

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

**TÜRK TOPLUMUNDA PROSTAT KANSERİ PROTEOM PROFİLLERİNİN VE
ANDROJEN RESEPTÖR, PSA, RNASEL
GEN POLİMORFİZMLERİNİN İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

Dr. Meltem YALINAY ÇIRAK

Tez Danışmanı

Prof.Dr. Abdullah EKMEKÇİ

ANKARA
HAZİRAN 2011

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

**TÜRK TOPLUMUNDA PROSTAT KANSERİ PROTEOM PROFİLLERİNİN VE
ANDROJEN RESEPTÖR, PSA, RNASEL
GEN POLİMORFİZMLERİNİN İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

Dr. Meltem YALINAY ÇIRAK

Tez Danışmanı

Prof.Dr. Abdullah EKMEKÇİ

Bu tezin proteomik kısmı Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
01/2007-57 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA
HAZİRAN 2011

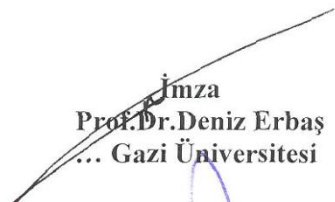
T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

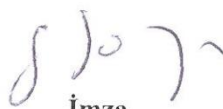
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı Doktora Programı
çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi : .28/06./2011


İmza
Prof.Dr.Abdullah Ekmekçi
.... Gazi Üniversitesi
Jüri Başkanı


İmza
Prof.Dr.Adnan Menevşe
... Gazi Üniversitesi


İmza
Prof.Dr.Deniz Erbaş
... Gazi Üniversitesi


İmza
Prof.Dr.Sinan Sözen
...Gazi Üniversitesi


İmza
Prof.Dr. Yakut Akyön Yılmaz
....Hacettepe Üniversitesi

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
Kabul ve Onay	
İçindekiler	I
Şekiller ve Grafikler	VII
Tablolar	XI
Semboller, Kısaltmalar	XIII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Prostat Kanseri	3
2.1.1. Histopatoloji	4
2.1.2. Prostat Kanseri Risk Faktörleri	5
2.1.2.1. Yaş	6
2.1.2.2 Aile Öyküsü	6
2.1.2.3. Etnik Köken	6
2.1.2.4. Beslenme	7
2.1.2.5. Çevresel Faktörler	7
2.1.2.6. Hormonlar	8
2.1.2.6.1. Testosteron	8
2.1.2.6.2. Testosteron ve Prostat	11
2.1.2.6.3. Testosteron ve Benign Prostat Hiperplazisi (BPH)	12
2.1.2.6.4. Testosteron ve Prostat Kanseri	12
2.3. Prostat Kanseri ve Genetik	12
2.3.1. Androjen Reseptör (AR) ve Steroid Hormon Metabolizma Genleri	14
2.3.2. Prostat Spesifik Antijen (PSA) Geni	17
2.3.3. Kalıtsal Prostat Kanseri İle İlişkili Genler ve Lokuslar	18
2.3.3.1. Hereditary Prostate Cancer 1 (HPC1) Geni	19
2.3.3.2. Hereditary Prostate Cancer 2, X ve 20 (HPC2, X ve 20) Geni	20

2.3.3.3. Macrophage Scavenger Receptor 1 MSR 1 Geni	20
2.3.3.4. BRCA1 ve BRCA2 Genleri	21
2.3.4. Prostat Kanseri ile İlişkili Diğer Genler	21
2.4. Proteomik	23
2.4.1. Surface enhanced laser desorption/ionization time-of-flight (SELDI-TOF) MS (Yüzey etkisi arttırılmış lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi)	24
3.GEREÇ VE YÖNTEM	27
3.1. Araç ve Gereçler	27
3.1.1. Cihazlar	27
3.1.2. Kitler	28
3.1.3.Sarf Malzemeler	28
3.1.4. Kimyasal Maddeler	28
3.2.Çözeltilerin Hazırlanışı	29
3.2.1. 5X Tris Borat EDTA (TBE) Çözeltisi Hazırlanışı	29
3.2.2. 1X TBE Çözeltisi Hazırlanışı	29
3.2.3. 0.5M EDTA Çözeltisi Hazırlanışı	29
3.2.4.Stok Etidyum Bromür Çözeltisi Hazırlanışı	30
3.2.5. 3M Sodyum asetat (NaOAc) Çözeltisi Hazırlanışı	30
3.3. Agaroz Jel Hazırlanışı	30
3.3.1.Jel Boyasının Hazırlanması	30
3.3.2.Orange G Jel Yükleme Boyası Hazırlanışı	30
3.4.Yöntemler	31
3.5. Proteomik Analizler	31
3.5.1. Çalışma Grubu ve Klinik Özellikler	31
3.5.2. Protein Profil Analizi: SELDI TOF (Surface Enhanced	33

Desorption and Ionization Time of Flight) Tekniği ile Proteomik alışması	
3.5.2.1. SPA Matriks (EAM- Energy Absorbing Molecules, Enerji absorbe eden moleküller) Hazırlanması	33
3.5.2.2. CHCA Matriks (EAM- Energy Absorbing Molecules, Enerji Absorbe Eden Moleküller) Hazırlanması	33
3.5.2.3. Protein ve Peptid Standartlarının Hazırlanması	33
3.5.2.4.Örneklerin Hazırlanması	34
3.5.2.5. Çipin Hazırlanması (ip Aktivasyonu)	34
3.5.2.6.Örneklerin ipe Yüklmesi	35
3.5.2.7. SELDI-TOF MS ile Protein Profillerinin Değerlendirilmesi	35
3.6. Moleküler Genetik Analizler	35
3.6.1. Parafin Bloklardan Genomik DNA Eldesi:	35
3.6.2. AR Geni Ekson 1 Bölgesinde (CAG)n Tekrarlarını İçeren Bölgenin Moleküler Genetik Analizi	37
3.6.2.1. AR Geni Ekson 1 Bölgesinde (CAG)n Tekrarlarını İçeren Bölgenin PZT ile oğaltılması	37
3.6.2.2. AR Geni Ekson 1'deki (CAG)n Tekrarları İçeren Bölgenin Tepkime Karışımı	38
3.6.2.3. AR Geni Ekson 1'deki (CAG)n Tekrarlarını İçeren Bölgenin PZT Programı	39
3.6.2.4. AR Geni Ekson 1'deki (CAG)n Tekrarlarını İçeren PZT Ürünlerinin Analizi	39
3.6.2.5. AR Geni Ekson 1'deki (CAG)n Tekrarlarının Analizi	39
3.6.2.6. Döngüsel DNA Analizi Yöntemi ile AR Geni Ekson 1'deki (CAG)n Tekrar Sayılarının Doğrulanması	40
3.6.2.7. Safılaştırılan PZT Ürünlerinin Agaroz Jel Elektrofrezinde Analizi	41
3.6.2.8. Döngüsel DNA Dizi Analizi Tepkime Karışımı	41
3.6.3. PSA/KLK3 Geni Kontrol Bölgesinde Yer Alan -158	42

