



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

**DOKTORA
TEZİ**

**FOXD1 TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜ
SUSTURULMASININ PROSTAT KANSERİ
HÜCRELERİNDE EPİTELYAL-MEZENKİMAL
GEÇİŞ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

ÇİĞDEM DÖNMEZ

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

OCAK 2022



**FOX D1 TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜ SUSTURULMASININ PROSTAT
KANSERİ HÜCRELERİNDE EPİTELYAL-MEZENKİMAL GEÇİŞ
ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Çiğdem DÖNMEZ

**DOKTORA TEZİ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

OCAK 2022

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

(İmza)

Çiğdem DÖNMEZ

13/01/2022

FOXD1 TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜ SUSTURULMASININ PROSTAT KANSERİ
HÜCRELERİNDE EPİTELYAL-MEZENKİMAL GEÇİŞ ÜZERİNE ETKİLERİNİN

ARAŞTIRILMASI

(Doktora Tezi)

Çiğdem DÖNMEZ

GAZİ ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ocak 2022

ÖZET

Prostat kanseri hastaları çoğunlukla metastaz nedeniyle hayatını kaybetmektedir. Metastatik süreçleri kontrol eden mekanizmaların aydınlatılması, lokalize hastalığın metastaza ilerlemesini önlemek için yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi açısından önemlidir. Forkhead box D1 (FOXD1), FOX transkripsiyon faktörü ailesinin bir üyesidir ve çeşitli kanserlerin gelişmesinde ve ilerlemesinde önemli rol oynadığı bildirilmiştir. Ancak, prostat kanserindeki rolü henüz bilinmemektedir. Bu çalışmada, ilk olarak prostat kanseri ve prostat epitel hücre hatlarında FOXD1 ifade düzeyleri açısından bir farklılık olup olmadığı belirlenmiştir. Daha sonra, en yüksek FOXD1 ifadesine sahip olan 22Rv1 prostat kanseri hücrelerinde, FOXD1'in susturulmasının hücre proliferasyonu, migrasyonu ve invazyonu üzerine etkileri araştırılmıştır. Ayrıca, FOXD1 susturulmasının bazı EMT proteinleri (E-kaderin, N-kaderin, Snail ve Vimentin) ve Wnt/ β -katenin yolağında görevli bazı proteinlerin (β -katenin, c-myc ve siklin D1) ifadesi üzerindeki etkileri de araştırılmıştır. FOXD1'in prostat kanseri hücre hatlarında normal prostat epitel hücre hattına kıyasla daha yüksek düzeyde ifade edildiği bulunmuştur. *İn vitro* deneyler, FOXD1'in susturulmasının 22Rv1 prostat kanseri hücrelerinin proliferasyonunu, migrasyonunu ve invazyonunu önemli ölçüde azalttığını göstermiştir. Bunlara ilaveten, FOXD1'in susturulmasının, Wnt/ β -katenin sinyal yolağında görevli β -katenin ve siklin D1'in ifadelerini etkilediği belirlenmiştir. Ancak, N-kaderin dışındaki EMT ile ilişkili proteinlerin ifadesi üzerine etki etmediği görülmüştür. Sonuçlarımız, FOXD1'in susturulmasının prostat kanseri ilerlemesi sırasında Wnt/ β -katenin sinyal yolağını baskılayarak, 22Rv1 hücrelerinin proliferasyon, migrasyon ve invazyon potansiyellerini EMT'den bağımsız olarak azalttığını göstermiştir. Bu nedenle, FOXD1'in ifade durumu yeni bir prognostik faktör olabileceği gibi, prostat kanseri tedavisi için potansiyel bir terapötik hedef olabilir.

Bilim Kodu : 1055.1
Anahtar Kelimeler : Fork-head box D1, FOXD1, Prostat kanseri, Proliferasyon, EMT, Migrasyon, İnvazyon
Sayfa Adedi : 80
Danışman : Prof. Dr. Ece KONAÇ

INVESTIGATION OF EFFECTS OF FOXD1 TRANSCRIPTION FACTOR SILENCING ON
EPITHELIAL TO MESENCHYMAL TRANSITION IN PROSTATE CANCER CELLS

(Ph. D. Thesis)

Çiğdem DÖNMEZ

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

January 2022

ABSTRACT

Prostate cancer patients mostly die due to metastasis. The elucidation of the mechanisms controlling the metastatic processes is important for the development of new treatment methods to prevent the progression of localized disease to metastasis. Forkhead box D1 (FOXD1) is a member of the FOX transcription factor family and has been reported to play an important role in the development and progression of various cancers. However, its role in prostate cancer is not yet known. In this study, initially, it was determined whether there was a difference in terms of FOXD1 expression levels in prostate cancer and prostate epithelial cell lines. Then, the effects of silencing FOXD1 on cell proliferation, migration and invasion were investigated in 22Rv1 prostate cancer cells with the highest FOXD1 expression. In addition, the effects of FOXD1 silencing on the expression of some EMT proteins (E-cadherin, N-cadherin, Snail and Vimentin) and some proteins involved in the Wnt/ β -catenin pathway (β -catenin, c-myc and cyclin D1) were also investigated. FOXD1 was found to be expressed at a higher level in prostate cancer cell lines compared to normal prostate epithelial cell line. *In vitro* experiments have shown that silencing FOXD1 significantly reduces proliferation, migration and invasion of 22Rv1 prostate cancer cells. Furthermore, silencing of FOXD1 was found to affect the expression of β -catenin and cyclin D1, which are involved in the Wnt/ β -catenin signaling pathway. However, it did not appear to affect the expression of EMT-related proteins other than N-cadherin. Our results showed that silencing of FOXD1 suppresses the Wnt/ β -catenin signaling pathway during prostate cancer progression, reducing the proliferation, migration and invasion potentials of 22Rv1 cells independently of EMT. Therefore, the expression status of FOXD1 may be a new prognostic factor as well as a potential therapeutic target for prostate cancer treatment.

Science Code : 1055.1
Key Words : Fork-head box D1, FOXD1, Prostate cancer, Proliferation, EMT, Migration, Invasion
Page Number : 80
Supervisor : Prof. Dr. Ece KONAÇ

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerinden büyük fayda gördüğüm, iyi niyeti ve hoşgörüsü ile yoluma daima ışık tutan, inandığım yolda başarıyla yürümem için gereken cesareti veren, başarılı bilim insanı duruşuyla bana her zaman örnek olan değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ece KONAÇ'a teşekkür ederim.

Doktora tez izleme komitemde yer alan ve tez çalışmalarım süresince desteklerini ve anlayışlarını hiç esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Cenk Yücel BİLEN'e ve Sayın Doç. Dr. Atiye Seda YAR SAĞLAM'a teşekkür ederim.

Akademik yolcuğum sırasında kendilerinden edindiğim bilgi ve tecrübelerden ötürü, Gazi Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Sayın Doç. Dr. Hacer İlke ÖNEN ve Sayın Doç. Dr. Nuray VAROL'a teşekkür ederim.

Tez çalışmamın bir kısmında bana laboratuvarının kapısını açan ve tezimi yürütebilmeme olanak sağlayan Sayın Prof. Dr. Çimen KARASU'ya teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili arkadaşım Öğr. Gör. Dr. Esra GÜNDÜZER'e teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca hep daha iyisini başarmam için ellerinden geleni yapan, sonsuz sevgi ve destekleriyle her zaman yanımda olan kıymetli aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması, Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı (ÖYP) ve 01/2019-52 proje kodu ile Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) birimi tarafından desteklenmiş olup, desteklerinden ötürü teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Prostat Kanseri	3
2.1.1. Prostat kanseri risk faktörleri	3
2.1.2. Prostat kanserinin tanısı	4
2.1.3. Prostat kanserinin hücrel ve moleküler ilerlemesi	5
2.1.4. Prostat kanserinde prognoz ve sağkalım	8
2.2. Epitelyal-Mezenkimal Geçiş (EMT) ve Prostat Kanseri.....	8
2.2.1. EMT'yi düzenleyen transkripsiyon faktörleri	10
2.2.2. Prostat kanserinde EMT'yi indükleyen büyüme faktörleri ve sitokinler.....	10
2.2.3. Prostat kanserinde Wnt/ β -katenin sinyal yolağı	12
2.3. Forkhead Box (FOX) Ailesi Transkripsiyon Faktörleri.....	13
2.3.1. FOXD1 transkripsiyon faktörü	14
2.3.2. FOXD1 ve kanser ilişkisi.....	15
2.4. RNA İnterferans	15
2.5. Sentetik siRNA'ların Klinik Uygulamaları	18

3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	21
3.1. Gereçler	21
3.1.1. Kullanılan cihazlar	21
3.1.2. Kullanılan sarf malzemeler	21
3.1.3. Kullanılan kimyasal malzemeler	22
3.1.4. Kullanılan kitler	23
3.1.5. Kullanılan besiyeri ve çözeltilerin hazırlanışı.....	23
3.2. Kullanılan Yöntemler	26
3.2.1. Hücre kültürü	26
3.2.2. Total RNA izolasyonu	27
3.2.3. DNaz I uygulaması	28
3.2.4. cDNA (komplementer DNA) sentezi	28
3.2.5. Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR).....	29
3.2.6. Hücrelerden protein izolasyonu.....	31
3.2.7. BCA kiti ile protein miktar tayini	31
3.2.8. Western blot yöntemi ile protein ifadelerinin belirlenmesi	32
3.2.9. Hücre transfeksiyonu	32
3.2.10. WST-1 ile hücre proliferasyonunun belirlenmesi.....	33
3.2.11. <i>In vitro</i> yara iyileşme (Wound healing) deneyi	33
3.2.12. <i>In vitro</i> migrasyon ve invazyon analizleri	34
3.3. Normalizasyon ve İstatistiksel Analiz Yöntemleri	34
4. BULGULAR	35
4.1. Prostat Kanseri Hücre Hatlarında ve Prostat Epitel Hücre Hattında FOXD1 İfadesinin mRNA ve Protein Düzeyinde Belirlenmesi.....	35

Sayfa

4.2. 22Rv1 Hücrelerinde FOXD1'in Susturulmasının Protein ve mRNA Düzeyinde Teyit Edilmesi	36
4.3. 22Rv1 Hücrelerinde FOXD1'in Susturulmasının Hücre Proliferasyonuna Etkisinin WST-1Yöntemi ile Değerlendirilmesi	38
4.4. 22Rv1 Hücrelerinde FOXD1'in Susturulmasının EMT ile İlgili Belirteçlerin Protein Düzeylerine Olan Etkisinin Değerlendirilmesi	39
4.5. 22Rv1 Hücrelerinde FOXD1'in Susturulmasının Yara İyileşmesi (Wound Healing) Üzerindeki Potansiyel Etkisinin Değerlendirilmesi	42
4.6. 22Rv1 Hücrelerinde FOXD1'in Susturulmasının Transwell Migrasyon ve İnvazyon Üzerindeki Potansiyel Etkilerinin Değerlendirilmesi	44
5. TARTIŞMA	47
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	57
KAYNAKLAR	59
ÖZGEÇMİŞ.....	77

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. FDA onaylı veya geç faz 3 klinik deneylerde siRNA bazlı ilaçların gelişiminin özeti.....	18
Çizelge 3.1. %8, %10 ve %12'lik ayırma (seperating) jellerinde kullanılan kimyasalların oranları	26
Çizelge 3.2. Üst jelde (stacking) kullanılan kimyasalların oranları.....	26
Çizelge 3.3. DNaz uygulamasında kullanılan bileşenler ve miktarları.....	28
Çizelge 3.4. cDNA sentezi için kullanılan bileşenler ve miktarları.....	28
Çizelge 3.5. Ters Transkripsiyon (RT-PCR) reaksiyon bileşenleri.	29
Çizelge 3.6. Real Time PCR reaksiyonu bileşenleri.....	30
Çizelge 3.7. Real Time PCR reaksiyonunun gerçekleştiği program	30
Çizelge 3.8. Çalışmada kullanılan gen bölgelerine ait primer dizileri.....	30

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. İnsan prostat kanserinin histopatolojik ve moleküler ilerlemesinin özeti	6
Şekil 2.2. Kanser hücrelerinde epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT)	9
Şekil 2.3. Prostat kanserinde EMT'yi tetikleyen bazı büyüme faktörü sinyal yolları.....	11
Şekil 2.4. Farklı organizmalarda bulunan bazı FOX proteinlerine ait benzer DNA bağlanma bölge motifleri.....	14
Şekil 2.5. siRNA ile susturma yolunun şematik gösterimi.....	17
Şekil 4.1. FOXD1 geninin dört prostat kanseri hücre hattı (22Rv1, LNCaP, DU-145 ve PC-3) ve normal prostat epitel hücre hattında (RWPE-1) mRNA düzeyindeki ifadesinin qRT-PCR analizi ile karşılaştırılması	35
Şekil 4.2. FOXD1 geninin dört prostat kanseri hücre hattı (22Rv1, LNCaP, DU-145 ve PC-3) ve normal prostat epitel hücre hattında (RWPE-1) protein düzeyindeki ifadesinin Western blot analizi ile karşılaştırılması.....	36
Şekil 4.3. FOXD1 siRNA ile transfekte edilen 22Rv1 hücrelerinde FOXD1 mRNA ifade düzeyleri.....	37
Şekil 4.4. FOXD1 siRNA ile transfekte edilen 22Rv1 hücrelerinde FOXD1 protein ifade düzeyi.....	38
Şekil 4.5. FOXD1'in susturulmasının, 22Rv1 hücrelerinin proliferasyonuna etkisi	39
Şekil 4.6. 22Rv1 hücrelerinde FOXD1'in susturulması sonrası E-kaderin, Vimentin, Snail ve c-myc protein ifadelerindeki değişimler	40
Şekil 4.7. 22Rv1 hücrelerinde FOXD1'in susturulması sonrası N-kaderin, β -katenin ve siklin D1 protein ifadelerindeki değişimler.	41
Şekil 4.8. FOXD1'in susturulmasının migrasyon üzerindeki potansiyel etkisinin yara iyileşme (wound healing) deneyi ile değerlendirilmesi	43
Şekil 4.9. FOXD1'in susturulmasının migrasyon üzerindeki potansiyel etkisinin transwell migrasyon testi ile değerlendirilmesi	44
Şekil 4.10. FOXD1'in susturulmasının invazyon üzerindeki potansiyel etkisinin transwell invazyon testi ile değerlendirilmesi.....	45

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklamalar
β	Beta
%	Yüzde
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
CO_2	Karbondioksit
dk	Dakika
g	Gram
M	Molar
mA	Miliamper
ml	Mililitre
mM	Milimolar
ng	Nanogram
nm	Nanometre
nM	Nanomol
rpm	Dakika başına dönme sayısı
s	Saniye
U	Ünite
V	Volt
μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
μM	Mikromolar

Kısaltmalar**Açıklamalar**

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AHP	Akut hepatik porfirisi
ALA	Aminolevulinik asit
APS	Amonyum persülfat
AR	Androjen reseptörü
BCA	Bikinkoninik Asit
BPE	Sığır hipofiz özü
BPH	Benign Prostat Hiperplazisi
BRCA2	Meme Kanseri 2
BSA	Bovine serum albumin
cDNA	Komplementer DNA
DBD	DNA bağlanma alanı
ddH₂O	Ultra saf su
DEPC	Dietilpirokarbonat
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoksiribonükleotid asid
DNaz	Deoksiribonükleaz
dNTP	Deoksinükleotit trifosfat
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
dsRNA	Çift sarmallı RNA
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
EGF	Epidermal büyüme faktörü
EMT	Epitelyal-mezenkimal geçiş
FBS	Fetal bovine serum
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FOX	Forkhead box
FOXD1	Forkhead box D1
GAPDH	Gliseraldehid 3-fosfat dehidrogenaz
IGF	İnsülin benzeri büyüme faktörü
KFSM	Keratinosit serum içermeyen besiyeri
LOH	Heterozigosite kaybı
MAPK	Mitojenle aktive olan protein kinaz

Kısaltmalar**Açıklamalar**

miRNA	mikroRNA
mRNA	Haberci RNA
OD	Optik yoğunluk
P	P-değeri
PBG	Porfobilinojen
PBS	Fosfat tamponlu salin
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PI3K	Fosfatidilinositol 3-Kinaz
PMSF	Fenilmetil sulfonil florid
PSA	Prostat spesifik antijen
PTEN	Fosfataz ve tensin homologu
PVDF	Polivinilidenflorit
qRT-PCR	Nicel gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
RISC	RNA ile indüklenen susturma kompleksi
RNA	Ribonükleik asid
RNAi	RNA interferans
RNaz	Ribonükleaz
SDS	Sodyum dodesil sülfat
shRNA	Kısa firkete RNA
siRNA	Küçük engelleyici RNA
TBS	Tris tamponlu salin
TEMED	Tetrametiletildiamin
TGF-β	Transforme edici büyüme faktör beta
TRUS	Transrektal ultrasonografi
WST-1	Kolorimetrik hücre proliferasyonu kiti

1. GİRİŞ

Prostat kanseri, erkeklerde en çok teşhis edilen ikinci kanser olup, kanser sebepli ölümlerin beşinci sırasında gelir. Radikal prostatektomi ve androjen deprivasyon tedavisi lokalize prostat kanserinde kansere bağlı ölümleri azaltmakta etkili tedavi yöntemleridir. Ancak, mevcut terapötik yöntemler metastatik prostat kanseri tedavisinde etkili değildir. Prostat kanseri hastaları çoğunlukla invazyon ve metastaz nedeniyle hayatını kaybetmektedir. Epitelyal-mezenkimal geçişin (EMT), kanser metastazındaki ilk adımları düzenleyen önemli bir mekanizma olduğu öne sürülmektedir. Bu nedenle, prostat kanserinde EMT'ye dahil olan yeni hedefleri araştırmak, prostat kanseri ilerlemesinin altında yatan moleküler mekanizmaların anlaşılması ve prostat kanserini tedavi etmek için yeni ve etkili tedaviler geliştirmek için önem arz etmektedir.

EMT sürecinde hücreler, E-kaderin gibi epitelyal belirteçlerin kaybının bir sonucu olarak hücreden hücreye yapışmadan sorumlu epitel özelliklerini kaybeder ve mezenkimal özellikler kazanır. Ayrıca, N-kaderin, Vimentin gibi mezenkimal belirteçleri, Wnt/ β katenin ve TGF- β yolu gibi sinyal iletim yollarını ve Snail, Slug gibi EMT transkripsiyon faktörlerini modüle ederek köken yerlerinden göç etme yeteneği kazanırlar.

Forkhead box (FOX) proteinleri, evrimsel olarak korunmuş "çatal başlı" veya "kanatlı sarmal" DNA bağlama alanının varlığı ile karakterize edilen bir transkripsiyon faktörleri ailesidir. FOX proteinleri hücre döngüsü ilerlemesi, çoğalma, farklılaşma, migrasyon, apoptoz ve metabolizma gibi çok çeşitli hücresel süreçlerde önemli roller oynamaktadır. FOXD1, FOX transkripsiyon faktörü ailesinin bir üyesidir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, FOXD1'in çeşitli kanser türlerinde anormal şekilde ifade edildiğini ve kanser hücrelerinde FOXD1 ifadesinin artmasının hücre proliferasyonu, apoptoz, invazyon ve metastaz gibi çeşitli biyolojik süreçlerle ilişkili olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, prostat kanserinin ilerlemesinde FOXD1'in rolü henüz aydınlatılamamıştır.

Bu doktora tez çalışmasının amacı; FOXD1'in prostat kanseri hücrelerinde EMT üzerine etkilerinin araştırılmasıdır. Tez çalışması kapsamında, ilk olarak prostat kanseri ve prostat epitel hücre hatlarında FOXD1 ifade düzeyleri açısından bir farklılık olup olmadığı belirlenmiştir. Yapılan analizler sonucunda en yüksek FOXD1 ifadesine sahip hücre hattı

tespit edilmiş ve bu aşamadan sonra araştırmaya bu hücre hattıyla devam edilmiştir. Seçilen prostat kanseri hücre hattında, FOXD1 geninin susturulmasının hücre proliferasyonu, migrasyonu ve invazyonu üzerine etkileri araştırılmıştır. Ayrıca, FOXD1 susturulmasının bazı EMT proteinleri (E-kaderin, N-kaderin, Snail ve Vimentin) ve tümörün başlaması, ilerlemesi ve metastazında kritik rol oynayan ve prostat kanserinde sıklıkla aktive edildiği bilinen Wnt/ β -katenin yolağında görevli bazı proteinlerin (β -katenin, c-myc ve siklin D1) ifadesi üzerindeki etkileri de araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Prostat Kanseri

Prostat kanseri milyonlarca erkeği etkileyen kompleks bir hastalıktır [1]. Hastalık, erkeklerde akciğer kanserinden sonra en sık görülen ikinci kanserdir ve tüm dünyada erkeklerde yeni teşhis edilen kanserlerin %14,1'ini oluşturmaktadır. Dünya çapında prostat kanserine bağlı ölümler yılda 375 000'i aşmaktadır, bu da prostat kanserini erkeklerde kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenlerinden biri yapmaktadır [2].

2.1.1. Prostat kanseri risk faktörleri

Prostat kanseri riski yaşla birlikte güçlü bir şekilde artar ve yeni teşhis edilen bireylerin %85'inden fazlası 60 yaş üzerindedir [3-5]. Prostat kanseri insidansı, insani gelişmişlik indeksi ve gayri safi yurtiçi hasıla ile pozitif ilişkilidir, bu nedenle gelişmiş ülkeler genellikle gelişmekte olan ülkelere göre daha yüksek bir insidansa sahiptir [6]. Tanıya yönelik testlerin yoğun olarak kullanıldığı ülkelerde insidans doğal olarak yükselebileceğinden, bu bölgelerin çoğunda insidanstaki artışın sebebi prostat kanserinin erken tanısına yönelik programların yoğun olarak kullanılması olabilir [7,8].

Afrika veya Karayip kökenliler gibi ABD'de yaşayan bazı etnik gruplar, beyaz popülasyonlara göre erken, daha agresif prostat kanseri açısından iki kat daha yüksek göreceli risk altındadır [9,10]. Buna karşılık, Asya'da yaşayan Asya kökenli erkeklerin prostat kanseri riski ABD'de yaşayan beyaz erkeklere göre daha düşüktür, ancak Asyalı erkeklerde risk ABD'de yaşarken beyaz erkeklere benzer seviyelere ulaşır [11]. Aşkenaz Yahudileri ve İzlanda kökenliler gibi bazı etnik gruplar için erken, daha agresif prostat kanseri riski, BRCA2 gibi genlerdeki germline mutasyonlarıyla bağlantılıdır [12,13]. Bununla birlikte, diğer birçok etnik grup için prostat kanseri insidansı ve mortalitesindeki eşitsizliğin nedenleri bilinmemektedir [1].

Prostat kanseri riski, ailede herhangi bir kanser öyküsü ile güçlü bir şekilde ilişkilidir ve bu ailelerdeki prostat kanseri insidansı, herhangi bir malignitenin en yüksekleri arasında kabul edilir (prostat kanseri teşhisi konan kişilerin yaklaşık %9'unun ailesinde kanser öyküsü

vardır) [14,15]. Ailesel riskin belirlenmesinde, etkilenen bireylerin sayısı, akrabalık derecesi ve hastalık başlangıç yaşı dikkate alınır. Prostat kanseri, bir hastanın üç veya daha fazla etkilenmiş akrabası varsa ve bu akrabalarından en az ikisinde erken prostat kanseri geliştiğinde (başlangıç yaşı <55) ailesel olarak kabul edilir [16]. Prostat kanseri hastası birinci derece akrabaları olan erkeklerin, hastalığa yakalanma riski iki kat daha fazladır [17].

Prostat kanserine bağlı ölüm oranını arttırdığı düşünülen kalıtsal olmayan faktörler arasında sigara dumanına maruz kalma, obezite ve ağırlıklı olarak Batı diyeti (yüksek yağlı, yüksek şekerli gıdalar, işlenmiş veya önceden paketlenmiş et, yumurta ve tahılların yanı sıra düşük meyve, sebze, işlenmemiş et ve tam tahıl tüketimi ile karakterize edilen bir diyet) yer almaktadır. Ancak, bunların hastalık insidansı üzerindeki etkisine dair bir kanıt bulunmamaktadır [18,19].

2.1.2. Prostat kanserinin tanısı

Dijital rektal muayene, serum prostat spesifik antijen (PSA) seviyesi ölçümü ve multiparametrik manyetik rezonans görüntüleme, prostat kanserini saptamak için standart tanı araçlarıdır. Ancak, hem dijital rektal muayene hem de PSA bulguları prostat kanseri yokluğunda anormal (yanlış pozitif) veya prostat kanseri olmasına rağmen normal (yanlış negatif) olabilir. Anormal dijital rektal muayene sonuçları prostat biyopsisi gerektirmektedir ve kesin tanı histopatolojik doğrulamaya bağlıdır. Prostat kanseri agresifliği, 2014 yılında güncellenen Gleason derece sistemi kullanılarak histolojik tümör özelliklerine göre derecelendirilir. Yeni Gleason dereceli grup sistemi, PSA seviyeleri ve klinik tümör evresi ile birlikte, potansiyel olarak ölümcül hastalık riskini öngörmedeki üstünlüğü nedeniyle hasta risk sınıflandırması için önerilir [1].

Bir serum belirteci olarak PSA, biyopsiye dayalı prostat kanseri için olağan tanı yöntemidir. Avrupa Üroloji Derneği Kılavuzlarında, yüksek PSA seviyeleri prostat kanseri olasılığını gösterir [20]. Bununla birlikte, 4.0 ng/ml ile 10.0 ng/ml arasındaki PSA seviyeleri, genellikle prostat kanserini teşhis etmenin tartışmalı olduğu “gri alan” olarak adlandırılır [21]. Bir araştırmaya göre, PSA düzeyi bu aralık içinde olduğunda, prostat biyopsisinin pozitif oranı sadece %15,9 ila %26,0'dır, bu nedenle saptama oranını iyileştirmek için sıklıkla diğer klinik parametrelerle birleştirmek gerekir [22].

Dijital rektal muayene, PSA ≤ 2 ng/ml olan erkeklerde prostat kanserini saptamada %5-30'luk pozitif bir prediktif değeri olan, bez genişlemesini, dokusunu ve sertliğini değerlendirmek için prostatın fiziksel palpasyonudur [16,23]. Dijital rektal muayene ve görüntüleme sonuçları şüpheliyse veya başka bir açıklama yapılmadan PSA değerinin yükseldiği doğrulanırsa prostat kanseri varlığını değerlendirmek için prostat biyopsisi kullanılır [24,25]. Histopatolojik tanı için TRUS kılavuzluğunda prostat biyopsisi alınır. TRUS, klinikte yaygın olarak kullanılan bir görüntüleme yöntemi olup, non-invaziv ve basittir. Bazı bilim adamları, prostat kanseri tanısında TRUS ölçümlerinin duyarlılığının ve özgüllüğünün sırasıyla %17 ila %57 ve %40 ila %63 arasında olduğuna dikkat çekmiştir [26]. Ayrıca, multiparametrik manyetik rezonans görüntüleme, prostat kanseri tanısı için önemli bir yardımcı olarak iyi bilinmektedir [27]. Multiparametrik manyetik rezonans görüntüleme kılavuzluğundaki biyopsilerin, klinik olarak anlamlı prostat kanseri için prostat biyopsisinin tanısal verimini büyük ölçüde artırdığı ve tüm erkeklerden sistematik örnekleme ile karşılaştırıldığında biyopsi için daha küçük bir erkek grubunun seçilmesini sağlayarak erken saptanmasını sağladığı gösterilmiştir [28].

2.1.3. Prostat kanserinin hücresel ve moleküler ilerlemesi

Prostat kanserinin, bir hastanın yaşamı boyunca prostat epitel hücre genomunda somatik mutasyonların birikmesiyle güçlü bir şekilde ilişkili olduğuna inanılmaktadır. Bu anormallikler onkogenlerde veya tümör baskılayıcı genlerde meydana gelebilir ve gen transkripsiyonunda, translasyonunda ve düzensiz hücre homeostazına yol açan fonksiyonel kusurlarda değişikliklere neden olabilir [29,30]. Mutasyonlar ağırlıklı olarak hücre büyümesini, DNA hasar onarımını, hücre çoğalmasını ve hücre ölümünü düzenleyen genleri içerir [31,32].

bulunmuştur [37,38]. Bu nedenle, sıklıkla silinen bu bölgelerde bulunan genlerin, prostat kanseri başlangıcı ile ilişkili olması muhtemeldir. Normal koşullar altında, NKX3.1, prostat epiteli üzerinde büyümeyi baskılayan ve farklılaştırıcı etkiler yaratır [39]. Kim ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışma, farelerde Pten ve Nkx3.1'in fonksiyon kaybının prostat kanseri gelişiminde birlikte rol oynadığını göstermiştir [40].

