



**PROSTAT KANSERLERİNDE *GADD45* METİLASYON DÜZEYİNİN
YÜKSEK ÇÖZÜNÜRLÜKLÜ ERİME ANALİZİ İLE BELİRLENMESİ
VE APOPTOZ İLE OLASI KORELASYONUN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Özge CAN

**Mayıs 2013
DENİZLİ**

**PROSTAT KANSERLERİNDE *GADD45* METİLASYON DÜZEYİNİN
YÜKSEK ÇÖZÜNÜRLÜKLÜ ERİME ANALİZİ İLE BELİRLENMESİ
VE APOPTOZ İLE OLASI KORELASYONUN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Pamukkale Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yüksek Lisans Tezi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı**


Özge CAN


Danışman: Doç.Dr. Vildan CANER


**Mayıs, 2013
DENİZLİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAY FORMU

Özge CAN tarafından, Doç. Dr. Vildan CANER yönetiminde hazırlanan “**Prostat Kanserlerinde GADD45y Metilasyon Düzeyinin Yüksek Çözünürlüklü Erime Analizi İle Belirlenmesi ve Apoptoz ile Olası Korelasyonun Değerlendirilmesi**” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Zeki TOPÇU
Jüri Başkanı


Prof. Dr. Gülseren BAĞCI
Jüri Üyesi


Doç. Dr. Vildan CANER
Jüri Üyesi (Danışman)

Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 21./06/19 tarih ve 13/11-5 sayılı kararıyla onaylanmıştır.


Prof. Dr. Z. Melek BOR KÜÇÜKATAY
Müdür

TEŐEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim ve tez çalışmam süresince bana maddi ve manevi her türlü desteği sağlayan, engin bilgilerini ve yardımlarını esirgemeyen değerli tez danışman hocam Doç. Dr. Vildan CANER başta olmak üzere; bu tez çalışmamda kullandığım materyallerin temin edilmesinde ve analizlerinde sonsuz yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Nilay ŐEN TÜRK'e ve bu süreçte çalışmalarımı destekleyen Anabilim Dalı başkanımız Prof. Dr. Gülseren BAĞCI'ya; içten yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım Cansu BARIŐ, Levent ELMAS, Buket ER'e; tez projemi destekleyen Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne; tüm eğitim hayatım boyunca her koşulda yanımda olan aileme ve katkıları geçen diğer tüm arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Bu tezin tasarımı, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

İmza :

Öğrenci Adı Soyadı : Özge CAN

ÖZET

PROSTAT KANSERLERİNDE *GADD45 γ* METİLASYON DÜZEYİNİN YÜKSEK ÇÖZÜNÜRLÜKLÜ ERİME ANALİZİ İLE BELİRLENMESİ VE APOPTOZ İLE OLASI KORELASYONUN DEĞERLENDİRİLMESİ

CAN, Özge

Yüksek Lisans Tezi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Yöneticisi: Doç. Dr. Vildan CANER

Mayıs 2013, 104 sayfa

Prostat kanseri tüm dünyada erkeklerde en yaygın tanı alan kanser türlerinden biridir ve sıklıkla ölümlü sonuçlanmaktadır. Prostat kanserinin patogenezi net olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte, önemli hücresel mekanizmalardaki düzensizlikler hastalığın patogeneziinde rol oynamaktadır. “*Growth Arrest DNA Damage-Inducible 45*” (*GADD45*), bu mekanizmalarda yer alan önemli bir gen ailesidir ve *GADD45 α* , *GADD45 β* , *GADD45 γ* olmak üzere 3 üyeden oluşmaktadır.

Hem hematolojik malignansiler hem de solid tümörlerde *GADD45 γ* ekspresyonunda önemli ölçüde azalma olduğu ve kanserli dokularda *GADD45 γ* metilasyon düzeyinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Ancak, prostat kanserlerinde sözkonusu genin ekspresyon ve metilasyon durumları hakkında detaylı bilgi bulunmamaktadır.

Bu çalışmanın amacı, benign prostat hiperplazi (BPH)’li (60 olgu) ve prostat kanserli (56 olgu) doku örneklerinde *GADD45 γ* ’nın metilasyon ve ekspresyon durumlarını belirlemek, metilasyon ile ekspresyon profili arasındaki korelasyonu değerlendirmek, ve *GADD45 γ* ’nın metilasyon ve ekspresyon profillerinin apoptozla olan ilişkisini belirlemektir.

Çalışma sonucunda literatürle uyumlu olarak, hematolojik malignansilerin aksine diğer solid tümörlerde olduğu gibi prostat kanserlerinde *GADD45 γ* metilasyon sıklığının düşük olduğu, bunun aksine BPH’li doku örneklerinde metilasyon sıklığının daha yüksek olduğu belirlendi ($p=0.000$). Her iki grupta da *GADD45 γ* metilasyonu ve protein ekspresyonu arasında korelasyon yoktu. Bcl-2 ve Bcl-xL ekspresyonu açısından her iki olgu grubu arasında anlamlı fark bulundu (sırası ile $p=0.000$ ve $p=0.003$). Prostat kanserli olgularda *GADD45 γ* ekspresyonunda anlamlı artış gözlenmesine rağmen, *GADD45 γ* ekspresyon durumu ile apoptoz arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı.

Bu çalışmada prostat kanserinde *GADD45 γ* metilasyon sıklığının düşük olduğu, prostat kanserinde apoptoz regülasyonunun çok daha karmaşık bir mekanizma ile sağlandığı ve *GADD45 γ* ’nın tek başına kanser hücrelerini apoptotik sürece yönlendirmediği bulundu.

Anahtar kelimeler: Prostat kanseri, *GADD45 γ* , Bcl-2, Bcl-xL, apoptoz, DNA metilasyonu, HRM

ABSTRACT

DETERMINATION OF *GADD45 γ* METHYLATION BY HIGH RESOLUTION MELTING ANALYSIS IN PROSTATE CANCER AND EVALUATION OF THE POSSIBLE CORRELATION WITH APOPTOSIS

CAN, Ozge

M. Sc. Thesis in Department of Medical Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Vildan CANER

May 2013, 104 pages

Prostate cancer (PCa) is one of the most common cancer type worldwide in men and it often leads to death. It is believed that deregulation of important cellular mechanisms is involved in the pathogenesis of PCa although the exact mechanism of its pathogenesis has not been clearly elucidated. “*Growth Arrest DNA Damage-Inducible 45*” (*GADD45*) is one of the most important gene family in these mechanisms and consists of 3 members: *GADD45 α* , *GADD45 β* , *GADD45 γ* .

It has been reported that there was a significantly reduced expression in *GADD45 γ* and methylation of the gene is present at very high frequencies in both solid tumors and hematological malignencies. But, there is no detailed information on protein expression and methylation profiles of the gene in PCa.

The aims of this study are to detect the methylation and protein expression profiles of *GADD45 γ* in benign prostate hyperplasia (BPH) (60 patients) and PCa (56 patients), to examine the correlation between methylation and protein expression profiles, and also to evaluate whether apoptosis is related to these profiles.

In this study, the methylation frequency for *GADD45 γ* was quite low in PCa compared with BPH (p=0.000). This was consistent with the literature with the reported the frequency of the gene in solid tumors was lower than in hematological malignencies. In both groups, there was no correlation between *GADD45 γ* methylation and protein expression. It was found that there was a significant difference between Bcl-2 and Bcl-x_L expressions in both groups (p=0.000 and p=0.003, respectively). It was not found a significant relation between *GADD45 γ* expression status and apoptosis although *GADD45 γ* expression was higher in PCa than that in BPH.

In summary, we found that the methylation frequency of *GADD45 γ* was not common in PCa, the regulation of apoptotic pathways is more complex than we expected, and *GADD45 γ* is not the only key factor for the cells to direct into the apoptotic process.

Key words: Prostate cancer, *GADD45 γ* , Bcl-2, Bcl-x_L, apoptosis, DNA methylation, HRM

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
İçindekiler.....	IX
Şekiller Dizini.....	XI
Tablolar Dizini.....	XII
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini	XIII
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI.....	4
2.1. Prostat: Anatomik ve Histolojik Yapısı.....	4
2.2. Benign Prostat Hiperplazisi (BPH).....	7
2.3. Prostatik İntraepitelyal Neoplazi (PIN).....	8
2.4. Prostat Kanseri.....	9
2.4.1. Prostat Kanserinde Risk Faktörleri.....	9
2.4.2. Prostat Kanserinin Epidemiyolojisi.....	10
2.4.3. Prostat Kanseri Histolojisi.....	12
2.4.4. Prostat Kanserinde Evreleme.....	13
2.4.5. Prostat Adenokarsinomunda Derecelendirme.....	15
2.4.6. Prostat Kanserinde Prognoz ve Tedavi.....	15
2.4.7. Prostat Karsinogenezi.....	18
2.4.7.1. Kalıtılabilir Faktörler ve Kromozomal Değişimler	18
2.4.7.2. Erken Evrede Gözlenen Değişimler ve Moleküler Mekanizmaları.....	19
2.4.7.3. Progresyonda Gözlenen Değişiklikler ve Moleküler Mekanizmaları.....	21
2.4.7.4. Metastatik Prostat Kanserinde Gözlenen Değişiklikler ve Moleküler Mekanizmaları	25
2.4.7.5. Prostat Kanserinde Androjen Reseptörü (AR) Sinyal İletimi	26
2.4.8. Prostat Kanserinde Gözlenen Epigenetik Mekanizmalar.....	29

2.4.8.1.	DNA Metilasyonu	29
2.4.8.2.	Histon Modifikasyonları	34
2.4.8.3.	Kodlama Yapmayan RNA'lar: miRNA'lar	35
2.5.	<i>GADD45</i> Gen Ailesi	37
2.5.1.	<i>GADD45</i> Gen Ailesi Yapısı ve Üyeleri	37
2.5.2.	<i>GADD45</i> Gen Ailesinin Fonksiyonları	39
3.	MATERYAL ve METOD	43
3.1.	Benign Prostat Hiperplazili Ve Prostat Adenokarsinomlu Olgular	43
3.2.	FFPE Doku Örneklerinden Genomik DNA İzolasyonu	43
3.2.1.	Genomik DNA İzolasyon Protokolü	43
3.2.2.	DNA Örneklerinin Konsantrasyonlarının ve Saflık Derecelerinin Belirlenmesi	45
3.3.	Bisülfid Uygulaması	45
3.3.1.	Ön Hazırlık Aşamaları	46
3.3.2.	Bisülfid Uygulama Protokolü	47
3.4.	Metilasyona Özgün - Yüksek Çözünürlüklü Erime Eğrisi Analizi	47
3.4.1.	Gerçek-Zamanlı PCR Optimizasyon Çalışmaları	48
3.4.2.	HRM Analizinde Verilerin Yorumlanması	50
3.5.	İmmünohistokimya (İHK)	51
3.6.	TUNEL (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick End Labeling) Yöntemi	52
4.	BULGULAR	55
4.1.	Olgulara Ait Klinikopatolojik Parametreler	55
4.2.	Olgularda <i>GADD45γ</i> Metilasyon Durum	56
4.3.	<i>GADD45γ</i> Protein Ekspresyonu ve Metilasyon Profili ile İlişkisi	57
4.4.	Anti-apoptotik Proteinlerin Ekspresyonları ve <i>GADD45γ</i> Metilasyon Profili ile İlişkileri	59
4.4.1.	Bcl-2 ve Bcl-x _L Protein Ekspresyonu	59
4.4.2.	Apoptotik İndeks (AI) ve Bcl-2, Bcl-x _L Protein Ekspresyonları	61
4.4.3.	<i>GADD45γ</i> Metilasyonu ve Bcl-2/ Bcl-x _L Protein Ekspresyonları	62
5.	TARTIŞMA	64
6.	SONUÇLAR	74
7.	KAYNAKLAR	76
8.	ÖZGEÇMİŞ	91

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1 Prostatın anatomik lokalizasyonu ve komşu organlar	4
Şekil 2.2 Prostat histolojisi.....	5
Şekil 2.3 Prostat McNeil'in zonal anatomisi.....	6
Şekil 2.4 Prostatik intraepitelyal neoplazide gözlenen hücresel değişiklikler	9
Şekil 2.5 Prostat kanseri için tanımlanmış en iyi risk faktörü yaştır	10
Şekil 2.6 Gleason derecelendirme sistemi	16
Şekil 2.7 Prostat kanserinde progresyon yolları.....	18
Şekil 2.8 (A) Normal genomik düzenlenme: <i>TMPRSS2</i> ve <i>ERG</i> genleri Normal genomik düzenlenme: <i>TMPRSS2</i> ve <i>ERG</i> genleri (B) <i>TMPRSS2-ERG</i> gen füzyonu	22
Şekil 2.9 Prostat kanser progresyonunda yer alan yollar.....	24
Şekil 2.10 Prostat metastaz basamakları.....	25
Şekil 2.11 Prostat kanserinde temel AR sinyal iletim yolları.....	28
Şekil 2.12 DNA metilasyonunun kimyasal temeli.....	30
Şekil 2.13 <i>GSTPI</i> : Prostat kanserinin tanı ve prognozunda epigenetik profil örneği.....	32
Şekil 2.14 <i>GADD45</i> izoformlarının monomerik yapısı ve dizi korunumları.....	38
Şekil 2.15 <i>GADD45</i> proteinlerinin sekonder yapısı ve etkileşim domainleri.....	39
Şekil 2.16 Stres sinyal yolağında <i>GADD45</i> genlerinin fonksiyonu ve etkileştiği yardımcı proteinler.....	41
Şekil 2.17 <i>GADD45γ</i> geninin yapısı ve CpG alanları.....	42
Şekil 3.1 Bisülfid uygulaması ile sitozinden urasil oluşumu.....	46
Şekil 3.2 Farklı $MgCl_2$ konsantrasyonları kullanılarak yapılan optimizasyon çalışmasına ait metilasyona özgün yüksek çözünürlüklü erime eğrisi analizi (HRM).....	48
Şekil 3.3 HRM analizinde metile-olmayan DNA ile metile DNA'nın Tm derecesi farkı.....	51
Şekil 4.1 Prostat adenokarsinom olgularında <i>GADD45γ</i> promoter metilasyonuna özgün HRM analizi.....	56
Şekil 4.2 Prostat adenokarsinomlu ve benign prostat hiperplazili olgularda <i>GADD45γ</i> metilasyon profili.....	57
Şekil 4.3 Prostat adenokarsinomunda <i>GADD45γ</i> proteininin güçlü (+++) ekspresyonu (x200).....	58
Şekil 4.4 Prostat adenokarsinomunda Bcl-2 protein ekspresyonu yokluğu/ negatifliği (x200)	60
Şekil 4.5 Prostat adenokarsinomunda Bcl-x _L protein ekspresyonu (x200).....	60
Şekil 4.6 Prostat adenokarsinomunda TUNEL yöntemi ile apoptotik hücreler.....	61

TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 2.1 Prostat kanserlerinin 2004 Dünya Sağlık Örgütü sınıflaması	12
Tablo 2.2 Prostat adenokarsinomlarının TNM evrelendirilmesi.....	14
Tablo 2.3 Prostat adenokarsinomunda prognostik faktörler.....	16
Tablo 2.4 Prostat kanserinde fonksiyonlarına ve yer aldıkları yolaklara göre sıklıkla hipermetile olan genler.....	33
Tablo 3.1 <i>GADD45γ</i> promoter metilasyon düzeyinin belirlenmesinde kullanılan primer setine özgün dizilimler (5'→3')	48
Tablo 3.2 <i>GADD45γ</i> promoter metilasyon durumunu belirlemek amacı ile kullanılan gerçek-zamanlı PCR reaksiyon karışımı	49
Tablo 3.3 <i>GADD45γ</i> için Metilasyon-özümlü HRM Analiz Protokolü.....	49
Tablo 4.1 Prostat adenokarsinomlu 56 olguya ait klinikopatolojik parametreler	56
Tablo 4.2 Prostat adenokarsinomlu ve benign prostat hiperplazili olgularda <i>GADD45γ</i> protein ekspresyonu	58
Tablo 4.3 <i>GADD45γ</i> promoter metilasyonu ile protein ekspresyonu arasındaki ilişki	59
Tablo 4.4 Prostat adenokarsinomlu ve benign prostat hiperplazi olgularda anti-apoptotik proteinlerin ekspresyonları	59
Tablo 4.5 Prostat adenokarsinomlu ve BPH'lı olgularda apoptotik indeks ile <i>GADD45γ</i> , Bcl-2 ve Bcl-x _L protein ekspresyonları arasındaki ilişki.....	62
Tablo 4.6 PCa'lı olgularda <i>GADD45γ</i> promoter metilasyon durumu ile Bcl-2 ve Bcl-x _L ekspresyonları arasındaki ilişki.....	63
Tablo 4.7 BPH'lı olgularda <i>GADD45γ</i> promoter metilasyon durumu ile Bcl-2 ve Bcl-x _L ekspresyonları arasındaki ilişki.....	63

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

- AR:** Androjen Reseptörü
ARE: Androjen Yanıt Elementi
bFGF: bazik Fibroblast Büyüme Faktörü
BPH: Benign Prostat Hiperplazi
DAB2IP: DAB2 interacting protein
DNMT: DNA metiltransferaz
EGF: Epidermal Büyüme Faktörü
EZH2: Enhancer of Zeste homolog 2
FFPE: Formalinle fikse parafine gömülü
GADD45 α , β , γ : Growth Arrest DNA Damage-Inducible 45 α , β , γ
GSTP1: Glutatyon S-transferaz pi 1
HRM: “High Resolution Melting” (Yüksek çözünürlüklü erime)
HSF: Isı Şok Faktörleri
IGF: İnsülin-benzeri Büyüme Faktörü
İHK: İmmünohistokimya
JNK: c-Jun N-terminal kinaz
MEKK4: Mitojenle-aktive protein kinaz /ekstraselüler sinyalle-ilişkili kinaz 4
miRNA: MikroRNA
MKK7: Mitojenle-aktive protein kinaz kinaz 7
MMS: Metilmetan sülfonat
MS-RDA: Methylation-Sensitive Representational Difference Analysis
MTK1: Methyl thioribose kinase 1
MYC: “Myelocytomatosis Oncogene”
NE: Nöroendokrin
NER: Nükleotid Eksizyon Tamiri
NF-KB: Nüklear faktor kappa-B
NKX3.1: NK3 homeobox 1
PCNA: Prolifere Eden Hücre Nüklear Antijeni
PIN: Prostatik İntraepitelyal Neoplazi
PLAT: Plazminojen Aktivatör Doku
PSA: Prostat-Spesifik Antijen
PTEN: Fosfotaz ve tensin homologu
SAH: S-adenozil homosistein
SAMe: S-adenozil-l-metyonin
TA: Transkripsiyonal aktivatör
TdT: Terminal deoksinukleotidil-transferaz
TF: Transkripsiyon Faktörü
TGF- β 1: Tümör Büyüme Faktörü- β 1
TMPRSS2-ERG: “Transmembrane protease, serine 2 - Erythroblastosis virus E26 transforming sequence (ETS)-related gene”
TP53: Tümör protein 53
TUNEL: “Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick End Labeling”
UTR: “Untranslated Region”
5mC: 5-metilsitozin

1.GİRİŞ

Çok hücreli organizmalarda, her bir hücre bir arada ve uyumlu yaşamının gerektirdiği davranışlarını gösterebilmek için, farklı sinyal moleküllerini gönderir, alır veya yorumlar. Hücreler sosyal denetim mekanizmaları olarak görev yapan bu sinyal molekülleri aracılığı ile gerektiği kadar bölünerek, farklılaşarak, dinlenerek ya da ölümlerle homeostazın devamlılığını sağlarlar. Bu uyumun düzenini bozan her bir moleküler faktör, bu tür bir organizma için sorun anlamına gelir. Ortalama 10^{14} 'den fazla hücre içeren insan vücudunda, milyarlarca hücre her gün normal fonksiyonlarını aksatabilecek genetik veya epigenetik değişimlerle karşılaşır. En tehlikeli olanı da, bir hücreye komşu hücrelerden daha hızlı bölünme ve çoğalma özelliği kazandırır ve bu seçici üstünlük, organizmanın aleyhinedir. Herhangi bir hücre topluluğunda, bir grup hücrenin bu tür olumsuz bir davranış içerisine girmesine neden olan genetik veya epigenetik değişimler, bu hücrelerin yer aldığı dokunun bütünlüğünün bozulmasına ve sonuçta kansere neden olabilirler.

Kanser hücre düzeyinde onkogenler, tümör baskılayıcı genler ve DNA tamir genlerinde meydana gelen genetik ve/veya epigenetik değişimlerin birikimi sonucunda ortaya çıkan ve kontrolsüz hücre çoğalmasıyla normal hücrelerin malign hücrelere dönüştüğü çok aşamalı kompleks bir hastalıktır. Tümör oluşumu ile başlayan bu süreçte, devam eden malign hücre proliferasyonu tümör gelişimine ve sonrasında da metastaza neden olabilir. Malign hücrelerde varolan genetik veya epigenetik değişimlere yenilerinin eklenmesi ve/veya varolan değişimlerin kümülatif birikimleri nedeniyle, kanser genellikle ileri yaşlarda ortaya çıkar.

DNA çift sarmalında bulunan bilginin doğru yorumlanması, organizmanın sağlıklı bir biçimde fonksiyonlarına devam edebilmesi açısından son derece önemlidir. DNA dizisinde değişimlere neden olmayan epigenetik mekanizmalar hücre döngüsü kontrolü, apoptoz, DNA tamiri, inflamasyon, hücre adezyonu ve migrasyonu gibi önemli hücresel olayları regüle ederler. Epigenetik mekanizmalarda gerçekleşen bir değişim, anormal gen ekspresyonuna neden olabilir ve kanser gibi birçok hastalıkla ilişkilidir. Kanserli

hücrelerde gözlenen epigenetik değişimler; lokus-hedefli hipermetilasyon ve global hipometilasyonu içeren DNA metilasyonları, histon modifikasyonları, kromatin yeniden düzenlenme mekanizmaları ve kodlama yapmayan RNA moleküllerininin anormal regülasyonları olarak sınıflandırılabilir.

DNA metilasyonu kromatin yapısını regüle eden temel mekanizmalardan biridir ve embriyonik gelişim, X-kromozomu inaktivasyonu ve genomik imprinting gibi birçok hücrel olayda rol oynar. İnsan genomunda, DNA metilasyonu çoğunlukla CpG dinükleotidlerindeki sitozin rezidülerinin 5. karbon pozisyonunda görülür. DNA metil transferazlar sitozinin bu pozisyonuna metil grubu eklenmesini katalizler ve sonuçta 5-metilsitozin oluşur. Genomun tekrarlayan fraksiyonlarında (α ve β satellitler, DNA transpozonlar gibi) bulunan sitozinler genellikle metile iken, genlerin promoter bölgelerinde bulunan CpG adalarındaki sitozinler genellikle unmetiledir. Unutmamak gerekir ki insan genomunda yer alan genlerin yaklaşık %40'ının 5'-uç bölgelerinde (promoter, UTR ve ekzon 1) CpG adaları bulunmaktadır. Promoter CpG adalarının metilasyonu, X-kromozomu inaktivasyonunda olduğu gibi gen sessizleştirilmesi ile koreledir. Günümüzde, kanserde hem global DNA hipometilasyonu hem de tümör baskılayıcı genlerde olduğu gibi lokus-spesifik DNA metilasyon artışının gözlemlendiği bilinmektedir ve anormal DNA metilasyonu, kanser gelişimi ve progresyonuyla ilişkilidir.

Prostat adenokarsinomu, gelişmiş ülkelerde erkeklerde, kansere bağlı ölümler sıralamasında, akciğer kanserinden sonra ikinci sırada yer almaktadır. Prostat kanserlerinin etyopatogenezi hala net olarak bilinmemekle birlikte, son 10 yıldır kanserin başlangıcında ve progresyonunda epigenetik değişimlerin kritik rol oynadığına dair kanıtlar elde edilmiştir. Genom-çaplı araştırmalarda, önemli hücrel fonksiyonlarda rol oynayan genlerde gözlenen hipermetilasyonunun prostat kanseri ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. Bu genlerden bazıları; hormonal yanıtta (*androjen reseptörü*), hücre döngü kontrolünde (*siklin D2* ve *siklin-bağımlı kinaz inhibitörü 2a*), sinyal iletiminde (*RASSF1A* ve *Runx3*), DNA tamirinde (*O⁶-metilguanin DNA metiltransferaz*), detoksifikasyonda (*glutasyon S-transferaz M1* ve *P1*), apoptozda (*Bcl-2*) ve tümör invazyonunda (*E-kaderin*, *TIMP metallopeptidaz inhibitörü 3*) yer alan genlerdir. Bir başka dikkat çekici nokta da, bu epigenetik değişimlerin çoğunun erken evre yüksek-dereceli prostatik intraepitelyal neoplazi (PIN) lezyonlarında gözlenmesidir.

ve bu da bize anormal DNA metilasyonunun prostat karsinogenezinde erken evrede gerçekleştiğini düşündürmektedir.

“*Growth Arrest DNA Damage-Inducible 45*” (*GADD45*) gen ailesi *GADD45α*, *GADD45β*, *GADD45γ* olmak üzere 3 üyeden oluşmaktadır. Bu ailenin üyeleri tarafından kodlanan *GADD45* proteinleri, memeli hücrelerinde, farklı çevresel, fiziksel ve genotoksik stres koşullarında yanıt veren stres sensörleri olarak görev yapmaktadırlar. Bu proteinler, stresin kaynağına ve buldukları hücre tipine göre farklı yollardan aktive edildiklerinden, aynı gen ailesinde olmalarına karşın fonksiyonları birbirlerinden farklıdır. Ancak, tümör baskılanmasında sinerjik etki gösterdikleri bilinmektedir. *GADD45γ*, proliferasyon eden hücre nükleer antijeni (PCNA) ve siklin-bağımlı kinaz inhibitörü p21 ile ilişkilidir ve hücre döngüsünün negatif regülasyonunda rol oynayan bir gendir. Aynı zamanda, çevresel stres faktörlerine yanıtta, MTK1 ve MEKK4 ile ilişkili olarak apoptoza da neden olabilir. Hem hematolojik malignansiler hem de solid tümörlerde *GADD45γ* ekspresyonunda önemli ölçüde azalma olduğu ve kanserli dokularda *GADD45γ* metilasyon düzeyinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Literatürde prostat kanserlerinde *GADD45γ* geninin metilasyon ve ekspresyon durumlarını ve aralarındaki korelasyonu gösteren herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu çalışmadaki hipotezimiz, prostat kanserli olgularda *GADD45γ* protein ekspresyonunun metilasyon aracılığı ile azaldığı ve bunun da apoptotik süreci etkileyeceğidir.

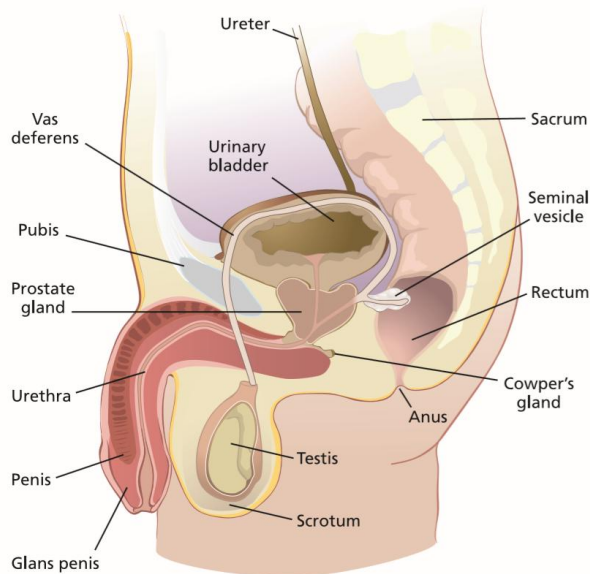
Bu kapsamda amacımız; benign prostat hiperplazili (BPH) ve prostat adenokarsinomlu (PCa) doku örneklerinde *GADD45γ*'nin metilasyon ve ekspresyon durumlarını belirlemek, elde edilen sonuçları karşılaştırmak ve metilasyon ile ekspresyon durumu arasındaki korelasyonu değerlendirmektir. Aynı zamanda, strese-yanıt geni olan *GADD45γ*'nin metilasyon ve ekspresyon durumlarının apoptozla olan ilişkisini belirlemektir.

2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI

2.1. Prostat: Anatomik ve Histolojik Yapısı

Prostat mesanenin hemen altında yer alan, 3-4 cm genişliğinde, 4-6 cm uzunluğunda asiner, stromal ve musküler elemanlar içeren kompleks küçük bir salgı bezidir (Şekil 2.1). Prostatın ortalama ağırlığı 20 gr (18-40 gr) olup, ters çevrilmiş piramide benzemektedir. Prostatın ağırlığı diferansiyasyonuna ve testiste sentezlenen androjenik hormonlara bağlıdır (Silverberg vd 2006).

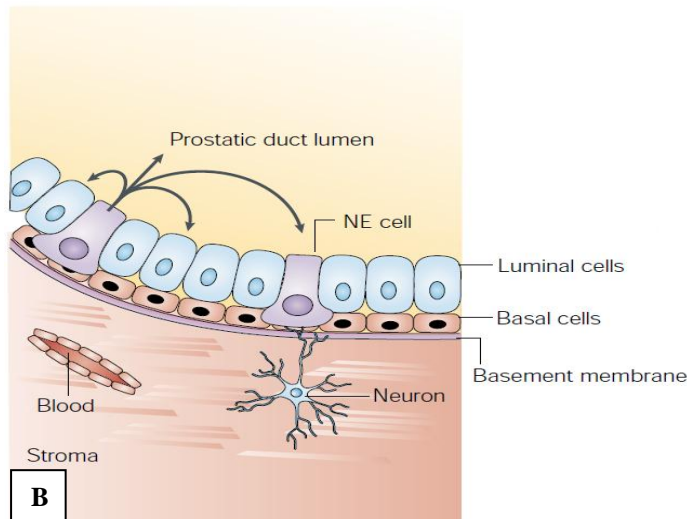
Prostat hafif alkali (pH 7.29) bir sıvı sekrete eder ve bu sıvı spermatozoaların yer aldığı seminal vezikül sıvı hacminin %25-30'luk bölümünü oluşturur. Bu nedenle prostat, fertilité açısından önemli bir organdır.



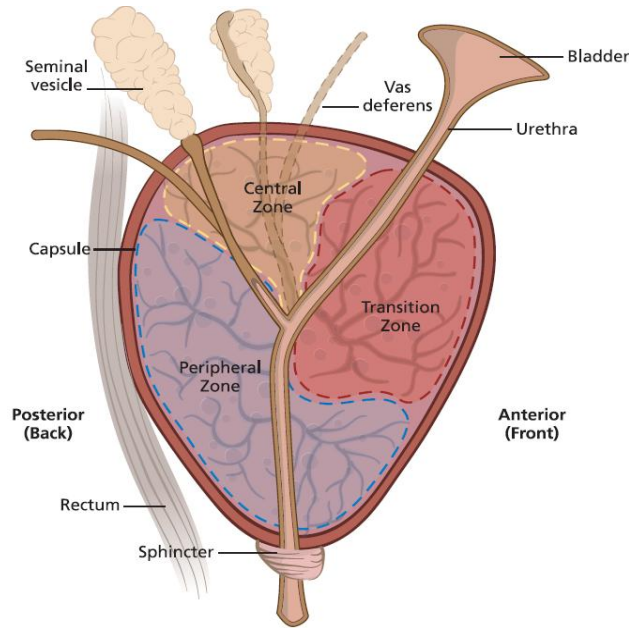
Şekil 2.1 Prostatın anatomik lokalizasyonu ve komşu organlar (Cramer vd 2006).

Prostat bezinin yapısını %70 glandüler doku (tubuloalveolar bezler) ve %30 glandüler-olmayan fibromusküler stroma oluşturur (Şekil 2.2). Topografik olarak prostatın McNeal zonal anatomisinde ise sırasıyla transizyonel zon (%5), santral zon (%25) ve periferal zon (%70) glandüler dokuyu oluştururken, en dışta yer alan anterior fibromusküler stroma da glandüler-olmayan dokuyu oluşturur (McNeal 1981)(Şekil2.3).

Prostatın zonal anatomisi klinik açıdan son derece önemlidir. Proksimal prostatik üretra etrafında yerleşerek üretraya lateral olan iki küçük lobtan oluşan transizyonel zon, benign prostat hiperplazilerinin (BPH) en sık görüldüğü bölgedir. Prostat karsinomlarının yaklaşık %15-20'si transizyonel zondan köken almaktadır. Tabanı mesane boynunda bulunan santral zon da hedef bölgelerden biridir ve santral zon kökenli primer tümöral tutulum %1-5 dolayındadır. Prostat bezinin taban kısmında, santral ve transizyonel zonu çevreleyerek, distalde posterior, posterolateral ve lateral yönde uzanarak distal prostatik üretrayı saran periferal zon, karsinom ve prostatik intraepitelyal neoplazi (PIN)'nin en sık görüldüğü bölgedir. Karsinomların %70-75'i bu zondan köken almaktadır. Ayrıca kronik inflamasyon ve atrofi de en sık bu zonda görülmektedir (Carter vd 2004).



Şekil 2.2 Prostat histolojisi. **A.** Prostatın temel yapısını oluşturan glandüler doku ve glandüler-olmayan fibromüsküler stroma (Cramer vd 2006), **B.** Prostatın temel hücreleri (NE: Nöroendokrin) (Bok ve Small 2002).



Şekil 2.3 Prostat McNeil'in zonal anatomisi (Cramer vd 2006)

Prostat epitelyal ve stromal hücrelerden oluşmaktadır. Epitelyal hücreler, prostatik üretraya açılan primer duktuslarla başlayan, asinuslarla sonlanan yapıları döşemektedir. Prostatın epitel hücreleri ürotelyal hücreler, sekretuar hücreler, bazal hücreler ve nöroendokrin hücrelerden oluşmaktadır. Bazal hücreler, sekretuar hücreleri bazal membrandan ayıran hücre katmanında yer alan oval nüveli, dar sitoplazmalı ve hiperkromatik hücrelerdir. Bazal hücreler sekretuar hücrelere oranla daha az diferensiyedirler ve bazal hücrelerin bir alt grubunu, luminal epitel hücreleri oluşturan kök hücrelerin oluşturduğu düşünülmektedir. Sekretuar hücreler, kolumnar veya kübik benzeri hücrelerdir ve yüzeylerinde androjen reseptörünü (AR) eksprese ederler. Prostat sıvısının komponentlerini sekrete etmekle birlikte androjen-bağımlı bir mekanizma ile Prostat-Spesifik Antijen (PSA)'i de sekrete ederler. Androjen reseptörü taşımayan nöroendokrin hücreler ise eozinofilik sitoplazmaya sahiptirler ve hücre bazalında ince sitoplazmik granülleri içerirler. Stromal hücreler temelde çizgili ve düz kas hücreleri, fibroblastlar, nöral ve endotelyal hücreleri içermektedir. Bu hücrelerin yanı sıra dendritik hücreler ve lenfositler gibi immun sistem hücreleri de bulunmaktadır. Bazı stromal hücreler androjene duyarlıdır ve uyarılmaları sonucunda büyüme faktörlerini salgılayarak prostatta homeostazın devamlılığında rol oynarlar (McNeal 1981, Berges vd 1995, Chung 1995).

Prostatta gözlenen en temel patolojiler prostatit, benign prostat hiperplazisi (BPH), prostatik intraepitelyal neoplazi (PIN) ve prostat kanseridir. Prostatit, prostat inflamasyonudur ve her yaşta erkeklerde gözlenebilen en yaygın ürolojik problemlerden biridir. Bu inflamasyon sıklıkla bakteriyal ve mantar infeksiyonlarının bir sonucu olmakla birlikte, mikroorganizma dışındaki faktörlere bağlı olarak da inflamasyonun gelişebileceği bilinmektedir. Prostatit dışındaki diğer patolojiler aşağıda daha detaylı tartışılacaktır.

2.2. Benign Prostat Hiperplazisi (BPH)

Benign prostat hiperplazisi (BPH) ileri yaş erkeklerde gözlenen yaygın bir sağlık problemidir ve prostatın bazal hücre tabakasındaki epitel hücrelerinin proliferasyonu sonucu gelişen prostat büyümesidir. Çoğunlukla hormon dengesindeki değişimlere bağlı olarak şekillenen bu hastalıkta, histolojik olarak glandular ve stromal komponentler yer alır ve prostatın periüretal hattında farklı nodüllerin varlığı dikkat çekicidir (Coffey ve Walsh 1990). Prostatta hormon dengesinin korunması son derece önemlidir. Fizyolojik düzeylerdeki androjenlerin varlığında, hücre proliferasyonu ve apoptoz arasındaki denge de korunur. Androjenlerin bu dengeyi korumasında epidermal büyüme faktörü (EGF), temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF) ve transforme edici büyüme faktörü- β 1 (TGF- β 1) gibi lokal parakrin ve otokrin büyüme faktörleri yardımcı olur ve böylelikle organ hacmi sabit tutulur (Lucia vd 2008).