G>A (rs266882) Polimorfizminin Moleküler Genetik Analizi	
3.6.3.1. PSA/KLK3 Geni Kontrol Bölgesinde Yer Alan -158	42
G>A (rs266882) Polimorfizmini İçeren Bölgenin PZT ile Çoğaltılması	
3.6.3.2. KLK3 -158 Polimorfizmini İçeren Bölgenin PZT Tepkime Karışımı	43
3.6.3.3. KLK3-158 Polimorfizmini İçeren Bölgenin PZT Programı	44
3.6.3.4. KLK3 -158 Polimorfizmini İçeren Bölgeye Ait PZT Ürünlerinin Analizi	44
3.6.3.5. KLK3-158 Polimorfizminin Belirlenmesi İçin PZT Ürünlerinin <i>NheI</i> Restriksiyon Enzimi ile Kesimi	45
3.6.3.5.1 Deneyin Yapılışı	45
3.6.4. PSA/KLK3 Geni Kontrol Bölgesinde Yer alan -252 G>A (rs4802754) Polimorfizmini Moleküler Genetik Analizi	46
3.6.4.1. PSA/KLK3 Geni Kontrol Bölgesinde Yer alan -252 G>A (rs4802754) Polimorfizmini İçeren Bölgenin PZT ile Çoğaltılması	46
3.6.4.2. KLK3 -252 Polimorfizmini İçeren Bölgenin PZT Tepkime Karışımı	47
3.6.4.3. KLK3-252 Polimorfizmini İçeren Bölgenin PZT Programı	47
3.6.4.4. KLK3 -252 Polimorfizmini İçeren Bölgeye Ait PZT Ürünlerinin Analizi	48
3.6.4.5. KLK3-252 Polimorfizminin Belirlenmesi için PZT Ürünlerinin <i>NlaIII</i> Restriksiyon Enzimi ile Kesimi	48
3.6.4.5.1. Deneyin Yapılışı	49
3.6.5. RNASEL Geni D541E T>G (rs627928) Polimorfizminin Moleküler Genetik Analizi	49
3.6.5.1. RNASEL Geni D541E T>G (rs627928) Polimorfizmini İçeren Bölgenin PZT ile Çoğaltılması	49

3.6.5.2. RNASEL D541E Polimorfizmini İçeren Bölgenin PZT Tepkime Karışımı	50
3.6.5.3. RNASEL D541E Polimorfizmini İçeren Bölgenin PZT Programı	51
3.6.5.4. RNASEL D541E Polimorfizmini İçeren Bölgeye Ait PZT Ürünlerinin Analizi	51
3.6.5.5. RNASEL 541 Polimorfizminin Belirlenmesi için PZT Ürünlerinin <i>Mbol</i> Restriksiyon Enzimi ile Kesimi	52
3.6.5.5.1. Deneyin Yapılışı	52
3.7. Biyoinformatik analiz programları	53
4. BULGULAR	54
4.1. Proteomik Analiz Sonuçları	54
4.2. Moleküler Genetik Analiz Sonuçları	64
4.2.1 AR Geni Ekson 1 bölgesinde (CAG) _n Tekrarlarının PZT Sonuçları	64
4.2.1.1 AR Geni Ekson 1'deki (CAG) _n Tekrarlarının Fragment Analizi Sonuçları	65
4.2.2. PSA/KLK3 Geni Kontrol Bölgesinde Yer alan -158 G>A (rs266882) Polimorfizmini İçeren Bölgenin PZT Sonuçları	68
4.2.2.1. PSA/KLK3 Geni Kontrol Bölgesinde Yer alan -158 G>A (rs266882) Polimorfizmini İçeren PZT Ürünlerinin <i>NheI</i> Restriksiyon Enzimi Kesim Sonuçları	69
4.2.3. PSA/KLK3 Geni Kontrol Bölgesinde Yer alan -252 G>A (rs4802754) Polimorfizmini İçeren Bölgenin PZT Sonuçları	69
4.2.3.1. PSA/KLK3 Geni Kontrol Bölgesinde Yer alan -252 G>A (rs4802754) Polimorfizmini İçeren PZT Ürünlerinin <i>NotI</i> Restriksiyon Enzimi Kesim Sonuçları	70
4.2.4. RNASEL Geni D541E T>G (rs627928) Polimorfizmini İçeren Bölgenin PZT Sonuçları	71

4.2.4.1. RNASEL Geni D541E T>G (rs627928)	72
Polimorfizmini İçeren Bölgenin PZT Ürünlerinin Mbol Restriksiyon Enzimi Kesim Sonuçları	
5. TARTIŞMA	75
6. SONUÇLAR	87
7. ÖZET	90
8. SUMMARY	92
9. KAYNAKLAR	94
10. EKLER	125
11. ÖZGEÇMİŞ	126

ŞEKİLLER ve GRAFİKLER

	Sayfa No
Şekil 1. Prostat kanseri evrelendirilmesi	4
Şekil 2. Prostat kanseri histopatolojisi	5
Şekil 3: Testosteronun taşınması ve prostatta hücre içine alınması	9
Şekil 4: Testosterondan dihidrotestosteron oluşumu	10
Şekil 5: DHT-ARA-AR üçlü kompleksinin HRE ile etkileşimi	11
Şekil 6: SELDI-TOF içinde proteinlerin ayrıştırılması ve protein parmak izinin çıkarılması	24
Şekil 7: SELDI-TOF teknolojisi	25
Şekil 8: AR geninin ekson 1 bölgesinde tanımlanan (CAG) _n tekrarlarını içine alan bölgeyi çoğaltan primerler ve bölgenin genomdaki yerleşimi.	37
Şekil 9: PSA/KLK3 genine ait 297 bç'lik bölümünü çoğaltan primerler, bölgenin genomdaki yerleşimi ve -158 G>A (rs266882) polimorfizmi için kullanılan restriksiyon enzimi ve kesim yeri	43
Şekil 10: PSA/KLK3 genine ait 204 bç'lik bölümünü çoğaltan primerler, bölgenin genomdaki yerleşimi ve -252 G>A (rs4802754) polimorfizmi için kullanılan restriksiyon enzimi ve kesim yeri	46

