Y., Carver, BS., et al. (2010). Integrative genomic profiling of human prostate cancer. *Cancer cell*. 18(1):11-22.

Tjandrawinata, R., Dahiya, R. ve Hughes-Fulford, M. (1997). Induction of cyclo-oxygenase-2 mRNA by prostaglandin E 2 in human prostatic carcinoma cells. *British Journal of Cancer*, 75(8):1111.

Trapman, J. (2001). Molecular mechanisms of prostate cancer. *Department of Pathology, Erasmus University, Rotterdtrm, The Netherlands*, 37 (7): 119–125.

Tsujii, M. ve DuBois, RN. (1995). Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell*, 83(3):493-501.

Tsujii, M., Kawano, S. ve DuBois RN. (1997). Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. Proceedings of the National Academy of Sciences, 94(7):3336-40.

Vane, J., Bakhle, Y. ve Botting, R. (1998). CYCLOOXYGENASES 1 AND 2. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 38(1):97-120.

Wang, MT., Honn, KV., Nie, D. (2007). Cyclooxygenases, prostanoids, and tumor progression. *Cancer and Metastasis Reviews*, 26(3-4):525.

Wei, Y., Zou, Z., Becker, N., Anderson, M., Sumpter, R., Xiao, G. et al. (2013). EGFR-mediated Beclin 1 phosphorylation in autophagy suppression, tumor progression, and tumor chemoresistance. *Cell*, 154(6):1269-84.

Weon, J. L. ve Potts, P. R. (2015). The MAGE protein family and cancer. *Current Opinion in Cell Biology*, 37, 1–8.

White, E. (2012). Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 12(6):401.

Xu, Y., Wang, C., Zhang, Y., Jia, L. ve Huang J. (2015). Overexpression of MAGE-A9 Is Predictive of Poor Prognosis in Epithelial Ovarian Cancer. *Scientific reports*, 5:12104.

Yadav, SS., Stockert, JA., Hackert, V., Yadav, KK. ve Tewari AK. (2018). Intratumor heterogeneity in prostate cancer. *Urol Oncol*, 36: 349–360.

Yakirevich, E., Sabo, E., Lavie, O., Mazareb, S., Spagnoli, GC., Resnick, MB. (2003). Expression of the MAGE-A4 and NY-ESO-1 cancer-testis antigens in serous ovarian neoplasms. *Clin Cancer Res*, 9(17):6453-60.

Yang, B., O'Herrin, S., Wu, J., Reagan-Shaw, S., Ma, Y., Nihal, M. et al. (2007). Select Cancer Testes Antigens of the MAGE-A, -B, and -C Families Are Expressed in Mast Cell Lines and Promote Cell Viability In Vitro and In Vivo. *Journal of Investigative Dermatology*, 127(2):267-75. A

Yang, F., Zhou, X., Miao, X., Zhang, T., Hang, X., Tie, R. et al. (2014). MAGEC2, an epithelial-mesenchymal transition inducer, is associated with breast cancer metastasis. *Breast cancer research and treatment*, 145(1):23-32.

Yang, X., Li, B., Si, T., Liu, Y. ve Guo, Z. (2013). Association between the 8473T> C polymorphism of PTGS2 and prostate cancer risk: a metaanalysis including 24,716 subjects. *Oncology Research and Treatment*, 36(4):182-6.

Zhang, S., Zhai, X., Wang, G., Feng, J., Zhu, H., Xu, L. et al. (2015). High expression of MAGE-A9 in tumor and stromal cells of non-small cell lung cancer was correlated with patient poor survival. *International journal of clinical and experimental pathology*, 8(1):541.