BPH'nin patogenezinde hormonal dengesizliğin yanı sıra inflamasyonun da rolü olduğu düşünülmektedir. Akut ve kronik prostat inflamasyonu, ileri yaş erkeklerden alınan prostat örneklerinin histolojik incelemesinde gözlenen ortak bulgu olmakla birlikte bu inflamasyonun yaşlanma sürecinin normal biyolojik mekanizması mı yoksa prostat büyümesine neden olabilecek patolojik bir mekanizma mı olduğu henüz netlik kazanmamıştır. Ancak, inflamatuvar mediatörlerin direkt olarak prostatik büyüme faktörlerinin üretimini uyararak prostat epitel ve stromal hücre büyümesine katılabilecekleri veya indirekt olarak prostat hücre apoptozunu baskılayarak prostat hücre ölümünü azaltabilecekleri düşünülmektedir (Bostanci vd 2013).

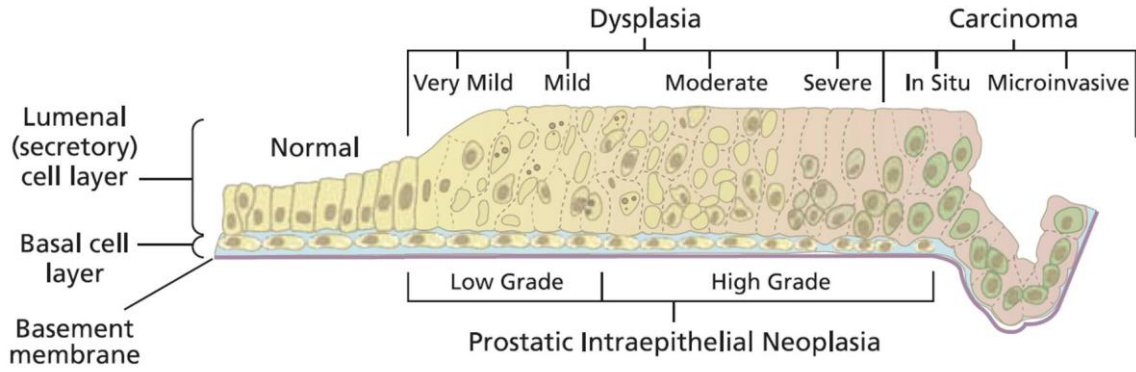
BPH, prostat kanserinin bir öncü lezyonu değildir. BPH için tanımlanan potansiyel risk faktörleri arasında yaş, ırk, aile öyküsü, sigara içme öyküsü ve hipertansiyon, diyabet gibi kronik hastalık öyküleri yer almaktadır. BPH'da uygulanan ilaç tedavisindeki hedeflerden biri, hücre içindeki testosteronun dihidroksitesterona

dönüşümünü katalizleyen 5-alfa redüktaz enzimini inhibe etmektir. Böylelikle, androjen yokluğuna neden olarak etki mekanizmasını gösterir. Diğer hedef ise prostat stromal düz kas hücrelerini gevşeten α -1 adrenoreseptör antagonistleridir ve etki mekanizmalarını prostat ve prostat kapsülündeki reseptörleri bloke ederek gösterirler (Yurdakul ve Güven 2006). BPH tedavisinde altın standard ise, prostatın transüretal rezeksiyonudur ve bu uygulama BPH'da gözlenen sık idrara çıkma, kesik idrar yapma ve idrar kaçırma gibi semptomların %85-100'ini ortadan kaldırmaktadır (Ziada 1999).

2.3. Prostatik İntraepitelyal Neoplazi (PIN)

Hücreler, malign transformasyon sırasında dereceli olarak değişim gösterirler ve sonuçta fenotipik olarak malign özellikler gösterirler. Meme, mesane ve deri kanserlerinde olduğu gibi prostat kanserinde de premalign koşullar tanımlanmıştır. PIN, daha önceden var olan benign prostatik asiner ve duktuslar içindeki epitelyum hücrelerin neoplastik büyümesi olarak tanımlanır. PIN'in, yüksek-dereceli ve düşük-dereceli olmak üzere iki farklı formu bulunur.

Premalign koşulların tüm gerekliliklerini karşıladığından, yüksek-dereceli PIN, prostat kanseri gelişiminde öncül lezyon olarak kabul edilmektedir (Brawer 2005). Gerçekten de PIN prostat adenokarsinomlarının büyük bir çoğunluğunun projenitörü olarak tanımlanmaktadır (Cramer 2006). PIN'de bazal hücre katmanının yapısı bozulmazken (bazal hücre tabakası ile sınırlı kalırken), prostat kanserinde bazal hücre tabakası yoktur ve bu ayırt edici özellik tanıda yardımcı olmaktadır. Şekil 2.4'te PIN oluşum süreci gösterilmiştir. Bazal membran boyunca yer alan normal lüminal hücreler şekil, büyüklük ve nükleus lokalizasyonu açısından birbirlerine benzerler. Düşük-dereceli PIN'de lüminal hücreler yavaş yavaş uniform olma özelliklerini kaybederler, nükleus bazal membrandan uzaklaşır ve genişleyerek içerisinde nükleoli olarak adlandırılan büyük koyu spotlar oluşur. Yüksek-dereceli PIN'de bu özellikler daha da belirginleşir ve bazal hücre katmanında boşluklar oluşmaya başlar. Erken evre prostat karsinomunda ek olarak bazal hücre katmanının kaybolduğu gözlenir.



Şekil 2.4 Prostatik intraepitelyal neoplazide gözlenen hüresel değişiklikler. Prostat dokusunun yapısında gözlenen bu değişiklikler soldan (normal) sağa (mikroinvaziv karsinom) doğru ilerlemektedir (Cramer 2006).

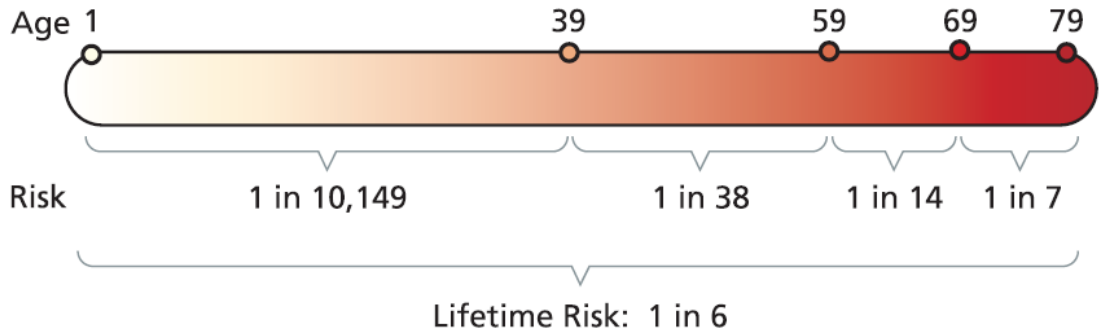
Her ne kadar yüksek-dereceli PIN bir kanseröz problem değilse de, prostat kanseri için bir risk faktörü olarak değerlendirilmelidir. Yüksek-dereceli PIN de prostat kanseri gibi ileri yaş erkeklerde daha sık gözlenir ve bu bireylerin büyük bir çoğunluğunda ilk 10 yıldan daha az bir süre içinde prostat kanseri gelişme olasılığı vardır. Prostat kanserli bireylerin büyük bir çoğunluğunda (%73) yüksek-dereceli PIN'in şiddeti ve sıklığı artarken kanserli olmayan bireylerde bu oran %32'dir (Bostwick vd 2004). Bu nedenle PIN tanısı alan hastalar dikkatli takip edilmelidir. Aynı zamanda PIN'de serum PSA konsantrasyonunun her zaman artmayacağı ve ultrasonla belirlenememesi de dikkate alınır, ileri yaş erkeklerde prostat biyopsisi alınarak rutin izlemlerin yapılması gerekmektedir.

2.4. Prostat Kanseri

2.4.1. Prostat Kanserinde Risk Faktörleri

Prostat kanserinde en iyi tanımlanmış risk faktörü ileri yaştır ve 60'lı yaşlardan sonra riskin oldukça arttığı bilinmektedir (Şekil 2.5). Prostat kanserinde insidans ve mortalite açısından coğrafi farklılıklar sık görülmektedir. Dünyada prostat kanser insidans hızının en yüksek olduğu nüfus grubu, ABD'de yaşayan zencilerdir. Prostat kanserine, Uzakdoğu'da nadir rastlanmaktadır. Tüm kanser türlerinde olduğu gibi, ailede prostat kanseri öyküsü olması, hastalığa genetik yatkınlığın varlığını göstermekte ve en büyük risk faktöründen biri olarak değerlendirilmektedir. Sigara kullanımının, detoksifiye edici genlerde meydana getirdiği hasarlar veya epigenetik değişimler sonucu ölümcül

prostat kanseri ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Böcek ilaçlarına maruz kalan çiftçilerde, petrol endüstrisinde çalışanlarda ve yüksek elektromanyetik alanlarda çalışan elektrik işçilerinde prostat kanser riskini arttığı gösterilmiştir. Enerji alımının, obezitenin ve sedanter yaşamın prostat kanseri riskini arttırdığına dair teoriler de ileri sürülmektedir (Carter vd 2004, Scott vd 2006). İlginç olan, alkol tüketimi ile prostat kanser gelişimi arasında bir ilişkinin olmadığı, hatta alkol tüketiminin agresif prostat kanser insidansını ve mortalitesini azalttığı ileri sürülmüştür (Özen vd 2007).



Şekil 2.5 Prostat kanseri için tanımlanmış en iyi risk faktörü yaştır. Amerikan Kanser Derneği 50 ve üzeri yaş erkelerin yıllık olarak prostat kanseri açısından tarama testlerini yaptırmaları önermektedir (Scott vd 2006).

İleri yaş, ırk ve aile öyküsü tanımlanabilen birkaç risk faktörü olmakla birlikte, prostat kanseri için kesinlik kazanmış önlenebilir risk faktörleri bulunmamaktadır (Schottenfeld vd 2006).

2.4.2. Prostat Kanserinin Epidemiyolojisi

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından yapılan istatistikler sonucunda 2008 yılında Dünya genelinde 7,6 milyon kişi kanser nedeniyle hayatını kaybetmiştir. Bu sayı Dünya genelindeki tüm ölüm sebepleri içerisinde %13'lük bir orana sahiptir. Hem ekonomik olarak gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde en yaygın görülen ve en sık ölümlerle sonuçlanan kanser türleri erkeklerde akciğer kanseri ve kadınlarda meme kanseridir. 2008 yılının verilerine göre prostat kanseri erkeklerde 2. en yaygın tanısı koyulan kanser türüdür (%14'lük oranla) ve kanserden ölüm nedenleri arasında 6. sırada yer almaktadır. İnsidans oranları dünya genelinde 25 kattan fazla değişim göstermektedir. En yüksek insidans oranlarının görüldüğü gelişmiş ülkeler: Avrupa ve Kuzey Amerika kıtalarındaki ülkelerle birlikte Avustralya'dır. Bunun nedeni, büyük ölçüde bu ülkelerde

linik olarak tümör tarama testi olan PSA testinin yaygınlıkla kullanılıyor olmasıdır. Karayip bölgesindeki Afrika kökenli erkekler dünyadaki en yüksek prostat kanser mortalitesine sahiplerdir. Bu ülkelerde, genetik yatkınlığın yüksek mortaliteden sorumlu olabileceği düşünülmektedir (Jemal vd 2011).

Prostat kanseri ileri yaş erkeklerde gözlenen bir hastalıktır ve tanı koyma sırasında ortalama yaş 71'dir (WEB_1). Ekonomik olarak gelişmekte olan ve gelişmiş ülkelerde erkeklerde en sık tanı konulan ve ölüm nedeni olan akciğer kanserinin aksine, gelişmiş ülkelerdeki erkeklerde en yaygın görülen kanser türü prostat kanseridir. Akciğer ve kolon kanseri ile birlikte, erkeklerde en yaygın kanserden ölüm nedenleri arasında yer almaya devam etmektedir (Jemal vd 2010, 2011). Prostat kanserli olguların %75'i 65 yaş ve üstündedir. Çocuk, adolesan ve genç erişkinlerde oldukça nadirdir (Eble vd 2004, Carter vd 2004).

Ülkemizde prostat kanser insidansı konusunda net veriler yoktur. Fidaner ve ark'larının 1993–94 yılları arasında yaptıkları çalışmada prostat kanserinin İzmir'deki insidansı yüz binde 9,1 olarak bildirilmiştir (Fidaner vd 2001).

Gelişmiş ülkelerde, prostat kanseri olma riski %16'dır ve bu her 6 erkekten birinin prostat kanseri tanısı alacağını göstermektedir (Jemal vd 2010). Bu ülkelerde her yıl 650.000 yeni vaka tanımlanmakta ve 136.000 vakanın da prostat kanseri nedeniyle ölümleri bildirilmektedir (Jemal vd 2011). Yeni tanı alan prostat kanserlerinin yaklaşık %90'ı lokalize prostat kanseridir ve bu vakaların tamamı 5 yıl içinde yaşamlarını kaybetmezler. Oysa geride kalan vakalar tanı aldıklarında metastatik evrededirler ve 5 yıllık sağkalım oranı %30'dur (Jemal vd 2010).

Dünya Sağlık Örgütü'nün Türkiye için 2008 verilerine bakıldığında; erkeklerde prostat kanseri insidans açısından akciğer, mide ve mesane kanserinden sonra 4. sırada yer alırken, mortalite açısından akciğer ve mide kanserinden sonra 3. sırada yer almaktadır. 2008 yılında 2853 kişi prostat kanseri nedeniyle hayatını kaybetmiştir (WEB_2). Türkiye Üroonkoloji Derneği adına 2009 yılında Türkiye'de yapılan bir epidemiyolojik çalışmada ("Prostattürk 2009") ise prostat kanserinin görülme sıklığında belirgin bir artış olduğu ve 35/100.000 insidans oranı ile akciğer kanserinden sonra 2. sırayı aldığı belirlenmiştir. Temmuz 2008- Haziran 2009 tarihleri arasında yapılan bu

çalışmada, olguların %88.6'sının ürolojik şikayetlerle başvurdukları, tanı anında olguların %51.4'ünde Gleason skorunun 2-6 arasında, %29.9'unda 7 ve %18.7'sinde 8-10 arasında olduğu görülmüştür (WEB_3).

2.4.3. Prostat Kanseri Histolojisi

Prostat kanserlerinin büyük bir çoğunluğu, epitelyal hücrelerden orijin alan adenokarsinomlardır ve tüm prostat kanserlerinin yaklaşık %80-90'ına karşılık gelir. Prostat kanserlerinin Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 2004 Histolojik Sınıflaması Tablo 2.1'de görülmektedir (Eble vd 2004).

Prostat adenokarsinomları histopatolojik olarak periferik (sekonder) duktus ve asinerlerin adenokarsinomu ve büyük (primer) duktusların adenokarsinomu olmak üzere iki büyük gruba ayrılmaktadır. Tümörlerin çoğu birinci grupta olmasına rağmen, bu iki grup sıklıkla birlikte görülmektedir (Rosai 2004).

Biyopsi materyalinde adenokarsinomların çoğu histolojik olarak iyi sınırlı, kolaylıkla seçilebilen glandüler yapılar şeklindedir. Neoplastik glandlar, tipik olarak benign glandlardan daha küçüktür, tek sıralı, amfofilik sitoplazmalı, küboidal veya kolumnar hücrelerle döşelidirler. Ayrıca, neoplastik glandlarda bazal hücre tabakası görülmemektedir. Nükleus büyüktür ve eozinofilik nükleolus içermektedir (Silverberg vd 2006, Carter vd 2004).

Tablo 2.1 Prostat kanserlerinin 2004 Dünya Sağlık Örgütü sınıflaması

Epitelyal tümörler	Mezenkimal tümörler
Glandüler neoplazmlar	Leiomyosarkom
Asiner adenokarsinom	Rabdomyosarkom
Asiner adenokarsinom	Kondrosarkom
Pseudohiperplastik	Anjiosarkom
Foamy	Malign fibröz histiyositom
Kolloid	Malign periferik sinir kılıfı tümörü
Signet ring	Hemanjiom
Onkositik	Kondrom

Devamı arka sayfada

Lenfoepiteliyoma benzeri	Leiomyom
Karsinosarkom, sarkomatoid karsinom	Granüler hücreli tümör
Prostatik intraepiteliyal neoplazi (PIN)	Hemanjioperistom
Prostatik intraepiteliyal neoplazi (PIN III)	Soliter fibröz tümör
Duktal adenokarsinom	Hematolenfoid tümörler
Kribriform	Lenfoma
Papiller	Lösemi
Solid	Değişik tümörler
Ürotelyal tümör	Kistadenom
Ürotelyal karsinom	Nöroblastom (<i>Willm 's</i> tümörü)
Skvamöz tümörler	Rabdoid tümör
Adenoskuamöz karsinom	Germ hücreli tümör
Skvamöz hücreli karsinom	Yolk salk
Bazal hücreli tümörler	Seminom
Bazal hücreli adenom	Embriyonel karsinom&teratom
Bazal hücreli karsinom	Koryokarsinom
Nöroendokrin tümörler	Berrak hücreli adenokarsinom
Endokrin diferansiyasyon gösteren adenokarsinom	Melanom
Karsinoid tümörler	Metastatik tümörler
Küçük hücreli karsinom	
Paraganglioma	
Nöroblastoma	
Prostatik stromal tümör	
Malignite potansiyeli belirsiz stromal tümör	
Stromal sarkom	

2.4.4. Prostat Kanserinde Evreleme

Prostat adenokarsinomunu evrelemedeki amaç, prognozu ve uygun tedaviyi belirlemektir. Prostat adenokarsinomunun klinik ve patolojik evrenmesinde tercih edilen evreleme sistemi, TNM evreleme sistemidir (Tablo 2.2) (Bostwick ve Meiers 2008, Eble vd 2004).

Prostat kanserlerinde lokal ekstraprostatik yayılım, periferal zonda yerleşen karsinomlarda posterolateral bölgeye, transizyonel zonda yerleşen karsinomlarda glandın anterior kısmına doğru görülmektedir. Prostat adenokarsinomu, metastazını en

sık obturator ve hipogastrik bölgesel lenf düğümlerine, pelvis kemiklerine, aksial iskelet sistemine yapmaktadır. Visseral metastazlar, akciğer ve karaciğerdir (Eble vd 2004).

Tablo 2.2 Prostat adenokarsinomlarının TNM evrelendirilmesi

Primer tümör (T)

Tx: Primer tümör değerlendirilemiyor

T0: Primer tümör bulgusu yok

T1: Palpe edilmeyen, klinik ve görüntüleme görülmeyen tümör

T1a: Rezeke edilen dokuların %5'inden azında insidental tümör

T1b: Rezeke edilen dokuların %5'inden çoğunda insidental tümör

T1c: İğne biyopsisinde tanı konan tümör (PSA yüksekliği nedeniyle)

T2: Prostata sınırlı tümör

T2a: Bir lobun yarısını veya daha azını kaplayan tümör

T2b: Sadece bir lobun yarısından fazlasını kaplayan tümör

T2c: Her iki lobta yer alan tümör

T3: Prostat dışına yayılan tümör

T3a: Ekstrakapsüler yayılım (unilateral veya bilateral)

T3b: Vezikula seminalis (ler) invazyonu

T4: Vezikula seminalis dışı komşu yapılara invaze veya fiske etmiş tümör (mesane boynu, eksternal sfinkter, rektum, levator kasları ve pelvik duvar)

Lenf nodu (N)

Nx: Bölgesel lenf nodu değerlendirilemiyor

N0: Bölgesel lenf nodu metastazı yok

N1: Bölgesel lenf nodu metastazı var

Uzak metastaz (M)

M0: Uzak metastaz yok

M1: Uzak metastaz mevcut

M1a: Bölgesel olmayan lenf nodülleri

M1b: Kemik (ler)

M1c: Diğer bölgeler

Devamı arka sayfada

- G: Histopatolojik Değerlendirme
 Gx: Grade değerlendirilememiştir
 G1: İyi diferansiye (Gleason Skor 2-4)
 G2: Orta diferansiye (Gleason Skor 5-6)
 G3-4: Kötü diferansiye (Gleason Skor 7-10)

Evrelendirme

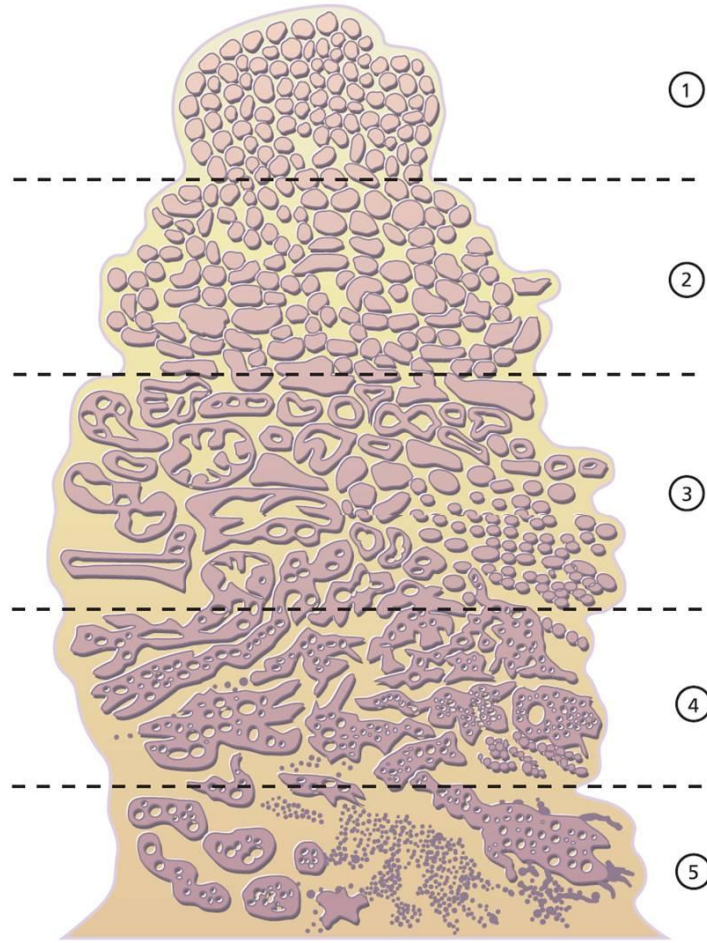
Evre 1: T1a-N0-M0-G1	Evre III: T3-N0-M0-Herhangi bir G
Evre 2: T1a-N0-M0-G2,3-4	Evre IV: T4-N0-M0-Herhangi bir G
T1b,c-N0-M0-Herhangi bir G	Herhangi bir T-N1-M0-Herhangi bir G
T1,T2-N0-M0-Herhangi bir G	Herhangi bir T-Herhangi bir N-M1-Herhangi bir G

2.4.5. Prostat Adenokarsinomunda Derecelendirme

Prostat adenokarsinomunun değerlendirilmesinde en çok kabul gören Gleason skorlama sistemi, prostat kanserinin kuvvetli prognostik faktörlerinden birisini oluşturmaktadır (Eble vd 2004). Gleason skorlama sistemi, tümörün küçük büyümede tespit edilen, glandüler diferansiyasyon ve büyüme paterninin, stroma ile ilişkisine dayanmaktadır. Sitolojik özellikler, tümör derecelendirmesinde rol oynamamaktadır. Tümör, glandüler diferansiyasyon ve büyüme paternine göre 1'den 5'e kadar skorlanmaktadır. 1 en iyi diferansiyasyonu, 5 en kötü diferansiyasyonu göstermektedir. En sık görülen primer ve ikinci en sıklıkta görülen sekonder yapısal paternlerin toplamı ile Gleason skoru elde edilmektedir (Şekil 2.6) (Eble vd 2004, Scott vd 2006).

2.4.6. Prostat Kanserinde Prognoz ve Tedavi

Amerikan Patoloji Topluluğu, prostat kanserinde prognozu 3 kategoride değerlendirilmektedir (Tablo 2.3). Preoperatif serum PSA düzeyi, prostat kanserini hem saptamada, hem de izleminde önemli rol oynamaktadır (Leman ve Getzenberg 2009, Bostwick ve Cheng 2008). PSA, 32 kD büyüklüğünde bir glikoprotein proteazdır. Prostat bezinin duktal ve asiner epitelden (lüminar epitelyum hücreleri) sentezlenir ve seminal sıvıya salgınır. Fizyolojik koşullarda prostat epitelinin bazal membranı PSA'nın sirkülasyona kaçışını önlemede bariyer görevi yapar. Bazal membranın normal yapısını değiştiren her bir patolojik olay, PSA'nın sistemik sirkülasyona geçişini sağlar. Artmış



Şekil 2.6 Gleason derecelendirme sistemi. Şekilde yukarıdan aşağıya her bir panel (1-5) artan Gleason skorunu göstermektedir (Scott vd 2006).

Tablo 2.3 Prostat adenokarsinomunda prognostik faktörler

Tanım	Prognostik faktörler
Kategori 1 Prognostik önemi ve klinik hasta izleminde faydalı olduğu ispatlanmış faktörler	Preoperatif serum PSA düzeyi Gleason skoru (histopatolojik derece) TNM evresi Cerrahi sınırlar
Kategori 2 Biyolojik ve klinik olarak yoğun şekilde çalışılmış fakat istatistiksel olarak güçlü çalışmalarla önemi ispatlanamamış faktörler	Tümör volumu Histolojik tipi DNA ploidi
Kategori 3 Prognostik değerini ortaya koymak için yeterli çalışma yapılmamış faktörler	Perinöral invazyon Nöroendokrin diferansiyasyon Mikrodamar dansitesi Ploidi dışındaki nükleer özellikler Onkogenler Tümör süpressör genler

serum PSA konsantrasyonu sadece prostat kanseri ile değil, aynı zamanda BPH ve prostatitle de ilişkilidir. Bu nedenle PSA değerlendirmesi, prostat kanserinde bir tanı testi olarak değerlendirilmez, ancak prostat biyopsi endikasyonuna kadar vermede son derece yardımcı bir parametredir. Etnik özelliklere ve yaşa bağlı olarak değişmekle birlikte (yaşla birlikte PSA düzeyi artma eğilimindedir), serum PSA düzeyi 4 ng/ml'den yüksek olan bireylerde ek testlerin yapılması önerilmektedir (Scott vd 2006).

Prostat kanserlerinde ölüm insidansını azaltmak amacıyla yapılan PSA tarama testinin etkinliği hem Amerika hem de Avrupa'da değerlendirilmiştir. Toplamda 250.000'den fazla hasta üzerinde tamamlanan bu çalışmalarda, hastaların 7-10 yıllık takipleri yapılmıştır. Amerikada yapılan çalışmada, PSA taraması yapılan grupla kontrol grubu arasında prostat kanserinden ölüm oranları açısından istatistiksel fark gözlenmemiştir (Andriole vd 2009). Ancak, Avrupa çalışmasında tarama yapılan gruptaki ölüm oranında %20 azalma gözlenmiştir (Schröder vd 2009). Bu nedenle PSA tarama testleri günümüzdeki önemini korumaktadır.

Gleason skorlaması ile elde edilen histopatolojik derece, klinik ve patolojik evreyle direkt ilişkili olup, cerrahi tedavi sonrası progresyonu göstermede güçlü belirteçlerden birini oluşturmaktadır. TNM evresi, prognozla ilişkili en önemli prognostik faktör olup, evreleme yaparken tümör hacmi, prostat kapsülü, seminal veziküllerin durumu ve lenf nodülleri de değerlendirilmektedir. Tümörün rekürrensiyle tümörün hacmi, prostatik kapsül invazyon durumu ve derecesi arasında güçlü ilişki bulunmaktadır. Yapılan çok sayıda araştırmada, özellikle cerrahi sınır pozitifliği ile tümörün progresyonu arasında güçlü ilişki tespit edilmiştir (Rosai 2004, Bostwick ve Cheng 2008, Eble vd 2004).

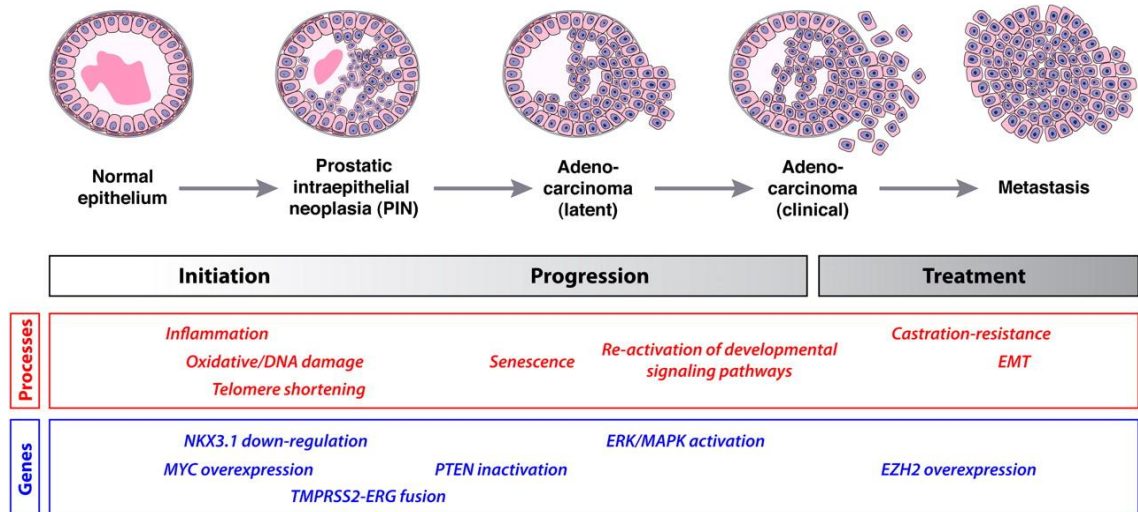
Prostat kanserinde tedavi, kanserin türüne göre değişmektedir. Lokalize prostat karsinomlarında tedavi seçenekleri radikal prostatektomi, eksternal radyoterapi, hormonal tedavi ve herhangi bir tedavi vermeden izlem -ertelenmiş tedavi- şeklindedir. Transüretral rezeksiyon materyallerinde insidental olarak saptanan karsinom ile tümör miktarı düşük ve iyi diferansiye olgularda genellikle ek tedaviye gerek görülmemektedir. Hormonal tedavi seçenekleri östrojen, luteinize edici hormon (LH) analogları, releasing (salınım yaptıran) hormon (RH) analogları ve antiandrojen

tedaviler ile bilateral orşiektomidir (Rosai 2004, Bostwick ve Cheng 2008, Eble vd 2004).

2.4.7. Prostat Karsinogenezi

Prostat kanserinin etyopatogenezi hala net olarak bilinmemekle birlikte, hormonal, genetik, epigenetik ve çevresel faktörlerin tümörün patogeneziinde rol oynadığı düşünülmektedir.

Prostat kanseri yavaş-ilerleyen bir hastalıktır. PIN, prostat kanserinin pre-malign prekürsörüdür. Prostat kanseri androjen-bağımlı lokalize tümörden (erken evre) metastaza kadar ilerlemektedir (Şekil 6) (Shen ve Abate-Shen 2010). Hormonal tedavi, tümör regresyonuna neden olur, ancak sonuçta kastrasyon-dirençli hastalık gelişebilir. Bu bölümde prostat kanser gelişiminde ve progresyonunda rol oynayan mekanizmalar özetlenmektedir.



Şekil 2.7 Prostat kanserinde progresyon yolları. Her bir progresyon yolağında yer alan ve önemli olduğu düşünülen moleküler mekanizmalar ve genler gösterilmektedir (Shen ve Abate-Shen 2010).

2.4.7.1. Kalıtlabilir Faktörler ve Kromozomal Değişimler

Kalıtsal genetik geçmişi gösteren aile öyküsü, prostat kanseri gelişiminde önemli risk faktörlerinden biridir. Epidemiyolojik çalışmalar, birinci derecede yakınlarında (baba ve erkek kardeş) prostat kanseri olan bireylerin, prostat kanseri olma riskinin aile öyküsü bulunmayan bireylere göre 2-3 kat daha fazla olduğunu göstermektedir.

Hereditör prostat kanseri, Mendelian kalıtım paternine sahiptir ve tüm prostat kanseri vakalarının %5-10'una karşılık gelmektedir (Carter vd 1993, Cerhan vd 1999). Genom-çaplı ilişkilendirme çalışmaları (GWAS), 17q21, Xp11, 10q21 ve 8q24 gibi birçok kromozomal bölgenin prostat kanser riski ile ilişkili olduğunu göstermektedir. 8q amplifikasyonlarının sıklığı erken evre prostat kanserlerinde düşük (>%8) olmakla birlikte kastrasyon-dirençli veya metastatik prostat kanserlerinde %60-90'lara ulaşmaktadır, görülme sıklığı tümör evresi ve derecesi ile ilişkilidir. 8q21, 8q22 ve 8q24, amplifikasyonun gözleendiği bölgelerden birkaçıdır ve *MYC* onkogeninin 8q24'de lokalize olması, 8q kazanımlarıyla ilişkili çalışmaların bir çoğunun bu bölge üzerine odaklanılmasına neden olmuştur (Al Olama vd 2009, El Gammal vd 2010). Özellikle 6q, 8p, 10q, 13q, 15q, 16q, 17p/q, 18q, 19p/q ve 22q bölgelerinde kromozomal kayıplar sözkonusu iken 8q, 1q, 3q, 7p/q ve Xq bölgelerinde kromozomal kazanımlar dikkati çekmektedir (Saramaki ve Visakorpi 2007). Kromozomal aberasyonların gözleendiği bu bölgelerde kodlu olan önemli genlerden bazıları *AR* (Xq), *NKX3.1* (NK3 homeobox 1) (8p21) ve *PTEN* (phosphatase and tensin homolog) (10q23)'dir.

2.4.7.2. Erken Evrede Gözlenen Değişimler ve Moleküler Mekanizmaları

Prostat adenokarsinomun pre-malign lezyonu olarak tanımlanan PIN, hem hücresele proliferasyon hem de sitolojik değişimler açısından kanseri taklit etmektedir. Aynı zamanda, kanserde gözlenen genetik ve epigenetik değişimler PIN lezyonlarında da tanımlanmıştır ve bu nedenle PIN lezyonlarında gözlenen genetik ve epigenetik değişimler, prostat kanser başlangıcının gatekeeper (bekçi) değişimleri olarak değerlendirilebilir.

Birçok epidemiyolojik, patolojik ve moleküler çalışmalar, kronik inflamasyonun prostat kanseri ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Karsinojenlerin kronik inflamasyona ve sonrasında PIN'e neden oldukları bilinmektedir (Klein ve Silverman 2008, Shen ve Abate-Shen 2010). Karsinojenlere karşı korunmada görev alan en önemli genlerden biri de *Glutasyon S-transferaz pi 1* (*GSTP1*)'dir. *GSTP1* promotör hipermetilasyonu, prostat kanser progresyonunun en erken evrelerinde tanımlanan değişimlerden biridir. Primer tümörlerin %90'ında ve PIN lezyonlarının %70'inde *GSTP1* hipermetilasyonu belirlenmiştir. (Maruyama vd 2002, Meiers vd 2007, Nakayama vd 2004). Bu genin ürünü olan protein, reaktif oksijen türlerini (örn; serbest radikaller) inaktive eden

koruyucu bir enzimdir ve bu nedenle *GSTP1*'in bir koruyucu (caretaker) gen olduğu düşünülmektedir.

