

T.C.  
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MEKLOFENAMİK ASİT İLE FTO (FAT-MASS AND OBESİTY  
ASSOCIATED GENE) PROTEİNİ BASKILANMASININ PROSTAT  
KANSERİ HÜCRE PROTEOMU ÜZERİNE ETKİLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**Büşra ŞAHİNÖZ**

Kocaeli Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin  
Tıbbi Biyoloji Programı için Öngördüğü  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
Olarak Hazırlanmıştır

KOCAELİ  
2021



T.C.  
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MEKLOFENAMİK ASİT İLE FTO (FAT-MASS AND OBESİTY  
ASSOCIATED GENE) PROTEİNİ BASKILANMASININ PROSTAT  
KANSERİ HÜCRE PROTEOMU ÜZERİNE ETKİLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**Büşra ŞAHİNÖZ**

Kocaeli Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin  
Tıbbi Biyoloji Programı için Öngördüğü  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Aylin KANLI

Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi  
Proje No: TYL 2020/2239

KOCAELİ

2021

## SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Tez Adı: Meklofenamik asit ile FTO (fat-mass and obesity associated gene) proteini baskılanmasının prostat kanseri hücre proteomu üzerine etkilerinin araştırılması

Tez Yazarı: Büşra ŞAHİNÖZ

Tez Savunma Tarihi: 09.07.2021

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Aylin KANLI

Bu çalışma, sınav kurulumuz tarafından Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

SINAV KURULU ÜYELERİ		
ÜNVANI	ADI SOYADI	İMZA
BAŞKAN (ÜYE)		
DANIŞMAN		
ÜYE		
ÜYE		
ÜYE		

### Onay

Bu tez Kocaeli Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla onaylanmıştır.

.... /.... /2021

Prof. Dr. Sema Aşkın KEÇELİ  
KOÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## ÖZET

### **Meklofenamik Asit ile FTO (Fat-Mass And Obesity Associated Gene) Proteini Baskılanmasının Prostat Kanseri Hücre Proteomu Üzerine Etkilerinin Araştırılması**

Amaç: Prostat kanseri (PK), erkeklerde görülen kanserler arasında ilk sırada gelmektedir. Tedavi için yeni yöntemlerde kullanılacak olan moleküllerin arayışları devam etmektedir. Meklofenamik asit (MA), farklı kanser türlerinde terapötik etkisi olan ve steroid olmayan anti-enflamatuar bir ilaçtır. Bu tez çalışmasında aynı zamanda demetilaz aktiviteye sahip FTO proteininin spesifik bir inhibitörü olan MA'nın prostat kanseri hücrelerindeki etkilerinin proteomik düzeyde araştırması amaçlanmıştır.

Yöntem: LNCaP hücrelerinde FTO proteini inhibisyonunu sağlamak için 80 µM MA ile 24 saat süreyle muamele edilmiştir. MA uygulanan ve MA-uygulanmayan hücrelerde karşılaştırmalı proteomik analiz gerçekleştirilmiştir. Bunun için deney gruplarından elde edilen proteinler, iki boyutlu jel elektroforezine (2DE) tabi tutuldu. Regülasyonlarında değişiklik görülen protein spotları jellerden kesilerek jel içi triptik kesim sonrası MALDI-TOF/TOF ile tanımlandı.

Bulgular: Tanımladığımız proteinler arasında neredeyse tamamının birbirleri ile ilişkili olduğu ve ilintili yollarda görev aldıkları görüldü. MA uygulanan LNCaP hücrelerinde glikoliz metabolizması (ALDOA, PKM ve SDH), hücre iskeletinin şekillenmesi (ARP3, COF1 ve WDR1), transport aktivitesi (CLIC1), protein metabolizması (yıkımı, translasyonu) (PSB, UCHL1, HSC71 ve EF2) ve en belirgin olarak da mRNA işlenmesi (CSTF1 SRSF1, SRSF3, RBM4, RBM4B) ile ilişkili proteinlerin ifade seviyelerinde değişiklikler görülmüştür. HSC70 hariç tüm proteinlerin ifade seviyelerinde azalma vardı.

Sonuç: Meklofenamik asit prostat kanserinde diğer hücresel yolların yanı sıra daha belirgin olarak alternatif poliadenilasyon ve splicing makinesi aracılı güçlü bir terapötik etkiye sahip olabilir ve diğer kanser türlerindeki tedavilere de yeni terapötik hedefler sunabilir. Ancak bu ön görüleri çalışmalar (*in vivo* ve *in vitro* deneyler) ile desteklenmelidir.

Anahtar Kelimeler: Prostat kanseri, LNCaP hücreleri, Meklofenamik asit, FTO, 2-DE, MALDI-TOF/TOF ve Proteomik.

## ABSTRACT

### **Investigation of the Effects of FTO (Fat-Mass and Obesity Associated Gene) protein inhibition with Meclofenamic Acid on the Prostate Cancer Cell Proteome**

**Objectives:** Prostate cancer (PC) is the highest observed cancer among the caancer types in men. The search for novel chemical agents that may be used for the treatment continues. Meclofenamic acid (MA) is a non-steroidal anti-inflammatory drug with therapeutic effect in different types of cancer. The aim of this thesis study was to investigate the effects of MA, a specific FTO protein inhibitor with dematylase activity, on prostate cancer cells at the proteome level.

**Methods:** To inhibit FTO protein activity in LNCaP cells, the cells were treated with 80  $\mu$ M MA for 24 hours. Comparative prototeomic analysis was performed in MA-treated and MA-untreated cells. First, proteins were extracted from cells and then were subjected to two-dimensional gel electrophoresis (2DE). Protein spots displaying changes in their regulation ratios for more than 2-fold were excised from the gels and identified with MALDI-TOF/TOFmass spectrometry.

**Results:** Bioinformatics analysis of the differentially regulated proteins that we identified showed that they were all associated with and took part in related pathways. In MA-treated LNCaP cells, glycolytic metabolizması (ALDOA, PKM and SDH), cytoskeletal formation (ARP3, COF1 and WDR1), transport activity (CLIC1), protein metabolism (PSB, UCHL1, HSC70 ve EF2) and most notably mRNA processing (CSTF1, SRSF1, SRSF3, RBM4 and RBM4B)- were affected by the changes caused by MA inhibited FTO activity.

**Conclusions:** The use of MA may have a significant potential for therapeutic use in prostate cancer. It appears that MA dictates its affects through alternative polyadenylation and splicing machinery as well as other cellular pathways and may offer novel therapeutic targets for te treatment of various cancer types. However, these predictions should be supported by further studies (in vivo and in vitro experiments).

**Keywords:** Prostate cancer, LNCaP cells, Meclofenamic acid, FTO, 2-DE, MALDI-TOF/TOF and Proteomics.

## TEŞEKKÜR

Tezimin proje ve tez önerisi olarak sunulmasından, teslimine kadar geçen tüm süreçlerde benimle birebir ilgilenen değerli danışman hocam sayın Dr. Öğr. Üyesi Aylin KANLI'ya teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, birçok konuda beni motive eden ve desteklerini hiçbir zaman eksik etmeyen, değerli hocam sayın Prof. Dr. Murat KASAP'a teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca yönlendirmeleriyle bana yol gösteren değerli hocam sayın Doç. Dr. Gürler AKPINAR'a teşekkür ederim.

Eğitime başladığım günden bu yana, tükenmeyen enerjisiyle birlikte fikirleriyle bana farklı bir bakış açısı kazandıran Ar. Gör. Mehmet SARIHAN'a, tez çalışmam boyunca her konuda yanımda olan ve yol gösteren Ar. Gör. Sevinç YANAR'a, bilimsel ve sosyal hayattaki tecrübelerini benimle paylaşan Ar. Gör. Merve Gülsen BAL ALBAYRAK'a teşekkürlerimi borç bilirim.

Tüm hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini benden hiçbir zaman esirgemeyen ve her zaman yanımda olan sevgili annem Arzu ŞAHİNÖZ ve babam Süleyman ŞAHİNÖZ'e sonsuz teşekkür ederim. Ayrıca sevgili eşim Çağdaş SAĞLAM'a göstermiş olduğu sonsuz ilgi ve anlayışı için en derin sevgilerimi sunarım.

Çalışmanın gerçekleşmesinde maddi destekleri için üniversitemizin Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne (Proje No: TYL 2020/2239) teşekkür ederim.

## ORJİNALLİK BİLDİRİMİ

Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Meklofenamik Asit ile Fto (Fat-Mass And Obesity Associated Gene) Proteini Baskılanmasının Prostat Kanseri Hücre Proteomu Üzerine Etkilerinin Araştırılması” başlıklı tezimde başka kaynaklardan yararlanılarak kullanılan yazı, bilgi, şekil, tablo ve diğer malzemeler kaynakları gösterilerek verilmiştir. Tezimde yer alan deneysel çalışmalar/araştırmalar bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yapılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususlar bir intihal programı (Turnitin) kullanılarak test edilmiş olup, doğruluğunu beyan ederim.

**09 /06 / 2021**

**Büşra ŞAHİNÖZ**



# İÇİNDEKİLER

<b>ÖZET</b>	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>v</b>
<b>TEŞEKKÜR</b>	<b>vi</b>
<b>ORJİNALLİK BİLDİRİMİ</b>	<b>vii</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b>	<b>xi</b>
<b>ŞEKİLLER</b>	<b>xii</b>
<b>1.GİRİŞ</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Prostat Kanseri</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Prostat Bezinin Anatomisi ve Fizyolojisi</b>	<b>1</b>
<b>1.3. Epidemiyoloji</b>	<b>3</b>
<b>1.4. Etiyoloji</b>	<b>4</b>
<b>1.4.1. Obezite</b>	<b>4</b>
<b>1.4.2. Yaş</b>	<b>4</b>
<b>1.4.3. Aile Öyküsü</b>	<b>4</b>
<b>1.4.4. Etnik Köken</b>	<b>5</b>
<b>1.4.5. Beslenme</b>	<b>5</b>
<b>1.4.6. Sigara</b>	<b>6</b>
<b>1.4.7. İlaç maruziyeti</b>	<b>6</b>
<b>1.4.8. Enfeksiyon</b>	<b>6</b>
<b>1.4.9. Genetik ve Epigenetik Faktörler</b>	<b>7</b>
<b>1.5. Mortalite</b>	<b>10</b>
<b>1.6. Prostat Kanseri Patogenezi</b>	<b>10</b>
<b>1.7. Prostat kanseri semptomları</b>	<b>12</b>
<b>1.8. Prostat Spesifik Antijeni (PSA)</b>	<b>12</b>
<b>1.9. Prostat Kanserinin Teşhisi ve Evrenmesi</b>	<b>13</b>
<b>1.10. Prostat Kanserinin Tedavisi</b>	<b>14</b>
<b>1.11. PK tedavilerinin yan etkileri</b>	<b>16</b>
<b>1.12. Androjen Reseptörü (AR)</b>	<b>16</b>
<b>1.13. Prostat kanseri, FTO ve m<sup>6</sup>A</b>	<b>17</b>
<b>1.14. Meklofenamik Asit</b>	<b>19</b>
<b>1.15. Prostat Kanseri ile ilgili yapılan proteomik çalışmalar</b>	<b>21</b>
<b>2.AMAÇ</b>	<b>24</b>
<b>3. YÖNTEM</b>	<b>25</b>

<b>3.1. LNCaP ve PNT1A Hücrelerinin Kültüre Edilmesi</b>	29
<b>3.1.1. Hücrelerin Çözülmesi</b>	29
<b>3.1.2. Hücrelerin Pasajlanması</b>	30
<b>3.1.3. Hücrelerin Saklanması</b>	30
<b>3.1.4. MA'nın hazırlanması</b>	31
<b>3.2. LNCaP Hücrelerinin Meklofenamik Asit ile Mumale Sonrası Global m6A Seviyelerinin Belirlenmesi</b>	31
<b>3.2.1. LNCaP hücrelerinin MA ile muemele edilmesi</b>	31
<b>3.2.2. Meklofenamik asitin Hücre Canlılığına Etkisinin Belirlenmesi</b>	31
<b>3.2.3. MA uygulamasının m6A Miktarına Etkisinin Belirlenmesi</b>	33
<b>3.2.4. LNCaP Hücrelerinden RNA İzolasyonu</b>	33
<b>3.2.5. m<sup>6</sup>A seviyesinin belirlenmesi</b>	33
<b>3.3. Meklofenamik Asitin LNCaP Hücre Proteomu Üzerine Etkilerinin Araştırılması</b>	34
<b>3.3.1 Hücrelerden protein izolasyonu ve örnek havuzlarının oluşturulması</b>	34
<b>3.3.2. Protein Özütlelerinin Hazırlanması</b>	34
<b>3.3.3 Protein Konsantrasyonlarının Belirlenmesi</b>	36
<b>3.3.4. Örnek havuzlarının oluşturulması</b>	36
<b>3.3.5 Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamit Jel Elektrofrez (SDS-PAGE)</b>	36
<b>3.3.6. İki Boyutlu Jel Elektrofrez (2DE) (PROTEAN Plus Dodeca cell)</b>	37
<b>3.3.7. İzoelektrik fokuslama ve Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamit Jel Elektrofrez</b>	38
<b>3.3.8. 2DE Jellerin Görüntü Analizi</b>	41
<b>3.4. Kütle Spektrometresi (MS/MS) İçin Örnek Hazırlama ve Analizleri</b>	41
<b>3.4.1 Jel içindeki Proteinlerin Tripsin ile Kesimi (In-Gel Tryptic Digestion) ve Peptit Örneklerinin MALDI TOF/TOF Analizi için Hazırlanması</b>	41
<b>3.4.2. MALDI TOF/TOF Analizi</b>	42
<b>3.4.3. Western Blotlama</b>	42
<b>3.4.4. Analizlerde Kullanılan Biyoinformatik Yazılımlar</b>	43
<b>4. BULGULAR</b>	<b>45</b>
<b>4.1 Prostat Kanseri Hücre Hatlarında FTO Ekspresyon Seviyelerinin WB Yöntemiyle Belirlenmesi</b>	45
<b>4.2. Meklofenamik asitin LNCaP Hücre Canlılığına Etkilerinin Belirlenmesi</b>	45

<b>4.3. LNCaP Hücrelerinin Meklofenamik Asit ile Muamale Sonrası Global m6A Seviyelerinin Belirlenmesi</b>	<b>49</b>
<b>4.4. Meklofenamik Asitin LNCaP hücre Proteomu Üzerine Etkileri</b>	<b>51</b>
<b>5. TARTIŞMA</b>	<b>70</b>
<b>6.SONUÇLAR VE ÖNERİLER</b>	<b>85</b>
<b>7. KAYNAKLAR</b>	<b>87</b>
<b>8.ÖZGEÇMİŞ</b>	Error! Bookmark not defined.



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

2D:2 Dimentional

2-OG:2-oksoglutarat

AmBic :Amonyum bikarbonat

APS :Amonyum persülfat

cDNA: Komplementer DNA

DMSO :Dimetil sülfoksit

DNA :Deoksiribonükleik asit

DTT : Dithiothreitol

FTO :Fat mass and obesity associated protein

IAA:İyodaasetamid

m6A :N<sup>6</sup> -metil adenzin

MALDI-TOF/TOF : Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight/Time of Flight

MgCl<sub>2</sub>:Magnezyum klorür

mRNA:Messenger RNA

PBS:Fosfat tuz tampon çözeltisi

RNA:Ribonükleik asit

SDS-PAGE: Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi

TBE:Tris Borat EDTA

TBS :Tris Buffer Salin

TBS-T: Tris-Tamponlu Salin, 0.1% Tween 20

TCEP :Tris (2-carboxyethyl) phosphine

TEMED:Tetramethylethylenediamin

## ŞEKİLLER

Şekil 1.1. 2020 yılındaki yeni kanser vakalarının tahmini veri grafiği.....	1
Şekil 1.2. Prostat anatomisinin şematik görünümü.....	2
Şekil 1.3. Hipofizer tümörünez kaskadı.....	3
Şekil 1.4. Protein analizlerinin şematik olarak gösterimi.....	12
Şekil 1.5. Prostat kanserinin evreleri.....	14
Şekil 1.6. Androjen reseptörü geninin yapısı.....	17
Şekil 1.7. Protein analizlerinin şematik olarak gösterimi.....	22
Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan yöntemler ve iş-akış şeması. ....	25
Şekil 3.2. Hücrelerin kültür kabından scraper ile kazınarak alınması .....	35
Şekil 3.3. Kültür içeriğinin çöktürülmesiyle elde edilen hücre pelletleri .....	36
Şekil 3.4. Proteinlerin IPG striplere emdirilmesi.....	39
Şekil 3.5. Striplerin rehidrasyonu için PROTEAN IEF (Biorad, ABD) cihazına yerleştirilmesi.....	40
Şekil 3.6. Protein örneklerinin Dodeca cihazında ikinci boyutta ayrımı.....	44
Şekil 3.7. Jellerin COMASSİE BRİLLİANT BLUE G-250 ile boyanması ve boyanan jel görüntüsü.....	41
Şekil 4.1. Prostat hücre dizilerinde FTO ekspresyon seviyelerinin Western blot analizi ve Bant yoğunluklarının grafiksel gösterimi.....	47
Şekil 4.2. MA'nın LNCaP hücre canlılığı üzerine etkisi.....	48
Şekil 4.3. 80 µM MA verilen LNCaP hücrelerinin inverted mikroskopi görüntüleri.....	49
Şekil 4.4. MA'nın PNT1A hücre canlılığı üzerine etkisi.....	50
Şekil 4.5. RNA'nın %1'lik formaldehit RNA agaroz jel elektroforezi ile analizi.....	51
Şekil 4.6. LNCaP hücrelerinde m6A seviyesine MA'nın etkisi.....	52
Şekil 4.7. Kontrol ve MA grubuna ait proteinlerin SDS-PAGE analizi.....	53
Şekil 4.8. LNCaP hücre hattında meydana gelen proteom düzeyindeki değişikliklere ait 2-DE görüntüsü.....	55
Şekil 4.9. MALDI-TOF/TOF ile tanımlanan protein spotlarının jeller üzerinde yakın çekim görüntüleri (TPM3, SFRS1, CLIC1, IPYR, HSP7C, UCHL1, ARP3, SFRS3, RBM4B)...	59
Şekil 4.10. MALDI-TOF/TOF ile tanımlanan protein spotlarının jeller üzerinde yakın çekim görüntüleri (SAHH, WDR1, DHS, CSTF1, RBM4, EF2, COF1, KPYM, GBLP, PSB1, ALDOA, LDHA).....	60
Şekil 4.11. Tablo 4.5'teki regülasyon farkı görülen proteinlerin STRING analizi.....	62



## TABLULAR

<b>Tablo 1.1.</b> Prostat kanserindeki genomik sapmalar ve lokalizasyonlarının gösterimi.....	9
<b>Tablo 1.2.</b> Prostat kanserinde işlevlerine ve yollarına göre sıklıkla metillenen genler.....	10
<b>Tablo 3.1.</b> Kullanılan Ekipmanlar/Kitler.....	26
<b>Tablo 3.2.</b> Çalışmada kullanılan kimyasallar ve hazırlanması.....	27
<b>Tablo 3.3.</b> Hücre Kültürü çalışmalarında kullanılan kimyasal maddeler.....	29
<b>Tablo 3.4.</b> SDS-PAGE içeriği.....	38
<b>Tablo 3.5.</b> Western Blot analizinde kullanılan birincil ve ikincil antikorların listesi.....	44
<b>Tablo 4.1.</b> Hücrelerdeki canlılık testi sonuçlarına göre belirlenen günler ve uygulanan dozlar.....	50
<b>Tablo 4.2.</b> Tanımlanan proteiblerin isimleri ve 2-DE deneyi sonucunda tespit edilen spotlara ait MALDI sskorları.....	56
<b>Tablo 4.3.</b> Tanımlanan proteinlerin isimleri ve 2-DE deneyi sonucunda tespit edilen spotlara ait MALDI skorları (devamı).....	57
<b>Tablo 4.4.</b> Tanımlanan proteinlerin hesaplanmış regülasyon oranları.....	58
<b>Tablo 4.5.</b> PANTHER Analizine göre proteinlerin moleküler fonksiyon, pathway, biyolojik proses ve protein sınıflarını gösterimi.....	64

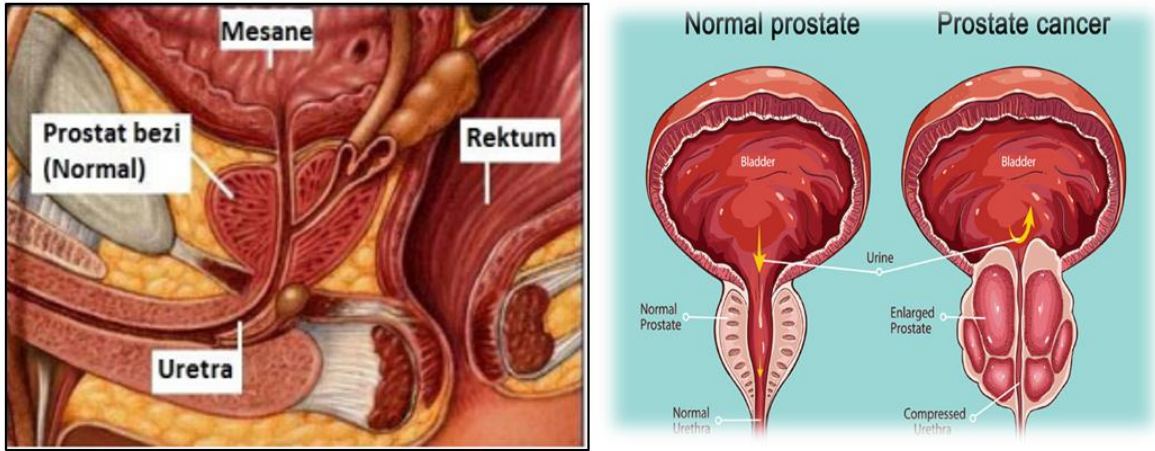
# 1.GİRİŞ

## 1.1. Prostat Kanseri

Prostat kanseri (PK), prostat bezindeki hücre proliferasyonu ve hücre ölümü arasındaki dengenin bozularak, organ hacminin malign büyümesi sonucunda oluşmaktadır (Epstein-Lieberman, 1985). Kansersiz hücreler vücudun diğer bölgelerine, özellikle kemiklere ve lenf düğümlerine yayılabilir (Ruddon,2007).

## 1.2. Prostat Bezinin Anatomisi ve Fizyolojisi

Prostat bezi, 3 cm büyüklüğünde olup, erkeklerde yardımcı üreme organıdır ve idrar yapma sırasında mesaneden idrarı ve boşalma sırasında da meni taşıyan tüp olarak görev yapan üretranın bir kısmını çevreler ve rektumun önünde yer alır (Epstein-Lieberman, 1985; Moore, Chubb, 1999). Prostat bezi, erkek üreme sisteminin seminal sıvının yapımına ve depolanmasına yardımcıdır ve fibrinolizin, sitrik asit ve asit fosfataz üretir (Şeftalioğlu, 1998).

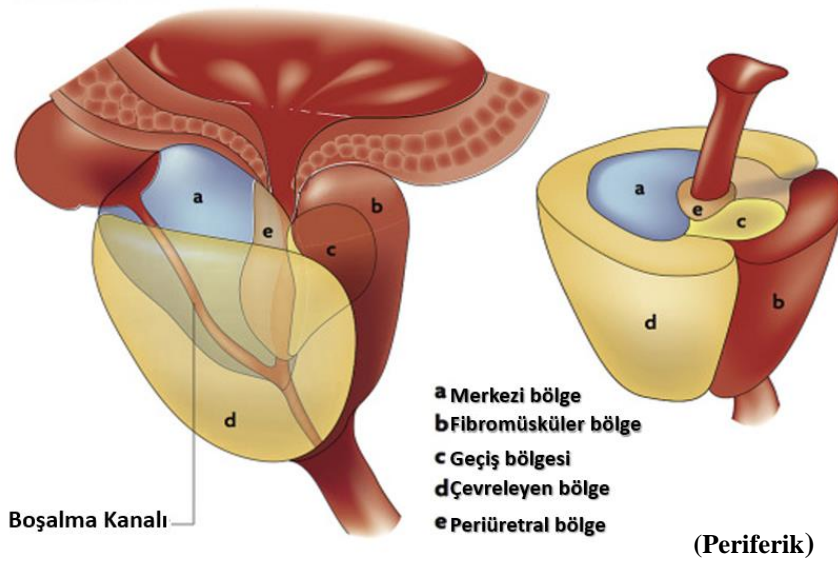


**Şekil 1.1.** Prostat bezinin anatomisinin şematik görünümü (Krongrad and Droller, 1993, <https://www.mountelizabeth.com.sg/>)



Prostat bezinin anatomik bölgeleri, periferik (çevreleyen), merkezi, geçiş (transisyonel) bölgeleri şeklinde ayrılabilir. Periferik boşluk prostatın arka ve yan kısımlarının yanı sıra prostatın alt kısımlarını içerir. Merkezi boşluk, üretra ve mesane boynunun en proksimal yönlerini içeren prostatın üst kısmını içerir. Geçiş boşluğu, merkezi boşluğun hemen önünde yer alır ve merkezi bez üretra distalinde üretra içerir (McNeal,1984).

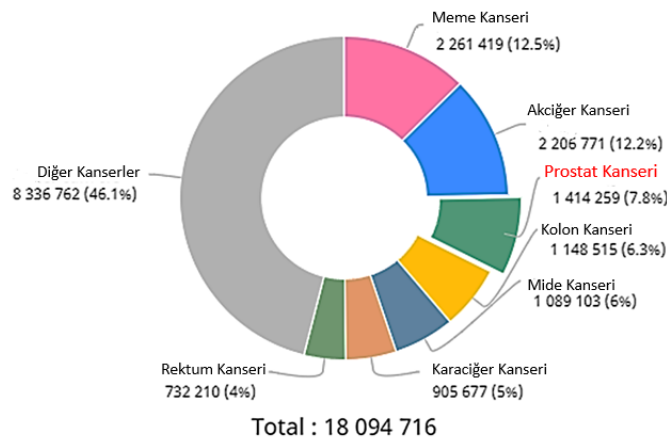
Prostat bezlerinin düzgün çalışması için androjenler olarak bilinen erkek hormonlarına ihtiyaç vardır. Androjenler arasında testislerde üretilen testosteron; adrenal bezlerde yapılan dehidroepiandrosteron ve prostatın kendi içinde testosterondan dönüştürülen dihidrotestosteron bulunmaktadır (Andreas ve ark., 1998).



**Şekil 1.2.** Prostat bezinin bölgelerinin gösterimi (Fairleigh Reeves ve ark.,2016).

### 1.3. Epidemiyoloji

Prostat kanseri özellikle batı toplumlarında erkeklerde görülen kanser türlerinde ilk sıradadır ve kanser sonucu olan ölümlerin en sık rastlanan nedenlerinden biridir. Dünya genelinde kanserden meydana gelen ölümlerde ise, prostat kanserinin akciğer kanserinden sonra ikinci sırada yer aldığı görülmektedir (Altıntaş ve ark., 2013; Yazıcı ve ark., 2014). ABD'de yapılan bir araştırmada 2019 yılında erkeklerde en fazla görülen kanser türünün prostat kanseri olduğu görülmüştür (Siegel ve ark., 2019). ABD'de yedi erkekten birinin, dünya çapında ise 25 kişiden biri, muhtemelen prostat kanseri teşhisi alacağı tahmin edilmektedir (Howlander ve ark., 2020). GLOBOCAN (Global Cancer Observatory) verilerine bakıldığında, 2018 yılında dünya çapında tahmini 1.276.000 prostat kanseri vakası görülmektedir; bu durum tüm kanser teşhislerinin %7,1'ini oluşturmaktadır (Ferlay ve ark., 2018). Amerika, Avrupa ve Afrika ülkelerinin çoğunda prostat kanseri teşhisi, erkekler arasında en yaygın kanser teşhisidir. En düşük oranlar Orta Güney (5.0/100.000) ve Güneydoğu Asya'da görülmektedir. Prostat kanseri ABD, İngiltere ve Japonya gibi ülkelerde 37.5/100.000 oranı ile önemli ölçüde daha yaygındır ve bu durum erkeklerde akciğer kanseri ile neredeyse aynı orandadır (Bray ve ark., 2018). ABD'de 2020 yılında 192.000 prostat kanseri vakası tahmin edilmektedir ve tüm yeni kanser teşhislerinin %10.6 'sını oluşturmaktadır. Bu insidans, 1992'de 237/100.000 oranındayken 2016 yılında 108.0/100.000'lik bir oranla, son on yılda istikrarlı bir azalma görülmüştür (Howlander ve ark., 2016).



Şekil 1.3. 2020 yılındaki yeni kanser vakalarının veri grafiği  
(<https://gco.iarc.fr/today/online-analysis>)

## **1.4. Etiyoloji**

Prostat kanserinin birincil risk faktörleri obezite, ilerleyen yaş ve aile öyküsüdür. Bunların yanı sıra etnik köken, beslenme ve epigenetik faktörler de prostat kanserinin gelişmesinde etkilidir (Calle ve ark.,2003; Crawford, 2003; Kumar, Barqavi, & Crawford, 2005).

### **1.4.1. Obezite**

Epidemiyolojik çalışmalar, obezitenin ilerlemiş prostat kanseriyle ilişkili olduğunu ileri sürmektedir (Fujita ve ark.,2019). Obez erkeklerin prostat kanserinden normal kilolu erkeklere göre %34 daha fazla ölüm oranına sahip olduğu bulunmuştur (Calle ve ark.,2003). Obez ve fazla kilolu erkeklerde prostata özgü antijen (PSA) düzeylerinin düşük olması, ortaya çıkan PK'ni maskeleyebileceğinden tanı konulmasını da zorlaştırabilir (Ribeiro, Lopes, & Medeiros, 2006). Vücut kitle indeksi ile prostat kanseri arasındaki ilişki için güçlü bir destek bulunmadığı gösterilse de (Calle, 2000), bazı veriler vücut kitle indeksi yüksek olan hastalarda prostat kanseri riskinde artış olduğunu göstermektedir (Rodriguez ve ark., 2001; Giovannucci ve ark.,1997). Andersson vd. BMI ile prostat kanseri arasında pozitif bir ilişki bulurken (Andersson ve ark., 1997), diğer iki araştırma grubunda vücut kütlesi ile prostat kanseri riski arasında bir ilişki olmadığını bildirmiştir (Schuurman ve ark., 2000), (Lund, Vatten, 1999). 2006 yılında 22 çalışmayı kapsayan bir meta-analize göre, obezitenin prostat kanseri riskinde artış ile bir ilişkisi olduğu gösterilmiştir. (Macinnis, English, 2006).

### **1.4.2. Yaş**

Prostat kanseri 45 yaşın altındaki erkeklerde nadiren görülüyorken, ilerleyen yaşla daha yaygın hale gelir. Tanı anında ortalama yaş 70'tir (Hankey ve ark., 1999).

### **1.4.3. Aile Öyküsü**

Yapılan bazı araştırmalarda, prostat kanserinin %10 oranında kalıtsal geçişli olduğu gösterilmiştir (Bratt, 2002; Konaç ve Sözen, 2014). %90'lık dilimi ise çevre ve yaşlılık etkisiyle meydana gelen sporadik prostat kanseri oluşturur. Prostat kanserinin herediter (kalıtsal) olan formu, sporadik forma göre yaklaşık olarak 7 yıl daha erkenden meydana gelmektedir (Konaç ve Sözen, 2014).

Birinci dereceden akrabası (baba veya erkek kardeş) prostat kanseri olan erkeklerde prostat kanseri gelişme riski iki kat daha fazladır ve etkilenen iki birinci derece akrabası olanlar, aile öyküsü olmayan erkeklere kıyasla beş kat daha fazla risk taşır (Steinberg ve ark., 1990; Zeegers ve ark., 2003).

#### **1.4.4.Etnik Köken**

Prostat kanseri, dünyanın birçok yerinde erkeklerde önde gelen kanserdir, ancak insidans ve ölüm oranları popülasyona göre önemli ölçüde farklılık gösterir. Afrika kökenli erkeklerin daha yüksek bir PK insidansı gösterdiği ve genellikle daha agresif bir hastalık seyrine sahip olduğu kabul edilmektedir (Tan ve ark., 2016). Veritabanındaki 17 coğrafi kayıta 229 771 erkeğin katıldığı bir çalışmada, siyah erkeklerin beyaz erkeklere kıyasla genel olarak daha yüksek ölüm riski olduğu gözlenmiştir (Fletcher ve ark., 2020). Mevcut kanıtlar bunu hem tümör biyolojisine hem de ırksal farklılıklara bağlamaktadır (Friedlander ve ark., 2018; Krimphove ve ark.,2019). Genomik çeşitliliğin altında yatan belirleyicilerden ve genetik ve çevresel faktörler arasındaki mekanizmalardan çoğu bilinmemektedir, ancak Afrika kökenli erkeklerin daha yüksek bir PK insidansı gösterdiği ve genellikle daha agresif bir hastalık seyrine sahip olduğu kabul edilmektedir (Tan ve ark., 2016). Japon erkekler, batı dünyasındaki erkeklere kıyasla daha düşük PK riskine sahiptir (Malvezzi ve ark., 2018).

#### **1.4.5.Beslenme**

Beslenme kanser gelişiminde etkili olduğu bilinen çevresel faktörlerden biridir (Calle ve ark.,2003). Beslenmedeki yağ ve prostat kanseri ile ilgili tutarlı verilerine rağmen, besinin rolü belirsizliğini koruyor (Kolonel, 1996). Uzun zincirli omega-3 çoklu doymamış yağ asitleri alımı ile PK arasında bir ilişki bulunmamıştır (Alexander ve ark., 2015). Kızartılmış yiyeceklerin tüketimi ile PK riski arasında bir ilişki olabileceği bildirilmiştir (Lippi ve ark., 2015). Ayrıca kırmızı et veya işlenmiş et tüketimi ile PK arasında herhangi bir ilişki görülmemiştir (Bylsma ve ark., 2015). Meyve ve sebze tüketimine bakıldığında ise prostat kanserinde önleyiciliğinin çok az olduğu görülmüştür. Bir çalışmada fazla et tüketiminin, yüksek riskle ilişkili olduğu bildirilmektedir (National Cancer Institute,2016). Bir 2020 sistematik incelemesi, süt tüketimi ve prostat kanseri ile ilgili sonuçların yetersiz olduğunu buldu, ancak daha yüksek riskli bireylerin ise sütü azaltabileceğini veya tamamen tüketimi durdurmasının doğru olacağını belirtmiştir (Sargsyan, Dubasi, 2020).

Selenyum veya E vitamini takviyelerinin PK'ni önlemede yararlı bir etkisine rastlanmamıştır, kandaki düşük D vitamini seviyeleri ise prostat kanseri riskini artırabilir (Lippman ve ark., 2009). Yapılan bir çalışmada fazla alkol alımının, yüksek PK riski ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir (Dickerman ve ark. 2016). Uzun zincirli omega-3 çoklu doymamış yağ asitleri alımı ile PK arasında bir ilişki bulunmamıştır (Alexander ve ark., 2015). Kızartılmış yiyeceklerin tüketimi ile PK riski arasında bir ilişki olabileceği söylenmektedir (Lippi ve ark., 2015). Ayrıca kırmızı et veya işlenmiş et tüketimi ile PK arasında herhangi bir ilişki görülmemiştir (Bylsma ve ark., 2015).

#### **1.4.6. Sigara**

Tütün dumanında bulunan karsinogenler yoluyla tümör oluşumu, epigenetik ve nikotin kaynaklı etkilerle birlikte çeşitli mekanizmalar vardır (Pernar, Ebot, Wilson & Mucci, 2018). Prostat kanseri dâhil kanserlerde sigaranın rolü, halk sağlığı açısından önemli bir rol oynamaktadır. ABD Surgeon General tarafından hazırlanan en son 2014 raporu, sigaranın prostat kanserinden ölüm riskini ve ileri evre kanser riskini artırdığına dair kanıtlar olduğu sonucuna varmıştır (Pernar, Ebot, Wilson, & Mucci, 2018). Hiç sigara içmeyenlerle karşılaştırıldığında, sigara içenler prostat kanseri mortalitesi açısından %60 daha yüksek riske sahiptir (Kenfield, Stampfer, Chan & Giovannucci, 2011). Epidemiyolojik kanıtlardan bazılarında da sigaranın prostat kanseri üzerindeki etkisinin maruziyet süresine bağlı olarak değişebileceği gösterilmektedir. Tütün dumanında bulunan karsinogenler yoluyla tümör oluşumu, epigenetik ve nikotin kaynaklı etkilerle birlikte çeşitli mekanizmalar vardır (Pernar, Ebot, Wilson & Mucci, 2018).

#### **1.4.7.İlaç maruziyeti**

Prostat kanseri ile ilaçlar, tıbbi prosedürler ve tıbbi durumlar arasında bazı bağlantılar kurulmuştur. Uzun süreli düzenli non-steroidal antiinflamatuvar ilaçların (NSAID) kullanımının, orta derecede azalmış prostat kanseri riski ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Jacobs ve ark.,2005). Statinlerin prostat kanseri riskini özellikle de agresif prostat kanseri riskini azalttığı bulunmuştur (Shannon ve ark.,2005).

#### **1.4.8. Enfeksiyon**

Prostat bezinin iltihabı veya enfeksiyonu olan prostatit (enfeksiyon veya iltihap) prostat kanseri riskini artırabilir. Özellikle cinsel yolla bulaşan enfeksiyonlar Chlamydia, gonore

veya sifiliz ile enfeksiyon riski artırıyor gibi görünmektedir (Dennis ve ark.,2002;Caini ve ark.,2014). Papilloma virüsünün de potansiyel bir rolü olduğu öne sürülmüştür, ancak 2015 itibariyle kanıtlar sonuçsuz kalmışken (Heidegger,,Borena & Pichler, 2015),2018 itibariyle prostat kanseri için artan risk tartışılmıştır (Cai, Di Vico & Durante,2018).