Prostat kanserinde gen füzyonları çok yaygındır ve genellikle kromozomal yeniden düzenlemeler nedeniyle oluşur. TMPRSS2 ve onkojenik bir transkripsiyon faktörü olan ERG arasındaki gen füzyonu, prostat kanserinde saptanan en yaygın kromozomal anormalliktir ve hastaların %50'sinden fazlasında karsinogenezin tetiklenmesinden sorumludur. Tomlins ve arkadaşları, ERG'nin, TMPRSS2 geninin androjen güdümlü promotörü ile gen füzyonunun bir sonucu olarak prostat kanserinde aşırı eksprese edildiğini göstermiştir [41,42]. Prostat epiteli normal olarak ERG'yi eksprese etmez [43]. ERG, prostat kanserinde aşırı eksprese edilen onkogenlerden biridir ve aşırı ekspresyonu, prostatik intraepitelyal neoplaziden karsinoma geçişte bir sürücü olaydır [42,44,45]. Prostat kanserinde yüksek ERG ekspresyonu ayrıca ileri tümör evresi, yüksek Gleason skoru, metastaz ve daha kısa hayatta kalma süreleri ile de ilişkilidir [46].

Erken evre prostat kanserinde tek nükleotid polimorfizmleri sık görülmez. Bunun yerine, büyük ölçekli genomik yapısal yeniden düzenlemeler, kopya sayısı değişiklikleri veya her ikisi birden görülür [47,31]. Erken genomik anormallikler, hastaların %40-60'ında TMPRSS2-ERG füzyonlarını, hastaların %5-15'inde SPOP'ta işlev kaybı mutasyonlarını ve hastaların %3-5'inde FOXA1'de işlev kazanımı mutasyonlarını içerir [47,48] ancak androjen reseptör (AR) genindeki değişiklikler nadirdir [47]. PTEN delesyonları ve TP53 mutasyonları, lokalize prostat kanseri vakalarının %10-20'sinde gözlenirken, ilerlemiş hastalığı olan vakalarda bu mutasyonların görülme sıklığı %50'den fazladır. Lokalize prostat kanserlerinin üçte biri, tümü hastalık nüksü ile ilişkili olan artan kopya sayısı değişiklikleri, kataegis (lokalize gen hipermutasyon bölgeleri), kromotripsis (kromozom parçalanma bölgeleri) ve kromopleksi (yüksek frekanslı, genom çapında gen yapısal yeniden düzenlemeleri) ile karakterize artan genetik instabiliteye sahiptir [49-51].

Metastatik kastrasyona dirençli prostat kanseri yaygın olarak AR proteininin aşırı ifadenmesine yol açan AR amplifikasyonları ve artan AR sinyali nedeniyle AR yolu değişiklikleri gösterir [52,8]. Metastatik kastrasyona dirençli prostat kanserine ilerleme,

büyüme kontrolü ve genetik stabilitede rol oynayan ilave genlerin düzensizliği ile de ilişkilidir. PTEN'deki homozigot delesyonlar ve fonksiyon kaybı mutasyonları, tüm metastatik kastrasyona dirençli prostat kanseri vakalarının %40'ından fazlasında meydana gelirken, PIK3CA, PIK3CB veya AKT1'deki fonksiyon kazanım mutasyonları, tüm metastatik kastrasyona dirençli prostat kanseri vakalarının %5'inde meydana gelmektedir [53]. Wnt sinyal yolunun aktivasyonu ve MYC onkogeninin aşırı ekspresyonu da sık görülür ve tüm metastatik kastrasyona dirençli prostat kanseri vakalarının %20-30'unda meydana gelir. TP53 ve RB1'deki değişiklikler ise vakaların %20-50'sinde görülür [52,48,54]. RB1 kaybı, metastatik kastrasyona dirençli prostat kanserinde kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir [54].

2.1.4. Prostat kanserinde prognoz ve sağkalım

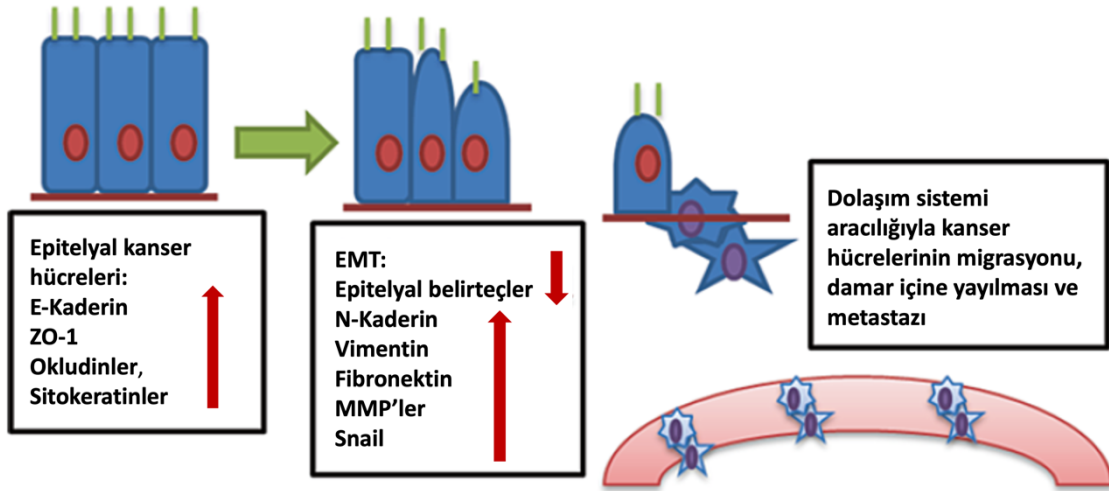
Prostat kanserli bir bireyin prognozu oldukça değişkendir ve birincil tanıdaki tümör derecesine ve evresine bağlıdır. ABD ve Birleşik Krallık gibi yüksek insani gelişmişlik indeksine sahip bölgelerde ve Batı bölgelerinde, PSA testi ve dijital rektal muayene gibi mevcut erken teşhis yöntemleri, çoğu erkekte erken hastalık evresinde tanıyı mümkün kılmaktadır. Erkeklerin yaklaşık %80'i organa sınırlı hastalık, %15'i bölgesel metastazlar ve %5'i uzak metastazlarla teşhis edilir. Lokalize prostat kanserli erkeklerin ortalama yaşam süresi, erken evrede teşhis edilirse 10 yılda %99'a kadar çıkabilir. Geç evre hastalık (uzak metastaz) teşhisi konan erkeklerin, 5 yılda sadece %30'luk bir genel sağkalım oranı vardır [3]. Lokalize hastalığın erken tespiti, metastatik hastalığın başlamasını da önleyerek prostat kanserli hastaların yaşam beklentilerini artırma çabalarında önemli bir role sahip olabilir [55,1].

2.2. Epitelyal-Mezenkimal Geçiş (EMT) ve Prostat Kanseri

Epitelyal-Mezenkimal geçiş (EMT), embriyonik gelişim, doku rejenerasyonu ve kanser progresyonunda epitel hücrelerinin yeniden programlanarak göç edebilmesi ve invazyon yapabilmesine imkan tanıyan mezenkimal özellikler kazandığı bir süreçtir. Epitel hücrelerinin mezenkimal fenotip kazanması için bir dizi morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler geçirmesi gerekmektedir [56]. EMT sırasında epitel hücreleri bağlantılarını ve apikal-bazal polaritelerini kaybederler, hücre iskeletlerini yeniden düzenlerler, hücre şeklini belirleyen ve gen ifadesini düzenleyen sinyal programlarında değişiklikler meydana

gelir; bu durum hücrelerin hareketliliğini artırır ve daha invaziv bir fenotipin gelişmesini sağlar [57,58].

EMT sürecinde epitel hücreleri E-kaderin, klaudin, ZO-1 (Zonula Okludens-1) ve sitokeratinler gibi proteinlerde ifadelenme kaybı nedeniyle polarize özelliklerini yitirir ve N-kaderin, vimentin, fibronektin, snail ve fibronektin gibi proteinlerin ifadelerindeki artış ile mezenkimal özellikler kazanırlar (Şekil 2.2). Çok sayıda epitelyal ve mezenkimal belirteç bulunmaktadır, ancak çoğu kanser türünde EMT'nin en temel karakteristik özelliği E-kaderin lokalizasyon kaybının N-kaderin (kaderin değişimi) ile giderilmesidir. Ancak, E-kaderin kaybı her zaman EMT indüksiyonu ile ilgili olmayabilir [56].



Şekil 2.2. Kanser hücrelerinde epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) [59]

EMT'nin, kanser hücrelerinin metastatik potansiyel kazanımlarında önemli bir mekanizma olduğu düşünülmektedir [60,61]. Prostat kanserinde EMT ilk olarak Greenburg ve arkadaşları tarafından önerilmiştir. Yapmış oldukları çalışmada, epitel hücrelerinin kolajen jellerinde mezenkimal hücrelere dönüşebildiğini rapor etmişlerdir [62]. Daha sonra, EMT ile ilgili araştırmalar geniş ilgi görmüştür. Yapılan araştırmalar, prostat kanseri hücrelerinde EMT oluştuğunda, hücrelerin hareketlilik ve istilacı potansiyel kazanacağını göstermiştir [63,64].

2.2.1. EMT'yi düzenleyen transkripsiyon faktörleri

EMT, Snail, Slug ve Twist gibi çeşitli transkripsiyon faktörleri tarafından indüklenebilir [65]. Snail transkripsiyon faktörü, EMT'yi düzenleyen ana protein olarak bilinen bir çinko parmak proteindir. Snail, hem gelişim hem de tümör ilerlemesi sırasında E-kaderinin ekspresyonunu baskılayarak EMT'yi düzenler [66]. Snail, E-kaderin proteinini kodlayan CDH1 genin promotör bölgesindeki E-box bölgesine bağlanarak ve prostat kanseri hücrelerinde transkripsiyonu baskılayarak E-kaderinin ekspresyonunu düzenleyebilir [67]. Prostat tümörigenezinde, Snail'in yüksek ekspresyonu, E-kaderin kaybı ile ilişkilidir [68]. Ayrıca, Snail okludin ve ZO-1 gibi epitelyal belirteçlerin ekspresyonunuda baskılayabilir [67].

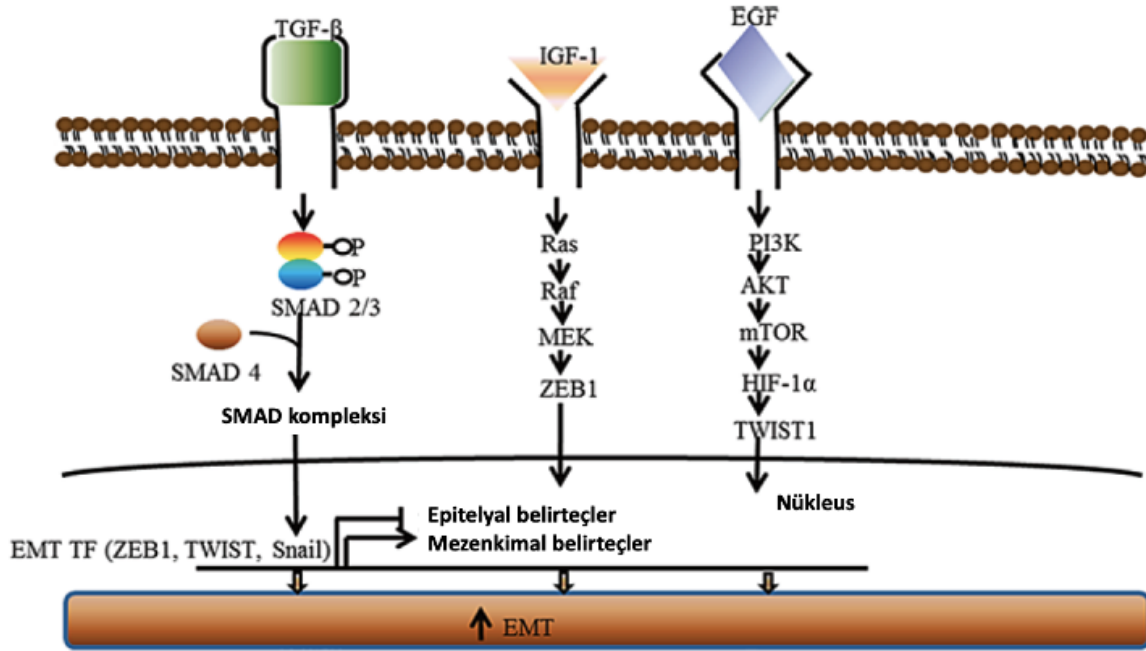
2.2.2. Prostat kanserinde EMT'yi indükleyen büyüme faktörleri ve sitokinler

Çeşitli büyüme faktörlerinin ve sitokinlerin prostat kanserinde EMT sürecine katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Prostat kanseri progresyonunda rol oynadığı bildirilen bazı büyüme faktörleri ve sitokinler, transforme edici büyüme faktörü beta (TGF- β), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) ve epidermal büyüme faktörü (EGF)'dir [69-75]. Büyüme faktörlerinin ve sitokinlerin etki mekanizması, ilgili reseptörlerinin aktivasyonu yoluyla aşağı yönde yer alan sinyal yollarının indüklenmesine yol açar [76,77].

Büyüme faktörleri ve sitokinler, çeşitli hücresel fonksiyonları düzenlemek için sinyal molekülleri olarak işlev gören glikoproteinlerdir. Bu iki kelime sıklıkla birbirinin yerine kullanılır, ancak büyüme faktörlerinin hücre proliferasyonu üzerinde olumlu bir rolü olduğu varsayılırken, sitokinlerin de hücre büyümesi üzerinde olumsuz bir etkisi olabilir [78].

Tümör progresyonu ve metastazı sırasında anahtar rol oynayan iyi çalışılmış sitokinlerden biri TGF- β 'dir [79]. TGF- β , prostat kanseri progresyonu sırasında, hastalığın erken evrelerinde tümör baskılayıcı ve sonraki evrelerde tümör promotörü olarak karşıt rollere sahiptir. Prostat kanserinin benign (iyi huylu) aşamalarında, TGF- β reseptörlerine bağlanır ve apoptoza yol açan sinyal yolunu aktive eder. Ayrıca hücre farklılaşması, hücre proliferasyonu ve migrasyon gibi süreçlere aracılık eder [71]. Prostat kanserinin geç evrelerinde, TGF- β 'nin ifadesinin arttığı, bu durumunda artan hücre invazyonuna ve

metastaza yol açtığı gösterilmiştir [80]. TGF- β 'nın, E-kaderin gibi epitelyal belirteçlerin ifadesini azaltarak ve vimentin gibi mezenkimal belirteçlerin ifadesini arttırarak EMT sırasında rol oynadığı bilinmektedir [81].



Şekil 2.3. Prostat kanserinde EMT'yi tetikleyen bazı büyüme faktörü sinyal yolları [59]

TGF- β hücre sinyali ya SMAD aracılı (kanonikal) ya da SMAD aracılı olmayan (non-kanonikal) yolu kullanır. SMAD aracılı yolda, TGF- β ligandı hedef hücredeki TGF- β tip II reseptörüne (T β RII) bağlanır ve T β RI reseptörü ile etkileşerek, fosforilasyon yoluyla aktivasyonuna yol açar. Aktive edilmiş T β RI daha sonra SMAD 2 ve SMAD 3'ü alır ve fosforile eder [71]. Bu iki protein daha sonra SMAD4 proteinine bağlanarak SMAD2-SMAD3-SMAD4 kompleksini oluşturur (Şekil 2.3). Bu kompleks, bir transkripsiyon faktörü olarak fonksiyon göstermek üzere hücre çekirdeğine geçer ve EMT, hücre çoğalması, hücre hareketi, hücre invazyonu, apoptoz, anjiyogenez gibi birçok biyolojik süreçte görev alan genlerin transkripsiyonlarını regüle eder [71,81]. SMAD aracılı olmayan yollardan bazıları arasında MAPK, mTOR, Ras, c-Src, PI3K/AKT, RhoA ve Cofilin yer almaktadır [71].

İnsülin benzeri Büyüme Faktörü (IGF), farklılaşma, apoptoz, çoğalma ve hücresel metabolizmayı düzenlediği bilinen bir büyüme faktörüdür. Prostat kanseri kemik metastazıyla ilişkilendirilmiştir. IGF'nin iki aile üyesi, IGF-I ve IGF-II ve iki reseptör,

IGF-IR ve IGF-IIR ve ayrıca 6 bağlayıcı protein (IGFBPs 1-6) vardır. Bu proteinler, diğer sinyal yollarıyla çapraz etkileşimin yanı sıra birbirleriyle de etkileşime girer. IGF-IR, hücre membranında yer alan bir tirozin kinaz reseptörüdür. IGF, reseptörüne bağlandığında, mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) ve Fosfatidilinositol 3-Kinaz (PI3K) gibi aşağı akış sinyal yollarını indükler [72]. İnsülin benzeri Büyüme Faktörü (IGF), prostat kanserinde EMT'yi arttırdığı bildirilen bir büyüme faktörüdür. Bu durum, E-kaderin seviyesini azalttığı bilinen bir transkripsiyon faktörü olan ZEB1 ekspresyonunun artması ile gerçekleşir [73].

Prostat kanserinde EMT sürecinde rol oynayan bir diğer büyüme faktörü EGF'dir [82]. Lorenzo ve arkadaşları, prostat kanseri hastalarının Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR) ekspresyonunu değerlendirdikleri bir klinik çalışma yapmışlar ve metastazı olan tüm hastalarda EGFR'nin eksprese edildiğini göstermişlerdir [74]. EGFR'nin, E-kaderini azaltmaktan ve kanser invazyonunu teşvik etmekten sorumlu olan transkripsiyon faktörlerinin artan ekspresyonu yoluyla EMT'yi indüklediği bildirilmiştir [82].

2.2.3. Prostat kanserinde Wnt/ β -katenin sinyal yolağı

β -katenin, gelişimsel ve biyolojik süreçleri düzenleyen, evrimsel olarak korunmuş bir sinyal molekülleri grubu olan Wnt protein ailesinin bir efektörüdür [83-85]. Hücre dışı Wnt sinyallerinin yokluğunda, sitoplazmik β -katenin, proteazom yoluyla parçalanır. Wnt sinyali, β -katenin'in bozulmasını önler ve β -katenin'in sitoplazmik ve nükleer birikimine neden olur. Çekirdekte β -katenin, AR hedef genlerinin yanı sıra Myc ve siklin D1 gibi hedef genlerin ekspresyonunu düzenlemek için T hücre faktörü (TCF) transkripsiyon faktörleri ailesini bağlar [86].

Wnt/ β -katenin sinyali ile EMT'de kritik bir adım olan E-kaderin arasında çok yönlü bir ilişki vardır. E-kaderin hücrenin hareketlilik özelliğinin yok olmasına neden olur. E-kaderin/ β -katenin kompleksi epitelyal bütünlüğün sağlanmasında görevli olup, bu dimerli yapının ve Wnt/ β -katenin sinyal yolağının bozulması, β -katenin'in nükleer translokasyonuna ve EMT'yi uyaran genlerin transkripsiyonuna neden olur [56].

EMT sırasında, E-kaderin kaybı, sitoplazmik ve nükleer β -katenin seviyelerinde artışa neden olur, bu da Wnt/ β -katenin sinyalinin indüklenmesine yol açar [87]. Aktif Wnt/ β -

katenin sinyali, Snail, Slug ve Twist gibi EMT'de görev alan transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunu indükler. Bunlar sırayla E-kaderin ifadesini azaltır ve N-kaderin ifadesini aktive ederek EMT yeniden programlamasının aktivasyonuna neden olur [88-91].

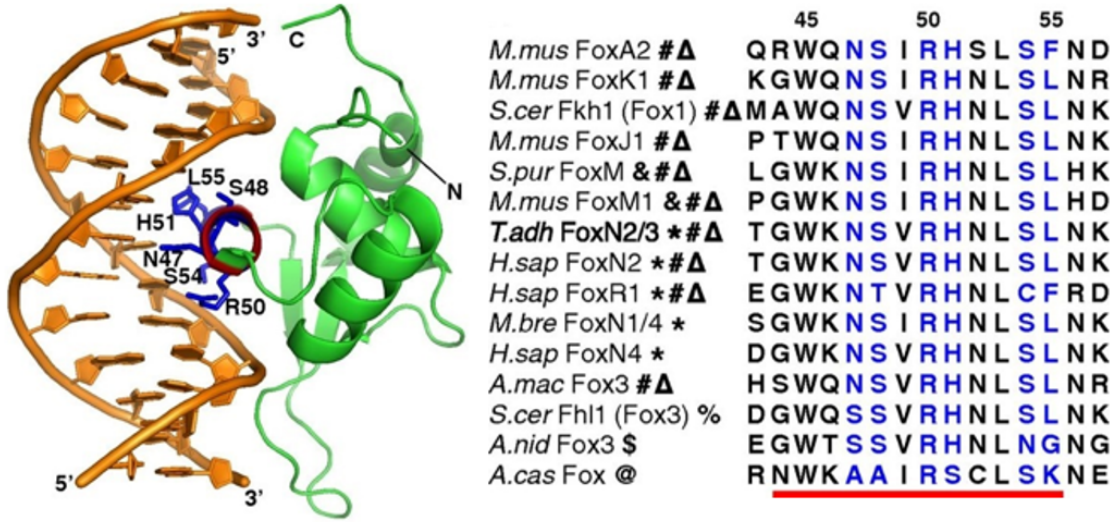
Yapılan araştırmalardan elde edilen bulgular, Wnt/ β -katenin sinyalinin geç evre prostat kanserinde aktif olduğunu ve bu sinyal yolunun aktivasyonunun onkojenik olduğunu, kastrasyon dirençli büyümeyi mümkün kıldığını, EMT'yi indüklediğini ve prostat kanseri hücrelerinin nöroendokrin farklılaşmasını desteklediğini göstermektedir [92-99]. Ayrıca, Wnt/ β -katenin sinyali, kanser metastaz kaskadının çoğu adımında yer alır. Primer bölgede, Wnt/ β -katenin sinyalinin aktivasyonu EMT'yi indükler ve kanser hücrelerinin invazyonunu sağlar. Kanser hücreleri yayıldıktan sonra, sonunda makroskopik lezyonlara dönüşmenin yollarını geliştirmeden önce genellikle uyku durumuna (dormans) girerler. Aktif Wnt/ β -katenin sinyalizasyonunun, uyuyan kanser hücrelerinin hayatta kalması, uykudan salıverilmesi ve makro-metastatik lezyonlar oluşturması için bir mekanizma sağladığı öne sürülmüştür [100,101].

2.3. Forkhead Box (FOX) Ailesi Transkripsiyon Faktörleri

Forkhead box (FOX) proteinleri, hücre çoğalması, hücre farklılaşması, hücre metabolizması, doku homeostazı, yaşlanma, hayatta kalma, apoptoz ve DNA hasarı onarımı dahil önemli biyolojik süreçlerin düzenlenmesinde anahtar rol oynayan geniş bir transkripsiyon faktörleri ailesidir [102]. İlk *forkhead* (fkh) geni, *D. melanogaster*'de gerçekleştirilen rastgele bir mutagenез taramasında forkhead genindeki mutasyonun çatal desenli embriyo baş fenotipinin oluşumuna neden olduğu tespit edildiğinde tanımlanmıştır [103]. Bu keşiften kısa bir süre sonra, mayalardan insanlara kadar birçok organizmada, FOX genleri olarak adlandırılan bir dizi ilgili gen tanımlanmıştır [104].

FOX proteinleri, FOX ailesinin tüm üyeleri arasında yüksek oranda korunan, forkhead box veya kanatlı sarmal adı verilen yaklaşık 100 amino asit uzunluğundaki DNA bağlanma alanı (DBD) ile karakterize edilir [105]. Tüm FOX proteinleri, DBD'de paylaşılan yapısal benzerliklere rağmen, korunmuş DNA bağlanma bölgesi dışındaki dizi farklılıkları nedeniyle farklı özelliklere ve işlevlere sahiptir (Şekil 2.4) [106,104]. Korunmuş DNA bağlanma bölgesi dışındaki FOX bölgeleri, transkripsiyonel aktivatörler, transkripsiyon baskılayıcılar veya DNA onarım kompleksleri ile etkileşimlerde yer alır [107,108]. Bugüne

kadar 50'den fazla memeli FOX proteinini tanımlanmış olup, korunmuş DNA bağlanma alanına göre 19 alt sınıfa (FoxA'dan FoxS'ye) ayrılmıştır [109-111].



Şekil 2.4. Farklı organizmalarda bulunan bazı FOX proteinlerine ait benzer DNA bağlanma bölge motifleri. Mavi renkte yazılmış olan aminoasit dizilimleri DNA üzerinde yer alan belli bir baz dizisi ile etkileşim halindedir [112]

2.3.1. FOXD1 transkripsiyon faktörü

FKHL8 ve FREAC-4 olarak da bilinen FOXD1, FOX ailesine ait bir transkripsiyon faktörüdür. FOXD1, insanlarda kromozom 5q12 üzerinde bulunur ve 100 amino asit uzunluğunda bir DNA bağlayıcı proteini kodlar [113]. FOXD1 proteini, bir transkripsiyon faktörü görevi görür ve DNA'yı bir monomer olarak bağlayan bir çatallı alan içerir. Ayrıca “kanatlı sarmal” adı verilen iki ilmek içerir [114]. FOXD1, ilk olarak ön beyin nöroepitelyumunda tanımlanmıştır. Ayrıca böbrek ve retina gelişimi sırasında önemli bir faktör olduğu kabul edilmektedir [115]. FOXD1'in, embriyonik gelişim ve organogenez, hücre döngüsü düzenlemesi, metabolizmanın kontrolü, kök hücre niş bakımı ve sinyal iletimi gibi çok sayıda fizyolojik süreç ve biyolojik işlevde görev aldığı bilinmektedir [104,109]. Bunların yanı sıra, FOXD1'in kendini yenileme ve farklılaşma yoluyla hücre yeniden programlamasının başarılı ilerlemesinin bir aracısı olduğu bulunmuştur [116,117].

2.3.2. FOXD1 ve kanser ilişkisi

Son yıllarda yapılan çalışmalar, FOXD1'in çeşitli insan kanserlerinde tümör oluşumu, tümör ilerlemesi ve metastazda önemli rol oynadığını göstermiştir. Yapılan bir araştırmada, FOXD1'in prostat kanseri dokularında ifadesinin arttığı ve lenf nodu metastazı ile ilişkili olduğu bulunmuştur [118]. Başka bir çalışma, FOXD1'in meme kanserinde G1'den S faz geçişini indükleyerek hücre proliferasyonunu ve kemoterapi direncini desteklediğini göstermiştir [119]. Nakayama ve arkadaşları, FOXD1'in insan küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde aşırı eksprese edildiğini ve yüksek FOXD1 ekspresyonu olan hastaların düşük FOXD1 ekspresyonu olan hastalardan çok daha kısa sağkalım süresine sahip olduğunu göstermişlerdir [120]. Ayrıca yapılan başka bir çalışmada, FOXD1'in insan küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde vimentini aktive ederek hücre büyümesini ve metastazı desteklediği de gösterilmiştir [121]. FOXD1'in glioma örneklerinde önemli ölçüde ifadesinin arttığı bildirilmiştir ve daha ileri araştırmalar, FOXD1'in glioma kaynaklı mezenkimal kök benzeri hücrelerinin klonojenik ve tümörjenik potansiyelini aktive etmek için ALDH1A3 transkripsiyonunu doğrudan düzenlediğini ileri sürmüştür [122]. Pan vd., (2018) tarafından yapılan bir çalışmada, FOXD1, ERK1/2 sinyal yolunu aktive ederek kolorektal kanser ilerlemesini kolaylaştırdığı ve aşırı ekspresyonunun kolorektal kanser hastalarının kötü prognozu ile önemli ölçüde ilişkili olduğu bildirilmiştir [123]. Bir başka çalışmada ise, meme kanserinde FOXD1'in p27'yi inhibe ettiği ve böylece kanser ilerlemesini desteklediği rapor edilmiştir [119]. Ayrıca, FOXD1'in karaciğer kanseri [124], rahim ağzı kanseri [125], pankreas kanseri [126], meme kanseri [127] ve glioma [122] dahil olmak üzere çeşitli kanserlerin gelişimine de katıldığı bildirilmiştir. Bu bulgular, tümör hücrelerinde FOXD1 ifadesinin artmasının hücre proliferasyonu, apoptoz, invazyon ve metastaz dahil olmak üzere biyolojik fonksiyonları etkileyebileceğini göstermektedir.