Prostat karsinogenezinde yaşla-ilişkili önemli faktörlerden biri de oksidatif stres ve DNA hasarı üzerinde gösterdiği etkisidir (Khandrika vd 2009). Oksidatif stres, reaktif oksijen türleri ile bu türleri hücresele düzeyde kontrol eden detoksifiye edici enzimler arasındaki dengesizlik sonucu oluşur ve hücredeki protein ve DNA gibi temel makromoleküllerin yapısını bozar. Prostat da yukarıda bahsedildiği gibi inflamasyon, hormonal dengesizlik, diyet, epigenetik modifikasyonlar (örn: *GSTP1*'de gözlenen promoter hipermetilasyonu) gibi olayların bir sonucu olarak oksidatif stres gelişebilir. Son yıllarda yapılan bir çalışma, *NKX3.1* homeobox geninde fonksiyon kazanımının prostat kanser hücrelerini DNA hasarına karşı koruduğu belirlenmiştir (Bowen ve Gelmann 2010). Prostat kanser progresyonunun en erken evrelerinde tanımlanan önemli bir değişim de *NKX3 homeobox 1 (NKX3.1)* geninin fonksiyon kaybıdır. Bu gen, 8p21'de lokalizedir ve bir transkripsiyon faktörünü kodlar. Bu faktör embriyogenez sırasında prostat gelişiminin en erken habercilerinden biridir ve prostat farklılaşmasının her evresinde eksprese olmaya devam eder. Erken evre prostat kanserlerinde ve yüksek-dereceli PIN lezyonlarında, sıklıkla bu gende allelik kayıplar gözlenmekle birlikte promoter metilasyonu nedeniyle epigenetik olarak baskılandığı da düşünülmektedir (Bowen vd 2000, Asatiani vd 2005). Aynı zamanda, *NKX3.1*'in Androjen Reseptör (*AR*) promoter'ı ile de ilişkili olduğu ve negatif feedback mekanizması oluşturarak *AR* aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir (Lei vd 2006).

Prostat kanserinin erken evrelerinde gözlenen bir diğer önemli değişim de telomer kısalmasıdır ve çoğunlukla DNA hasarı ile ilişkili olup kromozomal instabiliteye neden olabilmektedir (Meeker vd 2002, 2004). Benign prostat dokularında telomeraz aktivitesinde artış gözlenmezken, birçok yüksek-dereceli PIN ve prostat kanser dokularında bu enzimin aktivitesinde artış belirlenmiştir (Koeneman vd 1998, Sommerfeld vd 1996). Bu veriler, prostat kanser progresyonunun telomer uzunluğu ile ilişkili olduğunu göstermekle birlikte telomer uzunluğunun kanseri nasıl başlattığı veya hücresele yaşlanmayı nasıl (selüler senescence) uyardığı ile ilgili mekanizmalar henüz net olarak bilinmemektedir. Hücresele yaşlanma yaşla-ilişkili bir olaydır ve yaşlı dokularda bu hücrelerde artış gözlenir (Castro vd 2003). Oksidatif stres ve DNA hasarı hücresele yaşlanmayı uyaran önemli faktörlerdir. Hücresele yaşlanma, onkogenik

uyarılardan sonra malign fenotipin ortaya çıkışını önleyen güçlü bir tümör baskılayıcı mekanizma olarak tanımlanmaktadır. Ancak, prostat fibroblast hücre yaşlanmasının, komşu prostat epitel hücrelerinin sağkalımını ve proliferasyonunu arttırdığı gösterilmiştir (Bavik vd 2006). Bu da bize hücre yaşlanmayı bertaraf etmek için başlatılan onkogenik sürecin (ek onkogenik uyarılarla birlikte) hastalığın progresyonunu uyardığını göstermektedir.

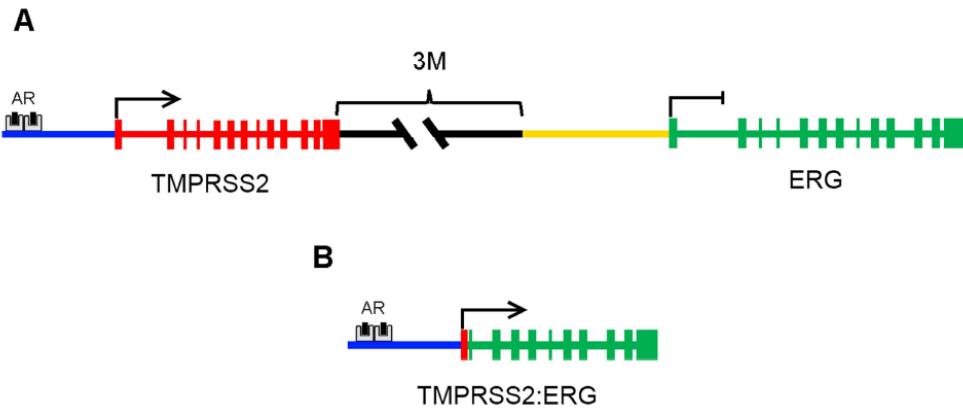
MYC, hücre döngüsü proliferasyonu, protein sentezi, mitokondri fonksiyonu gibi önemli hücresel olayların regülasyonunda rol oynayan önemli bir transkripsiyon faktörüdür. Bu nedenle, genetik ve epigenetik değişimler sonucu bu gende gözlenen deregülasyon birçok kanserle ilişkilendirilmiştir (Albihn vd 2010). Birçok PIN lezyonlarında ve prostat kanser dokularında nükleer MYC proteininin gen amplifikasyonu olmaksızın aşırı eksprese olduğu ve bu ekspresyon paterninin de kanserin başlangıcında önemli rol oynayabileceği belirlenmiştir (Gurel vd 2008, Koh vd 2010). Metastatik prostat kanserli olguların yaklaşık %90'ında MYC onkogeninin amplifiye olduğu bilinmektedir (Jenkins vd 1997). MYC'nin aşırı ekspresyonu en azından iki mekanizma ile prostat kanser süreciyle ilişkilidir. Bunlardan ilki, prostat epitelyum hücrelerinin transformasyonuna neden olmasıdır ve MYC aşırı eksprese eden transgenik farelerde adenokarsinomların geliştiği bildirilmiştir (Gil vd 2005, Iwata vd 2010). Bir diğer mekanizma, MYC'nin prostat kanser sürecinde yer aldığı bilinen genlerin regülasyonunda rol oynamasıdır. MYC, *NKX3.1*'in negatif regülasyonunda rol oynarken, hücrelerde farklılaşma programını uyan "Enhancer of Zeste homolog 2" (EZH2)'yi pozitif olarak regüle etmektedir (Iwata vd 2010, Koh vd 2011).

Özetle, prostat kanser sürecini başlattığı düşünülen mekanizmalar inflamasyon, oksidatif stres, DNA hasarı, telomer kısalması, hücre yaşlanma, genetik ve epigenetik değişimlerdir.

2.4.7.3. Progresyonda Gözlenen Değişiklikler ve Moleküler Mekanizmaları

TMPRSS2-ERG (Transmembrane protease, serine 2 - Erythroblastosis virus E26 transforming sequence (ETS)-related gene) füzyonu, daha önceki yıllarda erken evre prostat kanserlerinde sıklıkla gözlenen bir değişim olarak tanımlanmakla birlikte, son yıllarda yapılan çalışmalar bu yeniden düzenlenmenin ya kanser başlangıcından sonra oluştuğunu ya da alternatif olarak klinik progresyona yatkınlık gösteren erken evre

olaylardan biri olduğunu desteklemektedir (Şekil 2.8). *TMPRSS2*, androjene maruz kalma sonrası prostat epitelyal hücrelerinden salınan bir serin proteazdır ve *ETS* onkogen ailesinin iki önemli üyesi (*ERG* veya *ETV1*) ile füzyon yapar. *ERG* geninin, prostat kanserlerinde (yaklaşık %72) en sık aşırı eksprese olan proto-onkogen olduğu ve bu nedenle de prostat karsinogenezinde kritik bir mekanizmayı yönlendirdiği bilinmektedir (Tomlins vd 2005, Jeremy vd 2009). *TMPRSS2-ERG* füzyon sıklığı yüksek-dereceli PIN lezyonlarında yaklaşık %15-20, yerleşik prostat kanserlerinde ise %50 iken benign prostat lezyonlarında gözlenmeyen bir değişimdir (Shen ve Abate-Shen 2010). Bu sonuçlar bize, yukarıda da bahsedildiği üzere *TMPRSS2-ERG* füzyonunun ya kanser başlangıcından sonra oluştuğunu ya da alternatif olarak klinik progresyona yatkınlık gösteren erken evre olaylardan biri olduğunu düşündürmektedir.



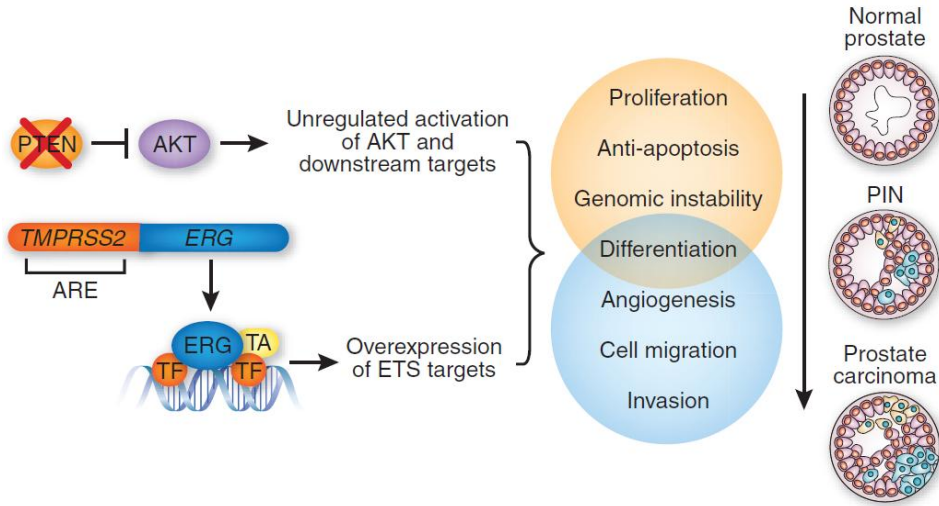
Şekil 2.8 (A) Normal genomik düzenleme: *TMPRSS2* ve *ERG* genleri 21. kromozomda lokalizedirler ve yaklaşık 3 megabazlık uzaklıkla birbirlerinden ayrılmaktadırlar. Prostat hücrelerinde, *TMPRSS2* ekspresyonu aktifken (androjen reseptör (AR) regülasyonu ile), *ERG* ekspresyonu inaktiftir. **(B)** *TMPRSS2-ERG* gen füzyonu. En yaygın gözlenen yeniden düzenlenmede, *TMPRSS2*'nin gen düzenlenme bölgesi ve birinci ekzonu *ERG*'nin dördüncü ekzonuna füzyon yapar. Sonuçta; *ERG*, AR ile regüle edilebilir duruma gelir ve artık ekspresyonu aktiftir (Mavi ve sarı bölgeler gen düzenlenme bölgelerini ve siyah bölge de iki gen arasındaki genomik alanı göstermektedir) (Tomlins SA vd 2005)

TMPRSS2-ERG füzyonu, *ERG*'nin androjenle-yönetilen aşırı ekspresyonuna neden olur ve bu ekspresyon paternini taşıyan prostat kanserlerinin %90'ından fazlasında bu füzyonun varlığı belirlenmiştir. *ERG* aşırı ekspresyonunun fonksiyon çalışmaları, hücre proliferasyonunda artış olmaksızın hücrelerin migrasyonunu ve invazyonunu uyardığı göstermiştir. *ERG*, prostat kanser hücrelerinde metalloproteinazları (örn; matriks

metallopeptidaz 3 gibi) ve plazminojen aktivatör yolak genlerini (örn; plazminojen aktivatör doku (*PLAT*)) aktive eder. Genin sessizleştirme çalışmaları da, bu genin prostat kanser hücrelerinin farklılaşmış durumlarının korunmasında rol oynadığını göstermektedir. Aynı zamanda ERG'nin hücrelerde dediferensiasyon programını uyarıcı "EZH2" olarak adlandırılan polikomb grubu proteinin de direkt aktivatörü olduğu belirlenmiştir (Tomlins vd 2005, Shen ve Abate-Shen 2010). *ERG*'nin yeniden düzenlenmesi PIN lezyonlarında nadiren gözlenmektedir ve bu nedenle de prostat kanser progresyonunda erken dönemde gözlenen bir değişiklik olarak değerlendirilmektedir.

ERG yeniden düzenlenmeleri, *PTEN* kaybının var olduğu prostat kanserlerinin çoğunda gözlenen genetik değişimlerdir. *PTEN* kaybı ve *ERG* yeniden düzenlenmelerinin birbirlerine eşlik eden olaylar olduğu düşünülmektedir (Şekil 2.9) (King vd 2009). *PTEN*, prostat kanseri de dahil birçok kanser türünde sıklıkla mutasyona ya da delesyona uğramış bir tümör baskılayıcı genidir. Prostat kanserinde sıklıkla *PTEN*'in lokalize olduğu 10q23 bölgesinde allelik kayıplar gözlemlendiğinden, *PTEN* ekspresyon kaybı genellikle bu nedendir. Bu mekanizmanın yanısıra mutasyonlar ve ekspresyonundaki azalmaya neden olan diğer mekanizmalar da *PTEN* fonksiyon kaybına neden olmaktadır. *PTEN*'in allelik kaybı, prostat karsinogenezinin erken dönemlerinde gözlenmekle birlikte, metastatik ve kastrasyon-dirençli dönemde çok daha yaygın görülen bir değişikliktir. Aynı zamanda, prostat kanserlerinde *PTEN* inaktivasyonunun *NKX3.1* fonksiyon kaybı, *c-Myc* proto-onkogeninin ve/veya *TMPRSS2-ERG* füzyonunun aktivasyonu ile de ilişkili olduğu gösterilmiştir. Dolayısıyla, *PTEN* ekspresyon kaybının özellikle kastrasyon-dirençli prostat kanserinin gelişimine öncülük ettiği düşünülmektedir (Shen ve Abate-Shen 2010).

Son yıllarda yapılan bir çalışma, primer prostat kanserlerinin %40'ında ve metastatik prostat kanserlerinin de %100'ünde PI3K yolağında deregülasyonların veya mutasyonların varlığını belirlemiştir (Taylor vd 2010). PI3K yolağı, negatif olarak *PTEN* tarafından regüle edilmektedir ve bu yolağın aktivasyonunun prostat kanserinde kastrasyon-direncini yönlendirdiği düşünülmektedir. PI3K yolağı, hücre proliferasyonunu ve hücre sağkalımını yönlendiren en önemli yollardan biridir. Bu yolak bir kez aktive olduğunda, AKT gibi önemli sinyallerin yer aldığı downstream sinyal iletim kaskadını başlatarak hücrede sağkalım, proliferasyon, hücre döngüsünde



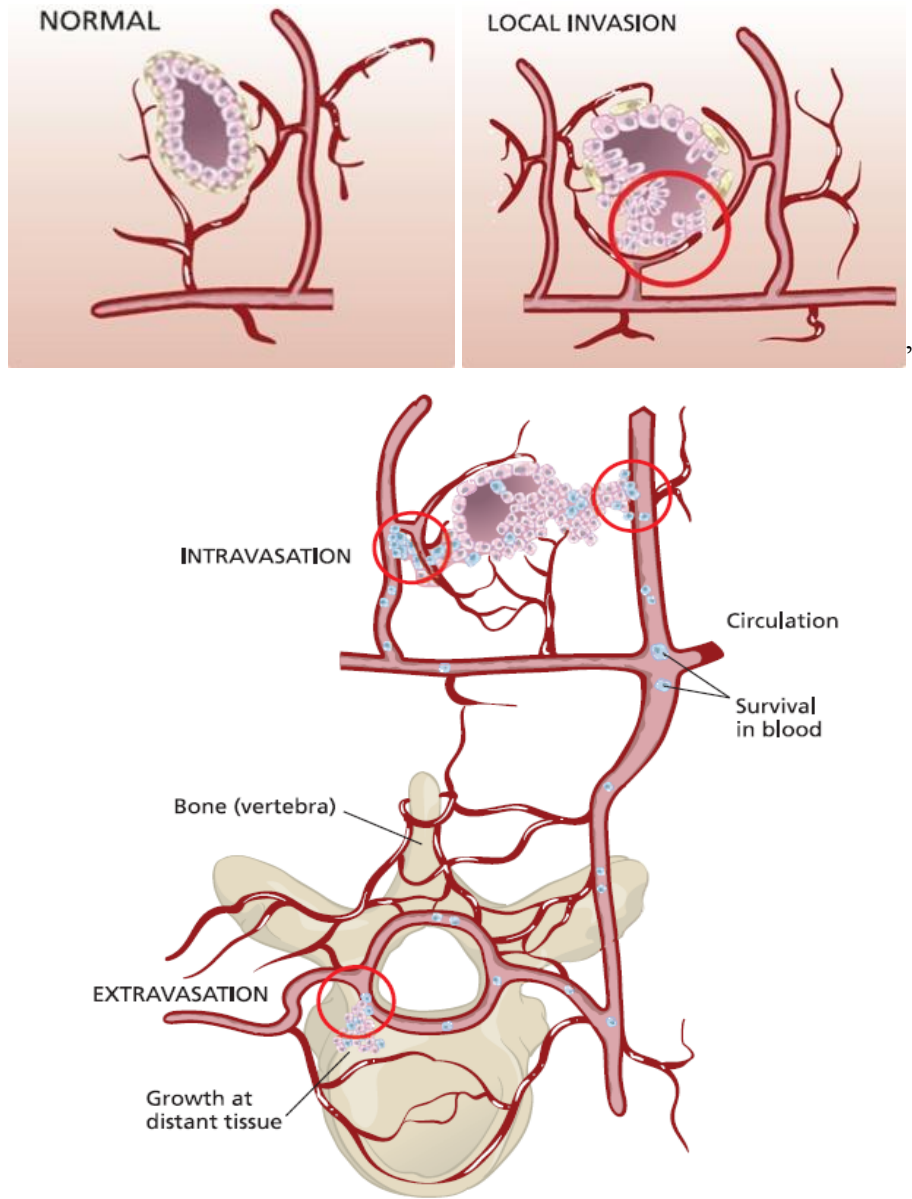
Şekil 2.9 Prostat kanser progresyonunda yer alan yollar. *PTEN* fonksiyon kaybı ve buna eşlik eden *AKT*, *TMPRSS2-ERG* füzyon proteini ile birlikte, downstream sinyal iletim yollarının aktivasyonunu sağlayarak, prostat kanserinin progresyonunu uyarırlar. ARE, androjen yanıt elementleri; TA, transkripsiyonal aktivatör; TF, transkripsiyon faktörü (Jeremy 2009)

ilerleme, büyüme, göç ve anjiyogenez gibi önemli hücrel olaylara neden olmaktadır (Şekil 2.9). *PTEN*-null hücrelerde *AKT*'nin sürekli aktif olduğu gösterilmiştir. Prostat kanserinde *PTEN* fonksiyon kaybının *AKT*/mTOR upregülasyonu ile sonuçlandığını göstermiştir. *AKT*/mTOR sinyal iletim yolağının aktivasyonu özellikle kastrasyon-dirençli prostat kanserinde gözlenmekle birlikte, bu yolaktaki disregülasyonun anti-androjenik tedaviye dirençle ilişkili olduğu belirlenmiştir. *AKT* sinyal iletimi ile birlikte koordineli olarak regüle edilen bir diğer sinyal iletim yolağı Erk/MAPK sinyal iletim yolağıdır ve özellikle ileri evre prostat kanserlerinde aktif olan bir yoldur. Prostat kanserlerinde bu yolağın aktivasyonu ile gerçekleşen kaskadlar net olarak bilinmemekle birlikte, büyüme faktörlerinin yer aldığı sinyal iletiminin aşırı düzeyde aktivasyonu ile ilişkilendirilmiştir (Shen ve Abate-Shen 2010, Jeremy 2009).

2.4.7.4. Metastatik Prostat Kanserinde Gözlenen Değişiklikler ve Moleküler Mekanizmaları

Tanı sırasında prostat kanserli hastaların yaklaşık %25'i ileri evre veya metastatik dönemdedir. Prostat kanseri öncelikle kemik metastazı yapan bir kanser türüdür ve metastazları genellikle osteoblastiktir (Şekil 2.10). Sekonder metastaz alanları ise sıklıkla akciğer, karaciğer ve plevradır (Logothetis ve Lin 2005). Klinik açıdan prostat kanserinde metastazın büyük önemi vardır ve birçok çalışma tümör hücrelerinin kemik

iliğine ve kan dolaşımına yayılabilme özelliklerine odaklanmıştır. Son yıllardaki çalışmalar, metastazlı hastaların sirkülasyondaki tümör hücrelerinde, ileri evre prostat kanserlerinde tipik olan birçok farklı kromozomal yeniden düzenlemeler gözlenmiş ve bu da bize kanser progresyonu sırasında genomik instabilitenin devam ettiğini göstermektedir (Attard 2009, Leversha vd 2009). Ancak yayılım gösteren tümör hücreleri ile metastaz oluşumu arasındaki ilişki net olarak çözülememiştir ve prostat kanserlerinin kemik dokusuna metastazını uyaran moleküler faktörler net olarak bilinmemektedir.



Şekil 2.10 Prostat metastaz basamakları: lokal invazyon, intravazasyon, kan dolaşımında canlı kalabilme, ekstrasvazyon ve farklı bir dokuda (vertebra) çoğalmadır (Scott vd 2006).

EZH2 bir polikomb grubu genlerinden biridir ve histon proteini H3'ün lizin 27 (H3K27)'sinin trimetilasyonunu katalizleyen bir histon lizin transferazı kodlar. Bu enzim, birçok agresif tümörlerde aktiftir ve dolayısıyla gen transkripsiyonunun baskılanması ile ilişkilidir. Büyüme ve farklılaşma gibi birçok önemli hücrel olaylarda yer alan genler, *H3K27* metilasyonu için hedefler. İleri evre prostat kanserlerinde *EZH2* gen ekspresyonunun sıklıkla arttığı belirlenmiştir. Bu artışın nedenleri arasında gen amplifikasyonu, miR-101 ve ERG yer almaktadır (Shen ve Abate-Shen 2010, Yu vd 2010). ERG direkt olarak *EZH2* promotor'una bağlanır ve *EZH2*'nin hedef aldığı genlerin epigenetik sessizleşmesini regüle eder. Bu genlere en iyi örneklerden biri *NKX3.1*'dir. Diğer iki önemli hedef gen de *E-cadherin* ve *DAB2IP* (DAB2 interacting protein)'dir ve bu genler özellikle metastatik prostat kanserleri ile ilişkilendirilmektedir. *DAB2IP*'nin transkripsiyonal olarak sessizleşmesi Ras sinyal iletim yolağını aktive ederek tümör gelişimine ve *NF-KB*'yi aktive ederek de metastaz gelişimine neden olur (Shen ve Abate-Shen 2010).

Tümör protein 53 (TP53) bir transkripsiyon faktörüdür ve tümörlerde genellikle mutasyonlar nedeniyle inaktiftirler. TP53, hücreleri DNA hasarından ve onkogen aktivasyonundan koruyan önemli bir proteindir. Mutasyonlar nedeniyle tümör baskılayıcı özelliğini kaybetmesinin yanı sıra, *TP53* genindeki birçok mutasyonun gene onkogenik özellikler kazandırdığı bilinmektedir (Brown vd 2009). Prostat kanserlerinde *TP53* mutasyonlarının görülme sıklıkları kendine özgü bir farklılık göstermektedir. Primer prostat kanserlerinde *TP53* mutasyon sıklığı yaklaşık %5 iken, metastatik ve kastrasyon dirençli tümörlerde bu sıklık artmaktadır (sırası ile %16 ve %26) (Schlomm vd 2008).

2.4.7.5. Prostat Kanserinde Androjen Reseptörü (AR) Sinyal İletimi

Prostat kanseri etyolojisi ve progresyonu açısından oldukça heterojen bir hastalık olmasına rağmen, AR aracılığı ile sinyal iletim yolağı hastalıkla ilgili her durumda rol oynayan bir yolaktır.

Prostat gelişimi ve fizyolojik fonksiyonları açısından androjenler son derece önemli hormonlardır ve nükleer hormon reseptörü olan androjen reseptörü (AR) aracılığı ile aktive edilirler. AR, prostat-spesifik genlerin ekspresyonunun uyarılmasını ve farklılaşmış prostat epitelyum fenotipinin korunmasını sağlarlar. Prostat hücrelerinde

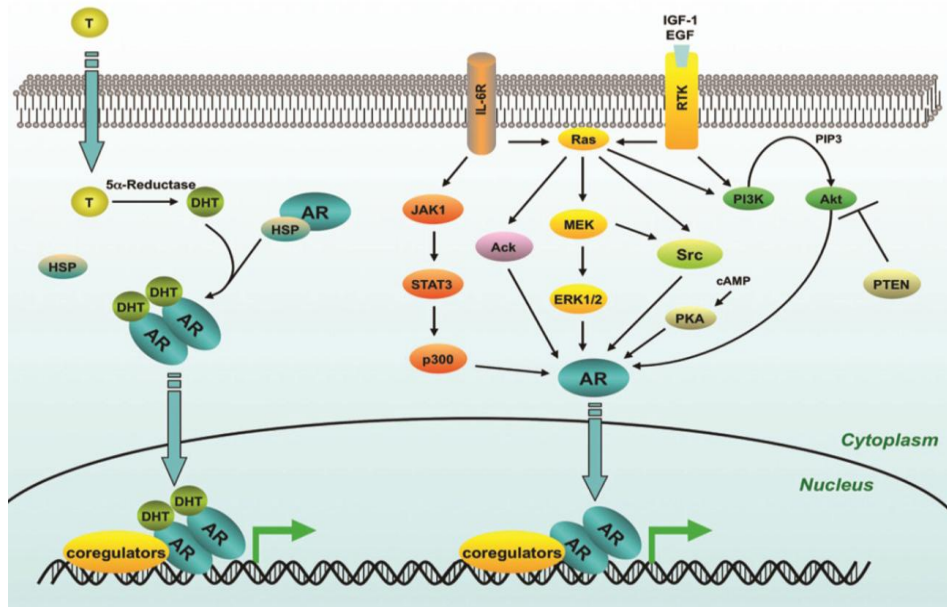
regüle ettikleri önemli hücresel olaylar protein sentezi ve salınımı, hücre döngüsü, hücre sağkalımı ve apoptozdur. Normal fizyolojik koşullarda, ligand yokluğunda, AR primer olarak sitoplazmada lokalizedir ve ısı şok proteinleri (HSP-90, -70, -56), hücre iskeleti elemanları ve diğer şaperonlarla etkileşim halindedir. Ligandın (testesteron ve DHT) reseptöre bağlanması, AR'de konformasyonel bir değişime neden olur ve AR içindeki hidrofobik bölge AR dimerizasyonunun gerçekleşmesine neden olur. Dimerizasyonla birlikte, AR'ye koaktivatörler bağlanır ve bu koaktivatörlerin yarattığı ek bağlanma bölgeleri, farklı sınıf koaktivatörlerin de AR'ye bağlanması sağlar. Tüm bu etkileşimler, AR'nin nükleusa hedeflenmesini kolaylaştırır. AR nükleus içine girdiğinde, androjen-hedefli genlerin (örn: PSA) promoter ve enhancer bölgelerinde bulunan ve androjen yanıt element (ARE)'leri olarak adlandırılan spesifik tanıma bölgelerine bağlanırlar. Bu bağlanma, koaktivatörlerin ve koreseptörlerin bölgeye çekilmesini sağlar ve sonuçta gen ekspresyonunun düzenlenmesi sağlanır (Lonergan vd 2011).

Genç yaşta kastre edilen erkeklerde prostat kanserinin oluşmaması AR sinyal iletiminin prostat kanserinin oluşmasında son derece önemli olduğunu göstermektedir. Aynı zamanda, malign prostat hücrelerinde hücresel de-diferensiasyonun varlığı, AR aktivitesi ve hedef genlerinde bir değişim olduğunu göstermektedir. Prostat kanserinin progresyonu sırasında, AR bir pro-diferensiasyon faktörü olmak yerine artık bir pro-proliferasyon faktörüdür (Wang Q vd 2009).

Prostat kanserinde AR'lerin tümör progresyonunu etkileyebileceği düşünülen en az 3 mekanizma bulunmaktadır. Bunlardan ilki reseptör ekspresyonu ve aktivasyonunda artıştır. Yeni tanı alan ve tedavi almamış prostat kanserli hastalarda, testosteronun serum düzeyindeki düşüklüğün yüksek AR ekspresyonu ve yüksek Gleason derecesi ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Aynı zamanda rekürrens-free sağkalımda azalma ve progresyondaki artış da, yüksek AR ekspresyonu ile ilişkili bulunmuştur. Bu nedenle AR ekspresyonundaki artış, prostat kanser başlangıcı ile değil, progresyonu ile ilişkilendirilmektedir (Lonergan vd 2011). Prostat kanserlerinin endokrinolojik tedavisi sirkülasyondaki testiküler androjenlerin deprivasyonunu, cerrahi kastrasyonu ve kimyasal kastrasyonu içermektedir ve bu tedaviler primer olarak AR aktivitesinin düzenlenmesini hedeflemektedir.

İkinci önemli mekanizma ise AR mutasyonlarıdır. AR geni, en sık mutasyona uğrayan steroid reseptör genidir. Günümüze kadar AR geninde 660'dan fazla mutasyon tanımlanmıştır ve bunların büyük bir çoğunluğu androjen-insensitivite sendromunun malign olmayan farklı klinik kategorileri ile ilişkilendirilmiştir. Tedavi almamış lokalize prostat kanserlerinde mutasyon sıklığı düşükken (<2%), ileri evre ve metastatik tümörlerde bu sıklığın arttığı (<50) gözlenmiştir. Prostat kanserlerinde gözlenen fonksiyon kazanım mutasyonları genellikle genin fonksiyonel bölümlerinde ve nadiren de genin UTR bölgelerinde gözlenmektedir. Bu mutasyonlar reseptörün hormon-bağlanma bölgesindeki değişikliklere neden olması kadar trans-aktivasyon özelliklerinde de değişimlere neden olarak, AR'de yapısal değişikliklere ve dolayısıyla da aktivitesinde değişikliklere neden olurlar (Koochekpour 2010).

Androjen yokluğunda AR sinyal iletiminde önemli bir mekanizma da AR'nin ligand-bağımsız aktivasyonudur. Bu atipik bir reseptör aktivasyonudur ve birçok steroid hormon reseptörlerinde gözlenen bir mekanizmadır. Prostat kanser hücrelerinde insülin-benzeri büyüme faktörü (IGF), epidermal büyüme faktörü (EGF), keratinosit büyüme faktörü, Her2/neu ve IL-6 gibi bazı büyüme faktörlerinin AR'yi aktive ettiği bilinmesine rağmen, bu ligand-bağımsız aktivasyonun mekanizması net olarak aydınlatılamamıştır (Lonergan vd 2011, Koochekpour 2010)



Şekil 2.11 Prostat kanserinde temel AR sinyal iletim yolları. Dihidrotestesteronun bağlanması ile AR nükleusa geçer ve hedef gene bağlanarak, ekspresyonunu regüle eder. AR, dihidrotestesteron yokluğunda da transaktive olabilir. IL-6, IGF ve EGF aktive edici sinyallere örneklerdir (Lonergan vd 2011).

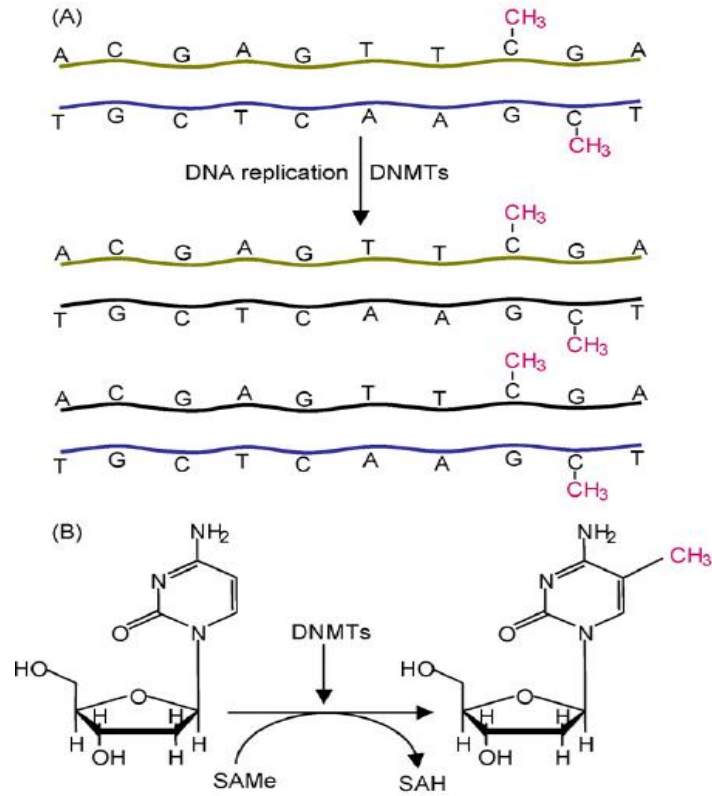
2.4.8. Prostat Kanserinde Gözlenen Epigenetik Mekanizmalar

Şu anda çok iyi biliyoruz ki, genom sadece özgün dizilere sahip DNA molekülü değildir ve DNA çift sarmalında bulunan bilginin doğru yorumu için nükleusun 3 boyutlu yapısında yer alan kromatin fiberleri, bunlarla ilişkili proteinler ve diğer nükleer komponentler gereklidir. Epigenetik terimi DNA molekülünün sahip olduğu baz çifti dizisinde değişiklik olmaksızın, gen ekspresyonundaki kalıtsal değişiklikleri tanımlamak için kullanılmakla birlikte, epigenetik ile ilgili çalışma alanı DNA dizisinde değişiklik olmaksızın özel bir genomik lokusun veya bir kromozomun sonucunu değiştirebilen her bir moleküler mekanizmayı kapsamaktadır (Espada ve Esteller 2010, Heyn ve Esteller 2012). Epigenetik mekanizmalar; DNA metilasyonu, histon kuyruklarının kovalent modifikasyonu, nükleozom korlarının ATP-bağımlı yeniden düzenlenmesi ve transkribe olan kodlama yapmayan RNA'lar olarak sınıflandırılabilirler ve birçok önemli hücrenel olayda rol oynarlar.

2.4.8.1. DNA Metilasyonu

DNA metilasyonu, DNA molekülünün tek reversible kimyasal modifikasyonudur ve DNA dizisinde değişim olmaksızın kalıtılabilir. Somatik memeli genomunda DNA metilasyonu, simetrik olarak CpG dinükleotidlerinde meydana gelir ve sitozinin 5. karbonuna metil grubunun eklenmesidir (5mC) (Şekil 2.12). Memelilerde non-CpG metilasyonu sadece embriyonik kök hücrelerde bulunur. Memeli non-transforme somatik hücrelerde, toplam GC içeriği %40-45 iken, CpG dinükleotidlerinin bulunma sıklığı beklenmedik şekilde düşüktür ve DNA molekülündeki tüm dizilerin %1-4'üne karşılık gelir. Memeli genomunda, tipik olarak tüm CpG alanlarının %60-90'ı metiledir ve DNA'daki tüm nükleotidlerin %0.75-1'ini 5mC oluşturur. Bu, kabaca tüm sitozinlerin %4-6'sının metile olduğu anlamına gelir ve bu metile sitozinlerin bazılarının CpG dinükleotidleri dışında da metile olduğunu göstermektedir (Espada ve Esteller 2010, Heyn ve Esteller 2012).