#### **1.4.9. Genetik ve Epigenetik Faktörler**

Prostat kanseri hücreleri tipik olarak, gen mutasyonları, gen delesyonları, gen amplifikasyonları, kromozomal yeniden düzenlemeler ve DNA metilasyonundaki değişiklikler dâhil olmak üzere çok sayıda somatik genom değişikliği içerir ve prostat kanserlerinde somatik genomda mevcut olan değişiklikler, genellikle yıllar boyunca birikim gösterir. Bu genom değişikliklerinin edinilmesinde yaşam tarzının da etkisi olabilir (Nelson, DeMarzo & Isaacs, 2003). Prostat kanserinin ırk ve aile öyküsü ile olan ilişkisi spesifik gen varyantlarının da prostat kanseri riskini artırabileceğini göstermektedir. İkiz çalışmaları prostat kanseri riskinin %40'ının kalıtsal faktörlerle açıklanabileceğini göstermiştir (Zeegers ve ark., 2003).

Prostat kanserinin oluşumu ve ilerlemesinde birçok genin (tümör supresör genler ve onkogenler) rol oynadığı gösterilmiştir. Prostat karsinogenezinin erken dönemlerinde kanser baskılayıcı genlerin kaybı, 8p, 10q, 13q ve 16q kromozomlarında lokalize edilmiştir. Primer prostat kanserindeki P53 mutasyonları nispeten düşüktür. Rol oynadığı düşünülen diğer tümör baskılayıcı genler arasında PTEN ve KAI1 bulunur. Prostat kanseri olan erkeklerin yüzde 70 kadarı tanıda PTEN geninin bir kopyasını kaybeder (Scientists Discover,2005).

Genom çapında 2008 yılında yapılmış iki çalışmada, tek nükleotid polimorfizmleri (SNP'ler) prostat kanserine bağlanmıştır (Eeles, Kote-Jarai & Giles, 2008; Thomas, Jacobs & Yeager, 2008). Bu çalışmalarda birkaç ilgili SNP'yi tanımlamıştır. Örneğin, SNP rs10993994'te TT alel çiftine sahip bireylerin, CC alel çiftine sahip olanlara göre 1,6 kat daha yüksek riskte olduğu bildirilmiştir. GSTP1 ile MGMT genlerinin hipermetilasyonu ve DNA hasarı onarımında yer alan genler başta olmak üzere birçok genin çoğu prostatın premalign lezyonlarında meydana gelir ve bu da etkilenen hücrelerde genetik değişikliklere neden olur (Li,Carrol &Dahiya, 2007).

Prostat kanseri risk genlerinde en kritik bölge, 8q24 bölgesidir (Ishak, Giri, (2011). Prostat kanserinden sorumlu olan tümör supressör genleri, p53, PTEN, CDKN1B (p27), MX11, NKX3.1, RB, GSTP1, KLF6, CDKN2A, ATFB1 genleriyken (Nakagawa,2013), onkogenler

ise c-MYC, c-ErB2 (Her-2 neu), BCL-2, PSCA, ERG, ETV1, AMACR, PIM1, Hepsin, AR, CYP17, SRD5A2, CYP3A4, VDR, STAT5 (Vecchione ve ark., 2007) genleridir. Bu genler aracılığıyla tümör gidişatının öncesinden tahmin edilmesi ve tedavi şekillerinin belirlenmesi şansı vardır (Slaman,deKernion & Verma,1984).

**Tablo 1.1.** Prostat kanserindeki ilişkili genler ve kromozomların gösterimi

GENLER	LOKALİZASYON
Androjen reseptörü	Xq11
TMPRSS2-ERG	Kromozom 21
c-myc	8q24
N-Myc	2p24
TP53	17p31
eIF3-p40	8q23
FOXA1	6q21

Epigenetik, DNA nükleotidinde bir değişiklik olmadan, genin işlevlerinde kalıtsal değişimlerin, mayoz ve mitoz bölünmeler ile aktarılması durumudur (Erol, Elyas & Ünal, 2010). Temeldeki DNA dizisini değiştirmeden genlerin nasıl ifade edildiğini değiştiren epigenetik değişiklikler, DNA metilasyonu ve histon modifikasyonlarıdır.

Bunların yanında kodlanmayan RNA'lar, kromatin yeniden düzenlenmesi mekanizmaları da epigenetik değişikliklerde rol oynamaktadır. Bu epigenetik değişiklikler, hücrenin yaşamı boyunca hücre bölünmeleri yoluyla sürebilir ve organizmanın temelindeki DNA sekansındaki değişiklikleri içermese bile birden fazla nesil boyunca sürebilir (Bird, 2002).

**Tablo 1.2.** Prostat kanserinde işlevlerine ve yollarına göre sıklıkla metillenene genler

Yolak	Gen	Tanımlama	Sıklık, %
<b>Hormonal cevap</b>			
	<i>AR</i>	Androgen receptor	15–39
	<i>ESR1</i>	Estrogen receptor 1	19–95
	<i>ESR2</i>	Estrogen receptor 2	83–92
	<i>RAR<math>\beta</math>2</i>	Retinoic acid receptor $\beta$ 2	68–95
	<i>RARRES1</i>	Retinoic acid receptor responder 1 ( <i>TIG1</i> )	55–96
<b>Hücre döngüsü kontrolü</b>			
	<i>CCND2</i>	Cyclin D2	32–99
	<i>CDKN2A</i>	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A ( <i>p16</i> )	3–77
	<i>RPRM</i>	Reprimo	–
	<i>SFN</i>	Stratifin (14-3-3 sigma)	99
<b>Sinyal iletimi</b>			
	<i>DKK3</i>	Dickkopf 3	68
	<i>EDNRB</i>	Endothelin receptor type B	15–100
	<i>RASSF1A</i>	Ras association domain family protein 1 isoform A	53–99
	<i>RUNX3</i>	Runt-related transcription factor 3	27–44
	<i>SFRP1</i>	Secreted frizzled-related protein 1	83
<b>Tümör invazyonu</b>			
	<i>APC</i>	Familial adenomatous polyposis	27–100
	<i>CAV 1</i>	Caveolin 1	90
	<i>CDH1</i>	E-cadherin	27–69
	<i>CDH13</i>	Cadherin 13	45–54
	<i>CD44</i>	Cluster differentiation antigen 44	19–72
	<i>LAMA 3</i>	$\alpha$ -3 laminin	44
	<i>LAM C2</i>	$\gamma$ -3 laminin	41



	<i>TIMP3</i>	TIMP metalloproteinase inhibitor 3	0–97
<b>DNA hasarı tamiri</b>			
	<i>GSTM1</i>	Glutathione S-transferase M1	58
	<i>GSTP1</i>	Glutathione S-transferase P1	79–95
	<i>GPX3</i>	Glutathione peroxidase 3	93
	<i>MGMT</i>	O-6-methylguanine DNA methyltransferase	0–76
<b>Apoptosis</b>			
	<i>ASC</i>	Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD	37–78
	<i>BCL2</i>	B cell lymphoma 2	52–87
	<i>DAPK</i>	Death-associated kinase	0–36
<b>Diğer</b>			
	<i>MDR1</i>	Multidrug resistance receptor 1	51–100
	<i>PTGS2</i>	Prostaglandin endoperoxidase synthase 2	18–88
	<i>HIC</i>	Hypermethylated in cancer	99–100

### 1.5. Mortalite

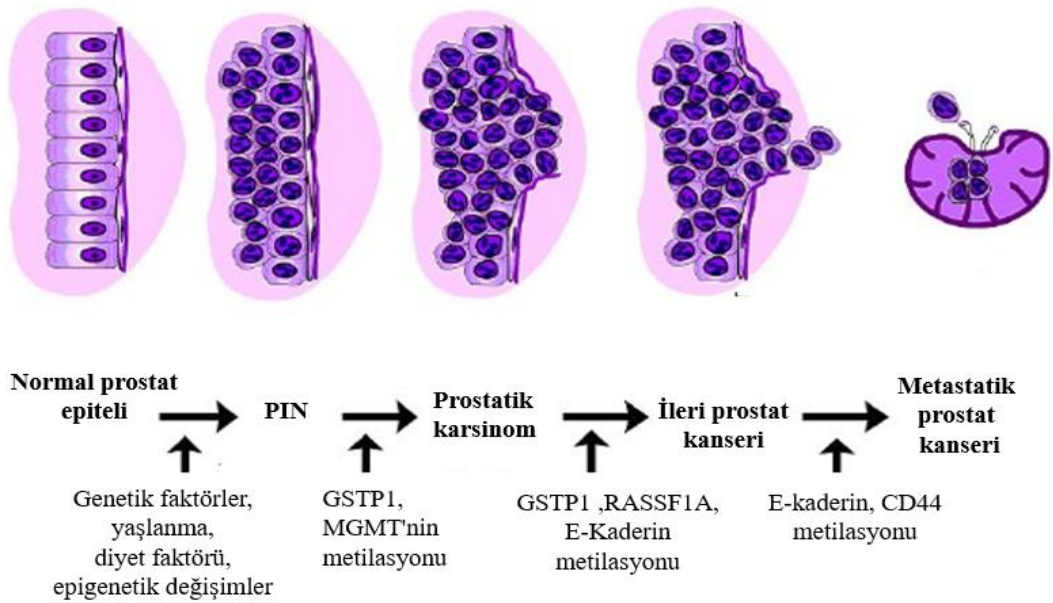
Mevcut kanıtlar bunu hem tümör biyolojisine hem de bakımlarına göre ırksal farklılıklara bağlamaktadır (Friedlander ve ark., 2018; Krimphove ve ark.,2019).

### 1.6. Prostat Kanseri Patogenezi

Prostat adenokarsinomu, neoplazi olarak başlar ve lokalize prostat adenokarsinomuna ilerler, sonra bazal hücre tabakası bozuldukça ve kanser hücreleri bazal laminadan istila edildikçe lokal olarak invazif karsinom haline gelmiş olur (Shen, M. M., & Abate-Shen, C.,2010). Lokal olarak ilerlemiş olan prostat kanseri, öncelikle lenf düğümlerine ve ardından kemiklere, karaciğer ve akciğerler dâhil olmak üzere uzak organlara metastaz yapmaktadır. Prostat kanserindeki en yaygın metastaz bölgesi ise kemiktir (Wang, G. Ve ark.,2018). Prostat kanseri kemik metastazları, çoğunlukla şiddetli ağrıya, hiperkalsemiye ve sık meydana gelen kırıklara neden olan karışık osteolitik özelliklere sahip osteoplastik lezyonlar olarak ortaya çıkar (Wang, G. Ve ark.,2018).

Prostat bezinin adenokarsinomun en yaygın olduğu bölgesi periferik bölgedir. Başlangıçta, kanser hücrelerinin küçük kümeleri, normal prostat bezlerinde kalır, bu durum karsinom in situ veya prostatik intraepitelyal neoplazi (PIN) olarak bilinir. PIN'in kanser öncüsü olduğu kanıtlanmasa da, kanserle yakından ilişkilidir. Zamanla bu hücreler çoğalır ve bir tümör oluşturan çevreleyen prostat dokusuna (stroma) yayılır. Sonunda, tümör, seminal veziküller veya rektum gibi yakın organları istila edecek kadar büyüyebilir ve genelde kemiklere ve lenf düğümlerine metastaz yapar ve lokal ilerlemeden sonra rektumu, mesaneyi ve alt üreterleri istila edebilir (Nelson, DeMarzo & Issaacs, 2003).

Prostata özgü membran antijeni (PSMA), folat seviyelerini artırarak kanser gelişimini uyarır, kanser hücrelerinin hayatta kalmasına ve büyümesine yardımcı olur (Yao, Berkman & Choi, 2010). RUNX2, kanser hücrelerinin apoptoza girmesini önleyen ve böylece kanser gelişimine katkıda bulunan bir transkripsiyon faktörüdür (Leav, Plescia & Goel, 2010). Makrofaj inhibitör sitokin-1 (MIC-1), kanser hücresi büyümesine ve hayatta kalmasına yol açan fokal adezyon kinaz (FAK) sinyal yolunu uyarır (Senapati, Rachagai & Chaudhary, 2010).



**Şekil 1.4.** Prostat kanserinin başlaması, ilerlemesi ve metastazının görsel olarak anlatımı (Nelson, DeMarzo & Issaacs, 2003).

## 1.7. Prostat kanseri semptomları

Prostat kanseri genellikle uzun süre belirti vermeden ilerlemektedir ve belirtiler hastalar ileri yaşlara geldiğinde ortaya çıkmaktadır. Eğer bir semptom varsa, hastalıkta olası bir ilerleme söz konusu olabilir. İdrar yapma esnasında yanma veya ağrı hissetme, hiç idrara çıkamama, kesik kesik idrar yapma, idrarda veya menide kan görülmesi yaygın semptomlar arasındadır, bunun yanında 80 yaşın yaklaşık yarısında mesane sıkışmasına bağlı idrar sıklığı gibi semptomlar görülür (Talcott ve ark., 2003; Langan, 2019).

Metastatik prostat kanseri ek semptomlara neden olabilir. En yaygın semptom, genellikle omurlarda (omurga kemikleri), leğen kemiğinde veya kaburgalarda görülen kemik ağrısıdır. Omurgadaki prostat kanseri, omuriliğe baskı yaparak karıncalanma, bacak güçsüzlüğü ve idrar ve dışkı inkontinansına neden olabilir (Van der, Vis & Roobol, 2005).

En iyi evreleme yöntemi ise cerrahi olarak lenf nodlarının çıkarılmasıdır. Avrupa Üroloji Kılavuzlarına göre; PSA, biyopsi Gleason skoru, pozitif kor yüzdesi ve klinik evrelerden oluşan nomogramlarla birlikte, lenf nodu metastaz riski %5' in üzerinde olan hastalara pelvik lenfadenektomi yapılması uygun bulunur (Mottet ve ark., 2017).

## 1.8. Prostat Spesifik Antijeni (PSA)

Prostat spesifik antijeni (PSA), prostattan salgılandığında, belli bir süre sonra kişinin kan dolaşımına karışabilen bir protein olup, prostat kanserin evresinin belirlenmesinde önemli bir belirleyicidir ve referans aralığının 4 ng/ml'nin altında olması kabul edilmiştir. Ancak bazen bu durum yaşa göre değişiklik gösterebilir (Baillargeon ve ark., 2005; Kosova, Arı, 2011). Yapılan bir çalışmada, prostat spesifik antijen (PSA) konsantrasyonları obezlerde, obez olmayan erkeklere göre daha düşük olduğu saptanmıştır (Mohler, Armstrong, Bahnson & D'Amico, 2016). Obez ve fazla kilolu erkeklerde prostata özgü antijen (PSA) düzeylerinin düşük olması, ortaya çıkan PK'yı maskeleyebileceğinden tanı konulmasını da zorlaştırabilir. (Ribeiro, Lopes, & Medeiros, 2006).

## 1.9. Prostat Kanserinin Teşhisi ve Evrenmesi

Donald Gleason (Gleason, Mellinger 1974) tarafından prostat adenokarsinomunun histolojik paternlerine dayalı olarak tanımlanan Gleason derecelendirme sistemi yıllar içinde düzenlenerek, prostat kanserinin yayılımını tanımlayan en yaygın kullanılan derecelendirme sistemi olmuştur. (Epstein ve ark.2005, 2016). Pekçok kanser türünde erken tanının konma imkânı rutin taramalar ile mümkündür ve erken tanı tedavi ihtimalini artırabilen bir faktördür. Bu taramalar özellikle kanser riski yüksek kişilere düzenli olarak yapılmalıdır (Özdoğan,2020).

Prostat kanserinde kullanılan tarama testleri:

Prostat spesifik antijen (PSA) olarak bilinen protein seviyesini ölçen kan testi,

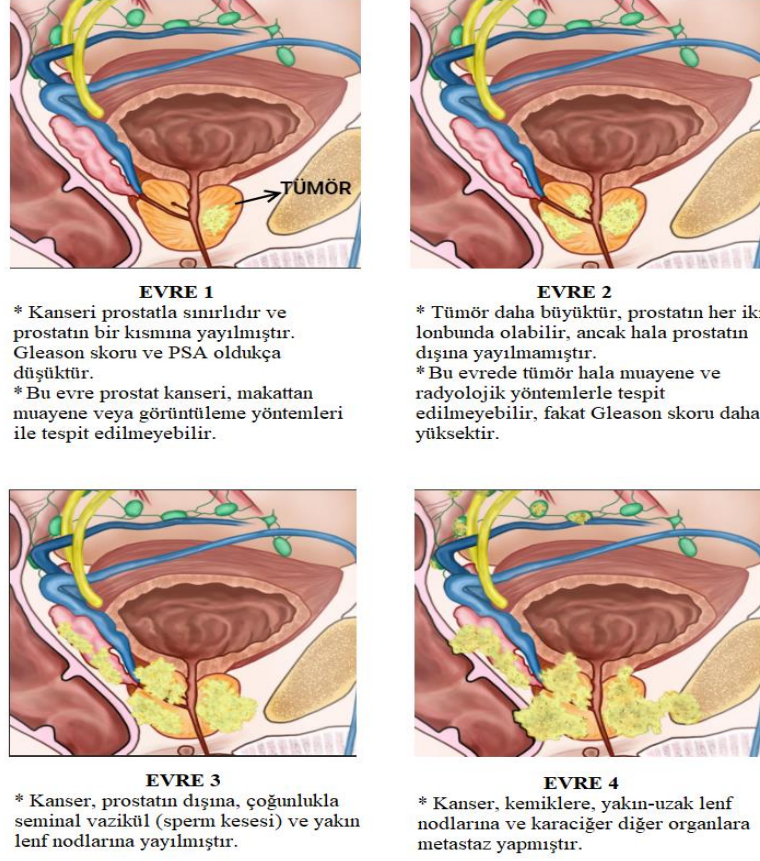
Dijital-rektal (parmakla makattan) muayene,

Biyopsi ve/veya

Transrektal ultrasondan oluşmaktadır.

Yapılan muayeneler ve biyopsi sonucunda kanserin varlığı tespit edildiğinde bundan sonraki aşama hastalığın yayılımının belirlenmesidir.

Örnek iğne biyopsisi ile alındıktan sonra patoloğlar tarafından Gleason Puan Sistemine (Gleason Skoru) göre sınıflandırma yapılır. Bu sınıflandırmada 2 ile 10 arasında bir puanlama yapılır ve buradaki değerlendirme kanserin ne kadar agresif olduğu hakkında bilgi verir. Yüksek Gleason puanı, daha agresif, çok daha hızlı büyüme ve yayılma potansiyeli taşıyan kanserin göstergesidir. Prostat kanseri ile ilgili tüm yeni tedavi bilgileri, evrelerine göre sınıflandırılmıştır (Özdoğan,2020).Prostat kanserinin evreleri, diğer kanser türlerinde olduğu gibi 4 evrede adlandırılır (Şekil 1.5).



Şekil 1.5. Prostat kanserinin evreleri (Özdoğan,2020)

### 1.10. Prostat Kanserinin Tedavisi

Prostat kanserinde hastalığın durumuna ve ilerleyişine göre farklı tedavi yöntemleri kullanılır. Prostat kanserinde uygun tedavinin belirlenmesi ve hastalığın seyrinin takibinde hastalığın risk grubun belirlenmesi önemlidir. Bunun için kanserin evresi, agresifliği veya PSA değerleri baz alınmaktadır.

Cerrahi girişim ile tedavi yönteminin, kemoterapi ve radyoterapiye göre daha az yan etkisi vardır. Radyoterapi ile tedavi yapılacak ise, kanserin yayılım göstermediği durumlarda uygulanmaktadır. Günümüzde üç boyutlu konformal radyoterapi (3BKRT), yoğunluk ayarlı radyoterapi (IMRT), görüntü güdümlü radyoterapi (IGRT) ve stereotaktik vücut radyoterapisi (SBRT) gibi modern radyoterapi teknikleri kullanılarak kanserin daha etkili bir şekilde kontrolü yapılabilir (Özkök, 2011). Tedavi yöntemlerden bir diğeri ise hormonal tedavidir. Hormon tedavisinde, prostat kanserinin ve prostat dokusunun gelişimini destekleyen steroid hormonlar etkisiz hale getirilir. Böylelikle, kanser hücrelerinin

büyümesinde rol oynayan androjen sinyal yolağı da baskılanır (Heidenreich ve ark., 2011). Hormonal tedavilere, kanserin derecesine göre başlanır. Hormonal tedavilerin etkisiyle hastalar, birkaç yıl içinde hormon tedavilerine direnç göstermeye başlayabilirler dolayısıyla kanserli dokularda tekrar büyüme gözlenir. Hormon tedavilerinde kullanılan ilaçlardan bazıları testosteron üretilmesini uyaran hormon olan luteinleştirici hormon (LH) aktivitesini baskılar. LH üretiminin baskılanması, testosteronun üretimini durdurur (Peter, Stephan, 2012). Bir diğer tedavi yöntemi olarak kemoterapik yöntemde, anti-kanserojenik ilaçlar, hedef dokulara etki ederler. Kemoterapik yöntemler, hastalığın geç dönemlerinde uygulanmaktadır. Yüksek riskli hastalar arasında prostatektomi ile birlikte harici ışın radyoterapisi ya da bu yöntemler tek başına ayrı ayrı uygulanırlar. Sonrasında ise androjen yoksunluğu terapisi (AYT) bakımı gelir. AYT, gelişmiş bir PKtedavisidir. AYT, dolaşımdaki prostat kanser hücrelerinin büyümesi için gerekli olan testosteronun seviyesini düşürerek, AR sinyalini bloke ederek çalışır ve erken evrede olan tümörün büyümesini durdurmada etkisi vardır. (Livermore, Munkley & Elliott, 2016). Ancak AYT, özellikle kalp hastalığı geçmişi olanlarda kardiyolojik komplikasyon yaratabilir (www.prostatecancerfree.org, 1.12.2020). PK için cerrahi olmayan tedaviler arasında androjen yoksunluğu tedavisi (AYT), radyasyon tedavisi (RT), ablatif tedaviler, kemoterapi ve immünoterapiler yer alır. AYT genellikle, cerrahiye uygun olmayan yüksek riskli yerel veya sistemik olarak ilerlemiş hastalık için ayrılmıştır.

Radyasyon tedavisi, düşük-orta riskli hastalıklar için ve cerrahi olarak ilerleyen hastalığın kontrolü için kullanılır (Munkley ve ark., 2016). Kanser ilerleme ve yayılması durumlarında, enzalutamid ve sitotoksik bir ajan olan dosetaksel ile birlikte kullanılmaktadır. (Barsouk, ve ark.,2020). Prostat kanserlerinin çoğu androjene bağımlıdır, yani androjen ablasyon tedavisine yanıt verirler. Bununla birlikte, bu tümörler sonunda androjenden bağımsız hale gelir ve androjen ablasyonuna rağmen büyürler. Prostat kanseri prostatta lokalize olduğunda, tercih edilen tedavi prostatektomi veya radyasyondur. Prostat kanseri metastatik ise, tedavi edilmesi oldukça güçtür (Debes, Tindall, 2004). Yüksek riskli hastalar arasında prostatektomi (robotik tercih edilir) ve / veya harici ışın radyoterapisi en yaygın müdahalelerdir, ardından AYT bakımı izler. Androjen yoksunluğu tedavisinde ilerlemeyi takiben (kastrasyon direnci olarak bilinir), enzalutamid gibi yeni nesil endokrin tedavileri, genellikle sitotoksik ajan dosetaksel ile kombinasyon halinde kullanılır (Barsouk ve ark., 2020). 2004 yılına kadar, metastatik hastalık için androjen yoksunluğu tedavisindeki ilerleme, ikincil hormonal manipülasyon eklenerek tedavi edildi; son on yılda, kastrasyona

dirençli prostat kanserinin tedavisi için altı sistemik ajan onaylanmıştır. Vakaların çoğu ölüme yönelik herhangi bir tehdit olmaksızın sessiz bir seyir izlese de, birçok hasta orta veya yüksek riskli lokalize, lokal olarak ilerlemiş veya metastatik kanser ile başvurur ve tedaviye rağmen hastalığa yenik düşer (Teo, Rathkopf & Kantoff, 2019). Hormonal ve cerrahi girişimlerdeki hedef, sinyal yollarının baskılanmasıdır. Bu durum metastaza girmemiş prostat kanserlerinde kısa dönemlerde etkilidir ancak metastazı başlayan prostat tümör hücrelerinde bu girişim etkisizdir (Heather, Daniel & Evan, 2012). Kabazitaksel, dosetaksele dirençli kanserlerde kanıtlanmış aktiviteye sahip tübülün bağlayıcı bir ilaçtır. Faz III TROPIC çalışmasında, kabazitakselin yanında, prednizon da alan hastalar, mitoksantron ile birlikte prednizon alanlara kıyasla progresyonun daha da azaldığı görülmüştür. Enzalutamid, kemoterapiden sonra hastalığın ilerlediği metastatik kastrasyona dirençli prostat kanserli erkeklerde sağkalımı uzatan oral bir androjen reseptör inhibitörüdür. Enzalutamidin, metastatik prostat kanseri olan erkeklerde radyografik progresyon ve ölüm riskini önemli ölçüde azalttığı ayrıca kemoterapinin başlamasını geciktirdiği görülmüştür (Beer ve ark., 2014). AYT ise prostat kanserinde fazla uygulanan bir tedavidir.

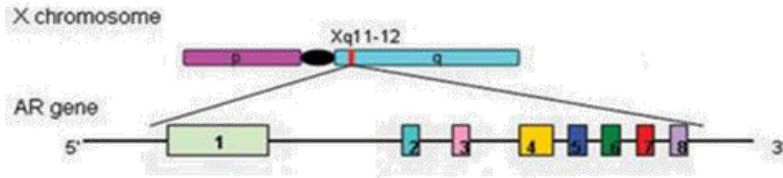
### **1.11. PK tedavilerinin yan etkileri**

Kemoterapik uygulamaların uzun dönem sonucu yan etkileri olarak, lösemi ve kalp hastalıkları gibi patolojilere yol açmaktadır (Bryan ve Trailokya, 2011; Heather ve ark., 2012). Hormonal tedavilerde hastalarda birkaç yıl sonrasında hormon tedavilerinde direnç kazanıldığı ve kanserli dokunun hormon bağımlılığını kaybederek, agresifleştiği ve tekrar büyümeye görülmüştür (Daniel ve ark., 2003).

### **1.12. Androjen Reseptörü (AR)**

Androjenler, PCA hücre canlılığı, poliferasyonu ve istilası için gerekli bir transkripsiyon aktörü olan androjen reseptörü (AR) aracılığı ile PCA hücre büyümesini yönlendirir ve bir dizi sinyal yolağında önemli role sahiptir (Livermore ve ark., 2016). Normal prostat ve prostat kanserinin gelişimi androjen reseptörüne bağlıdır. Androjen reseptör (AR) geni, X kromozu üzerinde, Xq11-12 lokasyonunda bulunur ve 8 ekson içerir. Androjen reseptörü steroid yapıda olup, P53, Cyclin, RAF, src gibi birtakım proteinlerle etkileşim halindedir. Buradaki proteinlerin bazıları androjen bağımlı yolakta fonksiyonelken, bazıları ise androjen bağımsız olan yolaklarda fonksiyoneldir (Kluger, Roy, & Chao, 2020). Androjen reseptörü, prostat hücrelerinin sitoplazmasındaki ısı şok proteinlerine bağlıdır. Testiküler androjen

testosteronundan oluşan aktif androjen dihidrotestosteron, androjen reseptörüne bağlanır, böylece onu ısı şok proteinlerinden ayırır ve çekirdeğe yer değiştirmesine izin vererek, çekirdekte, androjen reseptörü dimerleşir, DNA'daki androjen yanıt elemanlarına bağlanır ve hücrenin büyümesiyle ölmesini engelleyen genlerin transkripsiyonunu aktive eder. (Dabes, Tindall, 2004).



**Şekil 1.6.** Androjen reseptörü geninin yapısı (Galani ve ark., 2008).

Androjen bağımlı olan prostat kanseri hücreleri, büyüme ve yaşama için androjen reseptörüne bağlıdır. Androjen reseptörü inaktif olduğunda, prostat hücrelerinin sitoplazmasındaki ısı şoku proteinlerine bağlanır. Androjen dihidrotestosteron, androjen reseptörüne bağlanarak onu ısı şoku proteinlerinden ayırır. Dihidrotestosterona bağlı androjen reseptörü, çekirdeğe yer değiştirir, dimerize olur ve androjen yanıt elemanlarına bağlanır, böylece hücre büyümesine dâhil olan genleri aktive eder. Androjenden bağımsız olan prostat kanseri hücreleri, nöroendokrin benzeri davranış geliştirebilir. Nöroendokrin hücreler, komşu hücrelerin büyümesini indükleyen nöropeptidler salgılar ve bu nedenle prostat kanseri, terapötik müdahalelerde hayatta kalabilir (Hezarkhani, 2012).

### **1.13. Prostat kanseri, FTO ve m<sup>6</sup>A**

FTO, 505 amino asitlik protein kodlayan ve beyinde en yüksek ekspresyon seviyesine ulaşan bir gendir (Frayling ve ark., 2007; Robbens ve ark., 2008).FTO, 16q12.2 pozisyonunda yer alan ayrıca Fe (II) ve 2-oksoglutarat bağımlı oksijenaz süper ailesinin bir üyesidir.DNA onarımı, translasyon sonrası modifikasyon ve gen modifikasyonundaki 2-oksoglutarat bağımlı nükleik asit demetilazını gerçekleştirir (Gulati ve ark., 2014). Ökaryotik hücrelerde RNA'da en sık görülen modifikasyon olan N6-metiladenozinin(m6A) özellikle kanser oluşumunda kritik bir rol oynadığını gösterilmektedir (Chen vd 2019).Bir m6A demetilaz enzimi olan FTO öncelikli olarak 3' çevrilmemiş bölgeleri aracılığıyla aşağı yönlü



hedeflerinin m6A seviyelerini düzenler (Jia vd., 2008, 2011). FTO'nun m6A'yı kontrol eden bir RNA demetilazı olduğunun anlaşılması üzerine, FTO' nun epigenetik düzenlemedeki rolleri biyolojik işlevini ortaya çıkarmıştır. FTO'nun m6A lokalizasyonuna bağlı olarak RNA modifikasyonlarında rolü vardır.FTO genindeki polimorfizmler (SNP'ler) rs9930506 ve rs9939609 hem obezite hem de PK ile ilişkilendirilmiştir. (Salgado-Montilla, Rodríguez-Cabán, Sánchez-García, Sánchez-Ortiz, Irizarry-Ramírez, 2017). Ancak prostat kanseri ve FTO genindeki SNP'ler arasında bir ilişki olmadığını gösteren çalışmalar da vardır (Meyer vd., 2010, Lewis vd., 2010; Zhao vd., 2016). Bu farklı sonuçlar kanserin türü, evresi ve çalışmanın yapıldığı etnik grupların farklılığından ve farklı FTO SNP'ler olmasından kaynaklanabilir. Obezitenin, prostat kanseri (PK) mortalitesi ve saldırganlığı ile ilişkilendirildiği çalışmalar mevcuttur. Prostat kanserinin patogenezi üzerinde çok sayıda başarılı çalışma yapılmış olsa da, prostat karsinogenezinin altında yatan moleküler mekanizmalar hala araştırılmaya devam etmektedir (Robinson vd., 2015).Bazı meta-analiz çalışmaları, FTO ile PK da dâhil olmak üzere belirli kanser türleri arasında bir ilişki bulmuştur. (Yang ve ark., 2012), (Yeo, 2014), (Tang ve ark., 2011).FTO genotipi, prostat dışı kanser kontrolleriyle karşılaştırıldığında yüksek dereceli veya ileri evre hastalığın varlığı ile ilişkili olmadığı görülmüştür (Risk Sarah ve ark., 2010).

Bazı epidemiyolojik çalışmalar FTO proteinin ilişki olduğu obezitenin, lokalize prostat kanserine karşı koruyucu olduğunu ancak ileri veya ölümcül prostat kanseri riskini artırdığını göstermiştir (Gong vd., 2006; Freedland vd., 2006; Rodriguez vd., 2007; Wright vd., 2007; Buschemeyer vd., 2007) ve prostat kanserinin artan mortalitesi ve agresifliğini obezite ile ilişkilendirmiştir (Bassett vd., 2012; Chamie vd., 2012; Allott vd., 2013).

FTO rs8050136 SNP'nin prostat kanseri ile ilişkisi bulunmazken (Meyer vd., 2010; Zhao vd., 2016) FTO rs9939609 SNP'nin prostat kanseri ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Lewis vd., 2010; Salgado-Montilla vd.,2017).Dolayısıyla FTO ekspresyon seviyesini etkileyen yöntemlerin (siRNA, shRNA gibi) veya FTO proteinini inhibe eden ajanların (meklofenamik asit gibi) kullanımı m6A seviyesinde değişikliklere sebep olarak kanserleşme mekanizmasında etkileri olabilir.Birçok omurgalı dokusunda eksprese edilen yağ kütlesi ve obezite ile ilişkili proteinin (FTO), DNA onarımı, yağ asidi metabolizması ve transkripsiyon sonrası modifikasyonlar gibi hücresel işlemlerde rol oynadığı gösterilmiştir (Sanchez ve Andrade, 2007).Genom çapında ilişki çalışmaları (GWAS), FTO genindeki polimorfizmlerin obezite ve artan vücut kitle indeksi ile yakından ilişkili olduğunu göstermiştir (Frayling vd., 2007; Dina C vd., 2007; Scuteri vd., 2007; Meyre vd., 2010).

Daha ileri çalışmalarla, FTO'nun sadece obezite ile ilişkili olmadığını, aynı zamanda alzheimer hastalığı ve çeşitli kanser türleri gibi nörolojik hastalıklarla da ilişkili olduğunu ortaya konmuştur (Keller vd., 2011; Reitz vd., 2012; Rivera vd.,2012). Son yıllarda, FTO'nun, mRNA üzerindeki N6-metiladenozin (m6A) demetilaz aktivitesi ile kanser arasındaki ilişkinin keşfi, FTO'nun Akut Miyeloid Lösemi (AML) ve rahim ağzı kanseri gibi bazı kanserlerde onkojenik bir role sahip olduğunu gösterdi.Sınırlı sayıda çalışmada, bir m6A demetilaz olarak FTO'nun kanser hücrelerinin büyümesini, kendi kendini yenilemesini ve metastazını desteklediği gösterilmiştir (Chen ve Du, 2019). Prostat kanserinin genetik ve / veya epigenetik bozukluklar tarafından tetiklendiği (Attard vd., 2016) ve prostat kanserinde DNA metilasyon kalıplarının kansere bağlı süreçlerde yer alan genleri etkilediği bilinmektedir (Aryee vd., 2013; Massie vd., 2017). DNA metilasyonuna benzer şekilde, RNA metilasyon durumundaki anormal değişiklikler de sıklıkla kanser hücresi büyümesi, gelişimi ve tümör başlangıcına yol açan onkoprotein ekspresyonunu artırır (Zhao vd., 2017; Deng vd., 2018). Bununla ilgili olarak, bir demetilaz olan ALKBH5'in daha yüksek ekspresyonu, pankreas kanseri (Yamato vd., 2012), küçük hücre dışı akciğer kanseri (KHDAK) (Tasaki vd., 2011) ve böbrek kanseri (Hotta vd. 2015) örneklerinde gözlenmiş ve daha kötü prognoz ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Ancak, m<sup>6</sup>A “yazıcıları” ve “silicileri” nin prostat kanserindeki rolü henüz aydınlatılmamıştır.

Literatürde m<sup>6</sup>A yazıcılarından METTL3'ün prostat kanserindeki rolü ile ilgili kapsamlı tek bir çalışma vardır. Bu çalışmada METTL3'ün prostat kanserindeki m<sup>6</sup>A metilaz aktivitesine bağlı olarak onkojenik bir rol oynadığı ve MYC'in yukarı yönlü regülasyonu yoluyla prostat kanserinin proliferasyonu ve progresyonuna katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Bu sonuçlara dayanarak METTL3-m<sup>6</sup>A-MYC ekseninin potansiyel bir prognostik biyobelirteç ve insan prostat kanserinde etkili bir terapötik strateji olabileceğini önermişlerdir (Yuan vd., 2020). Bu çalışma m<sup>6</sup>A “yazıcıları”ndan olan METTL3'ün prostat kanseri progresyonuna katkısına ışık tutmuştur, ancak m<sup>6</sup>A “silicileri” nin prostat kanserindeki rolü hala belirsizdir.

#### **1.14. Meklofenamik Asit**

Meklofenamik asit (MA, meklofenamat sodyum) eklem, kas ağrısı, artrit ve dismenore için kullanılan steroid olmayan antiinflamatuvar ilaçların (NSAİİ'ler) antranilik asit türevleri (veya fenamat) sınıfının üyesi olan bir ilaçtır ve prostaglandin oluşumunu engelleyen bir siklooksijenaz (COX) inhibitörüdür (National Institute of Diabetes and Digestive and

Kidney Diseases; 2012). NSAİİ'ler arasında meklofenamik asit en toksik olanlardan biridir (Singh, Ramey, Morfeld, & Fries, 1994). Çeşitli kanserlerde, özellikle prostat ve meme kanserinde Aldo-keto redüktaz 1C3 (AKR1C3)'ün aşırı eksprese edildiği ve ekspresyon seviyeleri ile hastalığın agresifliği arasında bir korelasyon olduğu gösterilmiştir (Guise, Abbattista & Singleton,2010). Fazla eksprese olan AKR1C3'ü inhibe ettiği bilinen non-steroidal antiinflamatuvar ilaçlar bu nedenle hem hormon bağımlı hem de hormon bağımsız kanserlerde kullanılmaktadır (Byrns, Penning, 2011). MA'nın siklooksijenaz-prostaglandin mekanizmasından bağımsız olarak ATP'ye duyarlı potasyum iyon kanallarını ve nöronal voltaj kapılı potasyum kanallarını bloke ettiği bulunmuştur (Lee ve Wang, 1999). Ayrıca, MA'nın, insan aortik düz kas hücrelerinin çoğalmasını ve göç etmesini engellediği de gösterilmiştir (Schober ve ark., 2002). Ayrıca MA'nın gap bağlantı antagonisti olarak yüksek inhibisyon potansiyeline sahip olduğu da bilinmektedir (Veruki ve Hartveit, 2009; Jin ve ark., 2013). Bu fonksiyonlarına ek olarak MA'nın N6-metiladenozin (m6A) kalıntılarını oksidatif olarak demetile eden FTO proteini inhibitörü olduğu da gösterilmiştir (Huang ve ark., 2015).