2.4. RNA İnterferans

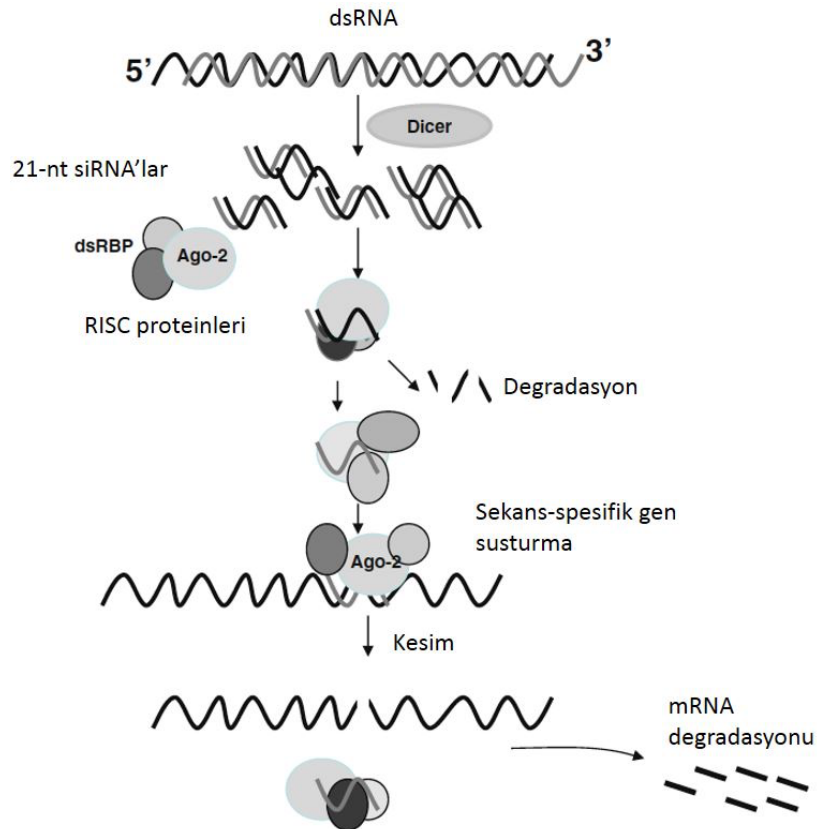
RNA interferans (RNAi), hedef mRNA'nın bozulduğu ve bunun sonucunda genetik ekspresyonun susturulduğu doğal bir süreçtir [128]. RNAi'nin keşfi ile ilgili ilk önemli bulgular, Napoli ve arkadaşlarının (1990) *Petunia* çiçeklerinin rengini daha mor hale getirme girişimlerinin beklenmedik bir sonucu olarak ortaya çıkmıştır. Araştırmacılar antosiyanin pigmentlerinin (kalkon sentetaz, CHS) üretiminden sorumlu geni aşırı eksprese etmek için bir deney tasarlamışlardır. Ancak deney sonucunda, beklenenin aksine tamamen

beyaz veya alacalı renkli petunyalar elde edilmiştir. Çalışmadan elde edilen sonuçlar CHS genlerinin belirgin bir şekilde susturulduğunu göstermiştir [129]. Daha sonraki yıllarda, Guo ve Kempthues'un (1995) yaptıkları çalışmada, *Caenorhabditis elegans*'ta par-1 geninin ekspresyonunu engellemek için antisens RNA dizisi enjekte edilmiş ve par-1 geninin ekspresyonunun azaldığını bulmuşlardır. Ancak, negatif kontrol olarak kullanılan sens RNA dizisinin de par-1 genin ekspresyonunu azalttığını gözlemlemişlerdir [130]. RNAi'nin keşfi ile ilgili olarak ilk dönüm noktası çalışması ise, Fire ve Mello tarafından, dsRNA'ların *C. elegans*'a enjeksiyonunun, dsRNA' nın kiyle tamamlayıcı bir diziye sahip bir genin etkin bir şekilde susturulmasıyla sonuçlandığını gösterdikleri çalışmadır. Gen susturma verimliliğinin, tek başına sens veya antisens ipliklerin kullanılmasından ziyade dsRNA'lar uygulandığında daha büyük olduğunu bildirmişlerdir [131]. Araştırmacılar, "RNA interferans" terimini tasarladıkları ve bunun meydana geldiği mekaniği ortaya çıkardıkları için 2006 yılında Nobel Ödülü'ne layık görülmüşlerdir. Daha ileri yıllarda yapılan araştırmalarda ise, dsRNA'nın, *Drosophila* hücrelerine verildiğinde 21-25 nükleotid fragmanlara işlendiği keşfedilmiştir [132,133]. Bu fragmanlar küçük engelleyici (si) RNA'lar olarak adlandırılmıştır ve memeli hücrelerinde RNA interferans (RNAi) indüksiyonunun ana efektörleri oldukları kanıtlanmıştır [134]. Bu küçük engelleyici RNA'lar (siRNA'lar), herhangi bir genin tek başına bir baz dizisi tarafından kolay inhibisyonuna izin verdikleri için kısa sürede biyolojik araştırmalarda her yerde bulunan araçlar haline gelmiştir [135].

Çeşitli türlerde yapılan RNAi analizleri, RNAi'nin mantarlar, bitkiler ve hayvanlar arasında korunan yaygın bir doğal fenomen olduğunu ortaya çıkarmıştır. Bu sürecin başlangıçta istilacı virüslere ve transpozonlara karşı bir konak savunma mekanizması olduğu düşünülmüştür; fakat, son yıllarda yapılan çalışmalar, RNAi yollarının çeşitli hücresel, gelişimsel ve fizyolojik süreçleri düzenlemek için küçük kodlamayan RNA'lar (sRNA'lar) kullandığını göstermiştir [136-138].

Aynı kökenli genlerin RNAi tarafından diziye özgü susturulması, küçük engelleyici RNA'lar (siRNA'lar), kısa saç tokası RNA ya da kısa firkete RNA'lar (shRNA'lar), mikroRNA'lar (miRNA'lar) ve ayrıca piRNA'lar gibi diğer kodlamayan RNA'lar tarafından tetiklenebilir [139].

siRNA'lar ile susturma süreci, RNase III ailesi üyesi olan Dicer enziminin, kofaktör RNA bağlayıcı proteinlerle birlikte, uzun çift sarmallı RNA'ları (dsRNA) sitoplazmada 21-23 nükleotid uzunluğundaki siRNA olarak bilinen fragmanlara kesmesiyle başlar. Kesim sonucu oluşan siRNA'lar 3' ucunda 2 nükleotidlik uzantılar ve 5' ucunda fosfat grupları içerir. Bu siRNA dupleksleri daha sonra RNA ile indüklenen susturma kompleksi (RNA-inducing silencing complex, RISC) adı verilen bir RNA-multiprotein kompleksine yüklenir. siRNA dubleksleri, bir anti-sense (rehber) zincir ve bir sense (passenger) zincirinden oluşmaktadır. RISC'lerin bir bileşeni olan Argonaute proteini (Ago-2), çift sarmallı siRNA'ları bağlar ve sense zincirini ayırır, bu da onun RISC kompleksinden ayrılmasını ve degradasyonunu indükler. Anti-sens zincirini içeren aktif RISC, tamamlayıcı mRNA dizilerini arar ve bunlara bağlanır. Bağlı mRNA molekülleri daha sonra Ago-2 proteini tarafından kesilir ve kesilen mRNA fragmanları hücresel nükleazlar tarafından hızla parçalanır (Şekil 2.5.) [140]. Ayrışmanın ardından aktif RISC, başka mRNA moleküllerini geri dönüştürebilir ve parçalayabilir. Böylece, RNAi süreci spesifik mRNA seviyesinin azalmasına ve hedef genin sessizleşmesine neden olur. Uzun dsRNA'ların aksine, sentetik siRNA'lar doğrudan RISC'e yüklenir [141].



Şekil 2.5. siRNA ile susturma yolunun şematik gösterimi [141]

2.5. Sentetik siRNA'ların Klinik Uygulamaları

Önce bitkilerde ve *C. elegans*'ta, daha sonra memeli hücrelerinde RNA interferansın keşfi, biyomedikal araştırmalarda dönüştürücü bir görüşün ortaya çıkmasına neden oldu. Günümüzde siRNA'lar hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak tek gen fonksiyonunu incelemek için araç olarak kullanılabildiği gibi özellikle kanser ve diğer hastalıkların tedavisi için tedavi edilemez hedeflere karşı çekici yeni bir terapötik sınıf olarak ortaya çıkmaktadır [142].

RNAi'nin ilk keşfedilmesinden 20 yıldan fazla bir süre sonra, siRNA bazlı terapötikler farmasötik pazarına girdi. Ağustos 2018'de FDA, ilk siRNA ilacı olan patisiran'ı (Onpattro) onayladı [143]. Ardından Kasım 2019'da givosiran [144] ve üçüncü olarak Kasım 2020'de lumasiran onayladı. Halihazırda, vutrisiran, nedosiran, inclisiran, fitusiran, teprasiran, cosdosiran ve tivanisiran da dahil olmak üzere Faz 3 klinik deneylerinin geç aşamalarında yedi siRNA ilacı vardır ve bunların bazıları FDA onayına çok yakındır (Çizelge 2.1). [145].

Çizelge 2.1. FDA onaylı veya geç faz 3 klinik deneylerde siRNA bazlı ilaçların gelişiminin özeti [145]

İlaç	Alternatif isim	Şirket	Hastalık	Güncel durum
Patisiran	ONPATTRO	Alnylam	Kalıtsal transtiretin aracılı amiloidozun	FDA onaylı 10/08/2018
Givosiran	GIVLAARI	Alnylam	Akut hepatik porfiri	FDA onaylı 11/20/2019
Lumasiran	ALN-GO1	Alnylam	Primer hiperoksalüri tip 1 (PH1)	FDA onaylı 11/23/2020
Vutrisiran	ALN-TTRsc02	Alnylam	Kalıtsal transtiretin aracılı amiloidozun	Faz 3
Nedosiran	DCR-PHXC	Dicema Alnylam	Primer hiperoksalüri	Faz 3
Inclisiran	ALN-PCSSC	Alnylam Novartis	Hiperkolesterolemi	Faz 3
Fitusiran	ALN-AT3sc ALN-APC SAR439774	Alnylam Sanofi Genzyme	Hemofili A ve B	Faz 3
Teprasiran	AKli-5, DGFİ, I-5NP, QPI-1002	Quark Novartis	Akut böbrek hasarı gecikmiş greft işlevi	Faz 3
Cosdosiran	QPI-1007	Quark	Non-arteritik iskemik optik nöropati (NAION)	Faz 2/3
Tivanisiran	SYL-1001	Sylentis	Kuru göz Göz ağrısı	Faz 3

ONPATTRO (patisiran) FDA tarafından ilk onaylanmış RNAi bazlı terapötiktir. Ağustos 2018'de, Gıda ve İlaç Dairesi (FDA), Faz 3 klinik deneyi "Apollo"nun cesaret verici sonucundan sonra yetişkinlerde nadir görülen bir hastalık olan kalıtsal transtiretin aracılı amiloidozun (hATTR) neden olduğu sinir hasarı için ilk RNA interferans ilacı Alnylam's Onpattro'yu onayladı [146]. Transtiretin ailesel amiloid polinöropati (TTR-FAP) veya ailesel amiloid kardiyomiyopati (TTR-FAC) olarak da adlandırılan hATTR, nadir görülen, ilerleyici ve ölümcül bir hastalıktır [147-149]. hATTR amiloidozu, yanlış katlanmış transtiretin (TTR) proteininin hücre dışı birikimi ile karakterize edilir. Normal katlanma durumunda, TTR tetramer 4 tek zincirli monomerden oluşur. TTR genindeki bir mutasyon, tetrameri kararsız hale getirerek monomerlere ayrışmasına neden olmakta, bu da daha sonra amiloid fibrillerinde toplanarak ve vücuttaki birçok organda birikerek ölüme neden olmaktadır [147,149,150]. Bu TTR gen mutasyonu karaciğerde meydana geldiğinden, TTR geninin susturulması, TTR geninin mutasyon etkisini tersine çevirmeyi, dolayısıyla hastalığı çözmeyi vaat etmektedir [151].

Alnylam Pharmaceuticals tarafından GIVLAARI olarak markalanan Givosiran, ticarileştirilmiş ikinci siRNA terapötik ilaçtır [144]. Givosiran, 20 Kasım 2019'da FDA tarafından akut hepatik porfirisisi (AHP) olan yetişkinler için onaylandı. AHP, hem biyosentez yolunda yer alan enzimlerin üretiminden sorumlu genlerdeki mutasyonların neden olduğu nadir, ciddi ve yaşamı tehdit eden genetik bir hastalıklardır [152]. Hem biyosentez yolunda yer alan ALAS1 geninde meydana gelen mutasyonlar, ALAS1 enziminin aşırı aktivitesiyle sonuçlanır ve normalde heme dönüştürülen aminolevulinik asit (ALA) ve porfobilinojen (PBG) gibi nörotoksik metabolitlerin birikmesine neden olur [153]. Bu metabolitlerin birikmesi şiddetli karın ağrısı, kusma, hipertansiyon, taşikardi, zihinsel durum değişiklikleri, nöbetler, kas zayıflığı, felç gibi zayıflatıcı ve bazen yaşamı tehdit eden semptomlara yol açar [154,155]. Givosiran, ALAS1 mRNA üzerindeki bir hedef diziye bağlanır, bu da ALAS1 sentezinin azalmasına ve dolayısıyla hastalığın semptomlarının aracıları olan ALA ve PBG üretiminin azalmasına neden olur [156].

Alnylam Pharmaceuticals tarafından OXLUMO olarak markalanan Lumasiran, FDA onaylı üçüncü ve en yeni siRNA terapötik maddesidir. Primer hiperoksalüri, hepatik enzimlerdeki eksiklikler ve ardından toksik bir metabolit olan oksalat birikimi ile karakterize edilir [157]. Oksalatın ana öncüsü olan glioksilat, normalde glioksilatı piruvat ve glisine metabolize eden birkaç enzime maruz kalır ve glioksilat birikmesine neden olur.

Glioksilat, başka bir metabolik yola yönlendirilir ve oksalata dönüştürülür. Oksalat böbrekler yoluyla etkili bir şekilde elimine edilir, ancak aşırı üretimi ve artan konsantrasyonları nihayetinde böbrek ve idrar yolu taşları olarak biriken kalsiyum oksalatın kristalleşmesini tetikler. Sonunda, böbrek hastalığına ilerler. Böbrek fonksiyonu ve atılımı azaldıkça, oksalat böbrek dışı dokuda birikir ve sıklıkla ölümcül sistemik oksaloza neden olur. Lumasiran, glioksilat sentezleyen hepatik enzim glioksilat oksidazı (GO) çeviren mRNA'yı hedefler. Lumasiran, GO ekspresyonunu azaltarak glioksilat üretimini azaltır ve ardından oksalat sentezini azaltır [158,159].

siRNA bazlı terapötikler, kanser tedavisi ve diğer hastalıkların tedavisi için büyük potansiyele sahiptir. Geliştirme aşamasındaki ve klinik deneylerdeki siRNA bazlı terapötiklerin sayısı hızla artmaktadır. FDA tarafından bugüne kadar yalnızca üç siRNA tedavisi onaylanmış olmasına rağmen, önümüzdeki yıllarda daha fazlasının geleceği muhtemeldir. Günümüzde, kanser ve diğer hastalık gruplarında siRNA bazlı terapötikler için klinik faz çalışmaları devam etmekte olup, yürütülen çalışmalar ile ilgili tüm gelişmeler www.clinicaltrials.gov adresinde yayınlanmaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Kullanılan cihazlar

- ✓ Buzdolabı (Arçelik)
- ✓ Cedex hücre sayım cihazı (Roche)
- ✓ Çalkalayıcı (Biosan 3D mini shaker)
- ✓ Derin dondurucu, -30°C (Sanyo)
- ✓ Derin dondurucu, -86°C (Sanyo)
- ✓ Elektroforez güç kaynağı (Thermo)
- ✓ Hassas terazi (Precisa)
- ✓ Invert mikroskop (Zeiss)
- ✓ Invert mikroskop (Leica DM IL)
- ✓ Jel görüntüleme sistemi (Gel Logic 2200 Pro-Carestream Health)
- ✓ Karbondioksitli etüv (Sanyo)
- ✓ Kuru ısıtıcı blok (Biosan)
- ✓ Laminar flow kabini (Danlaf)
- ✓ Manyetik karıştırıcı (TMA 2071)
- ✓ Mikropipetler; 10 µl, 100 µl, 1000 µl (Axygen)
- ✓ Mikrolaka ELISA okuyucu (Spectramax M3, Molecular Devices)
- ✓ Otomatik ısı döngü cihazı (Applied Biosystems)
- ✓ pH metre (WTW 422)
- ✓ Rotor-Gene Q Real-time PCR cycler (Qiagen)
- ✓ Soğutmalı santrifüj (Hettich Mikro 22R)
- ✓ Spektrofotometre (Nanodrop ND-1000, Thermo Scientific)
- ✓ Spin vorteks (Biosan)
- ✓ Western blotlama sistemi (BioRad)

3.1.2. Kullanılan sarf malzemeler

- ✓ 15 ml santrifüj tüpü (SPL)

- ✓ 50 ml santrifüj tüpü (SPL)
- ✓ 0.2 ve 1.5 ml mikrosantrifüj tüpleri (Nest Scientific)
- ✓ 6.5 mm Transwell with 8.0 µm Pore Polycarbonate Membrane Insert (Corning)
- ✓ Hücre dondurma tüpleri (SPL)
- ✓ Hücre kültürü flaskları, 25cm² ve 75 cm² (SPL)
- ✓ Hücre kültürü için 96 ve 6 kuyulu plaka (SPL)
- ✓ Hücre sayımı için tek kullanımlık slayt (Roche)
- ✓ Steril pipet uçları (Axygen)
- ✓ Steril 1 ml insülin enjektörü (Beybi)

3.1.3. Kullanılan kimyasal malzemeler

- ✓ Amonyum Persülfat (APS) (Sigma)
- ✓ Anti-c-Myc primer antikor (Sigma)
- ✓ Anti-cyclin D1 primer antikor (Sigma)
- ✓ Anti-FOXD1 primer antikor (LSBio)
- ✓ Bovine Serum Albumin (BSA) (Capricorn Scientific)
- ✓ ColorPlus Protein Standardı (NEB)
- ✓ Dimetil sülfoksit (DMSO) (Thermo)
- ✓ E-cadherin primer antikor (Invitrogen)
- ✓ ECL Western Blotting Substrate (Thermo)
- ✓ Etanol (Sigma)
- ✓ Fenilmetilsülfonilflorid (PMSF) (Sigma)
- ✓ Fetal Bovine Serum (FBS) (Biosera)
- ✓ FOXD1 siRNA (Dharmacon)
- ✓ Giemsa boyası (Merck)
- ✓ Glisin (Isolab)
- ✓ Hücre kültürü besiyeri; L-Glutamin içeren RPMI 1640 (Biosera) ve Keratinocyte Serum Free Medium (K-SFM) (Gibco)
- ✓ İzopropanol (Merck)
- ✓ Kloroform (Merck)
- ✓ Kontrol siRNA (Dharmacon)
- ✓ Matrigel (BD Biosciences)
- ✓ N-cadherin primer antikor (Invitrogen)

- ✓ NuPAGE® LDS Sample Buffer (4X) (Thermo)
- ✓ Penisilin/Streptomisin antibiyotik (Biosera)
- ✓ Phosphate-Buffered Saline (PBS) (Gibco)
- ✓ PhosSTOP™10 tablet (Roche)
- ✓ Primerler (FOXD1, GAPDH) (Oligomer)
- ✓ PVDF Transfer membrane (Thermo)
- ✓ RIPA Lizis Buffer (Sigma)
- ✓ Sekonder antikor (Sigma)
- ✓ siRNA Transfection Reagent (Dharmacon)
- ✓ Snail primer antikor (Invitrogen)
- ✓ Sodyum dodesil sülfat (SDS) (Amresco)
- ✓ Tetramethylethylenediamine (TEMED) (Amresco)
- ✓ Tripan mavisi boyası (Sigma)
- ✓ Tripsin (Thermo)
- ✓ Tris base (Sigma)
- ✓ Trizol Reagent (Ambion)
- ✓ Vimentin primer antikor (Invitrogen)
- ✓ β -Actin primer antikor (Invitrogen)
- ✓ β -Catenin primer antikor (Invitrogen)

3.1.4. Kullanılan kitler

- ✓ BCA Protein Tayin Kiti (Thermo)
- ✓ Hücre Proliferasyon Kiti, WST-1 (Roche)
- ✓ RevertAid First Strand cDNA Sentez Kiti (Thermo)
- ✓ RealMOD™ Green W² 2x qPCR mix (Intron Biotechnology)

3.1.5 Kullanılan besiyeri ve çözeltilerin hazırlanışı

%10'luk RPMI 1640 besiyerinin hazırlanışı

500 ml'lik besiyeri içerisinde 50 ml çekildi. Ardından sırası ile 50 ml inaktive edilmiş FBS ve 5 ml 100 µg/ml'lik antibiyotik karışımı eklendi.

%1'lik RPMI 1640 besiyerinin hazırlanışı

500 ml'lik besiyeri içerisinde 5 ml çekildi. Ardından sırası ile 5 ml inaktive edilmiş FBS ve 5 ml 100 µg/ml'lik antibiyotik karışımı eklendi.

Keratinosit - serum içermeyen besiyerinin hazırlanışı

500 ml'lik keratinosit - serum içermeyen besiyerinin (keratinocyte serum-free medium, K-SFM), içerisine 25 mg/ml sığır hipofiz özü (bovine pituitary extract, BPE), 2,5 µg/ml epidermal büyüme faktörü, EGF) ve 5 ml 100 µg/ml'lik antibiyotik eklenerek hazırlandı.

PMSF solüsyonu

0,3484 g PMSF hassas terazide tartıldı ve 10 ml izopropanol içerisinde çözüldü.

%10'luk SDS hazırlanışı (100 ml)

10 g sodyum dodesil sülfat tartılarak 100 ml distile su içerisinde çözüldü. Çözelti oda sıcaklığında saklandı.

1,5 M Tris buffer (pH:8,8) (150 ml)

27,23 g Tris base tartıldıktan sonra 80 ml suda çözüldü. Ardından pH metre ile pH 8,8'e ayarlandı. Daha sonra toplam hacim distile su ile 150 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan solüsyon +4°C'de saklandı.

0,5 M Tris buffer (pH:6,8) (100 ml)

6 g Tris base tartıldıktan sonra 60 ml suda çözündürüldü. pH değeri 6,8'e ayarlandıktan sonra toplam hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan solüsyon +4°C'de saklandı.

10X Running buffer (pH:8,3) (1000 ml)

30,3 g Tris base, 144 g glisin ve 10 ml %10'luk SDS 500 ml distile su içerisinde çözüldü. Ardından toplam hacim 1000 ml'e distile su ile tamamlandı.

10X Tris-Glisin stok solüsyonu

30,3 g tris base ve 144 g glisin tartılarak 1000 ml distile suda çözüldü.

Transfer buffer

10X konsantrasyondaki Tris glisin stoğundan 100 ml alındı, üzerine 200 ml metanol ve 600 ml distile su eklendi. pH'sı 8,3'e ayarlandı. Son hacmi distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

Amonyum persülfat (APS) solüsyonu

100 mg APS, 1 ml suda çözülerek hazırlandı. APS her çalışma öncesinde yeniden taze olarak hazırlandı.

10X TBS solüsyonu

12,1 g Tris base ve 40 g NaCl tartılıp 500 ml suda çözüldü. 1X'inin pH'sı 7,4'e ayarlandı.

Primer antikor dilüsyon solüsyonu

10 ml 1X TBS, %1 Tween20 ve 0,3 g BSA ile taze hazırlandı. Hazırlanan solüsyonun içerisine uygun dilüsyonda primer antikor eklendi.

Sekonder antikor dilüsyon solüsyonu

10 ml 1X TBS, %1 Tween20 ve 0,3 g BSA ile taze hazırlandı. Hazırlanan solüsyonun içerisine uygun dilüsyonda sekonder antikor eklendi.

Membran bloklama solüsyonu

10 ml 1X TBS, %1 Tween20 ve 0,3 g BSA ile taze hazırlandı.

SDS-PAGE için Jel Hazırlanması

Proteinleri moleküler ağırlıklarına göre ayırmak için SDS poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) yöntemi kullanıldı. Yükleme ve ayırma jeli olmak üzere iki kısımdan oluşan bu jel sistemi Çizelge 3.1 ve Çizelge 3.2'de belirtilen kimyasallar kullanılarak hazırlandı.

Çizelge 3.1. %8, %10 ve %12'lik ayırma (seperating) jellerinde kullanılan kimyasalların oranları

	%8	%10	%12
Su	4,6 ml	4 ml	3,3 ml
%30 Akrilamid/BisAk	2,7 ml	3.3 ml	4 ml
1,5 M Tris, pH 8.8	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
%10 SDS	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
%10 APS	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
TEMED	0,006 ml	0,004 ml	0,004 ml
Toplam	10 ml	10 ml	10 ml

Çizelge 3.2. Üst jelde (stacking) kullanılan kimyasalların oranları

	%4
Su	3.4 ml
%30 Akrilamid/BisAk	0.83 ml
1 M Tris, pH 6.8	0.63 ml
%10 SDS	0.05 ml
%10 APS	0.05 ml
TEMED	0.005 ml
Toplam	5 ml

3.2. Kullanılan Yöntemler

3.2.1. Hücre kültürü

Bu çalışmada prostat kanseri hücreleri LNCaP, DU-145, PC-3, 22Rv1 ve insan prostat epitel hücre hattı olan RWPE-1 hücre hattı kullanıldı. LNCaP, DU-145, PC-3 ve 22Rv1 hücreleri %10 inaktive edilmiş FBS, 200 mM L-glutamin, 100 U/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin ile desteklenmiş RPMI besiyerinde %95 nem ve %5 CO₂ içeren inkübatörde 37°C'de kültüre edilerek çoğaltıldı.

RWPE-1 hücreleri K-SFM (keratinosit-serum içermeyen besiyeri) besiyerinde çoğaltıldı. Besiyeri içerisine 25 mg/ml BPE, 2,5 µg/ml EGF ve 5 ml 100 µg/ml'lik antibiyotik eklendi ve %95 nem ve %5 CO₂ içeren inkübatörde 37°C'de kültüre edilerek çoğaltıldı.

3.2.2. Total RNA izolasyonu

İlk aşamada çalışmada kullanılan hücrelerin tamamında FOXD1 geninin ifadesinin mRNA düzeyinde belirlenmesi için hücreler T-25 cm² hücre kültür flasklarında çoğaltıldı. Çoğaltılan hücrelerden total RNA izolasyonu Trizol Reagent (Ambion) kullanılarak üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirildi. RNA'ların miktarları ve saflığı NanoDrop ND-1000 Spektrofotometre (Thermo Scientific) cihazı ile ölçüldü. Ölçümü gerçekleştirilen RNA'lar kullanılıncaya kadar -80°C derin dondurucuda saklandı.

Ayrıca, FOXD1 geninin susturulmasının doğrulanması amacıyla, siRNA uygulanan 22Rv1 hücrelerinden de RNA izolasyonu yapıldı. Trizol kullanılarak aşağıda yazılı olan protokole göre hücrelerden total RNA izolasyon işlemi gerçekleştirildi.

1. Hücrelerden besiyerleri uzaklaştırıldı ve 1'er ml Trizol solüsyonu eklendi. Birkaç kez pipetaj yapılarak hücreler üzerinde kaldırıcı etki yaratıldı.
2. Hücre lizatları steril eppendorf tüplere alındı ve nükleoprotein komplekslerinin tamamen ayrımı için oda sıcaklığında 5 dakika bekletilir.
3. Her bir tüpe 200'er µl kloroform eklendi ve 5-10 defa ters-düz ettikten sonra oda sıcaklığında 2-3 dakika inkübe edildi.
4. 12.000 rpm'de 4°C'de 15 dakika santrifüj edildi ve üst sıvı yeni tüplere alındı.
5. Her bir tüpe 500'er µl izopropanol eklendi ve 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
6. 12.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatantlar pipet yardımı ile atıldı ve pelletlerin üzerine yıkama amacıyla 1'er ml %75 lik etanol eklendi.
7. Örnekler kısa bir süre vortekslendi. Tüpler 7500 rpm'de 4°C'de 5 dakika santrifüj edildi ve bir mikropipet ile süpernatantları atıldı.
8. Pelletleri 5-10 dakika kurumaya bırakıldı ve 20- 50 µl DEPC muamele edilmiş H₂O eklendi.
9. Peletlerin çözülmesi için kuru ısıtıcıda 55-60°C'de 15 dakika inkübe edildi.
10. Elde edilen RNA'ların miktarları ve saflığı NanoDrop ND-1000 Spektrofotometre cihazında ölçülerek qRT-PCR'da kullanılına kadar -80°C'de derin dondurucuda muhafaza edildi.

3.2.3. DNaz I uygulaması

DNaz enzimi uygulanarak, izole edilen tüm RNA örneklerinde olması muhtemel DNA kontaminasyonu minimum düzeye getirildi. Aşağıda yazılı olan protokole göre DNaz uygulaması yapıldı.

1. Çizelge 3.3’de yer alan bileşenler RNaz’dan arındırılmış tüpe eklendi ve 37°C’de 30 dakika bekletildi.

Çizelge 3.3 DNaz uygulamasında kullanılan bileşenler ve miktarları

Bileşenler	Kullanılan miktar
RNA	1 µg
10X Reaksiyon tamponu	1 µl
DNaz I (RNaz’dan arındırılmış)	1 µl
DEPC ile muamele edilmiş ultra saf su ile toplam hacim 10 µl’ye ayarlanır.	

2. 1 µl 50 mM EDTA eklendi.
3. 65°C’de 10 dakika inkübe edilerek DNaz inhibe edildi.