Genom stabilitesinin korunmasında, imprinte genlerin sessizleşmesinde, X-kromozom inaktivasyonunda ve transpozonlarla diğer parazitik dizilerin kalıcı sessizleştirilmesinde DNA metilasyonu son derece önemli bir mekanizmadır. Ancak, memeli genomundaki genlerin %60'ından fazlası promoter bölgelerinde bir CpG adası içermezler ve bu genlerin CpG-metilasyon bağımsız bir yolla regüle edildikleri



Şekil 2.12 DNA metilasyonunun kimyasal temeli. (A) Memeli genomunda DNA metilasyonu, hemen hemen sadece CpG dinükleotidlerdeki sitozin rezidülerinde meydana gelir. (B) DNMT'ler, metil grubu kaynağı olarak SAME'yi kullanır. SAME, metil grubunu verince S-adenozil homosisteine (SAH) dönüşür. DNA metiltransferazlar, sitozinin primidin halkasının 5'-pozisyonuna metil grubunun eklenmesini katalize ederler (Espada ve Esteller 2010).

düşünülmektedir. DNA metilasyonu tek kalıtılabilir epigenetik belirteç olduğundan, DNA metilasyon paternlerinin yavru hücrelere doğru aktarımı ve korunması, hücre döngüsünün önemli bir mekanizmasıdır. CpG nükleotidlerinde DNA metilasyonundan sorumlu enzimler, DNA metiltransferaz (DNMT) protein ailesinin üyeleridir. Bu enzimler metil gruplarının donörü olarak S-adenozil-L-metiyonin (SAME)'i kullanırlar. Memelilerde, DNA metiltransferaz ailesininin 5 üyesi bulunmaktadır: DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B ve DNMT3L. DNMT1, somatik hücrelerde en fazla bulunan DNMT'dir. DNMT3A ve DNMT3B başlıca embriyonik ve non-diferensiyel hücrelerde ve embriyo implantasyonu (embriyo genomunda “*de novo*” DNA metilasyon dalgalarının meydana geldiği sırada embriyo gelişiminini kritik bir basamağıdır) sırasında eksprese edilir. Bu nedenle her iki protein de “*de novo*” DNMT'ler olarak adlandırılırlar. Ancak, birçok çalışma *in vivo* DNMT1'in DNMT3A ve 3B kadar “*de novo*” metilasyon fonksiyonuna sahip olduğu ve global DNA metilasyon paterninin oluşturulmasında işbirliği içinde olduğunu göstermiştir. DNMT2, diğer DNMT'lerden

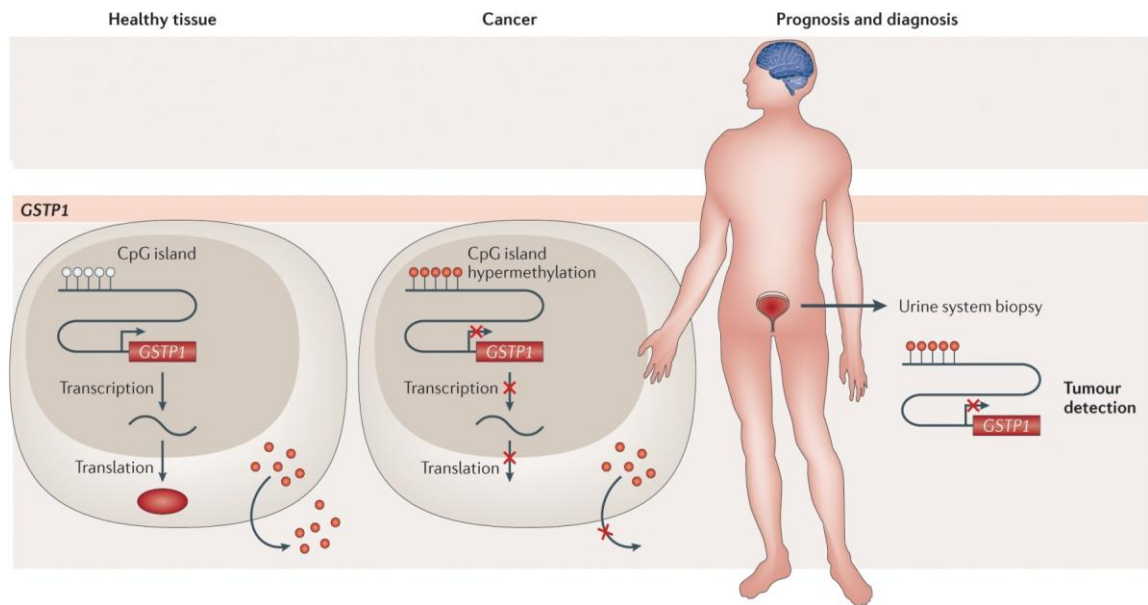
farklı olarak N-terminal regülatör domainini içermez ve bu nedenle daha düşük DNA metiltransferaz aktivitesine sahiptir (Espada ve Esteller 2010).

Hücre nükleusunda, temel 10 nm'lik kromatin yapısı, 30 nm'lik kromatin fiberlerine kondanse olur ve daha sonra çok daha kompakt şekilde paketlenir. Kromatin kondenzasyonunun başlangıç evrelerinde, histon modifiye edicilerin ve ATP-bağımlı kromatin remodeling komplekslerin nükleozomun temel yapısını değiştirerek transkripsiyonal etkilerinin olduğu düşünülmektedir. Bu aktiviteler, spesifik bölgelerde CpG'leri metile etmek için kromatin fiberlere DNMT'lerin toplanmasına neden olabilir. Bir sonraki basamakta, metil grubuna-bağlanan proteinler yeni metile olan DNA'ya bağlanabilir ve kromozom filamentlerinin tam olarak kompakt yapısının oluşmasına yardım edebilir. Böylece, DNA metilasyonu açık kromatin yapısından kapalı kromatin yapısına geçişle ilişkilidir. Bu konformasyonel değişim, sıklıkla gen transkripsiyonunun güçlü inhibisyonu ile ilişkilidir. DNA metilasyonu ile uyarılan transkripsiyonal sessizleşmeyi açıklayabilen 3 model bulunmaktadır. Bunlardan ilki, CpG metilasyonu, dizi-spesifik transkripsiyon faktörlerinin kromatin fiberlerdeki kendi bağlanan bölgelerine bağlanmasını kendiliğinden inhibe eder. Bu model, E2F, CREB ve c-myc transkripsiyon faktörlerinde gözlenen bir mekanizmadır. İkinci modelde, CpG metilasyonu özelleşmiş nükleozom yapısının oluşmasını uyararak nükleozom pozisyonu üzerinde direkt etkiye sahiptir. Üçüncü modelde, DNA metilasyonu, metile CpG dinükleotidlerini tanıyan nüklear faktörlerin kromatin fiberlerdeki spesifik bölgelere toplanmasını uyarır veya hedef bölgelere diğer nüklear faktörlerin toplanmasını geciktirir / engeller veya direkt olarak transkripsiyonun baskılanması etkisine sahiptir (Espada ve Esteller 2010).

Genomik DNA metilasyon düzeyinde azalma ile karakterize global hipometilasyon, kanserin genel özelliklerinden biridir ve genellikle proto-onkogenlerin aktivasyonu ve kromozomal instabilite ile ilişkilendirilmektedir. Gen-spesifik hipermetilasyon, global hipometilasyondan sonra şekillenmektedir ve genellikle kanserde epigenetik tedavi olasılıkları ve biyomarker araştırmalarında yer almaktadır (Heyn ve Esteller 2012). Prostat kanserlerinde en sık çalışılan epigenetik modifikasyon DNA metilasyonudur. Prostat kanserinin hem oluşumunda hem de progresyonunda rol oynadığı düşünülmektedir (Jeronimo vd 2011, Chiam vd 2012). Günümüzde, prostat kanserinde hipermetile olduğu belirlenen 50'nin üzerinde gen identifiye edilmiştir (Park 2010,

Chiam vd 2012). Bu genler DNA tamir genleri, hücre döngüsü kontrol genleri, apoptoz genleri, hormonal yanıt genleri, sinyal iletiminde yer alan genler ve hücre invazyon/metastaz genleri olarak gruplandırılabilir (Tablo 2.4).

Prostat kanserinde en iyi bilinen epigenetik modifikasyon *GSTP1*'in DNA metilasyonudur (Şekil 2.13). Serum PSA düzeyi ile karşılaştırıldığında daha spesifik olması (>%90), BPH ve yüksek-dereceli PIN gibi diğer prostata özgün hastalıklardan kanseri ayırt edebilmesi, metilasyon düzeyinin hastalığın evresi ve tedavi sonrası rekürrens ile ilişkili olması, serum, plazma ve idrar örneklerinden de analizinin yapılabilmesi prostat kanserlerinde *GSTP1* metilasyonunu önemli bir epigenetik biyomarker yapmak için yeterli nedenlerdendir (Chiam vd 2012). Son yıllarda yapılan bir çalışmada, *GSTP1*, *RASSF1A*, *CDH1*, *APC*, *DAPK*, *MGMT*, *RARβ2* ve *TIMP3* genlerinin hipermetilasyon durumlarının kontrol grubuna göre prostat kanserli olgularda daha yüksek oldukları ve *GSTP1*, *RASSF1A*, *RARβ2* ve *APC* genlerinden oluşan 4'lü gen hipermetilasyon profilinin %86 duyarlılık ve %89 özgünlükle kanserli olguları kontrol grubundan ayırabildiği gösterilmiştir (Roupret vd 2007).



Şekil 2.13 *GSTP1*: Prostat kanserinin tanı ve prognozunda epigenetik profil örneği. Sağlıklı hücrelerde, *GSTP1* ksenobiyotiklerin ve karsinojenlerin (kırmızı daireler) hücresel detoksifikasyonunda rol oynar. Tümör hücrelerinde *GSTP1*'in hipermetilasyonu, genin transkripsiyonal olarak baskılanması ile ilişkilidir ve ksenobiyotiklerle karsinojenlerin hücresel birikimine neden olarak tümör oluşumuna yardım eder. *GSTP1* hipermetilasyonu, prostat biyopsileri ile birlikte serum ve idrar örneklerinde malign hücrelerin varlığını gösteren bir biyolojik belirteç olarak kullanılmaktadır. (Heyn ve Esteller 2012'dan alınarak modifiye edilmiştir).

Tablo 2.4 Prostat kanserinde fonksiyonlarına ve yer aldıkları yollara göre sıklıkla hipermetile olan genler *

Yolak	Gen	Gen tanımı	Sıklık (%)
Hormonal yanıt	<i>AR</i>	Androjen reseptör	15-39
	<i>ESR1</i>	Östrojen reseptör 1	19-95
	<i>ESR2</i>	Östrojen reseptör 2	83-92
	<i>RARβ2</i>	Retinoikasit reseptör β2	68-95
	<i>RARRES1</i>	Retinoikasit reseptör yanıtlayıcı 1 (<i>TIG1</i>)	55-96
Hücre döngüsü kontrolü	<i>CCND2</i>	Siklin D2	32-99
	<i>CDKN2A</i>	Siklin-bağımlı kinaz inhibitörü 2A (<i>p16</i>)	3-77
	<i>RPRM</i>	Reprimo	-
	<i>SFN</i>	Stratifin (14-3-3 sigma)	99
Sinyal iletimi	<i>DKK3</i>	Dickkopf 3	68
	<i>EDNRB</i>	Endotelin reseptör tip B	15-100
	<i>RASSF1A</i>	Ras ortak domain ailesi proteini 1 izoform A	53-99
	<i>RUNX3</i>	Runt-ilişkili transkripsiyon faktörü 3	27-44
	<i>SFRP1</i>	Salgılanan frizzled-ilişkili protein 1	83
Tümör invazyonu	<i>APC</i>	Ailesel adenomatöz polipozis	27-100
	<i>CAV 1</i>	Kaveolin 1	90
	<i>CDH1</i>	E-cadherin	27-69
	<i>CDH13</i>	Cadherin 13	45-54
	<i>CD44</i>	Cluster farklılaşma antijeni 44	19-72
	<i>LAMA 3</i>	α-3 laminin	44
	<i>LAM C2</i>	γ-3 laminin	41
	<i>TIMP3</i>	TIMP metalopeptidaz inhibitör 3	0-97
DNA hasar tamiri	<i>GSTM1</i>	Glutasyon S-transferaz M1	58
	<i>GSTP1</i>	Glutasyon S-transferaz P1	79-95
	<i>GPX3</i>	Glutasyon peroksidaz 3	93
	<i>MGMT</i>	O-6-metilguanin DNA metiltransferaz	0-76
Apoptoz	<i>ASC</i>	Apoptoz-ilişkili Speck-benzeri protein içeren bir CARD	37-78
	<i>BCL2</i>	B hücre lenfoma 2	52-87
	<i>DAPK</i>	Ölüm-ilişkili kinaz	0-36
Diğer	<i>MDR1</i>	Çoklu ilaç direnç reseptörü 1	51-100
	<i>PTGS2</i>	Prostaglandin endoperoksidaz sentez 2	18-88
	<i>HIC</i>	Kanserde hipermetile	99-100

*: (Jerónimo vd 2011)'dan alınmıştır.

2.4.8.2 Histon Modifikasyonları

Kromatin, nüklear DNA'nın daha yüksek düzen içerisinde organize olmuş halidir ve temel birimi nükleozomdur. Nükleozom kor histon oktomeri (2 adet H3:H4 dimeri ve 2 adet H2A:H2B heterodimeri olmak üzere 8 adet histon proteini içerir) ve 147 bp'lik DNA'dan oluşmaktadır. Histon proteinlerinin N-terminal bölgeleri nükleozom yapısının dışında yer alır. Histon proteinlerinin türler arasında oldukça sıkı korunmuş olan bu N-terminal bölgeleri, oldukça bazik özelliktedir ve post-translasyonel modifikasyonların gerçekleştiği bölgelerden biridir. Histon proteinlerinin N-terminal bölgelerinde post-translasyonel modifikasyonların gerçekleştiği 60 farklı rezidü tanımlanmıştır ve asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon, ubiquitinasyon, sumolasyon, ADP ribozilasyon, deaminasyon ve prolin izomerizasyon olmak üzere en az 8 farklı tipte histon modifikasyonlarının gözlemlendiği bilinmektedir (Allis vd 2007). Bu tür modifikasyonlar nükleozom yapısına yeni bir grubun eklenmesine, histon proteinin elektriksel yükünün değişmesine veya spesifik proteinlerin toplanmasını sağlayarak farklı hücresel yanıtlara neden olurlar. Örneğin histon proteinlerinde yük değişimi nedeniyle bitişik nükleozomlar veya histon-DNA arasındaki temasların bozulmasına en iyi örnek histon lizin asetilasyonudur. Histon asetilasyonu lizinin pozitif yükünü nötralize eder ve bu da DNA ile histon arasındaki afiniteyi zayıflatır. Böylece kromatin çok daha kolay ulaşılabilir "açık kromatin" durumuna gelir. Bu nedenle histon asetilasyonu genellikle transkripsiyonal aktivasyonla ilişkilendirilmektedir. Ancak unutulmaması gereken bir nokta da, aynı modifikasyonun genomun farklı lokalizasyonlarında farklı sonuçlara neden olabilmesidir. Örneğin; *H3K9* ve *H3K27* metilasyonu transkripsiyonal sessizleşme ile ilişkili iken, *H3K4* ve *H3K79* metilasyonu transkripsiyonal olarak aktif gen bölgelerinde tanımlanan modifikasyonlardır. Aynı zamanda belli bir histon protein rezidüsünde gözlenen modifikasyonun şiddeti de sonucu etkilemektedir. Örneğin; *H3K79me1* aktif genlerde yoğun olarak bulunurken, *H3K79me3* transkripsiyonal olarak baskılanmış genlerde bulunmaktadır. İster aynı histon proteini üzerinde (in cis) ister aynı nükleozomun farklı histon proteinleri üzerinde (in trans) olsun, tüm histon modifikasyonları farklı hücresel olayları gerçekleştirebilmek için yoğun etkileşim içindedirler. Bu nedenle farklı veya kalıcı hücresel yanıtlara neden olabilen farklı histon modifikasyonlarının kombinasyonlarına "histon kodu" adı verilmektedir (Izzo ve Schneider 2010).

Malign hücrelerde, DNA metilasyonundaki değişimlerle uyumlu olarak genom-çaplı histon modifikasyonları da değişmektedir. Örneğin, H4 proteininde gözlenen lizin 16 asetilasyonunda azalma ve H4K20me3, insan kanserlerinin önemli bir belirteci olan DNA tekrar dizilerinin hipometilasyonu ile ilişkilidir. Aynı zamanda transkripsiyonal olarak sessizleşen genlerde gözlenen DNA hipermetilasyonu da H3K9me, H3K27me ve H3K4me ile ilişkili bulunmuştur. Bu ilişkiler bize histon asetilazlar, histon deasetilazlar, histon metilazlar ve histon demetilazlar gibi histon proteinlerini modifiye eden önemli enzimlerin ekspresyon düzeylerinin kanser gelişimi ve progresyonunda değiştiğini göstermektedir (Jerónimo vd 2011).

DNA metilasyonu ile karşılaştırıldığında, prostat kanserlerinde gözlenen histon modifikasyonları ile ilgili çalışmalar sınırlı sayıdadır. Prognostik marker belirleme amaçlı yapılan bu çalışmaların ortak sonuçlarından biri de *H3K27* metilasyonundan sorumlu bir metiltransferaz olan EZH2 enziminin prostat tümörögenezi boyunca aşırı eksprese olduğudur. EZH2 aşırı ekspresyonunun aynı zamanda önemli regülatör ve tümör baskılayıcı genlerin sessizleşmesine de neden olabileceği düşünülmektedir (Jerónimo vd 2011). Son yıllarda yapılan ve global düzeyde histon modifikasyonlarının analiz edildiği bir çalışmada, prostat kanserli dokularda H3K4me1, H3K9me2, H3K9me3, H3Ac ve H4Ac'ın önemli ölçüde azaldığı, histon lizin metilasyonu ve histon asetilasyon belirteçlerinin hastalığın klinik evresi ve Gleason skoru ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (Ellinger vd 2010).

2.4.8.3 Kodlama-yapmayan RNA'lar: miRNA'lar

MikroRNA (miRNA)'lar 18-25 nükleotid uzunluğunda, küçük kodlama-yapmayan RNA'ların önemli bir sınıfını oluşturmaktadır. Pri-miRNA olarak nükleusta sentezlenirler, işlenirler (pre-miRNA) ve sitoplazmaya geçerek olgun miRNA'lara dönüşürler. Olgun miRNA'lar hedef mRNA'ların 3' çevrilmeyen bölgesine (3'UTR) bağlanarak etkilerini gösterirler ve sonuçta komplementer baz eşleşmesinin derecesine göre ya mRNA'nın translasyonunu inhibe ederler ya da mRNA'yı degrade ederler. Günümüzde 1000'den fazla miRNA'nın var olduğu ve genlerimizin yaklaşık %30'unun miRNA'lar tarafından regüle edildikleri düşünülmektedir. Bu regülasyonun en önemli özelliği doku spesifik olmasıdır.

miRNA'lar, genlerin post-transkripsiyonal regülasyonuna neden olduklarından birçok önemli hücrel olayda rol oynadıkları bilinmektedir. Sağlıklı hücrelerle karşılaştırıldığında malign hücrelerde gözlenen önemli değişimlerden biri de miRNA ekspresyon profillerinde gözlenen değişimlerdir. Bu değişimlerin neden olduğu sonuçlara göre de miRNA'lar kendi içlerinde “tümör baskılayıcı miRNA'lar” ve “onkogenik miRNA'lar” olarak sınıflandırılmaktadırlar. Kanserde onkogenik miRNA'ların ekspresyonu artarken, tümör baskılayıcı miRNA'ların ekspresyonlarında azalma gözlenmektedir. Histon modifikasyonları gibi miRNA'lar da DNA metilasyonu ve kromatin yeniden yapılanması gibi diğer epigenetik mekanizmalarla ilişkilidirler ve epigenetik yollar arasında bir geçiş sağlarlar (Jeronimo vd 2011).

Prostat kanserinde ekspresyonlarında değişim gözlenen birçok miRNA tanımlanmıştır ve belli miRNA'ların anormal ekspresyonları prostat kanserinin tanısında, prognozunun belirlenmesinde ve sınıflandırılmasında önemli biyolojik belirteçler olarak değerlendirilmektedir. Genom-çaplı miRNA ekspresyon profillerindeki değişimlerin malign hücreleri malign-olmayan hücrelerden ayırabildiği gösterilmiştir. Kan, serum gibi vücut sıvı örneklerinde stabil yapıda olmaları ve kolaylıkla analiz edilebilmeleri, bu değişimlerin prostat kanserinin tanısında önemli biyolojik belirteçler olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir (Hassan vd 2010). Son yıllarda yapılan çalışmalar, prostat kanserlerinde *RAS*, *BCL2*, *E2F3* gibi önemli onkogenleri hedefleyen birçok miRNA'nın ekspresyonlarında azalma olduğu göstermektedir. Bu miRNA'lara en önemli örnekler tümör baskılayıcılar olarak görev yapan miR-15a ve miR-16'dır ve bu miRNA'ların allelik kayıplarının kanser oluşum sürecinde rol oynayabileceği öne sürülmüştür (Aqeilan vd 2010, Bonci vd 2008).

Onkogenik miRNA'lar olarak sınıflandırılan miR-221 ve miR222'nin prostat kanserinin gelişimi ve metastaz süreci ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Benzer şekilde, miR21 ve miR125b prostat kanser hücrelerinde aşırı eksprese olurlar ve tümör büyümesi ve metastazı ile ilişkilidirler (Hassan vd 2012). Aynı zamanda Gleason skor, patolojik evreleme ve serum PSA düzeyleriyle kıyaslandığında, miRNA ekspresyon profilinin prognozu belirleme açısından daha güçlü bir biyolojik belirteç olduğu gösterilmiştir (Martens-Uzunova vd 2011). Brase ve arkadaşları (2011) tarafından yapılan çalışmada miR-373 ve miR-141 'in aşırı ekspresyonunun patolojik evre ve Gleason skorla ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bir başka çalışmada, serumda miR-141

ekspresyon düzeyindeki artış daha agresif prostat kanseri ile ilişkilendirilmiştir (Mitchell vd 2008). Normal prostat dokusu ile karşılaştırıldığında, kanserli dokularda miR-143 ve miR-145'in ekspresyonlarında da değişim gözlenmiştir. Özellikle miR-143'ün aşırı ekspresyonu, prostat kanser hücrelerinde vimentin ve fibronektin gibi mezenkimal belirteçleri baskımlarken, E-kaderin gibi epiteliyal belirteçleri arttırmaktadır. (Hassan vd 2012). Bu sonuçlar bize, miR-143 ve miR-145'in prostat kanserinde invazyon ve migrasyonu inhibe ettiklerini düşündürmektedir.

Şu andaki bilgilerimiz belli miRNA'ların ekspresyon düzeylerindeki değişimin prostat kanseri ile ilişkili olduğunu desteklemektedir. Gelecek çalışmalar ekspresyon düzeyinde değişim gösteren miRNA'ların rollerinin net olarak belirlenmesine odaklanmalıdır ve bu çalışmalardan elde edilecek sonuçlar, prostat kanserinin tanısında, prognozunun belirlenmesinde ve tedavi yanıtının değerlendirilmesinde bu miRNA'ların klinik kullanımını destekleyecektir. Aynı zamanda, bu miRNA'ları hedefleyen yeni tedavi stratejilerinin prostat kanserindeki başarısı da değerlendirilebilecektir.

2.5. GADD45 Gen Ailesi

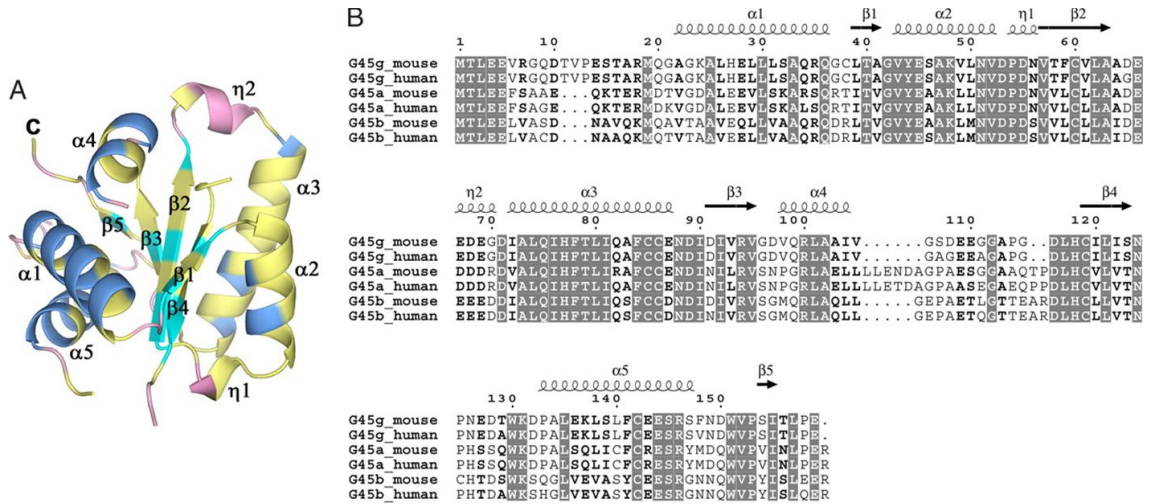
2.5.1. GADD45 Gen Ailesi Yapısı ve Üyeleri

“*Growth Arrest and DNA Damage Inducible 45*” (*GADD45*) gen ailesi, DNA hasarı ile indüklenen bir gen ailesidir. *GADD45* gen ailesi tarafından kodlanan proteinler, birçok farklı çevresel, fiziksel ve genotoksik stres koşullarında memeli hücrelerin yanıtını integre eden stres sensörleri olarak görev yapmaktadırlar (Carrier vd 1994, Zhang vd 1999, Liebermann ve Hoffman 1998) ve bu proteinler önemli tümör baskılayıcılar veya otoimmün baskılayıcılar olarak tanımlanmışlardır (Schrag vd 2008). Hemen hemen tüm memeli hücrelerinde farklı genotoksik stres faktörleri, immun hücrelerin terminal farklılaşmasından sorumlu sitokinler ve apoptotik sitokinler, *GADD45* gen ailesinin üyelerini kısa sürede uyarma yeteneğine sahiptirler (Abdollahi vd 1991, Zhan vd 1994, Vairapandi vd 1996, Zhang vd 1999).

GADD45 α (*GADD45*), *GADD45 β* (*MyD118*) ve *GADD45 γ* (*CR6*) genlerini kapsayan *GADD45* gen ailesi; küçük (18kDA), evrimsel olarak korunmuş, birbirleri ile yüksek homoloji gösteren, yüksek asidik ve çoğunlukla nükleusta lokalize proteinleri

kodlar (Takekawa ve Saito 1998). *GADD45* gen ailesi tarafından kodlanan genler, birbirleri ile aminasit düzeyinde %55-57 oranında identikaldirler (Gupta vd 2006).

GADD45 proteinlerinin moleküler yapısı 2008 yılında aydınlatılmış olup, insan *GADD45 α* protein yapısı nükleer manyetik rezonans ile gösterilirken, fare *GADD45 γ* proteinin yapısı da kristalografi ile belirlenmiştir (Sánchez vd 2008, Schrag vd 2008). Her iki proteinin de 5 α -heliks ve 5 β -tabaka'dan oluşmaktadır. *GADD45 γ* 'nın monomer yapısı, merkezde 5 farklı β tabakasının yer aldığı 3-katlı $\alpha\beta\alpha$ sandviç yapısından oluşmaktadır. Proteinin C-terminal bölgesinde yer alan ve paralel β tabakalarına hidrojen bağları ile bağlanan $\beta 5$ tabakası sadece 3 rezidüden oluşmaktadır. Protein yapısında, β -tabakalarına paralel olacak şekilde bir tarafta $\alpha 2$ ve $\alpha 3$ heliksleri yer alırken, diğer tarafta $\alpha 1$, $\alpha 4$ ve $\alpha 5$ heliksleri yer almaktadır. *GADD45* izoformları arasında oldukça sıkı korunan rezidüer, $\alpha 2$ ve $\alpha 3$ helikslerinde ve bu helikslerin etkileşim içinde oldukları β -tabakalarında yer alırlar (Şekil 2.14) (Schrag vd 2008).

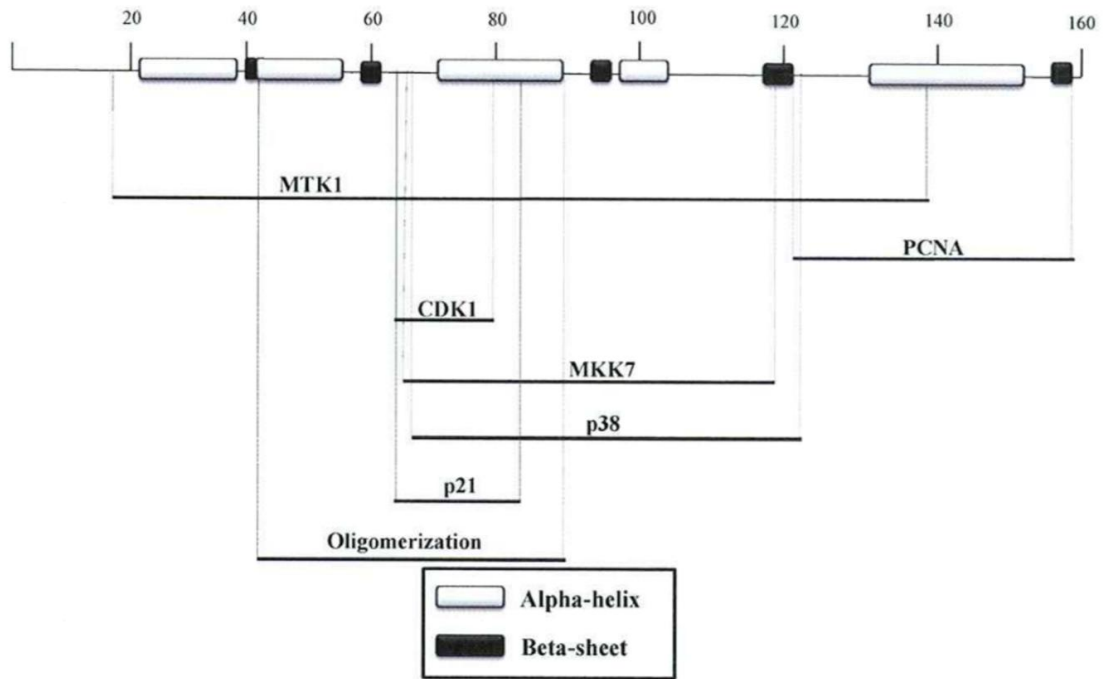


Şekil 2.14 *GADD45* izoformlarının monomerik yapısı ve dizi korunumları.

(A) *GADD45 γ* proteinin monomerik yapısı. Sekonder yapısal elementlerin de gösterildiği bu resimde tüm *GADD45* izoformlarında identikal olan rezidüer sarı renkle gösterilmektedir. (B) *GADD45* ailesi üyelerinin amino asit dizilimleri. İdentikal rezidüer gri kutular içine alınmıştır. *GADD45 γ* kristal yapısında bulunan sekonder yapısal elementler dizilimler üzerinde gösterilmiştir.

GADD45 proteinleri, homo-oligomer ya da farklı aile üyeleri arasında hetero-oligomerler oluşturabilirler. *GADD45 γ* için dimer oluşturan 4 farklı olası monomer etkileşim modeli ortaya konulmuştur. *GADD45 γ* 'daki dimerizasyon bölgelerinin $\alpha 2$ ve

α 3 heliks bölgelerinde olduğu gösterilmiştir ve bu bölgelerin yüksek korunumlu bölgeler olduğu bilinmektedir (Schrag vd 2008). Bu tür etkileşim bölgelerinin tanımlanması, GADD45 proteinlerinin yardımcı proteinlerle olan etkileşimlerini ve fonksiyonlarını tanımlamada büyük önem taşımaktadır. GADD45 proteinlerinin monomer-oligomer değişimlerinin onların fonksiyonlarını regüle ettiği ortaya koyulmuştur (Kovalsky vd 2001). Şekil 2.15'te GADD45 proteinlerinin sekonder yapısı ve etkileşim domainleri gösterilmektedir. GADD45 γ merkezi bölgesindeki dimerizasyon sonrası Cdc2, p21, p38 ve histon proteinleri ile etkileşim göstermektedir ve GADD45 γ 'deki L80E nokta mutasyonunun dimerizasyonu bloke ettiği gösterilmiştir. Tüm GADD45 proteinleri PCNA ile etkileşim gösterirler ve GADD45'in PCNA ile bağlanması p21^{WAF1/CIF} ile yarışmalı olarak gerçekleşmektedir (Zhang vd 2008).



Şekil 2.15 GADD45 proteinlerinin sekonder yapısı ve etkileşim domainleri. Proteinin α -heliks yapıları beyaz kutu ve β -tabaka yapıları siyah kutu ile gösterilmiştir. Resimde ayrıca GADD45 proteinlerinin PCNA, CDK1, MTK1, p38, MKK7 ve p21 proteinleri ile olası etkileşim domainleri gösterilmiştir (Tamura vd 2012).

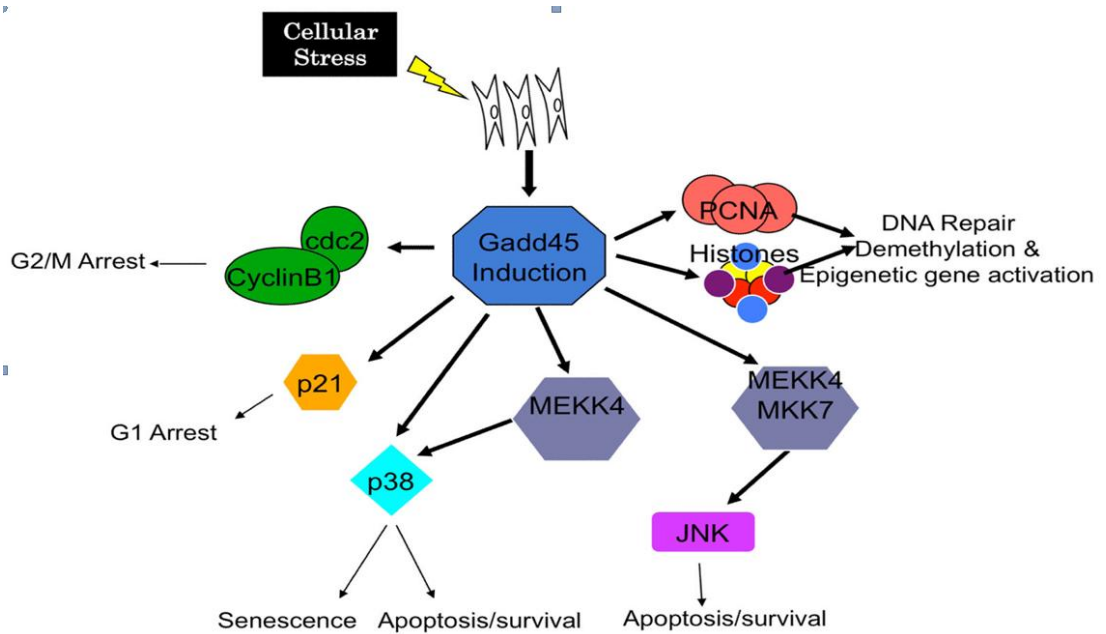
2.5.2. GADD45 Gen Ailesinin Fonksiyonları

Farklı genotoksik ve çevresel stres ajanları tarafından uyarıldıktan sonra, *GADD45* genlerinin hücre döngüsünün durdurulmasının kontrolünde (Vairapandi vd 2002, Liebermann ve Hoffman 1998), DNA tamirinde (Vairapandi vd 2002, Liebermann ve Hoffman 1998, Smith vd 2000), hücre canlılığının devamında (Smith vd 1996, Gupta vd

2006), apoptozda (Zhang vd 2001, Yoo vd 2003), *in vitro* transformasyon için hücrelerin duyarlılığında ve *in vivo* tümör gelişiminde (Tront vd 2006, Hollander vd 1999) yer aldıkları bildirilmiştir. Önemli rol oynadıkları bu hücre mekanizmaları, diğer hücre proteinleriyle fiziksel etkileşim göstererek, birlikte gerçekleştirmektedirler. Özellikle, DNA hasarından sonra tüm GADD45 protein ailesi üyeleri hızla uyarılırlar ve bunun sonucunda ya hücre döngüsünde, apoptozda durmaya neden olurlar ya da DNA tamir mekanizmasında aktif rol oynarlar. Hücre homeostazın korunmasında ve stres faktörlerine yanıtta önemli rol oynayan GADD45 proteinleri, hücre döngüsünün G₁ fazı boyunca yüksek düzeyde eksprese edilirler (Tamura vd 2012). *GADD45* genlerinin ekspresyonları, metilmetan sülfonat (MMS), γ ışınlar (IR), ultraviyole radyasyon (UV), daunorubisin (DNR) ve inflamatuvar sitokinleri de içeren farklı genotoksik ve çevresel stres faktörleri ile uyarılır (Takekawa ve Saito 1998). Her bir farklı uyarıda *GADD45* gen ailesi üyelerinin ekspresyon paternleri de farklıdır ve bu da bize stresin kaynağına bağlı olarak *GADD45* genlerinin farklı roller oynadığını göstermektedir. Bir başka ifade ile her 3 protein de benzer fonksiyonlara sahip olmakla birlikte, stresin kaynağına ve buldukları hücre tipine göre aktive edildikleri yolların farklı olması nedeniyle bu fonksiyonları identikal değildir. Örneğin *GADD45 β* TGF-indüklü apoptoz yolağı üzerinden aktive edilirken, *GADD45 α* bu yolak üzerinden aktive edilmez (Selvakumaran vd 1994, Yoo vd 2003). Diğer taraftan *GADD45 α* , p53 fonksiyonu için hedef gen olarak tanımlanırken, *GADD45 β* ve γ bu anlamda hedef genler değildirler (Kastan vd 1992, Selvakumaran vd 1994, Guillouf vd 1995).