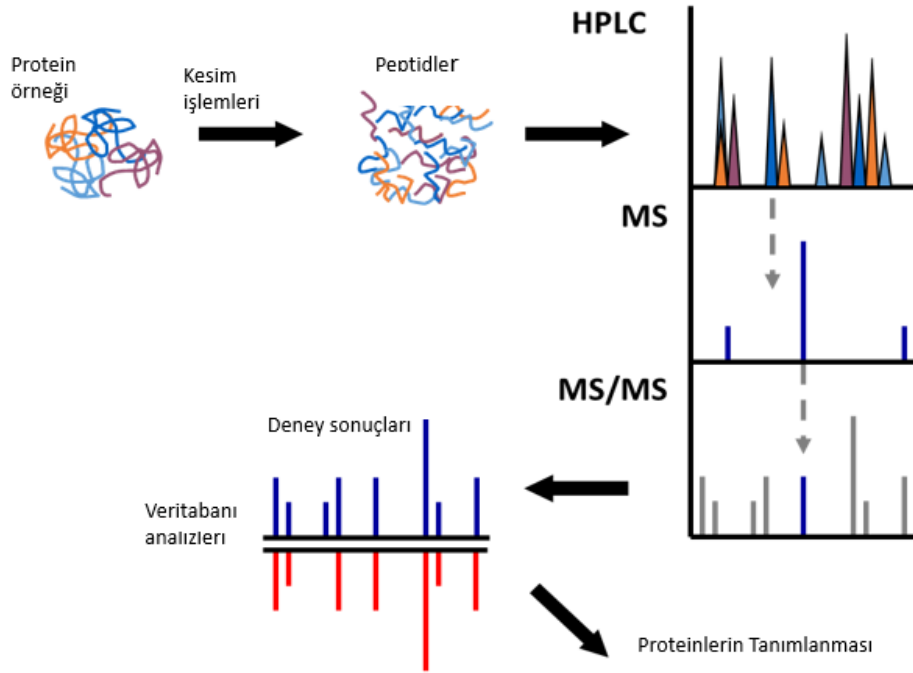
Son yapılan çalışmalar, meklofenamik asitin farklı mekanizmalar ile çeşitli kanser türlerinde tümörlerin oluşumu ve büyümesi üzerinde negatif etkiye sahip olabileceğini göstermiş (Delgado-Enciso ve ark., 2015; Soriano Hernandez ve ark., 2015; Cui ve ark., 2017) ve farklı kanser türleri için terapötik potansiyele sahip olabileceği önerilmiştir (Delgada vd., 2015). Prostat kanserinde uygulanmış olan fenamatlardan meklofenamik asit, hem androjene bağımlı hem de androjenden bağımsız prostat kanseri için en fazla terapötik etkiye sahip olanıdır (Soriano-Hernandez vd., 2012). Soriano-Hernandez ve ark. (2012) prostat kanserinde meklofenamik asitin etkilerini araştırdıkları bir çalışmada, *in vitro* (LNCaP ve PC3) ve *in vivo* (Androjenden bağımsız PK fare modeli) deneyler meklofenamik asitin neoplastik prostat hücrelerine yüksek oranda sitotoksik olduğunu ve 10 mg/kg/gün meklofenamik asit ile yapılan 25 günlük tedavinin, tümör büyümesini önemli ölçüde azalttığını, hayatta kalma süresini uzattığını ve hatta toplam tümör gerilemesine neden olduğunu göstermiştir. Meklofenamik asitin neden olduğu histolojik değişiklikleri inceleyen başka bir çalışma ise meklofenamik asitin androjenden bağımsız prostat tümörlerindeki düşük tümör saldırganlığı, artmış fibrozis ve hücrel proliferasyon ve vaskülerite azalması gösteren histolojik değişikliklere neden olarak, bu neoplazi açısından büyük terapötik potansiyeli olduğunu göstermiştir (Delgada vd., 2015). Diğer bir çalışmada ise simvastatinin androjenden bağımsız prostat kanseri hücrelerinde AKR1C3 ekspresyonunu arttırdığı;

simvastatin ve meklofenamik asit kombinasyonunun, tek başına simvastatine kıyasla PC-3 hücre proliferasyonunu, migrasyonunu ve aktivasyonunu daha da inhibe ettiği gösterilmiştir. Simvastatin ve NSAİİ'lerin kombinasyonunun prostat kanseri tedavisi için etkili bir strateji olabileceğini önermişlerdir (Sekine vd., 2017). Literatürde FTO'nun MA ile baskılanmasıyla hücre proteomundaki değişiklikleri inceleyen herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

### **1.15. Prostat Kanseri ile ilgili yapılan proteomik çalışmalar**

Organizmalardaki doku veya hücrelerde bulunan proteinlerin tamamına “proteom” denir (Peng ve ark.,2001). Bir organizma içerisindeki tüm proteinlerin, çeşitli teknolojiler kullanılarak analiz edilmesine ise “proteomik” denir ve proteinlerle ilgili büyük ölçekli çalışmaları ifade etmektedir (Anderson, Anderson, 1998). Proteomik teknolojisini ele alırsak, proteinlerin yapısı, yerleşim şekilleri, işlevleri ayrıca farklı proteinlerle olan ilişkilerini inceleyen bir alandır (Marko-Varga ve Fehniger, 2004). Proteom analizi, hücrenin yapısal ve fonksiyonel bilgilerinin yanında bir de hücrenin çeşitli stres türlerine ve ilaçlara karşı yanıt mekanizmasının tek veya çoklu proteomik teknikler kullanılarak tasvirini sağlamaktadır (Aslam, Basit, Nisar, Khurshid, & Rasool, 2017) (Şekil 1.8). Proteomik, bir genin işlevini anlayabilmek açısından da oldukça önemli bir teknolojidir ve genomik çalışmalara göre daha karmaşıktır (Lander ve ark., 2001). Proteomik, İnsan Genom Projesi de dâhil olmak üzere çeşitli genom projelerinin genetik bilgilerinden büyük ölçüde yararlanmaktadır (Hood ve Rowen, 2013). Genom araştırmaları, genetik bilgilerin organizmalarda nasıl kullanıldığını açıklamada tek başına yetersiz kalmaktadır.

Ancak proteomik teknolojisi bir gen ürünü olan proteinlerin yapı ve işlevlerini de inceleyerek bu eksiklikleri tamamlamada güçlü bir öneme sahiptir. (Akpınar, Kasap & Cantürk, 2011).



**Şekil 1.7.** Protein analizlerinin şematik olarak gösterimi (Aslam ve ark.,2017).

Çeşitli kanser türlerinde hem biyobelirteçlerin hem de tedaviye yönelik terapötik hedeflerin belirlenmesinde proteomik çalışmalar önemli bir araçtır. Prostat kanserinde aşırı tedaviyi azaltmak için hastalığı önceden tespit edebilen ve agresif olanı yavaş kanserlerden ayırabilen hassas biyobelirteçlerin tanımlanmasına hala ihtiyaç vardır. Proteomik araştırmaları, tümör oluşumunun, kanser hücrelerinin göçü ve istila potansiyelinin ve kastrasyon direncinin altında yatan mekanizmalar hakkında daha iyi bir anlayış geliştirmiştir. Bu çalışmalarda farklı biyolojik örnekler kullanılmıştır, yani prostat dokusu, prostat hücre hatları, kan (serum ve plazma), idrar, seminal plazma ve eksozom örnekleri ile hedefe yönelik proteomik çalışmalar yapılmıştır.

Bu çalışmalarda kanser teşhisi ve saldırganlık karakterizasyonu için en önemli biyobelirteçler vurgulanmıştır. Genel olarak sonuçlar, hücre döngüsü kontrolü, DNA onarımı, proteazomal bozunma ve metabolik aktivitede değişiklikler olduğunu göstermektedir. Ancak bu çalışmalar kanserin kendisinin heterojenliğinden ve protein tanımlama/miktar tayini için kullanılan tekniklerden dolayı düşük tekrarlanabilirliğe sahiptir. Bu sonuçların doğrulanması için daha ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç vardır (Intasqui, Bertolla & Sadi, 2018). Prostat kanserinde ise tanı konmasında kullanılan prostat spesifik antijeni (PSA) ile birlikte kanser hücrelerinden karsinoembriyjenik antijenler (CEA),

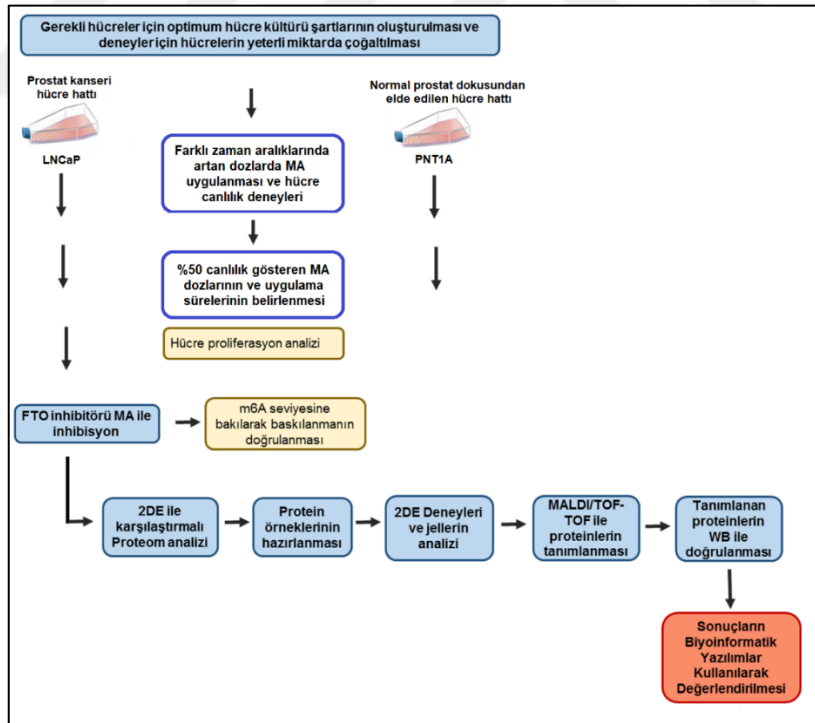
osteopontin, matrix metalloproteinaz 2 (MMP-2) belirteçlerinde bulunan ve vücut sıvılarına geçen proteinler, proteomik temelli yaklaşımlar ile tanımlanabilen biyobelirteçlerdir (Ludwig, Weinstein, 2005). Yapılmış olan proteomik tabanlı bir çalışmada, erken evreli LNCaP hücreleri sodyum selenit ile muamele edilmiş ve bu hücrelerin besiyerine salınmış olan proteinleri 2-DE (iki boyutlu poliakrilamid jel elektroforezi) ile profillendirilmiştir. Besiyerinde ekspresyonlarında değişiklik görülmüş olup, triosephosphate isomerase, chain A thioredoxin peroksidase, keratin 17, keratin 19, kalretikulin, siklofilin A, enolase 1, enolase (varyant), heat shock 60 (Hsp60) olmak üzere 9 protein tanımlanmıştır ve çalışmanın sonucunda, buradaki proteinlerin biyobelirteç olarak kullanılabilceği ve selenyum kullanan hastaların, prostat kanseri progresyonu ile ilişkilendirilebileceği düşünülmüştür (Kadaş, 2017). LNCaP hücrelerinde, DHT (dihidrotestosteron) ve forskolin tedavisi uygulanan bir başka çalışmada sinyal verme koşullarıyla ilişkili proteom farklılıkları incelenmiş olup, protein ekspresyonunda gözlenen farklılıkların AR mekanizmalarından etkilenip etkilenmediği araştırılmış ve LNCaP hücrelerinde alfa-enolaz ekspresyonunda azalma ve EF-Tu ekspresyonunda ise artışla sonuçlanmıştır. AR mekanizması ile bu çalışmada tanımlanan proteinlerin arasındaki ilişkiler henüz tam olarak anlaşılammıştır (Cha ve ark.,2017).

## 2.AMAÇ

Demetilaz aktivitesine sahip olan FTO'nun kanser ile olan ilişkisine dikkatler son beş yıldır yoğunlaşmaya başlamış ve sınırlı sayıda çalışma literatüre kazandırılmıştır. Transkriptom düzeyinde elde edilen bulguların proteom düzeyindeki bulgularla uyuma yüzdesinin beklenilenden daha düşük olması (Gry vd., 2019; Ghazalpour vd., 2011), transkriptom çalışmalarının proteom çalışmalarının yerini alamayacağını göstermektedir. Başka bir ifade ile çalışmadan elde edeceğimiz veriler var olan verilere katkı mahiyetinde olmayıp yeni veriler olacaktır. Mevcut çalışmaların hemen hepsinin transkriptomik düzeyde olması ve transkriptom düzeyinde elde edilen bulguların proteoma yansıma oranının düşük olması, bizi FTO'nun prostat kanseri ile ilişkisini proteom düzeyinde araştırmaya itmiştir. FTO'nun farmakolojik inhibitör ile baskılanması ve bu baskılanmanın hücresel ve moleküler düzeyde etkilerinin ortaya çıkarılması FTO-Prostat kanseri ilişkisini anlaşılmasına olanak sağlayacaktır. Bu bağlamda yapılan bu tez çalışmasının ana hedefi, FTO'nun prostat kanserindeki moleküler mekanizmasına ve hücre proteomu üzerindeki etkilerine dair bulgular elde etmektir. Hücre proteomu düzeyinde yapılacak bu çalışmalar ile FTO'nun hangi protein düzeylerini değiştirdiği ve hangi metabolik yollar üzerinde etki gösterdiği belirlenecektir. FTO'nun regülasyonunu değiştirdiği proteinlerin, kanser ile olası ilişkilerinin açığa çıkarılması hedeflenmiştir.

### 3. YÖNTEM

Çalışmada kullanılacak metot ve yaklaşımların genel hatları aşağıdaki akış şemasında (Şekil 3.1) gösterilmiştir. Hücre kültüründe öncelikle meklofeanmik asit (MA) ile ilgili olarak doz belirleme deneyleri, MA'nın hücrelerdeki m<sup>6</sup>A miktarına etkisi ve son olarak da proteom deneyleri gerçekleştirilmiştir. Her bir deney üç tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır. Deneylerimizde kullanılan ekipmanlar ve kitler Tablo 3.1'de, kullanılan kimyasallar ve hazırlanma şekilleri ise tablo 3.2'de verilmiştir. LNCaP kanser hücresi hattı, insan lenf düğümü metastatik lezyonundan, PC-3 hattı kemik metastazı ve DU-145 ise beyin metastatik lezyonundan oluşturulmuştur (Ford, O. H. ve ark.,2003). Bu tez çalışmasında kullanılmış olan LNCaP hücre hattı, 1977'de J. Horoszewicz tarafından, doğrulanmış metastatik prostat karsinomu, androjen reseptörü pozitif olan bir hastanın sol supraklaviküler lenf düğümünün iğne aspirasyon biyopsisinden izole edilmiştir. LNCaP hücre hattı, DU-145 ve PC-3 hücre hatlarından daha düşük bir metastatik potansiyele sahiptir (Tome-Garcia, Li & Ghazaryan, 2014).



Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan yöntemler ve iş-akış şeması



**Tablo 3.1.** Kullanılan Ekipmanlar/Kitler

Lamin air kabin (clean air)
CO <sub>2</sub> 'li inkübatör (thermo steri-cycle)
Bullet blender
Tetra cell jel yürütme sistemi (Bio-rad)
Protean plus dodeca cell jel yürütme sistemi (Bio-rad)
Power pac güç kaynakları (Bio-rad)
Transblot turbo transfer sistemi (Bio-rad)
Protean 1ef cell izoelektrik odaklama cihazı (Bio-rad)
Versadoc görüntüleme sistemi (Bio-rad)
Exquest spot cutter (Bio-rad)
MALDI-TOF/TOF 5800 (Absciex)
Elisa okuyucu (Thermo multiscan fc)
Vorteks karıştırıcı (agilent, palo alto, u.s.a.)
Roller (dlab, mx-t6-pro)
Eppendorf concentrator plus (22331,hamburg,germany)
WRocking platform vertikal karıştırıcı
Santrifüj masa üstü (isolab)
Santrifüj (eppendorf 5415 r centrifuge)
Soğutmalı santrifüj (sigma 3-18k)
Soğutmalı santrifüj (beckam coluter, allegra 64r centrifuge)
Trans-blot turbo soğutmalı santrifüj (sigma 3-18k)
UV transiluminatör (dathan scientific)
Spektrofotometre (nanodrop nd-1000; nanodrop technologies, wilmington, de)
Thermal cycler (techne tc-3000x, california, usa)
Isıtıcı blok (vwr digital heatblock)
RNasy mini kit cat no:74104 (qiagen, hilden, almanya)
Agaroz jel yürütme sistemi (bio-rad)

M <sup>6</sup> a quantifikasyon kiti (epigentek,)
Mikroskop (olympus ckx-41)
Mikropipet seti (eppendorf ve gilson)
0.2 ml'lik pcr tüpü
0.5 ml'lik eppendorf tüpleri
1.5 ml'lik eppendorf tüpleri
1.5 ml'lik safe lock tüpler
Pipet uçları (10-20-100-200-1000 µl)
Steril filtreli pipet uçları (10-20-100-200-1000 µl)
Kültür kapları (petri kapları, 50-100mm, 24-well, 6-well kültür kapları)
Kültür kapları (flasklar, t-25, t75, t175)
Amsterdam biosciences hypercassette (buckinghamshire,england, hp7 9na)
-20°C dondurucu (bosch)
-80°C derin dondurucu (sanyo)
+4°C buzdolabı (arçelik)
Sıvı azot tankı (thermoscientific)

**Tablo 3.2.** Çalışmada kullanılan kimyasallar ve hazırlanması.

Madde Adı	Hazırlama
%10 Amonyum Persülfat (APS)	1 g APS tartılıp 10 ml distile suda çözüldü. Filtre edildi ve +4°C'de saklandı.
%10 SDS	1 g SDS tartılıp 10 ml distile suda çözüldü ve oda sıcaklığında saklandı.
1,5 M Tris.HCl pH 8.8	18,15 g Tris tartılarak 80ml distile suda çözüldü. HCl ile pH 8.8'e ayarlandı ve 100ml'ye tamamlandı.
0,5 M Tris.HCl pH 6.8	6 g Tris tartılarak 80 ml distile suda çözüldü. HCl ile pH 6.8'e ayarlandı ve 100 ml'ye tamamlandı.
6X Yükleme boyası (6X Loading Dye)	1 ml 0,5 M Tris-HCl pH 6.8, 2 ml Glycerol (%99,7), 1,6 ml %10 SDS, 0,4 ml β-Mercaptoethanol, 0,4 ml %0,5 (w/v) Bromphenol blue 2,6 ml distile su ilave edildi

%30 Akrilamid/Bisakrilamid	29,2 g Akrilamid, 0,8 g Bisakrilamid tartılıp 100 ml distile suda çözüldü. Filtre edildi ve +4 °C'de saklandı.
SDS-PAGE Sabitleştirici Solüsyon (Fiksatif)	40 ml Metanol ve 10 ml Asetik Asit karıştırılarak distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.
SDS-PAGE Boyama Solüsyonu (COMASSİE BRİLLANTT BLUE)	1,2 gr Comassie Brilliant Blue-G250 tartılarak 450 ml milliQ su ile çözüldü. Bu karışıma 100 gr Amonyum Sülfat eklenerek, karışımın tamamı MilliQ su ile 700 ml'ye tamamlandı.
100 ml Western Blot Transfer Tamponu	0,58 gr Tris, 0,29 gr Glisin, 0,025 gr SDS (0,375 ml %10 SDS'den) tartılarak 100 ml distile suda çözüldü.
TBS-T pH 7.6	2,42 gr Tris, 8 gr NaCl, 1 ml Tween20 900 ml distile suda çözüldü. pH 7.6'ya ayarlandıktan sonra 1 L'ye tamamlandı. 1ml Tween20 eklendi.
Bloklama Tamponu (Western Blot)	5 g süt tozu (Blotting Grade Blocker NonFat Dry Milk, 10 mL TBST içinde çözüldü.
Developer Solüsyonu (KONIX automatic concentrated X-Ray bath solution)	Üretici tavsiyesi üzerine, 140 ml dH2O ve sırası ile 50 ml D1 solüsyonu, 5 ml D2 solüsyonu ve 5 ml D3 solüsyonu karıştırılıp, filtre kağıdı ile süzülerek hazırlanmıştır.
Fiksleme Solüsyonu (Carestream RP X-OMAT LO)	Üretici tavsiyesi üzerine, 140 ml dH2O ve sırasıyla 50 ml solüsyon A, 10 ml solüsyon B ile karıştırılıp, filtre kağıdı ile süzülerek hazırlanmıştır.
2DE-Rehidrasyon Örnek Tamponu	24 gr Üre, 1 gr CHAPS, 0.385 gr DTT, 250 µl Amfolit (%40) ve 0,5 mg Bromofenol mavisi karıştırılıp distile su ile 50 ml'ye tamamlandı.
RPMI-1640	SIGMA, Katalog No:R8758
Penisilin/Streptomisin	Biochrome, Katalog No: A2212
L-Glutamin	Biochrome, Katalog No: K0282

FBS	Capricorn Scientific, Katalog No: FBS-11B
Tripsin/ EDTA	GIBCO, Invitrogen, Katalog No: 25200-072
Fosfat Tamponlu Salin (PBS)	Biochorome, Katalog No: L1825
Dimetil Sülfoksit (DMSO)	Applchem, Katalog No: A1584
Meklofenamic Asit	Sigma-Aldrich, Katalog No: M4531
Tripan Mavisi	GIBCO, Invitrogen, Katalog No: 15250061

### 3.1. LNCaP ve PNT1A Hücrelerinin Kültüre Edilmesi

Bu çalışmada meklofenamik asitin prostat kanseri hücre proteomuna etkisini araştırmak için androjen bağımlı ve lenf düğümü lezyonundan üretilmiş bir hücre hattı olan LNCaP hücre hattı kullanılmıştır. *İn vitro* ortamda FTO ekspresyonu ve baskılanmasının LNCaP hücre viabilitesine etkisini karşılaştırmak amacıyla sağlıklı prostat PNT1A hücreleri kullanılmıştır. Hücre kültürü deneylerimizde kullanılan kimyasal maddeler ve ticari kitler Tablo 3.3’de verilmiştir.

#### 3.1.1. Hücrelerin Çözülmesi

LNCaP hücreleri laboratuvarımızda, stoklar halinde sıvı azot tanklarımızda bulunmaktadır. Kültürlerini başlatmak üzere sıvı azot tanklarından alınan hücreler, 37°C’de su banyosu içerisinde çözdürüldükten sonra 15 ml’lik bir falkon tüpte bulunan FBS’ce zengin (%10) besi ortamı üzerine eklendi. Hücreden koruyucu ajan olan DMSO’yu uzaklaştırmak ve daha yoğun hücre süspansiyonu elde etmek için, hücre süspansiyonu 1500 x rpm’de santrifuj edilerek çöktürüldü.

Çöken hücrelerin üzerine taze besi yeri ilave edilerek (RPMI-1640, FBS, 1X Penisilin/Streptomisin, 2 mM L-Glutamin) hücreler süspanse edilip, T-25 hücre kültürü kaplarına aktarıldı. 37°C ve %5'lik CO<sub>2</sub>'li ortamda çoğalmaya bırakılan hücrelerin 2 gün içerisinde kendilerini toparlamaları ve pasajlanmaya hazır hale gelmeleri beklenildi. Hücreler RPMI-1640 medium (sıgma-aldrich Katolog No R8758-500ML), %10 FBS, 0.1 µg/µl Penisilin/Streptomisin (multicell, Katalog No 450201EL Kanada), 2.8 mM L-Glutamin (Multicell, Katalog No 609065EL, Kanada) karışımı içeren besiyerinde 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> ortamında büyütüldü. Hücrelerin yoğunlukları %80'e ulaştığında hücreler pasajlandı.

### **3.1.2. Hücrelerin Pasajlanması**

Deneylerde kullanılacak olan hücrelerin yoğunluğu ~ %80'e ulaştığında, kültür kabından kaldırılıp yine hücrelerin durumu göz önünde bulundurularak daha büyük ya da daha fazla sayıda kültür kaplarına ekilmiştir. Steril PBS ile yıkanan hücreler yapıştıkları yüzeyden %0.25 Tripsin/EDTA muamelesi ile kaldırıldı ve PBS varlığında santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında oluşan hücre çökeltisi büyüyecekleri besiyerinde çözülerek uygun kültür kaplarına aktarıldı ve pasaj numarası etiketlendi.

### **3.1.3. Hücrelerin Saklanması**

Bu aşamada hücreler azot tankında saklamaya alınmadan önce kademeli olarak soğutulurak, donduruldu. Hücrelerin dondurulması için hazırlanan besiyeri, %70 RPMI medium, %20 FBS ve %10 DMSO oranları dikkate alınarak hazırlandı. Dondurma işlemi öncesi flask yüzeyini kaplayan hücreler üzerindeki besiyeri uzaklaştırılarak ve PBS solüsyonu ile yıkandı. PBS uzaklaştırıldıktan sonra kültür kabı içerisine 1 ml %0.25 Tripsin / EDTA (Multicell, katolog No:325043EL) solüsyonu eklendi ve 2 dakika 37°C'de inkübatörde bekletildi. İnkübasyon sonrası kültür kabı içerisindeki hücreler 10 ml PBS ile toplandı ve 10 dakika 1500 rpm'de + 4°C'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üstte kalan PBS uzaklaştırılıp hücrelerin bulunduğu çökelti dondurma besiyeri (%70 MEM, %20 FBS ve %10 DMSO) ile yavaşça karıştırıldı.

Hücrelerin kaldırılacağı cryovial tüplere hücre adı, pasaj numarası ve tarih yazılarak dondurma tüpleri (cryovial) içerisine her tüpte toplam hacim 1 ml olacak şekilde hücreler

bölündü. Tüpler -80°C’de kryofreezer saklama kabında bir gece bekletildikten sonra sıvı azot tankına (-196 °C) yerleştirildi.

### **3.1.4. MA’nın hazırlanması**

Denyelerde kullanılacak ilaç olan meklofenamik asit (MA), DMSO içerisinde çözülmüştür. DMSO içerisinde çözülen MA ileriki çalışmalarda kullanılmak üzere porsiyonlanarak -20°C’deki dondurucuda saklandı. 1000 µl DMSO’da 100 mg miktarda çözülmüş ve RPMI 1640 içerisinde 100 kat seyreltilerek hazırlanan MA kullanıldı.

## **3.2. LNCaP Hücrelerinin Meklofenamik Asit ile Mumale Sonrası Global m<sup>6</sup>A Seviyelerinin Belirlenmesi**

### **3.2.1. LNCaP hücrelerinin MA ile muamele edilmesi**

FTO proteininin aktivitesini inhibe etmek için MA kullanılmıştır. Yakın zamanda MA’nın insan hücreleri mRNA’sında m<sup>6</sup>A seviyesini artıran selektif bir FTO inhibitörü olduğu gösterilmiştir (Huang vd., 2015). Hücre hatlarına MA uygulamasını gerçekleştirmek için önce LNCaP hücreleri 24 kuyucuklu plaklara eşit sayıda ekilip gece boyu inkübe edilmiştir. Daha sonra Cui ve arkadaşlarının (2017) uyguladıkları şekilde hücreler artan dozlarda MA ile muamele edilerek, belirlenen sürelerde kültüre edilmiştir. m<sup>6</sup>A seviyesi ve hücre viabilitesi açısından toksik olmayan uygun doz belirlenerek, ileri çalışmalar bu doz konsantrasyonu ile yapılmıştır. MA, DMSO içerisinde çözüldüğü için kör grup olarak LNCaP + DMSO grubu hücreleri kullanılmış ve m<sup>6</sup>A seviyesine bakılmıştır.

### **3.2.2. Meklofenamik asitin Hücre Canlılığına Etkisinin Belirlenmesi**

MA’nın optimum konsantrasyonlarının (popülasyonun %50’sini öldüren) bulunması gerekmektedir. Bunun için belirli saatler için ilaç uygulanan hücrelerin Tripan Mavisi Testi ile canlılıkları değerlendirildi. Tripan mavisi, canlı hücrelerin zarları bozulmamış olduğundan, canlı hücreleri boyayamaz, ölü hücrelerin zar yapıları bozulduğundan boyayı emerler ve mikroskopta, ölü hücreler mavi, canlı olan hücreler parlak olarak görünürler.

Hücre canlılığının belirlenmesi için öncelikler hücreler 24 kuyucuklu plaklara ekilir, belirlenen dozlar ve sürelerde ilaç uygulaması yapılır ve süre sonunda da Tripan Mavisi ile boyanan hücrelerin canlılıkları belirlenir. Öncelikle hücreler T-75 flaskta çoğaltıldı ve deney öncesinde elimizde ne kadar hücre olduğu belirlendi. Ön deneylerimizde ekilecek

hücre miktarları belirlendi. Hücre miktarları hesaplandıktan sonra deney grupları belirlenerek her bir kuyucağa 30.000 hücre olacak şekilde 24 kuyucuklu plakalara hücre ekimi yapıldı ve 37°C'deki nemlendirilmiş %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde inkübasyona alındı. Ertesi gün ilaç uygulaması yapıldı. İlaç uygulaması süresinin sonunda öncelikle kuyucuklardaki hücrelerin üzerindeki besiyerleri mikrosantrifüj tüpüne alındı.

Hücreler PBS ile yıkandıktan sonra %0.25 Tripsin/ EDTA ile muamele edildi. Kalkan hücreler daha önce ependorf tüplere aldığımız besiyerleri ile ait oldukları tüplere toplandı ve 1500xg'de 10 dakika 4°C'de santrifüj edildi. Ardından pellet miktarına göre besiyeri ile çözüldü. Steril 500 µl'lik mikrosantrifüj tüplere 50 µl hücre konularak, kabin dışında karışım üzerine 200 µl Trypan mavisi boya (%0,4 Tripan blue, Sigma, ABD) eklenerek, dilisyon faktörü 5 yapıldı ve iyice karıştırıldı. Hücreler Thoma lamında sayıldı. Thoma lamı, alkol ile temizlenerek düz bir yüzeye konuldu ve lamel ise sayım alanı çerçevesinin üzerini örtecek şekilde yerleştirildi. Thoma laminin her iki yanında bulunan kanalların ortasında kalan sayım alanında lamelin lam ile birleştiği noktanın tam orta noktasından boyalı hücre solüsyonu (10 µl) pipetle verildi. Binoküler ışık mikroskobuna Thoma lamı yerleştirildikten sonra mikroskobun 10x objektifinde canlı hücreler sayıldı. Sırasıyla, Thoma laminin dört dış karesinde olan hücreler sayıldı. Seyreltilmiş olan numunedeki toplam canlı hücre/ml sayısını elde etmek için:

**Toplam canlı hücre sayısı/ml = 4 karede sayılan canlı hücre sayılarının ortalaması x dilüsyon faktörü x 10.000** şeklinde hesaplanarak ml içindeki hücre miktarı belirlenmiş oldu.

MA'nın kanser hücre hattı LNCaP ve sağlıklı hücre hattı PNT1A canlılığına etkilerini belirlemek için, literatürde benzer çalışmalardaki konsantrasyonlara dayanarak benzer ve artan konsantrasyonlarda ve artan zaman dilimlerinde hücrelere uygulandı. Ön çalışmalar ile optimum konsantrasyonlar belirlendi. Hücrelere MA uygulaması sırasında öncelikle besiyeri hazırlandı. 15 mL'lik falkon tüpler dozlara göre ayrı ayrı 10-20-40-60 ve 80 µM şeklinde etiketlendi. Belirlenen MA hacmi kadar besiyerinden çekip, atılarak yerine MA eklenip, karıştırıldı.

Bir gün öncesinde ekilmiş olan hücrelerin besiyeri çekilip, hazırlanan ilaçlar tekrar alt üst edildikten sonra kuyucuğun kenarından yavaşça verildi. Kontrol için ise sadece besiyeri değişimi yapıldı. Bu dozların tümü hücrelere 24 saat (1 gün), 48 saat (2 gün), 72 saat (3 gün),

120 saat (5 gün), 168 saat (7 gün) süreler ile uygulandı. Uygulama sonunda hücreler sayılarak hücre canlılık oranları tespit edildi.

### 3.2.3. MA uygulamasının m<sup>6</sup>A Miktarına Etkisinin Belirlenmesi

MA, DMSO içerisinde çözöldüğü için kör grup olarak LNCaP + DMSO grubu hücreleri kullanılmış ve baskılanmanın doğrulanması için m<sup>6</sup>A seviyesine bakılmıştır. Uygulanacak ilaç konsantrasyonları stok ilaç konsantrasyonuna göre aşağıdaki formöl kullanılarak hesaplanmıştır.

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

*C<sub>1</sub>=Stok ilaç konsantrasyonu,*

*V<sub>1</sub>=alınacak hacim,*

*C<sub>2</sub>=elde edilmek istenen konsantrasyon*

*V<sub>2</sub> = son hacim*

### 3.2.4. LNCaP Hücrelerinden RNA İzolasyonu

LNCaP hücre hatlarının 24, 48, 72, 120 ve 168 saatlik sürelerde inkübasyonları sırasında belirlenmiş olan dozlarda mA verilmiştir. Bu sürecin ardından RNeasy Mini Kit (74104), (Qiagen, ABD) kullanılarak alınan örnekler ile total RNA izolasyonu yapıldı. RNA izolatlarının kalitesi %1 formaldehit agaroz jel dökölerek 28S ve 18S bantları ile elde edilen RNA'ların kalitesi kontrol edilmiştir. Sonrasında izole edilmiş olan RNA ların konsantrasyonları ölçölerek, ölçüm sonrasında m<sup>6</sup>A kantifikasyonu yapıldı.

### 3.2.5. m<sup>6</sup>A seviyesinin belirlenmesi

Hücre kültürüne eklenen FTO inhibitörünün aktivitesini kontrol etmek için Liu ve arkadaşlarının (2018) yaptığı şekilde m<sup>6</sup>A seviyelerine bakılmıştır. m<sup>6</sup>A RNA metilasyon kantifikasyon kiti (Epigentek, P-9005-48) ile total RNA'lardaki m<sup>6</sup>A seviyesi belirlenmiştir. Bunun için 200 ng RNA her bir kuyuya eklenerek ve üretici firmanın önerdiği şekilde tutucu antikor solüsyonu ve bulucu antikor solüsyonu eklenmiştir. Daha sonrasında m<sup>6</sup>A seviyesi her bir kuyunun absorbans değeri 450 nm'de kalorimetrik bir şekilde ölçölerek değerdendirme yapılmıştır. m<sup>6</sup>A miktarının belirlenmesinde aşağıda gösterilen formölünden



yararlanılmıştır. Pozitif kontrol ile standart bir eğri oluşturularak m<sup>6</sup>A reaksiyonunun miktarı belirlenmiştir.

$$m6A \% = \frac{m6A \text{ miktarı (ng)}}{S (RNA \text{ örneği})} \times 100 \%$$

$$m6A (ng) = \frac{\text{Örnek O.D} - \text{Negatif kontrol O.D}}{\text{Eğim}}$$

### 3.3. Meklofenamik Asitin LNCaP Hücre Proteomu Üzerine Etkilerinin Araştırılması

#### 3.3.1 Hücrelerden protein izolasyonu ve örnek havuzlarının oluşturulması

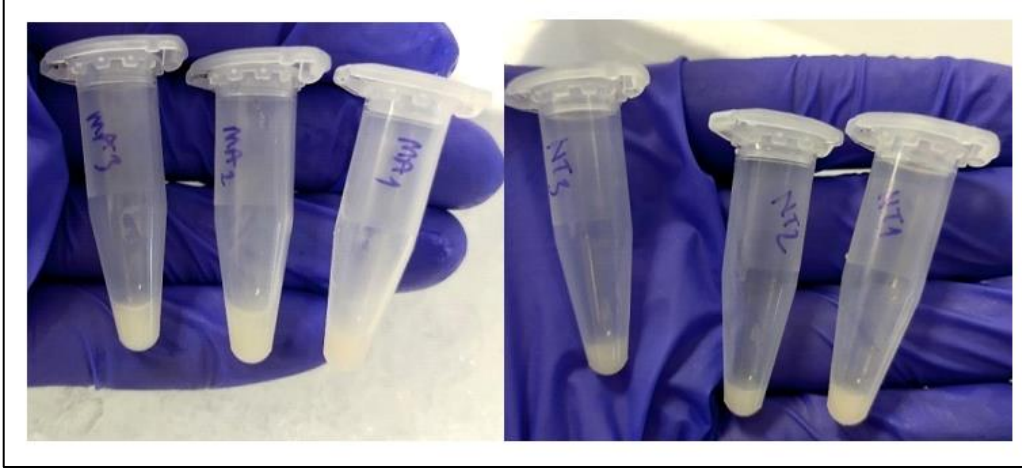
Prostat hücre hattı olan LNCaP hücrelerine MA uygulanmasının hücre proteomunda meydana getireceği değişiklikleri inceleyebilmek için öncelikle hücreler biyolojik tekrarı sağlamak adına üç ayrı T175 kültür kabında büyütüldü. Büyütülen ve MA uygulaması yapılan hücrelerden protein özütleri hazırlandı. Protein izolasyonu sonrası konsantrasyonu ölçülen örnekler, dondurma-çözme işlemleri sırasında zarar görmemesi için posiyonlanarak -80°C dondurucuda saklandı.