Şekil 11: RNASEL genine ait 361 bç'lik bölümünü çoğaltan primerler, bölgenin genomdaki yerleşimi ve D541E T>G (rs627928) polimorfizmi için kullanılan restriksiyon enzimi ve kesim yeri	50
Şekil 12: Prostat kanseri ve BPH karşılaştırılmasında saptanan 6428 Da ağırlığındaki proteine ait biyoinformatik analiz ve proteinin parmak izi haritası	56
Şekil 13: 6428 Da ağırlığındaki proteinin kromatografik analiz görüntüsü	56
Şekil 14: Prostat kanseri ve kontrol grupları karşılaştırılmasında saptanan 6628 Da ağırlığındaki proteine ait biyoinformatik analizi	57
Şekil 15: 6628 Da ağırlığındaki proteinin kromatografik analiz görüntüsü	57
Şekil 16: Tüm hastalıkla ilişkili gruplar ve sağlıklı kontrol grubu karşılaştırılmasında saptanan 2566 Da ağırlığındaki proteine ait biyoistatistik analiz verileri	59
Şekil 17: Tüm hastalıkla ilişkili gruplar ve sağlıklı kontrol grubu karşılaştırılmasında saptanan 5152 Da ağırlığındaki proteine ait biyoistatistik analiz verileri	61
Şekil 18: Tüm hastalıkla ilişkili gruplar ve sağlıklı kontrol grubu karşılaştırılmasında saptanan 6438 Da ağırlığındaki proteine ait biyoistatistik analiz verileri	63

- Şekil 19:** 261-288 bç'lik bantları gösteren jel görüntüsü: **65**
(CAG)n tekrar polimorfizmini içine alan gen bölgesine ait PZT sonuçlarının %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü
- Şekil 20:** AR geni ekson 1 bölgesinde 16 CAG tekrar **65**
sayısına sahip bireyin fragment analizi görüntüsü
- Şekil 21:** AR geni ekson 1 bölgesinde 17 CAG tekrar **66**
sayısına sahip bireyin fragment analizi görüntüsü
- Şekil 22:** AR geni ekson 1 bölgesinde 18 CAG tekrar **66**
sayısına sahip bireyin fragment analizi görüntüsü
- Şekil 23:** AR geni ekson 1 bölgesinde 19 CAG tekrar **66**
sayısına sahip bireyin fragment analizi görüntüsü
- Şekil 24:** AR geni ekson 1 bölgesinde 20 CAG tekrar **66**
sayısına sahip bireyin fragment analizi görüntüsü
- Şekil 25:** AR geni ekson 1 bölgesinde 21 CAG tekrar **67**
sayısına sahip bireyin dizi analizi görüntüsü
- Şekil 26:** 297 bç'lik bantları gösteren jel görüntüsü: -158 G>A **68**
(rs266882) polimorfizmini içine alan gen bölgesine ait PZT sonuçlarının %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü
- Şekil 27:** PSA/KLK3 geni kontrol bölgesinde yer alan -158 **69**
G>A (rs266882) polimorfizmini içeren PZT ürünlerinin *NheI* restriksiyon enzim kesimi

Şekil 28: 204 bç'lik bantları gösteren jel görüntüsü: -252 G>A (rs4802754) polimorfizmini içine alan gen bölgesine ait PZT sonuçlarının %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü	70
Şekil 29: PSA/KLK3 geni kontrol bölgesinde yer alan -252 G>A (rs4802754) polimorfizmini içeren PZT ürünlerinin <i>Nla</i> III restriksiyon enzim kesimi	71
Şekil 30: 361 bç'lik bantları gösteren jel görüntüsü: RNASEL Geni D541E T>G (rs627928) polimorfizmini içine alan gen bölgesine ait PZT sonuçlarının %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü	71
Şekil 31: RNASEL geni D541E T>G (rs627928) polimorfizmini içeren bölgenin PZT ürünlerinin <i>Mbol</i> restriksiyon enzim kesimi	72
Grafik 1: Tüm hastalıkla ilişkili gruplar ve sağlıklı kontrol grubu karşılaştırılmasında saptanan 2566 Da ağırlığındaki proteinin grafiksel değerlendirilmesi	60
Grafik 2: Tüm hastalıkla ilişkili gruplar ve sağlıklı kontrol grubu karşılaştırılmasında saptanan 5152 Da ağırlığındaki proteinin grafiksel değerlendirilmesi	62
Grafik 3: Tüm hastalıkla ilişkili gruplar ve sağlıklı kontrol grubu karşılaştırılmasında saptanan 6438 Da ağırlığındaki proteinin grafiksel değerlendirilmesi	64
Grafik 4: Prostat kanserli hasta ve kontrol (BPH) grubundaki AR geni (CAG) tekrar sayılarının dağılımları	67

TABLolar

	Sayfa No
Tablo 1: Kalıtsal prostat kanser gelişimi ile ilişkili genler	18
Tablo 2: Prostat kanser sitogenetiği ile ilişkili genler	22
Tablo 3: Çalışma grubunun demografik özellikleri	32
Tablo 4: PZT ürünlerinin uzunlukları ve tekrar sayıları	38
Tablo 5: AR geni ekson 1'deki (CAG)n tekrarları içeren bölgenin tepkime karışımı	38
Tablo 6: AR geni ekson 1'deki (CAG)n tekrarlarına ait fragment analizi karışımı	40
Tablo 7 : DNA dizi analizi amplifikasyon karışım	41
Tablo 8: KLK3-158 gen bölgesi için PZR tepkime karışımı	44
Tablo 9: KLK3-252 gen bölgesi için PZR tepkime karışımı	47
Tablo 10: RNASEL D541E gen bölgesi için PZR tepkime karışımı	51
Tablo 11. Proteomik analiz sonuçları	55
Tablo 12: Prostat kanserli bireylerde ve kontrollerde AR geni CAG tekrar sayısı polimorfizminin dağılımı	68