3.2.4. cDNA (komplementer DNA) sentezi

RNA örneklerinden cDNA sentezi, RevertAid First Strand cDNA Sentez Kiti (Thermo) kullanılarak gerçekleştirildi. Çizelge 3.4’de cDNA sentezinin ilk aşamasında hazırlanan total RNA-primer karışımı içerisinde bulunan bileşenler ve miktarları verilmektedir.

Çizelge 3.4 cDNA sentezi için kullanılan bileşenler ve miktarları (1 adet örnek için)

Bileşenler	Kullanılan miktar
Total RNA (DNaz I uygulanmış)	0,1 ng - 5 µg
Primer (Oligo (dT) ₁₈)	1 µl
ddH ₂ O	Her örnek için ayrı ayrı ayarlanır
Toplam Hacim	12 µl

Çizelge 3.4’de yer alan bileşenler RNaz’dan arındırılmış tüpe eklendi ve santrifüj edildi. Otomatik ısı döngü cihazı cihazında 65°C’de 5 dakika inkübe edilerek kalıp ve primer karışımının denatüre olması sağlandı. İnkübasyon sonrasında örnekler hemen buz üzerine alınarak, çizelge 3.5’de yer alan ters transkripsiyon reaksiyonunu gerçekleştirecek diğer bileşenler sıra ile buz üzerindeki 0,2 ml eppendorf tüp içine ilave edildi.

Çizelge 3.5 Ters Transkrpsiyon (RT-PCR) reaksiyon bileşenleri

Bileşenler	Kullanılan miktar
5x Reaksiyon tamponu	4 µl
RiboLock RNaz inhibitörü, 20 U/µl	1 µl
dNTP karışımı, 10 mM	2 µl
RevertAid M-MuLV RT, 200 U/µl	1 µl
Toplam Hacim	20 µl

Ters transkripsiyon reaksiyonu için çizelge 3.5’de yer alan bileşenler belirtilen miktarlarda bir tüpe alınarak, pipetle hafifçe karıştırılıp santrifüj edildi. Daha sonra OligodT ve gene spesifik primer ile cDNA sentezi için otomatik ısı döngü cihazında 42°C’de 60 dakika inkübe edildi. Ardından 70°C’de 5 dakika inkübe edilerek reaksiyon tamamlandı.

3.2.5. Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR)

Real-time PCR çalışmaları Rotor-Gene Q (QIAGEN's Real-time PCR cyclers) cihazında RealMOD Green W² 2x qPCR kiti kullanılarak gerçekleştirildi. Real Time PCR reaksiyonu üretici firmanın önerdiği koşullarda 3 tekrarlı olacak şekilde yapıldı. Real-time PCR reaksiyonu çizelge 3.6’de verilen bileşenler kullanılarak hazırlanmış olup, saf su ile toplam hacim 20 µl’ye ayarlanarak real time PCR cihazında, çizelge 3.7’de verilen programda amplifikasyon gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.6 Real Time PCR reaksiyonu bileşenleri

Bileşenler	Kullanılan miktar
cDNA	0,1 pg/μl
İleri (Forward) Primer (10 μM)	0,5 μl
Geri (Reverse) Primer (10 μM)	0,5 μl
RealMOD Green W ² 2x qPCR Mix	10 μl
ddH ₂ O	Her örnek için ayrı ayrı ayarlanır
Toplam hacim	20 μl

Çizelge 3.7 Real Time PCR reaksiyonunun gerçekleştiği program

qPCR adımları	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
Enzim aktivasyonu	95°C	10 dk	1
Denatürasyon	95°C	20 s	40
Bağlanma	60°C	40 s	
Uzama	72°C	30 s	
Final uzama	72°C	5 dk	
Erime Eğrisi Analizi	60-95°C	Sürekli okuma	1

Çalışmada kullanılan FOXD1 ve GAPDH gen bölgelerine ait primer dizileri çizelge 3.8’de görülmektedir.

Çizelge 3.8 Çalışmada kullanılan gen bölgelerine ait primer dizileri (F: Forward/İleri, R: Reverse/Geri)

Primer	Sekans (5'→3')
FOXD1-F	AAGAACCCGCTGGTGAAG
FOXD1-R	GTCCAGTAGTTGCCCTTGC
GAPDH-F	ACAACCTTGGTATCGTGGAAGG
GAPDH-R	GCCATCACGCCACAGTTTC

3.2.6. Hücrelerden protein izolasyonu

İlk aşamada, çalışmada kullanılan hücrelerin tamamında FOXD1'in ifadesinin protein düzeyinde belirlenmesi için hücreler T-25 cm² hücre kültür flasklarında çoğaltıldı. Çoğaltılan hücreler buz üzerine alınarak 5 dakika inkübe edildi. 5 dakikalık inkübasyon periyodunun ardından, kuyulardan besiyerleri uzaklaştırılarak hücreler 2 kez soğuk fosfat tamponlu tuzlu su (PBS) ile yıkandı. Daha sonra hücrelerin üzerine 1 mM PMSF içeren 1X Hücre Lizis Buffer eklendi ve hücreler buz üzerinde 5 dakika inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda hücreler scraper ile kaldırılıp 1.5 ml'lik eppendorf tüplere alındı. 13500 rpm'de +4°C'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra, süpernatant yeni tüplere alındı ve tek kullanımlık alikotlandıktan sonra analiz edilinceye kadar -80 °C derin dondurucuda muhafaza edildi.

Ayrıca, FOXD1'in susturulmasının doğrulanması amacıyla, siRNA uygulanan 22Rv1 hücrelerinden de protein izolasyonu yapıldı. Bunun için öncelikle, 6 kuyulu hücre kültür plakalarında hücrelerin siRNA transfeksiyonu yapıldı. Ardından, yukarıda anlatıldığı şekilde protein izolasyonu gerçekleştirildi.

3.2.7. BCA kiti ile protein miktar tayini

Elde edilen hücre lizatlarında bulunan total protein miktarı Bikinkoninik Asit (BCA) kiti ile saptandı. Öncelikle Bovine serum albumin (BSA) ile 2000 µg/ml, 1500 µg/ml, 1000 µg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml ve 0 µg/ml konsantrasyonlarda saf su kullanılarak standartlar hazırlandı. Hazırlanan standartlar ve hücre lizatları 96 kuyulu plakanın her kuyusuna üç tekrarlı olarak 25'şer µl dağıtıldı. Protein ölçüm kitinin içerisinde bulunan Reaktif B:A oranı 1:50 olacak şekilde hazırlandı ve bu reaktif karışımından her bir kuyuya 200 µl eklendi. İnkübatörde 37°C de yarım saat inkübasyondan sonra mikropilaka ELISA okuyucuda 562 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı. BSA standartlarından elde edilen absorbans değerleriyle excel programında standart eğri grafiği çizdirildi ve hesaplanan regresyon denklemi aracılığıyla total protein miktarları hesaplandı.

3.2.8. Western blot yöntemi ile protein ifadelerinin belirlenmesi

BCA kiti ile total protein miktarları belirlenen hücre lizatları yükleme için hazırlandı. Bu amaçla hücre lizatlarının üzerine 4X konsantrasyonda örnek hazırlama tamponu eklendi ve 95°C'de 5 dakika bekletilerek örneklerin denatürasyonu gerçekleştirildi. Örnekler oda sıcaklığına geldikten sonra yükleme aşamasına geçildi. Jele yüklenen protein örnekleri, 1X running buffer ile 150 V ve 250 mA'de 90 dakika boyunca yürütüldü.

Proteinler jel üzerinde moleküler ağırlıklarına göre yürütüldükten sonra güç kaynağı kapatıldı ve jelin ıslak transfer yöntemi ile PVDF membrana transferleri gerçekleştirildi. Bunun için membran ile jel, sünger ve whatman kağıtlarının arasında transfer kasetine konularak tank içerisine yerleştirildi. Tank içerisine transfer tamponunun eklenmesinin ardından 100 V ve 250 mA'de 90-120 dakika arasında örneklerin jelden membrana aktarımı gerçekleştirildi.

Jel üzerinde yer alan protein örneklerinin PVDF membrana transferinden sonra membran BSA ile bloklandı. Daha sonra, membran E-kaderin, N-kaderin, Snail, Vimentin, β -katenin, c-myc, siklin D1 ve β -aktin primerlerine özgü antikorlarla +4°C'de çalkalayıcı üzerinde gece boyunca inkübe edildi. İnkübasyonun ardından membran üç kez TBS-T ile yıkandı ve yine üretici firmanın talimatlarına göre hazırlanmış olan sekonder antikorlar ile oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi. Daha sonra membran üç kez TBS-T ile yıkandı. TBS-T ile yıkama sonrasında, membranlar ECL Chemiluminescent HRP Western substrat ile muamele edildi ve Gel Logic 2200 Pro cihazında Carestream programı kullanılarak görüntülenmesi gerçekleştirildi. Western blot yöntemi sonucu görüntülenen proteinlerin bant kalınlıkları ImageJ programı kullanılarak değerlendirildi ve sayısal değerlere dönüştürüldü.

3.2.9. Hücre transfeksiyonu

Yapılan analizler sonucunda en yüksek FOXD1 ifadesine sahip olan 22Rv1 prostat kanseri hücresi, 6 kuyulu hücre kültürü plakalarına 5×10^5 hücre/kuyu yoğunlukta ekildi ve 24 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından 22Rv1 hücreleri, üretici firmanın protokolüne göre siRNA Transfection Reagent kullanılarak transfekte edildi. Transfeksiyondan 24 saat sonra

RNA, 48 saat sonra ise protein izolasyonu gerçekleştirildi ve transfeksiyon verimliliği western blot ve qRT-PCR kullanılarak teyit edildi.

3.2.10. WST-1 ile hücre proliferasyonunun belirlenmesi

Hücre proliferasyonu, WST-1 hücre proliferasyon kiti kullanılarak tetrazolyum tuzu olan WST-1'in mitokondriyal dehidrogenazlar tarafından suda çözünür formazan kristalleri oluşturması esasına dayanan WST-1 yöntemi ile belirlendi. Kısaca, hücreler FOXD1 siRNA ve negatif kontrol siRNA ile transfekte edildikten sonra, Tripsin-EDTA ile tripsinize edilerek kaldırıldı. Ardından, taze besiyeri ile yeniden süspanse edildi ve 96 kuyulu hücre kültür plakalarının her bir kuyusuna 5000 hücre/100 µl yoğunlukta hücre ekimi yapıldı. Hücreler %95 nem ve %5 CO₂ içeren inkübatörde 37°C'de 24, 48 ve 72 saat inkübe edildi. Belirtilen sürelerin sonunda her bir kuyudaki besiyerleri uzaklaştırılıp yerine 100 µl fenol redsiz RPMI-1640 besiyeri ve 10 µL WST-1 eklendi. Hücreleri içeren kültür kabı etüvde 37°C'de 4 saat inkübe edildi. Formazan ürününün oluşturduğu renk değişimi 4 saat sonunda mikroparka okuyucu (Spektramax M3 plate reader, Molecular Devices) ile 450 nm dalga boyu aralığında belirlendi. Her deney altı tekrar halinde gerçekleştirildi.

3.2.11. *In vitro* yara iyileşme (Wound healing) deneyi

FOXD1 geninin susturulmasının migrasyon üzerindeki potansiyel etkisini değerlendirmek için yara iyileşme deneyi yapıldı. Yara iyileşme deneyi için, 22Rv1 hücreleri 6 kuyulu hücre kültür plakalarına kuyu başına 5×10^5 hücre olacak şekilde ekildi ve %95 nem ve %5 CO₂ içeren inkübatörde 37°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından hücreler, FOXD1-siRNA ve negatif kontrol-siRNA ile transfekte edildi. Transfeksiyon işleminden sonra, 200 µl sarı pipet ucu ile 22Rv1 hücreleri üzerinde dikey bir çizik oluşturuldu. Ayrılmış hücreleri uzaklaştırmak için hücreler PBS ile dikkatlice yıkandı ve inkübatöre geri yerleştirilmeden önce 0. saatte fotoğraflandı. Çizik oluşturulan alan 24. ve 48. saatlerde yeniden fotoğraflandı. Fotoğraflar ImageJ programı ile analiz edildi. Hücrelerin % göç oranları şu formüle göre hesaplandı: % alan kapanma oranı = $[(0.\text{saat hasar alanı} - 24.\text{saat hasar alanı}) / 0.\text{saat hasar alanı}] \times 100$

3.2.12. *In vitro* migrasyon ve invazyon analizleri

In vitro migrasyon ve invazyon analizleri için transwell migrasyon ve transwell invazyon deneyleri yapıldı. 8 µm por çapına sahip polikarbonat filtrenin üzeri matrigel ile kaplanarak transwell invazyon analizi ve matrigel ile kaplanmayarak transwell migrasyon analizi gerçekleştirildi. Her iki deney için, serum içermeyen besiyeri içerisinde süspansiyon haline getirilmiş 22Rv1 hücreleri kuyu başına 5×10^4 hücre olacak şekilde, polikarbonat filtrenin üst bölmesine ekildi. Alt bölme ise %10 FBS içeren 750 ml RPMI-1640 ortamı ile dolduruldu. 48 saat inkübasyondan sonra, membranın üst yüzeyinde kalan hücreler pamuklu bir çubuk ile temizlendi. Filtrenin alt yüzeyindeki hücreler %4 paraformaldehit ile sabitlendi ve Giemsa ile boyandı. Alt yüzeyde yer alan hücreler, invert mikroskop altında altı temsili alanda sayıldı.

3.3. Normalizasyon ve İstatistiksel Analiz Yöntemleri

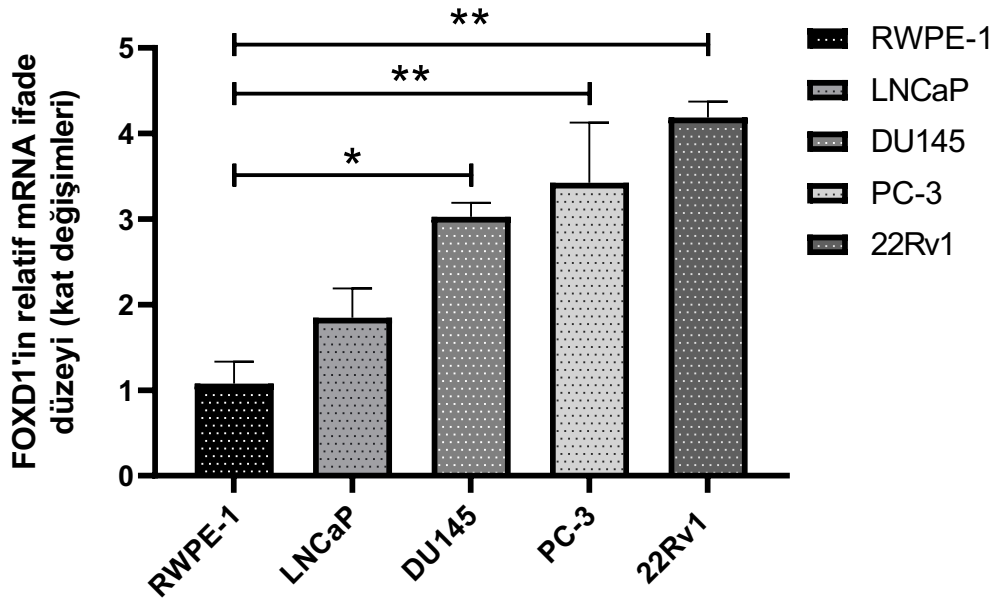
Farklı prostat kanseri hücre hatlarına ait mRNA ifade düzeyleri, insan prostat epitel hücre hattı RWPE-1 ve housekeeping gen olarak seçilen GAPDH dikkate alınarak Livak ve Schmittgen'in $2^{-\Delta\Delta CT}$ metoduna göre normalize edildi [160].

Çalışmadan elde edilen verilere göre gruplar arasındaki farklılıklar SPSS 23.0 istatistik programı ile analiz edildi. Karşılaştırmalar ANOVA veya Student's t testi ile yapıldı. İstatistiksel anlamlılık p değeri hesaplanarak incelendi. p değerinin $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ ve $****p < 0.0001$ olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

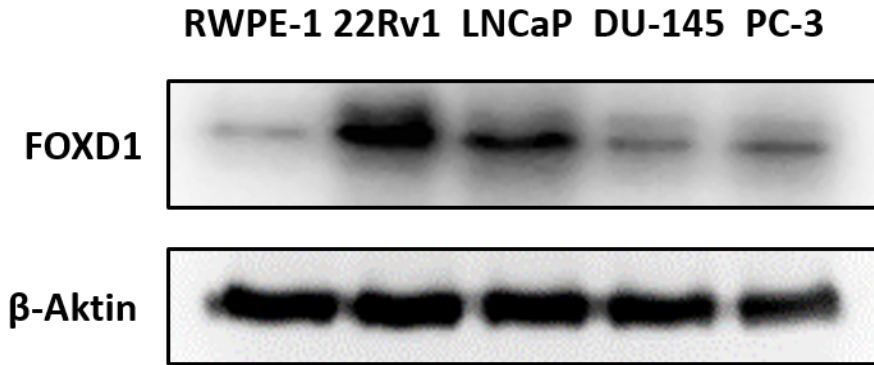
4.1. Prostat Kanseri Hücre Hatlarında ve Prostat Epitel Hücre Hattında FOXD1 İfadesinin mRNA ve Protein Düzeyinde Belirlenmesi

Çalışmamızda, 4 farklı prostat kanseri hücre hattı (22Rv1, LNCaP, DU-145 ve PC-3) ve 1 tane normal prostat epitel hücre hattı (RWPE-1) kullanılmıştır. İlk olarak prostat kanseri hücre hatlarında ve kontrol grubu olarak seçilen prostat epitel hücre hattında FOXD1 geninin mRNA ve protein ifade düzeyleri incelenmiştir. Nicel Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) analiz sonuçları, 22Rv1, PC-3 ve DU-145 hücre hatlarında FOXD1 geninin mRNA ifade düzeylerinin RWPE-1 hücre hattındaki ifadesine kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek olduğunu göstermiştir ($p<0.05$ ve $p<0.01$) (Şekil 4.1). LNCaP hücre hattında ise, FOXD1 geni mRNA ifade düzeyinin kontrole göre arttığı gözlemlense de bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir ($p>0.05$) (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. FOXD1 geninin dört prostat kanseri hücre hattı (22Rv1, LNCaP, DU-145 ve PC-3) ve normal prostat epitel hücre hattında (RWPE-1) mRNA düzeyindeki ifadesinin qRT-PCR analizi ile karşılaştırılması. RWPE-1 hücreleri ile karşılaştırıldığında * $p<0.05$, ** $p<0.01$

Western blot analizi sonuçları ise, FOXD1 geninin protein düzeyindeki ifadesinin dört prostat kanseri hücre hattında (22Rv1, LNCaP, DU-145 ve PC-3) RWPE-1 hücre hattındaki ifadesinden belirgin şekilde daha yüksek olduğunu göstermiştir. Çalışmada kullanılan hücre hatlarında, FOXD1 geninin protein düzeyindeki ifadeleri Şekil 4.2’de gösterilmiştir. Kuyulara eşit yükleme yapıp yapılmadığını kontrol etmek amacıyla, protein yükleme kontrolü olarak bir housekeeping gen olan β -Aktin kullanılmıştır.



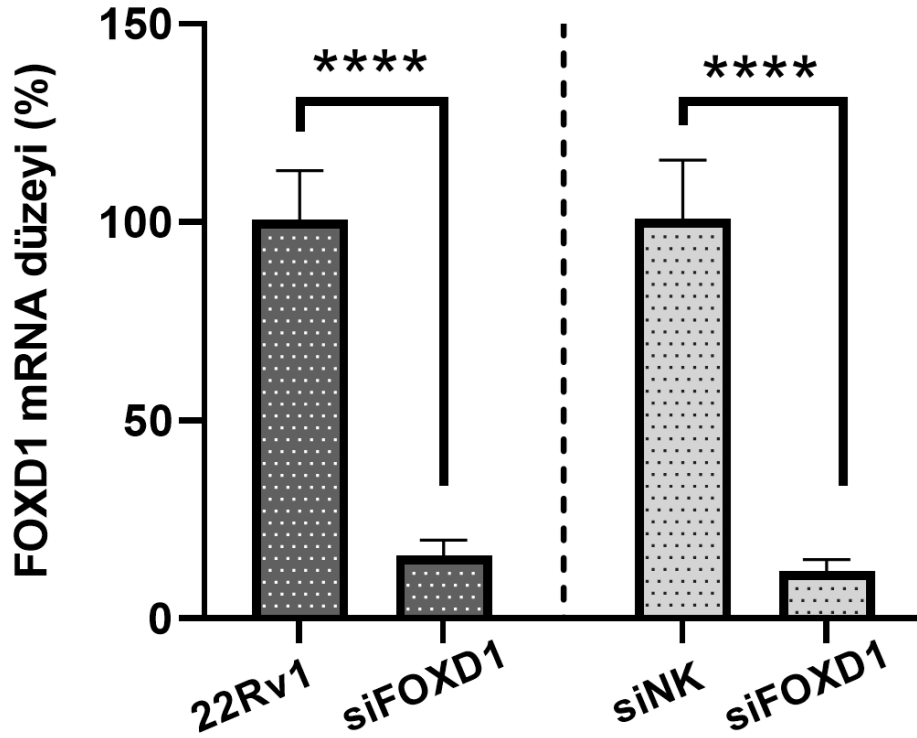
Şekil 4.2. FOXD1 geninin dört prostat kanseri hücre hattı (22Rv1, LNCaP, DU-145 ve PC-3) ve normal prostat epitel hücre hattında (RWPE-1) protein düzeyindeki ifadesinin Western blot analizi ile karşılaştırılması

Western blot ve qRT-PCR analizleri sonucunda hem mRNA hem de protein düzeyinde en yüksek FOXD1 ifadesi 22Rv1 hücrelerinde saptandığı için bu aşamadan sonra araştırmaya 22Rv1 hücre hattıyla devam edilmiştir.

4.2. 22Rv1 Hücrelerinde FOXD1’in Susturulmasının Protein ve mRNA Düzeyinde Teyit Edilmesi

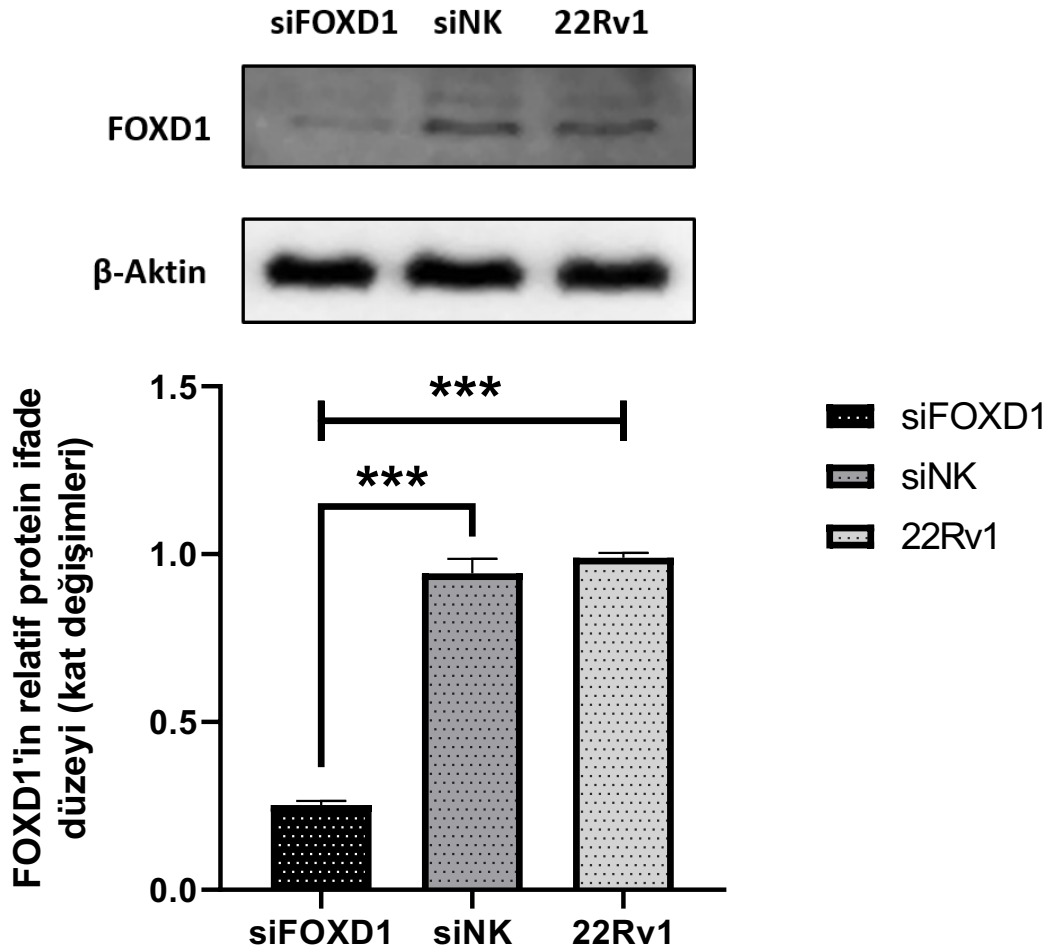
22Rv1 hücre hattında siRNA uygulamasının mRNA düzeyindeki etkinliğini saptamak için qRT-PCR yapılmıştır. Bu amaçla; öncelikle 22Rv1 hücreleri FOXD1 siRNA ve spesifik olmayan bir siRNA (negatif kontrol) ile transfekte edilmiştir. Transfeksiyon işleminden sonra FOXD1 mRNA ifade düzeyleri qRT-PCR ile değerlendirilmiştir. qRT-PCR ile elde edilen ham veriler, bir housekeeping gen olan GAPDH ile normalize edilmiştir. qRT-PCR’den elde edilen sonuçlar, FOXD1 siRNA ile transfekte edilen hücrelerde, FOXD1 ifadesinin belirgin şekilde baskılandığını göstermiştir (Şekil 4.3). FOXD1 siRNA (siFOXD1) ile transfekte edilen 22Rv1 hücrelerinin mRNA ifade düzeyleri transfeksiyon yapılmamış 22Rv1 hücrelerinin mRNA ifade düzeyleri ile kıyaslandığında FOXD1 mRNA

ifadesinin %85 oranında inhibe edildiği belirlenmiştir ($p<0.0001$) (Şekil 4.3). FOXD1 siRNA ile transfekte edilen 22Rv1 hücrelerinin mRNA ifade düzeyi, negatif kontrol siRNA (siNK) ile transfekte edilen 22Rv1 hücrelerinin mRNA ifade düzeyleri ile kıyaslandığında ise bu oran %88 olarak tespit edilmiştir ($p<0.0001$) (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. FOXD1 siRNA ile transfekte edilen 22Rv1 hücrelerinde FOXD1 mRNA ifade düzeyleri. Transfekte edilmemiş 22Rv1 hücreleri ve negatif kontrol siRNA ile transfekte edilen 22Rv1 hücreleri ile karşılaştırıldığında **** $p<0.0001$

22Rv1 hücre hattında siRNA uygulamasının protein düzeyindeki etkinliğini saptamak için western blot analizi yapılmıştır. Western blot analizi sonuçlarımıza göre; negatif kontrol siRNA ile transfekte edilen ve transfekte edilmemiş 22Rv1 hücreleriyle karşılaştırıldığında, FOXD1 siRNA ile transfekte edilen hücrelerde FOXD1 proteininin ifadesinin belirgin bir şekilde baskılandığı görülmüştür (Şekil 4.4). FOXD1 siRNA ile transfekte edilen 22Rv1 hücrelerinde protein düzeyindeki susturmanın %70'in üstünde olduğu bulunmuştur. Negatif kontrol siRNA ile transfekte edilen ve transfekte edilmemiş 22Rv1 hücrelerinde beklendiği gibi herhangi bir susturma etkisi gözlenmemiştir.