#### 3.3.2. Protein Özütlerinin Hazırlanması

Kültür kaplarındaki besiyerleri atılarak, tabana yapışık halde olan hücreler, öncelikle yıkama tamponu (10mM Tris, 250 mM süktroz) ile yıkandı ve scraper ile kazıma yapılarak toplandı (Şekil 3.2). Toplanan hücreler, önce 10 dk +4°C'de 15000xg'de santrifüj edildi (Şekil 3.3).



**Şekil 3.2.** Hücrelerin kültür kabından scraper ile kazınarak alınması



**Şekil 3.3.** Kültür içeriğinin çöktürülmesiyle elde edilen hücre pelletleri

Süpernatant kısım atılarak, hücre pelleti üzerine 100 ul 2-DE tamponu eklenmiştir. Ardından bu karışıma protein yıkımını engellemek için proteaz inhibitörü eklendi. İşleme başlamadan öncesinde, örnekler üzerine 0.2 mm ve 0.5 mm çelik boncuklar eklenip, +4°C’de bekletilen blut blander homojenizatör cihazı 4 dk, 7x hızda, 3 kez çalıştırılıp, hücrelerin fiziksel olarak parçalanması sağlandı. Homojenize edilmiş olan hücrelere +4°C’de 20.000xg’de 30 dakika santrifügasyon işlemi yapıldı ve süpernatant kısım temiz tüplere küçük hacimlerle alındı ve protein konsantrasyonları belirlendi. Saklama için sıvı azotta hızlı dondurma yapılarak, -80°C’ye kaldırıldı.

### 3.3.3 Protein Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Bu tez çalışmasında protein konsantrasyonunun ölçülmesi için Bradford assay yöntemi kullanılmıştır. Ölçülecek olan protein özütünden 1 µl alınarak 19 µl standart tamponu olan 2D-Rehydration buffer ile karıştırıldı. Karışıma 1ml 1X Bradford Reagent (Bio-Rad, ABD) eklenerek vortekslendi ve karanlıkta 5 dakika bekletilmesinin ardından örneklerin ölçümü Nanodrop (Thermo Scientific, ABD) cihazı ile 595 nm’de yapıldı. Her bir örnek için 3 kez ölçüm yapılmış olup, bu tekrarların ortalaması alınmıştır. Buradan elde edilen sonuçlar dilüsyon faktörüne göre hesaplanarak, proteinlerin konsantrasyonunu verir.

### 3.3.4. Örnek havuzlarının oluşturulması

LNCaP hücreleri üç ayrı kültür kabında büyütülmüş ve protein izolasyonları ayrı ayrı yapılarak protein konsantrasyonları ölçülmüştü. Her bir örnekten 2000 µg alınarak 6 mg’lık protein havuzları oluşturuldu. İlaç uygulanan grup için “MA” ve uygulanmayan grup için “Kontrol” şeklinde hazırlanan protein havuzları adlandırıldı. Protein konsantrasyonundan emin olunması için tekrar Bradford yöntemi ile konsantrasyonları ölçüldükten sonra ileriki çalışmalarda kullanılmak üzere küçük porsiyonlar halinde mikrosantrifüj tüplerine bölünerek sıvı azotta hızlı dondurulduktan sonra -80°C’deki dondurucuda muhafaza edildi.

### 3.3.5 Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamit Jel Elektrofrez (SDS-PAGE)

Elde edilmiş hücre lizatlarındaki konsantrasyonları belirlenen proteinlerin profilini görmek ve proteinleri moleküler ağırlıklarına göre ayırmak adına %12’lik protein jeli kullanılmıştır. Yükleme ve ayırma jeli olmak üzere iki kısımdan oluşan bu jel sistemi, Tablo 3.4.’de verilen içerik ve miktarlarına göre hazırlanmıştır. Jel karışımı hazırlandıktan sonra camlar arasına döküldü ve polimerizasyonu için bir süre bekletildi. Polimerizasyon sonrasında yükleme jeli hazırlanarak polimerize olmuş ayırma jelinin üzerine verildi ve jel kuyularını oluşturmak için cam plakalara 1 mm genişliğinde tarak yerleştirildi.

Yükleme jeline de polimerizasyon sağlandıktan sonra plakalar 1X SDS-PAGE yürütme tamponu olan tanklara yerleştirildi. Protein özütlerinin üzerlerine 3’er µl 6X yükleme boyası ve protein konsantrasyonları sonucu belirlenen yükleme miktarlarına göre dH<sub>2</sub>O eklenerek tüpler, su içinde 5 dakika kaynatılarak proteinler denatüre edildi.

**Tablo 3.4.** SDS-PAGE içeriği

<b>Kullanılan Solüsyonlar</b>	<b>Ayırma jeli (%12)</b>	<b>Yükleme jeli (%4)</b>
ddH <sub>2</sub> O	3300 µl	3000 µl
1.5 M Tris HCl pH 8.8	2500 µl	-
0.5M Tris HCl pH 6.8	-	1250 µl
%30 Akrilamid- Bis	0,004 µl	670 µl
%10 SDS	200 µl	50 µl
%10 APS	200 µl	50 µl
TEMED	10 µl	5 µl
<b>Toplam hacim</b>	<b>5 mL</b>	<b>5 mL</b>

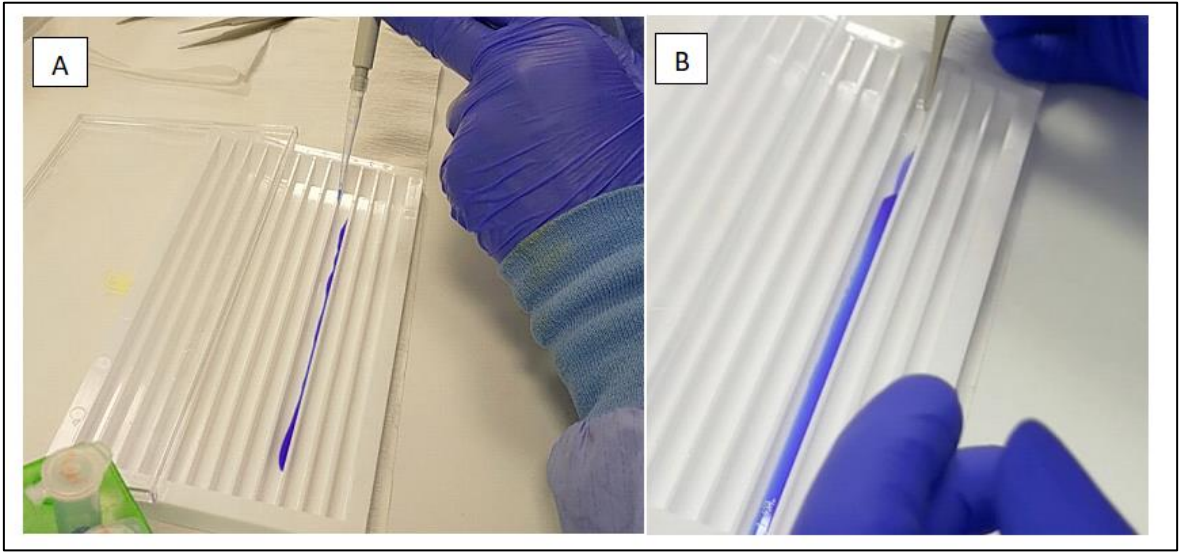
5 dakika sonunda buza alınan örnekler kısa bir santrifüj sonrası mikropipet yardımıyla jel kuyucuklarına yüklendi. Jel, önce 120 V gerilimde 10 dk, sonrasında 180 V'da 60 dakika boyunca yürütüldü. Yürütme işlemi sona erdiğinde jel, cam plakalar arasından çıkarılarak %40 metanol + %10 asetik asit ile fiksatif edilip ardından colloidal Comassie Brilliant Blue G250 boyası ile boyaması yapıldı.

### **3.3.6. İki Boyutlu Jel Elektroforezi (2DE) (PROTEAN Plus Dodeca cell)**

Proteinlerin iki boyutta ayırım için birinci boyutta izoelektrik noktalarına göre ayrıldılar. Daha sonrasında, ikinci boyutta ayırım SDS-PAGE yapılarak moleküler ağırlıklarına göre yapıldı.

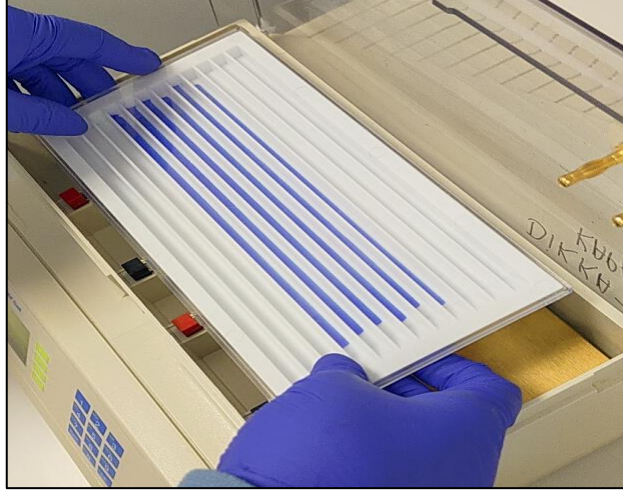
### 3.3.7. İzoelektrik odaklama ve Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Bu çalışma için keratinsiz olarak, Tablo 3.4'de gösterildiği gibi poliakrilamid jeller hazırlandı. Kontrol ve deney grubu örneklerimizde 3 deneysel tekrar olması için 3'er adet jel yürütüldü. Striplere toplamda 1500 µg protein yüklendi. Örneklerin yüklenmesi için 17 cm'lik pH 3-10 linear olmayan (NL) IPG stripler kullanıldı. Toplam hacmi 280 µl olacak şekilde örneklerin üzerlerine 2DE rehidrasyon örnek tamponu eklendi ve bu karışıma %1 TBP (Tribütilfosfin), striplerin pH aralığına uygun olan amfolit %1 oranında eklenerek karıştırıldı ve striplere yüklemesi yapıldı (Şekil 3.4).



**Şekil 3.4.** Proteinlerin IPG striplere emdirilmesi. A) Strip kuyularına hazırlanmış olan örnek karışımının verilmesi B) 17 cm'lik IPG striplerin örnek karışımı üzerine yerleştirilmesi.

Striplerin rehidrasyonu için PROTEAN IEF (Biorad, ABD) cihazına yerleştirilerek 20°C ısıda 30 dakika kadar yüklenmiş olan protein örneklerinin stribe emilmesi beklendi, sonrasında striplerin kurumaması ve örneğin buharlaşmasını engellemek için, striplerin üzerine mineral yağ eklendi ve gece boyu pasif rehidrasyona bırakıldı (Şekil 3.5).

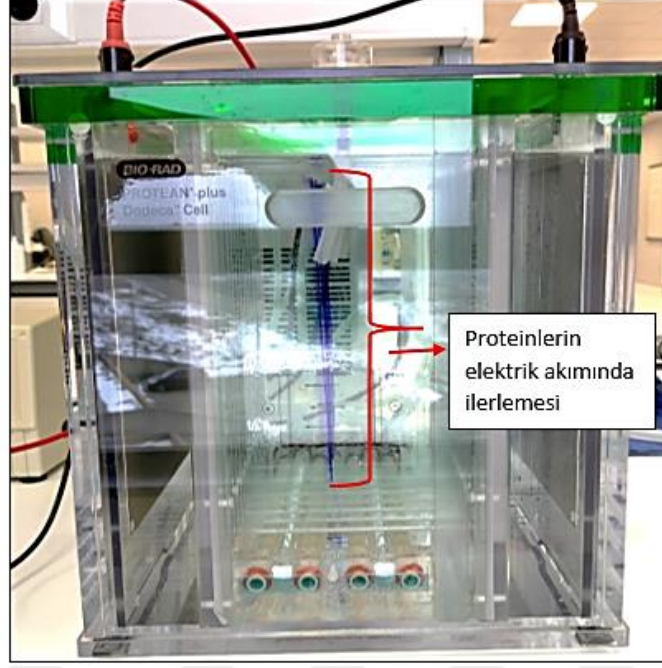


**Şekil 3.5.** Striplerin rehidrasyonu için PROTEAN IEF (Biorad, ABD) cihazına yerleştirilmesi.

Rehidrasyon işleminin bitmesiyle, IPG stripler üzerlerinde kalan mineral yağ uzaklaştırılarak stripler, dikkatlice fokuslama traylerine alındı. Striplerin üstü tekrar mineral yağ ile kapatılarak izoelektrik fokuslama aşamasına geçildi. PROTEAN IEF (BioRad, ABD) fokuslama cihazında IPG stripler, 20°C’de odaklamaya tabi tutuldu. Fokuslama, 20°C’de adım adım akımı yükselen üç aşamalı bir program ile gerçekleştirildi. Buna göre, stripler önce 250V’de 20 dakika hızlı rampada, 4000V’de 2 saat yavaş rampada, son olarak 40000V/saate ulaşana kadar 4000V hızlı rampada izoelektrik noktalarına göre fokuslandılar. Fokuslama sonrasında stripler 2DE strip yıkama tamponu I (6 M üre, 0.375 M Tris.HCl pH 8.8, %50 2 SDS, %20 Gliserol, %2 (w/v) DTT) ile 30 dk yıkaması yapıldı hemen ardından karanlık ortamda 2DE strip yıkama tamponu II (6 M üre, 0.375 M Tris.HCl pH 8.8, % 2 SDS, % 20 Gliserol, % 2.5 (w/v) iyodaasetamid)’da 30 dk süreyle yıkandı. Bu işlem sonunda protein örneklerinin izoelektrik noktasına göre birinci boyutta ayrımları yapılmış oldu. Örneklerin ikinci boyuttaki ayrımları için % 12’lik hazırlanan keratinsiz poliakrilamid jellere yerleştirilerek Protean Plus Dodeca Cell jel yürütme sisteminde (BioRad, ABD) elektroforezi yapılmıştır (Şekil 3.6).

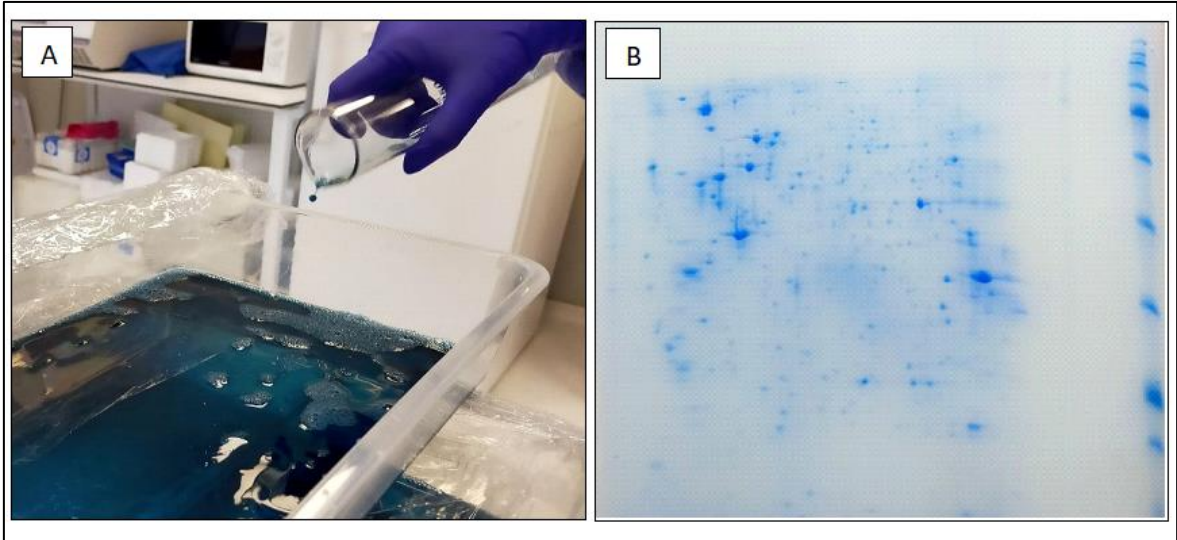
Bu işlemde proteinlerin, moleküler büyüklüklerine (MW) göre ikinci boyutta ayrımları yapılmış oldu.





**Şekil 3.6.** Protein örneklerinin Dodeca cihazında ikinci boyutta ayrımı

7 saat süren elektroforez sonrasında jeller %40 metanol, %10 asetik asit içerikli fiksatif solüsyonunda 2 gün bekletildi. Sonrasında kolloidal Comassie Brilliant Blue G-250 boyası hazırlanarak jeller gece boyu boyanmaya bırakıldı,ertesi gün destain edilerek boya uzaklaştırıldı.



**Şekil 3.7.** Jellerin Comassie Blue G-250 ile boyanması. A) Kolloidal Comassie boyasının çalkalayıcı üzerindeki jel üzerine dökülmesi, B) Boyanmış olan jelin görüntüsü.

### 3.3.8. 2DE Jellerin Görüntü Analizi

Jellerin boyanması sırasında görüntülenmesi için VersaDoc MP4000 sistemi (BioRad, ABD) QuantityOne programı (Versiyon 4.6.7, Bio-Rad, USA) kullanıldı. Görüntüleme sonrasında jel görüntüleri analiz bilgisayarına aktarılarak burada analizlerin yapılması için PDQuest Advance (BioRad, ABD) programı kullanılmıştır. Kontrol grubu ile MA verilen grup arasında ekspresyon seviyelerinde farklılık görülen protein spotları yazılım yardımıyla belirlendi. Analiz edilecek bölgeler standardize edilerek eşleştirildi. İstatiksel olarak önemli olan spotlar Student's t-test ile değerlendirildi ( $p < 0.05$  için). Ekspresyon seviyesinde 2 kattan fazla değişiklik görülen protein spotlarının kesimi için EX-Quest Spot-cutter cihazı (BioRad, ABD) kullanıldı ve kesilen spotlar 96 kuyucuklu plakalara alındı.

### 3.4. Kütle Spektrometresi (MS/MS) İçin Örnek Hazırlama ve Analizleri

#### 3.4.1 Jel içindeki Proteinlerin Tripsin ile Kesimi (In-Gel Tryptic Digestion) ve Peptit Örneklerinin MALDI TOF/TOF Analizi için Hazırlanması

Spot-cutter cihazında 96 kuyucuklu tabaklardan alınan protein spotları 0.6 ml'lik tüplere alındı ve In-gel Tryptic Digestion Kit (Thermo Scientific, ABD) kullanılarak üreticinin tavsiye ettiği şekilde gerçekleştirildi. Kesim işlemi basamakları, protein spotları 150  $\mu$ l %40 asetonitril ve %60 amonyum bikarbonat (50mM ph 8.0) çözeltisi (yıkama tamponu) ile 15 dakikalık periyotlarla renksiz hale gelene kadar yıkandı. Boya uzaklaşınca spotlar üzerine 50mM'lık TCEP çözeltisi eklendi ve disülfid bağlarının kırılması için 60°C'de 10 dakika inkübe edildi. Çözelti pipet ile çekilip atıldı ve 25°C'de, karanlıkta 10 mM iyodoasetamid (IAA) solüsyonu ile karanlıkta bir saat süre boyunca alkilelendikten sonra yaklaşık 10 dakika yıkama solüsyonu ile yıkandı ve yıkama tamponu uzaklaştırılarak ve spotların üzerine asetonitril eklenerek 15 dakika boyunca dehidrasyon sağlandı. Dehidrasyonun sonunda asetonitril uzaklaştırıldı ve spotlar üzerine 10ng/ $\mu$ l Tripsin eklenerek 37°C'de geceboyu kesim yapıldı. Kesim işleminden sonra, üst kısımlar temiz tüplere aktarıldı ve spotların üzerine %10'luk TFA çözeltisi eklenerek vortekte karıştırıldı. Sonrasında tüpteki sıvının tamamı ilk kesim reaksiyonunun alındığı tüplerle birleştirildi. Peptitlerin bulunduğu kesim reaksiyonu vakumlu konsantratör cihazı ile 45 dakika 60°C'de 2500 xg hızda çevrilerek kurutuldu.



### 3.4.2. MALDI TOF/TOF Analizi

Konsantratör cihazından alınan peptit örneği %0,1'lik 10 µl TFA solüsyonu ile çözüldü. Peptit parçaları üreticinin tavsiye ettiği şekilde ZipTip kolonuna (Millipore, Burlington, MA, ABD) bağlandı. Protokole göre ilerlenilen çalışmada öncelikle ZipTip kolonu 10 µl asetonitril ile 3 kez yıkanarak ıslatıldı. Sonrasında hemen 10µl %0.1 TFA solüsyonundan 3 kez geçirilerek peptitler bağlanmadan kolon dengelenmiş oldu ve peptitlerin kolona bağlanması için örnekler ZipTip kolonundan yavaşça 20 kez geçirildi. Bağlanan peptitler 1.4 µl Matriks ( $\alpha$ -Cyano-4hydroxycinnamic) solüsyonuyla indirilerek, MALDI Plate'e spotlandı.

Örneklerin analizi AbSciex 5800 MALDI-TOF/TOF (MS/MS) kütle spektrometresi cihazında yapıldı. Cihazdaki iyonize olmuş olan peptitler ayrıştırıldığında, kütle/yük (m/z) oranları belirlenmiştir. MALDI cihazından elde edilen sonuçlar, MASCOT data bankası, tanımlanan proteinler STRING ve PANTHER programları kullanılarak analiz edildi.

### 3.4.3. Western Blotlama

FTO proteini ekspresyon seviyesi en yüksek olan prostat kanser hücre hattını belirlemek için kültüre ederek çoğalttığımız ve protein örneklerini hazırladığımız örnekler SDS-PAGE jellerde yürütüldükten sonra anti-FTO antikoru ile western blot analizi yapıldı. Protein örnekleri SDS-PAGE ile moleküler ağırlıklarına göre ayrıldıktan sonra, nitroselüloz membrana trans-blot transfer cihazı (BIO-RAD Turbo V1.02, ABD) ile transferi yapılmak üzere, SDS-PAGE jeli transfer tamponu içerisine alınarak yaklaşık 10 dakika bekletildi. Bekleme esnasında nitroselüloz membran ve blot filtre kâğıtları aynı şekilde transfer tamponunda bekletildi. Jel, transfer cihazına alttan üste doğru 2 kat blot filtre kâğıdı, nitroselüloz membran, jel, 2 kat blot filtre kâğıdı sırasıyla yerleştirildi. Katlar arasında hava kabarcığı olmamasına dikkat edilerek 25 V'luk gerilimde 30 dakika transferi yapılmıştır. Süre sonunda transfer kalitesini görmek için membrandaki proteinleri boyayan Ponceau S boyası ile boyandı. Boyayı uzaklaştırmak için membran saf su ile yıkandı. Ardından membran, 10 ml TBS-T solüsyonuna 0,5 gr süt tozu ile hazırlanan %5'lik bloklama tamponu içinde oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası bloklama tamponu uzaklaştırılıp, TBS-T ile 15, 5, 5 dakika olacak şekilde 3 kez yıkaması yapıldı.

Kullanılan birincil antikorun tavsiye edilen oranda TBS-T solüsyonuyla 1:1000 oranında seyreltilerek +4°C’de gece boyu inkübe edildi. Ertesi gün aynı şekilde, TBS-T ile 15, 5, 5 dakika yıkamalar yapıldı ve tavsiye edilen şekilde ikincil antikor TBS-T içerisinde 1:10000 oranında seyreltildi, membran bu tampon içerisinde 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi (Tablo 3.5). 1 saatin sonunda aynı yıkama işlemleri tekrarlanarak bağlanmayan antikorlar uzaklaştırılmış oldu. Western blot görüntüleme aşamasında yüksek duyarlılıkta sinyal üretebilen Immun-Star HRP Peroxide çözeltisi (Biorad, ABD) ve Immun-Star HRP Luminol/Enhancer çözeltisi (Biorad, ABD) 1:1 oranında karıştırılarak membran yüzeyinin bu karışım ile temas etmesi sağlandı. Streç film arasına alınan membran, Hypercasette (Amersham, Biosciences) içerisine sabitlendi. Karanlık odada membran üzerinde oluşan ışığı algılayabilecek bir X-Ray filmi yerleştirildi. Sinyal ile yanan film, membran üzerinden alınarak HyperFilm developer solüsyonunda yıkanarak oluşan bantlar izlendi. Ardından su ile yıkandı ve HyperFilm fiksasyon solüsyonunda bekletilerek görüntü sabitlendi. Fiksasyon sonrası film saf su ile yıkanarak gözlenen bantlar analiz edildi.

**Tablo 3.5.** Western Blot analizinde kullanılan birincil ve ikincil antikorların listesi

1° Antikor	2° Antikor
<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ β-Actin Mouse (Santa Cruz, ABD)</li> <li>❖ FTO (Fatso), Mouse (Santa Cruz Biotechnology, ABD)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Goat Anti-Mouse HRP Conjugate, (BioRad, ABD)</li> </ul>

#### 3.4.4. Analizlerde Kullanılan Biyoinformatik Yazılımlar

Anti-FTO ve anti-Beta aktin antikorları ile yapılan western blotlama (WB) sonucu elde edilen band yoğunlukları ImageJ programında (<http://imagej.nih.gov/ij>) analiz edildi. WB band yoğunlukları, hücre canlılık testleri ile m6A seviyesi verilerinin biyoistatistiksel analizi GraphPad Prism 9 (La Jolla, CA, ABD) programı kullanılarak yapıldı. Gruplar arasındaki istatistiksel farklar, örnek dağılımı göz önünde bulundurularak, one-way analysis of variance (ANOVA) ya da two-way ANOVA kullanılarak analiz edildi. 2D jeller üzerindeki proteinlerin analizleri PD Quest Advanced Programı (Bio-Rad, ABD) kullanılarak yapılmıştır.

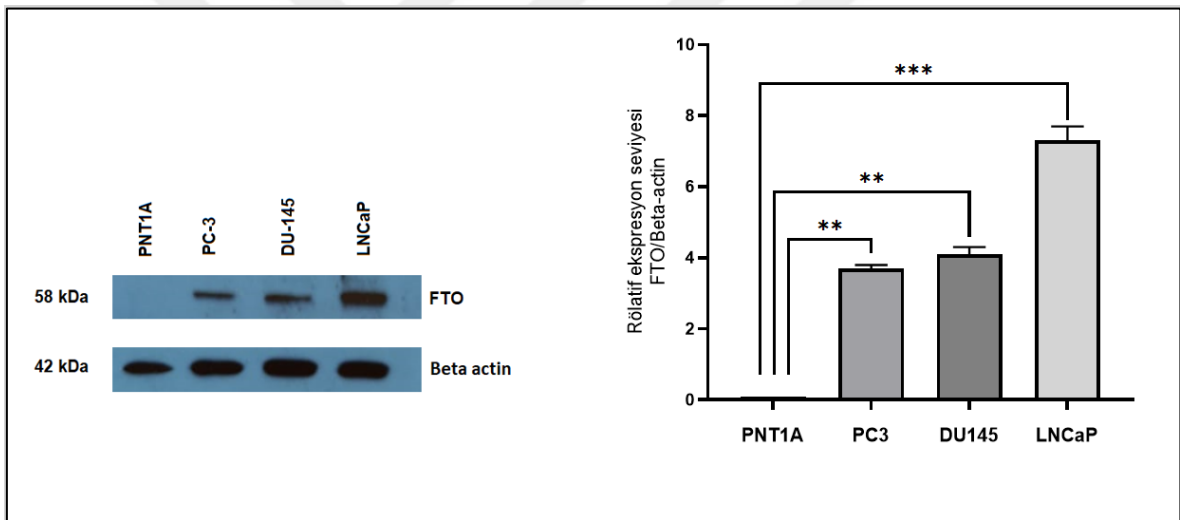
Kullandığımız bu program ile ayrıca proteinlerin jeller üzerindeki yerleri tespit edilerek, protein spotları otomatik olarak kesilmiştir. MALDI-TOF/TOF analizinde ProteinPilot yazılımı (4.0.8085 revizyonu 148085, AB Sciex, Framingham, ABD) kullanılarak MASCOT veritabanında (Matrix Science, Boston, MA, ABD) analiz edildi. Analizde  $p < 0.05$  olarak tanımlanan değerler kabul edildi. Regülasyon oranları ikiden büyük olan proteinler için UniProt erişim numaraları kullanılarak STRING (<https://string-db.org>) analizi yapıldı. Regülasyon oranları değişen proteinlerin PANTHER analizi (Protein Analysis THrough Evolutionary Relationships, <http://PANTHERdb.org/>) kullanılarak gerçekleştirildi.



## 4. BULGULAR

### 4.1 Prostat Kanser Hücre Hatlarında FTO Ekspresyon Seviyelerinin WB Yöntemiyle Belirlenmesi

LNCaP, PC-3, DU-145 hatları en yaygın kullanılmış olan prostat kanseri hücre hatlarıdır. Laboratuvar envanterimizde bulunan farklı prostat kanser hücre hatları olan PC-3, DU-145 ve LNCaP ve sağlıklı prostat hücre hattı olan PNT1A hücrelerinde FTO ekspresyon seviyesini belirlemek istedik. WB ile elde edilen bant yoğunlukları ImageJ yazılımı kullanılarak densitometrik analiz ile ölçüldü ve  $\beta$ -aktine göre normalize edildi. Western blot karşılaştırmalı analizi, en yüksek FTO ekspresyonunun LNCaP hücre hattında olduğunu gösterdi (Şekil 4.1). Bundan sonraki araştırmalarımızı, LNCaP hücre hattında gerçekleştirdik.



**Şekil 4.1.** Prostat hücre dizilerinde FTO ekspresyon seviyelerinin western blot analizi ve bant yoğunluklarının grafiksel gösterimi. Beta-aktin ile normalize edilmiş FTO ekspresyon seviyeleri prostat kanseri hücre dizilerinde kullanılmıştır. (Primer antikolar anti-FTO Ab 1: 1.000; anti-Actin Ab 1: 1.000; Sekonder antikor anti fare HRP 1: 20.000). (\*\*  $p < 0,005$  \*\*\*  $p < 0,001$ ).

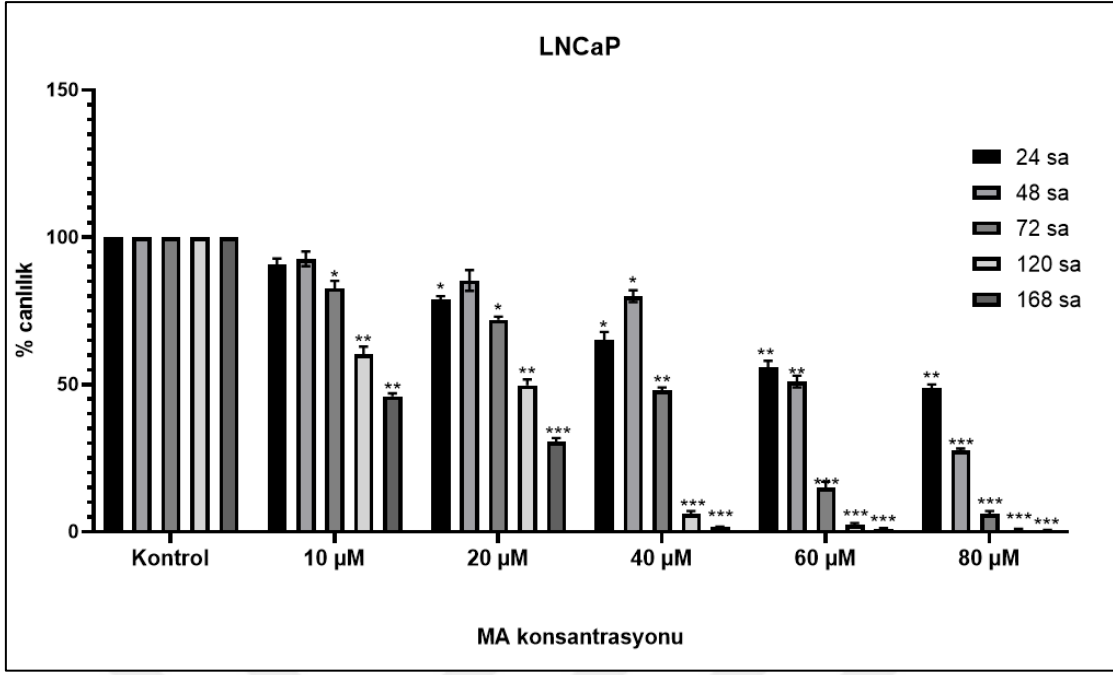
### 4.2. Meklofenamik asitin LNCaP Hücre Canlılığına Etkilerinin Belirlenmesi

Anti-enflamatuar bir ilaç olan meklofenamik asitten 200 mg tartılarak 1000  $\mu$ l DMSO içerisinde çözüldü -20°C'de saklama alındı. Öncesinde -20°C de saklanan bu ilaçlar literatür araştırmaları sonucunda, belirlenen konsantrasyonlarla ön çalışmalar yapılarak uygun dozlar ve süreler belirlendi sonrasında da bu dozlar taze besiyeri ortamına eklenerek, hücrelerin

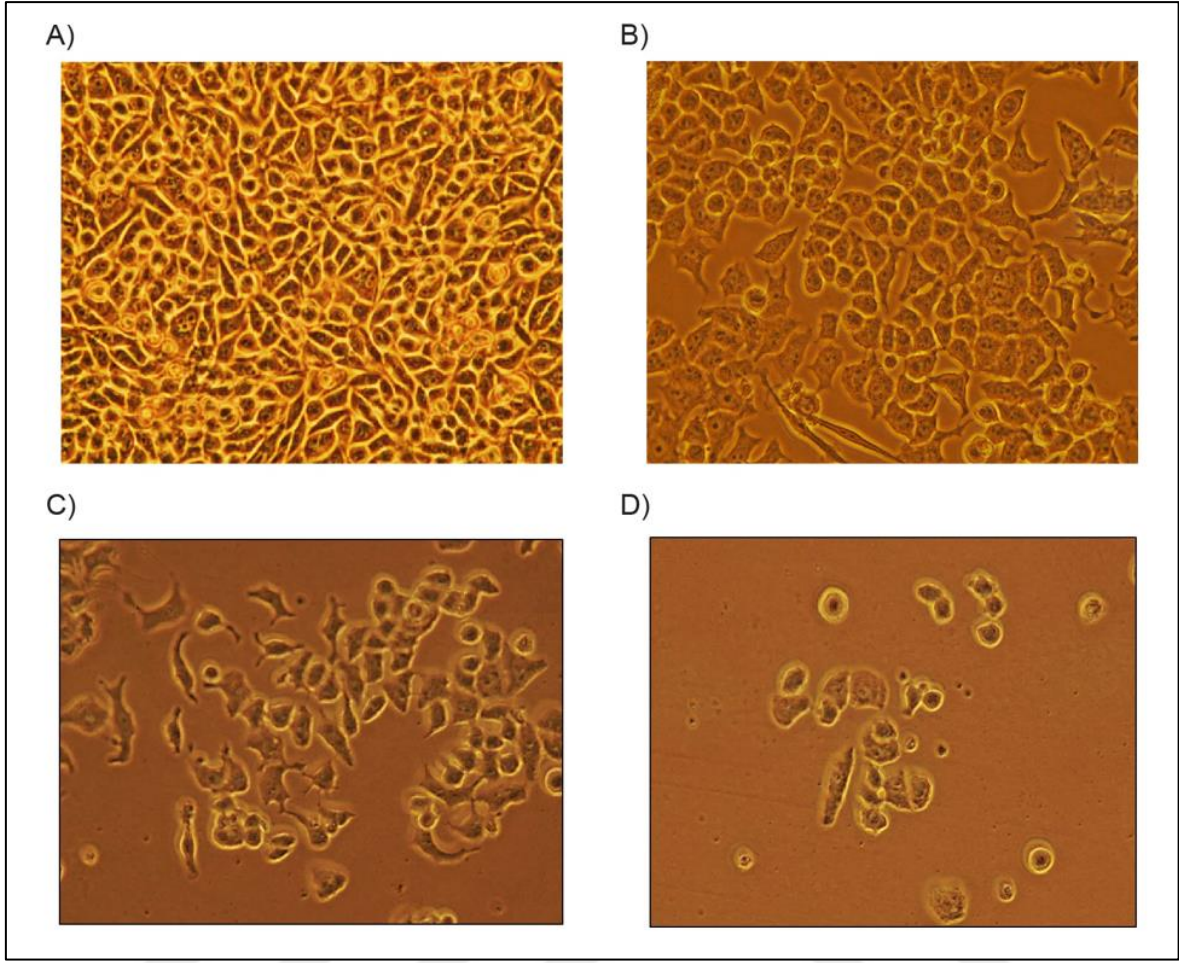
ekimi gerçekleştirildi. Meklofenamik asitin sağlıklı ve kanserli prostat hücrelerindeki canlılığına etkilerini araştırmak için öncelikle farklı bir prostat kanseri hücre hatları olan PC-3 ve DU-145 hatlarında denediğimiz dozlar (15-30-60-90-120-150  $\mu\text{M}$ ) 24 saat ve 48 saat zaman aralıkları için tüm hücrelerde denendi. Bu doz aralıklarında kanser hücreleri için yüzde 50 hücre canlılığı veren uygun dozlar, fazla toksik etki göstermiştir. Bununla birlikte kullandığımız bu dozlar sağlıklı prostat hücre hattı (PNT1A) üzerinde toksik etki göstermemiştir. Yüzde 50 hücre canlılık dozlarını belirleyebilmek için sadece kanser hücreleri için deneyler farklı konsantrasyonlarda artan MA uygulaması olacak şekilde tekrarlanmıştır. Çalışmamızda 24 saat ve 48 saat için LNCaP hücrelerine 0-50-60-70-80-90-100-110  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarda MA uygulanmıştır.