Tablo 13: Prostat kanserli hasta ve kontrollerde PSA/KLK3 geninin -158 G>A (rs266882) polimorfizminin dağılımı **73**

Tablo 14: Prostat kanserli hasta ve kontrollerde PSA/KLK3 geninin -252 G>A (rs4802754) polimorfizminin dağılımı **74**

Tablo 15: Prostat kanserli hasta ve kontrollerde RNASEL geninin D541E T>G (rs627928) polimorfizminin dağılımı **74**

SEMBOLLER VE KISALTMALAR

2D-PAGE	: 2 dimensional-polyacrylamide gel electrophoresis
5 α - DHT	: 5 α - dihidrotestosterona
μ l	: Mikrolitre
μ M	: Mikromolar
AR	: Androjen reseptör
ARA	: Androjen reseptör aktivatörü
BPH	: Benign prostat hiperplazisi
Da	: Dalton
DHEA	: Dehidroepiandrosteron
DHEAS	: Dehidroepiandrosteron sülfat
DHT	: Dihidrotestosteron
dNTP	: Deoksinükleotid Trifosfat
E2	: Östradiol
EAM	: Energy absorbing molecules
EDTA	: Etilendiamintetraasetikasit
EGFR	: Epidermal growth factor receptor
FRET	: Floresans rezonans enerji transferi
GTA	: Genel transkripsiyon aparatı
HPC	: Hereditary prostate cancer
HRE	: Hormona yanıt veren element
IGF	: Insulin like growth factor
IMAC	: Immobilized metal affinity capture
kDa	: Kilo dalton
KGF	: Keratinocyte growth factor
KLK	: Kallikrein
LCM	: Laser capture microdissection
LH	: Luteinizing hormon
LHRH	: Luteinizing hormon releasing hormon
MALDI-TOF	: Matrix-assisted laser desorption/ionization time of

MS	: flight mass spectrometry
MgCl ₂	: Magnezyum klorür
MSR	: Macrophage scavenger receptor
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotitfosfat
NaOAc	: Sodyum asetat
ng	: Nanogram
nM	: Nanomolar
PBS	: Phosphate buffer saline
pmol	: Pikomol
PSA	: Prostat spesifik antijen
PZT	: Polimeraz zincir tepkimesi
SELDI-TOF, MS	: Surface enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry
SHBG	: Seks hormon bağlayıcı globulin
T	: Testosteron
TBE	: Tris borat EDTA
TFA	: Trifluorasetik asit
VEGF	: Vascular endothelial growth factor

1. GİRİŞ

Prostat kanseri dünya üzerinde en sık saptanan onkolojik hastalıklardandır. Kanser gelişimi sırasında birçok moleküler değişiklikler olmaktadır. Bu moleküler değişikliklerin anlaşılabilmesi, gen ve gen ürünleri olan proteinlerin incelenmesi ile mümkün olmaktadır. Moleküler genetik araştırmaların yanı sıra proteomikler yüksek risk altındaki kişilerin tanımlanabilmesi için gerekli olan kanser biyobelirleyicilerinin keşfi ve değerlendirilebilmesi için yeni paradigmlar sağlamaktadır.

Bugüne kadar laboratuvarlarda tanıya yönelik olarak yapılmış olan plazma protein miktar tayinleri kanser erken tanısından çok uzak olup, halen tanı amacıyla kullanılan belirleyiciler de gerek özgüllüğü ve gerekse duyarlılıkları yönünden çok sayıda yalancı pozitiflik nedeniyle gereksiz biyopsi yapılmasına neden olmaktadır. Ayrıca duyarlılıkların düşük olması nedeniyle de kanser erken tanısı amacıyla kullanılamamaktadır.

Prostat kanseri taramalarında kullanılan tekli biyobelirleyici Prostat Spesifik Antijen (PSA) testinin özgüllüğünün düşük olması çoklu biyobelirleyiciler üzerindeki çalışmalara çok gereksinim oluşturmuştur. Çoklu protein biyobelirleyicilerin saptanmasında son yıllarda üzerinde en çok çalışılan sistemler kütle spektrometre yöntemleridir. Protein ayırt edilmesindeki etkinliğin artırılması amacıyla geliştirilen "Surface enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry - (SELDI-TOF, MS)" (yüzey etkisi artırılmış lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometre) teknolojisi biyoçip üzerinde kimyasal olarak modifiye edilmiş yüzeye, selektif olarak adsorbe edilen ilgili proteinlerin affinite- esaslı analiz edilmesidir.

Proteomiklerin günümüzde birçok kanser türünde hastalığın erken evrede tanımlanması, prognoz takibi ve tedavi planlanmasındaki giderek artan rolü dikkat çekicidir.

Bu bilgiler doğrultusunda çalışmamızın amacı, prostat kanseri, benign prostat hiperplazisi ve sağlıklı kontrol grupta SELDI-TOF, MS ile proteomik analizini gerçekleştirmek ve Türk toplumu için prostat kanseri çoklu biyobelirleyici araştırması yapmak ve çalışma gruplarındaki prostat kanserinde en çok üzerinde durulan Androjen Reseptör (AR), geni CAG tekrarları, Prostat Spesifik Antijen (PSA) promoter bölge ve RNASEL gen polimorfizmlerinin incelenmesidir.

2. GENEL BİLGİLER

Prostat bezi erkekte idrar torbası boynuyla üretra başlangıcını çevrelemektedir. Yaklaşık olarak 3×2,5×4 cm. boyutlarında olup, ikisi yanda, biri ortada olmak üzere üç parçalıdır. Prostat kanseri, prostat bezinin en sık görülen hastalıklarından ve erkeklerin en sık görülen kanserlerinden biridir¹.