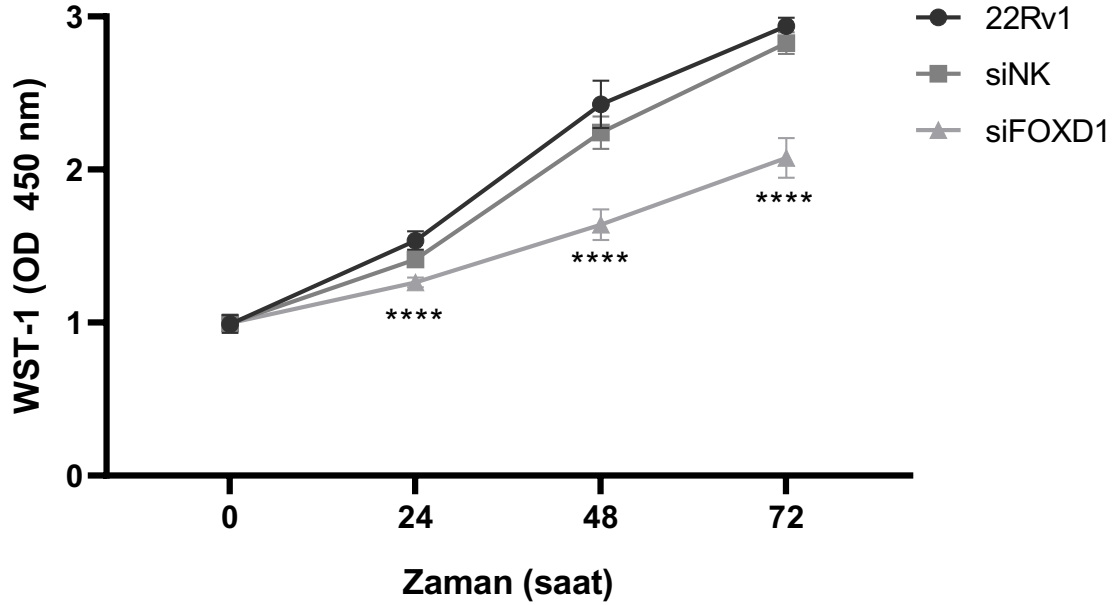
Şekil 4.4. FOXD1 siRNA ile transfeke edilen 22Rv1 hücrelerinde FOXD1 protein ifade düzeyi. *** $p < 0.001$

4.3. 22Rv1 Hücrelerinde FOXD1'in Susturulmasının Hücre Proliferasyonuna Etkisinin WST-1 Yöntemi ile Değerlendirilmesi

FOXD1 susturma işleminin siRNA ile transfeke edilmiş 22Rv1 hücrelerinde proliferasyon üzerine etkisini belirlemek için 24, 48 ve 72 saat süreyle WST-1 proliferasyon analizi yapılmıştır. Bu hücrelerin proliferasyonu, FOXD1 siRNA ve negatif kontrol siRNA ile transfeke edilmiş ve herhangi bir siRNA ile transfeke edilmemiş 22Rv1 hücrelerine kıyasla değerlendirilmiştir.

WST-1 analizinden elde edilen sonuçlar, FOXD1'in susturulmasının, siNK ve herhangi bir siRNA ile transfeke edilmemiş 22Rv1 grubu ile karşılaştırıldığında, 22Rv1 hücrelerinin proliferasyonunu önemli ölçüde inhibe ettiğini göstermiştir (Şekil 4.5). Negatif kontrol

siRNA ile transfekte edilen 22Rv1 hücrelerinin proliferasyonları ile herhangi bir siRNA ile transfekte edilmeyen kontrol grubundaki hücrelerin proliferasyonları arasında önemli bir farklılık tespit edilmemiştir. siFOXD1 grubu, siNK ve 22Rv1 grupları ile kıyaslandığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu saptanmıştır ($p<0.0001$).



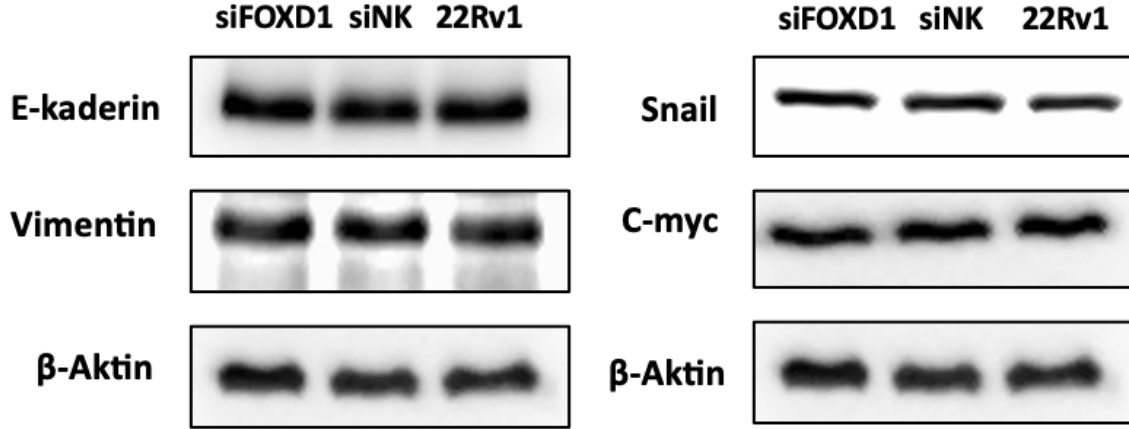
Şekil 4.5. FOXD1'in susturulmasının, 22Rv1 hücrelerinin proliferasyonuna etkisi.
**** $p<0.0001$

4.4. 22Rv1 Hücrelerinde FOXD1'in Susturulmasının EMT ile İlgili Belirteçlerin Protein Düzeylerine Olan Etkisinin Değerlendirilmesi

Prostat kanseri ilerlemesinde FOXD1'in rolünün moleküler mekanizmalarını araştırmak için, western blot analizi kullanarak 22Rv1 hücrelerinde FOXD1'in susturulmasının epitelial mezenkimal geçiş sürecinde görev alan bazı proteinlerin ve Wnt/ β -katenin yolağında görev alan bazı proteinlerin ifadesi üzerindeki etkilerini inceledik.

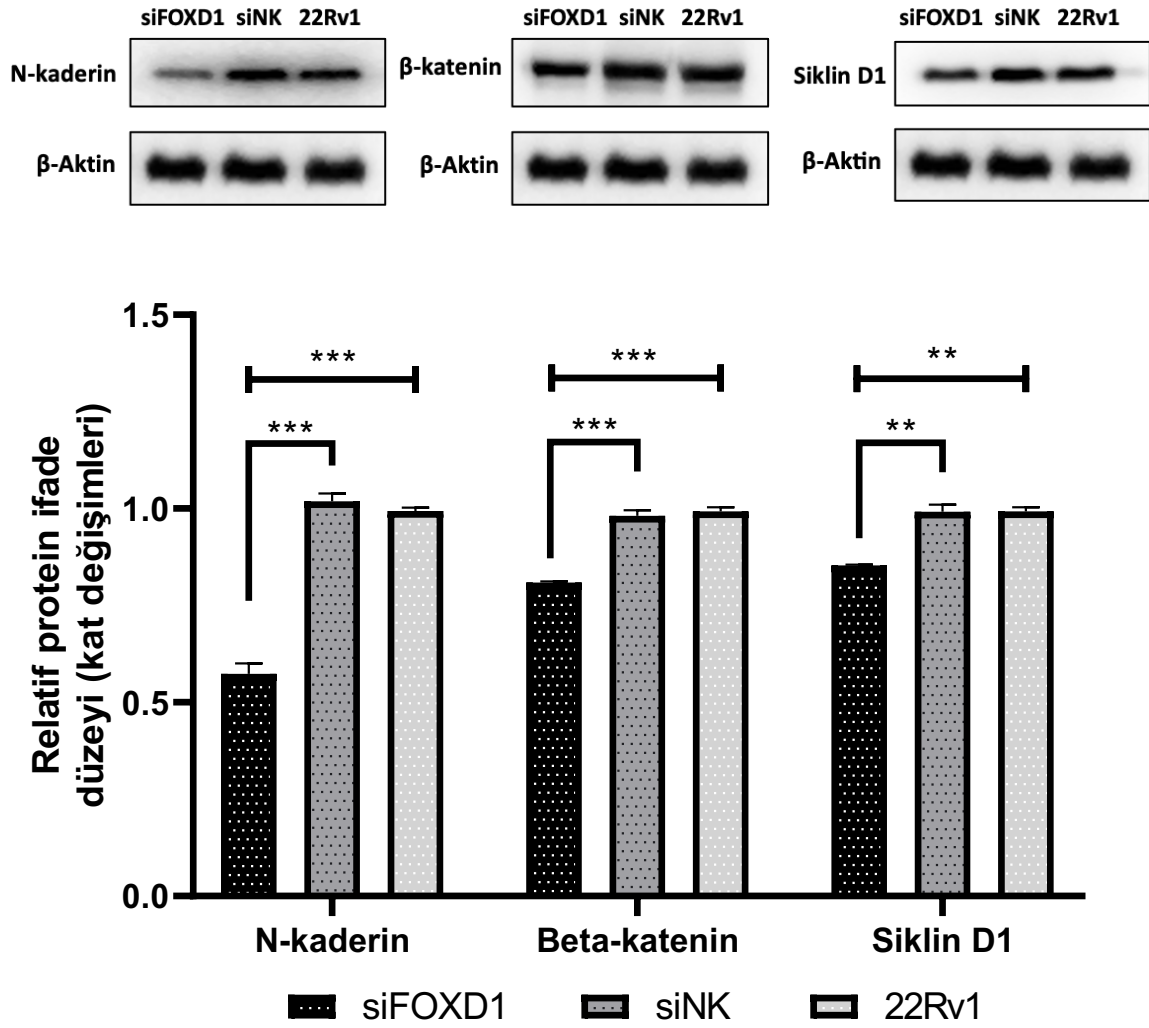
Epitelial mezenkimal geçişin, kanser hücrelerinin invazyon ve metastaz yetenekleri kazanması için önemli bir adım olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle, FOXD1'in EMT sürecinde düzenleyici bir role sahip olup olmadığını tespit etmek için FOXD1'in susturulması ile 22Rv1 hücrelerinde EMT ile ilişkili bazı proteinlerin ifade düzeylerinde bir değişiklik olup olmadığını analiz ettik.

Epitelyal mezenkimal geçiş sürecinde hücrelerde E-kaderin kaybı bilinen bir özelliktir. Ayrıca, Snail proteinin, E-kaderin ifadesini baskılayarak EMT'yi indükleyebildiği bilinmektedir. Western blot analizinden elde edilen sonuçlar, 22Rv1 hücrelerinde FOXD1'in susturulmasının E-kaderin ve Snail'in ifadesi üzerinde herhangi bir etkiye sahip olmadığını göstermiştir (şekil 4.6).



şekil 4.6. 22Rv1 hücrelerinde FOXD1'in susturulması sonrası E-kaderin, Vimentin, Snail ve c-myc protein ifadelerindeki değişimler

Epitelyal mezenkimal geçiş sürecinde hücreler, epitel özelliklerini kaybeder ve mezenkimal özellikler kazanır. Böylece, N-kaderin, Vimentin gibi mezenkimal belirteçlerin ifadelerinde de değişim meydana gelir. Bu nedenle, FOXD1 ile transfekte edilen 22Rv1 hücrelerinde N-kaderin ve Vimentin ifadelerinin değişip değişmediğini belirlemeye çalıştık. şekil 4.6'da grldği gibi, 22Rv1 hücrelerinde FOXD1'in susturulmasının Vimentin ifadesi üzerine etki etmediği gözlenmiştir. N-kaderin ifadesinde ise %40 oranında bir azalma gözlenmiştir ve bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.001$) (şekil 4.7).



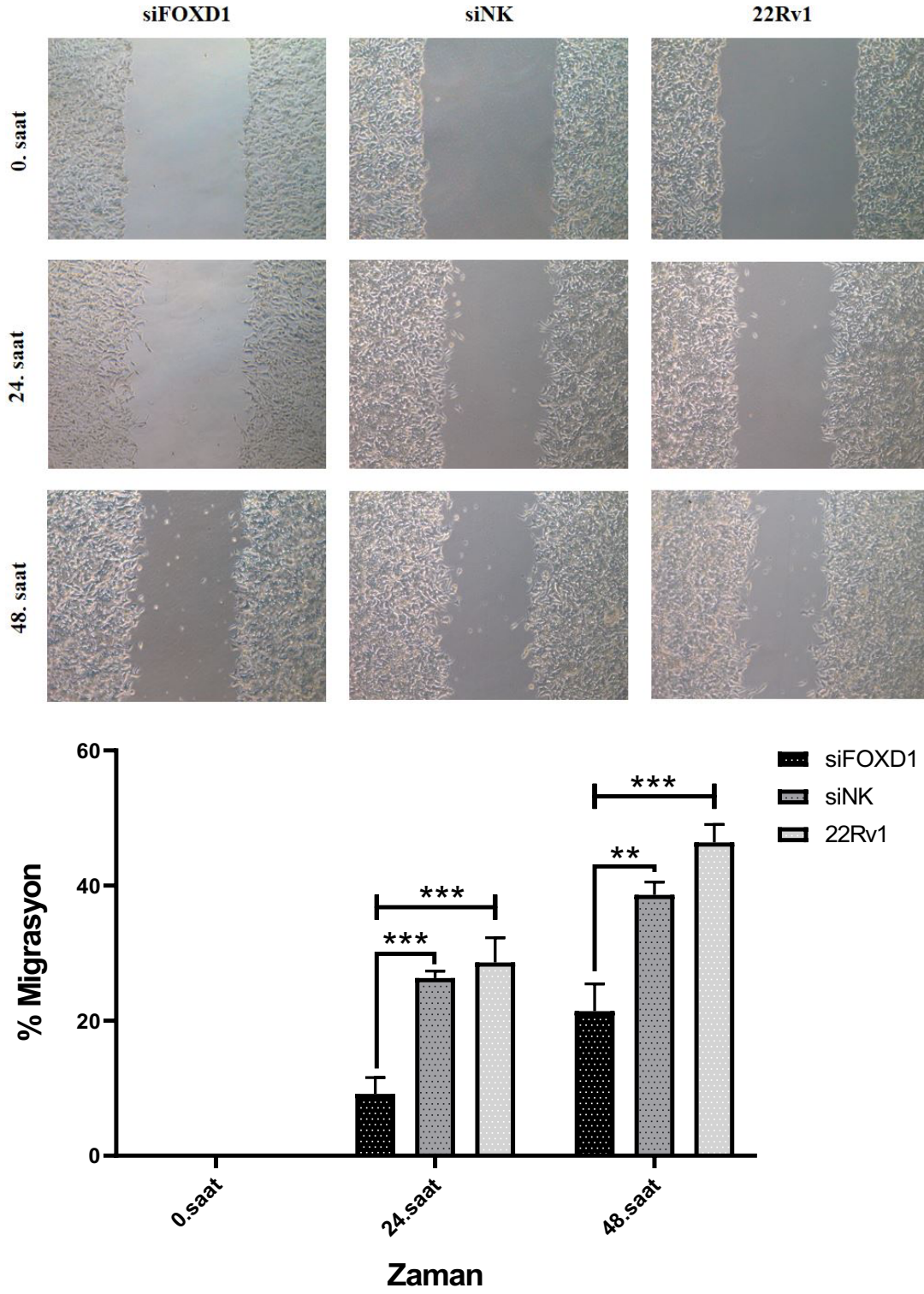
Şekil 4.7. 22Rv1 hücrelerinde FOXD1'in susturulması sonrası N-kaderin, β-katenin ve siklin D1 protein ifadelerindeki değışimler. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Wnt/β-katenin yolağının prostat kanserinde sıklıkla aktive edildiğı ve EMT sürecinde modüle edildiğı bilinmektedir. Bu nedenle 22Rv1 hücrelerinde FOXD1'in susturulmasının bu yolakta görev alan bazı proteinlerin (β-katenin, C-myc ve siklin D1) ifadesi üzerinde bir etkisi olup olmadığı da araştırılmıştır. Western blot analizi sonuçları, 22Rv1 hücrelerinde FOXD1'in susturulmasının, β-katenin ve siklin D1 ifadelerinde düşüşe neden olduğunu göstermiştir (Şekil 4.7). FOXD1 siRNA ile transfecte edilen hücrelerde β-katenin ifadesi siNK ve 22Rv1 gruplarına kıyasla %20'ye varan oranda azalırken ($p < 0.001$), siklin D1 ifadesi siNK ve 22Rv1 gruplarına kıyasla %15'e varan oranda azalma göstermiştir ($p < 0.01$). Bununla birlikte, c-myc ifade düzeyinin FOXD1 ifadesindeki değışimlerden etkilenmediğı saptanmıştır (Şekil 4.6).

4.5. 22Rv1 Hücrelerinde FOXD1'in Susturulmasının Yara İyileşmesi (Wound Healing) Üzerindeki Potansiyel Etkisinin Değerlendirilmesi

FOXD1'in migrasyon üzerindeki potansiyel etkisini araştırmak için, 22Rv1 hücrelerinde yara iyileşme (wound healing) deneyi yapılmıştır. Yara iyileşme deneyi için; 22Rv1 hücrelerinin bir kısmı ortamdaki son konsantrasyon 50 nM olacak şekilde negatif kontrol siRNA ve FOXD1 siRNA ile transfekte edilmiş, hücrelerin bir kısmı ise kontrol grubu olarak transfekte edilmemiştir. Transfeksiyon işleminin ardından, pipet ucuyla transfekte edilen ve edilmeyen hücrelerde yara oluşturulmuştur. Hücrelerin fotoğrafları 2 gün boyunca her 24 saatte bir çekilmiş olup, yara oluşturulduktan sonra 0, 24 ve 48. saatlerde invert mikroskopta alınan görüntüler Şekil 4.8' de gösterilmiştir. Hücrelerin migrasyon yeteneği, belirli bir zaman diliminde yara oluşturulan alana girdikleri mesafe Image J programı ile ölçülerek ve migrasyon yüzdeleri hesaplanarak belirlenmiştir.

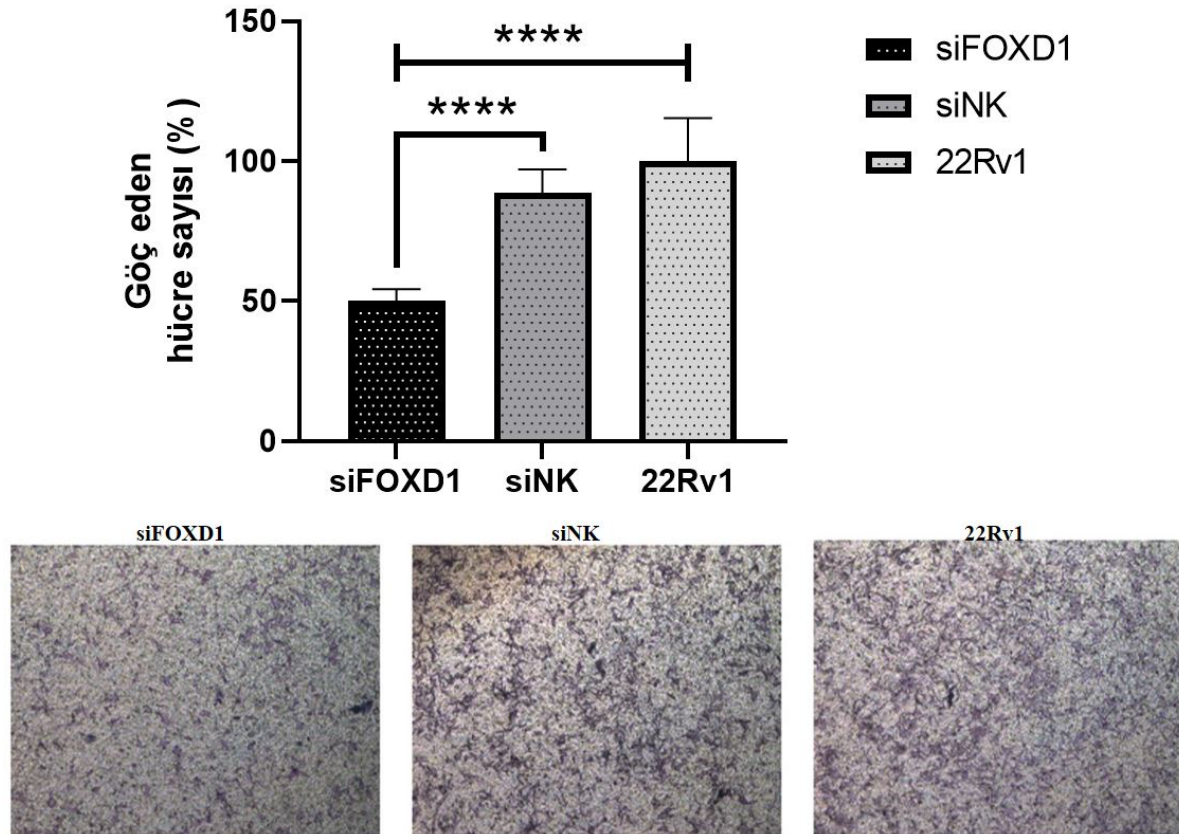
FOXD1 siRNA uygulanan hücrelerin migrasyon yeteneğinin, siNK ve 22Rv1 grupları ile kıyaslandığında 24 ve 48. saatlerde anlamlı ölçüde azaldığı görülmüştür ($p<0,01$ ve $p<0,001$) (Şekil 4.8). FOXD1 siRNA uygulanan hücrelerde migrasyon yüzdeleri 24. ve 48. saatlerde sırasıyla %9 ve %22 iken, negatif kontrol siRNA uygulaması yapılan hücre gruplarında ve FOXD1 siRNA uygulaması yapılmamış olan kontrol grubu hücrelerinde migrasyon yüzdeleri sırasıyla 24. saatte %26 ve %29, 48. saatte %39 ve %46 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. FOXD1'in susturulmasının migrasyon üzerindeki potansiyel etkisinin yara iyileşme (wound healing) deneyi ile değerlendirilmesi. ** $p<0.01$, *** $p<0.001$

4.6. 22Rv1 Hücrelerinde FOXD1'in Susturulmasının Transwell Migrasyon ve İnvazyon Üzerindeki Potansiyel Etkilerinin Değerlendirilmesi

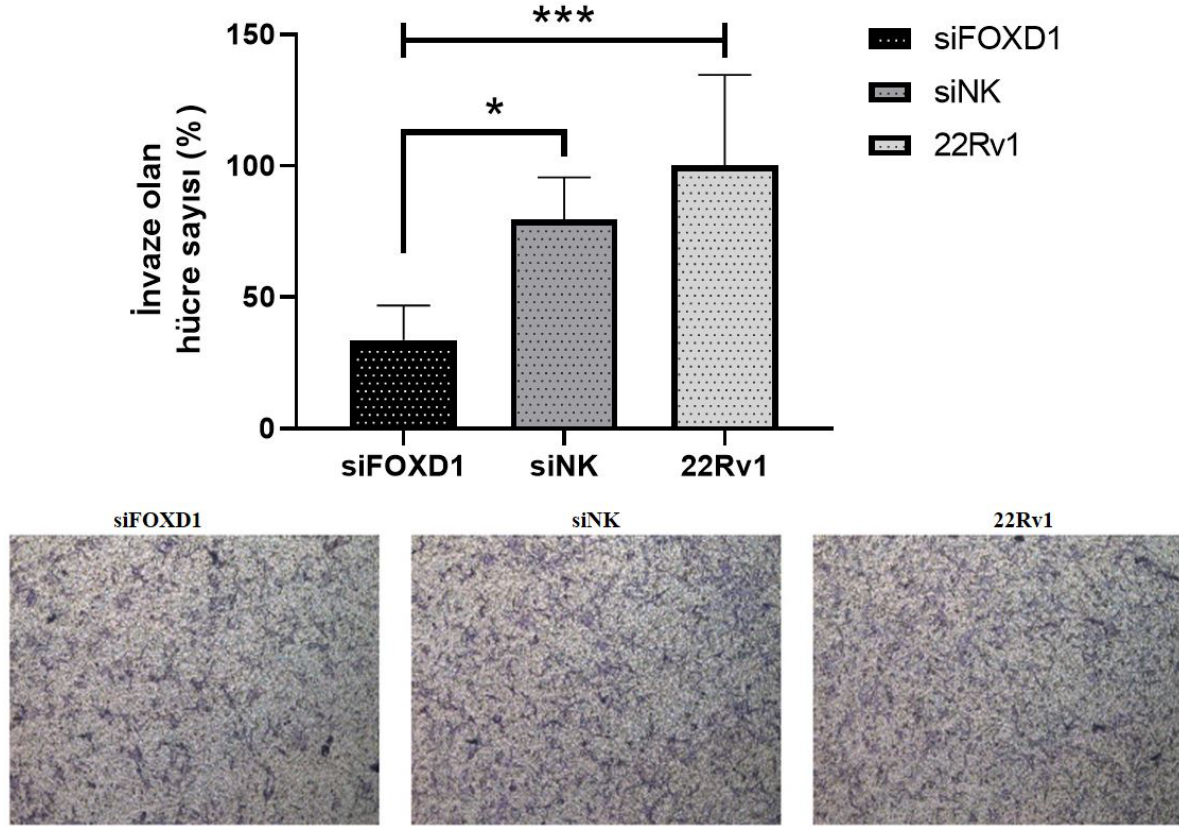
FOXD1'in migrasyon üzerindeki potansiyel etkisini incelemek için 22Rv1 hücrelerinde transwell migrasyon deneyi yapılmıştır. siFOXD1 ile transfekte edilen hücrelerin migrasyon yeteneğinin, siNK ve 22Rv1 grupları ile kıyaslandığında önemli ölçüde azaldığı görülmüştür ($****p<0,0001$). siFOXD1 uygulamasından sonra hücrelerin migrasyon yeteneklerinde, 22Rv1 hücrelerine kıyasla %50' ye varan oranda düşüş gözlenmiştir (Şekil 4.9). siFOXD1 ve siNK gruplarının migrasyon yüzdeleri, 22Rv1 hücrelerine kıyasla sırasıyla %50,2 ve %88,9 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.9. FOXD1'in susturulmasının migrasyon üzerindeki potansiyel etkisinin transwell migrasyon testi ile değerlendirilmesi. $****p<0,0001$

FOXD1 ile transfekte edilen hücrelerin invazyon yeteneklerindeki değişiklikleri incelemek için 22Rv1 hücrelerinde transwell invazyon deneyi yapılmıştır. siFOXD1 ile transfekte edilen hücrelerin invazyon yeteneğinin, siNK ve 22Rv1 grupları ile kıyaslandığında önemli ölçüde azaldığı görülmüştür (sırasıyla $*p<0,05$; $***p<0,001$). siFOXD1 uygulamasından

sonra hücrelerin invazyon yeteneklerinde, 22Rv1 hücrelerine kıyasla %34' e varan oranda düşüş gözlenmiştir (Şekil 4.10). siFOXD1 ve siNK gruplarının invazyon yüzdeleri, 22Rv1 hücrelerine kıyasla sırasıyla %33,7 ve %79,5 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.10. FOXD1'in susturulmasının invazyon üzerindeki potansiyel etkisinin transwell invazyon testi ile değerlendirilmesi. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$

4. TARTIŞMA

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün 2020 yılı raporuna göre prostat kanseri dünya çapında erkeklerde en sık görülen ikinci kanserdir ve 375 000'den fazla kişi bu hastalık nedeniyle hayatını kaybetmiştir [2]. Birçok bireyde prostat kanseri de dahil olmak üzere kansere bağlı ölümlerin nedeni, lokalize primer tümörlerin ileri evrelere ilerlemesi ve sonuçta birden fazla organa metastaz yapması ile ilişkilidir [161,162]. Epitel kökenli tümörlerde, epitelyal-mezenkimal geçişin anormal indüksiyonunun, tümör invazyonuna ve metastaza katkıda bulunduğu bilinmektedir [163-165]. Bu nedenle, prostat kanseri metastazında görev alan yeni düzenleyicilerin belirlenmesi, kanser hastalarını tedavi etmek ve yaşamlarını uzatmak için yeni ve etkili terapötiklerin geliştirilmesi açısından kritik öneme sahiptir.

FOX proteinleri, insanlarda 50 üyeden oluşan evrimsel olarak korunmuş bir transkripsiyon faktörleri ailesidir [109,166]. FOX transkripsiyon faktörleri ailesi, hücre büyümesi, hayatta kalma, uzun ömür, bağışıklık, metabolizma, farklılaşma, gelişme ve migrasyon gibi çeşitli biyolojik süreçlerde önemli roller oynamaktadır. Bu nedenle, FOX genlerinin ifadesinde meydana gelen değişiklikler kanser ilerlemesini teşvik edebilir [167]. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda, FOX transkripsiyon faktörleri ailesinin bazı üyelerinin kanser başlangıcı, invazyon, metastaz ve ilaç direnci ile ilişkili olduğu bulunmuştur [168,104,169,170].

FOXD1, FOX transkripsiyon faktörleri ailesinin yeni keşfedilen bir üyesidir [110]. FOXD1 ilk kez ön beyin nöroepitelyumunda tanımlanmıştır ve retina gelişimi sırasında önemli bir faktör olduğu kabul edilmektedir [171]. Ayrıca, FOXD1'in nefron progenitör farklılaşmasını teşvik ederek böbrekte önemli bir rolü olduğu bildirilmiştir [172]. Son zamanlarda yapılan bazı çalışmalar, FOXD1'in çeşitli insan kanserlerinde karsinogenez, tümör ilerlemesi ve metastazda önemli rol oynadığını göstermiştir [173,117]. Ancak, FOXD1'in birçok insan kanserindeki biyolojik işlevi tam olarak araştırılmamıştır.

Zhao ve diğerlerinin (2015) yapmış oldukları bir çalışmada, meme kanserli hastaların kanserli dokularında ve çevresindeki normal dokularda, FOXD1 geninin hem mRNA hem de protein ifade seviyeleri tespit edilmiştir. FOXD1'in meme kanseri dokularında ifadesinin daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Daha sonra, qRT-PCR ve western blot analizi ile meme kanseri hücre hatlarında ve normal meme epitel hücre hattında FOXD1 ifade düzeyleri

mRNA ve protein düzeyinde belirlenmiştir. mRNA ve protein düzeyinde en yüksek FOXD1 ifadesine sahip olan meme kanseri hücre hattı olan MDA-MB-231 siRNA ile transfekte edilmiştir. Meme kanseri hücre hatları arasında mRNA ve protein düzeyinde en düşük FOXD1 ifadesine sahip meme kanseri hücre hattı olan MCF-7 ise plazmid vektörüyle transfekte edilerek FOXD1'i aşırı ifade etmesi sağlanmıştır. FOXD1'in susturulmasının MDA-MB-231 hücrelerinde hücre proliferasyonu ve kemorezistans kabiliyetini azalttığını, FOXD1'in aşırı ifadelendirilmesinin ise, MCF-7 hücrelerinde hücre proliferasyonu ve kemorezistans kabiliyetini arttırdığını bildirmişlerdir [119].