Hücre canlılık deneyleri sonucunda hücre canlılığına %50 etki eden dozların, 1. ve 2. günlerde LNCaP hücreleri için 80 $\mu\text{M}$  ve 60 $\mu\text{M}$  olduğu belirlendi (Şahinöz, Kanlı, 2021).

Bu çalışmanın sonuçlarına dayanılarak LNCaP hücreleri için 10-20-40-60-80  $\mu\text{M}$  MA dozlarının 1 gün, 2 gün, 3 gün, 5 gün ve 7 gün olmak üzere beş farklı zaman diliminde yapılması uygun oldu ve deneyler bu şekilde gerçekleştirildi. Hücre canlılık deneyleri sonucunda hücre canlılığına %50 etki eden dozların, 1.gün, 2.gün, 3.gün, 5.gün ve 7.günler için sırasıyla 80  $\mu\text{M}$ , 60  $\mu\text{M}$ , 40  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$  ve 10  $\mu\text{M}$  olduğu bulundu (Şekil 4.2). MA'nın LNCaP hücreleri üzerine etkisi, ayrıca, mikroskopik olarak da incelenmiştir. MA uygulanmayan ve 24, 72, 120 saat süreyle 80  $\mu\text{M}$  MA uygulanan hücrelerin görüntüleri Şekil 4.3'te verilmiştir. Aynı dozun zamana bağlı olarak, hücre canlılık seviyesinde önemli bir azalmaya neden olduğu görülmektedir.

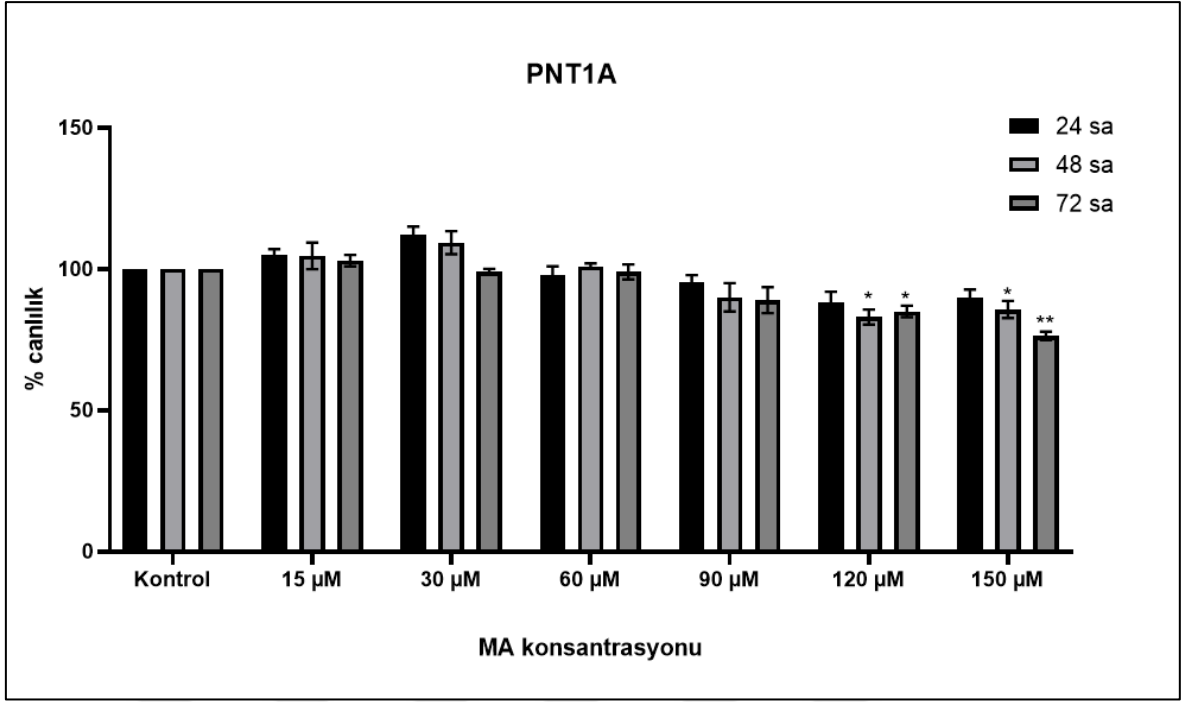


**Şekil 4.2.** MA'nın LNCaP hücre canlılığı üzerine etkisi (\*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,005$ , \*\*\*  $p < 0,001$ )



**Şekil 4.3.** 80 µM MA verilen LNCaP hücrelerinin inverted mikroskopi görüntüleri A) Kontrol, B) 24 saat- C) 72 saat-, D) 120 saat (40x).

MA'nın kanser hücre canlılığına etkisi belirlendikten sonra daha önce uyguladığımız 15-30-60-90-120-150 µM MA konsantrasyonlarının sağlıklı prostat PNT1A hücreleri üzerindeki etkileri araştırıldı. PNT1A hücreleri ile yapılan tripan mavisi testi sonucunda 120 ve 150 µM hariç tüm diğer MA konsantrasyonlarında hücre canlılığının %90'ın üzerinde olduğu ve istatistiksel olarak önemli bir fark olmadığı belirlendi (Şekil 4.4). Sadece 48 ve 72 saatlik zaman dilimlerinde 120 µM ve 150 µM MA uygulanan hücrelerin canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu görüldü ( $p < 0,05$ ). Bu sonuçlar, MA'nın 120 µM altındaki konsantrasyonlarda sağlıklı hücelere toksik etki göstermezken kanser hücrelerinin canlılığında önemli bir azalmaya neden olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.4. MA'nın PNT1A hücre canlılığı üzerine etkisi (\* p<0,05 \*\* p<0,005)

#### 4.3. LNCaP Hücrelerinin Meklofenamik Asit ile Muamale Sonrası Global m6A Seviyelerinin Belirlenmesi

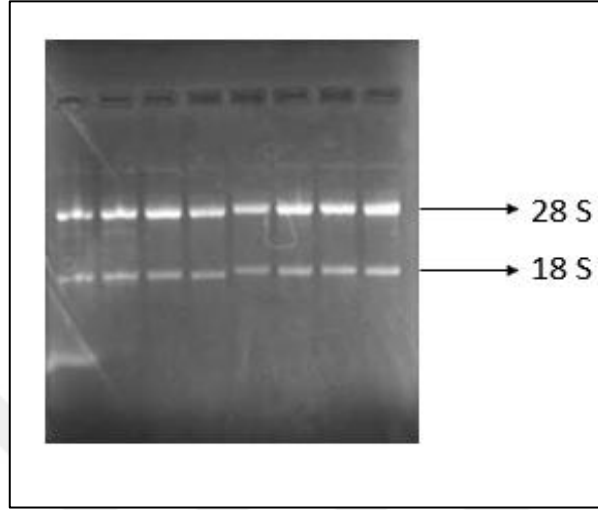
Hücre canlılığı testleri sonuçlarına göre belirlenen gün ve dozlarda MA uygulaması tablo 4.1'de gösterildiği gibi yapılarak bu ilacın LNCaP hücrelerinde m6A seviyesine etkisi analiz edildi (Tablo 4.1). Belirlenen konsantrasyonda ilaç uygulaması sonrasında uygulama süresi bitiminde hücrelerden önce RNA izolasyonu yapıldı, daha sonra da ticari olarak satın alınmış olan m6A RNA Metilasyon Kantifikasyon Kiti kullanılarak %m6A oranları belirlendi.

**Tablo 4.1.** LNCaP hücre hattındaki canlılık testi sonuçlarına göre belirlenmiş olan günler ve uygulanan dozlar.

MA uygulama süresi	MA konsantrasyonu
1 gün	80 µM
2 gün	60 µM
3 gün	40 µM
5 gün	20 µM
7 gün	10 µM

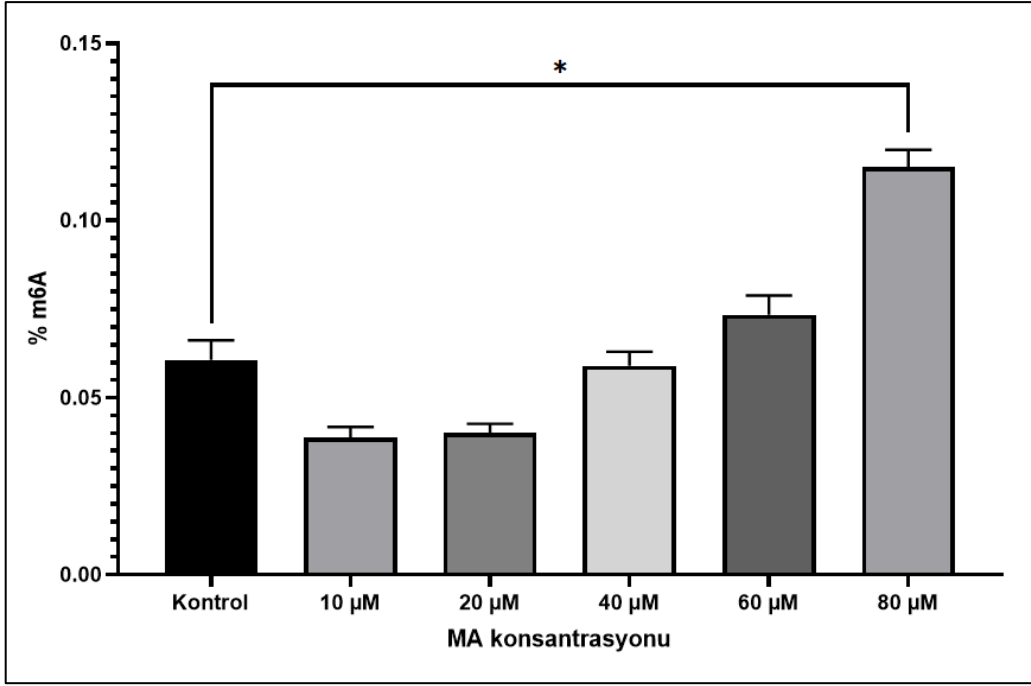


Kantifikasyon öncesinde RNA konsantrasyonları nanodrop ile ölçüldükten sonra izole edilen RNA'ların kalitesi %1'lik formaldehit agaroz jel ile kontrol edildi (Şekil 4.5). Formaldehit agaroz jel üzerindeki 18S ve 28S rRNA bantlarının görülmüş olması RNA kalitesinin bu çalışma için uygun olduğunu gösterdi.



**Şekil 4.5.** RNA'nın %1'lik formaldehitli RNA agaroz jel elektroforezi ile analizi.

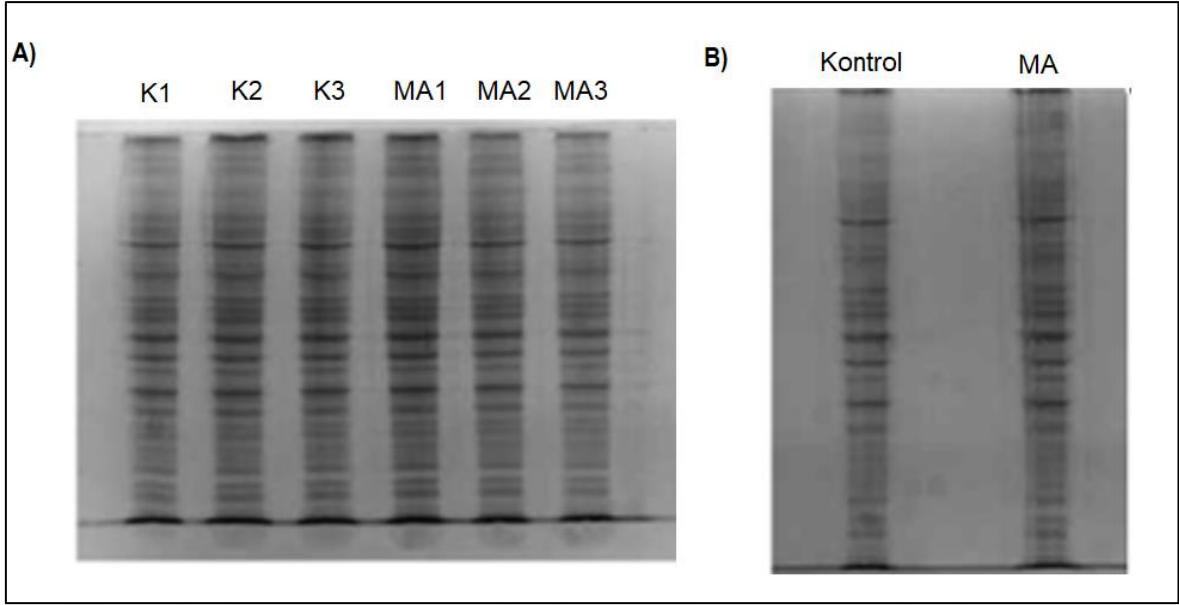
RNA örneklerinin konsantrasyonu belirlendikten sonra üretici firmanın önerdiği protokol takip edilerek %m<sup>6</sup>A değerleri hesaplandı. Kısaca, her bir kuyucuğa 200 ng toplam RNA eklendi ve yakalama antikor çözeltisi ve saptama antikor çözeltisi, üreticinin protokolüne göre eklendi. 450 nm dalga boyunda her kuyucuğun absorbansı ölçülerek optik yoğunluklar belirlendi ve %m<sup>6</sup>A değerleri hesaplandı (Şekil 4.6). Yapılan analizlerin sonuçlarına göre MA verilen hücrelerde 1. gün sonunda m<sup>6</sup>A oranında çok belirgin bir değişiklik olmamakla birlikte yaklaşık 2 kat artırdığı, 2. ve 3. gün sonunda bir etki göstermediği, 5. ve 7. günlerde ise m<sup>6</sup>A oranını azalttığı görüldü. Amacımız FTO'nun baskılanması sonucu m<sup>6</sup>A miktarının artması ve bunun hücre proteomu üzerindeki etkilerini araştırmak olduğu ve aldığımız sonuçların 1 günlük sürede ve 80 µM'lık dozda muamele sonrasında m<sup>6</sup>A'nın arttığı sonucunu aldığımız için, proteom çalışmalarımızı 1 günlük süre ve 80µM olacak şekilde gerçekleştirildi. MA uygulanmamış ve MA uygulanmış hücreleri günlere göre kendi içlerinde karşılaştırdığımızda da beklenildiği gibi MA verilmeyen grupta günler arasında m<sup>6</sup>A oranında bir değişiklik yokken MA verilen grupta zamana bağlı olarak m<sup>6</sup>A oranında düşüş görülmüştür.



Şekil 4.6. LNCaP hücrelerinde m<sup>6</sup>A seviyesine MA'nın etkisi (\* p<0,05)

#### 4.4. Meklofenamik Asitin LNCaP hücre Proteomu Üzerine Etkileri

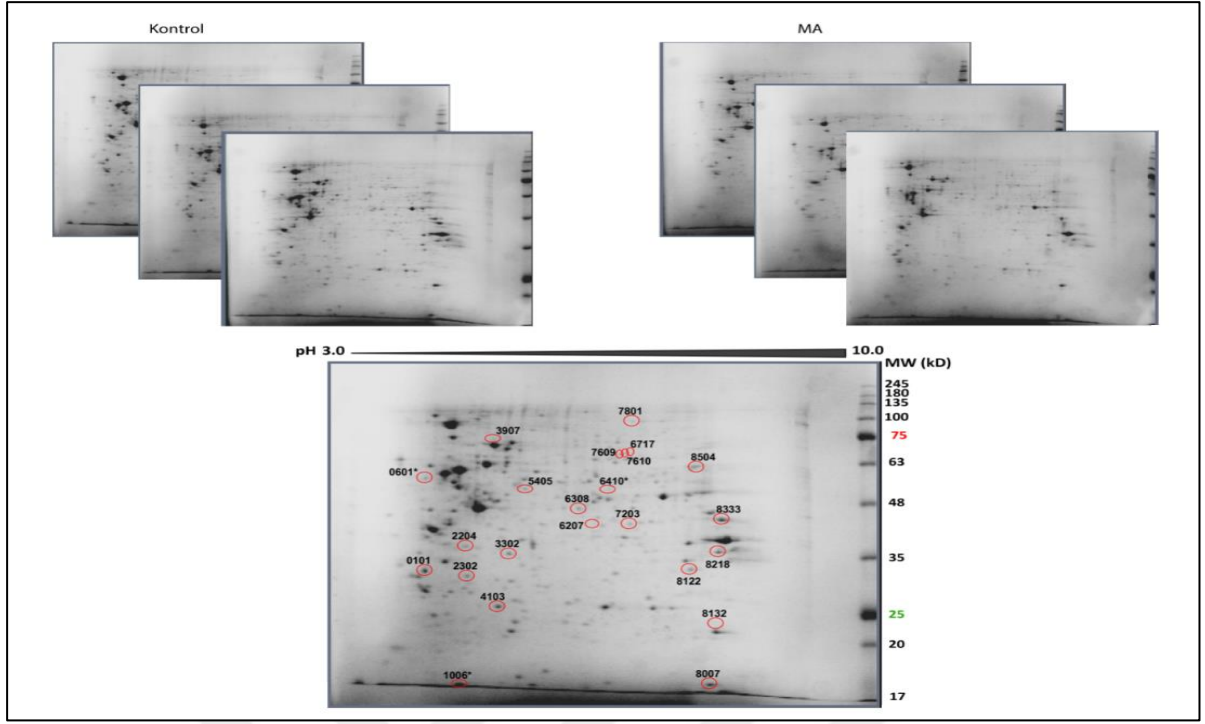
Sadece 1 gün MA uygulanan hücrelerde m<sup>6</sup>A oranında diğer günlere göre artış görüldüğünden, bu ilacın hücre proteomu üzerindeki etkilerini çalışmak üzere bu zaman dilimi ve MA konsantrasyonu seçilmiştir. Öncelikle daha büyük çaplı bir çalışma için çok sayıda hücreye ihtiyaç olduğu için hücreler çoğaltıldı. Her kültür kabına 4.000.000 hücre olacak şekilde kontrol grubu ve MA-uygulanan deney grubu için üçer adet T-175 flaska LNCaP hücre ekimi yapıldı. Ertesi gün deney grubunun besiyeri içeriğinde 80 µM konsantrasyonda MA olacak şekilde besiyeri değişimi yapıldı. Kontrol grubunun besiyeri taze besiyeri ile değiştirildi ve 24 saatlik bir inkübasyon sonucunda hücreler toplanarak bu hücrelerden protein örnekleri hazırlandı. Hazırlanan protein örneklerinin konsantrasyonları belirlendikten sonra protein kaliteleri ve miktarlarının doğruluğu bir boyutlu SDS-PAGE çalışması yapılarak kontrol edilmiştir (Şekil 4.7). SDS-PAGE jeli üzerindeki temiz bantlar sayesinde protein örneklerinin WB, 2-DE ve MALDI TOF/TOF çalışmalarında kullanılabileceği görülmüştür.



**Şekil 4.7.** Kontrol ve MA grubuna ait proteinlerin SDS-PAGE analizi. A) Kontrol ve MA gruplarının üçer deneysel tekrarlarına ait protein örnekleri B) Kontrol ve MA grubu protein havuzlarına ait protein örnekleri (K1-K3: MA uygulanmamış hücreler, MA1-MA3: MA uygulanmış hücreler)

Meklofenamik asit verilen hücrelerin proteomunda meydana gelen değişiklikler 2-DE yapılarak gözlemlendi. Hücre kültürlerinden elde edilen protein örnekleri 2 grubun 3'er tekrarı olacak şekilde, 17 cm'lik jeller kullanılarak izoelektrik noktalarına göre fokuslamaya tabi tutuldu. Fokuslama işlemi sonrasında, ikinci boyutta ayrıştırılan proteinler koloidal Comassie Brilliant Blue-G250 boyası ile boyanarak görüntülemeleri yapılmıştır (Şekil 4.8). Gruplar arasında regülasyon katı ikiden fazla olan spotlar belirlenerek 24 adet protein spotu kesildi. Bu spotlar jel içi triptik kesim yöntemi ile kesildikten sonra MALDI-TOF/TOF analizi ile tanımlandı (Tablo 4.2). Bu proteinlerden 21 tanesi tanımlanabilirken skorları çok düşük olan 3 protein tanımlanamamıştır. Tanımlanamayan protein spotları Şekil 4.8'de SSP numaralarının yanına yıldız (\*) konularak gösterilmiştir. Tablo 4.2'de verilen protein skorları incelendiğinde buradaki spotlardan 19'unun beklenen skorları (expectation score) yüksek olup, Q9BQ04 (RBM4B\_HUMAN) ve Q6IBS0 (RBM4\_HUMAN) proteinlerinin MALDI skorları daha düşüktür ancak iyon skorları yüksek olduğu için değerlendirmeye alınmıştır. Tanımlanan proteinlerin regülasyon oranları Tablo 4.4'te verilmiştir.

Kontrol grubu ile karşılaştırdığımızda MA uygulanan grupta Splicing factor, arginine/serine-rich 1 (SFRS1), Chloride intracellular channel protein 1 (CLIC1), Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1 (UCHL1), Actin-related protein 3 (ARP3), Splicing factor, arginine/serine-rich 3 (SFRS3), RNA-binding protein 4 (BM4), RNA-binding protein 4B (RBM4B), Adenosylhomocysteinase (SAHH), Cleavage stimulation factor subunit 1 (CSTF1), WD repeat-containing protein 1 (WDR1), Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial (DHSA), Elongation factor 2 (EF2), Cofilin-1 (COF1), Proteasome subunit beta type-1 (PSB1), Pyruvate kinase isozymes M1/M2 (KPYM) ve Fructose-bisphosphate aldolase A (ALDOA) proteinlerin ifade düzeyinde azalma varken sadece Heat shock cognate 71 kDa protein (HSP7C)'nin ifade düzeylerinde artış görüldü. Tropomyosin alpha-3 chain (TPM3), Inorganic pyrophosphatase (IPYR), Adenosylhomocysteinase (SAHH), Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1 (GBLP) ve L-lactate dehydrogenase A chain (LDHA) proteinlerin ifade düzeylerinde azalma olmakla birlikte 2-kat regülasyon kriterinin altında kaldığı için değerlendirilmemiştir. MALDI-TOF/TOF ile tanımlanan proteinlerin ortaya çıkan regülasyon oranlarının görsel olarak gösterilebilmesi adına spotların jeller üzerinde yakın çekim görüntüleri alındı ve yakın çekimlerin değerlendirilmesi QuantityOne (Bio-Rad, ABD) yazılımı ile yapıldı (Şekil 4.9 ve Şekil 4.10).



**Şekil 4.8.** LNCaP hücre hattında meydana gelen proteom düzeyindeki değişikliklere ait 2-DE görüntüsü. (\* Tanımlanamayan proteinler.)

**Tablo 4.2.** Tanımlanan proteinlerin isimleri ve 2-DE deneyi sonucunda tespit edilen spotlara ait MALDI skorları.

SSP No	Swiss-prot Acc. No.	Best Prot. Acc.	Best Prot. Mass	Best Prot. Score	Expectation score	Matches	Calculated pI	Seq. Cov. (%)	Best Prot. Description
0101	P06753	TPM3_HUMAN	32799	294	8,10E-26	16	4,68	32	Tropomyosin alpha-3 chain
2204	Q07955	SFRS1_HUMAN	27728	372	1,30E-33	20	10,37	47	Splicing factor, arginine/serine-rich 1
2302	O00299	CLIC1_HUMAN	26906	591	1,60E-55	18	5,09	55	Chloride intracellular channel protein 1
3302	Q15181	IPYR_HUMAN	32639	486	5,10E-45	22	5,54	67	Inorganic pyrophosphatase
3907	P11142	HSP7C_HUMAN	70854	166	5,1e-013	14	5,37	22	Heat shock cognate 71 kDa protein
4103	P09936	UCHL1_HUMAN	24808	456	5,1e-042	17	5,53	59	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1
5405	P61158	ARP3_HUMAN	47341	673	1,00E-63	33	5,61	51	Actin-related protein 3
6006	P84103	SFRS3_HUMAN	19318	88	3,2e-005	14	11,64	46	Splicing factor, arginine/serine-rich 3
6207	Q9BQ04	RBM4B_HUMAN	40124	58	0,032	13	6,28	25	RNA-binding protein 4B
6308	P23526	SAHH_HUMAN	47685	581	1,6e-054	33	5,92	41	Adenosylhomocysteinase
6717	Q05048	CSTF1_HUMAN	48327	372	1,3e-033	22	6,12	46	Cleavage stimulation factor subunit 1
7203	Q6IBS0	RBM4_HUMAN	40289	70	0,0018	14	6,37	35	RNA-binding protein 4
7609	O75083	WDR1_HUMAN	66152	207	4,00E-17	25	6,17	28	WD repeat-containing protein 1
7610	P31040	DHSA_HUMAN	72645	301	1,6e-026	31	6,17	28	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial
7801	P13639	EF2_HUMAN	95277	302	1,3e-026	40	6,41	33	Elongation factor 2

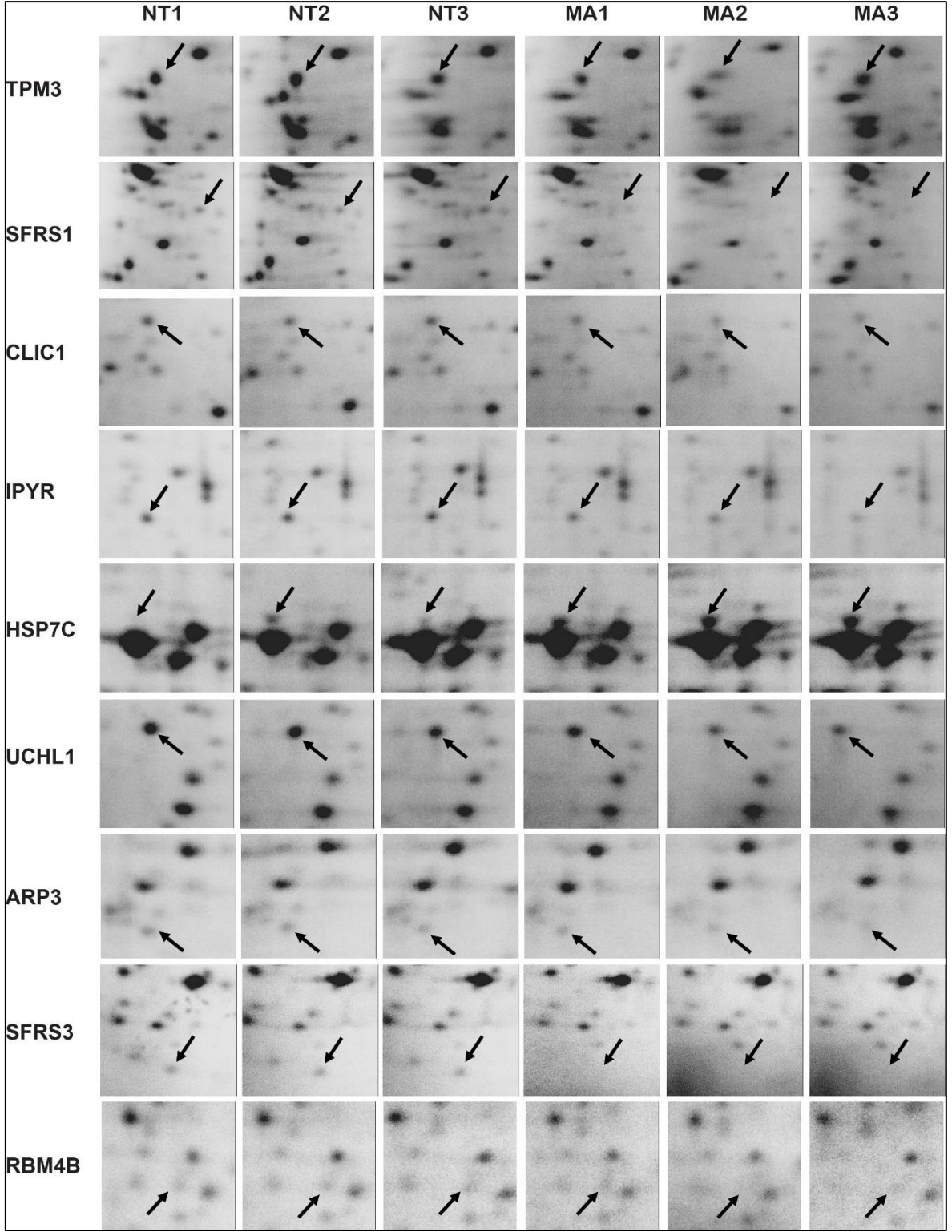
**Tablo 4.3.**Tanımlanan proteinlerin isimleri ve 2-DE deneyi sonucunda tespit edilen spotlara ait MALDI skorları (devamı).

SSP No	Swiss-prot Erişim Numarası	Protein Adı	Protein Kütlesi	Protein Skoru	Beklenen Skor	Eşleşme	pI Değeri	(%)	Protein Tanımı
8007	P23528	COF1_HUMAN	18491	428	3.2e-039	14	8,22	33	Cofilin-1
8122	P63244	GBLP_HUMAN	35055	669	2.6e-063	25	7,6	60	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1
8132	P20618	PSB1_HUMAN	26472	468	3.2e-043	19	8,27	51	Proteasome subunit beta type-1
8218	P14618	KPYM_HUMAN	57900	732	1.3e-069	33	7,96	52	Pyruvate kinase isozymes M1/M2
8333	P04075	ALDOA_HUMAN	39395	599	2.6e-056	24	8,3	48	Fructose-bisphosphate aldolase A
8504	P00338	LDHA_HUMAN	36665	370	2e-033	28	8,44	48	L-lactate dehydrogenase A chain

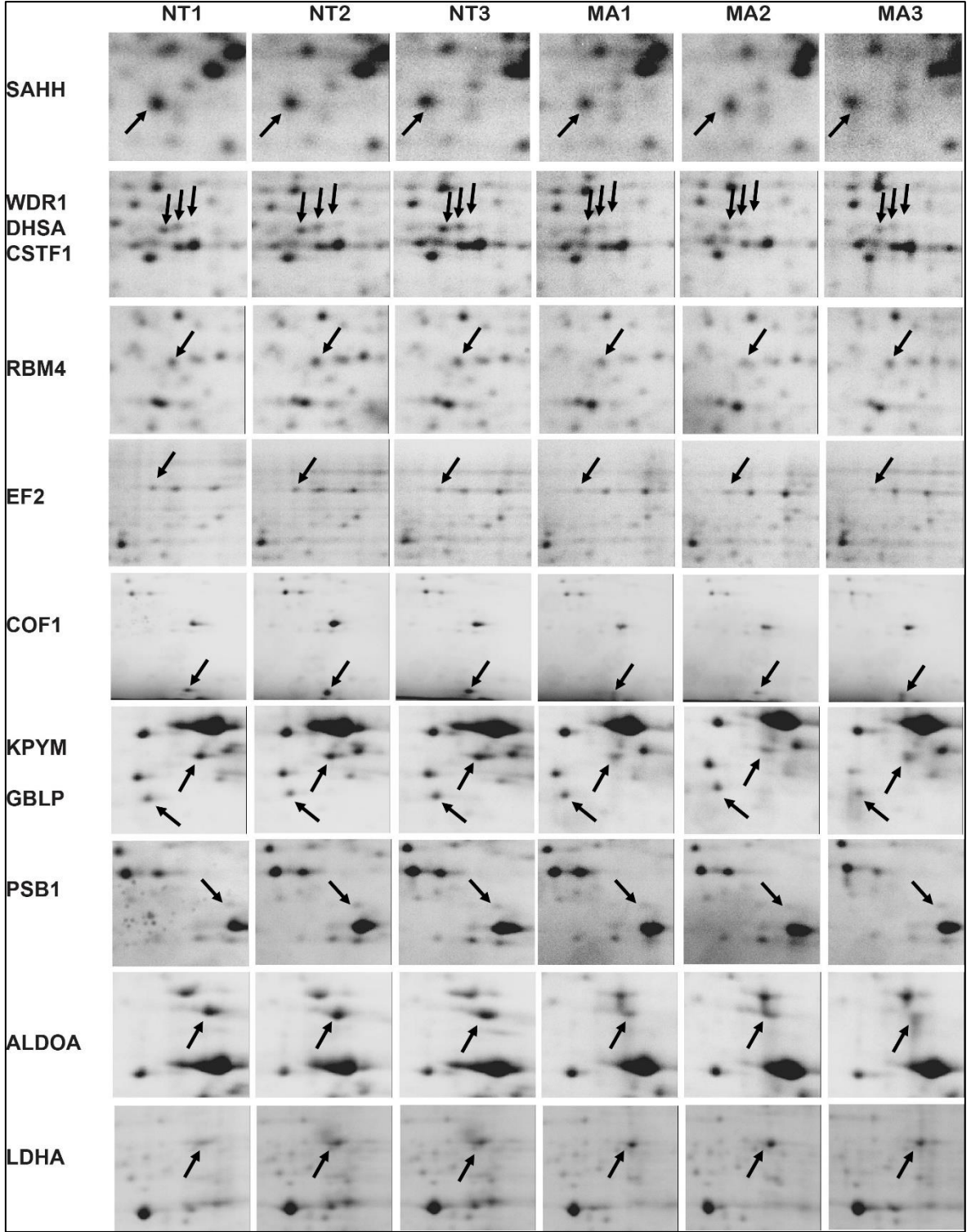
**Tablo 4.4.** MALDI-TOF/TOF ile tanımlanan proteinlerin hesaplanmış regülasyon oranları. Kont/MA: Kontrol grubuna göre MA grubundaki regülasyon, ↓:Azalma, ↑: Artış ↓:  $2 \leq x < 5$ , ↓↓: $5 \leq x < 10$ , ↓↓↓:  $10 \leq x < 50$ , ↓↓↓↓:  $50 \leq x$ , ↑↑:  $5 > x > 10$ , NR: Regülasyon yok.

Protein Tanımı	NT/MA Regülasyon oranı	NT/MA Regülasyon yönü
Tropomyosin alpha-3 chain	NR	-
Splicing factor, arginine/serine-rich 1	23	↓↓↓
Chloride intracellular channel protein 1	2	↓
Inorganic pyrophosphatase	NR	-
Heat shock cognate 71 kDa protein	8	↑↑
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	2	↓
Actin-related protein 3	5	↓↓
Splicing factor, arginine/serine-rich 3	76	↓↓↓↓
RNA-binding protein 4B	5	↓↓
Adenosyl homocysteinase	NR	-
Cleavage stimulation factor subunit 1	31	↓↓↓
RNA-binding protein 4	2	↓
WD repeat-containing protein 1	4	↓
Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mit.	5	↓↓
Elongation factor 2	6	↓↓
Cofilin-1	2	↓
Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1	NR	-
Proteasome subunit beta type-1	3	↓
Pyruvate kinase isozymes M1/M2	3	↓
Fructose-bisphosphate aldolase A	5	↓↓
L-lactate dehydrogenase A chain	NR	-



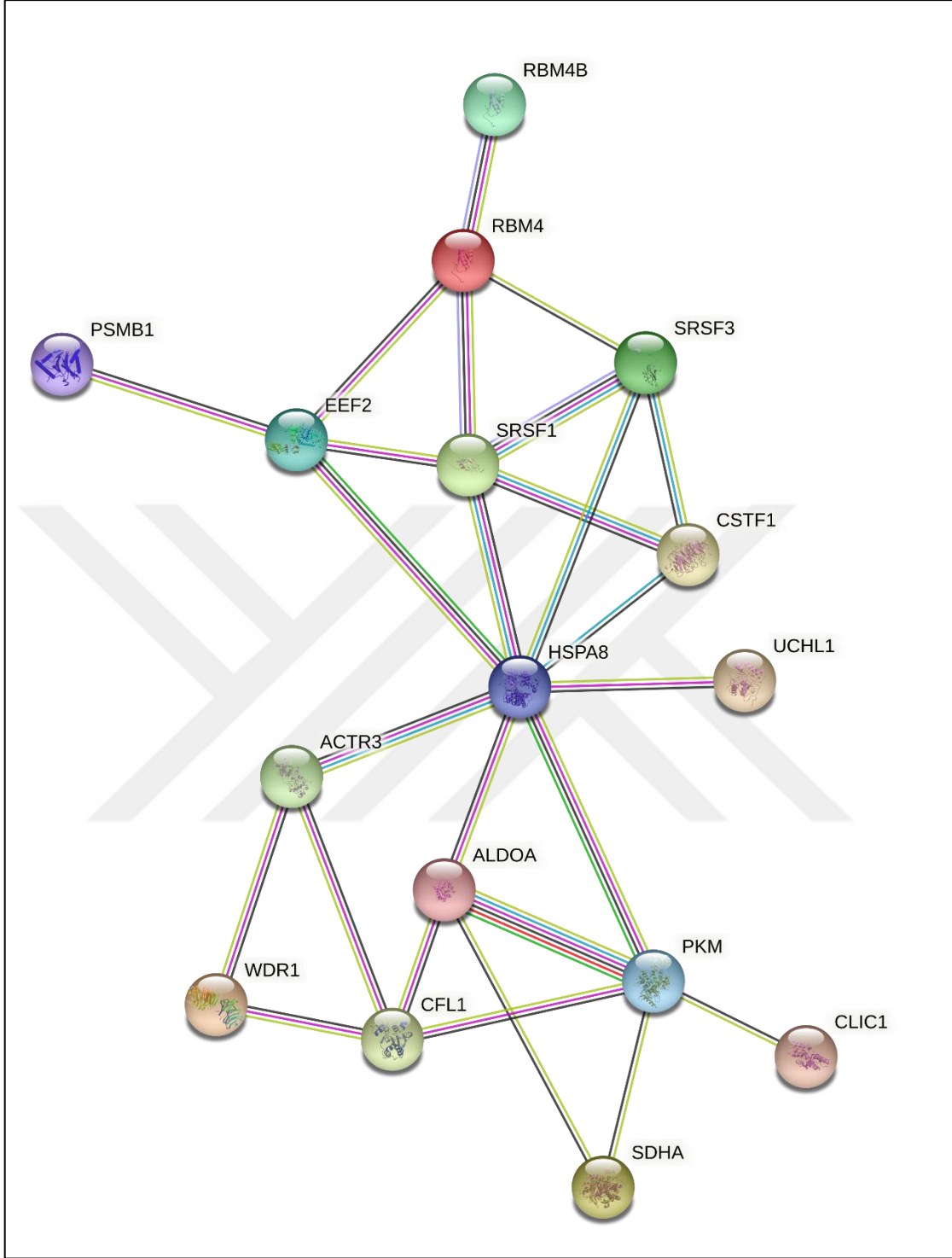


**Şekil 4.9.**MALDI-TOF/TOF ile tanımlanan protein spotlarının jeller üzerinde yakın çekim görüntüleri (TPM3, SFRS1, CLIC1, IPYR, HSP7C,UCHL1, ARP3, SFRS3, RBM4B).