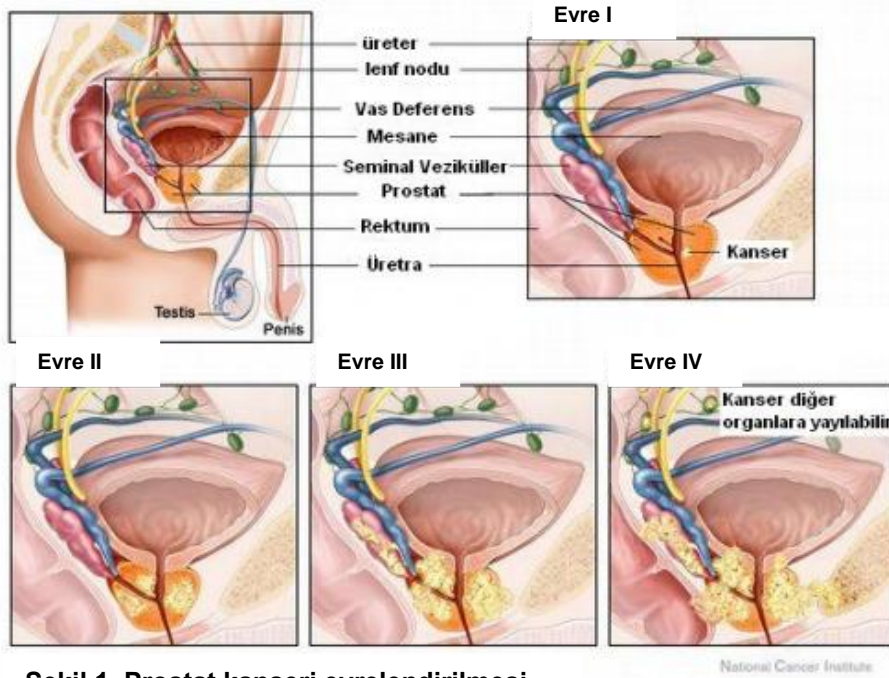
2.1. Prostat Kanseri

Prostat kanseri erkeklerin onkolojik hastalıkları arasında diğer solid tümörlerden daha yüksek bir sıklık taşımaktadır. Günümüzde dünyada ikinci kanser mortalite nedenidir². İnsidans sürekli artmasına karşın 1980'lerde Prostat Spesifik Antijenin (PSA) klinik uygulamaya girmesiyle birlikte mortalite oranları hemen hemen aynı kalmıştır. PSA çağı ile birlikte %70 üzerinde prostat kanseri tanısı yükselen PSA değeri ile konulabilmektedir. Eskiye göre kanser tanısı 10 yıl daha erken konulabilmektedir. Ayrıca daha düşük malignansi evresinde tanımlanabilmektedir. Ancak prostat kanser evrelendirilmesine (Gleason skor) ilişkin değerlendirmeler agresif kanserlerle ilgili yüksek prevalansı ortaya koymaktadır^{3,4}. Türkiye'de yapılan prostat kanseri araştırmasında vakanın görülme sıklığının erkeklerde 2. sıraya yükseldiğini ortaya koymuştur⁵.

Prostat kanseri yüksek sıklıkta görülen multifaktöriyel bir hastalık olmasına karşın kesin kanıtlanmış bir nedeni ortaya konulamamıştır. Hastalığın gelişiminde önemli olduğu düşünülen çeşitli risk faktörleri üzerinde durulmaktadır. Prostat kanseri gelişiminde çevresel faktörler etkili olmakla birlikte esas olarak genetik faktörlerin predominant rol oynadığı düşünülmektedir⁶.

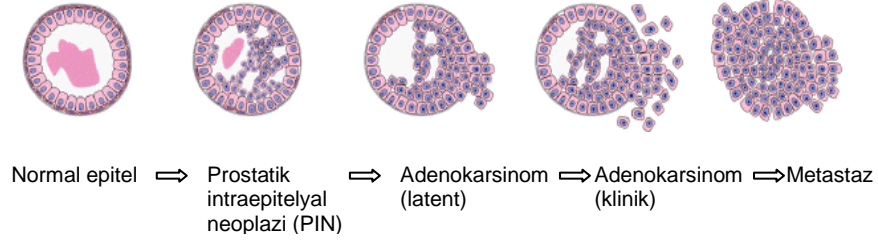
2.1.1 Histopatoloji

Histopatolojik olarak benign prostat hiperplazisi (BPH), prostatın periüretral alanında epitelyal ve stromal hücrelerin artışı ile karakterizedir^{7,8}. Prostat kanseri ise genellikle (%70) prostatın periferal zonundan gelişir. Olguların yaklaşık %5-15'i santral zondan, geri kalanı ise transizyonel zondan köken alır. Prostat kanseri I-IV arasında evrelendirilir (Şekil1).



Şekil 1. Prostat kanseri evrelendirilmesi.

Prostat adenokarsinomunun histopatolojik incelemelerinde (Şekil 2) en yaygın kullanılan derecelendirme sistemi Gleason skorlamasıdır⁹. Gleason sistemi, artan oranlarda agresifliği belirleyen 5 ayrı düzeyde patolojik örneklerin incelenmesini yapan bir sistemdir. Gleason skoru 4'ün altında olan örnekler iyi diferansiyasyon, 5-7 olanlar orta düzeyde diferansiyasyon, 8 ve üzeri olanlar kötü diferansiyasyon gösteren hastalar olarak bildirilmiştir⁹.



Şekil 2. Prostat kanseri histopatolojisi.

Evre I'de PSA seviyesi 10'dan daha düşük olup, Gleason skoru 6 veya daha düşüktür. Evre II A aşamasında PSA seviyesi 20'den daha düşük ve Gleason skoru 7 veya daha düşük; B aşamasında PSA düzeyi 20 veya daha yüksek ve Gleason skoru 2 ile 10 arasında değişebileceği gibi 8 veya daha yüksek de olabilir. Evre III'de PSA herhangi bir düzeyde olabilir ve Gleason skoru 2 ile 10 arasındadır. Evre IV'de PSA herhangi bir düzeyde olabilir ve Gleason skoru 2 ile 10 arasındadır⁹.

2.1.2. Prostat Kanseri Risk Faktörleri

- Yaş
- Aile öyküsü
- Etnik köken
- Beslenme
- Çevresel faktörler
- Hormonlar
- Genetik

2.1.2.1. Yaş

Prostat kanserinin görülme sıklığı yaşla birlikte belirgin olarak artmaktadır. 50 yaş üstü erkeklerde hem görülme sıklığı hem de kanserden ölüm oranı yaşa bağlı olarak artar. 39 yaş altında görülme oranı 1/10.000 iken, 40-59 yaşlar arasında 1/139 ve 60-79 yaşları arasında ise bu oran 1/8'dir¹⁰. Prostat kanseri tanısı almış erkeklerin % 80'i 65 yaş ve üzerindedir¹¹.