Hücre döngüsünün durdurulması ve DNA tamiri gibi rol oynadıkları önemli hücre mekanizmaları, diğer yardımcı hücre proteinleriyle fiziksel etkileşim göstererek, birlikte gerçekleştirmektedirler. Bu yardımcı proteinlerin belli başlıları; PCNA (proliferating cell nuclear antigen), histonlar, cdk2/cdk1, cdk2/SiklinB1 kompleksi, p21, MEKK4/MTK1, MKK7/JNKK2, p38, Bcl-x_L, CRIF1/Gadd45GIP, Aurora-A, B23, DNA-tamir endonükleazı XPG'dir. (Zhang vd 2008) (Şekil 2.16). *GADD45* proteinlerinin yardımcı proteinlerle etkileşimleri, *GADD45* proteinlerinin ve yardımcı proteinlerin ekspresyon düzeylerine, bu proteinlerin hücre lokalizasyonlarına ve post-translasyonel modifikasyonlara bağlıdır. Etkileştikleri proteinlere bağlı olarak da hücre yanıt değişebilmektedir (Smith vd 1996, Vairapandi vd 2000, Azam vd 2001, Liebermann ve Hoffman 2007). Örneğin, *GADD45 α* , CDK1/Siklin B1 kompleksiyle etkileşerek CDK1'in kinaz aktivitesini inhibe etmektedir ve sonuçta hücre döngüsü

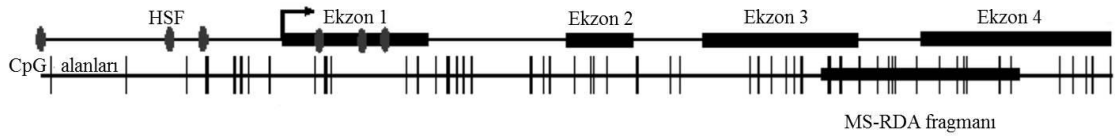
G₂/M evresinde durdurulur. Benzer şekilde, GADD45 proteinlerinin PCNA (DNA replikasyonu ve tamirinde rol oynayan bir protein) ile etkileşimi, hücreyi nükleotid eksizyon tamirine (NER) yönlendirmektedir. *GADD45* ekspresyonundaki azalmanın DNA tamir mekanizmasındaki yetersizlikle korele olduğu bilinmektedir ve GADD45'in hasarlı kromatinde DNA'ya erişilebilirliği modifiye etme yeteneği (Carrier vd 1999) ve PCNA ile etkileşimi (Smith vd 1994), bu proteinlerin DNA tamir mekanizmasındaki rolünü desteklemektedir. GADD45 proteinlerinin MEKK4 ve p38 ile etkileşimleri, bu proteinlerin aktivasyonuna neden olur. Aktive olan bu proteinlerin etkileşim gösterdikleri diğer proteinlere bağlı olarak hücresel yanıt değişmektedir (Liebermann vd 2011). Bir başka önemli nokta da, GADD45 proteinlerinin uyarıcı ve/veya hücre tipine bağlı olarak hücre sağkalımına ya da apoptoza neden olmalarıdır. Örneğin GADD45'in γ ışınlarıyla uyarımı p53-bağımlı yolları aktive ederken (Kastan vd 1997), kısa dalga boylu UV, metilmetan sülfonat (MMS), Δ 12 prostaglandin J2, kamptotesin gibi ajanlarla uyarım p53-bağımsız yolları aktive edebilir (Hollander vd 1993, Goldwasser vd 1996, Ohtani-Fujita vd 1998).



Şekil 2.16 Stres sinyal yolağında GADD45 genlerinin fonksiyonu ve etkileştiği yardımcı proteinler (Liebermann vd 2011).

Yukarıda tanımlanan fonksiyonlarına ek olarak, GADD45 proteinlerinin hem *in vivo* hem *in vitro* önemli onkogenik stres sensörleri olduğu bilinmektedir. *GADD45 α* ^{-/-} ve

GADD45β^{-/-} farelerde mutasyon sıklığının ve kimyasal karsinojenlere karşı duyarlılığın arttığı gözlenmesi, *GADD45* proteinlerinin tümör gelişiminin modülasyonunda rol aldıklarına dair ilk kanıtlardır. Ayrıca *GADD45α* ve *GADD45γ*'nin NF-KB aracılı baskılanması, kanser hücrelerinde sağkalım için oldukça önemlidir (Zerbini vd 2004). Birçok kanser türünde, *GADD45* proteinlerinin ekspresyonlarının azaldığı bilinmektedir. Kanserlerde *GADD45* genleri nadiren mutant olduğundan, ekspresyon kaybından genellikle DNA metilasyonu sorumlu tutulmaktadır. Şekil 2.17'de *GADD45γ* geninin yapısı ve CpG alanları gösterilmiştir.



Şekil 2.17 *GADD45γ* geninin yapısı ve CpG alanları. Transkripsiyon başlama bölgesi okla gösterilmiştir. HSF: Kor promotor bölgesinde bulunan 6 adet Isı Şok Faktörleri, MS-RDA fragmanı: “Methylation-sensitive representational difference analysis” ile belirlenen hipermetile fragman (Ying vd 2005)

Yukarıda tartışılan veriler eşliğinde, bu çalışmadaki hipotezimiz, prostat kanserli olgularda *GADD45γ* protein ekspresyonunun metilasyon aracılığı ile azaldığı ve bunun da apoptotik süreci etkileyeceğidir. Bu kapsamda benign prostat hiperplazili ve prostat adenokarsinomlu doku örneklerinde *GADD45γ*'nin ekspresyon ve metilasyon profillerinin belirlenmesi, metilasyon ile ekspresyon profilleri arasındaki korelasyonun ortaya koyulması ve bu profillerin apoptozla olan ilişkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

3. MATERYAL ve METOD

3.1. Benign prostat hiperplazili ve prostat adenokarsinomlu olgular

Bu çalışmada, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda histopatolojik olarak incelenen ve prostat adenokarsinom tanısı alan 60 olgu (2003-2012 yılları arasında) ile birlikte kontrol grubunu oluşturan ve benign prostat hiperplazi (BPH) tanısı alan 60 olgu (2011-2012 yılları arasında) değerlendirildi. Olgulara ait klinikopatolojik bilgiler patoloji raporlarından elde edildi. Çalışma materyali olarak bu olgulara ait %10 formaldehit solüsyonu ile tespit edilen, parafin bloklara gömülü (FFPE) doku örnekleri kullanıldı.

Toplam 120 olguya ait doku örnekler laboratuvarımızda numaralandırıldı ve örneklerin kayıt işlemleri gerçekleştirildi.

Her bir olguya ait FFPE doku örneklerinden alınan ardışık 2 kesit DNA izolasyonu amacıyla kullanılırken, 3 adet kesit immunohistokimyasal (IHK) analizinde (Bcl-2, Bcl-X_L ve GADD45 γ) ve 1 kesit de TUNEL yönteminde kullanıldı.

3.2. FFPE Doku Örneklerinden Genomik DNA İzolasyonu

Toplam 120 olguya ait FFPE doku örneklerinden genomik DNA izolasyonları ticari kit (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen) yardımı ile gerçekleştirildi. Üretici firmanın belirttiği şekilde, DNA izolasyonu için aşağıdaki basamaklar sırası ile uygulandı:

3.2.1. Genomik DNA İzolasyon Protokolü

- 1) FFPE doku örneklerinin etrafında bulunan fazla parafin, steril bistüri ve pens yardımı ile mekanik olarak uzaklaştırıldı ve bu doku örnekleri steril mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı.
- 2) Örnekler 56°C'de 16-18 saat süreyle gece boyu inkübasyona bırakıldı.

- 3) Örneklere deparafinizasyon amacı ile 1200 µl ksilen (Sigma-Aldrich) ilave edildi ve 2200 rpm'de kuvvetlice vortekslendi (10 kez pulse-vorteks).
- 4) Örnekler 14.000 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek pelet kısmına dokunulmadan süpernatant mikropipet kullanılarak uzaklaştırıldı.
- 5) Ksilenle deparafinizasyon işlemi (3-4. basamaklar) 1 kez daha tekrarlandı.
- 6) Doku örneklerinde artık olarak kalan ksileni uzaklaştırmak için peletlere 1200 µl etanol (%96-100) (Merck) eklendi ve örnekler birkaç kez pulse-vorteks edildi.
- 7) Örnekler oda ısısında (15-25°C), 14.000 rpm'de, 5 dk santrifüj edildi ve süpernatant mikropipet yardımı ile uzaklaştırıldı (Peletin dağılmamasına dikkat edildi).
- 8) Altıncı ve yedinci basamaklar tekrar edildi. Örneklerin bulunduğu mikrosantrifüj tüplerinin kapakları açılarak 37°C'de 15 dk inkübasyona bırakılarak, rezidüe etanolün tamamen uzaklaştırılması sağlandı.
- 9) Örneklere, kitle birlikte sağlanan 180 µl doku lizis tamponu (Buffer ATL) ve 20 µl proteinaz K eklendi ve homojenize edildi.
- 10) Örnekler, 56°C'de 16-18 saat (gece boyunca) inkübasyona bırakıldı.
- 11) Örneklere, kitle birlikte sağlanan 200 µl "AL Tamponu" eklendi ve 70°C'de 10 dk inkübasyona bırakıldı.
- 12) Örneklere, 200 µl "Etanol" (%96-100) eklendi ve homojenize edildi.
- 13) Örnekler kitle birlikte sağlanan spin kolonlara aktarıldı. Kolonların kapakları kapatılarak, 8.000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.
- 14) Santrifüj işleminden sonra kolonlar yeni 2 ml'lik toplama tüplerine yerleştirildi. Kolonlara kitle birlikte sağlanan 500 µl yıkama tamponu (AW1 Tamponu) eklendi. Kolonların kapakları kapatılarak 8.000 rpm'de, 1 dk santrifüj edildi.
- 15) Santrifüjden sonra kolonlar, yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi. Kolonlara kitle birlikte sağlanan 500 µl yıkama tamponu (AW2 Tamponu) eklendi. Kolonların kapakları kapatılarak 14.000 rpm'de 3 dk santrifüj edildi.
- 16) Kolonlar yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi ve 14.000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.
- 17) Santrifüj işleminden sonra kolonlar, yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi ve kolonlara kitle birlikte sağlanan 100 µl elüsyon tamponu (AE Tamponu)

eklendi. Oda ısısında (15-25⁰C) 5 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon işleminden sonra kolonlar 8.000 rpm’de, 1 dk santrifüj edilerek genomik DNA örnekleri elde edildi.

Örnekler, bir sonraki analiz aşamasına kadar -20⁰C’de saklandı.

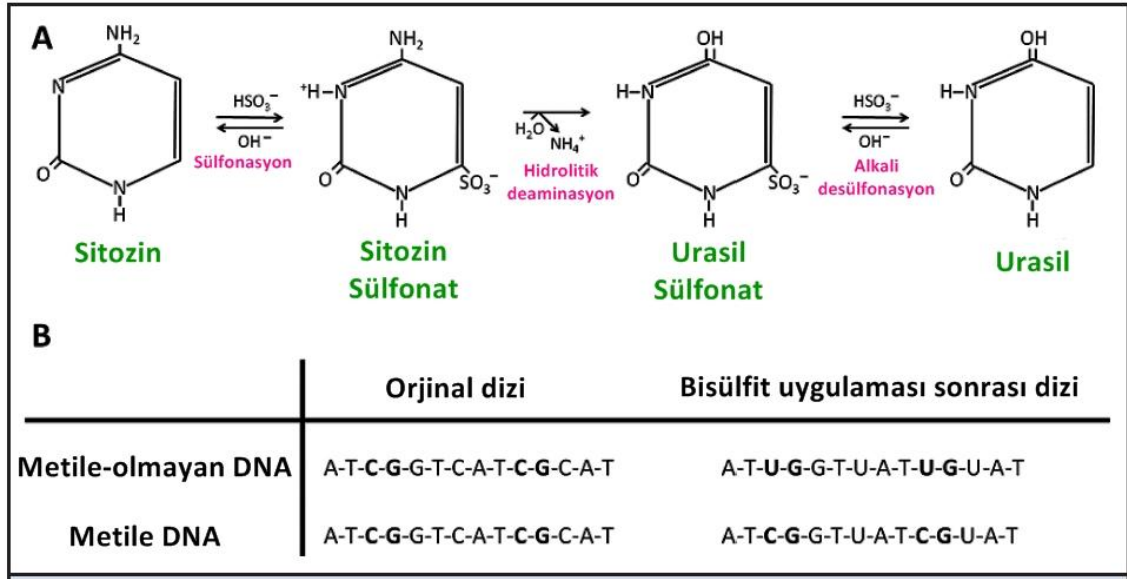
3.2.2. DNA Örneklerinin Konsantrasyonlarının ve Safılık Derecelerinin Belirlenmesi

Toplam 120 adet doku örneklerinden izole edilen DNA örneklerinin konsantrasyonları ve saflıkları, spektrofotometrik yöntemle (Nanodrop, Thermo) belirlendi. Her bir olguya ait DNA örneğinden 2µl alınarak cihazda okuma yapıldı ve örneklere ait konsantrasyon, A₂₆₀, A₂₈₀, A_{260/280} değerleri kaydedildi.

3.3. Bisülfıt Uygulaması

Metilasyon spesifik gerçek-zamanlı PCR uygulamasından önce, izole edilen DNA örneklerinde bisülfıt uygulaması yapıldı.

DNA polimeraz, metile ve metile-olmayan sitozinleri ayırt edemez. Yani DNA polimeraz, guanin ve metile ya da metile olmayan sitozinleri ayırt etmeksizin birleştirir. Bu nedenle epigenetik bilgiler PCR süresince kaybolabilirler. Bu amaçla, yani metilasyon bilgisinin korunması amacı ile PCR öncesi DNA modifiye edilir. DNA’nın modifikasyonu amacı ile uygulanan bisülfıt uygulamasının amacı, metile ve metile-olmayan sitozinleri birbirinden ayırt etmektir. Bisülfıt uygulamasında yer alan kimyasal modifikasyonlarla (sülfonasyon, hidrolitik deaminasyon, alkali desülfonasyon) sitozinler urasile deamine olurlar. PCR sırasında urasil rezidüleri timin rezidüleri olarak ve 5-metilsitozin rezidüleri sitozin olarak replike olurlar. Böylece özgün primerler kullanılarak, metile ve metile-olmayan sitozinler belirlenmiş olur. Bisülfıt uygulaması metile-olmayan sitozinleri %99 oranında urasile dönüştürür (Kristensen ve Hansen 2009).



Şekil 3.1 Bisülfid uygulaması ile sitozinden urasil oluşumu. (A) Bisülfid uygulaması, tek zincirli DNA'nın sodyum bisülfitle düşük pH ve yüksek sıcaklıkta kimyasal reaksiyonuna dayanır. Her bir kimyasal reaksiyon adımı şu şekildedir: sitozinin karbon-6 pozisyonundan sülfonasyonu, oluşan urasil sülfonatın karbon-4 pozisyonundan hidrolitik deaminasyonu ve son olarak oluşan urasilin alkali koşullarda desülfonasyonu. 5. karbondaki metilasyon ilk reaksiyon adımında karbon-6'daki sülfonasyon reaksiyonunu engeller. 5-metilsitozin bisülfitle reaksiyona girmesine rağmen bu reaksiyon oldukça yavaştır ve reaksiyonun denge yönü deaminlenmiş ürün olan timin değil 5-metilsitozin yönündedir. (B) Sodyum bisülfid uygulamasıyla metile-olmayan sitozinleri urasile dönüştürürken metile sitozinler değişmeden kalırlar (Kristensen ve Hansen 2009'dan alınarak modifiye edilmiştir).

Bisülfid uygulaması için ticari kit (EZ DNA Methylation-Gold Kit, Zymo Res.) kullanıldı ve aşağıdaki basamaklar sırası ile uygulandı:

3.3.1. Ön Hazırlık Aşamaları

Kitle birlikte liyofilize halde sağlanan CT dönüşüm reagenti aşağıda belirtildiği şekilde kullanıma hazır hale getirildi:

- CT dönüşüm reagent tüpüne sırasıyla 900 µl dH₂O, 300µl M-dilüsyon tamponu ve 50µl M-dissolving tamponu ilave edildi.
- Oda ısısında 10 dk boyunca hızlı vortekslendi.

Kitle birlikte sağlanan M-yıkama tamponuna 24 ml etanol (%96-100) eklenerek kullanıma hazır hale getirildi.

3.3.2. Bisülfıt Uygulama Protokolü

- 1) Bir PCR tüpüne 20µl DNA örneği (DNA konsantrasyonu 500ng olarak ayarlandı) ve 130µl CT dönüşüm reagenti eklendi. Mikropipet yardımı ile karıştırılarak kısa bir santrifüj işlemi (short-spin) yapıldı.
- 2) Örnekler thermal cyclers'a (Nyx Teknik, Inc. USA) yerleştirildi ve 98°C'de 10 dk, 64°C'de 2.5 saat, 4°C'de bekletme olmak üzere program ayarlandı.
- 3) Kitle birlikte sağlanan spin kolonlar, toplama tüplerine yerleştirildikten sonra üzerlerine 600 µl M-bağlanma tamponu eklendi.
- 4) İçinde M-bağlanma tamponu bulunan kolonlara, 2. basamak sonrasında elde edilen DNA örnekleri eklendi. Kolonların kapakları kapatılarak birkaç defa ters yüz edilerek karıştırıldı.
- 5) Örnekler 14.000 rpm'de 30sn santrifüj edildi. Santrifüj sonrası, toplama tüpünde toplanan içerik uzaklaştırıldı.
- 6) Kolonlara 100µl M-yıkama tamponu koyularak 14.000rpm'de 30sn santrifüj edildi.
- 7) Kolonlara 200µl M-desülfonasyon tamponu eklendi ve oda ısısında (20-30°C) 15-20dk inkübe edildikten sonra 14.000rpm'de 30sn santrifüj edildi.
- 8) Kolonlara 200µl M-yıkama tamponu koyuldu ve 14.000rpm'de 30sn santrifüj edildi.
- 9) Kolonlar toplama tüplerinden alınarak steril 1.5ml'lik mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı ve üzerlerine 12µl M-elüsyon tamponu eklenerek 14.000rpm'de 30sn santrifüj edildi.

Bisülfıt uygulaması yapılan DNA örnekleri gerçek-zamanlı PCR aşamasına kadar -20°C'de saklandı.

3.4. Metilasyona-özgün Yüksek Çözünürlüklü Erime Eğrisi Analizi

GADD45γ promoter metilasyon durumu, gerçek-zamanlı PCR sistemi (LightCycler 480 Gerçek-zamanlı PCR Sistemi, Roche Diagnostics) kullanılarak belirlendi. Bu amaçla, Yüksek Çözünürlüklü Erime Eğrisi (HRM) analizi öncesinde, bisülfıt modifikasyonları tamamlanmış DNA örnekleri kullanılarak *GADD45γ* genine özgün 115 bp büyüklüğündeki promoter bölgesinde yer alan DNA fragmanının PCR ile amplifikasyonu gerçekleştirildi. Tablo 3.1'de amplifikasyonda kullanılan primer setinin

dizilimleri yer almaktadır (Zhang vd 2010). Amplifikasyon sonrasında, ampliconun identifikasyonu amacı ile HRM analizi yapıldı.

Tablo 3.1 *GADD45 γ* promoter metilasyon durumunun belirlenmesinde kullanılan primer setine özgün dizilimler (5'→3')

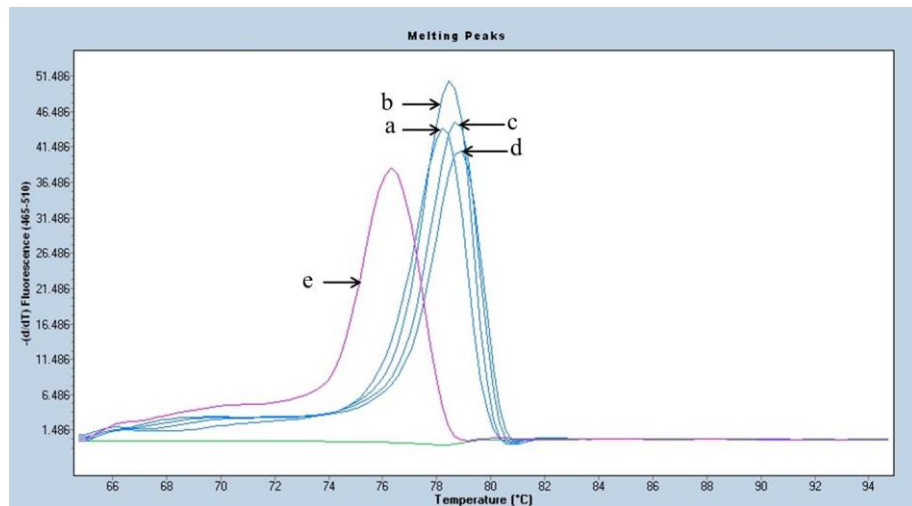
<i>GADD45γ</i> Primer seti	
	5'-CGTCGTGTTGAGTTTTGGT-3' (Forward)
	5'-TAACCGCGAACTTCTTCCA-3' (Reverse)

3.4.1. Gerçek-Zamanlı PCR Optimizasyon Çalışmaları

Hedef bölgenin amplifikasyonu için uygulanacak protokolün optimizasyon çalışmaları;

- i) Bisülfıt uygulaması yapılmış tamamıyla metile genomik kontrol DNA örneği,
- ii) Bisülfıt uygulaması yapılmış tamamıyla metile-olmayan genomik kontrol DNA örneği ve
- iii) Bisülfıt uygulaması yapılmamış metile-olmayan genomik kontrol DNA örnekleri

kullanılarak yapıldı (EpiTect Control DNA and Control DNA Set, Qiagen). Optimizasyon çalışmalarına 1.5mM, 2mM, 2.5mM ve 3mM olmak üzere 4 farklı MgCl₂ konsantrasyonları kullanılarak devam edildi. En iyi sonucun elde edildiği 3mM MgCl₂ konsantrasyonu ile çalışmalara devam edildi (Şekil 3.1).



Şekil 3.2 Farklı MgCl₂ konsantrasyonları kullanılarak yapılan optimizasyon çalışmasına ait metilasyona-özgün yüksek çözünürlüklü erime eğrisi analizi (HRM). a) 1,5 mM MgCl₂ ve metile DNA örneği, b) 2mM MgCl₂ ve metile DNA örneği, c) 2,5mM MgCl₂ ve metile DNA örneği, d) 3mM MgCl₂ ve metile DNA örneği e) 3mM MgCl₂ ve metile-olmayan DNA örneği.

Tablo 3.2 ve 3.3'te optimize edilen gerçek-zamanlı PCR reaksiyon karışımı ve PCR protokolü yer almaktadır.

Tablo 3.2 *GADD45γ* promoter metilasyon durumunu belirlemek amacı ile kullanılan gerçek-zamanlı PCR reaksiyon karışımı

İçerik	Hacim	Final konsantrasyon
Forward primer	1 µl	5 µM
Reverse primer	1 µl	5 µM
MgCl ₂	2.4 µl	3 mM
Master karışımı*	10 µl	1x
PCR-grade su	0.6 µl	-
Template DNA	5 µl	-

*: Master karışımı olarak, “LightCycler 480 HRM Master Mix” kiti (Roche) kullanıldı.

Tablo 3.3 *GADD45γ* için Metilasyon-özümlü HRM Analiz Protokolü*

Analiz Modu	Döngü	Segment	Hedef Isı	Süre	Kazanım Modu
Pre-inkübasyon					
	1		95 °C	10 dk	-
Amplifikasyon					
	50	Denatürasyon	95 °C	10 sn	-
		Annealing	60 °C	15 sn	Tek
			58 °C	10 sn	-
		Ekstensiyon	72 °C	10 sn	-
HRM					
	1	Denatürasyon	95 °C	1 dk	-
		Annealing	40 °C	1 dk	-
			65 °C	15 sn	-
		Melting	95 °C	0 sn	Sürekli
slope=0.3°C/sn					
Soğutma					
	1		40 °C	30 sn	-

*: Gerçek-zamanlı PCR Protokolü; **Pre-inkübasyon**: Enzim aktivasyonu ve kalıp cDNA'nın denatürasyonu, **Amplifikasyon**: Hedef bölgenin primerler yardımı ile çoğaltılması, **HRM**: Satüre boya ve HRM master karışımı kullanılarak hedef bölgenin (amplikonun) identifikasyonu, **Soğutma**: Sistemde yer alan termal bloğun soğutulması basamaklarını içermektedir.

3.4.2. HRM Analizinde Verilerin Yorumlanması

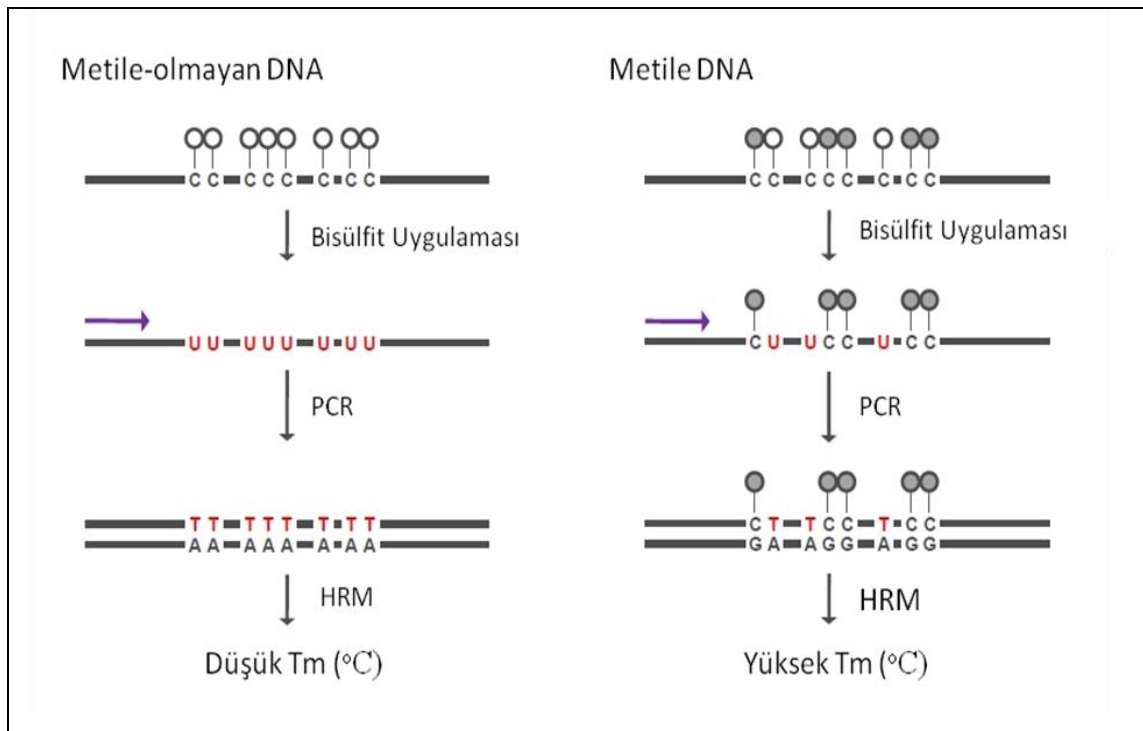
İnsan DNA molekülünün iki zinciri birbirine Adenin(A) ve Timin(T) arasından iki (A=T), Guanin (G) ve Sitozin arasından ise üç (G≡C) hidrojen bağı ile bağlıdır. DNA çift zinciri hidrojen bağlarını kıran kimyasal veya fiziksel etmenlerle denatürasyona uğrayabilmektedir. DNA çift zincirinin %50'sinin birbirinden ayrılması için gerekli olan sıcaklık derecesi 'Tm derecesi' olarak tanımlanmaktadır. Tm derecesi kullanılarak spektrofotometrik yöntemlerle DNA zincirinin denatürasyonu izlenebilmektedir. 260 nm dalga boyunda tek zincirli DNA çift zincirli DNA'dan daha fazla UV absorbansı oluşturmaktadır.

DNA boyutu ve GC içeriği, DNA'nın kararlılığını belirleyen en önemli faktörlerdir. GC arasındaki hidrojen bağı sayısı AT arasındakinden fazla olduğu için GC içeriğinden zengin bir DNA'nın Tm derecesi AT'den zengin DNA'ya göre daha yüksektir. DNA baz dizisinde meydana gelen değişiklikler Tm derecesini de değiştirmektedir. Tm derecesi değişime bağlı olarak artabilmekte ya da azalabilmektedir. Teorik olarak DNA baz dizisinde meydana gelen $\pm 0,1$ 'lik değişim Tm derecesini $\pm 0,4^{\circ}\text{C}$ değiştirmektedir (Benjamin, 1997).

DNA erime analizinde, artan sıcaklığın çift zincirli DNA üzerinde yarattığı etkinin floresan sinyal şiddetinde oluşan değişikliklerle takip edildiği eğrilere 'denatürasyon eğrisi' denir. Bu eğriler 2 sn'lik zaman dilimlerinde $0,1^{\circ}\text{C}$ 'lik sıcaklık artışına karşılık floresans sinyal şiddetindeki değişimlerle oluşturulur (Montgomery vd 2007). HRM analizinde floresan sinyal şiddetindeki değişimleri gözlemlemek amacı ile satüre boyalar kullanılmaktadır. PCR'da çift zincirli DNA'ya bağlanan satüre edici boyaların floresan sinyal şiddeti, çoğalan çift zincirli DNA ile birlikte artmaktadır. PCR sonrası gerçekleşen HRM analizinde ise artan sıcaklıkla DNA denatüre oldukça ayrılan çift zincirden floresan boyalar ayrılır ve sinyal şiddeti yavaş yavaş azalır (Nygren vd 1998).

Artan sıcaklıkla meydana gelen, floresan sinyali değişimlerinin tepe noktası olarak ifade edildiği eğrilere 'erime eğrisi' denir. Bu eğrinin y ekseninde çizilen floresanın sıcaklık türevi ($-dF/dT$) ve x ekseninde ise sıcaklık derecesi yer almaktadır. Bu eğrinin tepe noktası, analiz edilen DNA fragmanının Tm derecesini oluşturur (Montgomery vd

2007). Herhangi bir hedef DNA fragmanının metilasyon durumunu belirlemek amacı ile uygulanan HRM analizlerinde de yukarıda bahsedilen prensipler uygulanmaktadır. Buna göre, metile-olmayan DNA bisülfid uygulaması sonrası sahip olduğu düşük GC içeriği nedeniyle daha düşük Tm derecesine, metile DNA ise zengin GC içeriği nedeniyle yüksek Tm derecesine sahiptir (Şekil 3.3). Bu nedenle daha düşük sıcaklıkta Tm derecesine sahip olan örnekler metile olmayan DNA örnekleri olarak yorumlanırken, yüksek Tm derecesine sahip örnekler metile DNA örnekleri olarak yorumlanır .



Şekil 3.3 : HRM analizinde metile-olmayan DNA ile metile DNA'nın Tm derecesi farkı ('WEB_4' adresinden alınıp modifiye edilmiştir).

3.5. İmmünohistokimyasal (İHK) Analiz

İmmünohistokimyasal boyamalar için FFPE dokulardan elektrostatik yüklü lamlara (X-traTM, Surgipath Medical Industries, Richmond, Illinois, USA) 4-5µm kalınlığında kesitler alındı ve 60°C'de en az iki saat kurutuldu. Deparafinizasyon ve antijen açığa çıkarma işlemleri de dahil olmak üzere tüm boyama süreci Ventana, BechMark XT tam otomatik İHK boyama cihazında gerçekleştirildi. Zıt boyama Hematoksilen ve mavileştirici solüsyon ile cihazda tamamlandı. Kesitlerin dehidratasyonu, ksilen ile şeffaflandırılmaları ve lamel ile kapatılma aşamaları elde yapılarak İHK boyama protokolü tamamlandı. Primer antikor olarak Bcl-2 (dilüsyon: 1/25, klon: 100/D5, Santa

Cruz, Heidelberg, Germany), Bcl-x_L (dilüsyon: 1/50, klon: 2H12, Santa Cruz, Heidelberg, Germany) ve GADD45 γ (dilüsyon: 1/200, Rabbit Polyclonal Antibody, Woburn, MA, USA) kullanıldı.

Işık mikroskopunda, x40 büyütmede immünopozitif hücreleri içeren alanlar tarandı. Bcl-2, Bcl-x_L proteinleri için pozitif ekspresyon, neoplastik hücrelerin en az %10'u pozitif olduğunda kabul edildi (Bai vd 2004). GADD45 γ proteini için pozitif ekspresyon, granüler sitoplazmik boyanma olduğunda kabul edildi. Ayrıca Gadd45 γ için pozitif ekspresyon 4 gruba ayrılarak değerlendirildi: 0: boyanma yok, +: zayıf boyanma, ++: moderate (orta şiddette) boyanma, +++: güçlü boyanma (Na vd 2009). Tonsil, Bcl-2 ve Bcl-x_L için; larinks skuamoz hücreli karsinom, GADD45 γ için pozitif kontrol olarak kullanıldı. Aynı doku örnekleri, aynı immünohistokimyasal yöntemlerle primer antikör ilave edilmeksizin boyanarak negatif kontrol olarak değerlendirildi.

3.6. TUNEL (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick End Labeling)

Yöntemi

Parafine gömülü dokulardan elektrostatik yüklü lamlara (X-traTM, Surgipath Medical Industries, Richmond, Illinois, USA) alınan 4 μ m kalınlığında kesitlerde DNA fragmantasyonunun gösterilmesi için, TdT (terminal deoksinukleotidil-transferaz)-aracılı in situ işaretleme tekniği (TUNEL) uygulandı (In Situ Cell Death Detection Kit, POD, Roche). Üretici firmanın önerdiği şekilde uygulanan protokolün detayları aşağıda basamaklar halinde verilmektedir:

A. Deparafinizasyon

1. Lamlar etüvde 60°C'de 30dk inkübasyona bırakıldı.
2. Etüvden çıkartılan lamlar ksilende oda sıcaklığında 2 saat bekletildi.

B. Rehidratasyon

1. Lamlar sırasıyla %100, %95, %90, %80 ve %70'lik etanol içerisinde 3'er dk bekletildi.
2. Lamlar iki ayrı PBS (pH 7,4) içerisinde oda sıcaklığında 3'er dk bekletilerek yıkama işlemi gerçekleştirildi.

C. H₂O₂ ile bloklama

1. Lamların üzerine pipetle %3'lük H₂O₂ solüsyonu damlatıldı ve oda sıcaklığında 15dk inkübe edildi.
2. Lamlar iki ayrı PBS (pH 7,4) içerisinde oda sıcaklığında 3'er dk bekletilerek yıkama işlemi gerçekleştirildi.

D. Proteaz Uygulaması

1. Lamlar %1'lik proteinaz K içeren 10 mM Tris-HCl'de 37°C'de 30 dk inkübe edildi.
2. Lamlar dört ayrı PBS (pH 7,4) içerisinde oda sıcaklığında 3'er dk bekletildi.
3. Lamlar, üzerindeki doku örneği nemli kalacak şekilde kurutma kağıdı ile kurutuldu.

E. TUNEL Karışımının eklenmesi

1. Örneklerin üzerine kitle birlikte sağlanan 50µl TUNEL reaksiyon karışımı eklendi ve üzeri lamelle kapatılıp 37°C'de nemli ve karanlık ortamda 1 saat inkübasyona bırakıldı.
2. Lamlar üç ayrı PBS (pH 7,4) içerisinde oda sıcaklığında 2'şer dk bekletildi.
3. Lamlar, üzerindeki doku örneği nemli kalacak şekilde kurutma kağıdı ile kurutuldu.

F. Converter-POD Eklenmesi

1. Doku örneği üzerine kitle birlikte sağlanan Converter-POD'tan 50µl örnek üzerine eklendi ve lamelle kapatılıp 37°C'de nemli ve karanlık ortamda 30dk inkübe edildi.
2. Lamlar üç ayrı PBS (pH 7,4) içerisinde oda sıcaklığında 2'şer dk bekletildi.
3. Lamlar, üzerindeki doku örneği nemli kalacak şekilde kurutma kağıdı ile kurutuldu.