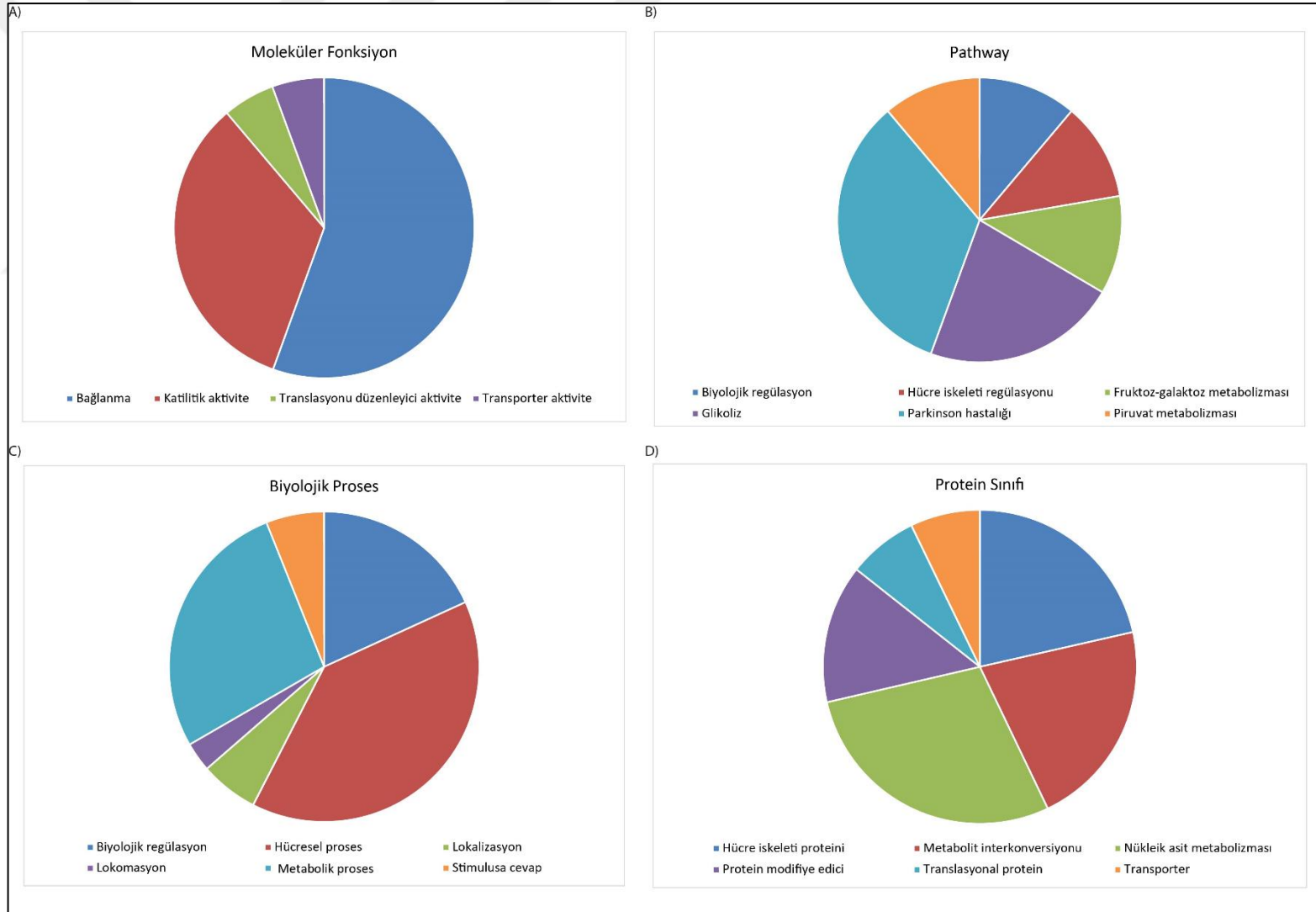


**Şekil 4.10.** MALDI-TOF/TOF ile tanımlanan protein spotlarının jeller üzerinde yakın çekim görüntüleri (SAHH, WDR1, DHSA, CSTF1, RBM4, EF2, COF1, KPYM, GBLP, PSB1, ALDOA, LDHA)

2-DE deneylerinde tanımlanan ve farklı şekilde regüle olduğu tespit edilen proteinler STRING analizine tabi tutuldu. 1. ve 2. kabuklar için maksimum etkileşim sayısı dikkate alınmadan gerçekleştirilen STRING analizi, 16 düğümlü tek metabolik ağ oluşturmuştur (Şekil 4.11). Tanımladığımız proteinler arasında neredeyse tamamının birbirleri ile ilişkili olduğu ve ilintili yollarda görev aldıkları görüldü. Regülasyonlarında farklılıkları görülen bu proteinlerin karbon ve RNA metabolizmasının yanı sıra hücre iskeleti yapısının şekillenmesinde rol oynadığı görülmüştür. Bu proteinlerden ALDOA, PKM ve SDH karbon metabolizması ile ilişkili olan proteinler olup bunlardan ikisi (ALDOA ve PKM) glikoliz ve glukoneogenezin yanı sıra amino asit biyosentezinde ve nükleotid katabolik süreçlerde de rol oynamaktadır. Tanımlanan proteinlerden beşi (CSTF1, SRSF1, SRSF3, RBM4, RBM4B) mRNA işlenmesi (mRNA splicing, mRNA 3'-uç proseslenmesi) ile ilişkili olup bunlardan ikisinin (SRSF1 ve SRSF3) mRNA transportunda yer aldığı görülmektedir. ARP3, COF1 ve WDR1 proteinleri de hücre iskeletinin organizasyonu, özellikle aktin filament organizasyonu ile ilişkilendirilmiştir. Tanımlanan proteinlerden PSB, UCHL1 ve HSPA8 (HSC71) proteinlerinin metabolizmasıyla, EF2'nin ise translasyon ile ilişkili olduğu bulundu. Bu proteinlerin fonksiyonel analizlerini yapabilmek için proteinler ile ilgili bilgiler PANTHER veri bankasından da araştırıldı. Tanımlanan proteinlerin çoğunluğunu bağlanma ve katalitik aktivite gösteren proteinler oluştururken az bir kısmını da translasyonu düzenleyici ve transport aktivitesi olan proteinlerin oluşturduğu belirlendi (Şekil 4.12 ve Tablo 4.6). Bu proteinlerin hangi metabolik yollarda yer aldığına baktığımızda çoğunlukla Parkinson hastalığı, enerji metabolizması (glikoliz, piruvat metabolizması, fruktoz-galaktoz metabolizması) olmakla birlikte hücre iskeletinin organizasyonunda yer aldıkları görülmektedir. Aynı proteinler görev aldıkları biyolojik görevlere göre sınıflandırıldığında ağırlıklı olarak hücre işlemler, metabolik yollar ve biyolojik regülasyon olmak üç temel görevle karşımıza çıkmaktadır. Bunların yanı sıra stimulusa cevap, hücre içi hareket ve lokalizasyon ile ilişkili proteinler de dikkati çekmektedir (Şekil 4.12 ve Tablo 4.6). Bu proteinleri protein sınıflarına göre değerlendirdiğimizde ise proteinlerin çoğunu nükleik asit metabolizması ile ilişkili proteinler, metabolik enzimler ve hücre iskeleti proteinleri olduğu görülmüştür. Bunların yanı sıra protein modifiye edici enzimler, translasyonel ve transporter proteinler de yer alır (Şekil 4.12 ve Tablo 4.6).



**Şekil 4.11** Regülasyonlarında farklılık görülen proteinlerin STRING analizi



Şekil 4.12 Regülasyonlarında farklılık görülen proteinlerin PANTHER analizi

**Tablo 4.5.** PANTHER Analizine göre proteinlerin moleküler fonksiyon,yolak,biyolojik işlemler ve protein sınıflarını gösteren tablo.

Moleküler Fonksiyon	Oran (%)	Proteinler
Bağlanma	62,5	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Cofilin-1</li> <li>•Heat shock cognate 71 kDa Protein</li> <li>•RNA-binding protein 4</li> <li>•RNA-binding protein 4B</li> <li>•Cleavage stimulation factor subunit 1</li> <li>•WD repeat-containing protein 1</li> <li>•Serine/Arginine-rich splicing factor 1</li> <li>•Serine / Arginine -rich splicing factor 3</li> </ul>




		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Actin-related protein 3</li> <li>• Elongation factor 2</li> </ul>
<p>Katalitik aktivite <a href="http://www.pantherdb.org/list/list.do?chartCategoryAcc=GO:0003824&amp;chartCategoryType=1&amp;filterLevel=1&amp;listType=1">http://www.pantherdb.org/list/list.do?chartCategoryAcc=GO:0003824&amp;chartCategoryType=1&amp;filterLevel=1&amp;listType=1</a></p>	37,5	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Heat shock cognate 71 kDa Protein</li> <li>• Fructose - bisphosphate aldolase A</li> <li>• Pyruvate kinase PKM</li> <li>• Elongation factor 2</li> <li>• Proteasome subunit beta type-1</li> <li>• Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase Isozyme L1</li> </ul>
<p>Translasyonel regülatör aktivite <a href="http://www.pantherdb.org/list/list.do?chartCategoryAcc=GO:0045182&amp;chartCategoryType=1&amp;filterLevel=1&amp;listType=1">http://www.pantherdb.org/list/list.do?chartCategoryAcc=GO:0045182&amp;chartCategoryType=1&amp;filterLevel=1&amp;listType=1</a></p>	6,3	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Elongation factor 2</li> </ul>
Transport aktivite	6,3	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Chloride intracellular channel protein</li> </ul>
<b>Yolak</b>	<b>Oran</b>	<b>Proteinler</b>

	( %) )	
Biyolojik Regülasyon	6,3	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Heat Shock Cognate 71 kDa Protein</li> </ul>
Rho GTPase aracılı hücre iskeleti regülasyonu	6,3	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cofilin-1</li> </ul>
Fruktoz galaktoz metabolizması	6,3	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fructose - bisphosphate aldolase A</li> </ul>
Glikoliz	12,5	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fructose - bisphosphate aldolase A</li> <li>• Piruvat e kinase PKM</li> </ul>
Parkinson hastalığı	18,8	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Heat shock cognate 71 kDa protein</li> <li>• Proteasome subunit beta type-1</li> <li>• Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase Isozyme L1</li> </ul>
Piruvat metabolizması <a href="http://www.pantherdb.org/list/list.do?chartCategoryAcc=P02772&amp;chartCategoryType=3&amp;filterLevel=1&amp;listType=1">http://www.pantherdb.org/list/list.do?chartCategoryAcc=P02772&amp;chartCategoryType=3&amp;filterLevel=1&amp;listType=1</a>	6,3	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Piruvat e kinase PKM</li> </ul>



Biyolojik İşlem	Oran (%)	Proteinler
Biyolojik regülasyon	37,5	<ul style="list-style-type: none"> <li>• RNA-binding protein 4</li> <li>• RNA-binding protein 4B</li> <li>• WD repeat-containing protein 1</li> <li>• Serine/Arginine-rich splicing factor 1</li> <li>• Serine / Arginine -rich splicing factor 3</li> <li>• Actin-related protein 3</li> </ul>
Hücresel işlem	81,3	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cofilin-1</li> <li>• Heat shock cognate 71 kDa protein</li> <li>• RNA-binding protein 4</li> <li>• RNA-binding protein 4B</li> </ul>

		<ul style="list-style-type: none"> <li>• WD repeat-containing protein 1</li> <li>• Serine/Arginine-rich splicing factor 1</li> <li>• Serine / Arginine-rich splicing factor 3</li> <li>• Fructose - biphosphate aldolase A</li> <li>• Pyruvate kinase PKM</li> <li>• Actin-related protein 3</li> <li>• Elongation factor 2</li> <li>• Proteasome subunit beta type-1</li> <li>• Ubiquitin carboxyl-terminal Hydrolase Isozyme L1</li> </ul>
<p>Lokalizasyon <a href="http://www.pantherdb.org/list/list.do?chartCategoryAcc=GO:0051179&amp;chartCategoryType=2&amp;filterLevel=1&amp;listType=1">http://www.pantherdb.org/list/list.do?chartCategoryAcc=GO:0051179&amp;chartCategoryType=2&amp;filterLevel=1&amp;listType=1</a></p>	<p>12,5</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cofilin-1</li> </ul>

		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Heat Shock Cognate 71 kDa Protein</li> </ul>
Lokomasyon	6,3	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cofilin-1</li> </ul>
Metabolik işlem	56,3	<ul style="list-style-type: none"> <li>• RNA-Binding Protein 4</li> <li>• RNA-Binding Protein 4B</li> <li>• Serine/Arginine-rich splicing factor 1</li> <li>• Serine / Arginine e-rich splicing factor 3</li> <li>• Fructose - Bisphosphate Aldolase A</li> <li>• Pyruvate kinase PKM</li> <li>• Elongation factor 2</li> <li>• Proteasome subunit beta type-1</li> <li>• Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase</li> </ul>

		Isozyme L1
Stimulusu cevap	12,5	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Heat shock cognate 71 kDa Protein</li> <li>• Pyruvat e kinase PKM</li> </ul>
<b>Protein Sınıfı</b>	<b>Oran (%)</b>	<b>Proteinler</b>
Hücre iskeleti proteini	18,8	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cofilin-1</li> <li>• Actin-related protein 3</li> <li>• WD repeat-containing protein 1</li> </ul>
Metabolik interkonversiyon enzim	18,8	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fructose-bisphosphate aldolase A</li> <li>• Pyruvat e kinase PKM</li> <li>• Succinat e dehydrogenase [Ubiquinone]</li> </ul>
Nükleik asit metabolizma proteini	25	<ul style="list-style-type: none"> <li>• RNA-binding protein 4</li> <li>• RNA-binding</li> </ul>

		protein 4B • Serine/ Arginin e rich splicing factor 1 • Serine/ Arginin e- rich splicing factor 3
Protein modifiye edici enzim	12, 5	• Proteaso me subunit beta type-1 • Ubiquiti n carboxy l- terminal hydrolas e Isozyme L1
Translasyonel protein	6,3	• Elongati on factor 2

## 5. TARTIŞMA

Kanser, vücuttaki bazı hücrelerin kontrolsüz bir şekilde büyüdüğü ve vücudun diğer bölgelerine yayılan bir hastalıktır (Assanpour,Dehghani,2017). Erkeklerde görülen kanser türlerinin sık görülenleri sırasıyla prostat, akciğer, bronş, kolon, rektum ve mesanededir. Kadınlarda kanser prevalansı sırasıyla meme, akciğer ve bronş, kolon, rektum, uterus korpusu ve tiroiddedir. Bu veriler, prostat ve meme kanserinin sırasıyla erkeklerde ve kadınlarda kanserin en büyük dilimini oluşturduğunu gösterir (Siegel, Miller & Jemal, 2016). Bilim insanları, kanser patogenezinde birkaç gen mutasyonunun rol oynadığını gösteren farklı kanser evrelerini tanımlamışlardır. Bu gen mutasyonları, anormal hücre çoğalmasına yol açarak kansere sebebiyet verir (Assanpour,Dehghani,2017).

Prostat kanseri erkeklerde sık görülen bir kanser türüdür ve istatistiksel olarak her altı erkekten birinin yaşamları boyunca prostat kanseri geliştirebileceği düşünülmektedir (Saraon, Drabovich & Jarvi, 2014). Hastalığın durumu ve seyri tedavi yönteminin belirlenmesinde önemlidir. Bu yaklaşımlar arasında cerrahi ve cerrahi olmayan (kemoterapi, radyoterapi, hormonal tedavi gibi) tedavi seçenekleri değerlendirilir (Özkök, 2011; Livermore, Munkley & Elliott, 2016). Steroid olmayan bir anti-enflamatuvar ilaçların da çeşitli kanser türleri için potansiyel terapötikler olduğu gösterilmiştir (Delgada vd., 2015). Meklofenamik asit eklem, kas ağrısı, artrit ve dismenore için kullanılan steroid olmayan antiinflamatuvar ilaçların (NSAİİ'ler) antranilik asit türevleri (veya fenamat) sınıfının üyesi olan bir ilaçtır ve prostaglandin oluşumunu engelleyen bir siklooksijenaz (COX) inhibitörüdür (National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases; 2012).

Literatürde MA'nın prostat kanseri üzerindeki antineoplastik etkilerinin çalışıldığı az sayıda çalışma vardır (Soriano-Hernández, Galvan-Salazar & Montes-Galindo, 2012; Sekine, Nakayama & Miyazawa, 2018; Delgado-Enciso, Soriano-Hernández & Rodriguez-Hernandez, 2015). İlk olarak Soriano-Hernandez ve arkadaşları (2012), MA'nın *in vitro* ve *in vivo* antineoplastik etkilerini çalışmışlar ve bu ilacın tümör büyümesini azaltarak sağ kalımı artırdığını göstermişlerdir (Soriano-Hernandez, 2012). Delgado-Enciso ve arkadaşları da (2018) MA'nın androjen bağımsız prostat kanseri PC3 hücrelerinde histolojik değişiklikleri analiz etmişler ve MA'nın hücre büyümesini yavaşlatıcı etkisi olduğunu gözlemlemişlerdir (Delgado-Enciso ve ark. 2015). Yakın zamanda yapılan başka bir çalışmada ise androjen bağımsız PC-3 ve LNCaP hücrelerinde MA'nın simvastatinin tek başına olan hücre proliferasyonunu ve göçünü azaltma etkisini artırdığı, IGF1 ile indüklenen Akt aktivasyonunu inhibe ettiği ve özellikle kastrasyona dirençli prostat kanserinin tedavisinde etkili olabileceği bildirilmiştir (Sekine ve ark 2018). Meklofenamik asit, COX inhibitörü olmasının yanı sıra demetilaz aktivite gösteren bir protein olan FTO proteininin de spesifik bir inhibitörüdür (Yue, Jingli & Qi, 2015) ve MA ile muamele edilen glioblastoma hücrelerinde m<sup>6</sup>A seviyesinde artış olduğu gözlenmiştir (Qi, Hailing & Peng, 2017). Bir m<sup>6</sup>A demetilazı olan FTO'nun kanser hücrelerinin büyümesini, kendi kendini yenilemesini ve metastazını desteklediği son yıllarda yapılan sınırlı sayıdaki çalışma ile gösterilmiştir (Chen ve Du, 2019). Genetik ve / veya epigenetik bozuklukların prostat kanserini tetiklediği bilinmektedir (Attard vd., 2016). RNA metilasyon durumundaki anormal değişikliklerin de kanserleşme ile ilişkilendirilmiş olması (Zhao vd., 2017; Deng vd., 2018) bilim insanlarını RNA metilasyon durumunu etkileyen metilaz ve

demetilazların farklı kanser tiplerinde etkilerini araştırmaya yönelmiştir. 1-metiladenozin (m<sup>1</sup>A) içeren DNA ve RNA demetilasyonuna aracılık eden ALKBH3'ün prostat kanserinde yüksek seviyede eksprese olarak kötü prognosis ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Yamato vd., 2012). Yuan ve ark 2020 yılında yaptıkları bir çalışmada RNA spesifik bir metilaz olan METTL3'ün onkogenik etki göstererek MYC'in artış gösteren regülasyonunun, prostat kanserinin proliferasyonu ve progresyonuna katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Ancak m<sup>6</sup>A "silicileri" nin prostat kanserindeki rolü hala belirsizdir.

m<sup>6</sup>A "silicileri"nden biri olan FTO'nun MA aracılı inhibe edilmesi sonucu olası etkilerinin araştırılması prostat kanserinin moleküler mekanizmasının aydınlatılmasına katkı sağlayabilir. Literatürde MA'nın prostat kanseri üzerindeki etkilerini proteomik düzeyde araştıran bir çalışma yoktur. Proteom odaklı olan bu çalışmada, FTO inhibitörü olan meklofenamik asit aracılığıyla FTO inhibisyonunun hücresel düzeyde prostat kanseri hücre proteomu üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Bunun için öncelikle farklı prostat kanseri dizilerindeki (DU145, PC3, LNCaP) ve sağlıklı prostat hücre dizisindeki (PNT1A) FTO protein seviyeleri western blot yöntemi ile belirlendi. Sağlıklı hücreye göre en yüksek FTO proteini seviyesi olan LNCaP hücreleri farklı zaman dilimlerinde ve farklı konsantrasyonlarda MA ile muamele edildi. Çalışmamızda 24 saatlik süreyle MA uygulanan LNCaP hücrelerinde m<sup>6</sup>A içeriğinin yaklaşık olarak 2 kat oranında arttığı gözlemlendi. Bu, FTO demetilasyon aktivitesinin belirlediğimiz doz ve sürelerde inaktive edildiğini göstermektedir. MA'nın uygulandığı diğer zaman dilimlerinde m<sup>6</sup>A seviyelerinde çok belirgin olmamakla birlikte bir azalma olduğu dikkatimizi çekmiştir. m<sup>6</sup>A seviyesindeki bu azalış, FTO proteininin MA ile daha uzun süreli baskılanmasına bir tepki olarak, hücrede alternatif mekanizmaların devreye girmiş olabileceğini düşündürmektedir. Belki de daha uzun süreli ilaç uygulamasına hücresel bir savunma olarak FTO gibi bir demetilaz olan AlkB homolog 5 (ALKBH5) (Zheng, Dahl & Niu, 2013) proteini seviyesinde artış m<sup>6</sup>A seviyesindeki bu değişimin nedeni olabilir.

Bu çalışmada FTO proteini baskılanmasının bir göstergesi olan m<sup>6</sup>A seviyesinde artışın görüldüğü 24 saatlik MA uygulamasının hücre proteomu üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Temel olarak karbon metabolizması, hücre iskeleti organizasyonu, protein metabolizması ve mRNA proseslenmesi olmak üzere dört gruba ait proteinlerin regülasyonlarında değişiklikler görüldü. Bu proteinler aşağıda sırayla tartışılmıştır.

## ***Metabolik Proteinler***

Kanser hücrelerinde glukoz metabolizması başlıca iki ana biyokimyasal olay ile karakterize edilir. Bunlardan biri artan glukoz alımı, diğeri aerobik glikoliz (glukozun piruvata dönüşüm süreci sonunda laktat üretimiyle sonuçlanır, fermentasyon). Aerobik glikoliz (yani oksijen varlığında glikoliz) ile tümör oluşumu arasında “Warburg etkisi” olarak bilinen bir bağlantının varlığı bilinmektedir (Warburg,1956). Bu metabolik fenotip, oksijenden bağımsız bir şekilde enerji üretimi için glikolize (glukozun piruvata dönüştürülmesi ve ardından laktat üretimi süreci) tercihli bağımlılık ile karakterize edilir. Glikoliz, oksidatif fosforilasyondan daha az verimli olmasına rağmen, adenzin trifosfatın (ATP) net veriminde kanser hücreleri, artan glikoz alımı ile bu dezavantaja uyum sağlar. Böylece glikoliz yoluyla oluşan ATP kanser hücrelerinin büyümesi için yeterlidir. Glikolizden kaynaklanan artan ATP üretim hızının kanser hücrelerine seçici bir büyüme avantajı sağlaması muhtemeldir (Gatenby, Gillies,2004).

Fructose-Bisphosphate Aldolase A (ALDOA), fruktoz-1,6-bifosfatın gliseraldehit 3-fosfata (G3P) ve dihidroksiaseton fosfata (DHAP) tersine çevrilebilir dönüşümünü katalize eden bir glikolitik enzimdir. Glikolizde anahtar role sahip olan ALDOA, çizgili kaslarda kasılma, aktin filamentlerde organizasyon ve hücre hareketliliğinin düzenlenmesi gibi işlemlere katkı sağlamaktadır (Arnold, Pette, 1968; Kusakabe, Motoki, hori,1997; Tochio ve ark., 2010). Özellikle, ALDOA'nın insan akciğer skuamöz (Shinohara,1994; Wilson,2003), renal hücre (Mathupala,Ko &Pedersen,2006), kolorektal (Kawai ve ark.,2017; Ye ve ark.,2018) ve hepatoselüler karsinomlar (Patra ve ark.,2013) dâhil olmak üzere çeşitli malign kanserlerde yüksek oranda eksprese edildiği bulunmuştur. Sha ve arkadaşlarının çalışmasında da (2014), ALDOA'nın akciğer skuamöz hücreli karsinomda yüksek oranda eksprese edildiği ve kötü prognoz ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. ALDOA'nın düşük regülasyonları hücre döngüsünü baskılamakta ve böylelikle hücre yayılımına engel olmaktadır, yüksek regülasyonu durumunda ise hücre istila durumu artış göstermektedir (Huang ve ark, 2018).

Buradaki çalışmanın verileri, ALDOA'nın bir tümör promotörü işlevinde olabileceğini göstermektedir. Kuang ve arkadaşları da (2021) prostat kanseri DU145 ve PC3 hücrelerinde ALDOA'nın aşırı ekspresyonunun tümör büyümesini önemli ölçüde destekleyebildiğini ve ALDOA inhibitörü ile baskılanmasının (knockdown) ise PK hücrelerinin büyümesini doza bağlı olarak bastırıldığını *in vivo* ve *in vitro* deneylerle gösterdiler. Bu sonuçlar, genel olarak insan tümör patogenezinde ALDOA'nın yaygın destekleyici rolü olduğunu göstermektedir.



Glikolizin son basamağında yer alan Pirüvat Kinaz PKM (KPYM, PKM2) bir fosfat grubunun fosfoenolpiruvattan (PEP) adenozin difosfata (ADP) transferini katalize ederek bir molekül piruvat ve bir ATP molekülü üretilmesini sağlayan glikolitik bir enzimdir (Gupta, Bamezai, 2010). Kanser hücrelerinde PKM2 ekspresyonunun, aerobik glikolizi uyardığı bilinmektedir (Tamada, Suematsu & Saya, 2015). Troid kanserinde, hepatomal dokularda pirüvat kinazın spesifik aktivitesinin arttığı gösterilmiştir. Bunların yanında pirüvat kinazın, kötü huylu meme kanserinde yüksek seviyede eksprese olduğu, sağlıklı meme dokusunda düşük seviyede olduğu gösterilmiştir (Ibsen, Orlando & Nungaray,1982). Pirüvat kinazın artan ekspresyonlarının da lösemide kötü prognoz ile ilişkilendirildiği gösterilmiştir (Yücel, 2019).

Süksinat Dehidrojenaz (DHSA, SDH), ökaryotların iç mitokondriyal zarında bulunan bir enzim kompleksidir (Mitokondriyal Kompleks II) ve ubikinonun ubikuinole indirgenmesiyle süksinatın fumarata oksidasyonunu katalize eder. Aynı zamanda süksinatı fumarata okside ettiği sitrik asit döngüsüne katılır. (Oyedotun, Lemire, 2004). Mitokondriyal elektron taşıma zincirinin kompleks II'inde yer alan ve sukkinattan ubikinona (koenim Q) elektronların aktarılmasından sorumlu olan süksinat dehidrojenazın (SDH) flavoprotein (FP) alt birimi tümör baskılayıcı görevi görebilir. Mitokondriyal solunum kompleksleri içinde en az çalışılmış olan bu kompleks, insan hastalıklarındaki rolünün keşfedilmesi nedeniyle yeniden ilgi görmüştür (Renkema ve ark.,2015). Sewha ve arkadaşlarının bir araştırması sonucunda meme kanserinin yaklaşık olarak %3'ünde oksidasyon için bağlanma sağlayan SDHA ve demir ile sülfatı bağlayıcı SDHB ekspresyonlarında kayıplar bulunmuştur (Sewha ve ark.,2013). SDH'nin, tümör hücrelerinin sitozolünde ve hastaların hücre dışı sıvılarında anormal bir süksinat birikimine katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Bazı tümörlerin oluşumundaki rolünü doğrulayan bu gözlemlerin ardından, SDH bir tümör baskılayıcı ve süksinat ise bir onkometabolit olarak tanımlanmıştır (Dalla ve ark.,2019). Bu tez çalışmasında, LNCaP hücrelerinde MA uygulama sonrasında glikolitik proteinler ALDOA, PKMY ve DHSA'nın ifade seviyelerinde sırasıyla 5-, 3- ve 5-kat bir azalma görüldü. Bonnet ve arkadaşları (2007), kanser hücrelerinde aerobik glikolitik fenotipi oksidatif fosforilasyona (OXPHOS) çevirmenin hücre ölümünü tetiklediğini gösterdiler (Bonnet ve ark.,2007).

Kanser hücrelerinin oksijen varlığında bile mitokondriyal solunum yerine glikoliz yapmayı tercih ettiği aerobik glikoliz, yeni tedavilerin geliştirilmesi için umut verici bir hedef olarak tanımlanmıştır (Cruys ve ark.,2016; Pusapati ve ark.,2016). Bu nedenle, tümör glikolizini kesmek veya bozmak, enerji tükenmesi ve ayrıca terapötiklere duyarlılaşma yoluyla tümör

büyümesini etkileyebileceği ifade edilmiştir (Hsu,2008; Dang ve ark.,2011; Birsoy ve ark.,2012). Bu bağlamda MA'nın etkisiyle glikolitik proteinlerin ifade seviyelerindeki düşüş, kanser hücrelerinin avantajına olan bu enerjetik yolağın tersine çevrildiğinin bir göstergesi olabilir.

### ***Hücre iskeleti ile ilişkili proteinler***

Hücre iskeleti elemanlarından aktin filamanların dinamiği, hücre şekli düzenlemesi ve hareketliliği için kritik olup, çeşitli aktin bağlayıcı proteinler tarafından düzenlenir (Polard, Cooper, 2009). Kofilin 1 (COF1), ADF/kofilin ailesinin bir parçasıdır ve hem monomerik hem de iplikli aktini bağlayabilen çok küçük bir proteindir (Yeoh., Pope & Mannherz,2002). COF1'in fazla ekspresyonu bazı kanser türlerinde agresiflik ile ilişkilendirilmiştir (Kürten, Uhlén& Syrén,2015). Lu ve arkadaşlarının (2015) yapmış olduğu bir çalışmada PK'nin %70,3'ünde cofilin1 ekspresyonunda artış olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca yine aynı çalışmada cofilin1'in, PK gelişimini öngörebileceği bir protein olduğu ve aşırı ekspresyonunun lenf nodu metastaz gelişimiyle ilgili olabileceği gösterilmiştir.

Aktine bağlanan proteinlerden olan WD repeat-containing protein 1 (WDR1), kofilin aracılı aktin filamanının sökülmesine yardımcı olan bir proteindir (ADF/kofilin kofaktörüdür) ve hücre iskeletinin yeniden şekillenmesinde rol oynar (Lee ve ark.,2016).WDR1'in aşırı eksprese olması kanserin invazyon kapasitesinin yüksek olması ile ilişkilendirilmiştir (Kang ve ark., 2010). WDR1'in göğüs kanseri (Xiang ve ark., 2017), yumurtalık kanseri (Haslena ve ark.,2013), glioblastoma (Xu ve ark.,2016) gibi bazı kanser türlerinde aşırı ekspresyonuna rastlanmıştır. WDR1'in aşırı ekspresyonunun küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücrelerinde ADF/kofilin aracılı aktin dinamiği yoluyla hücre büyümesi göçünü teşvik ederek malign fenotipe katkı sağladığı gösterilmiştir. Bu hücrelerde WDR1 yıkımı hücre göçünü ve istilasını, tümör hücre büyümesini *in vitro* ve *in vivo* olarak inhibe etmiştir (Yuan ve ark., 2018).

Aktine bağlanan bir diğer proteinlerden ARP2/3 kompleksi, hücre hareketliliği ve hücre morfolojisinin korunması için gerekli olan aktin filamentlerinin polimerizasyonunu başlatır (Vartiainen, Machesky,2004). Actin-related protein 3 (ARP3, aktin ile ilişkili protein 3),hepatosellüler kanserli hastalarda ve hücre hatlarında da yüksek seviyede eksprese olmaktadır ve bu proteinin hepatosellüler kanserli hastalar için potansiyel bir prognostik gösterge ve terapötik hedef olabileceği önerilmiştir (Jiale ve ark.,2018).

Bizim çalışmamızda 24 saat MA uygulanan LNCaP hücrelerinde COF1, WDR1 ve ARP3 proteinlerinin sırasıyla 2-, 4- ve 5-kat daha az ifade edildiği görüldü. Güçlü aktin dinamiklerini içeren hücre göçü ve istilası kanser hücrelerinin iyi bilinen bir özelliğidir (Blanchoin ve ark.,2014). MA uygulaması sonrası aktinle ilişkili bu proteinlerin seviyelerindeki düşüş, ilacın etkisiyle LNCaP hücrelerinde aktin dinamiğinde bir azalma olduğunun ve dolayısıyla kanserin hücre göç ve istila özelliğinin azaldığının bir göstergesi olabilir. Nitekim önceki iki çalışmada MA'nın prostat kanserinde hem tek başına hem de simvastatin ile kombine şekilde verilmesinin hücre proliferasyonu ve migrasyonunu azalttığı gösterilmiştir (Delgado vd., 2015; Sekine vd., 2017). Proteomik düzeyde elde ettiğimiz bu bulgular MA'nın bu etkisini destekler niteliktedir. Bu sonuçlara dayanarak hücre iskeleti proteinleri, MA'nın etkisiyle WDR1/Kofilin-Aktin/Arp2 ekseninde prostat kanserinde umut verici bir terapötik hedef olabileceği söylenebilir.

### ***Transport aktivite***

Klorür hücre içi kanal proteini 1 (CLIC1) insanlarda CLIC1 geni tarafından kodlanan klorür kanal proteinlerinden biridir (Valenzuela ve ark.,1997).Klorür kanal proteinleri hem çözünür küresel proteinler hem de iyon kanalı işlevine sahip integral zar proteinleri olarak var olabilir (Anderson,Cormier &Scott,2019).Klorür kanalları, hücre membran potansiyelinin stabilizasyonu, transepitelyal taşıma, hücre içi pH'ın korunması, hücre hacminin düzenlenmesi, düzenlenmiş sekresyon, hücre adezyonu, hücre döngüsü ve apoptoz dâhil olmak üzere temel hücresel süreçleri düzenleyen çeşitli bir protein grubudur. Bu protein esas olarak hücre çekirdeğine yerleşir ve hem nükleer hem de plazma zarı klorür iyon kanalı aktivitesi sergiler (Anderson,Cormier &Scott,2019).CLIC1'in kolorektal, pankreatik, gastrik, hepatosellüler ve safra kesesi tümörlerinin çoğunda yukarı regüle olduğu gösterilmiş ve kötü prognazla ilişkilendirilmiştir. Gastrik kanserde CLIC1'in ROS aracılı MAPK/AKT sinyalini düzenleyerek kanserin ilerlemesini desteklediği bildirilmiştir (Anderson,Cormier &Scott,2019).Ummanni ve ark.(2008), CLIC1'in prostat kanserinde yukarı regüle edildiğini ve prostat kanseri için potansiyel bir biyobelirteç olabileceğini buldular (Ummanni,Junker, Zimmermann,2008). Daha sonra, prostat kanseri PC3 ve DU145 hücrelerinde CLIC1'in RNAi aracılı aşağı regülasyonunun, mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK)/ERK yolunu düzenleyerek prostat kanseri hücre çoğalmasını ve göçünü negatif yönde düzenleyebildiği gösterilmiştir (Tian, Guan, Jia, Meng & Yang,2014). Bizim çalışmamızda da MA-muamelesi sonrasında, çok belirgin bir değişiklik olmamakla birlikte, CLIC1 protein

seviyesinde yaklaşık 2-kat bir düşüş gözlemledik. CLIC1'in aşırı ekspresyonunun hücre hareketliliğini önemli ölçüde arttırdığı ve CLIC1'in yıkılmasının hücre göçünü ve istilasını belirgin şekilde inhibe ettiği gösteriştir (Wang, Peng, Li ,2009).Dolayısıyla CLIC1 ekspresyon seviyesindeki azalma, hücre iskeletinin organizasyonu ile ilişkili proteinlerde gördüğümüz düşüş ile uyumlu olarak hücre hareketliliğinde bir azalma olduğunun göstergesi olabilir.