2.1.2.2. Aile Öyküsü

Birçok çalışma prostat kanseri hastalarının yakını olan erkeklerde prostat kanseri insidansının normal popülasyona göre arttığını göstermiştir. Tüm prostat kanserlerinin %9'unda ve 55 yaşın altındaki olguların %45'inde yüksek otozomal dominant geçiş olasılığı gösterilmiştir. Babası ya da erkek kardeşine 50 yaşın altında prostat kanseri tanısı konmuş bir erkekte prostat kanseri riski yaklaşık 7 kat artmıştır¹².

2.1.2.3. Etnik Köken

Değişik etnik gruplarda prostat kanseri insidansı geniş bir varyasyon gösterir. Görülme ve ölüm oranı Kuzey Amerika, Kuzey Avrupa ve İskandinav ülkelerinde yüksek iken Japon ırkında oldukça düşüktür. A.B.D' de yaşayan siyah erkeklerde insidans oldukça yüksek ve hastalık ağır seyretmekte iken, aynı bölgede ve aynı sosyoekonomik düzeydeki beyaz erkeklerde daha düşüktür¹³. Prostat kanser insidansı ve mortalitesi beyazlar ve Afroamerikan erkeklerde farklılıklar göstermektedir. Örneğin Jemal ve ark. prostat kanser insidansı ve mortalitesini sırası ile beyazlarda 156 ve 25/100.000 erkek iken Afroamerikanlarda 248 ve 59/100.000 erkek olarak bildirmişlerdir².

2.1.2.4. Beslenme

Besinler ile yüksek oranda hayvansal yağ alımının prostat kanseri insidansını arttırdığı düşünülmektedir. Bu hipoteze göre diyetle alınan fazla miktarda yağ, seks hormonlarının sentezini uyarmakta ve uzun süreli androjenik uyarı oluşturarak prostat bezinde kanser riskini arttırmaktadır. Bu hipotez sadece yağlar için değil aynı zamanda, yağda eriyen vitaminler (A, D, K) ve çinko gibi eser elementler için de geçerlidir¹⁴. A vitamininin emiliminin azalması dolaşımdaki beta karoten düzeyinin azalmasına neden olmaktadır. Beta karotenin, selenyum ve E vitamininin benzer antioksidan etkisiyle kanser gelişimini engellediği bilinmektedir. Bazı çalışmalarda yüksek kalsiyum tüketiminin prostat kanseri riskinde artışla ilişkili olduğu bulunmuştur¹⁵. Likopen, selenyum ve E vitaminin antioksidan etkileriyle kanserde önleyici etkisi olduğuna yönelik çeşitli çalışmalar bulunmaktadır¹⁶⁻¹⁹.

2.1.2.5. Çevresel Faktörler

Vazektomi öyküsü, sigara içimi, alkol kullanımı, obezite, statin ve nonsteroid antiinflatuvar ilaç kullanımı ve seksüel aktivitenin prostat kanser gelişimi üzerine etkisiyle ilgili çeşitli çalışmalar bulunmaktadır²⁰.

Vazektomi, antisperm antikor seviyelerinde yükselme, semende hormon konsantrasyonunda ve prostat sekresyonunda azalmaya yol açmaktadır²¹. Yapılan çalışmaların çoğunda vazektomi ile prostat kanseri arasında ilişki olduğu saptanmıştır. Vazektominin prostat kanseri riskini 1.2-2 kat artırdığını, özellikle 35 yaş altında bu riskin daha fazla olduğu bildirilmektedir²².

2.1.2.6. Hormonlar

Androjenler, östrojenler, insulin, IGF (insulin like growth factor), çevresel ve genetik faktörlerle ilişkili diğer hormonlar bireysel genetik yatkınlıklar ve dış koşullara (hormon alımı, obezite gibi) bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir.

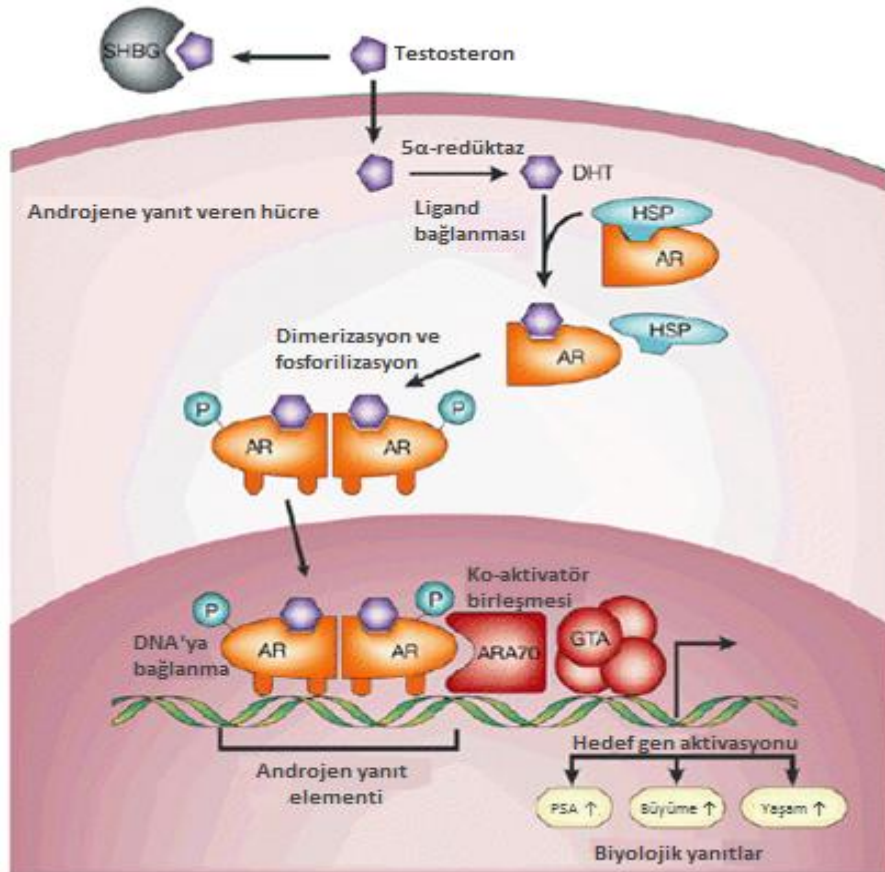
2.1.2.6.1. Testosteron

Testosteron insan vücudunda çoğunluğu testisler olmak üzere, overler ve adrenal bez tarafından üretilen 19 karbonlu steroid yapıda bir hormondur. Normal erkeklerde dolaşımdaki major serum androjeninin hemen hemen tümü testiküler orijinli olan testosterondur²³.