G. DAB-Substrat Eklenmesi

1. Kitle birlikte sağlanan peroksidaz buffer içerisinde %5'lik DAB-Substrat hazırlandı ve doku örneklerini üzerine 100 µl eklendi. Oda sıcaklığında 10 dk bekletildi.
2. Lamlar üç ayrı PBS (pH 7,4) içerisinde oda sıcaklığında 2'şer dk bekletildi.
3. Örnekler Harris'in hemotoksilen boyası ile zıt boyama yapıldı ve üzerleri lamelle kapatıldı.

Her TUNEL protokolü uygulandığında, çalışma grubu örnekleri ile birlikte pozitif kontrol (reaktif lenf nodülü kesitleri) ve negatif kontrol (TUNEL reaksiyon karışımı eklenmemiş reaktif lenf nodülü kesitleri) kullanıldı. Işık mikroskopunda, adenokarsinomlu olgu ve BPH'lı olgu gruplarına ait preparatlarda, x40 büyütmede

apoptotik hücreleri içeren en az 10 alan sayıldı ve apoptotik hücre oranı aşağıdaki formüle göre hesaplandı (Garrity vd 2003):

$$\text{Apoptotik hücre oranı (\%)} = \text{Pozitif apoptoz hücre sayısı} / \text{Toplam hücre sayısı} \times 100$$

4. BULGULAR

4.1. Olgulara Ait Klinikopatolojik Parametreler

Bu çalışmada, PAÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda arasında tanıları koyulan 60 prostat adenokarsinomlu olgu grubu ile 60 BPH'lı olgu grubuna ait doku örnekleri değerlendirildi. Prostat adenokarsinomlu 4 olguya ait patolojik evre ve Gleason skorlarına ulaşılamadığından, toplam 56 prostat adenokarsinomlu olgu değerlendirildi. Bu olguların tümü 50 yaşın üzerindediydi ve ortalama yaş 62.8 ± 5.8 (53-76) olarak bulundu. Kontrol grubunu oluşturan BPH'li olguların sadece 2'si 50 yaşın altında idi ve bu grupta ortalama yaş 68.5 ± 10.1 (42-87) olarak belirlendi.

Prostat adenokarsinomlu olgular patolojik evrelerine göre değerlendirildiğinde, tüm olguların T2 ve T3 evresinde oldukları belirlendi (Tablo 4.1). T2 evresindeki olgular detaylı olarak sınıflandırıldığında, pT2a evresinde 4 (%7.1) , pT2b evresinde 1 (%1.8) ve pT2c evresinde 31 (%55.4) olgunun yer aldığı belirlendi. Benzer şekilde T3 evresindeki olgular; pT3a evresinde 12 (%21.4) ve pT3b evresinde 8 (%14.3) olgu olarak sınıflandırıldı. T1 ve T2 evresinde yer alan olgular "erken evre", T3 ve T4 evresindeki olgular "ileri evre" olarak değerlendirildiğinde; çalışmamızda yer alan prostat adenokarsinomlu olgulardan 36'sının (%64.3) erken evre ve 20'sinin (%35.7) ileri evre olduğu belirlendi.

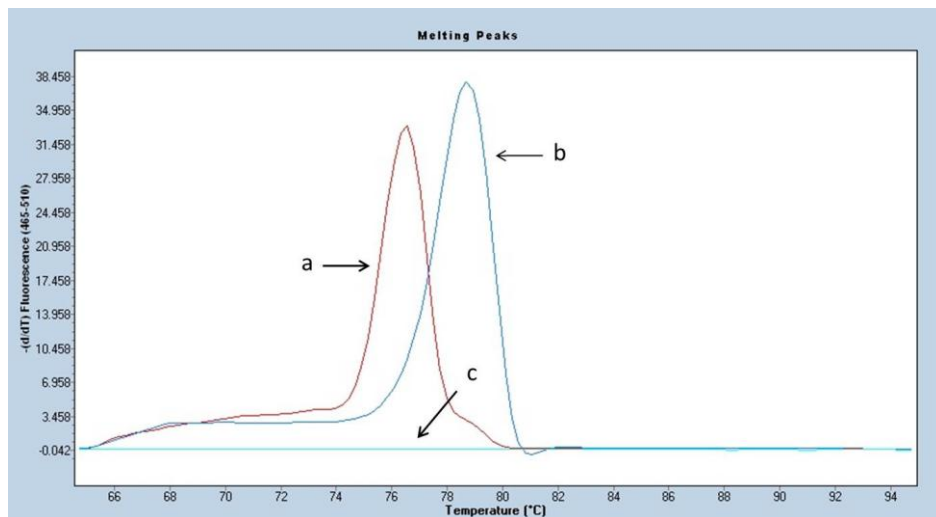
Prostat adenokarsinomlu olgular histopatolojik açıdan Gleason skoruna göre değerlendirildiğinde, tüm olguların 6-9 skorları arasında oldukları ve Gleason skoru 6 olan 19 (%33.9) , 7 olan 35 (%62.5) , 8 olan 1 (%1.8) ve 9 olan 1 (%1.8) olgunun yer aldığı belirlendi (Tablo 4.1). Gleason Skoru açısından "2" skoru yavaş ilerleme potansiyeline sahip kanser hücrelerini ifade ederken, "10" skoru aşırı hızlı ilerleme ve çoğalma kapasitesine sahip tümör hücreleri anlamını taşıdığından, çalışma grubunda değerlendirilen tüm olguların Gleason skorlarının yüksek olduğu gözlemlendi. Bir başka ifade ile Gleason skoruna göre; 19 (%33.9) olgu "G2: orta diferansiyasyon" olarak değerlendirilirken, 37 (%66.1) olgu "G3-4: kötü diferansiyasyon" olarak değerlendirildi.

Tablo 4.1. Prostat adenokarsinomlu 56 olguya ait klinikopatolojik parametreler

Klinikopatolojik parametre	Olgu sayısı (%)
Ortalama Yaş (en düşük - en yüksek)	62.8 ±5.8 (53-76)
Patolojik evre	
T2	
pT2a	4 (7.1)
pT2b	1 (1.8)
pT2c	31 (55.4)
T3	
pT3a	12 (21.4)
pT3b	8 (14.3)
Gleason skoru	
G2	
Gleason 6	19 (33.9)
G3-4	
Gleason 7	35 (62.5)
Gleason 8	1 (1.8)
Gleason 9	1 (1.8)

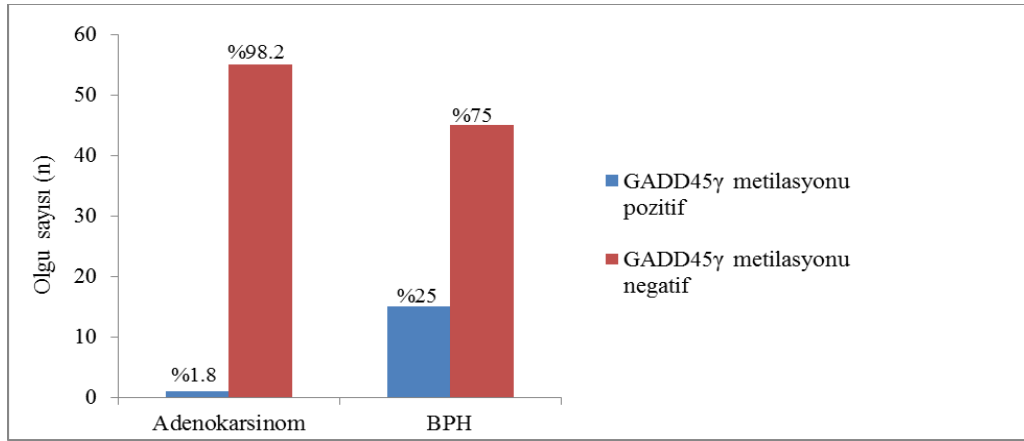
4.2. *GADD45γ* Metilasyon Durumu

Çalışma grubumuzu oluşturan olgulara ait FFPE dokulardan izole edilen genomik DNA örneklerinde *GADD45γ* geninin promoter metilasyon durumu, metilasyona özgün HRM analizi ile belirlendi. Şekil 4.1’de prostat adenokarsinomlu olgulara ait HRM analizi gösterilmektedir.



Şekil 4.1 Prostat adenokarsinom olgularında *GADD45γ* promoter metilasyonuna özgün HRM analizi. a: Promoter metilasyonu belirlenmeyen olguya ait erime eğrisi ($T_m=76\pm0.5^\circ\text{C}$), b: Promoter metilasyonu belirlenen olguya ait erime eğrisi ($T_m=79\pm0.5^\circ\text{C}$), c: Negatif kontrol (Kalıp DNA yerine PCR-grade su kullanıldı).

Tüm olgulardan informatif veriler alındı. HRM analizi sonrasında metile *GADD45γ* promoter bölgesine sahip örneklerin Tm derecesi $79\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ iken, metile olmayan örneklerde Tm derecesi $76\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ olarak belirlendi. Buna göre prostat adenokarsinomlu olgulardan sadece 1 (%1.8) olguda *GADD45γ* promoter bölgesinin metile olduğu belirlendi. Geri kalan 55 (%98.2) olguda promoter metilasyonu gözlenmedi. BPH'lı olgulardan 15 (%25) olguda *GADD45γ* promoter metilasyonu saptanırken, 45 (%75) olgunun *GADD45γ* promoter bölgesinin metile olmadığı belirlendi (Şekil 4.2). *GADD45γ* metilasyonu açısından adenokarsinomlu ve BPH'lı olgulardaki fark anlamlı idi ($p= 0.000$).

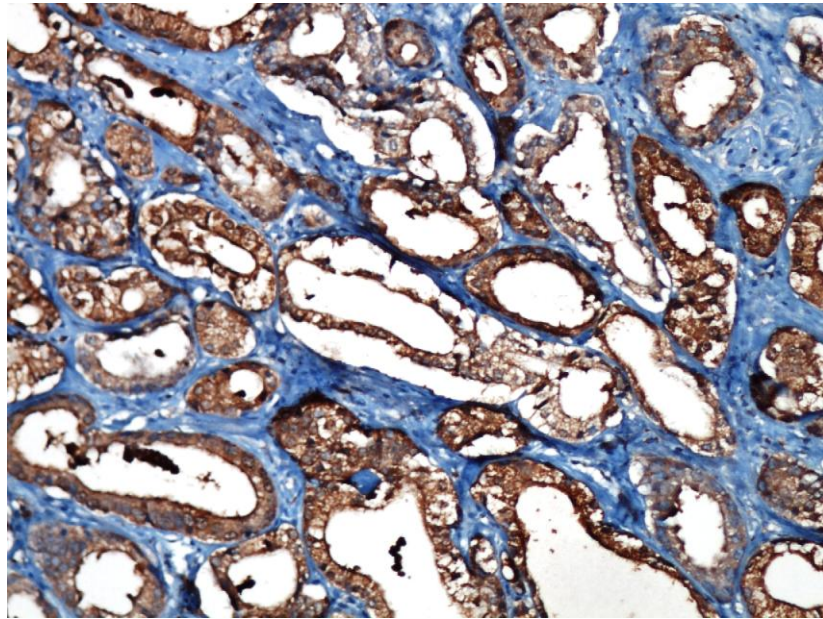


Şekil 4.2 Prostat adenokarsinomlu ve benign prostat hiperplazili olgularda *GADD45γ* metilasyon profili

4.3. *GADD45γ* Protein Ekspresyonu ve Metilasyon Profili ile İlişkisi

GADD45γ protein ekspresyonu açısından prostat adenokarsinomlu olguların 7'si "0", 19'u "+", 16'sı "++" ve 14'ü "+++" olarak değerlendirilirken, BPH'lı 10 olgu "0", 30 olgu "+", 15 olgu "++" ve 5 olgu "+++" olarak değerlendirildi (Şekil 4.3). Bu değerlendirmede "0" ve "+" olgular protein ekspresyonu açısından negatif ve "++" ve "+++" olgular protein ekspresyonu açısından pozitif olarak gruplandırıldığında, adenokarsinomlu 26 (%46.4) olguda *GADD45γ* protein ekspresyonu gözlenmezken, 30 (%53.6) olguda *GADD45γ* protein ekspresyonu gözlendi. BPH'lı olguların 40'ı (%66.7) protein ekspresyonu açısından negatif olarak değerlendirilirken 20 (%33.3) olgu protein ekspresyonu açısından pozitif olarak değerlendirildi. Prostat adenokarsinomlu ve

BPH'lı olgular arasında GADD45 γ protein ekspresyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu (Tablo 4.2) ($p=0.028$).



Şekil 4.3 Prostat adenokarsinomunda GADD45 γ proteininin güçlü (+++) ekspresyonu (x200).

Tablo 4.2 PCa'lı ve BPH'lı olgularda GADD45 γ protein ekspresyonu

	PCa n (%)	BPH n (%)	<i>p</i> -değeri
Gadd45γ ekspresyonu			
Negatif (0/+)	26 (46.4)	40 (66.7)	
Pozitif (++/+++)	30 (53.6)	20 (33.3)	0.028

Prostat adenokarsinomlu olguların patolojik evrelerine göre GADD45 γ protein ekspresyonu değerlendirildiğinde, erken evre olguların 14 (%38.9)'ünde ekspresyon gözlenmezken, 22 (%61.1) olguda protein ekspresyonu gözlendi. İleri evre olgularda ise, 12 (%60) olgu ekspresyon açısından negatif olarak değerlendirilirken, 8 (%40) olgu pozitif olarak değerlendirildi. Patolojik evre ve protein ekspresyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki gözlenmedi ($p=0.167$).

Prostat adenokarsinomlu olguların histopatolojik değerlendirmesi gözönüne alındığında, orta diferansiye (Gleason skoru: 6) olguların 9 (%47.4)'unda GADD45 γ protein ekspresyonu gözlenirken, 10 (%52.6) olguda ekspresyon gözlenmedi. Kötü

diferensiye (Gleason skoru: ≥ 7) olguların 21 (%56.8)'i protein ekspresyonu açısından pozitif olarak değerlendirilirken, 16 (%43.2) olgu negatif olarak değerlendirildi. Histopatolojik değerlendirme ve GADD45 γ protein ekspresyonu arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı (p=0.578).

GADD45 γ promoter metilasyon profili ile protein ekspresyonu arasındaki ilişki değerlendirildiğinde, toplam 52 (%44.8) olguda uyum gözlenirken 64 (%55.2) olguda metilasyon durumu ve protein ekspresyonu arasında uyum belirlenmedi (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. GADD45 γ promoter metilasyonu ile protein ekspresyonu arasındaki ilişki

	Metilasyon +/ Ekspresyon +	Metilasyon +/ Ekspresyon -	Metilasyon -/ Ekspresyon +	Metilasyon -/ Ekspresyon -
Prostat adenokarsinom	1	-	29	26
BPH	6	9	14	31
Toplam	7	9	43	57

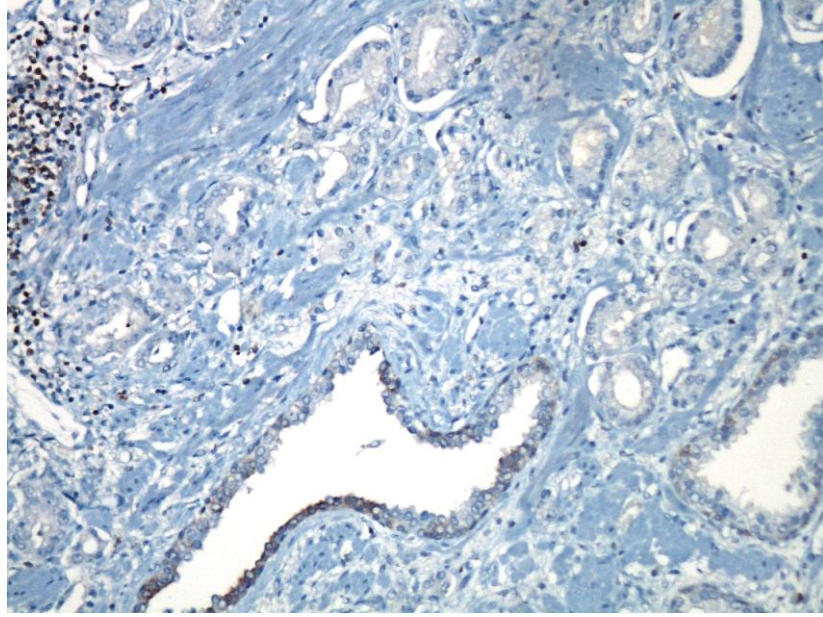
4.4. Anti-apoptotik Proteinlerin Ekspresyonları ve GADD45 γ Metilasyon Profili ile İlişkileri

4.4.1. Bcl-2 ve Bcl-x_L Protein Ekspresyonu

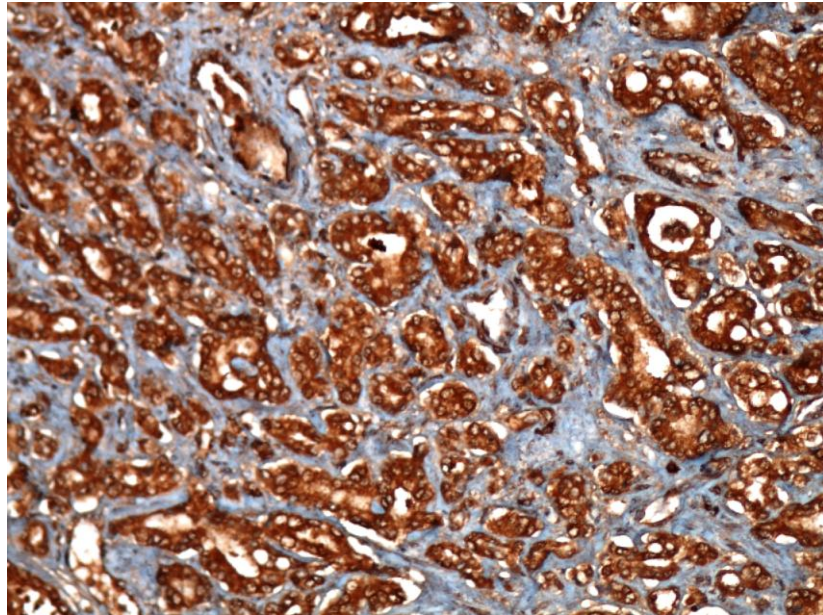
Tablo 4.4 Prostat adenokarsinomlu ve BPH'lı olgularda gözlenen Bcl-2 ve Bcl-x_L protein ekspresyon profillerini göstermektedir. Adenokarsinomlu olguların tümünde Bcl-2 ekspresyon kaybı gözlenirken, BPH'lı olguların 15 (%25)'inde Bcl-2 ekspresyon kaybı gözlemlendi (Şekil 4.4). Bcl-x_L ekspresyonu açısından adenokarsinomlu olguların %60.7 (34 olgu)'si pozitif olarak değerlendirilirken, BPH'lı olguların %31.7 (19 olgu)'si pozitif olarak değerlendirildi (Şekil 4.5). Prostat adenokarsinomlu ve BPH'lı olgular arasında hem Bcl-2 hem de Bcl-x_L protein ekspresyonları açısından anlamlı ilişki bulundu (sırası ile p=0.000 ve p=0.003).

Tablo 4.4 PCa'lı ve BPH'lı olgularda anti-apoptotik proteinlerin ekspresyonları

	Prostat adenokarsinom (%)	Benign prostat hiperplazi (%)	p-değeri
Bcl-2			
Negatif	56 (100)	15 (%25)	
Pozitif	0	45 (%75)	0.000
Bcl-x _L			
Negatif	22 (39.3)	41 (68.3)	
Pozitif	34 (60.7)	19 (31.7)	0.003



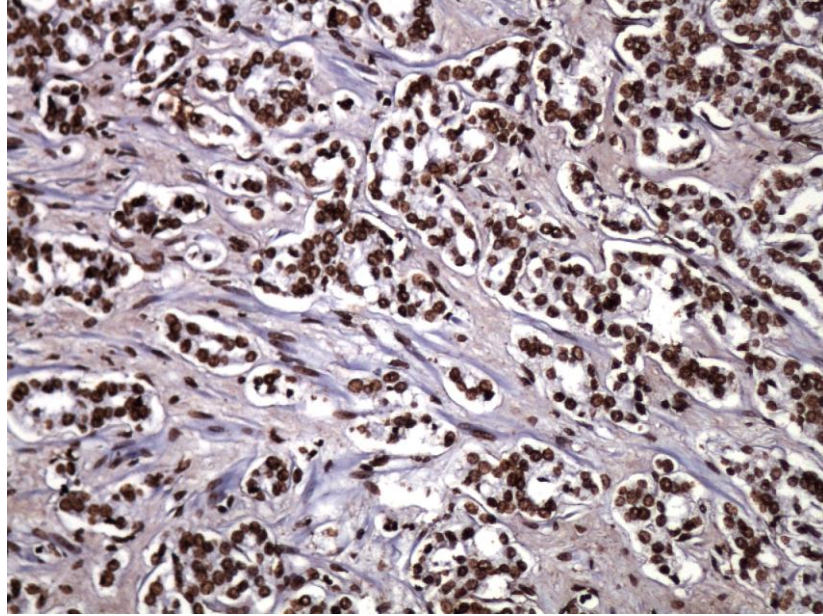
Şekil 4.4 Prostat adenokarsinomunda Bcl-2 protein ekspresyonu yokluğu/negatifliği (x200) (Sol üst köşedeki lenfoid alanlarda Bcl-2 ekspresyonu gözlenmektedir ve bu da Bcl-2 İHK analiz için iç kontrol olarak değerlendirilebilir).



Şekil 4.5 Prostat adenokarsinomunda Bcl-x_L protein ekspresyonu (x200).

4.4.2 Apoptotik İndeks (AI) ve Bcl-2, Bcl-x_L Protein Ekspresyonları

Prostat adenokarsinomlu olgularda, TUNEL pozitif apoptotik hücre indeksi medyan değeri 0.9 (%95 güven aralığı, aralık 0-1) iken, BPH'lı olgularda apoptotik indeks medyan değeri 0.93 (%95 güven aralığı, aralık 0-1) olarak belirlendi (Şekil 4.6).



Şekil 4.6 Prostat adenokarsinomunda TUNEL yöntemi ile apoptotik hücreler (x200).

Bcl-2 protein ekspresyon kaybı olan prostat adenokarsinomlu ve BPH'lı olgularda apoptotik indeks 0.9 (%95 güven aralığı, aralık 0-1) olarak belirlenirken, Bcl-2 ekspresyonu gözlenen BPH'lı olgularda apoptotik indeks 0.98 (%95 güven aralığı, aralık 0-1) olarak belirlendi. Bcl-x_L ekspresyon kaybı olan prostat adenokarsinomlu ve BPH'lı olgularda apoptotik indeks sırası ile 0.95 (%95 güven aralığı, aralık 0-1) ve 0.90 (%95 güven aralığı, aralık 0-1) olarak belirlenirken, protein ekspresyonunun gözleendiği olgularda yine sırası ile apoptotik indeks değerleri 0.9 (%95 güven aralığı, aralık 0-1) ve 0.99 (%95 güven aralığı, aralık 0-1) olarak hesaplandı (Tablo 4.5).

Prostat karsinomlu ve BPH'lı olgularda belirlenen apoptotik indeks değerleri GADD45γ protein ekspresyonları ile birlikte değerlendirildiğinde, adenokarsinomlu olgularda protein ekspresyonunun apoptotik indekste önemli farklılığa neden olmadığı gözlenirken, BPH'lı olgularda apoptotik indeksin 1.3 kat arttığı belirlendi. Ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p > 0.05$).

Tablo 4.5 Prostat adenokarsinomlu ve BPH'lı olgularda apoptotik indeks ile GADD45 γ , Bcl-2 ve Bcl-x_L protein ekspresyonları arasındaki ilişki

	Prostat adenokarsinomda apoptotik indeks (medyan/aralık)	Benign prostat hiperplazisinde apoptotik indeks (medyan/aralık)
GADD45 γ		
Negatif	0.9 / 0-1	0.75 / 0-1
Pozitif	0.95 / 0-1	0.99 / 0-1
Bcl-2		
Negatif	0.9 / 0-1	0.9 / 0-1
Pozitif	-	0.98 / 0-1
Bcl-x _L		
Negatif	0.95 / 0-1	0.9 / 0-1
Pozitif	0.9 / 0-1	0.99 / 0-1

4.4.3 GADD45 γ Metilasyonu ve Bcl-2/ Bcl-x_L Protein Ekspresyonları

Prostat adenokarsinomlu olgular arasında, Bcl-2 ekspresyon kaybı olan olguların %98.2 (55 olgu)'sinde GADD45 γ promoter metilasyonu gözlenmedi. BPH'lı olgularda GADD45 γ promoter metilasyonu gözönüne alındığında, olguların %33.3'ünde Bcl-2 ekspresyon kaybı gözlenirken, geride kalan olgularda (%66.7) Bcl-2 ekspresyonu pozitif olarak belirlendi (Tablo 4.6 ve 4.7). GADD45 γ promoter metilasyonunun belirlendiği tek prostat adenokarsinomlu olguda Bcl-x_L protein ekspresyon kaybı gözlemlendi. Promoter metilasyonunun gözlenmediği olguların 21 (%38.2)'inde Bcl-x_L protein ekspresyon kaybı gözlenirken, 34 (%61.8) olgu Bcl-x_L ekspresyonu açısından pozitif. BPH'lı olgular içinde, GADD45 γ promoter metilasyonu gözlenen olguların %86.7 (13 olgu)'si Bcl-x_L ekspresyonu açısından negatif iken 2 (%13.3) olgu Bcl-x_L protein ekspresyonu açısından pozitif. Promoter metilasyonu gözlenmeyen olgular arasında ise, %62.2 olguda (28 olgu) Bcl-x_L ekspresyon kaybı gözlenirken, olguların %37.8 (17 olgu)'sinde protein ekspresyonu belirlendi.

Tablo 4.6 PCa'lı olgularda *GADD45* γ promoter metilasyon durumu ile Bcl-2 ve Bcl-x_L ekspresyonları arasındaki ilişki

PCa	Promoter metilasyonu		<i>p</i> -değeri
	+	-	
	n(%)	n(%)	
Bcl-2			
Pozitif	0	0	*
Negatif	1 (%1.8)	55 (%98.2)	
Bcl-x _L			
Pozitif	0	34 (%61.8)	0.393
Negatif	1 (%1.8)	21 (%38.2)	

* Prostat kanserli olguların tümünde Bcl-2 ekspresyon kaybı gözlemlendiği için istatistiksel analiz yapılamamıştır.

Tablo 4.7 BPH'lı olgularda *GADD45* γ promoter metilasyon durumu ile Bcl-2 ve Bcl-x_L ekspresyonları arasındaki ilişki

BPH	Promoter metilasyonu		<i>p</i> -değeri
	+	-	
	n(%)	n(%)	
Bcl-2			
Pozitif	10 %66.7	35 (%77.7)	0.494
Negatif	5 %33.3	10 (%22.2)	
Bcl-x _L			
Pozitif	2 (%13.3)	17 (%37.8)	0.112
Negatif	13(%86.7)	28 (%62.2)	

Prostat adenokarsinomlu olguların sadece 1'inde *GADD45* γ promoter metilasyonu gözlemlendi ve bu olguya ait apoptotik indeks 0 olarak belirlendi. *GADD45* γ promoter metilasyonu açısından BPH'lı olgularda belirlenen apoptotik indeks arasında belirgin bir fark gözlemlenmedi [promoter metilasyonlu olgularda apoptotik indeks 0.9 (%95 güven aralığı, aralık 0-1) ve metile olmayan olgularda apoptotik indeks 0.95 (%95 güven aralığı, aralık 0-1)].

5. TARTIŞMA

GADD45 gen ailesi üyelerinin fonksiyonları her ne kadar birbirlerine benzese de, fonksiyonları uyarının türüne, uyarının etkilediği hücre tipine ve hücrenin içinde bulunduğu fizyolojik koşullara göre farklılıklar göstermektedir. *GADD45* proteinleri hem fetal hem de erişkin dokularda eksprese edilirler. Ancak, hücre döngüsünün G_1 fazında bu proteinlerin ekspresyonları artarken, S fazı boyunca ekspresyonları önemli derecede azalmaktadır. *GADD45* proteinleri stres sensörleri ve tümör baskılayıcılar gibi etki göstererek genotoksik ve genotoksik-olmayan ajanlara karşı hücre yanıtının oluşmasında rol oynarlar. *GADD45 α* ve *β* 'nin yer aldıkları yollardaki fonksiyonları daha detaylı bilinmesine karşın *GADD45 γ* 'nin fonksiyonu net olarak bilinmemektedir ve fonksiyonları ile ilgili elde edilen veriler birbirleri ile uyum göstermemektedir.

Bu çalışmanın hipotezlerinden biri *GADD45 γ* 'nin metilasyonu aracılı gen ekspresyon kaybının prostat karsinogenez sürecinde rol oynadığıdır. Bu hipotezin eşliğinde prostat adenokarsinomlu ve BPH'lı olgularda *GADD45 γ* metilasyon durumunu ve protein ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi amaçlandı. Çalışmamızda *GADD45 γ* prostat adenokarsinomlu olguların %1.8'i metile iken, BPH'lı olguların %25'i metile idi. *GADD45 γ* protein ekspresyon oranları prostat adenokarsinomlu ve BPH'lı olgularda sırası ile %53.6 ve %33.3 olarak belirlendi. Bilgilerimiz dahilinde, bu çalışma prostat kanseri ve BPH'lı klinik örneklerde *GADD45 γ* metilasyonunu ve protein ekspresyonu ile ilişkisini belirleyen ilk çalışmadır.

GADD45 γ proteininin rat prostat dokularında androjenlerle kontrol edilen hücresel olaylarda yer alabileceği düşünülmüştür (Jiang ve Wang 2003). Prostat karsinom hücre hatları ile yapılan bir çalışmada, androjen duyarlı karsinom hücrelerinde sentetik androjen analogları ile uyarım sonrasında *GADD45 γ* protein ekspresyonunun arttığı ancak 48 saat sonra ekspresyonun azaldığı belirlenmiştir. Androjen reseptörü taşımayan hücre hatlarında ise *GADD45 γ* ekspresyonu gözlenmemiştir. Sonuç olarak, *GADD45 γ* proteininin aşırı ekspresyonunun hücre büyümesini inhibe ettiği ve

androjenlerle regüle edilen negatif hücre kontrolünde yer alabilecekleri öne sürülmüştür (Jiang ve Wang 2004). Prostat kanser hücre hatları ile yapılan bir başka çalışmada, *GADD45γ*'nin ektopik ekspresyonunun hücreleri G₁ fazında tuttuğu ve böylelikle proliferasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir (Flores ve Burnstein 2010). Hipofiz adenokarsinomlu klinik olgular ve karsinomlu hücre hatları ile yapılan bir çalışmada, 36 klinik olguda *GADD45γ* ekspresyon kaybı gözlenirken, hücre hatlarında hücre çoğalmasının inhibe (>%50) olduğu gözlenmiştir. Hücre hatları *GADD45γ* eksprese eden vektör ile transfekte edildiğinde, hücre proliferasyonunun inhibe olduğu ve *GADD45γ*'nin çoğalmayı inhibe eden genlerden biri olduğu öne sürülmüştür (Zhang vd 2002). Chung ve arkadaşları (2003), normal insan tiroid hücreleri ve anaplastik tiroid kanser hücre hatlarını kullanarak yaptıkları çalışmalarında, *GADD45α* ve *β* ekspresyonunda bir fark gözlenmezken, *GADD45γ* gen ekspresyonunun anaplastik tümör hücre hatlarında önemli derecede azaldığını belirlemiştir. Bu bulgular, anaplastik kanser hücrelerinin *GADD45γ*'nin yer aldığı belirli düzenleyici mekanizmalarını kaybettiklerini göstermektedir. Klinik hepatoselüler karsinom ve bitişik sağlıklı doku örnekleri ile yapılan bir çalışmada, Northern blot analizi ile karsinomlu olguların %65.2'sinde *GADD45γ* ekspresyonunda azalma belirlenmiştir (Sun vd 2003). Bahar ve arkadaşları (2004), 33 hipofiz adenomlu olguların %58'inde *GADD45γ* metilasyonunu belirlemişler ve mRNA düzeyinde gen ekspresyonu gözlenmeyen 22 adenomlu olgunun 18 (%82)'inde hem metilasyon-özgün PCR hem de sodyum bisülfid dizi analizi ile *GADD45γ* metilasyonunu belirlemiştir. *GADD45γ* metilasyonu ile ekspresyon kaybı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmasına karşın, *GADD45γ* metilasyonu gözlenen olguların %9'unda *GADD45γ* transkriptinin eksprese olduğu bildirilmiştir. Benzer şekilde uyumun gözlenmediği diğer grupta olguların %18'inde *GADD45γ* metilasyonu belirlenmediği halde, ekspresyon gözlenmemiştir. Küçük hücre dışı akciğer kanserlerinde yapılan bir çalışmada *GADD45γ* metilasyon sıklığı %31.6 olarak bulunmuştur. Aynı zamanda metilasyon sıklığının kadınlarda erkeklere göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir ve bu genin metilasyon-aracılı sessizleşmesinin akciğer karsinogenezinde rol oynayabileceği öne sürülmüştür (Na vd 2010). Ying ve arkadaşları (2005), yüksek-çözünürlüklü bisülfid dizi analizi sonucunda, *GADD45γ*'nin çeşitli kanser tipleri ve tümör hücre hatlarında, sıklıkla epigenetik olarak inaktive olduğuna dair güçlü kanıtlar elde etmişlerdir. *GADD45* gen ailesi üyelerinin ekspresyonları toplam 75 karsinom ve lenfoma hücre hattında incelenmiştir. Bu karsinom ve

lenfomalar nazofarinks, meme, özofagus, kolorektal, serviks, akciğer, gastrik, larinks karsinomlu hücre hatlarıyla, non-Hodgkin lenfoma, Hodgkin lenfoma ve lösemi hücre hatlarını kapsamaktadır ve *GADD45 γ* ekspresyonları semi-quantitative RT-PCR kullanılarak analiz edilmiştir. Nazofaringeal karsinomda %73, non-Hodgkin lenfomalarda %85, Hodgkin lenfomalarda %50 ve diğer hücre hatlarında %35 oranında *GADD45 γ* ekspresyonunun baskılandığı veya susturulduğu bulunmuştur. Bunun aksine *GADD45 α* ve *GADD45 β* ekspresyonları tüm hücre hatlarında yüksek ekspresyon profili göstermişlerdir. *GADD45 γ* ekspresyonunun baskılandığı ya da susturulduğu hücre hatlarının tümünde *GADD45 γ* promoter metilasyonu saptanmıştır. Farklı lenfoma türlerinde metilasyon oranı %16-88 oranında değişirken, solid tümörlerde bu %11-16 arasında değişkenlik göstermiştir ve bu bulgular lenfomaların hipermetilasyon düzeylerinin solid tümörlere göre anlamlı şekilde yüksek olduğunu göstermektedir. Bu çalışmada ilginç olan, primer meme karsinomunda ve primer hepatoselüler karsinomda *GADD45 γ* promoter metilasyonunun gözlenmemesidir (Ying vd 2005). Tüm bu bulgular, bize *GADD45 γ* 'nın birçok farklı kanser türünde genellikle hipermetile olduğunu, ancak hipermetile olan CpG adalarının tümör-spesifik olduğunu ve nadiren mutasyonların bulunduğunu göstermektedir. Biz çalışmamızda sadece *GADD45 γ* promoter bölgesinin (115 bp'lik DNA fragmanında) metilasyon durumunu değerlendirdik ve prostat kanserinde metilasyon oranını düşük bulduk. Yukarıda detaylıca tartıştığımız sonuçlar eşliğinde, *GADD45 γ* 'nın epigenetik sessizleşmesinin prostat karsinogenezindeki rolünü net olarak açıklayabilmek için *GADD45 γ* genindeki metilasyon durumu hakkında daha detaylı bilgi edinilmelidir. Bu amaçla hem genin çalıştığımız promoter bölge dışındaki diğer kor CpG alanlarındaki metilasyon durumunun değerlendirilmesi hem de bisülfid dizi analizi gibi daha ileri yöntemlerin kullanılması gerektiğini düşünmekteyiz.