### ***Protein metabolizması ile ilişkili proteinler***

Ubiquitin (Ub)/proteazom yolu, hasarlı proteinlerin ve büyüme ve stres tepkisinin düzenleyicilerinin bozulmasını kolaylaştıran bir yoldur. Proteazomlar, poli-ubikitinlenmiş hücre içi proteinlerin bozunması için bir yol sağlayan, böylece yanlış katlanmış veya katlanmamış proteinlerin yanı sıra hücre döngüsü ilerlemesi, DNA onarımı, apoptoz, bağışıklık tepkisi, sinyal iletimi, transkripsiyon, metabolizma ve gelişim dâhil olmak üzere önemli hücresel süreçlerin anahtar düzenleyicilerini ortadan kaldıran çok enzimli komplekslerdir (Voorhees ve ark.,20035; Yang,Chin & Lambert,2004).Dolayısıyla Ubiquitin (Ub)/proteazom yolunun bozulmuş aktivasyonları hücre fonksiyonunun neredeyse tüm yönlerine dâhil olması nedeniyle pleiotropik kusurlara neden olabilir.

Proteozom alt ünitesi beta tip-1 (PSB1) çoğu hücre içi proteinin proteolitik yıkımında rol oynayan 20S çekirdek proteazom kompleksinin katalitik bileşenlerinden biridir ve post-glutamil peptid hidrolize edici (kaspaz benzeri) aktiviteye sahiptir (Adams,2004).

Ayrıca PSMB1'in transkripsiyonel aktivatör olarak potansiyel bir rolü olduğu bildirilmiştir (Yamauchi ve ark.,2013). 20S çekirdek proteazom kompleksi, farklı düzenleyici parçacıklarla birleşerek hücre içinde çok sayıda önemli rollere sahiptir. Hücresel fonksiyonları bozabilecek yanlış katlanmış veya hasar görmüş proteinleri ortadan kaldırarak protein homeostazının korunmasında önemli bir rol oynar (Rut, Drag,2016). Proteinlerin ubikütinasyonu ve ardından proteazom tarafından proteoliz ve yıkım, hücre döngüsü, hücre büyümesi ve farklılaşması, gen transkripsiyonu, sinyal transdüksiyonu ve apoptozun düzenlenmesinde önemli mekanizmalardır (Goldberg, Stein & Adams,1995). Literatürde PSB1'in prostat kanseri ile ilişkisine dair bir yayına rastlanmamıştır ancak meme kanseri ile ilgili yapılan bir proteomik çalışmada, PSB1 proteininin yüksek ekspresyonu tespit edilmiştir (Deng ve ark.,2007).

Ubikitin karboksil-terminal hidrolaz izozim L1 (UCHL1), hem ubikütin öncülerinin hem de ubikitine proteinlerin işlenmesinde rol oynar. UCHL1, proteinlerden ubikütin kalıntılarını

hidrolize eden bir enzimdir (Bilguvar ve ark.,2013). UCHL1 protein ekspresyonu, nöronlara ve testis/yumurtalık dokusuna özgü olmakla birlikte, bazı akciğer tümörü hücre hatlarında eksprese edildiği bulunmuştur (Liu ve ark.,2003). UCHL1'in anormal ekspresyonunun kanserle ilişkili olduğu gösterilmiş ve bir onkojen olarak tanımlanmasına yol açmıştır (Hussein ve ark.,2010).

Uzamana Faktörü- 2 (EF2), protein sentezinin önemli bir ve çeşitli kanser türlerinin ilerlemesinde rol oynar. EF2 geninin çeşitli kanser türlerinin çoğunda aşırı ifade edildiğini ve kanser hücresi büyümesinde onkojenik bir rol oynadığını gösteren çalışmalar vardır (Kaneda ve ark.,1984). Prostat kanserinde de EF2'nin aşırı ekspresyonu ve hiperaktivitesi, kanser hücresi ilerlemesi ve erken tümör nüksü ile ilişkilendirilmiştir ve EF2 proteininin PK için yararlı bir biyobelirteç olduğu önerilmiştir (Nakamura ve ark., 2009).

Isı Şoku Proteini (71 kDa) (HSP7C, HSPA8, HSC70), bir şaperon proteini olarak, yeni çevrilmiş ve yanlış katlanmış proteinlerin düzgün katlanmasını kolaylaştırmanın yanı sıra, mutant proteinleri stabilize veya degrade eder. Protein katlanmasındaki rolü ile HSC70 sinyal iletimi, apoptoz, otofaji, protein homeostazı ve hücre büyümesi ve farklılaşması gibi biyolojik süreçlere katkıda bulunur (Mayer, Bukau, 2005; Xilouri, Stefanis, 2016). HSC70 normal koşullar altında şaperon işlevlerini yerine getirirken, aynı zamanda yapısal olarak ifade edilir ve protein ubiquitinasyonu ve yıkımı gibi hücrel süreçlerle ilgili işlevleri yerine getirir (Goldfarb ve ark.,2006; Soss ve ark., 2015). Hsc70'in sitoplazma ve lizozomda lokalize olduğu ve burada şaperon aracılı otofajiye katıldığı, substrat proteinlerinin zardan lizozomal lümeneye açılmasına ve yer değiştirmesine yardımcı olduğu bilinmektedir (Majeski, Dice,2004). Bu yol aracılığıyla, HSC70, normal koşullar altında proapoptotik BBC3/PUMA'nın bozulmasına da katkıda bulunur, böylece sitoproteksiyon sağlar (Xie ve ark.,2015). Hsc70 ayrıca hücre döngüsü geçişi ve karsinogenezin pozitif düzenleyicisi olarak hizmet eder. Örneğin, HSC70, G1'den S fazına hücre döngüsü geçişinde kilit bir oyuncu olan siklin D1'in nükleer birikimini düzenler (Diehl ve ark.,2003;Hatakeyama,2013).HSC70'in diğer bir işlevi, zar bileşenlerinin hücre içinde taşınması sırasında klatrin kaplı veziküllerin parçalanmasında bir ATPaz görevi görmesidir (Goldfarb ve ark.,2006). Ayrıca, şaperon aracılı otofajinin önemli bir bileşenidir ve burada bu lizozomal yol tarafından parçalanmış proteinlere seçicilik kazandırır (Goldfarb ve ark.,2006).Bu rollerinin yanısıra preproteinlerin mitokondriyal giriş reseptörü TOMM70'e ileterek proteinlerin mitokondriyal girişinde kritik bir rol oynar (Young ve ark.,2003). Transkripsiyonel aktivasyonun bir baskılayıcısı olarak hareket ettiği de gösterilmiştir. Smad aracılı transkripsiyon üzerinde CITED1'in

transkripsiyonel koaktivatör aktivitesini inhibe eder. Splaysazomun ayrılmaz bir parçasını oluşturan PRP19-CDC5L kompleksinin bir komponentidir ve pre-mRNA öncesi eklemeyi aktive etmek için gereklidir. Çekirdek kompleksinin diğer tüm bileşenleriyle temas ettiğinden, splaysazom düzeneğinde bir iskele rolü oynayabilir (Yahata ve ark.,2000). HSC70'in J alanı içeren yardımcı şaperonlar ve E3 ligaz STUB1 ile birlikte ER ile ilişkili bozulma (ERAD) kalite kontrol yolağına katıldığı da gösterilmiştir (Matsumura ve ark.,2013). HSC70 çok çeşitli hücresele olaylarda rol oynamaktadır ve çok sayıda kanser, nörodejeneratif hastalık, hücre yaşlanması ve yaşlanma ile ilişkilendirilmiştir (Mayer, Bukau,2005; Wang ve ark.,2013).

Ubiquitin (Ub)/proteazom yolunun çeşitli kanserlerde ve farklı malignitelerde aktivasyonu tarif edilmiştir. Aşırı aktif protein sentezi sergileyen malign hücrelerde, proteazomlar ile birlikte ısı şoku proteinleri gibi şaperonların da hücresele homeostazda kritik bir rol oynadığı bilinmektedir (Chen, Madura K., 2005). Kötü huylu koşullar sıklıkla düzenleyici proteinlerin değişmiş bolluğu ve stabilitesi ile ilişkilidir. Bu nedenle, normalden anormal büyümeye geçişin altında, benzersiz bir protein repertuarının ifadesinin olması muhtemeldir. Dolayısıyla proteazom aktivitesi, hızla büyüyen dokularda bu proteolitik sistemin gerekliliği ile tutarlı olarak, insan kanserlerinde sıklıkla yükselir (Wyke ve ark.2004).Bizim çalışmamızda da bu yolla ilişkili olan PSB1, UCHL1 ve EF2 proteinlerin ifade seviyelerinde sırasıyla 3-, 2- ve 6-kat azalma; HSC70 proteininin ifade seviyesinde ise yaklaşık 8-kat bir artış görülmüştür. Ubiquitin (Ub)/proteazom yolundaki bu proteinlerin ifadelerindeki değişimler LNCaP hücrelerinde bozulmuş olan hücresele homeostazın MA muamelesi sonrası dengelenebileceğini düşündürmektedir.

### ***RNA metabolizması ile ilişkili proteinler***

Büyük ölçekli genomik çalışmalar, mutasyonların gen ekspresyonunun transkripsiyonel ve transkripsiyon sonrası düzenlemesini bozarak kansere neden olduklarını ortaya çıkarmıştır. Bunlar, mRNA'nın eklenmesi, taşınması, düzenlenmesi ve bozulması dâhil olmak üzere RNA işleminin her aşamasını etkileyen değişiklikleri içermektedir. RNA ekleme ve poliadenilasyonu etkileyen genetik değişikliklerin kanserde yaygın olduğu ve yeni terapötik fırsatlar yaratabileceği konusunda artan bir farkındalık vardır. Bu tür mutasyonlar, tek bir gen içinde veya RNA işleme faktörlerinin kendisinde meydana gelebilir, böylece birçok aşağı akış hedef genin eklenmesini etkiler (Obeng, Stewart& Abdel-Wahab, 2019). RBP-RNA ağları aktivitesindeki bozulmalar da nedensel olarak kanser gelişimi ile

ilişkilendirilmiştir (Pereira, Billaud & Almeida, 2017). Böylelikle genetik değişikliklerin yanı sıra epigenetik olarak bu proteinlerin ekspresyonlarındaki değişiklikler de kanser gelişimine katkı sağlayabilir.

Bölünme stimülasyon faktörü alt birimi 1 (CSTF1), insanlarda CSTF1 geni tarafından kodlanan bir proteindir (Takagaki, Manley,1992; Kleiman, Manley, 2001). Bu gen, bölünme uyarma faktörünü (CSTF) oluşturmak için birleşen üç alt birimden birini kodlar ve CSTF, poliadenilasyonda ve pre-mRNA'ların 3' uç kesiminde rol oynar (Takagaki,Manley,2000). mRNA'nın 3'-UTR'si genellikle düzenleyici RNA bağlayıcı proteinler ve mikroRNA'lar için birçok bağlanma bölgesi içerir ve bu nedenle 3'-UTR'nin uzunluğu, mRNA stabilitesinin düzenlenmesi, lokalizasyonu ve protein translasyon verimliliği için önemlidir (Yeh, Yong,2016).

Farklı 3' uçlu RNA moleküllerinin tek bir genin farklı poliadenilasyon bölgelerinden kaynaklandığı bir fenomen olan alternatif poliadenilasyon (APA), genellikle aynı kodlama dizisine sahip, ancak transkripsiyon sonrası işleme aşamasının sonuncusu olan farklı uzunluklarda 3'-UTR'ye sahip mRNA izoformları ile sonuçlanabilir. APA'nın gen ekspresyonunu düzenleyen yeni bir mekanizma olduğu keşfedilmiştir (Chen ve ark.,2017). İlgi çekici olan, kanser hücreleri veya erken evre embriyonik hücreler gibi benzer şekilde çoğalan hücreler, genellikle daha kısa 3'-UTR'lere sahip önemli miktarlarda mRNA izoformları eksprese eder (Mayr, Bartel,2009; Fu ve ark.,2011). 3'-UTR'lerin kısaltılmasının, akciğer kanseri de dâhil olmak üzere kanser hastalarının kötü prognozu ile korele olduğu bulunmuştur (Lembo, Di Cunto & Provero,2012; Ichinose ve ark.,2014). Zhang ve arkadaşları (2019), küçük hücreli dışı akciğer kanseri örneklerinde diferansiyel eksprese edilmiş genleri ve bu genlerin tandem 3'-UTR uzunluklarını ve ayrıca 3'-UTR uzunluğunda gözlemlenen değişikliği etkileyebilecek potansiyel protein faktörlerini incelemiştir. H460 hücrelerinde CSTF2 ekspresyonunun düşürülmesi, kanser dokularında kısalmış olan genlerde 3'UTR uzamasıyla sonuçlanmıştır. 3'UTR'lerin alternatif poliadenilasyon (APA) yer değiştirmesi küçük hücreli dışı akciğer kanserinde yaygındır ve CSTF2, bu kansere bağlı genlerin 3'UTR uzunluğunu düzenleyen bir onkojen olarak hizmet ediyor olabilir (Zhang ve ark.,2019). Literatürde prostat kanserinde CSTF1'in aşırı ifadesi ile ilişkili bir yayına rastlanmamıştır. Alternatif ekleme işleminin düzensizliği, kanserin önemli bir özelliği olarak kabul edilir. Ökaryotlarda, uygun ekleme işleminin kontrolü, farklı küçük nükleer ribonükleoproteinler (RNU1, RNU2, vb.) ve çekirdek splayozom ile ilişkili proteinlerden (PRPF8, PRPF40A, U2AF2, SF3B1, vb.) oluşan karmaşık bir hücresel makine

olan splaysazom tarafından yönetilir. Splaysazom, işlenecek intronları ve ekzonları tam olarak tanımak ve pre-mRNA'ların birleştirme sürecini katalize etmek için ek proteinlerle (ekleme faktörleri; SF'ler) dinamik olarak etkileşime girer (Matera, Wang, 2014). Bu hücrel mekanizmanın uygun işleyişi, hücrel, doku ve vücut homeostazını sürdürmek için gereklidir ve bu nedenle, bu sürecin düzensizliği, endokrin-metabolik ve tümör patolojileri dahil olmak üzere farklı hastalıklarla ilişkilendirilmiştir (Scotti, Swanson,2016).

Serin/arginin açısından zengin proteinler (SR proteinleri), tüm metazoanlarda ve bitkilerde bulunan filogenetik olarak korunmuş RNA bağlayıcı proteinlerin bir ailesine aittir ve bugüne kadar on iki tip SR proteini tanımlanmıştır (SRSF1-12) (Krainer, Conway & Kozak,1990). SR proteinleri, kurucu ve alternatif pre-mRNA ekleme, mRNA aktarımı, genom stabilizasyonu ve translasyonda önemlidir. RNA Polimeraz II, DNA'yı RNA'ya kopyalarken, SR proteinleri, genom stabilizasyonunu artırmak için pre-mRNA'nın kodlayıcı DNA zincirine bağlanmasını önlemek için yeni yapılmış pre-mRNA'ya bağlanır (Long, Caceres, 2009).

Ekleme faktörü, arginin/serinden zengin 1 (SRSF1, ASF, SF2), ekson atlamasının önlenmesinde, ekleme doğruluğunun sağlanmasında ve alternatif birleştirmenin düzenlenmesinde rol oynayan yaklaşık 33 kDa'lık bir proteindir (Kohtz ve ark.,1994; (Birmingham ve ark.,1995). SRSF1 tüm ekleme reaksiyonlarının meydana gelmesi için gereklidir ve ekleme yeri seçimini konsantrasyona bağlı bir şekilde etkileyerek alternatif birleştirme ile sonuçlanır (Zuo, Manley,1993). Daha önce SRSF1, çok çeşitli tümörlerde artan ekspresyonu olan bir proto-onkogen olarak tanımlanmıştır ve buna ek olarak, alternatif eklemede kanserle ilişkili değişikliklerde de yer aldığı gösterilmiştir. SRSF1'in ekspresyonu, tümörün oluşumu, gelişimi ve tedavi yanıtı ile ilgilidir ve SRSF1, tümör hücrelerinde yüksek oranda eksprese edilir (Karni ve ark.,2007). Göğüs kanserinin ilerlemesinde SRSF1'in aracılık ettiği alternatif ekleme olayları, meme bezinde tümör oluşumunu teşvik edebilir (Anczuków ve ark.,2012). SRSF1'in, prostat dokusunun iyi huylu hiperplazisinde adenokarsinom dokusunda yüksek oranda eksprese edildiği ve SRSF1'in Survivin ekspresyonunu yukarı-düzenleyebileceğini ve böylece prostat kanserinin oluşumunu ve gelişimini destekleyebileceği gösterilmiştir (Bangming ve ark.,2016). SRSF1, hedef genlerin alternatif eklenmesini düzenleyerek tümör oluşumunu etkileyebilir. Örneğin, SRSF1, akciğer kanseri gelişimini etkilemek için PTPMT1 alternatif eklemesini düzenler (Sheng ve



ark.,2018). SRSF1'in, PTPMT1'in onkojenik ek değiştirme yoluyla meme kanseri ilerlemesini desteklediği de bulunmuştur (Du ve ark.,2021).

SRSF1, kck hücreli dışı akciğer kanserinde tümör oluşumunu etkilemek için BIN1 alternatif eklemesini de düzenleyebilir (Wang ve ark.,2020). Yapılan son bir çalışmada da, SRSF1'in hepatoselüler karsinom hücrelerinde transkripsiyonel koaktivatör SRA1'in alternatif eklenmesini düzenleyerek hücre büyümesini, istilasını ve gücünü artırdığını bulunmuştur (Lei ve ark.,2021).

Diğer bir SR faktörü olan Ekleme faktörü, arginin/serinden zengin 1 (SRSF3) de, çeşitli kanser türlerinde onkojenik bir işleve sahiptir. N6-metiladenozin (m<sup>6</sup>A) içeren RNA'ları tanıyan ve bağlayan bir RNA bağlayıcı protein olan YTHDC1'in, SRSF3'n mRNA'ya bağlanmasını kolaylaştırdığı ve alternatif ekleme sırasında ekson dahil edilmesini desteklediği gösterilmiştir (Xiao ve ark.,2016). SRSF3 çok işlevli bir proteindir ve birkaç hüresel süreç düzenlenmesine katılır. Hem kurucu hem de alternatif birleştirmedeki kanonik rolünü yanı sıra, SRSF3 ayrıca alternatif poliadenilasyon, mRNA dışa aktarma, transkripsiyon sonlandırması ve miRNA biyogenezini gibi RNA metabolizmasının ek yönlerini de düzenler (More, Kumar,2020).SRSF3'n hücre proliferasyonu ve tümör indüksiyonu ve devamlılığı için çok önemli bir proto-onkogen olarak rolü ilk olarak Jia ve arkadaşları (2010) tarafından önerilmiştir (Jia ve ark.,2010).SRSF3'n anormal ifadesinin kanser dâhil, başta nörolojik ve kardiyolojik birçok insan hastalığı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (More, Kumar,2020). Meme kanseri (Su ve ark.,2010; Sotiriou ve ark.,2006), yumurtalık kanseri (Iborra ve ark.,2013;Lauren ve ark.,2017), retinoblastom (Kooi ve ark.,2016;Villegas ve ark.,2014), baş ve boyun hücreli skuamöz (Jia ve ark.,2016), glioblastoma (GBM) (Song ve ark.,2019), mide kanseri (Park,Jeong, 2016), kolorektal kanser (CRC) (Hargaus ve ark.,2006; Park,Jeong, 2016;Torres ve ark.,2018), rahim ağzı kanseri (Chen ve ark.,2019) ve hepatoselüler karsinom (HCC) (Wang ve ark.,2019) dahil olmak üzere birçok insan kanseri türünde SRSF3'n ifadesinde artış görülmektedir.

PK'nin gelişiminin ve özellikle ilerlemesinin çoğunlukla normal gen ekspresyon paterninin değişmesinden ve onkojenik splaysing varyantların anormal varlığından etkilenen tümör patolojilerinden biri olduğu ifade edilmiştir (Paschalis ve ark.,2018). Bu anlamda, ekleme işleminin kontrolünde yer alan hüresel makinenin düzensizliğinin, PK'de gözlenen onkojenik splaysing varyantların geniş değişiminden sorumlu olacağını düşünmek mantıklıdır. Bununla birlikte, bazı spesifik splaysing faktörler ve splaysazom komponentleri,

PK gelişimi ve saldırganlığı ile ilişkilendirilmiştir (Liu ve ark.,2014; Grupp ve ark.,2014; Takayama ve ark.,2017; Yamamoto ve ark.,2018). Jiménez-Vacas ve arkadaşları da (2020) splaysozom komponentlerinin ve splaycing faktörlerin geniş bir spektrumunun ekpresyonlarını ilk kez prostat kanserli vakalarda incelemişler ve ekleme (splicing) makinesi bileşenlerinden SNRNP200, SRRM1 ve SRSF3'ün ekpresyon seviyelerinin önemli ölçüde artış olduğunu ve bunların PK patofizyolojisi ile yakından ilişkili olduğunu göstermişlerdir.

Bu proteinlerin PK'de yeni tanısal/prognostik biyobelirteçleri ve/veya terapötik hedefleri temsil edebileceği ifade edilmiştir (Jiménez-Vacas ve ark.,2020).

RNA-binding protein 4B (RBM4), insan genlerinin alternatif eklemesini kontrol eden bir grup intronik ekleme düzenleyici eleman için bir bağlayıcı faktördür (Wang ve ark.,2012). RBM4, sitoplazma ve çekirdek arasında gidip gelir ancak çoğunlukla, çoğu ekleme olayının meydana geldiği nükleer beneklerde bulunur (Lai ve ark.,2003). Tutarlı bir şekilde RBM4'ün Tau ve a-tropomiyosinin AS'sini kontrol ettiği gösterilmiştir (Lin,Tarn,2005;Kar ve ark.,2006). Ayrıca RBM4'ün çeviriyi (translasyonu) etkilediği bulunmuştur. Kas ve pankreas hücrelerinin farklılaşmasına aracılık etme dâhil olmak üzere RBM4 için çoklu fizyolojik işlevler rapor edilmiştir (Lin , Hsu & Tarn,2007; Hsieh ve ark.,2013). Ekleme aktivatörü, RNA bağlama motifi 4'ün (RBM4) düzensizliğinin, son zamanlarda birkaç kanserin ilerlemesinde rol oynadığı bildirilmiştir. Wang ve arkadaşları (2014), RBM4'ün pro- ve anti-apoptotik yollar arasındaki dengeyi kontrol etmek için Bcl-x'in eklenmesini değiştirdiği ve böylece kanser ilerlemesini baskıladığı bir modeli desteklediğini önermişlerdir. Bcl-x eklemesini düzenlemeye ek olarak, RBM4'ün muhtemelen hücre proliferasyonunu teşvik ettiği ve apoptozu geciktirdiği bilinen SRSF1'i antagonize ederek tümör ilerlemesini de inhibe ettiğini de göstermişlerdir. Birlikte ele alındığında, iki ekleme faktörü, tümör baskılayıcı RBM4 ve proto-onkogen SRSF1 arasındaki antagonizma, kanser proliferasyonu için kritik olan çoklu ekleme hedeflerini ve sinyal yollarını kontrol eden hassas bir fonksiyonel denge sunar ve kanser hastalarında RBM4 ekpresyonu önemli ölçüde azalmaktadır (Wang ve ark.,2014).RBM4 proteininde eşlik eden bir azalma ile birlikte SRSF3'ün yukarı regüle edilmiş ifadesi, kolorektal kanser dâhil olmak üzere farklı kanser türlerinde diğer karsinogenez ile ilişkili ekleme olayları için düzenleyici bir mekanizma oluşturabilir (Lin ve ark.,2017).Mide kanseri hücrelerinde RBM4 proteini ifadesinin azaldığı görülmüştür. RBM4'ün yeniden ekpresyonu, apoptozu teşvik ederken mide kanseri hücrelerinin proliferasyonunu, göçünü ve istilasını inhibe ettiği bulunmuştur (Yong ve ark.,2019). Akciğer kanserinde de RBM4 seviyesinde düşüş bildirilmiştir (Coomer ve

ark.,2019). RBM4B ise sirkadiyen saate yanıt olarak transkripsiyonel baskılayıcı olan PER1 mRNA'nın translasyonel aktivasyonu için gerekli olan bir proteindir ve bunu PER1 mRNA'nın 3'-UTR'sine doğrudan bağlanarak yapar (Uniprot RBM4B,2021). Sirkadiyen ritimlerdeki bozulmalar, kardiyovasküler hastalıklar, kanser, metabolik sendromlar ve yaşlanmanın patolojisine katkıda bulunur ve PER2'nin protein bozunmasını kontrol ettiği gösterilmiştir (UNİPROT PER,2021). Ailesel pankreatik kanserli olguların öncül lezyonlarında RBM4B'nin gen ifadesi seviyesinde artış bildirilmiştir (Ming ve ark.,2020).

Literatürde RBM4B'ün başka kanserlerle ilişkili bir bulguya rastlanmamıştır ve ancak kanser hücrelerinde azalan bir ifade gösteren RBM4'ün aksine pankreatik kanserde RBM4B'nin transkriptomik seviyedeki artışı onkogenik bir protein olabileceğini gösterebilir. Diğer kanser tiplerinde de bu protein seviyelerinin çalışılması bu yoruma açıklık getirebilir.

Bizim çalışmamızda LNCaP hücrelerinin MA muamelesi sonrası ifade seviyelerindeki majör değişimler RNA ile ilişkili olan proteinlerde olmuştur. RBM4, RBM4B, CSTF1, SRSF1 ve SRSF3 proteinlerinin ifadelerinde sırasıyla 5-, 2-, 31-, 76-, 23-kat bir azalma görüldü. Onkojenik etkiye sahip bu proteinlerin seviyelerindeki düşüş, MA'nın ekleme işleminin kontrolünde yer alan hücresel makineye ait bu proteinlerin bozulmuş olan ifadelerini (aşırı ifadelerini) normale getirebildiğini göstermektedir. Kanser hücrelerinin daha kısa 3'-UTR'lere sahip önemli miktarlarda mRNA izoformları eksprese ettiği düşünülecek olursa LNCaP hücrelerinde fazla miktarda ifade olan CSTF1'de MA muamelesi sonrası düşüş daha uzun 3'-UTR'lere sahip mRNA isoformlarının üretilmesine sebep olabilir. Dolayısıyla MA, PK'de alternatif poliadenliasyon ve splaysing makinesi aracılı güçlü bir terapötik etkiye sahip olabilir.

## 6.SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Daha uzun süreli MA uygulamalarındaki proteomik değişikliklerin incelenmesi ve RNA epigenetiğinde fonksiyonu olan diğer demetilaz (ALKBH5) ve metilaz (METTL3, METTL14 ve WTAP) proteinlerin ekspresyon seviyelerinin araştırılması bu sorulara yanıt vermemizi sağlayabilir.

Bu tez kapsamında bir non-steroidal antiinflamatuvar bir ilaç ve aynı zamanda demetilaz aktiviteye sahip FTO proteini inhibitörü olan meklofenamik asitin prostat kanseri LNCaP hücre proteomu üzerine etkileri araştırılmıştır. Karşılaştırmalı proteom analizinde 24 saat süreyle 80 µM konsantrasyonda Meklofenamik asit verilen LNCaP hücrelerinde 16 proteinin regülasyonlarında değişiklik tespit edilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırdığımızda MA uygulanan grupta Splicing factor, arginine/serine-rich 1 (SFRS1), Chloride intracellular

channel protein 1 (CLIC1), Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1 (UCHL1), Actin-related protein 3 (ARP3), Splicing factor, arginine/serine-rich 3 (SFRS3), RNA-binding protein 4 (BM4), RNA-binding protein 4B (RBM4B), Adenosylhomocysteinase (SAHH), Cleavage stimulation factor subunit 1 (CSTF1), WD repeat-containing protein 1 (WDR1), Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial (DHSA), Elongation factor 2 (EF2), Cofilin-1 (COF1), Proteasome subunit beta type-1 (PSB1), Pyruvate kinase isozymes M1/M2 (KPYM) ve Fructose-bisphosphate aldolase A (ALDOA) proteinlerinde aşağı yönlü bir regülasyon varken sadece Heat shock cognate 71 kDa protein (HSP7C)'de yukarı yönlü bir regülasyon görüldü.

Yaptığımız biyoinformatik analizler sonucunda regülasyonlarında değişiklik görülen bu proteinlerin; glikoliz metabolizması, hücre iskeletinin şekillenmesi, protein mteabolizması (yıkımı, translasyonu) ve mRNA proseslenmesi ile işkili proteinler olduğu görülmüştür. Tanımladığımız proteinler neredeyse tamamı birbirleri ile ilişkilidir ve ilintili yollarda görev almaktadır. Ancak MA, en belirgin olarak mRNA proseslenmesi (mRNA splaying, mRNA 3'-uç proseslenmesi) ile ilişkili proteinler olan CSTF1, SRSF1, SRSF3 ve RBM4 proteinlerinin ifadelerinde azalmaya neden olmuştur. Bu çalışma MA'nın LNCaP hücrelerinde etkilerinin proteomik düzeyde araştırıldığı ilk çalışmadır. Elde ettiğimiz bu veriler, FTO proteini inhibitörü olan MA'nın prostat kanserinde diğer hücresel yolların yanı sıra daha belirin olarak alternatif poliadenliasyon ve splaying makinesi aracılı güçlü bir terapötik etkiye sahip olabilir.

Ancak bu ön görülerin ileri çalışmalar (*in vivo* ve *in vitro* deneyler) ile desteklenmesi gerekmektedir. Basit ama tekrarlanabilirliği yüksek bu çalışmalar sonucunda elde edilecek veriler PK için kullanılacak yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine önayak olacaktır.

## 7. KAYNAKLAR

A.K. Roy, Y. Lavrovsky, C.S. Song, S. Chen, M.H. Jung, N.K. Velu, B.Y. Bi, B. Chatterjee, Regulation of androgen action, *Vitam. Horm.* 55 (1999) 309–352.

Ablin, R. J., Soanes, W. A., Bronson, P., & Witebsky, E. (1970). Precipitating antigens of the normal human prostate. *Journal of reproduction and fertility*, 22(3), 573–574.

Akpınar, G, Kasap, M, Cantürk, Z, & Cantürk, N. Z. (2011). Proteomiks nedir? Tiroid hastalıklarıyla ilgili araştırmalarda proteomiks. *Journal of dialog in endocrinology/Endokrinolojide diyalog dergisi*, 8(4),166-176

Alexander, D. D., Bassett, J. K., Weed, D. L., Barrett, E. C., Watson, H., & Harris, W. (2015). Meta-Analysis of Long-Chain Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids (LC $\omega$ -3PUFA) and Prostate Cancer. *Nutrition and cancer*, 67(4), 543–554. <https://doi.org/10.1080/01635581.2015.1015745>

Anczuków, O., Rosenberg, A. Z., Akerman, M., Das, S., Zhan, L., Karni, R., Muthuswamy, S. K., & Krainer, A. R. (2012). The splicing factor SRSF1 regulates apoptosis and proliferation to promote mammary epithelial cell transformation. *Nature structural & molecular biology*, 19(2), 220–228. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2207>

Anderson, N. L., & Anderson, N. G. (1998). Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis*, 19(11), 1853–1861. <https://doi.org/10.1002/elps.1150191103>

- Ardoin, S. P., & Sundy, J. S. (2006). Update on nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Current opinion in rheumatology*, 18(3), 221–226. <https://doi.org/10.1097/01.bor.0000218940.04613.cc>
- Aslam, B., Basit, M., Nisar, M. A., Khurshid, M., & Rasool, M. H. (2017). Proteomics: Technologies and Their Applications. *Journal of chromatographic science*, 55(2), 182–196. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmw167>
- Aylin KANLI, Sevinç YANAR. Western Blotting ile Çeşitli Kanser Hücre Hatlarında FTO Protein Ekspresyon Düzeylerinin Değerlendirilmesi. 3rd International Eurasian Biyolojik ve Kimyasal Bilimler Konferansı (EurasianBioChem 2020), 19-20 Mart 2020 Ankara, Türkiye
- Baillargeon, J., Pollock, B. H., Kristal, A. R., Bradshaw, P., Hernandez, J., Basler, J., Higgins, B., Lynch, S., Rozanski, T., Troyer, D., & Thompson, I. (2005). The association of body mass index and prostate-specific antigen in a population-based study. *Cancer*, 103(5), 1092–1095.
- Barsouk, A., Padala, S. A., Vakiti, A., Mohammed, A., Saginala, K., Thandra, K. C., Rawla, P., & Barsouk, A. (2020). Epidemiology, Staging and Management of Prostate Cancer. *Medical sciences (Basel, Switzerland)*, 8(3), 28.
- Beer, T. M., Armstrong, A. J., Rathkopf, D. E., Loriot, Y., Sternberg, C. N., Higano, C. S., Iversen, P., Bhattacharya, S., Carles, J., Chowdhury, S., Davis, I. D., de Bono, J. S., Evans, C. P., Fizazi, K., Joshua, A. M., Kim, C. S., Kimura, G., Mainwaring, P., Mansbach, H., Miller, K., PREVAIL Investigators (2014). Enzalutamide in metastatic prostate cancer before chemotherapy. *The New England journal of medicine*, 371(5), 424–433
- Bennett, N. C., Gardiner, R. A., Hooper, J. D., Johnson, D. W., & Gobe, G. C. (2010). Molecular cell biology of androgen receptor signalling. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 42(6), 813–827. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.11.013>
- Bermingham JR, Arden KC, Naumova AK, Sapienza C, Viars CS, Fu XD, Khotz J, Manley JL, Rosenfeld MG (Sep 1995). "Chromosomal localization of mouse and human genes encoding the splicing factors ASF/SF2 (SFRS1) and SC-35 (SFRS2)". *Genomics*. 29 (1): 70–
- Bilguvar K., Tyagi N.K., Ozkara C., Tuysuz B., Bakircioglu M., Choi M., Delil S., Caglayan A.O., Baranoski J.F., Erturk O., Yalcinkaya C., Karacorlu M., Dincer A., Johnson M.H., Mane S., Chandra S.S., Louvi A., Boggon T.J., Gunel M. "Recessive loss of function of the neuronal ubiquitin hydrolase UCHL1 leads to early-onset progressive neurodegeneration." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110:3489-3494(2013)).
- Bratt, O. 2002. Hereditary prostate cancer: clinical aspects. *J Urology*. 168:906-913.
- Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I., Siegel R.L., Torre L.A., Jemal A. Global cancer statistics 2018: Globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* 2018;68:394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Breslow, N., Chan, C. W., Dhom, G., Drury, R. A., Franks, L. M., Gellei, B., Lee, Y. S., Lundberg, S., Sparke, B., Sternby, N. H., & Tulinius, H. (1977). Latent carcinoma of prostate at autopsy in seven areas. The International Agency for Research on Cancer, Lyons, France. *International journal of cancer*, 20(5), 680–688. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910200506>
- Bryan, A.F. and Trailokya, N.P. 2011. Safety and efficacy of vinorelbine in the treatment of non-small cell lung cancer clinical medicine insights. *Oncology*. 5:131-44.
- Bylsma, L. C., & Alexander, D. D. (2015). A review and meta-analysis of prospective studies of red and processed meat, meat cooking methods, heme iron, heterocyclic amines and prostate cancer. *Nutrition journal*, 14, 125. <https://doi.org/10.1186/s12937-015-0111-3>
- Calle E. Do anthropometric measures predict risk of prostate cancer? *Am J Epidemiol* 2000;151:550-553 , 3. Nomura A. Body size and prostate cancer. *Epidemiol Rev* 2001;23:126-131)
- Calle, E. E., Rodriguez, C., Walker-Thurmond, K., & Thun, M. J. (2003). Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *The New England journal of medicine*, 348(17), 1625–1638. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa021423>

- Castanares, M. A., Copeland, B. T., Chowdhury, W. H., Liu, M. M., Rodriguez, R., Pomper, M. G., Lupold, S. E., & Foss, C. A. (2016). Characterization of a novel metastatic prostate cancer cell line of LNCaP origin. *The Prostate*, 76(2), 215–225.
- Cha, S., Shin, D. H., Seok, J. R., & Myung, J. K. (2017). Differential proteome expression analysis of androgen-dependent and -independent pathways in LNCaP prostate cancer cells. *Experimental cell research*, 359(1), 215–225. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.07.026>
- Chen, T., Hao, Y. J., Zhang, Y., Li, M. M., Wang, M., Han, W., ... & Zhou, Q. (2015). m6A RNA methylation is regulated by microRNAs and promotes reprogramming to pluripotency. *Cell stem cell*, 16(3), 289-301.
- Chen, W., Jia, Q., Song, Y., Fu, H., Wei, G., & Ni, T. (2017). Alternative Polyadenylation: Methods, Findings, and Impacts. *Genomics, proteomics & bioinformatics*, 15(5), 287–300. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2017.06.001>
- Chen L, Madura K. Increased proteasome activity, ubiquitin-conjugating enzymes, and eEF1A translation factor detected in breast cancer tissue. *Cancer Res.* . 2005 Jul 1;65(13):5599-606.)
- Coomer AO, Black F, Greystoke A, Munkley J, Elliott DJ. Alternative splicing in lung **cancer**. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech.* 2019 Nov-Dec;1862(11-12):194388
- ÇAL Ç., ŞİMŞİR A., PROSTATE KANSERİ HÜCRELERİNDE ANDROJEN BASKILAMA TEDAVİSİNE DİRENÇ GELİŞİMİNİN MEKANİZMALARI. *Türk Üroloji Dergisi*: 31 (1): 21-30, 2005
- Dalla Pozza, E., Dando, I., Pacchiana, R., Liboi, E., Scupoli, M. T., Donadelli, M., & Palmieri, M. (2019). Regulation of succinate dehydrogenase and role of succinate in cancer. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. doi:10.1016/j.semcdb.2019.04.013
- Debes, J. D., & Tindall, D. J. (2004). Mechanisms of androgen-refractory prostate cancer. *The New England journal of medicine*, 351(15), 1488–1490. <https://doi.org/10.1056/NEJMp048178>
- Delgado-Enciso, I., Soriano-Hernández, A. D., Rodriguez-Hernandez, A., Galvan-Salazar, H. R., Montes-Galindo, D. A., Martinez-Martinez, R., Valdez-Velazquez, L. L., Gonzalez-Alvarez, R., Espinoza-Gómez, F., Newton-Sanchez, O. A., Lara-Esqueda, A., & Guzman-Esquivel, J. (2015). Histological changes caused by meclofenamic acid in androgen-independent prostate cancer tumors: evaluation in a mouse model. *International braz j urol : official journal of the Brazilian Society of Urology*, 41(5), 1002–1007. <https://doi.org/10.1590/S1677-5538.IBJU.2013.00186>
- Dickerman, B. A., Markt, S. C., Koskenvuo, M., Pukkala, E., Mucci, L. A., & Kaprio, J. (2016). Alcohol intake, drinking patterns, and prostate cancer risk and mortality: a 30-year prospective cohort study of Finnish twins. *Cancer causes & control : CCC*, 27(9), 1049–1058. <https://doi.org/10.1007/s10552-016-0778-6>
- Du JX, Luo YH, Zhang SJ, Wang B, Chen C, Zhu GQ, Zhu P, Cai CZ, Wan JL, Cai JL, Chen SP, Dai Z, Zhu W. Splicing factor SRSF1 promotes breast cancer progression via oncogenic splice switching of PTPMT1. *J Exp Clin Cancer Res.* 2021 May 15;40(1):171
- Ferlay J., Ervik M., Lam F., Colombet M., Mery L., Piñeros M., Bray F. Global Cancer Observatory: Cancer Today. International Agency for Research on Cancer; L"yon, France: 2018. [(accessed on 31 May 2020)]. Available online:<https://gco.iarc.fr/today>
- Flanagan JU, Yosaatmadja Y, Teague RM, Chai MZ, Turnbull AP, Squire CJ Crystal structures of three classes of non-steroidal anti-inflammatory drugs in complex with aldo-keto reductase 1C3. *PLoS One.* 2012;7(8):e43965. doi: 10.1371/journal.pone.0043965. Epub 2012 Aug 28.
- Fletcher, S. A., Marchese, M., Cole, A. P., Mahal, B. A., Friedlander, D. F., Krimphove, M., Kilbridge, K. L., Lipsitz, S. R., Nguyen, P. L., Choueiri, T. K., Kibel, A. S., & Trinh, Q. D. (2020). Geographic Distribution of Racial Differences in Prostate Cancer Mortality. *JAMA network open*, 3(3), e201839.
- Frayling, T.M., N.J. Timpson, M.N. Weedon ve diğ. 2007. A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science*. 316:889-894. <https://doi.org/10.1126/science.1141634>



Friedlander, D. F., Trinh, Q. D., Krasnova, A., Lipsitz, S. R., Sun, M., Nguyen, P. L., Kibel, A. S., Choueiri, T. K., Weissman, J. S., Menon, M., & Abdollah, F. (2018). Racial Disparity in Delivering Definitive Therapy for Intermediate/High-risk Localized Prostate Cancer: The Impact of Facility Features and Socioeconomic Characteristics. *European urology*, 73(3), 445–451. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2017.07.023>

Furuya, Y., Akimoto, S., Akakura, K., & Ito, H. (1998). Smoking and obesity in relation to the etiology and disease progression of prostate cancer in Japan. *International journal of urology: official journal of the Japanese Urological Association*, 5(2), 134–137. <https://doi.org/10.1111/j.1442-2042.1998.tb00261.x>

Goldfarb SB, Kashlan OB, Watkins JN, Suaud L, Yan W, Kleyman TR, Rubenstein RC (Apr 2006). "Differential effects of Hsc70 and Hsp70 on the intracellular trafficking and functional expression of epithelial sodium channels". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103 (15): 5817–22.]