Sentezi hipotalamik-pituiter-gonadal aks tarafından, temel olarak lüteinize edici hormon (LH) aracılığı ile kontrol edilir. Hipotalamusun, luteinizing hormon releasing hormon (LHRH) olarak adlandırılan küçük bir polipeptid hormon salgılayarak stimüle ettiği hipofiz, LH'yı salgılar. LH testislere taşınır ve vücudun major serum androjeni olan testosteronun salınımı ve de novo steroid sentezini stimüle etmesi için Leydig hücreleri üzerine direkt etki eder. Sağlıklı bir erişkin erkek, günde 2.5-11 mg testosteron üretir. Erkek dolaşımında kadınlardakinden 10 kat daha fazla testosteron bulunur. Üretilen testosteronun % 44' ü seks hormon bağlayıcı globulin SHBG'ye bağlı, % 2' si ise serbest haldedir. Testosteron, dolaşımdaki temel androjenken, dihidrotestosteron (DHT) ise nükleer androjendir. Testosteron aromatisasyon ve redüksiyonla periferde östrojen ve 5 α - dihidrotestosterona (5 α - DHT) dönüşür. Testosteron; kaslarda direkt olarak, cilt ve prostatta 5 α -DHT ye dönüşerek, beyin, lipid metabolizması, kemikler ve vasküler sistem üzerinde ise östradiole (E2) dönüşerek etki eder²³.

Dolaşımdaki dihidrotestosteronun %25'i testislerden salgılanırken, geri kalan %75'i ise periferel dokularda dehidroepiandrosteron (DHEA), androstenedion, dehidroepiandrosteron sülfat (DHEAS) ve testosteron gibi inaktif androjenlerden 5 α redüktaz II enzimi katalizi ile oluşur²⁴.

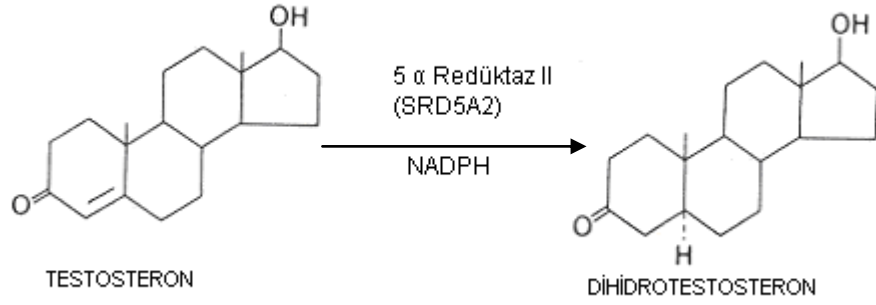
Dolaşımdaki serbest testosteron pasif difüzyon ile prostat hücresine alınır. Albümine bağlı olarak taşınan testosteron, albüminden ayrılarak hücre içine girer. SHBG ile taşınan testosteron ise prostat hücre zarında yerleşmiş olan reseptörü aracılığıyla hücre içine alınır²⁵ (Şekil 3).



Şekil 3: Testosteronun taşınması ve prostatta hücre içine alınması²⁵.

AR= Androjen reseptörü, ARA= Androjen reseptör aktivatörü
DHT= Dihidrotestosteron, T= Testosteron, SHBG= Seks hormonu bağlayan globulin, GTA= Genel transkripsiyon aparatı

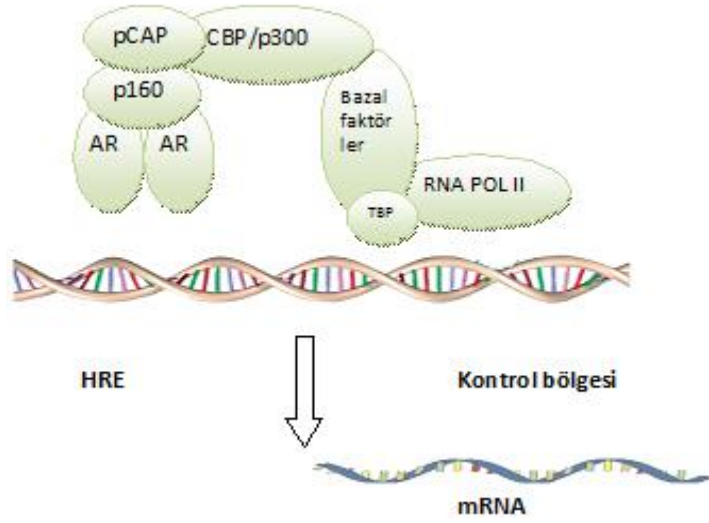
Hücre içinde testosteron, 5 α redüktaz II enzimi ile NADPH ve moleküler oksijen varlığında geri dönüşümsüz olarak dihidrotestosterona dönüştürülür²³ (Şekil 4).



Şekil 4: Testosterondan dihidrotestosteron oluşumu.

NADPH= Nikotinamid Adenin dinükleotitfosfat

Prostat dokusunda sentezlenen dihidrotestosteron androjen reseptörüne (AR) bağlanır. Dihidrotestosteronun androjen reseptörüne olan ilgisi testosterona oranla 5 kat daha fazladır²⁶. Androjen reseptörü, prostata özgü genlerin ifadenmesinde anahtar rol oynayan bir transkripsiyon faktörüdür²³. DHT androjen reseptörüne bağlandıktan sonra ARA (androjen reseptör aktivatörleri) bu komplekse katılır²⁵. Androjen reseptör aktivatörleri, etkilerinin histonları modifiye ederek doğrudan gösterirken, kromatini modifiye eden yapılara katılarak dolaylı olarak da gösterebilirler^{23,27}. En iyi bilinen aktivatörler p160 aile üyeleri olan ARA70, ARA55, ARA54, SMAD-3 'dir²³. Androjen reseptör aktivatörlerinde oluşan mutasyonların ve ifadenmelerinde meydana gelen değişikliklerin prostat kanseri gibi androjen reseptörü aktivitesiyle ilgili hastalıkların ilerlemesi üzerine etkisinin olabileceği düşünülmektedir²⁷.