Nakayama ve diğerleri (2015) tarafından yapılan bir çalışmada, 90 küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hastasından alınan örneklerden mikrodizi analizi yapılarak gen ifade profili çıkarılmıştır. Analiz sonucuna göre, FOXD1'in normal dokulara göre tümör dokularında daha yüksek düzeyde ifade edildiği bulunmuştur. Daha sonra FOXD1'in mRNA ifade düzeyleri, akciğer kanseri hücre hatlarında ve normal bronş epitel hücre hattında değerlendirilmiştir. Normal bronş epitel hücrelerine göre daha yüksek FOXD1 ifadesine sahip olan akciğer kanseri hücre hatları belirlenmiş ve bu hücre hatlarında FOXD1 ifadesi siRNA ile baskılanmıştır. FOXD1'in ifadesinin baskılanmasının, akciğer kanseri hücrelerinin proliferasyonunu azalttığı belirlenmiştir. Araştırmacılar ayrıca, yüksek FOXD1 ifadesine sahip olan hastaların düşük FOXD1 ifadesine sahip olan hastalardan çok daha kısa sağkalım süresine sahip olduğunu rapor etmişlerdir [120].

Gao ve diğerlerinin (2017) yaptıkları bir çalışmada, glioma tümör numuneleri ve glioblastoma hücrelerinde FOXD1'in glioma tümörgenezi ve ilerlemesindeki rolü araştırılmıştır. FOXD1'in ekspresyon paterni, qRT-PCR kullanılarak 70 glioma dokusu ve 20 normal beyin dokusunda değerlendirilmiştir. FOXD1 ekspresyonu, normal beyin dokularına kıyasla glioma dokularında önemli ölçüde daha yüksek bulunmuştur. FOXD1'in gliomadaki rolünü araştırmak için, FOXD1-siRNA kullanarak U87 ve U251 glioma hücrelerinde FOXD1'in ifadesi baskılanmıştır. FOXD1 susturma işleminin glioma hücrelerinin proliferasyonu ve migrasyonu üzerindeki etkisi araştırılmıştır. FOXD1-siRNA kullanılarak, FOXD1 ifadesinin baskılanmasının hücre proliferasyonu ve migrasyonunu önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir [173].

Kolorektal kanserinde, FOXD1'in rolünün araştırıldığı bir çalışmada ise, 80 kolorektal kanserli hastadan alınmış tümörlü ve normal dokularda FOXD1 ifadesi qRT-PCR

kullanılarak belirlenmiştir. FOXD1 mRNA ifadesinin, normal dokulara kıyasla tümörlü dokularda daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca FOXD1'in aşırı ekspresyonunun malign klinik özellikler ile ilişkili olduğu ve kolorektal kanserli hastaların sağkalımını azalttığı saptanmıştır. İnsan kolorektal kanseri hücre hatları olan SW480 ve HT29'da FOXD1 ifadesi baskılanarak, FOXD1'in hücre proliferasyonu ve apoptoz üzerine etkisi araştırılmıştır. FOXD1'in proliferasyonu desteklediği ve muhtemelen polo benzeri kinaz 2'yi (Plk2) indükleyerek kolorektal kanseri hücrelerinin apoptozunu inhibe ettiği öne sürülmüştür [174].

Li ve diğerlerinin (2018) yapmış oldukları çalışmada, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hastasına ait 264 dokuda FOXD1'in ifade düzeyleri mRNA düzeyinde incelenmiştir. FOXD1'in mRNA ifade düzeyinin, tümörlü dokularda çevresindeki normal dokulara kıyasla önemli ölçüde yüksek olduğu bulunmuştur. Ayrıca, FOXD1'in protein ifade düzeyleri, Western blot analizi ile beş farklı akciğer kanseri hücre hattında ve bir tane normal bronş epitel hücre hattında belirlenmiştir. FOXD1'in ifade düzeyinin, akciğer kanseri hücre hatlarında normal bronş epitel hücre hattına göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Akciğer kanseri hücre hatlarında FOXD1 ifadesi baskılanarak, proliferasyon, migrasyon ve invazyon üzerindeki etkileri incelenmiştir. FOXD1'in susturulmasının proliferasyon, migrasyon ve invazyonu önemli ölçüde inhibe ettiği bildirilmiştir [121].

Pan ve diğerleri (2018) tarafından yapılan bir çalışmada, 126 kolorektal kanser hastasının normal ve tümörlü dokularında FOXD1 protein ifadesi immünohistokimyasal analiz ile incelenmiştir. FOXD1'in kolorektal kanser hastalarının tümörlü dokularında anormal şekilde aşırı eksprese edildiği bildirilmiştir. Daha sonra, FOXD1'in kolorektal kanser hücrelerindeki fonksiyonunu belirlemek için FOXD1'i aşırı ifade eden Caco2 ve SW480 hücre hatları oluşturulmuştur. Ayrıca, SW1116 hücre hattı shRNA ile transfekte edilerek FOXD1 ifadesi baskılanmıştır. FOXD1 ifadesinin baskılanması kolorektal kanser hücrelerinde hücre proliferasyonunu, migrasyonunu ve invazyonunu azaltmıştır. FOXD1'in aşırı ifadelendirilmesinin ise zıt etkiler yarattığı belirlenmiştir. Ayrıca, FOXD1'in aşırı ekspresyonunun kolorektal kanser hastalarının kötü prognozu ile önemli ölçüde ilişkili olduğu bildirilmiştir [123].

Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, FOXD1'in normal oral mukoza doku örneklerine kıyasla oral skuamöz hücreli karsinom doku örneklerinde daha yüksek düzeyde ifade

edildiği bulunmuştur. Yine aynı çalışmada, immünohistokimyasal boyama sonuçları, FOXD1 ifadesinin oral skuamöz hücreli karsinomlu hastaların klinik evresi ve nüks durumu ile ilişkili olduğunu göstermiştir. FOXD1'in oral skuamöz hücreli karsinomda rolünü belirlemek için, shRNA kullanılarak CAL27 ve SCC25 hücrelerinde FOXD1 ifadesi baskılanmıştır. CAL27 ve SCC25 hücrelerinde FOXD1 ifadesi baskılandığında, hücrelerin migrasyon, invazyon, koloni oluşumu ve proliferasyon yeteneklerinin azaldığı tespit edilmiştir. Ayrıca, EMT ile ilgili belirteçlerin protein ifade düzeylerinde meydana gelen değişimler incelendiğinde E-kaderin ifadesinde artış, N-kaderin ve Vimentin ifadesinde azalma gözlenmiştir. Yine aynı hücrelerde, FOXD1'in aşırı ifade edilmesi sağlandığında ise E-kaderin ifadesinde azalma, N-kaderin ve Vimentin ifadesinde artış gözlenmiştir. Araştırmacılar, FOXD1'in susturulmasının oral skuamöz hücreli karsinom hücrelerinin migrasyonunu, invazyonunu ve EMT'sini engellediğini göstermişlerdir [175].

Chen ve diğerleri (2021) tarafından yakın tarihte yapılan bir başka çalışmada ise, baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomu olan hastalardan alınan numuneler ile normal numunelerdeki FOXD1 ifade düzeyleri karşılaştırıldığında, baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomu olan hastalardan alınan numunelerde FOXD1'in ifade düzeylerinin daha yüksek olduğu bulunmuştur. Aynı çalışmada, baş ve boyun skuamöz hücreli karsinom hücre hatları (CAL27, SCC25 ve HN4) ve normal oral epitel hücre hattı olan HIOEC arasında FOXD1 ifade düzeyleri açısından bir farklılık olup olmadığı western blot ve qRT-PCR ile analizleri tespit edilmiştir. Baş ve boyun skuamöz hücreli karsinom hücre hatlarında FOXD1 ifadesinin daha yüksek olduğu bulunmuştur. CAL27 ve SCC25 hücrelerinde FOXD1 ifadesi baskılandığında, hücrelerin migrasyon, invazyon, koloni oluşumu ve proliferasyon yeteneklerinde azalma olduğu saptanmıştır. Ayrıca, EMT ile ilgili belirteçlerin ifade düzeylerinde EMT sürecinin inhibe edildiğini gösteren değişiklikler gözlenmiştir. Aynı hücrelerde FOXD1 aşırı ifade ettirildiğinde ise, EMT ile ilgili belirteçlerin ifade düzeylerinde EMT sürecini destekleyici yönde değişiklikler gözlenmiştir [176].

Van der Heul-Nieuwenhuijsen ve diğerlerinin yapmış oldukları bir çalışmada, benign prostat hiperplazisi (BPH), prostat kanseri ve lenf nodu metastazı tanısı alan hastaların prostat dokularından alınan örnekler ve normal prostat dokusundan alınan örnekler kullanılmıştır. Alınan bu örneklerde 12 farklı FOX geninin mRNA ifade düzeyleri qRT-PCR ile incelenmiştir. Yapılan bu çalışmada, FOXD1'in prostat kanseri ve lenf nodu metastazı tanısı alan hastaların prostat dokularından alınan örneklerde normal prostat dokusundan alınan

örneklere kıyasla daha yüksek oranda ifade edildiği bildirilmiştir [118]. Ancak, araştırmacılar bu çalışmada prostat kanserinin gelişiminde ve ilerlemesinde FOXD1'in rolünü araştırmamışlardır.

Bu doktora tez çalışmasında, daha önce Van der Heul-Nieuwenhuijsen ve diğerleri tarafından yapılan çalışmada, prostat kanseri hastalarının tümörlü dokularında yüksek düzeyde ifade edildiği tespit edilen FOXD1'in, prostat kanseri ve prostat epitel hücre hatlarında ifade düzeyleri açısından bir farklılık olup olmadığı belirlenmiştir. Literatürde çeşitli kanser hücre hatlarında FOXD1'in ifade düzeyinin normal hücre hatlarına göre yüksek olduğu bildirilmiştir [119,120,121,123]. Bu tez çalışmasında kullanılan hücre hatlarında, daha önce çeşitli kanser hücreleriyle yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlarla uyumlu olarak, FOXD1'in prostat kanseri hücre hatlarında normal prostat epitel hücre hattına kıyasla hem mRNA hem de protein seviyelerinde önemli ölçüde yüksek ifade edildiği tespit edilmiştir.

FOXD1'in çeşitli kanserlerde hücre proliferasyonu, migrasyonu ve invazyonu üzerine etkilerinin deneysel sonuçları göz önüne alındığında, FOXD1 susturulmasının proliferasyon, migrasyon ve invazyonu önemli ölçüde inhibe ettiği görülmektedir. Çalışmamızda FOXD1'in susturulmasının prostat kanseri hücrelerinde proliferasyon üzerine bir etkisinin olup olmadığını belirlemek için hem mRNA hem de protein düzeyinde en yüksek FOXD1 ifadesine sahip hücre hattı olan 22Rv1 hücreleri siRNA ile transfekte edilerek FOXD1 ifadesi baskılanmıştır. Daha sonra 24, 48 ve 72 saat süreyle WST-1 proliferasyon analizi yapılmıştır. WST-1 analizinden elde edilen sonuçlar literatürde yer alan çalışmaların sonuçları ile paralellik göstermekte olup, FOXD1'in susturulması, 22Rv1 prostat kanseri hücrelerinin hücre proliferasyonunu önemli ölçüde azaltmıştır.

FOXD1'in migrasyon üzerindeki potansiyel etkisini araştırmak için 2 farklı yöntem kullanılmıştır. Bunlardan ilki, yara iyileşme (wound healing) deneyi diğeri ise transwell migrasyon yöntemidir. Her iki deneyden elde edilen sonuçlar paralellik göstermekte olup, FOXD1 siRNA uygulanan hücrelerin migrasyon yeteneğinin, siNK ve 22Rv1 grupları ile kıyaslandığında önemli ölçüde azaldığı görülmüştür. Yine aynı şekilde transwell invazyon deneyinden elde edilen veriler FOXD1 siRNA ile transfekte edilen hücrelerin invazyon kapasitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalmaya neden olduğunu göstermiştir. *İn vitro* deneylerden elde edilen sonuçlar, FOXD1'in susturulmasının 22Rv1 prostat kanseri

hücrelerinin proliferasyonunu, migrasyonunu ve invazyonunu önemli ölçüde azalttığını göstermektedir.

EMT, epitel hücrelerinin epitelyal fenotiplerini kaybetmelerine ve mezenkimal hücrelerin özelliklerini kazanmasına neden olan biyolojik bir süreçtir [177,178]. EMT'nin çok hücreli organizmaların morfogenezinde sırasında kritik bir süreç olduğu gibi, aynı zamanda tümörigenez, invazyon ve metastazda yer alan anahtar süreçlerden biri olduğu da düşünülmektedir [179,180,181,58,182]. Bu nedenle, FOXD1'in EMT sürecinde düzenleyici bir role sahip olup olmadığını tespit etmek için, FOXD1'in susturulmasının 22Rv1 hücrelerinde EMT ile ilişkili bazı proteinlerin ifade düzeylerinde bir değişikliğe neden olup olmadığı analiz edilmiştir.

EMT sürecinde hücrelerde E-kaderin gibi epitelyal belirteçlerin ifadesinde azalma, N-kaderin, Vimentin gibi mezenkimal belirteçlerin ifadesinde artış meydana gelmektedir. Ayrıca, Snail proteinin, E-kaderin ifadesini baskılayarak EMT'yi indükleyebildiği bilinmektedir. Western blot analizinden elde edilen sonuçlar, 22Rv1 hücrelerinde FOXD1'in susturulmasının E-kaderin, Vimentin ve Snail'in ifadesi üzerinde herhangi bir etkiye sahip olmadığını göstermiştir. Ancak, N-kaderin ifadesinde önemli oranda bir azalma gözlenmiştir.

EMT sırasında E-kaderin ifadesinin kaybının genellikle kanser hücrelerinin ayrışmasına ve invazyonuna izin vererek metastazı teşvik ettiği düşünülmektedir [183,184,185]. Bununla birlikte, çalışmamızda FOXD1 ifadesi baskılanan 22Rv1 hücreleri ile siNK ve 22Rv1 grupları arasında E-kaderin ifadesi bakımından bir farklılık gözlenmemiştir. Literatürde yer alan bazı çalışmalarda birçok metastatik dokunun yüksek seviyelerde E-kaderin ifadesine sahip olabildiği ve E-kaderin ifade eden epitel hücrelerin, kanserlerde EMT geçirilmeden invaziv hale gelebildiği ve metastaz yapabildiği bildirilmiştir [186,187,188,189]. Ayrıca, son yıllarda yapılan bazı çalışmalarda, E-kaderinin kanser hücrelerinin disseminasyonu, intravazasyonu ve hayatta kalmasında önemli roller oynadığı rapor edilmiştir [190,191]. Bu çalışmalardan elde edilen veriler birlikte değerlendirildiğinde, metastaz ile ilişkili EMT sürecinin, E-kaderin gibi geleneksel bir EMT belirtecinin ekspresyon paterni kullanılarak tahmin edilemeyeceği görülmektedir.

EMT'de yer alan diğer önemli bir faktör N-kaderin'dir. E-kaderin'den farklı olarak, N-kaderin ifadesinin artmasının, tümör hücrelerinin migrasyon ve invazyon kapasitelerini arttırdığı bildirilmiştir [192]. Literatürde yer alan bazı araştırmalarda, E-kaderin-pozitif kanser hücre hatlarında, N-kaderinin aşırı ifadesinin, hücreleri hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak daha invaziv hale getirdiği, ancak E-kaderinin ifadesinde paralel yönde bir azalma olmadığı bildirilmiştir [193,194]. Bu sonuçlar, N-kaderinin, E-kaderin varlığında bile kanser metastazını destekleyebileceğini göstermektedir [192]. Bu çalışmada, western blot analizinden elde edilen veriler incelendiğinde siRNA uygulanan hücrelerde siNK ve 22Rv1 grupları ile karşılaştırıldığında E-kaderin ifadesinde gruplar arasında değişim gözlenmemiştir, ancak N-kaderin ifadesinde azalma olduğu görülmüştür. N-kaderin ifadesinde meydana gelen azalmanın 22Rv1 hücrelerinin migrasyon ve invazyon kapasitelerinde meydana gelen azalmaya katkı sağlamış olabileceğini düşündürmüştür.

Wnt/ β -katenin sinyal yolağı hem normal prostat gelişiminde hem de prostat kanseri ilerlemesinde rol oynamaktadır [195]. Literatürdeki mevcut çalışmalarda, invaziv prostat kanseri hücre hatlarında ve primer prostat kanseri örneklerinde wnt-1 ve β -katenin ifadesinin arttığı rapor edilmiştir [97,196]. Wnt sinyali, β -katenin bozulmasını önlemekte ve β -katenin'in sitoplazmik/nükleer birikimine neden olmaktadır [83]. β -katenin çekirdeğe girdiğinde ise, bir transkripsiyon koaktivatörü olarak işlev görmekte ve c-myc, siklin D1, MMP7, uPA ve AR gibi proliferasyon, migrasyon, invazyon ve metastazda yer alan hedef genleri aktive etmektedir [83,197].

β -kateninin stabilizasyonu ve nükleer translokasyonu, Wnt/ β -katenin sinyalizasyonunda merkezi olaylardır [198]. Böylece, β -katenin'in protein seviyesini veya hücre içi lokalizasyonunu etkileyen herhangi bir molekül, Wnt transkripsiyonel yanıtının büyüklüğünü doğrudan kontrol eder. Literatürde yer alan mevcut bilgilerin çoğu, birçok FOX transkripsiyon faktörleri ailesi üyesinin kanser hücrelerinde Wnt aktivatörleri veya inhibitörleri olarak hareket ettiğini göstermektedir [199,200]. FOX proteinlerinin kanserdeki rolünün, Wnt yolundaki işlevleriyle tutarlı olduğu görülmektedir; yani, Wnt yolu aktivatörleri olarak çalışan FOX proteinleri genellikle tümör oluşumunu teşvik eder ve kanserlerde indüklenir, oysa Wnt sinyalini inhibe eden FOX ailesi üyeleri sıklıkla tümör baskılayıcılar olarak tanınır ve azalmış ekspresyon sergiler [200].

Siklin D1, iyi bilinen bir Wnt hedef genidir. Prostat kanseri hücrelerinin proliferatif potansiyelini arttırmak için genellikle ileri evre prostat kanseri ile ilişkilidir [201]. Wnt/ β -katenin sinyal yolağının prostat kanseri oluşumu ve gelişimindeki önemli rolü göz önüne alındığında, prostat kanserinde Wnt/ β -katenin sinyal yolağının aktivasyonunun FOXD1 tarafından düzenlenip düzenlenmediğini araştırdık. Mevcut çalışmada, FOXD1'in susturulmasının, 22Rv1 hücrelerinde β -katenin ve siklin D1'in protein ifade düzeylerini önemli ölçüde azalttığını gözlemledik. Ancak, c-myc ifadesinde gruplar arasında değişim gözlemlenemedi. Bu bulgular, FOXD1'in prostat kanserinde en azından kısmen Wnt/ β -katenin sinyal yolağında görev alan ilgili proteinleri ve ardından siklin D1'in ifadesini düzenleyerek hücrelerin proliferasyon, migrasyon ve invazyonunu düzenleyebileceğini göstermektedir.

Karsinomla ilişkili EMT bağlamında yapılan çalışmaların ve mevcut bilgilerin çoğu, hücrenin migrasyon ve invazyon davranışındaki artışı nedensel olarak EMT ile ilişkilendirmiştir ve her iki durumunda EMT'nin ayırt edici özellikleri olduğu düşünülmektedir. Ancak EMT geçiren bir hücrenin her zaman göç ve invazyon davranışında artış olup olmayacağı yönünde çelişkili bulgular rapor edilmiştir.

Schaeffer ve arkadaşlarının (2014), migrasyon ve invazyondaki değişikliklerin EMT ile pozitif olarak ilişkilendirmenin gerekip gerekmediğini araştırdıkları çalışmalarında, gelişmiş migrasyonun EMT'nin fenotipik bir gerekliliği olmadığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada, iki EMT modelinde birkaç *in vitro* ve *in vivo* migrasyon ve invazyon deneyi kullanılarak EMT, migrasyon ve invazyon arasındaki ilişki araştırılmıştır. EMT geçirmiş (post-EMT) hücre hattı olarak sıçan prostat adenokarsinom hücre hattı olan AT3, EMT geçirmemiş (pre-EMT) hücre hattı olarak ise epitelyal DT hücre hattı model olarak kullanılmıştır. Yara iyileşme ve transwell migrasyon deneylerinde AT3 hücrelerinin DT hücrelerinden daha yavaş göç ettiği bulunmuştur. Transwell invazyon deneylerinde ise AT3 hücrelerinin DT hücrelerine göre matrigel kaplı membrandan daha fazla invaze olma yeteneğine sahip olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, DT ve AT3 hücrelerinin *in vivo* migrasyon ve invazyon kabiliyetini belirlemek için deney hayvanı modeli kullanılmıştır. AT3 hücrelerinin, DT hücrelerinden daha az göçmen ancak daha istilacı bir fenotip sergiledikleri bildirilmiştir. Çalışmadan elde edilen veriler göz önüne alındığında, araştırmacılar migrasyonun EMT geçirmemiş hücrelere kıyasla EMT geçirmiş hücrelerde her zaman artmadığını ve migrasyon ve invazyonun birbiri ile bağlantılı olmadığını rapor etmiştir [202].

Kang ve arkadaşlarının 2016 yılında yayınladıkları bir çalışmada, DU145 prostat kanseri hücresinde PSCA'nın susturulmasının, DU145 hücrelerinin migrasyon ve invazyonunu azalttığını, ancak aynı anda EMT sürecinde görev alan E-kaderin, β -katenin ifadelerinde azalma, Vimentin, Fibronektin, Snail, Slug ve Twist ifadelerinde artış ile EMT'yi indüklediğini bildirmişlerdir. Bu nedenle azalan metastatik potansiyelin EMT'den bağımsız olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca EMT'nin metastatik hücresel davranışında hücre içeriğine bağlı (context-dependent) bir rolü olduğunu ve bu bulguların diğer prostat kanseri hücre hatlarında doğrulanması gerektiğini belirtmişlerdir [203].

Literatürde yer alan bazı çalışmalarda, çeşitli kanser hücrelerinde FOXD1'in susturulmasının proliferasyon, migrasyon, invazyon ve EMT'yi önemli ölçüde inhibe ettiği bildirilmiştir. Mevcut çalışmada ise, FOXD1'in susturulmasının 22Rv1 hücrelerinin proliferasyon, migrasyon ve invazyon yeteneklerinde önemli ölçüde azalmaya neden olduğunu gözlemledik. Ancak, çalışmada kullanılan EMT belirteçlerinin tamamında değişim meydana gelmemesi nedeniyle, FOXD1'in susturulması ile 22Rv1 hücrelerinin migrasyon ve invazyon yeteneklerinde meydana gelen azalmanın EMT'den bağımsız olarak gerçekleştiğini düşünmekteyiz.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Prostat kanseri erkeklerde en sık görülen kanserlerden biridir. Prostat kanserinin erken evrelerinde cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi gibi geleneksel tedaviler faydalı olabilmektedir. Bununla birlikte, kanser uzak organlara metastaz yaptığında, geleneksel tedaviler sadece palyatiftir. Bu nedenle, prostat kanserinin tedavisine yönelik yeni terapötik hedeflerin araştırılması ve bu terapötik hedeflerin etkileşime girdikleri hücresel sinyal yollarının belirlenmesi, prostat kanserinin ilerlemesinde rol oynayan moleküler mekanizmaların daha iyi anlaşılması açısından önem arz etmektedir.

Son yıllarda yapılan çalışmalar, insan kanserlerinde FOXD1'in kritik rol oynadığını göstermiştir. Bununla birlikte, daha önceki yıllarda yapılan bir çalışmada FOXD1'in prostat kanseri hastalarının tümörlü dokularından alınan örneklerde normal prostat dokusundan alınan örneklerle kıyasla yüksek düzeyde ifade edildiği bulunmuştur, ancak bu çalışmada prostat kanserinin gelişiminde ve ilerlemesinde FOXD1'in rolü araştırılmamıştır.

Bu tez çalışmasında, FOXD1'in prostat kanseri hücre hatlarında normal prostat epitel hücre hattına kıyasla daha yüksek düzeyde ifade edildiği bulunmuştur. Ayrıca, 22Rv1 hücrelerinde FOXD1'in ifadesinin baskılanmasının, prostat kanseri hücrelerinin proliferasyonunu, migrasyonunu ve invazyonunu önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir. Bu durum, FOXD1'in prostat kanserinde onkojenik fonksiyonu olabileceğini düşündürmüştür. Bunlara ilaveten, FOXD1'in susturulmasının bazı EMT proteinleri ve Wnt/ β -katenin yolağında görevli bazı proteinlerin ifadeleri üzerindeki etkileri de araştırılmıştır. FOXD1'in susturulmasının, Wnt/ β -katenin sinyal yolağında görevli β -katenin ve siklin D1'in ifadelerini etkilediği belirlenmiştir. Ancak, N-kaderin dışındaki EMT ile ilişkili proteinlerin ifadesi üzerine etki etmediği gözlenmiştir. Bu durum, FOXD1'in susturulması ile 22Rv1 hücrelerinin proliferasyon, migrasyon ve invazyon kabiliyetinde meydana gelen azalmanın EMT'den bağımsız olduğunu göstermiştir. Ancak, FOXD1'in fonksiyonlarını değerlendirirken, çalışılan hücre hattının içeriğine bağlı olarak farklı hücre hatlarında farklı etkilere yol açabileceğini göz önünde bulundurmak ve fonksiyonu hakkında daha detaylı bilgi edinmek için daha fazla çalışma yapmak gerekmektedir. Ayrıca, prostat kanserinde FOXD1'in aşırı ifadelendirilmesinin proliferasyon, migrasyon, invazyon ve Wnt/ β -katenin sinyal yolağında görevli proteinlerin ifadesini nasıl düzenleyeceğinin

moleküler mekanizması da araştırılmalıdır. Bunun yanı sıra, mevcut bulguların hayvan modellerinde doğrulanması gerekmektedir.

Sonuç olarak, bu çalışma, FOXD1'in susturulmasının prostat kanseri ilerlemesi sırasında Wnt/ β -katenin sinyal yolağını baskılayarak, 22Rv1 hücrelerinin proliferasyon, migrasyon ve invazyon potansiyellerini azalttığını gösteren ilk çalışmadır. Bu bağlamda, çalışmamızın kanser biyolojisindeki mevcut FOXD1 anlayışına katkı sağlayacağı düşüncesindeyiz. Sonuçlarımız, FOXD1'in prostat karsinogenezinde ve ilerlemesinde önemli bir rol oynadığını göstermiştir. Bu nedenle, FOXD1'in ifade durumu yeni bir prognostik faktör olabileceği gibi, prostat kanseri tedavisi için potansiyel bir terapötik hedef olabilir.

KAYNAKLAR

1. Rebello, R. J., Oing, C., Knudsen, K. E., Loeb, S., Johnson, D. C., Reiter, R. E., Gillessen, S., Van der Kwast, T., and Bristow, R. G. (2021). Prostate cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 7(1):9.
2. İnternet: World Health Organization-Cancer Profiles, 2020. Web: <https://gco.iarc.fr/> adresinden 23 Kasım 2021 tarihinde alınmıştır.
3. Siegel, R. L., Miller, K. D., Goding Sauer, A., Ortiz, A. P., Fedewa, S. A., Pinheiro, P. S., Tortolero-Luna, G., Tyson D. M., and Jemal A. (2018). Cancer statistics for hispanics/latinos, 2018. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 425-445.
4. Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., and Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394-424.
5. Crawford, E. D. (2003). Epidemiology of prostate cancer. *Urology*, 62(6), 3-12.
6. Wong, M. C., Goggins, W. B., Wang, H. H., Fung, F. D., Leung, C., Wong, S. Y., Ng C.F. and Sung, J. J. (2016). Global incidence and mortality for prostate cancer: analysis of temporal patterns and trends in 36 countries. *European Urology*, 70(5), 862-874.
7. Loeb, S., Bjurlin, M. A., Nicholson, J., Tammela, T. L., Penson, D. F., Carter, H. B., Carroll, P., and Etzioni, R. (2014). Overdiagnosis and overtreatment of prostate cancer. *European Urology*, 65(6), 1046-1055.
8. Alkibay, T., Konaç, E., Sözen, S. (2017). Prostat Kanserinin Epidemiyolojisi, Etiyolojisi ve Önlenmesi, *Üroonkoloji Kitabı*, Özen H, Türkeri L. eds., Bölüm 45, Ankara: Pelin Ofset Tipo Matbaacılık, 637-652.
9. Shenoy, D., Packianathan, S., Chen, A. M., and Vijayakumar, S. (2016). Do African-American men need separate prostate cancer screening guidelines?. *BMC Urology*, 16(1), 1-6.
10. Zeigler-Johnson, C. M., Spangler, E., Jalloh, M., Gueye, S. M., Rennert, H., and Rebbeck, T. R. (2008). Genetic susceptibility to prostate cancer in men of African descent: implications for global disparities in incidence and outcomes. *The Canadian Journal of Urology*, 15(1), 3872.
11. Kimura, T., and Egawa, S. (2018). Epidemiology of prostate cancer in Asian countries. *International Journal of Urology*, 25(6), 524-531.
12. Kirchhoff, T., Kauff, N. D., Mitra, N., Nafa, K., Huang, H., Palmer, C., Gulati, T., Wadsworth, E., Donat, S., Robson, M. E., Ellis, N. A., and Offit, K. (2004). BRCA mutations and risk of prostate cancer in Ashkenazi Jews. *Clinical Cancer Research*, 10(9), 2918-2921.