Zhang ve arkadaşları (2010) tarafından yapılan bir çalışmada, gastrik, kolorektal ve pankreas kanserlerinde *GADD45 γ* metilasyon yüzdeleri HRM analizi ile değerlendirilmiş ve sırasıyla bu kanserlerde %34, %45 ve %31 oranında hipermetilasyon gözlemlendiği belirlenmiştir. Normal dokularda ise metilasyon yüzdesi %10'un altında bulunmuştur. HRM analizi, promoter metilasyon analizlerinde kullanılan yeni bir yöntemdir (Wojdacz vd 2008). PCR sonrası yapılan bir erime analizi yöntemi olan HRM, dizi uzunluğuna, GC içeriğine veya dizi komplementerliğine göre

dsDNA'yı analiz etmede kullanılır. Oldukça duyarlı, hızlı ve ucuz bir yöntemdir. Bu yöntemde PCR ile amplifikasyondan sonra, DNA'ya-bağlanan bir saturasyon boyası varlığında erime eğrisi analizi yapılır ve hedef DNA ampikonunun Tm derecesi belirlenir. HRM analizi, daha detaylı bir erime eğrisi analizidir. Bu amaçla kullanılan yazılım, öncelikle ek ısı değişimi uygulayarak erime eğrisini normalize eder ve sonuçları gözle daha iyi ayırt edebilecek hale getirmek için normalize edilen erime eğrilerini yeni bir grafiğe yerleştirir. Bu yazılım aynı zamanda farklı genotip/dizilere sahip örnekleri gruplar halinde toplar ve böylelikle birçok veriyi içeren bir analizde sonuçları kolaylıkla yorumlamamızı sağlar. HRM analizinde, konvansiyonel erime analizinde kullanılan satüre olmayan boyaların (SYBR Green I gibi) aksine satüre olan boyalar (LC GreenTM I, EVA Green ve Syto 9 gibi) kullanılır. Satüre olmayan veya interkalasyon boyaları erime analizinde oldukça kullanışlı boyalar olmalarına karşın, amplifikasyon reaksiyonları için toksik özelliğe sahiptirler ve bu nedenle de düşük konsantrasyonlarda kullanılırlar. Aynı zamanda, bu boyalar erime başladığında tekrar yerlerini alabilme özelliğine sahip olduklarından, erime analizlerinde büyük bir dezavantaja sahiptirler. Satüre olan boyalar, amplifikasyon sırasında *Taq* polimerazı inhibe etmediklerinden toksik etkileri çok düşüktür ve tüm DNA fragmanının boya ile satüre olmasına olanak sağlayacak şekilde yüksek konsantrasyonda kullanılabilirler. Böylelikle, hedef DNA fragmanının uzunluğu boyunca DNA'ya bağlanırlar. Erime sırasında, satüre olan boyalar dsDNA'nın denatüre olmaya başladığı bölgede DNA'dan ayrılmaya başlarlar. DNA'nın denatüre olmayan bölgelerinde satüre boyanın varlığı nedeniyle, serbest kalan boya tekrar DNA'ya bağlanamaz. Bu özellik daha detaylı ve doğru analiz yapılmasına olanak sağlar. HRM analizini konvansiyonel erime analizinden üstün kılan özellikler, yukarıda aktarıldığı gibi HRM analizinde kullanılan boyaların sahip oldukları özelliklerdir (Wojdacz vd 2009). Bu nedenlerle çalışmamızda *GADD45* metilasyon durumunu belirlemek için HRM analizini kullandık ve tüm olgulardan informatif sonuçlar aldık. Bunun yanısıra, konvansiyonel metilasyon-spesifik PCR ile karşılaştırıldığında tek bir primer seti ile DNA metilasyon analizinin yapılabilmesi araştırmalarda maliyeti de azaltmaktadır. DNA metilasyon profillerinin belirlenmesinde, HRM analizinin duyarlılık, özgünlük ve maliyet açısından metilasyon-spesifik PCR yöntemlerine göre daha üstün olduğunu düşünmekteyiz.

HRM analizi ile tamamladığımız bu çalışmada promoter metilasyonu ve protein ekspresyonu arasında uyum gözlenmeyen olgular vardı. Prostat adenokarsinomlu

olgulara promoter metilasyonu belirlenmemesine karşın 26 olguda protein ekspresyon kaybı gözlenmiştir. Promoter metilasyonunu belirlediğimiz 1 olguda protein ekspresyonu gözlendi. Benzer şekilde BPH'lı olgulardan 6'sında promoter metilasyonuna karşın protein ekspresyonu gözlenirken, metilasyon gözlenmeyen 31 olguda protein ekspresyon kaybı belirlendi. Bu sonuçlar bize, promoter metilasyonu olmayan ve protein ekspresyonu gözlenmeyen olgularda çalışmamızda değerlendirdiğimiz promoter bölgesinin *GADD45γ* gen metilasyon durumunu net olarak yorumlamak için yeterli olmadığını göstermektedir. Bunun yanısıra diğer epigenetik mekanizmaların da bu uyumsuzluktan sorumlu olabileceği düşünülmektedir (Jeronimo vd 2011, Aqeilan vd 2010, Bonci vd 2008). Her ne kadar primer kanserlerde *GADD45γ* gen mutasyonları nadir olarak gözlenirse de genetik faktörlerin de bu açıdan değerlendirilmesi gerekmektedir (Ying vd 2005). Bir başka uyumsuzluk da *GADD45γ* promoter bölgesi metile olduğu halde protein ekspresyonunun gözlendiği olgulardır. Bu durum iki şekilde açıklanabilir: Birincisi, çalışmamızda metilasyon analizi kantitatif olarak yapılamadığından metilasyon yüzdesi hakkında bilgimiz bulunmamaktadır ve büyük olasılıkla bu olgularda metilasyon yüzdesinin düşük olması, protein ekspresyon kaybı için yetersizdir. İkinci olasılık ise IHK analizinde kullanılan *GADD45* antikorunun poliklonal olmasıdır. Ticari olarak monoklonal antikorun bulunmaması nedeniyle, poliklonal antikor kullanılmıştır. Aynı proteinin farklı epitoplarını tanıyabilme avantajına rağmen, poliklonal antikorların farklı proteinlerdeki ortak epitopları da tanıyabilmesi, elde edildiği deney hayvanı türüne göre değişkenlik gösterebilmesi ve aynı antijenle yeniden immunize edilen deney hayvanlarında farklı epitoplara sahip olmaları gibi önemli dezavantajları bulunmaktadır (Burry vd 2010).

Prostat kanser oluşumu ve progresyonunda rol oynayan mekanizmalardan biri de apoptotik yolların regülasyonunda yer alan kritik moleküllerin ekspresyonlarındaki değişimlerdir. Anti-apoptotik moleküller olan Bcl-2 ve Bcl-x_L bu moleküller arasında yer alır (Catz vd Johnson 2003). Sayar ve arkadaşlarının (2012), karsinomun histolojik derecelendirmesinde Bcl-2 belirtecinin önemini saptamak amacıyla yaptıkları çalışma sonucunda BPH olgularının %26.32'sinde Bcl-2 ekspresyonu gözlenmezken %55.26'sında ekspresyon belirlenmiştir. Ancak prostat adenokarsinomlu olguların hiç birinde Bcl-2 ekspresyonu gözlenmemiştir. Yüksek dereceli PIN lezyonları ve prostat adenokarsinom olgularının karşılaştırıldığı bir çalışmada, Bcl-2 aşırı ekspresyonu adenokarsinomlu olguların %2.3'ünde gözlenirken, diğer grupta bu oran %34.9 olarak

belirlenmiştir (Johnson vd 1998). Zhang ve arkadaşlarının (2006) BPH'lı olgularla yaptıkları çalışmada Bcl-2 ekspresyonunu %80 olarak bulmuşlardır (Zhang vd 2006). Haussler ve arkadaşlarının (1999) yaptığı bir çalışmada, prostat kanserli olguların %3'ünde Bcl-2 ekspresyonu gözlenirken, BPH'lı olguların bazal hücrelerinde Bcl-2'nin diffüz olarak eksprese edildikleri belirlenmiştir. Prostatın iki temel hücresi olan luminal ve bazal hücreler farklı belirteçleri eksprese ederler. Luminal hücreler PSA, AR, sitokeratin 8, sitokeratin 18 ve CD57'yi eksprese ederken bazal hücreler yüksek düzeyde p63, Bcl-2 ve epidermal büyüme faktör reseptörünü eksprese ederler. Bu nedenle, Bcl-2 normalde bazal hücre belirteci olarak değerlendirilmektedir (van Leenders ve Schalken 2001). Çalışmamızda prostat adenokarsinomlu tüm olgularda Bcl-2 ekspresyon kaybı belirlenirken, BPH'lı olguların %75'inde Bcl-2 ekspresyonu gözlemlendi. Bu bulgular, yukarıda tartışılan çalışma bulguları ile uyumludur ve Bcl-2 ekspresyonunun gözlenmemesi kanserli prostat dokularında bazal hücre kaybı olduğunu göstermektedir.

Castilla ve arkadaşları (2006), 139 FFPE prostat kanser örneği ile yaptıkları çalışmalarında, Gleason skoru düşük örneklerde Bcl-x_L ekspresyon düzeyinin de düşük olduğunu, Bcl-x_L immunreaktifliğin kabaca granüler, sitoplamik boyama ile karakterize olduğunu gözlemlemişlerdir. Benign hiperplastik bezlerde, immunpozitif çok az sayıda hücrenin varlığını belirtmişlerdir. Prostat kanser hücre hattı (PC3) ile yapılan bir çalışmada da, bu hücrelerde Bcl-x_L'in aşırı eksprese olduğu ve bunun da çoklu-ilaç dirençliliği ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (Li vd 2001). Krajewski ve arkadaşları normal prostatın epitel hücrelerinde de Bcl-x_L ekspresyonu gözlemekle birlikte, 64 prostat adenokarsinomlu olgunun tümünde Bcl-x_L ekspresyonunu belirlemişlerdir (Krajewski vd 1994). Prostat adenokarsinomunda, benign prostat hiperplazi ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede Bcl-x_L'in ekspresyonunu belirlediğimiz çalışmamızın bulguları, literatürle uyumludur.

In vitro çalışmalar, Bcl-2'nin prostat kanser hücrelerini apoptozdan koruduğunu göstermektedir (Raffo vd 1995). Bu bulgu ile uyumlu olarak çalışmamızda Bcl-2 ekspresyon kaybı ile apoptoz arasında bir korelasyon gözlenmemiştir. Benzer uyum Bcl-x_L ekspresyonunda da gözlenmemiştir. Prostat kanser hücreleri, apoptozdan kaçınmak için farklı moleküler mekanizmaları kullanırlar. Prostat kanserleri, hücrelerde apoptozu uyaran androjen ablasyon tedavisine yanıt verirler, ancak tedaviden 12-18 ay

sonra prostat kanser hücrelerinin %50'si androjen-bağımsız ve apoptoza-dirençli hale gelirler (Eisenberger ve Walsh 1999). Çalışmamızda prostat adenokarsinomlu ve BPH'lı olgularda, AI açısından bir fark gözlenmedi. Aynı zamanda çalışmada değerlendirilen GADD45 γ , Bcl-2 ve Bcl-x_L protein ekspresyonları ile AI arasında da önemli fark belirlenmedi. Johnson ve arkadaşları (1998), BPH'la karşılaştırıldığında AI'in prostat adenokarsinomlu olgularda istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığını belirlemişlerdir. Araştırmacılar TUNEL yöntemi ile pozitif boyanmadaki varyasyonların bulunmasından yola çıkarak, apoptotik hücreleri morfolojik özelliklerine göre tanımlamışlar ve AI'i belirlerken intraluminal apoptotik-benzeri cisimleri hesaplamada değerlendirmemişlerdir. Duman ve arkadaşları (2004), yaşa bağlı olarak (>65 yaş) BPH'lı olgularda TUNEL yöntemini kullanmışlar ve apoptozun artmış olduğunu belirlemişlerdir. Bu bulgu, ortalama yaşın 68.5 \pm 10.1 olduğu BPH'lı olgu verilerimiz ile uyumludur. Prostat kanserlerinde olduğu gibi, BPH'da da apoptozun yüksek oranlarda gözlenmesi, bu olgularda apoptozu uyaran faktörlerin varlığıdır. En olası nedenlerden biri BPH'lı olgularda rezidual idrarın varlığıdır ve bunun da enfeksiyonlara neden olmasıdır. Bir başka faktör de retensiyon veya kateterizasyon nedeniyle mesaneye olan basınçtır.

GADD45 α ve *β* , ancak belli koşullarda, hücrelerde apoptozu uyarabilmelerine karşın, *GADD45 γ* hücrelerin G₂/M evresinde durma ve apoptozun uyarımında daha kritik rol oynamaktadır (Thyss vd 2005, Liebermann ve Hoffman 2007, Tamura vd 2012). Bu nedenle, çalışmamızda *GADD45 γ* ekspresyonunun apoptozla olan ilişkisini değerlendirdik. Prostat kanserli olgularda anlamlı derecede *GADD45 γ* ekspresyonu gözlenirken, *GADD45 γ* ekspresyon durumu apoptozla ilişkili değildi. Chung ve arkadaşları (2003), normal tiroid hücreleri ile karşılaştırıldığında, anaplastik tiroid kanser hücre hatlarında *GADD45 γ* ekspresyonunun önemli derecede azaldığını belirlemişlerdir. Endojen *GADD45 γ* eksprese eden bu hücrelerde apoptoz çok düşük derecede gözlenirken, *GADD45 γ* 'nin reeksprese edildiği kanser hücrelerinde apoptozda artış gözlenmiştir. Bu çalışmada, *GADD45 γ* 'nin anaplastik tiroid kanser hücrelerinde çoğalmayı-inhibe edici etkisinin apoptoza neden olabileceği öne sürülmüştür. Saha ve arkadaşları (2010), akciğer kanser hücre hattı (PC9) ile yaptıkları çalışmalarında, fenolik bir bileşik olan kurkuminin p53-bağımsız yolakla *GADD45* ekspresyonunu arttırdığını ve bu artışın apoptoza neden olduğunu gözlemlemişlerdir. Kurkuminin anti-

kanser aktivitesindeki mekanizmanın GADD45 ekspresyon artışı ile ilişkili olduğu öne sürülmüştür. Yukarıda tartışılan verilerle birlikte, bilgilerimiz dahilinde prostat adenokarsinomu ve BPH'da *GADD45γ*'nin apoptozla olan ilişkisini araştıran bir çalışma bulunmamaktadır. GADD45 proteinlerinin hem p38/JNK üzerinden hem de mitokondri üzerinden hücreyi ölüme götürdükleri düşünülmektedir. NF-κB, c-myc ekspresyonunu artırır ve bu da GADD45β ekspresyonunu değiştirmezken, GADD45α ve GADD45γ ekspresyonlarını inhibe eder. Bu mekanizma üzerinden JNK-aracılı apoptozun, *GADD45α* ve *GADD45γ*'nin sessizleştirilmesi ile bloke edilebileceği öne sürülmektedir. GADD45α'nın mitokondri-aracılı hücre ölümü ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Bu etkisini elongasyon faktörü 1-α ile etkileşime girerek gösterir. Bu etkileşim hücre iskeleti stabilitesini bozar ve Bim'in membrandan ayrılmasına bağlı olarak mitokondri üzerinden apoptoza neden olur. GADD45α ve GADD45γ'nin pro-apoptotik fonksiyonlarına zıt olarak, GADD45β, mitojenle-aktive protein kinaz kinaz 7 (MKK7) inhibe ederek, TNF-α aracılığı ile apoptozun JNK üzerinden apoptozu inhibe eder (Tamura vd 2012). GADD45γ'nin apoptoz yolaklarındaki etki mekanizması ile ilgili bilgilerimiz oldukça sınırlıdır ve GADD45γ ile uyarılan apoptozun derecesi ile birlikte hücre tipine göre gösterdiği değişiklik henüz net olarak bilinmemektedir. Bu çalışmadan elde ettiğimiz veriler bize prostat kanserinde apoptoz regülasyonunun çok daha karmaşık bir mekanizma ile sağlandığını ve *GADD45γ*'nin tek başına prostat kanserinde apoptozun mekanizmasını açıklamaya yeterli olmadığını göstermektedir.

Yukarıda da tartışıldığı üzere GADD45 protein ailesi üyeleri başlıca hücre döngüsünden kaçışın regülasyonunda önemli rol oynayan stres-sensörleridir. Son yıllarda GADD45 genlerinin bölge-spesifik aktif DNA demetilasyonunda da rol oynadıkları düşünülmektedir, ancak bu fonksiyonu yerine getirirken gerçekleşen mekanizmalar net ve detaylı olarak bilinmemektedir. DNA demetilasyonu, metile DNA zincirinden 5mC'lerin uzaklaştırılmasıdır ve bu süreçte DNA tamir mekanizmaları da görev yapmaktadır. DNA demetilasyonu; aktif DNA metilasyonu ve pasif DNA demetilasyonu olarak 2 farklı mekanizma ile gerçekleşir. Pasif DNA demetilasyonu; DNA replikasyonu sırasında DNMT1'in inhibisyonu, degradasyonu ya da nükleer eksizyonu sonucu, yeni hücrelerde DNA metilasyonunun %50 oranında kaybıdır (Oswald vd 2000, Mayer vd 2000). Aktif DNA metilasyonu ise 5mC'lerin enzimatik olarak uzaklaştırılmasıdır (Jost 1993, Agius vd 2006). DNA demetilasyon

mekanizmasını aktifleştiren sinyallerin ne olduğu henüz net olarak bilinmemektedir. Ancak demetilleyici faktörlerin ve regülatörlerin doku-spesifik oldukları düşünülmektedir (Sen vd 2010, Guo vd 2011).

Konu ile ilgili ilk çalışmalar *GADD45α* ile tamamlanmıştır ve *GADD45α*'nın overekspresyonunun, metilasyonla susturulmuş reporter'ları demetile ederek aktive ettiği gösterilmiştir (Barreto vd 2007). Daha sonraki çalışmalarda, *GADD45*-aracılı demetilasyonun memeli hücrelerinde meydana gelen aktif bir olay olduğu ve tüm *GADD45* izoformlarının DNA demetilasyonunda yer aldığı gösterilmiştir (Rai vd 2008, Engel vd 2009). *GADD45*-aracılı demetilasyon, hücre farklılaşması ve strese yanıt süreci ile birlikte nükleer hormonlar gibi farklı uyaranlara yanıtla da ilişkili bulunmuştur (Sen vd 2010). *GADD45α* ile ilgili yapılan çalışmalarda, bu proteinin hem BER (Baz Eksizyon Tamiri)'de hem de NER (Nükleotid Eksizyon Tamiri)'de görev aldığına dair bulgular elde edilmiştir (Niehrs ve Schäfer 2012). Bu bulgular eşliğinde, *GADD45* proteinlerinin DNA demetilasyonunu nasıl düzenlediklerine ilişkin 2 olası model öne sürülmüştür. İlk modelde, NER ya tek başına ya da BER ile birlikte *GADD45* proteinlerinin yardımı ile demetilasyon sürecine katılır. Yapılan çalışmalarda NER inhibitörü olan gemsitabinin *GADD45α*-aracılı demetilasyonu inhibe ettiği, ancak BER inhibitörlerinin aynı etkiye sahip olmadıkları belirlenmiştir (Schmitzs vd 2009, Schafer vd 2010). Dolayısıyla bu ilk model NER odaklı bir mekanizmayı içermektedir. İkinci modelde ise BER aracılığı ile 5mC'nin deaminasyonu ve sonrasında yardımcı proteinler ve enzimler ile uzaklaştırılması yer almaktadır. Her iki modelde de NER ve BER'in birlikte yer aldıkları demetilasyonun hücre tipine ve içeriğine bağlı olarak farklı mekanizmalarla gerçekleştiği, ancak hangi tamir yolağının seçileceği veya bu yolakların nasıl aktive edildikleri henüz netlik kazanmamıştır (Niehrs ve Schäfer 2012).

DNA demetilasyonu ile ilgili en önemli sorulardan biri de bölge-spesifikliğinin nasıl sağlandığıdır. *GADD45*-aracılı demetilasyon için bölge-spesifikliğini sağlayan kofaktörler (demetilasyonu hedefleyici) içinde en önemli adaylardan biri nükleer hormon reseptörleridir. Çünkü *GADD45* ailesi proteinleri LXXLL motifi içerirler ve bu motifler nükleer hormon reseptörlerine bağlanmaya aracılık etmektedirler. Dolayısıyla, *GADD45* proteinlerin hormon reseptörlerine bağlanarak, bu reseptörleri demetile etmeleri ve sonrasında da özgün hormonların hedef bölgeye çağrılarak reseptöre bağlanmaları sözkonusudur (Yi vd 2000).

Özetle, herhangi bir katalitik aktiviteleri olmamasına rağmen GADD45 proteinleri, DNA demetilasyonunu NER ve BER mekanizmalarına dahil olarak gerçekleştirebildikleri düşünülmektedir. Bu süreçte GADD45 proteinlerinin, nükleotid ve/veya baz eksizyon tamir faktörlerini gen-spesifik hedef bölgelere çağırdığı ve tamir faktörleri ile kromatin arasında bir adaptör protein gibi rol oynadığı öne sürülmektedir. Dolayısıyla, GADD45 proteinlerinin epigenetik ve DNA tamiri arasında bağlantıyı sağladıkları düşünülmektedir (Niehrs ve Schäfer 2012). GADD45 proteinlerinin DNA tamir mekanizmaları ile birlikte DNA demetilasyonunda önemli rol oynadıklarına dair veriler artmakla birlikte, GADD45-aracılı DNA demetilasyonunun karsinogenez üzerinde nasıl bir etkiye sahip olduğu henüz bilinmemektedir. Çalışmamızda GADD45 γ proteinin ekspresyonunun PCa'lı olgularda yüksek olduğu belirlenmiştir. Yukarıda tartışılan veriler eşliğinde, *GADD45 γ* 'nın prostat kanserinin oluşumundan sorumlu olabilecek genlerin demetilasyonuna neden olarak veya androjen reseptör sinyal iletim yolağını etkileyerek karsinogenez sürecinde yer alabileceği ile ilgili yeni çalışmaların yapılması gerektiğini düşünmekteyiz.

6. SONUÇLAR

Prostat kanseri, tüm dünyada erkeklerde en yaygın tanı alan kanser türlerinden biridir ve sıklıkla ölümlerle sonuçlanmaktadır. Prostat kanserinin patogenezi net olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte, tüm solid tümörlerde olduğu gibi önemli hücresel mekanizmalardaki düzensizliklerin hastalığın patogenezinde rol oynadığı bilinmektedir. “*Growth Arrest DNA Damage-Inducible 45*’ (*GADD45*) gen ailesi bu mekanizmalarda yer alan önemli bir gen ailesidir ve *GADD45α*, *GADD45β*, *GADD45γ* olmak üzere 3 üyeden oluşmaktadır.

GADD45γ, hücre döngüsünün negatif regülasyonunda rol oynayan bir genidir. Hem hematolojik malignansiler hem de solid tümörlerde *GADD45γ* ekspresyonunda önemli ölçüde azalma olduğu ve kanserli dokularda *GADD45γ* metilasyon düzeyinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda *GADD45γ* metilasyonu ve *GADD45γ* ekspresyon kaybı arasında sıkı bir korelasyon bulunmuştur. Ancak, prostat kanserlerinde sözkonusu genin ekspresyon ve metilasyon düzeyleri hakkında detaylı bilgi bulunmamaktadır. Bu amaçla planlanan çalışmamızın ana sonuçları aşağıda belirtilen maddeler halinde özetlenebilir:

- Literatürle uyumlu olarak, hematolojik malignansilerin aksine diğer solid tümörlerde olduğu gibi prostat kanserlerinde *GADD45γ* metilasyon düzeyi düşüktür (%1.8). Prostat kanserlerinin aksine BPH’da *GADD45γ* metilasyon sıklığı daha yüksektir (%25) (p=0.000). Bu çalışma, literatürde prostat kanserlerinde ve BPH’da *GADD45γ* metilasyon düzeyini belirleyen ilk çalışmadır.
- *GADD45γ* metilasyon profilini belirlemede Metilasyona-ölgün HRM Analizi

kullanıldı ve tüm olgulardan informatif sonuçlar alındı. HRM analizi diğer Metilasyona-özgün PCR yöntemlerine göre duyarlılık, özgünlük ve maliyet açısından daha üstündür.

- *GADD45γ* protein ekspresyon oranları prostat adenokarsinomlu ve BPH'lı olgularda sırası ile %53.6 ve %33.3 olarak belirlendi. *GADD45γ* metilasyonu ve protein ekspresyonu arasında korelasyonun bulunmaması, bu alanda yeni çalışmaların yapılması gerekliliğini göstermektedir. Bu yeni çalışmalar 3 ana başlık altında özetlenebilir:
 - a) Daha ileri yöntemler (bisülfid dizi analizi gibi) kullanılarak *GADD45γ* geninde, çalışmamızda değerlendirilen promoter bölgesinde metilasyon düzeyinin belirlenmesi,
 - b) *GADD45γ* geninde, çalışmamızda değerlendirilen promoter bölgesi dışındaki diğer CpG alanlarının metilasyon durumunun belirlenmesi,
 - c) DNA metilasyonu dışında diğer epigenetik mekanizmalardaki değişimlerin belirlenmesidir.
- Literatürle uyumlu olarak, prostat adenokarsinomlu tüm olgularda Bcl-2 ekspresyon kaybı belirlenirken, BPH'lı olguların %75'inde Bcl-2 ekspresyonu gözlemlendi (p=0.000). Bcl-2 ekspresyonunun gözlenmemesi, prostat kanserli dokularda bazal hücre kaybı olduğunu göstermektedir.
- Literatürle uyumlu olarak, BPH ile karşılaştırıldığında prostat adenokarsinomunda Bcl-x_L ekspresyonunda anlamlı artış belirlendi (p=0.003)
- Prostat kanserli olgularda *GADD45γ* ekspresyonunda anlamlı artış gözlenmesine rağmen, *GADD45γ* ekspresyon durumu ile apoptoz arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı. Bu sonuçlar bize prostat kanserinde apoptoz regülasyonunun çok daha karmaşık bir mekanizma ile sağlandığını ve *GADD45γ*'nin, tek başına kanser hücrelerinde bu programlı hücre ölüm tipine neden olmadığını göstermektedir.

7. KAYNAKLAR

- Abdollahi, A., Hoffman-Liebermann, B., Liebermann, D. (1991), Sequence and expression of a cDNA encoding MyD118: A novel myeloid differentiation primary response gene induced by multiple cytokines, *Oncogene*, 6(1):165-167.
- Agius, F., Kapoor, A., Zhu, JK. (2006), Role of the Arabidopsis DNA glycosylase/lyase **ROS1** in active DNA demethylation, *Proc Natl Acad Sci USA.*, 103(31):11796-801.
- Al Olama, AA., Kote-Jarai, Z., Giles, GG., Guy, M., Morrison, J., Severi, G., Leongamornlert, DA., Tymrakiewicz, M., Jhavar, S., Saunders, E., Hopper, JL., Southey, MC., Muir, KR., English, DR., Dearnaley, DP., Arden-Jones, AT., Hall, AL., O'Brien, LT., Wilkinson, RA., Sawyer, E., Lophatananon, A. (2009), Multiple loci on 8q24 associated with prostate cancer susceptibility, *Nat Genet.*, 41: 1058-60.
- Albihn, A., Johnsen, JI., Henriksson, MA. (2010), MYC in oncogenesis and as a target for cancer therapies, *Adv Cancer Res.*, 107: 163-224.
- Allis, CD., Jenuwein, T., Reinberg, D., Caparros, ML. (2007), Epigenetics, In: Chromatin modifications and their mechanism of action (Kouzarides, T., Berger, SL., Eds.), *CSHL Press*, New York, s.191-201,
- Andriole, GL., Crawford, ED., Grubb, RL., Buys, SS., Chia, D., Church, TR., Fouad, MN., Gelmann, EP., Kvale, PA., Reding, DJ., Weissfeld, JL., Yokochi, LA., O'Brien, B., Clapp, JD., Rathmell, JM., Riley, TL., Hayes, RB., Kramer, BS., Izmirlian, G., Miller, AB., Pinsky, PF., Prorok, PC., Gohagan, JK., Berg, CD., PLCO Project Team. (2009), Mortality results from a randomized prostate-cancer screening trial, *N Engl J Med.*, 26;360(13): 1310-9.
- Aqeilan, RI., Calin, GA., Croce, CM. (2010), miR-15a and miR-16-1 in cancer: discovery, function and future perspectives, *Cell Death Differ.*, 17: 215-220.
- Asatiani, E., Huang, WX., Wang, A., Rodriguez Ortner, E., Cavalli, LR., Haddad, BR., Gelmann, EP. (2005), Deletion, methylation, and expression of the NKX3.1 suppressor gene in primary human prostate cancer, *Cancer Res.*, 65: 1164-73.
- Attard, G., Swennenhuis, JF., Olmos, D., Reid, AH., Vickers, E., A'Hern, R., Levink, R., Coumans, F., Moreira, J., Riisnaes, R., et al. (2009), Characterization of ERG, AR and PTEN gene status in circulating tumor cells from patients with castration-resistant prostate cancer, *Cancer Res.*, 69: 2912-2918.

- Azam, N., Vairapandi, M., Zhang, W., Hoffman, B., Liebermann, DA., Azam, N., Vairapandi, M., Zhang, W., Hoffman, B., Liebermann, DA. (2001), Interaction of CR6 (GADD45 γ) with proliferating cell nuclear antigen impedes negative growth control. *J Biol Chem.*, 276:2766–2774.
- Bahar, A., Bicknell, JE., Simpson, DJ., Clayton, RN., Farrell, WE. (2004), Loss of expression of the growth inhibitory gene GADD45 γ , in human pituitary adenomas, is associated with CpG island methylation. *Oncogene*, 23:93–44.
- Bai, M., Skyras, A., Agnantis, NJ., Kamina, S., Tsano, E., Grepì, C., Galani, V., Kanavaros, P. , et al. (2004) Diffuse large B-cell lymphomas with germinal center B-cell like differentiation immunophenotypic profile are associated with high apoptotic index, high expression of the proapoptotic proteins bax, bak and bid and low expression of the antiapoptotic pretein bcl-xl, *Modern Pathol*, 17: 847-56.
- Barreto, G., Schäfer, A., Marhold, J., Stach, D., Swaminathan, SK., Handa, V., Döderlein, G., Maltry, N., Wu, W., Lyko, F., Niehrs, C. (2007), Gadd45a promotes epigenetic gene activation by repair-mediated DNA demethylation, *Nature*, 445(7128):671-5.
- Bavik, C., Coleman, I., Dean, JP., Knudsen, B., Plymate, S., Nelson, PS. (2006), The gene expression program of prostate fibroblast senescence modulates neoplastic epithelial cell proliferation through paracrine mechanisms, *Cancer Res.*, 66: 794–802.
- Benjamin, L. (1997), Bölüm 5 , Nucleic acid structure, *Oxford University Press*, Newyork, (s. 97-113).
- Berges, RR., Vukanovic, J., Epstein,JI., CarMichel,M., Cisek,L., Johnson, DE. et al. (1995), Implication of cell kinetic changes during the progression of human prostatic cancer, *Clin Cancer Res.*, 1(5): 473-4803.
- Bok, RA. & Small,EJ., (2002) Bloodborne biomolecular markers in prostate cancer development and progression, *Nature Reviews Cancer* 2, s:918-926.
- Bonci, D., Coppola, V., Musumeci, M. *et al.* (2008), The miR-15a-miR-16-1 cluster controls prostate cancer by targeting multiple oncogenic activities, *Nat Med*, 14: 1271–1277
- Bostanci, Y., Kazzazi, A., Momtahn, S., Laze, J., Djavan, B. (2013), Correlation between benign prostatic hyperplasia and inflammation, *Curr Opin Urol.*, 23(1): 5-10.
- Bostwick, DG., Liu, L., Brawer, MK. (2004), Qian J. High-Grade Prostatic Intraepithelial Neoplasia, *Rev Urol.*, 6(4): 171–179.
- Bostwick,DG., Meiers, I. (2008), Neoplasms of the Prostate. In: Urologic Surgical Pathology (Bostwick, DG., Cheng,L., Eds), Missouri, *Mosby-Elsevier*, s.444-578.
- Bowen, C., Bubendorf, L., Voeller, HJ., Slack, R., Willi, N., Sauter, G., Gasser, TC., Koivisto, P., Lack, EE., Kononen, J., Kallioniemi, OP., Gelmann, EP. (2000), Loss of NKX3.1 expression in human prostate cancers correlates with tumor progression, *Cancer Res.*, 60:6111-5.

- Bowen, C., Gelmann, EP. (2010), NKX3.1 activates cellular response to DNA damage, *Cancer Res*, 70: 3089–3097.
- Brase, J.C., Johannes, M., Schlomm, T., Falth, M., Haese, A., Steuber, T., Beissbarth, T., Kuner, R., Sultmann, H. (2011), Circulating miRNAs are correlated with tumor progression in prostate cancer, *Int. J. Cancer.*, 128(3): 608–616.
- Brawer, MK. (2005), Prostatic Intraepithelial Neoplasia: An Overview, *Rev Urol.*, 7(Suppl 3): 11–18.
- Brown, CJ., Lain, S., Verma, CS., Fersht, AR., Lane, DP. (2009), Awakening guardian angels: drugging the p53 pathway, *Nat Rev Cancer.*, 9(12): 862-73.
- Burphy, RW. (2010), Immunocytochemistry: A Practical Guide for Biomedical Research. In Chapter 2: Antibodies, New York, *Springer*, p. 7-16.
- Carrier, F., Georgel, PT., Pourquier, P., Blake, M., Kontny, HU., Antinore, MJ., Gariboldi, M., Myers, TG., Weinstein, JN., Pommier, Y. and Fornace, AJ., Jr. (1999), Gadd45, a p53-responsive stress protein, modifies DNA accessibility on damaged chromatin, *Mol. Cell. Biol.*, 19: 1673–1685.
- Carrier, F., Smith, ML., Bae, I., Kilpatrick, KE., Lansing, TJ., Chen, CY., Engelstein, M., Friend, SH., Henner, WD., Gilmer, TM., et al. (1994), Characterization of human Gadd45, a p53-regulated protein, *J Biol Chem.*, 269(51):32672-7.
- Carter, BS., Bova, GS., Beaty, TH., Steinberg, GD., Childs, B., Isaacs, WB., Walsh, PC., (1993), Hereditary prostate cancer: epidemiologic and clinical features, *J Urol.*, 150:797-802.
- Castilla, C., Congregado, B., Chinchón, D., Torrubia, FJ., Japón, MA., Sáez, C. (2006), Bcl-xL is overexpressed in hormone-resistant prostate cancer and promotes survival of LNCaP cells via interaction with proapoptotic Bak, *Endocrinology*, 147(10):4960-7.
- Castro, P., Giri, D., Lamb, D., Ittmann, M. (2003), Cellular senescence in the pathogenesis of benign prostatic hyperplasia, *Prostate*, 55: 30–8.
- Catz, SD., Johnson, JL. (2003), Bcl-2 in prostate cancer: a minireview. *Apoptosis.*, 8(1):29-37.
- Cerhan, JR., Parker, AS., Putnam, SD., Chiu, BC., Lynch, CF., Cohen, MB., Torner, JC., Cantor, KP. (1999), Family history and prostate cancer risk in a population-based cohort of Iowa men, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, 8:53-60.
- Chiam, K., Ricciardelli, C., Bianco-Miotto, T. (2012), Epigenetic biomarkers in prostate cancer: Current and future uses, *Cancer Lett.*, [Epub ahead of print].
- Chung, HK., Yi, YW., Jung, NC., Kim, D., Suh, JM., Kim, H., Park KC., Kim, DW., Hwang, ES., Song, JH., Ku, BJ., Han, HJ., Ro, HK., Kim, JM., Shong, M. (2003), Gadd45gamma expression is reduced in anaplastic thyroid cancer and its reexpression results in apoptosis, *J Clin Endocrinol Metab.*, 88(8):3913-20.