Geula, S., Moshitch-Moshkovitz, S., Dominissini, D., Mansour, A. A., Kol, N., Salmon-Divon, M., ... & Hanna, J. H. (2015). m6A mRNA methylation facilitates resolution of naïve pluripotency toward differentiation. *Science*, 347(6225), 1002-1006.

Giovannucci E, Rimm EB, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC. Height, body weight, and risk of prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997;6:557-563

Guisse, C. P., Abbattista, M. R., Singleton, R. S., Holford, S. D., Connolly, J., Dachs, G. U., Fox, S. B., Pollock, R., Harvey, J., Guilford, P., Doñate, F., Wilson, W. R., & Patterson, A. V. (2010). The bioreductive prodrug PR-104A is activated under aerobic conditions by human aldo-keto reductase 1C3. *Cancer research*, 70(4), 1573–1584. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-3237>

Grupp K., Wilking J., Prien K., Hube-Magg C., Sirma H., Simon R. High RNA-binding motif protein 3 expression is an independent prognostic marker in operated prostate cancer and tightly linked to ERG activation and PTEN deletions. *Eur J Cancer*. 2014;50(4):852–861

Gulati, P., Avezov, E., Ma, M., Antrobus, R., Lehner, P., O'Rahilly, S., & Yeo, G. S. (2014). Fat mass and obesity-related (FTO) shuttles between the nucleus and cytoplasm. *Bioscience reports*, 34(5), e00144.

Gupta, V., & Bamezai, R. N. (2010). Human pyruvate kinase M2: a multifunctional protein. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 19(11), 2031–2044. <https://doi.org/10.1002/pro.505>

Harris, W. P., Mostaghel, E. A., Nelson, P. S., & Montgomery, B. (2009). Androgen deprivation therapy: progress in understanding mechanisms of resistance and optimizing androgen depletion. *Nature clinical practice. Urology*, 6(2), 76–85. <https://doi.org/10.1038/ncpuro1296>

Heather, H.C., Daniel, W.L. and Evan, Y.Y. 2012. Advanced clinical states in prostate cancer. *Drugs*. 39(4):561-71

Hood, L., & Rowen, L. (2013). The Human Genome Project: big science transforms biology and medicine. *Genome medicine*, 5(9), 79. <https://doi.org/10.1186/gm483>

Howlader N, Noone AM, Krapcho M, et al, eds; National Cancer Institute. SEER cancer statistics review, 1975-2014. Updated April 2, 2018. Accessed February 25, 2020.

<https://gco.iarc.fr/today/online-analysis>

[https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-map?v=2020&mode=cancer&mode\\_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population\\_group=0&ages\\_group%5B%5D=0&ages\\_group%5B%5D=17&nb\\_items=10&group\\_cancer=1&include\\_nmsc=1&include\\_nmsc\\_other=1&projection=natural-earth&color\\_palette=default&map\\_scale=quantile&map\\_nb\\_colors=5&continent=0&rotate=%25B10%252C0%255D](https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-map?v=2020&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=10&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&projection=natural-earth&color_palette=default&map_scale=quantile&map_nb_colors=5&continent=0&rotate=%25B10%252C0%255D)

<https://www.mountelizabeth.com.sg/healthplus/article/prostate-gland-removal-singapor>

Huang, Y., Yan, J., Li, Q., Li, J., Gong, S., Zhou, H., Gan, J., Jiang, H., Jia, G. F., Luo, C., & Yang, C. G. (2015). Meclofenamic acid selectively inhibits FTO demethylation of m6A over ALKBH5. *Nucleic acids research*, 43(1), 373–384.

- Huang, Z., Hua, Y., Tian, Y., Qin, C., Qian, J., Bao, M., Liu, Y., Wang, S., Cao, Q., Ju, X., Wang, Z., & Gu, M. (2018). High expression of fructose-bisphosphate aldolase A induces progression of renal cell carcinoma. *Oncology reports*, 39(6), 2996–3006. <https://doi.org/10.3892/or.2018.6378>
- Huggins, C., & Hodges, C. V. (1972). Studies on prostatic cancer. I. The effect of castration, of estrogen and androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. *CA: a cancer journal for clinicians*, 22(4), 232–240. <https://doi.org/10.3322/canjclin.22.4.232>
- Ibsen, K. H., Orlando, R. A., Garratt, K. N., Hernandez, A. M., Giorlando, S., & Nungaray, G. (1982). Expression of multimolecular forms of pyruvate kinase in normal, benign, and malignant human breast tissue. *Cancer research*, 42(3), 888–892.
- Intasqui, P., Bertolla, R. P., & Sadi, M. V. (2018). Prostate cancer proteomics: clinically useful protein biomarkers and future perspectives. *Expert review of proteomics*, 15(1), 65–79. <https://doi.org/10.1080/14789450.2018.1417846>
- Ishak, M. B., & Giri, V. N. (2011). A systematic review of replication studies of prostate cancer susceptibility genetic variants in high-risk men originally identified from genome-wide association studies. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 20(8), 1599–1610. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-11-0312>
- J.D. McConnell, Prostatic growth: new insights into hormonal regulation, *Br. J. Urol.* 76 (Suppl 1) (1995) S5–S10.
- Jia, G., Fu, Y., Zhao, X., Dai, Q., Zheng, G., Yang, Y., Yi, C., Lindahl, T., Pan, T., Yang, Y. G., & He, C. (2011). N6-methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO. *Nature chemical biology*, 7(12), 885–887. <https://doi.org/10.1038/nchembio.687>
- Jiménez-Vacas JM, Herrero-Aguayo V, Montero-Hidalgo AJ, Gómez-Gómez E, Fuentes-Fayos AC, León-González AJ, Sáez-Martínez P, Alors-Pérez E, Pedraza-Arévalo S, González-Serrano T, Reyes O, Martínez-López A, Sánchez-Sánchez R, Ventura S, Yubero-Serrano EM, Requena-Tapia MJ, Castaño JP, Gahete MD, Luque RM. Dysregulation of the splicing machinery is directly associated to aggressiveness of prostate cancer. *EBioMedicine*. 2020 Jan;51:102547.).
- Kadaş, N.Ö. (2017). Prostat kanserinde selenyumun proteomik temelli yaklaşımla farklı etkilerinin belirlenmesi. *Deneyisel tıp dergisi*. 14 (7).
- Kang, S., Kim, M. J., An, H., Kim, B. G., Choi, Y. P., Kang, K. S., Gao, M. Q., Park, H., Na, H. J., Kim, H. K., Yun, H. R., Kim, D. S., & Cho, N. H. (2010). Proteomic molecular portrait of interface zone in breast cancer. *Journal of proteome research*, 9(11), 5638–5645. <https://doi.org/10.1021/pr1004532>
- Kar A, Havlioglu N, Tarn WY, Wu J. RBM4 interacts with an intronic element and stimulates tau exon 10 inclusion. *J Biol Chem*. 2006 Aug 25; 281(34):24479-88.; Lin JC, Tarn WY. Exon selection in alpha-tropomyosin mRNA is regulated by the antagonistic action of RBM4 and PTB. *Mol Cell Biol*. 2005 Nov; 25(22):10111-21
- Karen E. Livermore, Jennifer Munkley, David J. Elliott. Androgen receptor and prostate cancer. *AIMS Molecular Science*, 2016, 3(2): 280-299. doi:10.3934/molsci.2016.2.280
- Kenfield S.A., Stampfer M.J., Chan J.M., Giovannucci E. Smoking and prostate cancer survival and recurrence. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* 2011;305:2548–2555. doi: 10.1001/jama.2011.879
- Key, T.J. Nutrition, hormones and prostate cancer risk: results from the European prospective investigation into cancer and nutrition. *Recent Results Cancer Res*, 2014. 202: 39.
- Kluger, J., Roy, A., & Chao, H. H. (2020). Androgen Deprivation Therapy and Cognitive Function in Prostate Cancer. *Current oncology reports*, 22(3), 24. <https://doi.org/10.1007/s11912-020-0884-1>
- Kluger, J., Roy, A., & Chao, H. H. (2020). Androgen Deprivation Therapy and Cognitive Function in Prostate Cancer. *Current oncology reports*, 22(3), 24. <https://doi.org/10.1007/s11912-020-0884-1>
- Kolonel L. N. (1996). Nutrition and prostate cancer. *Cancer causes & control : CCC*, 7(1), 83–44.
- Konaç E., Sözen S. (2014). Prostat kanserinin tanı ve tedavisinde moleküler biyolojinin kullanım alanları. *Üroonkoloji bülteni*, 2014, 228-235.

Krainer, A. R., Conway, G. C., & Kozak, D. (1990). Purification and characterization of pre-mRNA splicing factor SF2 from HeLa cells. *Genes & development*, 4(7), 1158–1171. <https://doi.org/10.1101/gad.4.7.1158>

Krimphove, M. J., Cole, A. P., Fletcher, S. A., Harmouch, S. S., Berg, S., Lipsitz, S. R., Sun, M., Nabi, J., Nguyen, P. L., Hu, J. C., Kibel, A. S., Choueiri, T. K., Kluth, L. A., & Trinh, Q. D. (2019). Evaluation of the contribution of demographics, access to health care, treatment, and tumor characteristics to racial differences in survival of advanced prostate cancer. *Prostate cancer and prostatic diseases*, 22(1), 125–136. <https://doi.org/10.1038/s41391-018-0083-4>

Kumar, R.J., Barqavi, A.B. and Crawford, E.D. 2005. Epidemiology of Prostate Cancer. *US Oncology Rev.* 1(1):1-6.

Kürten, C., Uhlén, M., & Syrén, P. O. (2015). Overexpression of functional human oxidosqualene cyclase in *Escherichia coli*. *Protein expression and purification*, 115, 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2015.04.015>

Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., Funke, R., Gage, D., Harris, K., Heaford, A., Howland, J., Kann, L., Lehoczky, J., LeVine, R., McEwan, P., McKernan, K., ... International Human Genome Sequencing Consortium (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409(6822), 860–921. <https://doi.org/10.1038/35057062>

Langan R. C. (2019). Benign Prostatic Hyperplasia. *Primary care*, 46(2), 223–232. <https://doi.org/10.1016/j.pop.2019.02.003>

Lee, J. H., Kim, J. E., Kim, B. G., Han, H. H., Kang, S., & Cho, N. H. (2016). STAT3-induced WDR1 overexpression promotes breast cancer cell migration. *Cellular signalling*, 28(11), 1753–1760. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2016.08.006>

Lewis, S. J., Murad, A., Chen, L., Davey Smith, G., Donovan, J., Palmer, T., Hamdy, F., Neal, D., Lane, J. A., Davis, M., Cox, A., & Martin, R. M. (2010). Associations between an obesity related genetic variant (FTO rs9939609) and prostate cancer risk. *PLoS one*, 5(10), e13485. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013485>

Li, G., Chen, Q., Wang, L., Ke, D., & Yuan, Z. (2012). Association between FTO gene polymorphism and cancer risk: evidence from 16,277 cases and 31,153 controls. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 33(4), 1237–1243. <https://doi.org/10.1007/s13277-012-0372-9>

Lei S, Zhang B, Huang L, Zheng Z, Xie S, Shen L, Breitzig M, Czachor A, Liu H, Luo H, Chen Y, Liu K, Sun H, Zheng Q, Li Q, Wang F. **SRSF1** promotes the inclusion of exon 3 of SRA1 and the invasion of hepatocellular carcinoma cells by interacting with exon 3 of SRA1 pre-mRNA. *Cell Death Discov.* 2021 May 19;7(1):117.)

Lin JC, Lee YC, Liang YC, Fann YC, Johnson KR, Lin YJ. The impact of the RBM4-initiated splicing cascade on modulating the carcinogenic signature of colorectal cancer cells. *Sci Rep.* 2017 Mar 9;7:44204

Lippi, G., & Mattiuzzi, C. (2015). Fried food and prostate cancer risk: systematic review and meta-analysis. *International journal of food sciences and nutrition*, 66(5), 587–589. <https://doi.org/10.3109/09637486.2015.1056111>

Lippman, S. M., Klein, E. A., Goodman, P. J., Lucia, M. S., Thompson, I. M., Ford, L. G., Parnes, H. L., Minasian, L. M., Gaziano, J. M., Hartline, J. A., Parsons, J. K., Bearden, J. D., 3rd, Crawford, E. D., Goodman, G. E., Claudio, J., Winquist, E., Cook, E. D., Karp, D. D., Walther, P., Lieber, M. M., ... Coltman, C. A., Jr (2009). Effect of selenium and vitamin E on risk of prostate cancer and other cancers: the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT). *JAMA*, 301(1), 39–51. <https://doi.org/10.1001/jama.2008.864>

Liu Y., Fallon L., Lashuel H.A., Liu Z., Lansbury P.T. Jr. The UCH-L1 gene encodes two opposing enzymatic activities that affect alpha-synuclein degradation and Parkinson's disease susceptibility." *Cell* 111:209-218(2002)

Liu, J., Yue, Y., Han, D., Wang, X., Fu, Y., Zhang, L., Jia, G., Yu, M., Lu, Z., Deng, X., Dai, Q., Chen, W., & He, C. (2014). A METTL3-METTL14 complex mediates mammalian nuclear RNA N6-adenosine methylation. *Nature chemical biology*, 10(2), 93–95. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1432>

- Long, J. C., & Caceres, J. F. (2009). The SR protein family of splicing factors: master regulators of gene expression. *The Biochemical journal*, 417(1), 15–27. <https://doi.org/10.1042/BJ20081501>
- Lu, L. I., Fu, N. I., Luo, X. U., Li, X. Y., & Li, X. P. (2015). Overexpression of cofilin 1 in prostate cancer and the corresponding clinical implications. *Oncology letters*, 9(6), 2757–2761. <https://doi.org/10.3892/ol.2015.3133>
- Ludwig JA, Weinstein JN. Biomarkers in cancer staging. *Nat Rev Cancer* 2005; 5 (11): 845-856.
- Lv, J., Liu, J., Xiao, M., Xu, H., Xu, C., Zhang, X., Tang, L., Jiang, F., Zhou, Y., Zhang, Z., Qu, L., & Lu, C. (2018). ARP3 promotes tumor metastasis and predicts a poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Pathology, research and practice*, 214(9), 1356–1361. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2018.05.028>
- Macinnis RJ, English DR (2006) Body size and composition and prostate cancer risk: systematic review and meta-regression analysis. *Cancer Causes Control* 17: 989–1003
- Marko-Varga, G., & Fehniger, T. E. (2004). Proteomics and disease--the challenges for technology and discovery. *Journal of proteome research*, 3(2), 167–178. <https://doi.org/10.1021/pr049958+>
- Mazaris E, Tsiotras A. Molecular pathways in prostate cancer. *Nephrourol Mon* 2013;5:792-800.
- Ming Tan, Ove B Schaffalitzky de Muckadell, Maiken Thyregod Jøergensen: Gene Expression Network Analysis of Precursor Lesions in Familial Pancreatic Cancer. *J Pancreat Cancer*. 2020 Aug 5;6(1):73-84
- Mohler J., Armstrong A., Bahnson R., D'Amico A. NCCN clinical practice guidelines in oncology: Prostate cancer. *J. Natl. Compr. Cancer Netw*. 2016 doi: 10.1016/B978-0-12-800077-9.00013-X
- Mottet, N., Bellmunt, J., Bolla, M., Briers, E., Cumberbatch, M. G., De Santis, M., Fossati, N., Gross, T., Henry, A. M., Joniau, S., Lam, T. B., Mason, M. D., Matveev, V. B., Moldovan, P. C., van den Bergh, R., Van den Broeck, T., van der Poel, H. G., van der Kwast, T. H., Rouvière, O., Schoots, I. G., ... Cornford, P. (2017). EAU-ESTRO-SIOG Guidelines on Prostate Cancer. Part 1: Screening, Diagnosis, and Local Treatment with Curative Intent. *European urology*, 71(4), 618–629. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2016.08.003>
- Moul, J. W., Sesterhenn, I. A., Connelly, R. R., Douglas, T., Srivastava, S., Mostofi, F. K., & McLeod, D. G. (1995). Prostate-specific antigen values at the time of prostate cancer diagnosis in African-American men. *JAMA*, 274(16), 1277–1281.
- More DA, Kumar A. SRSF3: Newly discovered functions and roles in human health and diseases. *European Journal of Cell Biology* 99 (2020) 151099
- Munkley, J., Maia, T. M., Ibarluzea, N., Livermore, K. E., Vodak, D., Ehrmann, I., James, K., Rajan, P., Barbosa-Morais, N. L., & Elliott, D. J. (2018). Androgen-dependent alternative mRNA isoform expression in prostate cancer cells. *F1000Research*, 7, 1189. <https://doi.org/10.12688/f1000research.15604.1>
- Munkley, J., Vodak, D., Livermore, K. E., James, K., Wilson, B. T., Knight, B., McCullagh, P., Mcgrath, J., Crundwell, M., Harries, L. W., Leung, H. Y., Robson, C. N., Mills, I. G., Rajan, P., & Elliott, D. J. (2016). Glycosylation is an Androgen-Regulated Process Essential for Prostate Cancer Cell Viability. *EBioMedicine*, 8, 103–116. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.04.018>
- Mydlo, J. H., Tieng, N. L., Volpe, M. A., Chaiken, R., & Kral, J. G. (2001). A pilot study analyzing PSA, serum testosterone, lipid profile, body mass index and race in a small sample of patients with and without carcinoma of the prostate. *Prostate cancer and prostatic diseases*, 4(2), 101–105. <https://doi.org/10.1038/sj.pcan.4500514>
- Nakagawa H. Prostate cancer genomics by high-throughput technologies: genome-wide association study and sequencing analysis. *Endocr Relat Cancer* 2013;20:171-181.
- Nakamura, J., Aoyagi, S., Nanchi, I., Nakatsuka, S., Hirata, E., Shibata, S., Fukuda, M., Yamamoto, Y., Fukuda, I., Tatsumi, N., Ueda, T., Fujiki, F., Nomura, M., Nishida, S., Shirakata, T., Hosen, N., Tsuboi, A., Oka, Y., Nezu, R., Mori, M., ... Oji, Y. (2009). Overexpression of eukaryotic elongation factor eEF2 in gastrointestinal cancers and its involvement in G2/M progression in the cell cycle. *International journal of oncology*, 34(5), 1181–1189.
- Obeng, E. A., Stewart, C., & Abdel-Wahab, O. (2019). Altered RNA Processing in Cancer Pathogenesis and Therapy. *Cancer discovery*, 9(11), 1493–1510. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-19-0399>

- Özök, S. 2011. Prostat kanserinde radyasyon temelli tedavi sonrası olası sorunlar ve çözümler. *Üroonkoloji Bülteni*. 2:98-102.
- Pal S, Gupta R, Davuluri RV (2012) Alternative transcription and alternative splicing in cancer. *Pharmacol Ther* 136: 283-294. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.08.005>
- Paschalis, A., Sharp, A., Welti, J. C., Neeb, A., Raj, G. V., Luo, J., Plymate, S. R., & de Bono, J. S. (2018). Alternative splicing in prostate cancer. *Nature reviews. Clinical oncology*, 15(11), 663–675. <https://doi.org/10.1038/s41571-018-0085-0>
- Patel AV, Rodriguez C, Jacobs EJ, Solomon L, Thun MJ, CalleEE. 2005. Recreational physical activity and risk of pros-tate cancer in a large cohort of U.S. men. *Cancer Epide-miol Biomarkers Prev* 14:275–279
- Peng, C., Lu, Z., Xie, Z., Cheng, Z., Chen, Y., Tan, M., Luo, H., Zhang, Y., He, W., Yang, K., Zwaans, B. M., Tishkoff, D., Ho, L., Lombard, D., He, T. C., Dai, J., Verdin, E., Ye, Y., & Zhao, Y. (2011). The first identification of lysine malonylation substrates and its regulatory enzyme. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 10(12), M111.012658. <https://doi.org/10.1074/mcp.M111.012658>
- Pernar, C. H., Ebot, E. M., Wilson, K. M., & Mucci, L. A. (2018). The Epidemiology of Prostate Cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 8(12), a030361.
- Pereira, B., Billaud, M., & Almeida, R. (2017). RNA-Binding Proteins in Cancer: Old Players and New Actors. *Trends in cancer*, 3(7), 506–528. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2017.05.003>
- Peter, H., and Stephan, M. 2012. Landmarks in hormonal therapy for prostate cancer. *British J Urol Int*. 110(1):23-9.
- Renkema, G. H., Wortmann, S. B., Smeets, R. J., Venselaar, H., Antoine, M., Visser, G., Ben-Omran, T., van den Heuvel, L. P., Timmers, H. J., Smeitink, J. A., & Rodenburg, R. J. (2015). SDHA mutations causing a multisystem mitochondrial disease: novel mutations and genetic overlap with hereditary tumors. *European journal of human genetics : EJHG*, 23(2), 202–209. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2014.80>
- Ribeiro, R., Lopes, C., & Medeiros, R. (2006). The link between obesity and prostate cancer: the leptin pathway and therapeutic perspectives. *Prostate cancer and prostatic diseases*, 9(1), 19–24. <https://doi.org/10.1038/sj.pcan.4500844>
- Robbens, S., P. Rouze, J.M. Cock ve diğ. 2008. The FTO gene, implicated in human obesity, is found only in vertebrates and marine algae. *Journal of molecular evolution*. 66:80-84. <https://doi.org/10.1007/s00239-007-9059-z>
- Rodriguez C, Patel AV, Calle EE, Jacobs EJ, Chao A, Thun MJ. Body mass index, height, and prostate cancer mortality in two large cohorts of adult men in the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;10:345-353
- Russo, G. I., Calogero, A. E., Condorelli, R. A., Scalia, G., Morgia, G., & La Vignera, S. (2020). Human papillomavirus and risk of prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *The aging male : the official journal of the International Society for the Study of the Aging Male*, 23(2), 132–138. <https://doi.org/10.1080/13685538.2018.1455178>
- Salgado-Montilla, J. L., Rodríguez-Cabán, J. L., Sánchez-García, J., Sánchez-Ortiz, R., & Irizarry-Ramírez, M. (2017). Impact of FTO SNPs rs9930506 and rs9939609 in Prostate Cancer Severity in a Cohort of Puerto Rican Men. *Archives in cancer research*, 5(3), 148. <https://doi.org/10.21767/2254-6081.1000148>
- Schrecengost, R., & Knudsen, K. E. (2013). Molecular pathogenesis and progression of prostate cancer. *Seminars in oncology*, 40(3), 244–258. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2013.04.001>
- Sekine, Y., Nakayama, H., Miyazawa, Y., Kato, H., Furuya, Y., Arai, S., Koike, H., Matsui, H., Shibata, Y., Ito, K., & Suzuki, K. (2018). Simvastatin in combination with meclufenamic acid inhibits the proliferation and migration of human prostate cancer PC-3 cells via an AKR1C3 mechanism. *Oncology letters*, 15(3), 3167–3172. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.7721>
- Singh, G., Ramey, D. R., Morfeld, D., & Fries, J. F. (1994). Comparative toxicity of non-steroidal anti-inflammatory agents. *Pharmacology & Therapeutics*, 62(1-2), 175–191.
- Slaman DJ., deKarnion JB., Verma IM., Cline MJ.: Expression o celluler oncogenes in human maligncies. *Science*, 224;256,1984.

- Sommer, S., Lavi, U., & Darnell, J. E., Jr (1978). The absolute frequency of labeled N-6-methyladenosine in HeLa cell messenger RNA decreases with label time. *Journal of molecular biology*, 124(3), 487–499. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(78\)90183-3](https://doi.org/10.1016/0022-2836(78)90183-3)
- Soriano-Hernández, A. D., Galvan-Salazar, H. R., Montes-Galindo, D. A., Rodriguez-Hernandez, A., Martínez-Martínez, R., Guzmán-Esquivel, J., Valdez-Velázquez, L. L., Baltazar-Rodríguez, L. M., Espinoza-Gómez, F., Rojas-Martínez, A., Ortiz-López, R., González-Alvarez, R., & Delgado-Enciso, I. (2012). Antitumor effect of meclufenamic acid on human androgen-independent prostate cancer: a preclinical evaluation. *International urology and nephrology*, 44(2), 471–477. <https://doi.org/10.1007/s11255-011-0012-0>
- Sundram, V., Chauhan, S. C., Ebeling, M., & Jaggi, M. (2012). Curcumin attenuates  $\beta$ -catenin signaling in prostate cancer cells through activation of protein kinase D1. *PloS one*, 7(4), e35368. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035366>
- Sheng, J., Zhao, Q., Zhao, J., Zhang, W., Sun, Y., Qin, P., Lv, Y., Bai, L., Yang, Q., Chen, L., Qi, Y., Zhang, G., Zhang, L., Gu, C., Deng, X., Liu, H., Meng, S., Gu, H., Liu, Q., Coulson, J. M., ... Wang, Y. (2018). SRSF1 modulates PTPMT1 alternative splicing to regulate lung cancer cell radioresistance. *EBioMedicine*, 38, 113–126. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.11.007>
- Takayama K.I., Suzuki T., Fujimura T., Yamada Y., Takahashi S., Homma Y. Dysregulation of spliceosome gene expression in advanced prostate cancer by RNA-binding protein PSF. *PNAS*. 2017;114(39):10461–10466.
- Talcott JA, (2003). Quality of care in prostate cancer: Important to start and too important to stop here. *J Clin Oncol* 21:1902-1903, 2003
- Talcott, J. A., Manola, J., Clark, J. A., Kaplan, I., Beard, C. J., Mitchell, S. P., Chen, R. C., O'Leary, M. P., Kantoff, P. W., & D'Amico, A. V. (2003). Time course and predictors of symptoms after primary prostate cancer therapy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 21(21), 3979–3986.
- Tan, D. S., Mok, T. S., & Rebbeck, T. R. (2016). Cancer Genomics: Diversity and Disparity Across Ethnicity and Geography. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 34(1), 91–101. <https://doi.org/10.1200/JCO.2015.62.0096>
- Tang, H., Dong, X., Hassan, M., Abbruzzese, J. L., & Li, D. (2011). Body mass index and obesity- and diabetes-associated genotypes and risk for pancreatic cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 20(5), 779–792.
- Teo, M. Y., Rathkopf, D. E., & Kantoff, P. (2019). Treatment of Advanced Prostate Cancer. *Annual review of medicine*, 70, 479–499.
- Tian, Y., Guan, Y., Jia, Y., Meng, Q., & Yang, J. (2014). Chloride intracellular channel 1 regulates prostate cancer cell proliferation and migration through the MAPK/ERK pathway. *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals*, 29(8), 339–344. <https://doi.org/10.1089/cbr.2014.1666>
- Valenzuela, S. M., Martin, D. K., Por, S. B., Robbins, J. M., Warton, K., Bootcov, M. R., Schofield, P. R., Campbell, T. J., & Breit, S. N. (1997). Molecular cloning and expression of a chloride ion channel of cell nuclei. *The Journal of biological chemistry*, 272(19), 12575–12582. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.19.12575>
- Vecchione, A., Gottardo, F., Gomella, L. G., Wildemore, B., Fassan, M. s., Bragantini, E., Pagano, F., & Baffa, R. (2007). Molecular genetics of prostate cancer: clinical translational opportunities. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*, 26(1), 25–37.
- Voorhees, P. M., Dees, E. C., O'Neil, B., & Orłowski, R. Z. (2003). The proteasome as a target for cancer therapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 9(17), 6316–6325.
- Wang, Y., Chen, D., Qian, H., Tsai, Y. S., Shao, S., Liu, Q., Dominguez, D., & Wang, Z. (2014). The splicing factor RBM4 controls apoptosis, proliferation, and migration to suppress tumor progression. *Cancer cell*, 26(3), 374–389. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.07.010>

Wang, Y., Li, Y., Toth, J. I., Petroski, M. D., Zhang, Z., & Zhao, J. C. (2014). N 6-methyladenosine modification destabilizes developmental regulators in embryonic stem cells. *Nature cell biology*, 16(2), 191–198.

Westphalen, A. C., Coakley, F. V., Kurhanewicz, J., Reed, G., Wang, Z. J., & Simko, J. P. (2009). Mucinous adenocarcinoma of the prostate: MRI and MR spectroscopy features. *AJR. American journal of roentgenology*, 193(3), W238–W243. <https://doi.org/10.2214/AJR.08.1495>

Winter, D., Podtelejnikov, A. V., Mann, M., & Li, R. (1997). The complex containing actin-related proteins Arp2 and Arp3 is required for the motility and integrity of yeast actin patches. *Current biology : CB*, 7(7), 519–529. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(06\)00223-5](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(06)00223-5)

[www.prostatecancerfree.org](http://www.prostatecancerfree.org) (1.12.2020)

[www.drozdogan.com/prostat-kanseri-belirteleri-evreleri-ve-tedavisi/#4-evre-metastatik-prostat-kanserinde-kemoterapi-ve-hedefe-yonelik-tedaviler](http://www.drozdogan.com/prostat-kanseri-belirteleri-evreleri-ve-tedavisi/#4-evre-metastatik-prostat-kanserinde-kemoterapi-ve-hedefe-yonelik-tedaviler)).

Wyke, S. M., Russell, S. T., & Tisdale, M. J. (2004). Induction of proteasome expression in skeletal muscle is attenuated by inhibitors of NF-kappaB activation. *British journal of cancer*, 91(9), 1742–1750. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602165>

Xiang, Y., Liao, X. H., Yao, A., Qin, H., Fan, L. J., Li, J. P., Hu, P., Li, H., Guo, W., Li, J. Y., Gu, C. J., Bao, L. Y., & Zhang, T. C. (2017). MRTF-A-miR-206-WDR1 form feedback loop to regulate breast cancer cell migration. *Experimental cell research*, 359(2), 394–404. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.08.023>

Xiao W., Adhikari S., Dahal U., Chen Y.S., Hao Y.J., Sun B.F., Sun H.Y., Li A., Ping X.L., Lai W.Y., Wang X., Ma H.L., Huang C.M., Yang Y., Huang N., Jiang G.B., Wang H.L., Zhou Q. Yang Y.G."Nuclear m(6)A reader YTHDC1 regulates mRNA splicing." *Mol. Cell* 61:507-519(2016) <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0220573>

Xie W, Zhang L, Jiao H, Guan L, Zha J, Li X, Wu M, Wang Z, Han J, You H (Jul 2015). "[Chaperone-mediated autophagy prevents apoptosis by degrading BBC3/PUMA](#)". *Autophagy*. 11 (9): 1623–1635.]

Yamauchi, J., Sekiguchi, M., Shirai, T., Yamada, M., & Ishimi, Y. (2013). Role of nuclear localization of PSMB1 in transcriptional activation. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 77(8), 1785–1787. <https://doi.org/10.1271/bbb.130290>

Yang, C. S., Chin, K. V., & Lambert, J. D. (2004). Cancer chemoprevention by targeting proteasomal degradation: commentary re KA Dragnev et al, Specific chemopreventive agents trigger proteasomal degradation of G1 cyclins: implications for combination therapy. *Clin Cancer Res*, 2004;10:2570-7. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 10(7), 2220–2221. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-04-0416>

Yang, J., Loos, R. J., Powell, J. E., Medland, S. E., Speliotes, E. K., Chasman, D. I., Rose, L. M., Thorleifsson, G., Steinthorsdottir, V., Mägi, R., Waite, L., Smith, A. V., Yerges-Armstrong, L. M., Monda, K. L., Hadley, D., Mahajan, A., Li, G., Kapur, K., Vitart, V., Huffman, J. E., ... Visscher, P. M. (2012). FTO genotype is associated with phenotypic variability of body mass index. *Nature*, 490(7419), 267–272.

Yeo G. S. (2014). The role of the FTO (Fat Mass and Obesity Related) locus in regulating body size and composition. *Molecular and cellular endocrinology*, 397(1-2), 34–41. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2014.09.012>

Yong, H., Zhao, W., Zhou, X., Liu, Z., Tang, Q., Shi, H., Cheng, R., Zhang, X., Qiu, Z., Zhu, J., & Feng, Z. (2019). RNA-Binding Motif 4 (RBM4) Suppresses Tumor Growth and Metastasis in Human Gastric Cancer. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*, 25, 4025–4034. <https://doi.org/10.12659/MSM.914513>

Yamamoto R, Osawa T, Sasaki Y, Yamamoto S, Anai M, Izumi K. Overexpression of p54(nrb)/NONO induces differential EPHA6 splicing and contributes to castration-resistant prostate cancer growth. *Oncotarget*. 2018;9(12):10510–10524

Yuan, B., Zhang, R., Hu, J., Liu, Z., Yang, C., Zhang, T., & Zhang, C. (2018). WDR1 Promotes Cell Growth and Migration and Contributes to Malignant Phenotypes of Non-small Cell Lung Cancer through ADF/cofilin-mediated Actin Dynamics. *International journal of biological sciences*, 14(9), 1067–1080. <https://doi.org/10.7150/ijbs.23845>

YuPeng, L., YuXue, Z., PengFei, L., Cheng, C., YaShuang, Z., DaPeng, L., & Chen, D. (2015). Cholesterol Levels in Blood and the Risk of Prostate Cancer: A Meta-analysis of 14 Prospective Studies. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 24(7), 1086–1093. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-14-1329>

Zaccara, S., Ries, R.J. & Jaffrey, S.R. Reading, writing and erasing mRNA methylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 20, 608–624 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0168-5>

Zheng, G., Dahl, J. A., Niu, Y., Fedorcsak, P., Huang, C. M., Li, C. J., Vågbø, C. B., Shi, Y., Wang, W. L., Song, S. H., Lu, Z., Bosmans, R. P., Dai, Q., Hao, Y. J., Yang, X., Zhao, W. M., Tong, W. M., Wang, X. J., Bogdan, F., Furu, K., ... He, C. (2013). ALKBH5 is a mammalian RNA demethylase that impacts RNA metabolism and mouse fertility. *Molecular cell*, 49(1), 18–29. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.10.015>

Zuo P, Manley JL (Dec 1993). "Functional domains of the human splicing factor ASF/SF2". *The EMBO Journal*. **12** (12): 4727–37