13. Eldon, B. J., Jonsson, E., Tomasson, J., Tryggvadottir, L., and Tulinius, H. (2003). Familial risk of prostate cancer in Iceland. *BJU International*, 92(9), 915-919.
14. Hemminki, K. (2012). Familial risk and familial survival in prostate cancer. *World Journal of Urology*, 30(2), 143-148.
15. Mucci, L. A., Hjelmborg, J. B., Harris, J. R., Czene, K., Havelick, D. J., Scheike, T., Graff, R. E., Holst, K., Möller, S., Unger, R. H., McIntosh, C., Nuttall, E., Brandt, I., Penney, K. L., Hartman, M., Kraft, P., Parmigiani, G., Christensen, K., Koskenvuo, M., Holm, N. V., Heikkilä, K., Pukkala, E., Skytthe, A., Adami, H. O., and Kaprio, J. (2016). Familial risk and heritability of cancer among twins in Nordic countries. *Jama*, 315(1), 68-76.
16. Mottet, N., Bellmunt, J., Bolla, M., Briers, E., Cumberbatch, M. G., De Santis, M., Fossatihi, N., Grossj, T., Henryk, A. M., Joniaul, S., Lammn, T. B., Masono, M. D., Matveevp, V. B., Moldovanq, P. C., van den Berghr, R. C. N., Van den Broeckl, T., van der Poels H. G., van der Kwastt, T. H., Rouvièreq, O., Schootsu, I. G., Wiegel, T., and 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.
17. Johns, L. E., and Houlston, R. S. (2003). A systematic review and meta-analysis of familial prostate cancer risk. *BJU International*, 91(9), 789-794.
18. Huncharek, M., Haddock, K. S., Reid, R., and Kupelnick, B. (2010). Smoking as a risk factor for prostate cancer: a meta-analysis of 24 prospective cohort studies. *American Journal of Public Health*, 100(4), 693-701.
19. Salem, S., Salahi, M., Mohseni, M., Ahmadi, H., Mehrsai, A., Jahani, Y., and Pourmand, G. (2011). Major dietary factors and prostate cancer risk: a prospective multicenter case-control study. *Nutrition and Cancer*, 63(1), 21-27.
20. İnternet: European Association of Urology Guidelines on Prostate Cancer, 2019. Web: <https://uroweb.org/guideline/prostate-cancer/> adresinden 23 Kasım 2021 tarihinde alınmıştır.
21. Xia, J., Gulati, R., Au, M., Gore, J. L., Lin, D. W., and Etzioni, R. (2013). Effects of screening on radical prostatectomy efficacy: the prostate cancer intervention versus observation trial. *Journal of the National Cancer Institute*, 105(8), 546-550.
22. Chen, R., Xie, L. P., and Zhou, L. Q. (2015). Current status of prostate biopsy in Chinese Prostate Cancer Consortium member hospitals. *Chinese Journal of Urology*. 36(5), 342-345.
23. Hoogendam, A., Buntinx, F., and De Vet, H. C. (1999). The diagnostic value of digital rectal examination in primary care screening for prostate cancer: a meta-analysis. *Family Practice*, 16(6), 621-626.
24. Lilja, H., Ulmert, D., and Vickers, A. J. (2008). Prostate-specific antigen and prostate cancer: prediction, detection and monitoring. *Nature Reviews Cancer*, 8(4), 268-278.

25. Ulmert, D., Serio, A. M., O'Brien, M. F., Becker, C., Eastham, J. A., Scardino, P. T., Björk T., Berglund G., Vickers A. J., and Lilja, H. (2008). Long-term prediction of prostate cancer: prostate-specific antigen (PSA) velocity is predictive but does not improve the predictive accuracy of a single PSA measurement 15 years or more before cancer diagnosis in a large, representative, unscreened population. *Journal of Clinical Oncology*, 26(6), 835-841.
26. Sang, L., Wang, X. M., Xu, D. Y., and Cai, Y. F. (2017). Accuracy of shear wave elastography for the diagnosis of prostate cancer: A meta-analysis. *Scientific Reports*, 7(1), 1-8.
27. Harmon, S. A., Tuncer, S., Sanford, T., Choyke, P. L., and Türkbey, B. (2019). Artificial intelligence at the intersection of pathology and radiology in prostate cancer. *Diagnostic and Interventional Radiology*, 25(3), 183.
28. Ahmed, H. U., Bosaily, A. E. S., Brown, L. C., Gabe, R., Kaplan, R., Parmar, M. K., Collaco-Moraes, Y., Ward, K., Hindley, R. G., Freeman, A., Kirkham, A. P., Oldroyd, R., Parker, C., Emberton, M., and PROMIS Study Group. (2017). Diagnostic accuracy of multi-parametric MRI and TRUS biopsy in prostate cancer (PROMIS): a paired validating confirmatory study. *The Lancet*, 389(10071), 815-822.
29. Ahmadiyeh, N., Pomerantz, M. M., Grisanzio, C., Herman, P., Jia, L., Almendro, V., Hansen He, H., Brown, M., Liu, X. S., Davis, M., Caswell, J. L., Beckwith, C. A., Hills, A., Macconnaill, L., Coetzee, G. A., Regan, M. M., and Freedman, M. L. (2010). 8q24 prostate, breast, and colon cancer risk loci show tissue-specific long-range interaction with MYC. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(21), 9742-9746.
30. Ahmed, M., and Eeles, R. (2016). Germline genetic profiling in prostate cancer: latest developments and potential clinical applications. *Future Science OA*, 2(1).
31. Cancer Genome Atlas Research Network. (2015). The molecular taxonomy of primary prostate cancer. *Cell*, 163, 1011–1025.
32. Robinson, D., Van Allen, E. M., Wu, Y. M., Schultz, N., Lonigro, R. J., Mosquera, J. M., Montgomery B., Taplin M.E., Pritchard C. C., Attard G., Beltran H., Abida W., Bradley R. K., Vinson J., Cao X., Vats P., Kunju L. P., Hussain M., Feng F. Y., Tomlins S. A., Cooney K. A., Smith D. C., Brennan C., Siddiqui J., Mehra R., Chen Y., Rathkopf D. E., Morris M. J., Solomon S. B., Durack J. C., Reuter V. E., Gopalan A., Gao J., Loda M., Lis R. T., Bowden M., Balk S. P., Gaviola G., Sougnez C., Gupta M., Yu E. Y., Mostaghe E. A., Cheng H. H., Mulcahy H., True L. D., Plymate S. R., Dvinge H., Ferraldeschi R., Flohr P., Miranda S., Zafeiriou Z., Tunariu N., Mateo J., Lopez R. P., Demichelis F., Robinson B. D., Schiffman M., Nanus D. M., Tagawa S. T., Sigaras A., Eng K. W., Elemento O., Sboner A., Heath E. I., Scher H. I., Pienta K. J., Kantoff P., de Bono J. S., Rubin M. A., Nelson P. S., Garraway L. A., Sawyers C. L., and Chinnaiyan, A. M. (2015). Integrative clinical genomics of advanced prostate cancer. *Cell*, 161(5), 1215-1228.

33. Saranyutanon, S., Deshmukh, S. K., Dasgupta, S., Pai, S., Singh, S., and Singh, A. P. (2020). Cellular and molecular progression of prostate cancer: Models for basic and preclinical research. *Cancers*, 12(9), 2651.
34. Stambolic, V., Suzuki, A., De La Pompa, J. L., Brothers, G. M., Mirtsos, C., Sasaki, T., Ruland J., Penninger J. M., Siderovski D. P., and Mak, T. W. (1998). Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell*, 95(1), 29-39.
35. Berenjeno, I. M., Guillermet-Guibert, J., Pearce, W., Gray, A., Fleming, S., and Vanhaesebroeck, B. (2012). Both p110 α and p110 β isoforms of PI3K can modulate the impact of loss-of-function of the PTEN tumour suppressor. *Biochemical Journal*, 442(1), 151-159.
36. Zhang, D. T., Shi, J. G., Liu, Y., and Jiang, H. M. (2014). The prognostic value of Smad4 mRNA in patients with prostate cancer. *Tumor Biology*, 35(4), 3333-3337.
37. Vocke, C. D., Pozzatti, R. O., Bostwick, D. G., Florence, C. D., Jennings, S. B., Strup, S. E., Duray, P.H., Liotta, L.A., Emmert-Buck, M. R., and Linehan, W. M. (1996). Analysis of 99 microdissected prostate carcinomas reveals a high frequency of allelic loss on chromosome 8p12–21. *Cancer Research*, 56(10), 2411-2416.
38. Emmert-Buck, M. R., Vocke, C. D., Pozzatti, R. O., Duray, P. H., Jennings, S. B., Florence, C. D., Zhuang, Z., Bostwick, D. G., Liotta, L. A., and Linehan, W. M. (1995). Allelic loss on chromosome 8p12–21 in microdissected prostatic intraepithelial neoplasia. *Cancer Research*, 55(14), 2959-2962.
39. Abate-Shen, C., Shen, M. M., and Gelmann, E. (2008). Integrating differentiation and cancer: the Nkx3. 1 homeobox gene in prostate organogenesis and carcinogenesis. *Differentiation*, 76(6), 717-727.
40. Kim, M. J., Cardiff, R. D., Desai, N., Banach-Petrosky, W. A., Parsons, R., Shen, M. M., and Abate-Shen, C. (2002). Cooperativity of Nkx3. 1 and Pten loss of function in a mouse model of prostate carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(5), 2884-2889.
41. Tomlins, S. A., Rhodes, D. R., Perner, S., Dhanasekaran, S. M., Mehra, R., Sun, X. W., Cao X., Tchinda J., Kuefer R., Lee C., Montie J. E., Shah R. B., Pienta K. J., Rubin M. A., and Chinnaiyan, A. M. (2005). Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science*, 310(5748), 644-648.
42. Tomlins, S. A., Laxman, B., Varambally, S., Cao, X., Yu, J., Helgeson, B. E., Cao Q., Prensner J. R., Rubin M. A., Shah R. B., Mehra R., and Chinnaiyan, A. M. (2008). Role of the TMPRSS2-ERG gene fusion in prostate cancer. *Neoplasia*, 10(2), 177-189.
43. Deramaudt, T. B., Remy, P., and Stiegler, P. (2001). Identification of interaction partners for two closely-related members of the ETS protein family, FLI and ERG. *Gene*, 274(1-2), 169-177.

44. Vanaja, D. K., Cheville, J. C., Iturria, S. J., and Young, C. Y. (2003). Transcriptional silencing of zinc finger protein 185 identified by expression profiling is associated with prostate cancer progression. *Cancer Research*, 63(14), 3877-3882.
45. Carver, B. S., Tran, J., Chen, Z., Carracedo-Perez, A., Alimonti, A., Nardella, C., Gopalan, A., Scardino, P. T., Cordon-Cardo, C., Gerald, W., Pandolfi, P. P., and Pandolfi, P. P. (2009). ETS rearrangements and prostate cancer initiation. *Nature*, 457(7231), E1-E1.
46. Häggblöf, C., Hammarsten, P., Strömvall, K., Egevad, L., Josefsson, A., Stattin, P., Granfors, T., and Bergh, A. (2014). TMPRSS2-ERG expression predicts prostate cancer survival and associates with stromal biomarkers. *Plos One*, 9(2), e86824.
47. Fraser, M., Sabelnykova, V. Y., Yamaguchi, T. N., Heisler, L. E., Livingstone, J., Huang, V., Shiah, Y. J., Yousif, F., Lin, X., Masella, A. P., Fox, N. S., Xie, M., Prokopec, S. D., Berlin, A., Lalonde, E., Ahmed, M., Trudel, D., Luo, X., Beck, T. A., Meng, A., Zhang, J., D'Costa, A., Denroche, R. E., Kong, H., Espiritu, S. M. G., Chua, M. L. K., Wong, A., Chong, T., Sam, M., Johns, J., Timms, L., Buchner, N. B., Orain, M., Picard, V., Hovington, H., Murison, A., Kron, K., Harding, N. J., P'ng, C., Houlahan, K. E., Chu, K. C., Lo, B., Nguyen, F., Li, C. H., Sun, R. X., de Borja, R., Cooper, C., I., Hopkins, J. F., Govind, S., K., Fung, C., Waggott, D., Green, J., Haider, S., Chan-Seng-Yue, M. A., Jung, E., Wang, Z., Bergeron, A., Dal Pra, A., Lacombe, L., Collins, C., Sahinalp, C., Lupien, M., Fleshner, N. E., He, H. H., Fradet, Y., Tetu, B., van der Kwast, T., McPherson, J. D., Bristow, R. G., and Boutros, P. C. (2017). Genomic hallmarks of localized, non-indolent prostate cancer. *Nature*, 541(7637), 359-364.
48. Armenia, J., Wankowicz, S. A., Liu, D., Gao, J., Kundra, R., Reznik, E., Chatila, W. K., Chakravarty, D., Han, G. C., Coleman, I., Montgomery, B., Pritchard, C., Morrissey, C., Barbieri, C. E., Beltran, H., Sboner, A., Zafeiriou, Z., Miranda, S., Bielski, C. M., Penson, A. V., Tolonen, C., Huang, F. W., Robinson, D., Wu, Y. M., Lonigro, R., Garraway, L. A., Demichelis, F., Kantoff, P. W., Taplin, M. E., Abida, W., Taylor, B. S., Scher, H. I., Nelson, P. S., de Bono, J. S., Rubin, M. A., Sawyers, C. L., Chinnaiyan, A. M., PCF/SU2C International Prostate Cancer Dream Team, Schultz, N., and Van Allen, E. M. (2018). The long tail of oncogenic drivers in prostate cancer. *Nature Genetics*, 50(5), 645-651.
49. Rubin, M. A., and Demichelis, F. (2018). The Genomics of Prostate Cancer: emerging understanding with technologic advances. *Modern Pathology*, 31(1), 1-11.
50. Lalonde, E., Ishkanian, A. S., Sykes, J., Fraser, M., Ross-Adams, H., Erho, N., Dunning, M. J., Halim, S., Lamb, A. D., Moon, N. C., Zafarana, G., Warren, A. Y., Meng, X., Thoms, J., Grzadkowski, M. R., Berlin, A., Have, C. L., Ramnarine, V. R., Yao, C. Q., Malloff, C. A., Lam, L. L., Xie, H., Harding, N. J., Mak, D. Y. F., Chu, K. C., Chong, L. C., Sendorek, D. H., P'ng, C., Collins, C. C., Squire, J. A., Jurisica, I., Cooper, C., Eeles, R., Pintilie, M., Dal Pra, A., Davicioni, E., Lam, W., L., Milosevic, M., Neal, D. E., van der Kwast, T., Boutros, P. C., and Bristow, R. G. (2014). Tumour genomic and microenvironmental heterogeneity for integrated prediction of 5-year biochemical recurrence of prostate cancer: a retrospective cohort study. *The Lancet Oncology*, 15(13), 1521-1532.

51. Hieronymus, H., Schultz, N., Gopalan, A., Carver, B. S., Chang, M. T., Xiao, Y., Heguy, A., Huberman, K., Bernstein, M., Assel, M., Murali, R., Vickers, A., Scardino, P. T., Sander, C., Reuter, V., Taylor, B. S., and Sawyers, C. L. (2014). Copy number alteration burden predicts prostate cancer relapse. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(30), 11139-11144.
52. Quigley, D. A., Dang, H. X., Zhao, S. G., Lloyd, P., Aggarwal, R., Alumkal, J. J., Foye, A., Kothari, V., D., Perry, M., Bailey, A. M., Playdle, D., Barnard, T. J., Zhang, L., Zhang, J., Youngren, J. F., Cieslik, M. P., Parolia, A., Beer, T. M., Thomas, G., Chi, K. N., Gleave, M., Lack, N. A., Zoubeidi, A., Reiter, R. E., Rettig, M. B., Witte, O., Ryan, C. J., Fong, L., Kim, W., Friedlander, T., Chou, J., Li, H., Das, R., Li, H., Baygi, R. M., Goodarzi, H., Gilbert, L. A., Lara, J. P. N., Evans, C. P., Goldstein, T. C., Stuart, J. M., Tomlins, S. A., Spratt D. E., Cheetham, R. K., Cheng, D. T., Farh, K., Gehring, J. S., Hakenberg, J., Liao, A., Febbo, P. G., Shon, J., Sickler, B., Batzoglou, S., Knudsen, K. E., He, H. H., Huang, J., Wyatt, A. W., Dehm, S. M., Ashworth, A., Chinnaiyan, A. M., Maher, C. A., Small, E. J., and Feng, F. Y. (2018). Genomic hallmarks and structural variation in metastatic prostate cancer. *Cell*, 174(3), 758-769.
53. Ashton, J., and Bristow, R. (2020). Bad neighbours: hypoxia and genomic instability in prostate cancer. *The British Journal of Radiology*, 93(1115), 20200087.
54. Abida, W., Cyrta, J., Heller, G., Prandi, D., Armenia, J., Coleman, I., Cieslik, M., Benelli, M., Robinson, D., Van Allen, E. M., Sboner, A., Fedrizzi, T., Mosquera, J. M., Robinson, B. D., De Sarkar, N., Kunju, L. P., Tomlins, S., Wu, Y. M., Nava Rodrigues, D., Loda, M., Gopalan, A., Reuter, V. E., Pritchard, C. C., Mateo, J., Bianchini, W., Miranda, S., Carreira, S., Rescigno, P., Filipenko, J., Vinson, J., Montgomery, R. B., Beltran, H., Heath, E. I., Scher, H. I., Kantoff, P. W., Taplin, M. E., Schultz, N., deBono, J. S., Demichelis, F., Nelson, P. S., Rubin, M. A., Chinnaiyan, A. M., and Sawyers, C. L. (2019). Genomic correlates of clinical outcome in advanced prostate cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(23), 11428-11436.
55. Sammon, J. D., Abdollah, F., D'Amico, A., Gettman, M., Haese, A., Suardi, N., Vickers A., and Trinh, Q. D. (2015). Predicting life expectancy in men diagnosed with prostate cancer. *European Urology*, 68(5), 756-765.
56. Konaç, E. ve Sözen, T. (2017). Üroonkolojide Temel Konular, Bölüm 7, İnvazyon ve Metastaz Biyolojisi: Moleküler Bakış Açısıyla Eski Probleme Yaklaşım, *Üroonkoloji Kitabı*, Özen H, Türkeri L. eds., Bölüm 7, Ankara: Pelin Ofset Tipo Matbaacılık, 135-155.
57. Thiery, J. P., and Sleeman, J. P. (2006). Complex networks orchestrate epithelial–mesenchymal transitions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(2), 131-142.
58. Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y., and Nieto, M. A. (2009). Epithelial–mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, 139(5), 871-890.

59. Odero-Marah, V., Hawsawi, O., Henderson, V., and Sweeney, J. (2018). Epithelial-mesenchymal transition (EMT) and prostate cancer. *Cell & Molecular Biology of Prostate Cancer*, 101-110.
60. Radisky, D. C. (2005). Epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Cell Science*, 118(19), 4325-4326.
61. Hugo, H., Ackland, M. L., Blick, T., Lawrence, M. G., Clements, J. A., Williams, E. D., and Thompson, E. W. (2007). Epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transitions in carcinoma progression. *Journal of Cellular Physiology*, 213(2), 374-383.
62. Greenburg, G., and Hay, E. D. (1982). Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. *The Journal of Cell Biology*, 95(1), 333-339.
63. Ding, G., Fang, J., Tong, S., Qu, L., Jiang, H., Ding, Q., and Liu, J. (2015). Over-expression of lipocalin 2 promotes cell migration and invasion through activating ERK signaling to increase SLUG expression in prostate cancer. *The Prostate*, 75(9), 957-968.
64. Gao, F., Al-Azayzih, A., and Somanath, P. R. (2015). Discrete functions of GSK3 α and GSK3 β isoforms in prostate tumor growth and micrometastasis. *Oncotarget*, 6(8), 5947.
65. Cano, A., Pérez-Moreno, M. A., Rodrigo, I., Locascio, A., Blanco, M. J., del Barrio, M. G., Portillo, F., and Nieto, M. A. (2000). The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nature Cell Biology*, 2(2), 76-83.
66. Peinado, H., Olmeda, D., and Cano, A. (2007). Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype?. *Nature Reviews Cancer*, 7(6), 415-428.
67. Smith, B. N., and Odero-Marah, V. A. (2012). The role of Snail in prostate cancer. *Cell Adhesion & Migration*, 6(5), 433-441.
68. Zhau H. E, Odero-Marah V., Lue Hui-Wen, Nomura T., Wang R., Chu G., Liu Z.-R., Zhou B. P., Huang Wen-Chin, Chung L. W. K. (2008). Epithelial to mesenchymal transition (EMT) in human prostate cancer: lessons learned from ARCaP model. *Clinical & Experimental Metastasis*, 25(6), 601.
69. Thakur N., Gudey S., Marcusson A., Fu J., Bergh A., Heldin C., and Landstrom M. (2014) TGF- β -induced invasion of prostate Cancer cells is promoted by c-Jun-dependent transcriptional activation of Snail1. *Cell Cycle*, 13(15):2400–2414.
70. Tu, W. H., Thomas, T. Z., Masumori, N., Bhowmick, N. A., Gorska, A. E., Shyr, Y., Case T., Roberts R. L., Shappell S.B., Moses H. L. and Matusik, R. J. (2003). The loss of TGF- β signaling promotes prostate cancer metastasis. *Neoplasia*, 5(3), 267-277.

71. Cao, Z., and Kyprianou, N. (2015). Mechanisms navigating the TGF- β pathway in prostate cancer. *Asian Journal of Urology*, 2(1), 11-18.
72. Gennigens, C., Menetrier-Caux, C., and Droz, J. P. (2006). Insulin-Like Growth Factor (IGF) family and prostate cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 58(2), 124-145.
73. Graham, T. R., Zhau, H. E., Otero-Marah, V. A., Osunkoya, A. O., Kimbro, K. S., Tighiouart, M., Liu, T., Simons, J. W., and O'Regan, R. M. (2008). Insulin-like growth factor-I-dependent up-regulation of ZEB1 drives epithelial-to-mesenchymal transition in human prostate cancer cells. *Cancer Research*, 68(7), 2479-2488.
74. Di Lorenzo, G., Tortora, G., D'Armiento, F. P., De Rosa, G., Staibano, S., Autorino, R., D'Armiento, M., De Laurentiis, M., De Placido, S., Catalano, G., Bianco, A. R., and Ciardiello, F. (2002). Expression of epidermal growth factor receptor correlates with disease relapse and progression to androgen-independence in human prostate cancer. *Clinical Cancer Research*, 8(11), 3438-3444.
75. Tang, J., Xiao, L., Cui, R., Li, D., Zheng, X., Zhu, L., Sun H., Pan Y., Du Y., and Yu, X. (2016). CX3CL1 increases invasiveness and metastasis by promoting epithelial-to-mesenchymal transition through the TACE/TGF- α /EGFR pathway in hypoxic androgen-independent prostate cancer cells. *Oncology Reports*, 35(2), 1153-1162.
76. Grötzinger, J. (2002). Molecular mechanisms of cytokine receptor activation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1592(3), 215-223.
77. Maruyama I. N. (2014). Mechanisms of activation of receptor tyrosine kinases: monomers or dimers. *Cell*, 3(2):304–330.
78. Hughes, F. J., Turner, W., Belibasakis, G., and Martuscelli, G. (2006). Effects of growth factors and cytokines on osteoblast differentiation. *Periodontology* 2000, 41(1), 48-72.
79. Poniatowski, Ł. A., Wojdasiewicz, P., Gasik, R., and Szukiewicz, D. (2015). Transforming growth factor Beta family: insight into the role of growth factors in regulation of fracture healing biology and potential clinical applications. *Mediators of Inflammation*, 2015, 1-17.
80. Akhurst, R. J., and Derynck, R. (2001). TGF- β signaling in cancer—a double-edged sword. *Trends in Cell Biology*, 11, S44-S51.
81. Xu, J., Lamouille, S., and Derynck, R. (2009). TGF- β -induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Research*, 19(2), 156-172.
82. Cho, K. H., Choi, M. J., Jeong, K. J., Kim, J. J., Hwang, M. H., Shin, S. C., Park, C. G., and Lee, H. Y. (2014). A ROS/STAT3/HIF-1 α signaling cascade mediates EGF-induced TWIST1 expression and prostate cancer cell invasion. *The Prostate*, 74(5), 528-536.
83. Miller J. R. (2002). The Wnts. *Genome Biology*, 3: 1–15.