- Chung, LW. (1995), The role of stromal-epithelial interaction in normal and malignant growth. *Cancer Surv.*, 23: 33-42.
- Coffey, DS., Walsh, PC. (1990), Clinical and experimental studies of benign prostatic hyperplasia, *Urol Clin North Am.*, 17: 461- 75.
- Cramer, SD., Alcamo, IE., Heymann, DL., (2006) Prostate Cancer (Deadly Diseases & Epidemics), *Chelsea House Publishers*, s136.
- Duman, İ., Arısan, S., Büyüktunçer, D., Çaşkurlu, T., Sönmez, C., Ünsal, NP. (2004), Apoptosis detection by TUNEL assay in BPH patients, *J Cell Mol Biol*, 3: 103-107.
- Eble, JN., Sauter, G., Epstein, JI., Sesterhenn, IA., (2004) Pathology and genetics of tumours of the urinary system and male genital organs, World Health Organization classification of tumours, *IARC Pres*, Lyon, s160-215.
- Eisenberger, MA., Walsh, PC. (1999), Early androgen deprivation for prostate cancer. *N Engl J Med.*, 341:1837–1838.
- El Gammal, AT., Brüchmann, M., Zustin, J., Isbarn, H., Hellwinkel, OJ., Köllermann, J., Sauter, G., Simon, R., Wilczak, W., Schwarz, J., Bokemeyer, C., Brümmendorf, TH., Izbicki, JR., Yekebas, E., Fisch, M., Huland, H., Graefen, M., Schlomm, T. (2010), Chromosome 8p deletions and 8q gains are associated with tumor progression and poor prognosis in prostate cancer, *Clin Cancer Res*, 16: 56-64.
- Ellinger, J., Kahl, P., von der Gathen, J., Rogenhofer, S., Heukamp, LC., Gütgemann, I., Walter, B., Hofstädter, F., Büttner, R., Müller, SC., Bastian, PJ., von Ruecker, A. (2010), Global levels of histone modifications predict prostate cancer recurrence, *Prostate*, 70(1): 61-9.
- Engel, N., Tront, J.S., Erinle, T., Nguyen, N., Latham, K.E., Sapienza, C., Hoffman, B., Liebermann, D.A. (2009), Conserved DNA methylation in Gadd45a(-/-) mice, *Epigenetics*, 4(2):98-9.
- Epstein, JI., (2004) The prostate and Seminal Vesicles, in Sternberg's Diagnostic Surgical Pathology (Carter, D., Greenson, JK., Oberman, HA., Reuter, V., Stoler, MH., Eds), *Lippincott Williams & Wilkins*, Philadelphia, s2084-2132.
- Er TK, Chang JG. (2012) High-resolution melting: Applications in genetic disorders. *Clin Chim Acta.*, 414:197-201.
- Erali M, Wittwer CT. (2010), High resolution melting analysis for gene scanning. *Methods*, 50(4):250-6.
- Erali, M., Voelkerding, KV. and Wittwer, CT. (2008), High Resolution Melting Applications for Clinical Laboratory Medicine, *Exp Mol Pathol.*, 85(1): 50–58.
- Espada J, Esteller M. (2010), DNA methylation and the functional organization of the nuclear compartment, *Semin Cell Dev Biol.*, 21(2):238-46.

- Farrar, JS., Reed, GH., Wittwer, CT. (2009), High Resolution Melting Curve Analysis for Molecular Diagnostics, In: Molecular Diagnostics. (Patrinis, GP., Ansoorge, W., editors), *Academic Press*, Burlington, MA, USA, s229-245.
- Fidaner, C., Eser, SY., Parkin, DM. (2001), Incidence in Izmir in 1993-1994: first results from Izmir Cancer Registry, *Eur J Cancer*, 37(1): 83-92.
- Flores, O., Burnstein KL. (2010), GADD45gamma: a new vitamin D-regulated gene that is antiproliferative in prostate cancer cells, *Endocrinology*, 151(10):4654-64.
- Garrity, MM., Burgart, LJ, Riehle, DL., Hill, EM., Sebo, TJ., Witzig, T. (2003), Identifying and quantifying apoptosis: navigating technical pitfalls, *Mod Pathol.* 16(4):389-94.
- Gil, J., Kerai, P., Lleonart, M., Bernard, D., Cigudosa, JC., Peters, G., Carnero, A., Beach, D. (2005), Immortalization of primary human prostate epithelial cells by c-Myc, *Cancer Res.*, 65(6): 2179-85.
- Goldwasser, F., Bae, I., Fornace, AJ Jr, Pommier, Y. (1996), Differential GADD45, p21CIP1/WAF1, MCL-1 and topoisomerase II gene induction and secondary DNA fragmentation after camptothecin-induced DNA damage in two mutant p53 human colon cancer cell lines, *Oncol Res.*, 8(7-8):317-23.
- Guillouf, C., Graña, X., Selvakumaran, M., De Luca, A., Giordano, A., Hoffman, B., Liebermann, DA. (1995), Dissection of the genetic programs of p53-mediated G1 growth arrest and apoptosis: blocking p53-induced apoptosis unmasks G1 arrest, *Blood.*, 85(10):2691-8.
- Guo, JU., Ma, DK., Mo, H., Ball, MP., Jang, MH., Bonaguidi, MA., Balazer, JA., Eaves, HL., Xie, B., Ford, E., Zhang, K., Ming, GL., Gao, Y., Song H. (2011), Neuronal activity modifies the DNA methylation landscape in the adult brain. *Nat Neurosci*, 14(10):1345-51.
- Gupta, M., Gupta, SK., Hoffman, B. and Liebermann DA. (2006), *Gadd45a* and *Gadd45b* Protect Hematopoietic Cells from UV-induced Apoptosis via Distinct Signaling Pathways, including p38 Activation and JNK Inhibition, *The Journal of Biological Chemistry* VOL.281, NO. 26: 17552–17558.
- Gurel, B., Iwata, T., Koh, CM., Jenkins, RB., Lan, F., Van Dang, C., Hicks, JL., Morgan, J., Cornish, TC., Sutcliffe, S., Isaacs, WB., Luo, J., De Marzo, AM., (2008), Nuclear MYC protein overexpression is an early alteration in human prostate carcinogenesis, *Mod Pathol.*, 21: 1156-67.
- Haluk Özen, Levent Türkeri. (2007) Prostat Kanserinin Etiyolojisi, Epidemiyolojisi ve Risk Faktörleri, Üroonkoloji kitabı, (Haluk Özen, Levent Türkeri, Bülent Akdoğan, Editörler) *Üroonkoloji Derneği*, Ankara, 2007, s525-527.
- Hassan, O., Ahmad, A., Sethi, S., Sarkar, FH. (2012), Recent updates on the role of microRNAs in prostate cancer, *J Hematol Oncol.*, 5: 9.
- Häussler, O., Epstein, JI., Amin, MB., Heitz, PU., Hailemariam, S. (1999), Cell proliferation, apoptosis, oncogene, and tumor suppressor gene status in adenosis

- with comparison to benign prostatic hyperplasia, prostatic intraepithelial neoplasia, and cancer. *Hum Pathol.*, 30(9):1077-86.
- Heyn, H., Esteller, M. (2012), DNA methylation profiling in the clinic: applications and challenges. *Nat Rev Genet.*, 13(10): 679-92.
- Higgs, MR., Lerat, H., Pawlowsky, JM. (2010), Downregulation of Gadd45beta expression by hepatitis C virus leads to defective cell cycle arrest, *Cancer Res.*, 70:4901-11.
- Hollander, MC., Sheikh, MS., Bulavin, DV., Lundgren, K., Augeri-Henmueller, L., Shehee, R., Molinaro, TA., Kim, KE., Tolosa, E., Ashwell, JD., Rosenberg, MP., Zhan, Q., Fernández-Salguero, PM., Morgan, WF., Deng, CX., Fornace, AJ Jr. (1999), Genomic instability in Gadd45 α -deficient mice, *Nat Genet.*, 23(2): 176-84.
- Hollander, MC., Alamo, I., Jackman, J., Wang, MG., McBride, OW., Fornace, AJ Jr. (1993), Analysis of the mammalian gadd45 gene and its response to DNA damage, *J Biol Chem.*, 268(32):24385-93.
- Iwata, T., Schultz, D., Hicks, J., Hubbard, GK., Mutton, LN., Lotan, TL., Bethel, C., Lotz, MT., Yegnasubramanian, S., Nelson, WG., Dang, CV., Xu, M., Anele, U., Koh, CM., Bieberich, CJ., De Marzo, AM. (2010), MYC overexpression induces prostatic intraepithelial neoplasia and loss of Nkx3.1 in mouse luminal epithelial cells, *PLoS One.*, 5(2):e9427.
- Izzo, A., Schneider, R. (2010), Chatting histone modifications in mammals, *Briefings in Functional Genomics*, 9(6): 429-443.
- Jemal, A., Bray, F., Center, MM., Ferlay, J., Ward, E, Forman, D. (2011) Global cancer statistics, *CA Cancer J Clin.*, 61(2): 69-90.
- Jemal, A., Siegel, R., Xu, J., Ward, E. (2010), Cancer statistics, *CA Cancer J Clin.*, 60(5): 277-300.
- Jenkins, RB., Qian, J., Lieber, MM., Bostwick, DG. (1997), Detection of c-myc oncogene amplification and chromosomal anomalies in metastatic prostatic carcinoma by fluorescence in situ hybridization, *Cancer Res.*, 57(3): 524-31.
- Jerónimo, C., Bastian, PJ., Bjartell, A., Carbone, GM., Catto, JW., Clark, SJ., Henrique, R., Nelson, WG., Shariat, SF. (2011), Epigenetics in prostate cancer: biologic and clinical relevance, *Eur Urol.* 60(4): 753-66.
- Jiang, F., Wang, Z. (2003), Identification of androgen-responsive genes in the rat ventral prostate by complementary deoxyribonucleic acid subtraction and microarray, *Endocrinology*, 144(4):1257-65.
- Jiang, F., Wang, Z. (2004), Gadd45gamma is androgen-responsive and growth-inhibitory in prostate cancer cells, *Mol Cell Endocrinol.*, 213(2):121-9.
- Johnson, MI., Robinson, MC., Marsh, C., Robson, CN., Neal, DE., Hamdy, FC. (1998), Expression of Bcl-2, Bax, and p53 in high-grade prostatic intraepithelial neoplasia and localized prostate cancer: relationship with apoptosis and proliferation. *Prostate.*, 37(4):223-9.

- Jost, JP. (1993), Nuclear extracts of chicken embryos promote an active demethylation of DNA by excision repair of 5-methyldeoxycytidin, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(10):4684-8.
- Kastan, MB., Zhan, Q., El-Deiry, WS., Carrier, F., Jacks, T., Walsh, WV., Plunkett, BS., Vogelstein, B. and Fornace, AJ., Jr. (1992), A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia, *Cell*, 71, 587–597.
- Khandrikai, L., Kumar, B., Kou, S., Maroni, P., Koul, HK. (2009), Oxidative stress in prostate cancer, *Cancer Lett*, 282: 125–136.
- King, JC., Xu, J., Wongvipat, J., Hieronymus, H., Carver, BS., Leung, DH., Taylor, BS., Sander, C., Cardiff, RD., Couto, SS., Gerald, W.L., and Sawyers, CL. (2009), Cooperativity of TMPRSS2-ERG with PI3-kinase pathway activation in prostate oncogenesis, *Nat. Genet.*, 41: 524-526.
- Klein, EA., Silverman, R. (2008), Inflammation, infection, and prostate cancer, *Curr Opin Urol.*, 18: 315–319.
- Koeneman, KS., Pan, CX., Jin, JK., Pyle, JM III., Flanigan, RC., Shankey, TV., Diaz, MO., (1998), Telomerase activity, telomere length, and DNA ploidy in prostatic intraepithelial neoplasia (PIN), *Urol.*, 160: 1533–1539.
- Koh, CM., Bieberich, CJ., Dang, CV., Nelson, WG., Yegnasubramanian, S., De Marzo, AM., (2010), MYC and Prostate Cancer, *Genes Cancer.*, 1: 617-28.
- Koh, CM., Iwata, T., Zheng, Q., Bethel, C., Yegnasubramanian, S., De Marzo AM. (2011), Myc enforces overexpression of EZH2 in early prostatic neoplasia via transcriptional and post-transcriptional mechanisms, *Oncotarget*, 2(9):669-83.
- Koochekpour, S. (2010), Androgen receptor signaling and mutations in prostate cancer, *Asian J Androl.*, 12(5): 639-57.
- Kovalsky, O., Lung, FD., Roller, PP., Fornace, Jr AJ. (2001), Oligomerization of human Gadd45 α protein, *J Biol Chem.*, 276: 39330–39339.
- Krajewski, S., Krajewska, M., Shabaik, A., Wang, HG., Irie, S., Fong, L., Reed, JC. (1994), Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of Bcl-X expression. *Cancer Res.*, 54: 5501-5507.
- Kristensen, LS., Hansen LL. (2009), PCR-Based Methods for Detecting Single-Locus DNA Methylation Biomarkers in Cancer Diagnostics, Prognostics, and Response to Treatment, *Clinical Chemistry*, 55(8): 1471–1483.
- Lattouf, JB, Srinivasan, R., Pinto, PA., Linehan, WM. and Neckers, L. (2006), Mechanisms of Disease: the role of heat-shock protein 90 in genitourinary malignancy, *Nature Clinical Practice Urolog.*, 3, 590-601.
- Lei, Q., Jiao, J., Xin, L., Chang, CJ., Wang, S., Gao, J., Gleave, ME., Witte, ON., Liu, X., Wu, H. (2006), NKX3.1 stabilizes p53, inhibits AKT activation, and blocks prostate cancer initiation caused by PTEN loss, *Cancer Cell.*, 9: 367-78.

- Leman, ES. and Getzenberg, RH. (2009), Biomarkers for prostate cancer, *J. Cell Biochem.*, 108, 3-9.
- Leversha, MA., Han, J., Asgari, Z., Danila, DC., Lin, O., Gonzalez-Espinoza, R, Anand, A., Lilja, H., Heller, G., Fleisher, M. et al. (2009), Fluorescence in situ hybridization analysis of circulating tumor cells in metastatic prostate cancer, *Clin Cancer Res.*, 15: 2091–2097.
- Li, X., Marani, M., Mannucci, R., Kinsey, B., Andriani, F., Nicoletti, I., Denner, L., Marcelli, M. (2001), Overexpression of BCL-XL underlies the molecular basis for resistance to staurosporine-induced apoptosis in PC-3 cells, *Cancer Res.*, 61:1699–1706.
- Liebermann, DA., Hoffman, B. (1998), MyD genes in negative growth control. *Oncogene.*, 17(25):3319-29.
- Liebermann, DA., Hoffman, B. (2007), Gadd45 in the response of hematopoietic cells to genotoxic stress, *Blood Cells Mol Dis.*, 39: 329–335.
- Liebermann, DA., Tront, JS., Sha, X., Mukherjee, K., Alisha-Mohamed-Hadley, and Hoffman B. (2011), Gadd45 Stress Sensors in Malignancy and Leukemia, *Crit Rev Oncog.*, 16(1-2): 129–140.
- Liu, XP., Li, DY., Liu, XL., Xu, JD., Furuya, T., Kawauchi, S., Oga, A., Sasaki, K. (2009), Comparison of chromosomal aberrations between primary tumors and their synchronous lymph-node metastases in intestinal-type gastric carcinoma, *Pathol Res Pract.*, 205:105-11.
- Logothetis, CJ., Lin, SH. (2005), Osteoblasts in prostate cancer metastasis to bone, *Nat Rev Cancer*, 5: 21–28.
- Lonergan, PE., Tindall, DJ. (2011), Androgen receptor signaling in prostate cancer development and progression, *J Carcinog.*, 10: 20.
- Lucia, MS., Lambert, JR. (2008), Growth factors in benign prostatic hyperplasia: basic science implications, *Curr Urol Rep.*, 9(4): 272-8.
- Martens-Uzunova, ES., Jalava, SE., Dits, NF., van Leenders, GJ., Moller, S., Trapman, J., Bangma, CH., Litman, T., Visakorpi, T., . Jenster, G. (2011), Diagnostic and prognostic signatures from the small non-coding RNA transcriptome in prostate cancer, *Oncogene*, 31: 978–991.
- Maruyama, R., Toyooka, S., Toyooka, KO., Virmani, AK., Zöchbauer-Müller, S., Farina, AJ., Minna, JD., McConnell, J., Frenkel, EP., Gazdar, AF. (2002), Aberrant promoter methylation profile of prostate cancers and its relationship to clinicopathological features, *Clin Cancer Res.*, 8: 514-9.
- Mayer, W., Niveleau, A., Walter, J., Fundele, R., Haaf, T. (2000), Demethylation of the zygotic paternal genome, *Nature*, 403(6769):501-2.

- McKinney, JT., Nay, LM., De Koeyer, D., Reed, GH., Wall, M., Palais, RA., Jarret, RL., Wittwer, CT. (2009), Mutation Scanning and Genotyping in Plants by High-Resolution DNA Melting, In: The handbook of plant mutagenesis and mutant screening, (Meksem K, Kahl G, editors), *Wiley-blackwell-VCH*, Malden.
- McNeal, JE. (1981) Normal and pathologic anatomy of the prostate, *Urology*, 17(Suppl 3): 11-6.
- Meeker, AK., Hicks, JL., Iacobuzio-Donahue, CA., Montgomery, EA., Westra, WH., Chan, TY., Ronnett, BM., De Marzo, AM. (2004), Telomere length abnormalities occur early in the initiation of epithelial carcinogenesis, *Clin Cancer Res.*, 10: 3317–3326.
- Meeker, AK., Hicks, JL., Platz, EA., March, GE., Bennett, CJ., Delannoy, MJ., De Marzo, AM. (2002), Telomere shortening is an early somatic DNA alteration in human prostate tumorigenesis, *Cancer Res.*, 62: 6405–6409.
- Meiers, I., Shanks, JH., Bostwick, DG. (2007), Glutathione S-transferase pi (GSTP1) hypermethylation in prostate cancer, *Pathology*, 39: 299-304.
- Mitchell, PS., Parkin, RK., Kroh, EM., Fritz, BR., Wyman, SK., Pogosova-Agadjanyan, EL., Peterson, A., Noteboom, J., O'Briant, KC., Allen, A., Lin, DW., Urban, N., Drescher, CW., Knudsen, BS., Stirewalt, DL., Gentleman, R., Vessella, RL., Nelson, PS., Martin, DB., Tewari, M. (2008), Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 105: 10513–10518.
- Montgomery J, Wittwer CT, Palais R, Zhou L. (2007), Simultaneous mutation scanning and genotyping by high-resolution DNA melting analysis, *Nat Protoc.*, 2 (1): 59-66.
- Na, YK., Lee, SM., Hong, HS., Kim, JB., Park, JY., Kim, DS. (2010), Hypermethylation of growth arrest DNA damage-inducible gene 45 in non-small cell lung cancer and its relationship with clinicopathologic features. *Mol Cells.*; 30:89–92.
- Nakayama, M., Gonzalgo, ML., Yegnasubramanian, S., Lin, X, De Marzo, AM., Nelson, WG. (2004), GSTP1 CpG island hypermethylation as a molecular biomarker for prostate cancer, *J Cell Biochem.*, 91: 540–552.
- Niehrs, C., Schäfer, A. (2012), Active DNA demethylation by Gadd45 and DNA repair, *Trends Cell Biol*, 22(4):220-7.
- Nygren, J., Svanvik, N., Kubista, M. (1998), The interactions between the fluorescent dye thiazole orange and DNA, *Biopolymers*, 46(1):39-51.
- Ohtani-Fujita, N., Minami, S., Mimaki, S., Dao, S., Sakai, T., (1998), p53-Independent activation of the gadd45 promoter by Delta12-prostaglandin J2, *Biochem Biophys Res Commun.*, 251(2):648-52.

- Oswald, J., Engemann, S., Lane, N., Mayer, W., Olek, A., Fundele, R., Dean, W., Reik, W., Walter, J. (2000), Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote, *Curr Biol.*, 10(8):475-8.
- Park, JY. (2010), Promoter hypermethylation in prostate cancer, *Cancer Control*, 17(4): 245-55.
- Platz,EA., Giovannucci,E. (2006), Prostate cancer. In: Cancer Epidemiology and Prevention, 3rd ed, (Schottenfeld, D., Fraumeni,JF.), *Oxford University Press*, New York, s.1151-1165.
- Raffo, AJ., Perlman, H., Chen, MW., Day, ML., Streitman, JS., Buttyan, R. (1995), Overexpression of bcl-2 protects prostate cancer cells from apoptosis in vitro and confers resistance to androgen depletion in vivo. *Cancer Res.*, 55(19):4438-45.
- Rai, K., Huggins, I.J., James, S.R., Karpf, A.R., Jones, D.A., Cairns, B.R. (2008), DNA demethylation in zebrafish involves the coupling of a deaminase, a glycosylase, and gadd45, *Cell*, 135(7):1201-12.
- Ramachandran, K., Gopisetty, G., Gordian, E., Navarro, L., Hader, C., Reis, IM., Schulz, WA., Singal, R. (2009), Methylation-mediated repression of GADD45 α in prostate cancer and its role as a potential therapeutic target. *Cancer Res.*, 69:1527–35.
- Reed, GH., Kent, JO., Wittwer, CT. (2007), High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics, *Pharmacogenomics*, 8(6):597-608.
- Rosai, J. (2004), Rosai and Ackerman's Surgical Pathology, *Mosby-Elsevier*, s.1361-1412.
- Roupret, M., Hupertan, V., Yates, DR., Catto, JW., Rehman, I., Meuth, M., Ricci, S., Lacave, R., Cancel-Tassin, G., de la Taille, A., Rozet, F., Cathelineau, X., Vallancien, G., Hamdy, FC., Cussenot, O. (2007), Molecular detection of localized prostate cancer using quantitative methylation-specific PCR on urinary cells obtained following prostate massage, *Clin. Cancer Res.*, 13: 1720–1725.
- Saha, A., Kuzuhara, T., Echigo, N., Fujii, A., Suganuma, M., Fujiki, H. (2010), Apoptosis of human lung cancer cells by curcumin mediated through up-regulation of "growth arrest and DNA damage inducible genes 45 and 153", *Biol Pharm Bull.*, 33(8):1291-9.
- Sánchez, R., Pantoja-Uceda, D., Torres, D., Prieto, J., Campos-Olivas, R., Blanco, FJ. (2008), NMR assignment and secondary structure of human growth arrest and DNA damage alpha protein (Gadd45 α), *Biomol NMR Assign.*, 2(2): 139-42.
- Saramaki, O., Visakorpi, T. (2007), Chromosomal aberrations in prostate cancer, *Front Biosci.*, 12: 3287-301.
- Sayar, İ., Gelincik, İ., Bozkurt, A., Bayram, İ. (2012), Benign, Premalign ve Malign Prostat Lezyonlarında Ki-67, Bcl-2 ve C-erbB2 Belirteçlerinin Önemi, *J Kartal TR*, 23(3): 123-129.

- Schäfer, A., Schomacher, L., Barreto, G., Döderlein, G., Niehrs, C. (2010), Gemcitabine functions epigenetically by inhibiting repair mediated DNA demethylation, *PLoS One*, 5(11):e14060.
- Schlomm, T., Iwers, L., Kirstein, P., Jessen, B., Köllermann, J., Minner, S., Passow-, Drolet, A., Mirlacher, M., Milde-Langosch, K., Graefen, M., Haese, A., Steuber T., Simon, R., Huland, H., Sauter, G., Erbersdobler, A. (2008), Clinical significance of p53 alterations in surgically treated prostate cancers, *Mod Pathol.*, 21(11): 1371-8.
- Schmitz, K.M., Schmitt, N., Hoffmann-Rohrer, U., Schäfer, A., Grummt, I., Mayer, C. (2009), TAF12 recruits Gadd45a and the nucleotide excision repair complex to the promoter of rRNA genes leading to active DNA demethylation, *Mol Cell*, 33(3):344-53.
- Schrag, J.D., Jiralerspong, S., Banville, M., Jaramillo, M.L. and O'Connor-McCourt, M.D. (2008), The crystal structure and dimerization interface of GADD45 γ , *Proc Natl Acad Sci USA.*, 105(18): 6566–6571.
- Schröder, F.H., Hugosson, J., Roobol, M.J., Tammela, T.L., Ciatto, S., Nelen, V., Kwiatkowski, M., Lujan, M., Lilja, H., Zappa, M., Denis, L.J., Recker, F., Berenguer, A., Määtänen, L., Bangma, C.H., Aus, G., Villers, A., Rebillard, X., van der Kwast, T., Blijenberg, B.G., Moss, S.M., de Koning, H.J., Auvinen, A., ERSPC Investigators (2009), Screening and prostate-cancer mortality in a randomized European study, *N Engl J Med.*, 26;360(13):1320-8.
- Selvakumaran, M., Lin, H.K., Tjin Tham Sjin, R., Reed, J., Liebermann, D., and Hoffman, B. (1994), The novel primary response gene MyD118 and the proto-oncogenes myb, myc and bcl-2 modulate transforming growth factor β 1-induced apoptosis of myeloid leukemia cells, *Mol. Cell. Biol.*, 14: 2352–2360.
- Sen, G.L., Reuter, J.A., Webster, D.E., Zhu, L., Khavari, P.A. (2010), DNMT1 maintains progenitor function in self-renewing somatic tissue, *Nature*, 463(7280):563-7.
- Shen, M.M., Abate-Shen, C. (2010), Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges, *Genes Dev.*, 24(18): 1967-2000.
- Silverberg, S.G., DeLellis, R.A., Frable, W.J., LiVolsi, V.A., Wick, M.R. (2006) Silverberg's Principles and Practice of Surgical Pathology and Cytopathology, 2, *Churchill Livingstone*, Philadelphia., s:1791-1828.
- Smith, M.L., Chen, I.T., Zhan, Q., Bae, I., Chen, C.Y., Gilmer, T.M., Kastan, M.B., O'Connor, P.M., Fornace, A.J., Jr. (1994), Interaction of the p53-regulated protein Gadd45 with proliferating cell nuclear antigen, *Science (Wash. DC)*, 266: 1376-1380.
- Smith, M.L., Ford, J.M., Hollander, M.C., Bortnick, R.A., Amundson, S.A., Seo, Y.R., Deng, C.X., Hanawalt, P.C., Fornace, A.J. Jr. (2000), p53-mediated DNA repair responses to UV radiation: studies of mouse cells lacking p53, p21, and/or gadd45 genes, *Mol Cell Biol.*, 20(10): 3705-14.
- Smith, M.L., Kontny, H.U., Zhan, Q., Sreenath, A., O'Connor P.M., Fornace A.J. Jr. (1996), Antisense GADD45 expression results in decreased DNA repair and sensitizes cells to u.v.-irradiation or cisplatin. *Oncogene.*, 13(10): 2255-63.

- Sommerfeld, HJ., Meeker, AK., Piatyszek, MA., Bova, GS., Shay, JW., Coffey, DS., (1996), Telomerase activity: A prevalent marker of malignant human prostate tissue, *Cancer Res.*, 56: 218–222.
- Squire, JA. (2009), TMPRSS2:ERG and PTEN loss in prostate cancer, *Nature Genetics*, 41: 509 – 510.
- Sun, L., Gong, R., Wan, B., Huang, X., Wu, C., Zhang, X., Zhao, S., Yu, L. (2003), GADD45 γ , down-regulated in 65 % hepatocellular carcinoma (HCC) from 23 Chinese patients, inhibits cell growth and induces cell cycle G2/M arrest for hepatoma Hep-G2 cell lines, *Mol Biol Rep.*, 30:249–53.
- Takekawa, M., Saito, H. (1998), A family of stress-inducible GADD45-like proteins mediate activation of the stress-responsive MTK1/MEKK4 MAPKKK, *Cell.*, 95(4):521-530.
- Tamura, RE., de Vasconcellos, JF., Sarkar, D., Liebermann, TA., Fisher, PB., Zerbini, LF., (2012), GADD45 proteins: central players in tumorigenesis, *Curr Mol Med.*, 12(5): 634-51.
- Taylor, BS., Schultz, N., Hieronymus, H., Gopalan, A., Xiao, Y., Carver, BS., Arora, VK., Kaushik, P., Cerami, E., Reva, B., et al. (2010), Integrative genomic profiling of human prostate cancer, *Cancer Cell*, 18: 11-22.
- Thyss, R., Virolle, V., Imbert, V., Peyron, J. F., Aberdam, D. and Virolle, T. (2005), NF-kappaB/Egr-1/Gadd45 are sequentially activated upon UVB irradiation to mediate epidermal cell death, *EMBO .*, 24: 128–137.
- Tomlins, SA., Rhodes, DR., Perner, S., Dhanasekaran, SM., Mehra, R., Sun, XW., Varambally, S., Cao, X., Tchinda, J., Kuefer, R., Lee, C., Montie, JE., Shah, RB., Pienta, KJ., Rubin, MA., Chinnaiyan, AM. (2005), Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer, *Science*, 310: 644–648.
- Tront, JS., Hoffman, B., Liebermann, DA. (2006), Gadd45 α suppresses Ras-driven mammary tumorigenesis by activation of c-Jun NH2-terminal kinase and p38 stress signaling resulting in apoptosis and senescence, *Cancer Res.*, 66(17): 8448-54.
- Vairapandi, M., Azam, N., Balliet, AG., Hoffman, B., Liebermann, DA. (2000), Characterization of MyD118, Gadd45, and PCNA interacting domains: PCNA impedes MyD/Gadd mediated negative growth control, *J Biol Chem.*, 275:16810–16819.
- Vairapandi, M., Balliet, AG., Hoffman, B., Liebermann, DA. (1996), The differentiation primary response gene MyD118, related to GADD45, encodes for a nuclear protein which interacts with PCNA and p21WAF1/CIP1, *Oncogene*, 12: 2579–2594.
- Vairapandi, M., Balliet, AG., Hoffman, B., Liebermann, DA. (2002), GADD45 β and GADD45 γ are cdc2/cyclinB1 kinase inhibitors with a role in S and G2/M cell cycle checkpoints induced by genotoxic stress. *J Cell Physiol.* 192(3):327-38.

- van Leenders, GJ., Schalken, JA. (2001), Stem cell differentiation within the human prostate epithelium: implications for prostate carcinogenesis. *BJU Int*, 88(Suppl 2): 35-50.
- Vossen RH, Aten E, Roos A, den Dunnen JT. (2009) High-resolution melting analysis (HRMA): more than just sequence variant screening, *Hum Mutat.*, 30(6):860-6.
- Wang W., Huper G., Guo Y., Murphy SK., Olson JA. Jr and Marks JR. (2005) Analysis of methylation-sensitive transcriptome identifies GADD45a as a frequently methylated gene in breast cancer, *Oncogene*, 24, 2705–2714.
- Wang, Q., Li, W., Zhang, Y., Yuan, X., Xu, K., Yu, J., Chen, Z., Beroukhi, R., Wang, H., Lupien, M., Wu, T., Regan, M., Meyer, CA., Carroll, JS., Manrai, AK., Jänne, OA., Balk, SP., Mehra, R., Han, B., Chinnaiyan, AM., Rubin, MA., True, L., Fiorentino, M., Fiore, C., Loda, M., Kantoff, PW., Liu, XS., Brown, M. (2009), Androgen receptor regulates a distinct transcription program in androgen-independent prostate cancer, *Cell.*, 23;138(2): 245-56.
- Witte, JS. (2009), Prostate cancer genomics: towards a new understanding, *Nat Rev Genet.* 10: 77-82.
- Wittwer, CT., Rasmussen, RP., Ririe, KM. (2009), Rapid PCR and melting analysis. In: The PCR revolution (Bustin SA, editor.), *Cambridge University Press*, Cambridge, in press.
- Wojdacz, TK. (2012), Methylation-sensitive high-resolution melting in the context of legislative requirements for validation of analytical procedures for diagnostic applications, *Expert Rev Mol Diagn.*, 12(1):39-47.
- Yi, Y.W., Kim, D., Jung, N., Hong, S.S., Lee, H.S., Bae, I. (2000), Gadd45 family proteins are coactivators of nuclear hormone receptors, *Biochem Biophys Res Commun*, 272(1):193-8.
- Ying, J., Srivastava, G., Hsieh, WS., Gao, Z., Murray, P., Liao, SK., Ambinder, R., Tao, Q. (2005), The stress-responsive gene GADD45 γ is a functional tumor suppressor, with its response to environmental stresses frequently disrupted epigenetically in multiple tumors, *Clin Cancer Res.*, 11(18):6442-9.
- Yoo, J., Ghiassi, M., Jirmanova, L., Balliet, AG., Hoffman, B., Fornace, AJ Jr., Liebermann, DA., Bottinger, EP., Roberts, AB. (2003), Transforming growth factor-beta-induced apoptosis is mediated by Smad-dependent expression of GADD45b through p38 activation, *J Biol Chem.*, 278(44): 43001-7.
- Yu, J., Yu, J., Mani, RS., Cao, Q., Brenner, CJ., Cao, X., Wang, X., Wu, L., Li, J., Hu, M., Gong, Y., Cheng, H., Laxman, B., Vellaichamy, A., Shankar, S., Li, Y., Dhanasekaran, SM., Morey, R., Barrette, T., Lonigro, RJ., Tomlins, SA., Varambally, S., Qin, ZS., Chinnaiyan, AM. (2010), An integrated network of androgen receptor, polycomb and TMPRSS2:ERG gene fusions in prostate cancer progression, *Cancer Cell.*, 17: 443-54.
- Yurdakul, T., Güven, S. (2006), Benign prostat hiperplazisi (BPH) ve apoptozis, *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası*, 59: 132-136.

- Zerbini, LF., Wang, Y., Czibere, A., Correa, RG., Cho, JY., Ijiri, K., Wei W., Joseph M., Gu, X., Grall F., Goldring, MB., Zhou JR., and Libermann TA. (2004), NF- κ B-mediated repression of growth arrest- and DNA-damage-inducible proteins 45 α and γ is essential for cancer cell survival, *PNAS*, 101:13618-13623.
- Zhan, Q., Lord, KA., Alamo, Jr. I., Hollander, MC., Carrier, F., Ron, D., Kohn, KW., Hoffman, B., Liebermann, DA., Furnace, Jr. AJ., (1994), The gadd and MyD genes define a novel set of mammalian genes encoding acidic proteins that synergistically suppress cell growth, *Mol. Cell. Biol.*, 14: 2361–2371.
- Zhang, W., Zhao, M., Li, J., Li, X., Zeng, Z. and Rao, Z. (2008), Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of human Gadd45 γ , *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.*, 64(Pt 11): 1070–1073.
- Zhang, W., Bae, I., Krishnaraju, K., Azam, N., Fan, W., Smith, K., Hoffman, B., Liebermann, DA. (1999), CR6: a third member in the MyD118 and Gadd 45 gene family which functions in negative growth control, *Oncogene*, 18: 4899–4907.
- Zhang, W., Hoffman, B., Liebermann, DA. (2001), Ectopic expression of MyD118/Gadd45/CR6 (Gadd45 β / α / γ) sensitizes neoplastic cells to genotoxic stress-induced apoptosis, *Int J Oncol.*, 18(4):749-57.
- Zhang, W., Li, T., Shao, Y., Zhang, C., Wu, Q., Yang, H., Zhang, J., Guan, M., Yu, B., Wan, J. (2010), Semi-quantitative detection of GADD45- γ methylation levels in gastric, colorectal and pancreatic cancers using methylation-sensitive high-resolution melting analysis, *J Cancer Res Clin Oncol.*, 136(8):1267-73.
- Zhang, X., Sun, H., Danila, DC., Johnson, SR., Zhou, Y., Swearingen, B., Klibanski, A. (2002), Loss of expression of GADD45 γ , a growth inhibitory gene, in human pituitary adenomas: implications for tumorigenesis. *J Clin Endocrinol Metab.*, 87(3):1262-7.
- Zhang, X., Zhang, Q., Zhang, Z., Na, Y., Guo, Y. (2006), Apoptosis profiles in benign prostatic hyperplasia: close associations of cell kinetics with percent area density of histologic composition. *Urology.*, 68(4):905-10.
- Zhu, N., Shao Y., Xu L., Yu L., Sun L. (2009), Gadd45- α and Gadd45- γ utilize p38 and JNK signaling pathways to induce cell cycle G2/M arrest in Hep-G2 hepatoma cells, *Mol Biol Rep.*, 36: 8, pp 2075-2085.
- Ziada, A., Rosenblum, M., Crawford, ED. (1999), Benign prostatic hyperplasia: an overview, *Urology*, 53(suppl 3a):1–6.

- WEB_1, National Cancer Institute, Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) Program, USA, http://seer.cancer.gov/publications/prostate/inc_mort.pdf (Ocak 2013)
- WEB_2. (2013). International Agency for Reserch on Cancer, Globocan 2008 <http://globocan.iarc.fr/> (Ocak 2013)
- WEB_3. (2013). Türkiye’de Prostat Kanseri İnsidansı: Epidemiyolojik Bir Çalışma (PROSTATTURK) <http://uroonkoloji9.naklenkongre.com/sunumlar/210800.pdf> (Ocak 2013)
- WEB_4. (2013). Gene Target Solution’s web site. www.genetargetsolutions.com (Mayıs 2013)

8. ÖZGEÇMİŞ

Özge CAN, 1987 yılında Denizli'de doğdu. İlköğretim ve liseyi Denizli'de okuduktan sonra, lisans öğrenimini 2006-2010 yılları arasında Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyokimya Bölümü'nde tamamladı. 2011 yılının Güz Dönemi'nde Pamukkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans öğrenimine başladı.