84. Polakis, P. (2000). Wnt signaling and cancer. *Genes & Development*, 14(15), 1837-1851.
85. Wodarz, A., and Nusse, R. (1998). Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 14(1), 59-88.
86. Dehm, S. M., and Tindall, D. J. (Eds.). (2020). Prostate Cancer: Cellular and Genetic Mechanisms of Disease Development and Progression. *Springer Nature*, 1210, 351-378.
87. Heuberger, J., and Birchmeier, W. (2010). Interplay of cadherin-mediated cell adhesion and canonical Wnt signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(2), a002915.
88. Wu, Z. Q., Li, X. Y., Hu, C. Y., Ford, M., Kleer, C. G., and Weiss, S. J. (2012). Canonical Wnt signaling regulates Slug activity and links epithelial-mesenchymal transition with epigenetic Breast Cancer 1, Early Onset (BRCA1) repression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(41), 16654-16659.
89. Conacci-Sorrell, M., Simcha, I., Ben-Yedidia, T., Blechman, J., Savagner, P., and Ben-Ze'ev, A. (2003). Autoregulation of E-cadherin expression by cadherin-cadherin interactions: the roles of β -catenin signaling, Slug, and MAPK. *The Journal of Cell Biology*, 163(4), 847-857.
90. Howe, L. R., Watanabe, O., Leonard, J., and Brown, A. M. (2003). Twist is up-regulated in response to Wnt1 and inhibits mouse mammary cell differentiation. *Cancer Research*, 63(8), 1906-1913.
91. Jamora, C., DasGupta, R., Kocieniewski, P., and Fuchs, E. (2003). Links between signal transduction, transcription and adhesion in epithelial bud development. *Nature*, 422(6929), 317-322.
92. Yokoyama, N. N., Shao, S., Hoang, B. H., Mercola, D., and Zi, X. (2014). Wnt signaling in castration-resistant prostate cancer: implications for therapy. *American Journal of Clinical and Experimental Urology*, 2(1), 27.
93. Kypta, R. M., and Waxman, J. (2012). Wnt/ β -catenin signalling in prostate cancer. *Nature Reviews Urology*, 9(8), 418-428.
94. Murillo-Garzón, V., and Kypta, R. (2017). WNT signalling in prostate cancer. *Nature Reviews Urology*, 14(11), 683-696.
95. Thiele, S., Rauner, M., Goettsch, C., Rachner, T. D., Benad, P., Fuessel, S., Erdmann K., Hamann C., Baretton G.B., Wirth M. P., Jakob F., and Hofbauer, L. C. (2011). Expression profile of WNT molecules in prostate cancer and its regulation by aminobisphosphonates. *Journal of Cellular Biochemistry*, 112(6), 1593-1600.
96. Zhu, H., Mazor, M., Kawano, Y., Walker, M. M., Leung, H. Y., Armstrong, K., Waxman J. and Kypta, R. M. (2004). Analysis of Wnt gene expression in prostate

- cancer: mutual inhibition by WNT11 and the androgen receptor. *Cancer Research*, 64(21), 7918-7926.
97. Chen, G., Shukeir, N., Potti, A., Sircar, K., Aprikian, A., Goltzman, D., and Rabbani, S. A. (2004). Up-regulation of Wnt-1 and β -catenin production in patients with advanced metastatic prostate carcinoma: Potential pathogenetic and prognostic implications. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 101(6), 1345-1356.
 98. Wan, X., Liu, J., Lu, J. F., Tzelepi, V., Yang, J., Starbuck, M. W., Diao, L., Wang, J., Efsthathiou, E., Vazquez, E. S., Troncoso, P., Maity, S. N. and Navone, N. M. (2012). Activation of β -catenin signaling in androgen receptor-negative prostate cancer cells. *Clinical Cancer Research*, 18(3), 726-736.
 99. de la Taille, A., Rubin, M. A., Chen, M. W., Vacherot, F., de Medina, S. G. D., Burchardt, M., Buttyan, R., and Chopin, D. (2003). β -Catenin-related anomalies in apoptosis-resistant and hormone-refractory prostate cancer cells. *Clinical Cancer Research*, 9(5), 1801-1807.
 100. Giancotti, F. G. (2013). Mechanisms governing metastatic dormancy and reactivation. *Cell*, 155(4), 750-764.
 101. Croucher, P. I., McDonald, M. M., and Martin, T. J. (2016). Bone metastasis: the importance of the neighbourhood. *Nature Reviews Cancer*, 16(6), 373-386.
 102. Lam, E. W. F., Brosens, J. J., Gomes, A. R., and Koo, C. Y. (2013). Forkhead box proteins: tuning forks for transcriptional harmony. *Nature Reviews Cancer*, 13(7), 482-495.
 103. Weigel, D., Jürgens, G., Küttner, F., Seifert, E., and Jäckle, H. (1989). The homeotic gene fork head encodes a nuclear protein and is expressed in the terminal regions of the *Drosophila* embryo. *Cell*, 57(4), 645-658.
 104. Golson, M. L., and Kaestner, K. H. (2016). Fox transcription factors: from development to disease. *Development*, 143(24), 4558-4570.
 105. Lai, E., Prezioso, V. R., Smith, E., Litvin, O., Costa, R. H., and Darnell, J. E. (1990). HNF-3A, a hepatocyte-enriched transcription factor of novel structure is regulated transcriptionally. *Genes & Development*, 4(8), 1427-1436.
 106. Benayoun, B. A., Caburet, S., and Veitia, R. A. (2011). Forkhead transcription factors: key players in health and disease. *Trends in Genetics*, 27(6), 224-232.
 107. Almeida, M., Han, L., Martin-Millan, M., O'Brien, C. A., and Manolagas, S. C. (2007). Oxidative stress antagonizes Wnt signaling in osteoblast precursors by diverting β -catenin from T cell factor-to forkhead box O-mediated transcription. *Journal of Biological Chemistry*, 282(37), 27298-27305.
 108. Brenkman, A. B., van den Broek, N. J., de Keizer, P. L., van Gent, D. C., and Burgering, B. M. (2010). The DNA damage repair protein Ku70 interacts with

- FOXO4 to coordinate a conserved cellular stress response. *The FASEB Journal*, 24(11), 4271-4280.
109. Hannehalli, S., and Kaestner, K. H. (2009). The evolution of Fox genes and their role in development and disease. *Nature Reviews Genetics*, 10(4), 233-240.
 110. Katoh, M., and Katoh, M. (2004). Human FOX gene family. *International Journal of Oncology*, 25(5), 1495-1500.
 111. Shimeld, S. M., Degnan, B., and Luke, G. N. (2010). Evolutionary genomics of the Fox genes: origin of gene families and the ancestry of gene clusters. *Genomics*, 95(5), 256-260.
 112. Nakagawa, S., Gisselbrecht, S. S., Rogers, J. M., Hartl, D. L., and Bulyk, M. L. (2013). DNA-binding specificity changes in the evolution of forkhead transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(30), 12349-12354.
 113. Gomez, I. G., and Duffield, J. S. (2014). The FOXD1 lineage of kidney perivascular cells and myofibroblasts: functions and responses to injury. *Kidney International Supplements*, 4(1), 26-33.
 114. Donaldson, L. W., Petersen, J. M., Graves, B. J., and McIntosh, L. P. (1994). Secondary structure of the ETS domain places murine Ets-1 in the superfamily of winged helix-turn-helix DNA-binding proteins. *Biochemistry*, 33(46), 13509-13516.
 115. Quintero-Ronderos, P., and Laissue, P. (2018). The multisystemic functions of FOXD1 in development and disease. *Journal of Molecular Medicine*, 96(8), 725-739.
 116. Fetting, J. L., Guay, J. A., Karolak, M. J., Iozzo, R. V., Adams, D. C., Maridas, D. E., Brown, A. C., and Oxburgh, L. (2014). FOXD1 promotes nephron progenitor differentiation by repressing decorin in the embryonic kidney. *Development*, 141(1), 17-27.
 117. Koga, M., Matsuda, M., Kawamura, T., Sogo, T., Shigeno, A., Nishida, E., and Ebisuya, M. (2014). Foxd1 is a mediator and indicator of the cell reprogramming process. *Nature Communications*, 5(1), 1-9.
 118. van der Heul-Nieuwenhuijsen, L., Dits, N. F., and Jenster, G. (2009). Gene expression of forkhead transcription factors in the normal and diseased human prostate. *Cancer Related Gene Expression in The Human Prostate Zones*, 41.
 119. Zhao, Y. F., Zhao, J. Y., Yue, H., Hu, K. S., Shen, H., Guo, Z. G., and Su, X. J. (2015). FOXD1 promotes breast cancer proliferation and chemotherapeutic drug resistance by targeting p27. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 456(1), 232-237.
 120. Nakayama, S., Soejima, K., Yasuda, H., Yoda, S., Satomi, R., Ikemura, S., Terai, H., Sato, T., Yamaguchi, N., Hamamoto, J., Arai, D., Ishioka, K., Ohgino, K., Naoki K., and Betsuyaku, T. (2015). FOXD1 expression is associated with poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Anticancer Research*, 35(1), 261-268.

121. Li, D., Fan, S., Yu, F., Zhu, X., Song, Y., Ye, M., Fan, L., and Lv, Z. (2018). FOXD1 promotes cell growth and metastasis by activation of vimentin in NSCLC. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 51(6), 2716-2731.
122. Cheng, P., Wang, J., Waghmare, I., Sartini, S., Coviello, V., Zhang, Z., Kim, S. H., Mohyeldin, A., Pavlyukov, M. S., Minata, M., Valentim, C. L. L., Chhipa, R. R., Bhat, K. P. L., Dasgupta, B., La Motta, C., Kango-Singh, M., and Nakano, I. (2016). FOXD1–ALDH1A3 Signaling Is a Determinant for the Self-Renewal and Tumorigenicity of Mesenchymal Glioma Stem Cells. *Cancer Research*, 76(24), 7219-7230.
123. Pan, F., Li, M., and Chen, W. (2018). FOXD1 predicts prognosis of colorectal cancer patients and promotes colorectal cancer progression via the ERK 1/2 pathway. *American Journal of Translational Research*, 10, 1522–1530.
124. Sun, D. S., Guan, C. H., Wang, W. N., Hu, Z. T., Zhao, Y. Q., and Jiang, X. M. (2021). LncRNA NORAD promotes proliferation, migration and angiogenesis of hepatocellular carcinoma cells through targeting miR-211-5p/FOXD1/VEGF-A axis. *Microvascular Research*, 134, 104120.
125. Zhang, D., Zhang, Y., and Sun, X. (2021). LINC01133 promotes the progression of cervical cancer via regulating miR-30a-5p/FOXD1. *Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology*, 17(3), 253-263.
126. Wu, L., Liu, Y., Guo, C., and Shao, Y. (2020). LncRNA OIP5-AS1 promotes the malignancy of pancreatic ductal adenocarcinoma via regulating miR-429/FOXD1/ERK pathway. *Cancer Cell International*, 20(1), 1-13.
127. Bai, J., Luo, Y., and Zhang, S. (2020). Microarray data analysis reveals gene expression changes in response to ionizing radiation in MCF7 human breast cancer cells. *Hereditas*, 157(1), 1-8.
128. Lam, J. K., Chow, M. Y., Zhang, Y., and Leung, S. W. (2015). siRNA versus miRNA as therapeutics for gene silencing. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 4, e252.
129. Napoli, C., Lemieux, C., and Jorgensen, R. (1990). Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *The Plant Cell*, 2(4), 279-289.
130. Guo, S., and Kemphues, K. J. (1995). par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell*, 81(4), 611-620.
131. Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., and Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669), 806-811.
132. Hamilton, A. J., and Baulcombe, D. C. (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*, 286(5441), 950-952.

133. Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A., and Bartel, D. P. (2000). RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*, 101(1), 25-33.
134. Elbashir, S. M., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001). RNA interference is mediated by 21-and 22-nucleotide RNAs. *Genes & Development*, 15(2), 188-200.
135. Setten, R. L., Rossi, J. J., and Han, S. P. (2019). The current state and future directions of RNAi-based therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*, 18(6), 421-446.
136. Obbard, D. J., Gordon, K. H., Buck, A. H., and Jiggins, F. M. (2009). The evolution of RNAi as a defence against viruses and transposable elements. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1513), 99-115.
137. Kim, V. N., Han, J., and Siomi, M. C. (2009). Biogenesis of small RNAs in animals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(2), 126-139.
138. Moazed D. (2009). Small RNAs in transcriptional gene silencing and genome defence. *Nature*, 457:413–20.
139. Sioud, M. (2011). Promises and challenges in developing RNAi as a research tool and therapy. *RNA*, 173-187.
140. Van den Boorn, J. G., Schlee, M., Coch, C., and Hartmann, G. (2011). SiRNA delivery with exosome nanoparticles. *Nature Biotechnology*, 29(4), 325-326.
141. Sioud, M. (2015). RNA interference: mechanisms, technical challenges, and therapeutic opportunities. *RNA Interference*, 1-15.
142. Ozcan, G., Ozpolat, B., Coleman, R. L., Sood, A. K., and Lopez-Berestein, G. (2015). Preclinical and clinical development of siRNA-based therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 87, 108-119.
143. Wood, H. (2018). FDA approves patisiran to treat hereditary transthyretin amyloidosis. *Nature Reviews. Neurology*, 14(10), 570-570.
144. Scott, L. J. (2020). Givosiran: first approval. *Drugs*, 80(3), 335-339.
145. Zhang, M. M., Bahal, R., Rasmussen, T. P., Manautou, J. E., and Zhong, X. B. (2021). The growth of siRNA-based therapeutics: Updated clinical studies. *Biochemical Pharmacology*, 189, 114432.
146. Adams, D., Gonzalez-Duarte, A., O’Riordan, W. D., Yang, C. C., Ueda, M., Kristen, A. V., Tournev, I., Schmidt, H. H., Coelho, T., Berk, J. L., Lin, K. P., Vita, G., Attarian, S., Planté-Bordeneuve, V., Mezei, M. M., Campistol, J. M., Buades, J., Brannagan, T. H., Kim, B. J., Oh, J., Parman, Y., Sekijima, Y., Hawkins, P. N., Solomon, S. D., Polydefkis, M., Dyck, P. J., Gandhi, P. J., Goyal, S., Chen, J., Strahs, A. L., Nochur, S. V., Sweetser, M. T., Garg, P. P., Vaishnaw, A. K., Gollob, J. A., and Suhr, O. B. (2018). Patisiran, an RNAi therapeutic, for hereditary transthyretin amyloidosis. *New England Journal of Medicine*, 379(1), 11-21.

147. Ando, Y., Coelho, T., Berk, J. L., Cruz, M. W., Ericzon, B. G., Ikeda, S. I., Lewis, W. D., Obici, L., Planté-Bordeneuve, V., Rapezzi, C., Said, G., and Salvi, F. (2013). Guideline of transthyretin-related hereditary amyloidosis for clinicians. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 8(1), 1-18.
148. Conceição, I., González-Duarte, A., Obici, L., Schmidt, H. H. J., Simoneau, D., Ong, M. L., and Amass, L. (2016). “Red-flag” symptom clusters in transthyretin familial amyloid polyneuropathy. *Journal of the Peripheral Nervous System*, 21(1), 5-9.
149. Gertz, M. A. (2017). Hereditary ATTR amyloidosis: burden of illness and diagnostic challenges. *The American Journal of Managed Care*, 23(7 Suppl), S107-S112.
150. Johnson, S. M., Connelly, S., Fearn, C., Powers, E. T., and Kelly, J. W. (2012). The transthyretin amyloidoses: from delineating the molecular mechanism of aggregation linked to pathology to a regulatory-agency-approved drug. *Journal of Molecular Biology*, 421(2-3), 185-203.
151. Saw, P. E., and Song, E. W. (2020). siRNA therapeutics: a clinical reality. *Science China Life Sciences*, 63(4), 485-500.
152. Whatley, S. D., and Badminton, M. N. (2019). Acute intermittent porphyria. *Gene Review*.
153. Anderson, K. E. (2019). Acute hepatic porphyrias: current diagnosis & management. *Molecular Genetics and Metabolism*, 128(3), 219-227.
154. Besur, S., Hou, W., Schmeltzer, P., and Bonkovsky, H. L. (2014). Clinically important features of porphyrin and heme metabolism and the porphyrias. *Metabolites*, 4(4), 977-1006.
155. Pallet, N., Karras, A., Thervet, E., Gouya, L., Karim, Z., and Puy, H. (2018). Porphyria and kidney diseases. *Clinical Kidney Journal*, 11(2), 191-197.
156. Agarwal, S., Simon, A. R., Goel, V., Habtemariam, B. A., Clausen, V. A., Kim, J. B., and Robbie, G. J. (2020). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the small interfering ribonucleic acid, givosiran, in patients with acute hepatic porphyria. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 108(1), 63-72.
157. Harambat, J., Fargue, S., Bacchetta, J., Acquaviva, C., and Cochat, P. (2011). Primary hyperoxaluria. *International Journal of Nephrology*, 2011.
158. Dindo, M., Conter, C., Oppici, E., Ceccarelli, V., Marinucci, L., and Cellini, B. (2019). Molecular basis of primary hyperoxaluria: clues to innovative treatments. *Urolithiasis*, 47(1), 67-78.
159. Kletzmayer, A., Ivarsson, M. E., and Leroux, J. C. (2020). Investigational therapies for primary hyperoxaluria. *Bioconjugate Chemistry*, 31(7), 1696-1707.
160. Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25(4), 402-408.

161. Mimeault, M., and Batra, S. K. (2005). Recent advances on multiple tumorigenic cascades involved in prostatic cancer progression and targeting therapies. *Carcinogenesis*, 27(1), 1-22.
162. Thiery, J. P. (2003). Epithelial–mesenchymal transitions in development and pathologies. *Current Opinion in Cell Biology*, 15(6), 740-746.
163. Yang, J., and Weinberg, R. A. (2008). Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Developmental Cell*, 14(6), 818-829.
164. Zhang, J., and Ma, L. (2012). MicroRNA control of epithelial–mesenchymal transition and metastasis. *Cancer and Metastasis Reviews*, 31(3), 653-662.
165. Ye, X., and Weinberg, R. A. (2015). Epithelial–mesenchymal plasticity: a central regulator of cancer progression. *Trends in Cell Biology*, 25(11), 675-686.
166. Herman, L., Todeschini, A. L., and Veitia, R. A. (2021). Forkhead transcription factors in health and disease. *Trends in Genetics*, 37(5), 460-475.
167. Myatt, S. S., and Lam, E. W. F. (2007). The emerging roles of forkhead box (Fox) proteins in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 7(11), 847-859.
168. Koo, C. Y., Muir, K. W., and Lam, E. W. F. (2012). FOXM1: From cancer initiation to progression and treatment. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1819(1), 28-37.
169. Bach, D. H., Long, N. P., Luu, T. T. T., Anh, N. H., Kwon, S. W., and Lee, S. K. (2018). The dominant role of forkhead box proteins in cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(10), 3279.
170. Laissue, P. (2019). The forkhead-box family of transcription factors: key molecular players in colorectal cancer pathogenesis. *Molecular Cancer*, 18(1), 1-13.
171. Hatini, V., Tao, W., and Lai, E. (1994). Expression of winged helix genes, BF-1 and BF-2, define adjacent domains within the developing forebrain and retina. *Journal of Neurobiology*, 25(10), 1293-1309.
172. Levinson, R. S., Batourina, E., Choi, C., Vorontchikhina, M., Kitajewski, J., and Mendelsohn, C. L. (2005). Foxd1-dependent signals control cellularity in the renal capsule, a structure required for normal renal development. *Development*, 529-539.
173. Gao, Y. F., Zhu, T., Mao, X. Y., Mao, C. X., Li, L., Yin, J. Y., Zhou, H. H., and Liu, Z. Q. (2017). Silencing of Forkhead box D1 inhibits proliferation and migration in glioma cells. *Oncology Reports*, 37(2), 1196-1202.
174. Han, T., Lin, J., Wang, Y., Fan, Q., Sun, H., Tao, Y., and Sun, C. (2018). Forkhead box D1 promotes proliferation and suppresses apoptosis via regulating polo-like kinase 2 in colorectal cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 103, 1369-1375.

- 175.Chen, Y., Liang, W., Liu, K., and Shang, Z. (2021). FOXD1 promotes EMT and cell stemness of oral squamous cell carcinoma by transcriptional activation of SNAI2. *Cell & Bioscience*, 11(1), 1-14.
- 176.Chen, Y., Liang, W., Liu, K., and Shang, Z. (2021). FOXD1 Promotes EMT and Cell Stemness of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma by Transcriptional Activation of SNAI2. *Research Square*, 1-20.
- 177.Kalluri, R., and Neilson, E. G. (2003). Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *The Journal of Clinical Investigation*, 112(12), 1776-1784.
- 178.Rastaldi, M. P. (2006). Epithelial-mesenchymal transition and its implications for the development of renal tubulointerstitial fibrosis. *Journal of Nephrology*, 19(4), 407-412.
- 179.Thiery, J. P. (2002). Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature Reviews Cancer*, 2(6), 442-454.
- 180.Vernon, A. E., and LaBonne, C. (2004). Tumor metastasis: a new twist on epithelial–mesenchymal transitions. *Current Biology*, 14(17), R719-R721.
- 181.Lee, J. M., Dedhar, S., Kalluri, R., and Thompson, E. W. (2006). The epithelial–mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *Journal of Cell Biology*, 172(7), 973-981.
- 182.Kalluri, R., and Weinberg, R. A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of Clinical Investigation*, 119(6), 1420-1428.
- 183.Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674.
- 184.Kang, Y., and Massagué, J. (2004). Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis. *Cell*, 118(3), 277-279.
- 185.Valastyan, S., and Weinberg, R. A. (2011). Tumor metastasis: Molecular insights and evolving paradigms. *Cell* 147, 275–292.
- 186.Bukholm, I. K., Nesland, J. M., and Børresen-Dale, A. L. (2000). Re-expression of E-cadherin, α -catenin and β -catenin, but not of γ -catenin, in metastatic tissue from breast cancer patients. *The Journal of Pathology*, 190(1), 15-19.
- 187.Lou, Y., Preobrazhenska, O., auf dem Keller, U., Sutcliffe, M., Barclay, L., McDonald, P. C., Roskelley, C., Overall, C. M., and Dedhar, S. (2008). Epithelial–mesenchymal transition (EMT) is not sufficient for spontaneous murine breast cancer metastasis. *Developmental Dynamics*, 237(10), 2755-2768.
- 188.Hollestelle, A., Peeters, J. K., Smid, M., Timmermans, M., Verhoog, L. C., Westenend, P. J., Heine, A. A. J., Chan, A., Sieuwerts, A. M., Wiemer, E. A. C., Klijn, J. G. M., van der Spek, P., J., Foekens, J. A., Schutte, M., den Bakker, M., A., and Martens, J. W. (2013). Loss of E-cadherin is not a necessity for epithelial to

- mesenchymal transition in human breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 138(1), 47-57.
189. Querzoli, P., Coradini, D., Pedriali, M., Boracchi, P., Ambrogi, F., Raimondi, E., Sorda La R., Lattanzio R., Rinaldi R., Lunardi M., Frasson C., Modesti F., Ferretti S., Piantelli M., Iacobelli S., Biganzoli E., Nenci I., and Alberti, S. (2010). An immunohistochemically positive E-cadherin status is not always predictive for a good prognosis in human breast cancer. *British Journal of Cancer*, 103(12), 1835-1839.
 190. Shamir, E. R., Pappalardo, E., Jorgens, D. M., Coutinho, K., Tsai, W. T., Aziz, K., Auer M., Tran P. T., Bader T. J., and Ewald, A. J. (2014). Twist1-induced dissemination preserves epithelial identity and requires E-cadherin. *Journal of Cell Biology*, 204(5), 839-856.
 191. Rodriguez, F. J., Lewis-Tuffin, L. J., and Anastasiadis, P. Z. (2012). E-cadherin's dark side: possible role in tumor progression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1826(1), 23-31.
 192. Hazan, R. B., Qiao, R. U. I., Keren, R., Badano, I., and Suyama, K. (2004). Cadherin switch in tumor progression. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1014(1), 155-163.
 193. Nieman, M. T., Prudoff, R. S., Johnson, K. R., and Wheelock, M. J. (1999). N-cadherin promotes motility in human breast cancer cells regardless of their E-cadherin expression. *Journal of Cell Biology*, 147(3), 631-644.
 194. Hazan, R. B., Phillips, G. R., Qiao, R. F., Norton, L., and Aaronson, S. A. (2000). Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis. *Journal of Cell Biology*, 148(4), 779-790.
 195. Yu, X., Wang, Y., Jiang, M., Bierie, B., Roy-Burman, P., Shen, M. M., Taketo M. M. , Wills M. , and Matusik, R. J. (2009). Activation of β -Catenin in mouse prostate causes HGPIN and continuous prostate growth after castration. *The Prostate*, 69(3), 249-262.
 196. Chesire, D. R., Ewing, C. M., Sauvageot, J., Bova, G. S., and Isaacs, W. B. (2000). Detection and analysis of β -catenin mutations in prostate cancer. *The Prostate*, 45(4), 323-334.
 197. Terry S., Yang X., Chen M. W., Vacherot F., and Buttyan R. (2006). Multifaceted interaction between the androgen and Wnt signaling pathways and the implication for prostate cancer. *Journal of Cell Biochemistry*, 99(2), 402-410.
 198. Nusse, R., and Clevers, H. (2017). Wnt/ β -catenin signaling, disease, and emerging therapeutic modalities. *Cell*, 169(6), 985-999.
 199. Moparthi, L., Pizzolato, G., and Koch, S. (2019). Wnt activator FOXB2 drives the neuroendocrine differentiation of prostate cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(44), 22189-22195.

- 200.Koch, S. (2021). Regulation of Wnt Signaling by FOX Transcription Factors in Cancer. *Cancers*, 13(14), 3446.
- 201.Drobnjak, M., Osman, I., Scher, H. I., Fazzari, M., and Cordon-Cardo, C. (2000). Overexpression of cyclin D1 is associated with metastatic prostate cancer to bone. *Clinical Cancer Research*, 6(5), 1891-1895.
- 202.Schaeffer, D., Somarelli, J. A., Hanna, G., Palmer, G. M., and Garcia-Blanco, M. A. (2014). Cellular migration and invasion uncoupled: increased migration is not an inexorable consequence of epithelial-to-mesenchymal transition. *Molecular and Cellular Biology*, 34(18), 3486-3499.
- 203.Kang, R., Zhao, S., Liu, L., Li, F., Li, E., Luo, L., Xu, L., Wan, S., and Zhao, Z. (2016). Knockdown of PSCA induces EMT and decreases metastatic potentials of the human prostate cancer DU145 cells. *Cancer Cell International*, 16(1), 1-12.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : DÖNMEZ, Çiğdem
Uyruğu : T.C.



Eğitim Derecesi

Okul/Program

Mezuniyet yılı

Doktora

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri
Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik
Anabilim Dalı

Devam Ediyor

Bütünleşik Doktora

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri
Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı

2018

Yüksek Lisans

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri
Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik
Anabilim Dalı

2016

Lisans

Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi
Biyoloji Bölümü

2009

İş Deneyimi, Yıl

Çalıştığı Yer

Görev

2013- devam ediyor

Gazi Üniversitesi Tıbbi Biyoloji
ve Genetik Anabilim Dalı

Araştırma Görevlisi

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayınlanan Makaleler

1. **Donmez, C.**, Konac, E. (2020). Aberrant Expression of Forkhead Box Proteins in Prostate Cancer Development. Gazi Medical Journal. 31(3), 460-464.
2. **Donmez, C.**, Konac, E., Aydogan, B. T., Bilen, C. Y. (2016). Might E-cadherin promoter polymorphisms of rs16260 and rs5030625 associate with the risk of nephrolithiasis?. SpringerPlus, 5(1), 1673.
3. Kiliccioglu, I., Konac, E., Albayrak, G., **Donmez, C.**, Bilen, C. Y. (2015). Combination of Metformin and Dichloroacetate Inhibits Proliferation and Induce Intrinsic Pathway of Apoptosis in PC-3 Human Prostate Cancer Cells. Gazi Medical Journal, 26(4A).

Ulusal Hakemli Dergilerde Yayınlanan Makaleler

1. Aydin, S. S., Kiliç, Z., **Dönmez, Ç.**, Altunkaynak, E., & Aras, S. (2015). Assessment of genotoxicity induced by lead pollution in tomato (*Lycopersicum esculentum*) by molecular and population markers. BioDi Con, 8(1), 83-89.

Ulusal/Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitaplarında Basılan Bildiriler

1. **Dönmez Ç.**, Gökçe Gündüzer, E., Başaran, E., Aras S. Gene Expression Analysis of bZIP Gene in Some Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Varieties in Response to Cold Stress. 5-8 September 2018. 6th International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey. pt 043. İzmir.
2. **Dönmez Ç.**, Başaran, E., Gökçe Gündüzer, E., Aras S. Analyzing the gene expression level of WRKY genes under cold stress in Sunflower (*Heliantus annuus* L.). 5-8 September 2018. 6th International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey. pt 48. İzmir.
3. Başaran, E., **Dönmez Ç.**, Gökçe Gündüzer, E., Aras S. Determination of mRNA Expression Levels of Cell Cycle Gene Retinoblastoma (Rb) in Sunflower (*Helianthus*

annuus L.) under Salinity Stress. 5-8 September 2018. 6th International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey. pt 64. İzmir.

4. Başaran, E., Gökçe Gündüzer, E., **Dönmez Ç.**, Aras S. Assessment of mRNA Expression Levels of E2F Transcription Factor Gene in Sunflower (*Helianthus annuus* L.) under Cr (VI) Stress. 5-8 September 2018. 6th International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey. pt 72. İzmir.
5. **Dönmez Ç.**, Gökçe Gündüzer, E., Aras S. The activity of some antioxidant enzymes in three sunflower cultivars related to cold stress. 1st International Eurasian Conference on Science, Engineering and Technology (EurasianSciEnTech) (Paper ID:13). 2018. Ankara.
6. **Dönmez Ç.**, Gökçe Gündüzer, E., Başaran, E., Aras S. Expression analysis of NAC gene under cold stress condition in sunflower (*Helianthus annuus* L.). 1st International Eurasian Conference on Science, Engineering and Technology (EurasianSciEnTech) (Paper ID:13). 2018. Ankara.
7. Safi Öz Z., Başaran A., **Dönmez Ç.**, Köktürk F. Romatoid artritli hastaların yanak (bukkal) epiteli hücre profili. 25. Ulusal Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Kongresi, 22 - 26 Nisan 2015, Antalya.

Sözlü Bildiriler

1. **Dönmez, Ç.**, Konac, E. İnsan prostat kanseri hücrelerinde FOXD1 geni susturulmasının proliferasyon, migrasyon, invazyon ve epitelyal-mezenkimal transizyon üzerindeki etkileri. XVII. Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Ekim 2021.
2. **Donmez, C.**, Konac, E., Aydoğan, B. T., Bilen, C. Y. E-Kaderin Promotör Polimorfizmleri rs16260 ve rs5030625 ile Nefrolitiazis Riski Arasında İlişki Olabilir mi? Ürolojik Cerrahi Derneği - 3. Ulusal Ürolojik Cerrahi Kongresi, Kasım 2016.

Uluslararası Kitaplarda Bölümler

1. Aras, S., Aydın, S. S., Körpe, D. A., & **Dönmez, Ç.** (2012). Comparative genotoxicity analysis of heavy metal contamination in higher plants. *Ecotoxicology*, 107-124.

Görev Aldığı Projeler

1. FOXD1 Transkripsiyon Faktörü Susturulmasının Prostat Kanseri Hücrelerinde Epitelyal-Mezenkimal Geçiş Üzerine Etkilerinin Araştırılması. Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi, 2021, Proje No: 01/2019-52, Araştırmacı, Tamamlandı.
2. E-Kaderin Geni (CDH1) -160C>A (rs16260) Polimorfizminin Böbrek Taşı Oluşumundaki Rolü. Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi, 2015, Proje No: 01/2015-13, Araştırmacı, Tamamlandı.
3. Dünya *Nigella L.* (Ranunculaceae) Türleri Üzerinde Moleküler Biyolojik Araştırmalar. Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi, 2014, Proje No: 11B4240004, Araştırmacı, Tamamlandı.
4. Türkiye'de yayılış gösteren *Usnea* cinsinin revizyonu. Tübitak (1001), 2014, Tübitak Proje No: 210T022, Bursiyer Öğrenci, Tamamlandı.

Ödüller

1. E-Kaderin Promotör Polimorfizmleri rs16260 ve rs5030625 ile Nefrolitiazis Riski Arasında İlişki Olabilir mi? Ürolojik Cerrahi Derneği - 3. Ulusal Ürolojik Cerrahi Kongresi, Kasım 2016, **En İyi Sözlü Sunum İkincilik Ödülü.**



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR...