Şekil 5: DHT-ARA-AR üçlü kompleksinin HRE ile etkileşimi.

AR= Androjen reseptörü

HRE= Hormona yanıt veren elementler

DHT-ARA-AR üçlü kompleksi nükleusda birikerek düzenleyici DNA dizilerine (hormona yanıt veren elementler: HRE) bağlanırlar (Şekil 5). Böylece özgün gen aktivitesinin baskılanmasına veya uyarılmasına neden olurlar. HRE, özgün bir hormona yanıt veren gen veya gen grubunun yakınındaki her hızlandırıcı (enhancer) bölgede bulunur^{23,27}.

2.1.2.6.2. Testosteron ve Prostat

Prostat dokusunun, oluşması ve büyümesi için androjen ve embriyonik prostatik mezenkimde eksprese olan androjen reseptörü mutlaka gereklidir²⁸. Erişkin hayatta prostat büyümesinin devamı için de testisten salgılanan normal erişkin kan testosteron düzeyinin sürekli olan uyarısı ve ayrıca testosteronun intraprostatik olarak, daha potent saf androjen olan 5 α -DHT'ya dönüşmesini sağlayan tip 2 5 α -redüktaz gereklidir²⁹. Prostat büyümesinde asıl rolü oynayanın testis kaynaklı testosteron olduğu unutulmamalıdır. Adrenal androjenlerin, prostat

büyümesine katkısı yoktur. İlerleyen dönemlerde, erişkin erkek serum testosteron konsantrasyonu ile yıllarca süren etkilenme nedeni ile yaşla birlikte insidansı artan benign prostat hipertrofisi ve prostat kanseri ortaya çıkar³⁰.

2.1.2.6.3. Testosteron ve Benign Prostat Hiperplazisi (BPH)

BPH gelişmesi için intraprostatik 5 α -DHT varlığı ve östrojenik etkiler de önemli rol oynamaktadır. Bu durumdaki normal erkeklerde ilerleyen yaşla birlikte prostat büyümeye devam ederken, hipogonadal erkeklerde bu büyüme gerçekleşmez. Hipogonadal erkeklere androjen replasman tedavisinin verildiğinde özellikle ilk altı ayda olmak üzere, yaşlılarında olması beklenen kadar prostat büyümesi gerçekleşir³¹.

2.1.2.6.4. Testosteron ve Prostat Kanseri

Prostat androjen bağımlı bir organdır. Testosteron prostat epitelinin büyümesi için vazgeçilmez bir unsurdur ve erken evre prostat kanseri endokrin bağımlıdır.

Androjenlerin prostat kanseri gelişimindeki rolü yaygın olarak kabul görmektedir. Hayvan modellerinde yüksek düzeyde androjen etkisinde kalınması sonucunda prostat kanseri gelişim hızının arttığı gözlenmiştir³². Testosteron ve daha aktif formu olan dihidrotestosteron prostat bezi gelişiminden sorumludur. Bu hormonların prostat kanseri gelişiminde de rol oynadıkları düşünülmektedir³³.

2.3. Prostat Kanseri ve Genetik

Onkolojik hastalıklara genellikle hücre yaşlanması (fiziksel, kimyasal veya biyolojik mutajenlere bağlı) sırasında ortaya çıkan birçok

gen mutasyonu neden olmaktadır. Bu mutasyonlar birçok düzeyde eş zamanlı olarak oluşmaktadır. Sağlıklı hücrelerde bu değişiklikler olağandır ve malign transformasyona yol açması şart değildir. Sadece onarım süreçleri oluşan malign hücreleri ortadan kaldıramazsa düzensiz büyüme ve proliferasyon gerçekleşir ve apoptozis baskılanır. Eğer böyle bir değişiklik ve hasar germ hücrede oluşursa değişen bilgi olduğu gibi alt basamaklara yansiyacaktır. Mutasyon teorisi dışında kök hücre teorisi kanser yanı sıra birçok hastalıkların açıklanmasında da güncel bir yaklaşım olarak karşımıza çıkmaktadır⁶.

Prostat kanserleri kalıtsal, ailesel ve sporadik olarak üç gruba ayrılabilir. Prostat kanserlerinin tümünün %85'i sporadiktir ve sadece %10-15'i genetik olarak saptanmaktadır. Toplum çalışmalarının analizinde birinci derece yakınlarda daha yüksek sıklıkta prostat kanseri bulunmuştur^{34,35}. Prostat kanseri için yüksek riskli alel dispoziyonu görülmesi genç yaşta tanı alan erkeklerde daha sıktır. Yapılan çalışmalarda 55 yaştan daha genç olanlarda %43, 70 yaştan daha genç olanlarda %34, 85 yaştan daha genç olanlarda %9 olarak saptanmıştır^{36,37}. Sporadik prostat kanserli erkeklerde aile öyküsü bulunmamaktadır. Ailesel prostat kanseri bir ailede iki üç erkeği etkilerken, gerçek herediter prostat kanseri takip eden üç kuşakta bir ailede üç veya daha fazla erkeği veya 55 ve daha genç yaşta iki erkeği etkilemektedir³⁷.

Prostat kanseri aile riskini değerlendiren 33 epidemiyolojik çalışmanın meta-analizleri erkek kardeşi veya babasında prostat kanseri olan bir erkeğin prostat kanseri olma göreceli riskinin sırasıyla 3.4 ve 2.2 olduğunu göstermiştir. İlk kuşakta etkilenen erkek sayısı ikinci kuşaktan daha fazla ise risk daha yüksektir^{38,39}. Ailede sadece prostat kanseri öyküsü değil aynı zamanda meme ve over kanseri de varsa erkeklerdeki risk artmaktadır. Bu tip olgularda göreceli risk 1.7 iken prostat kanseri ve

meme veya over kanseri de beraber olanlarda bu risk 5.8 olmaktadır ancak diğer çalışmalardaki sonuçlar değişebilmektedir^{40,41}.

Farklı çalışmalar sporadik ve ailesel prostat kanserli hastalarda çoğunlukla otozomal dominant kalıtım bulmuşlardır. Sadece küçük bir grup hasta kalıtsal otozomal resessif veya X'e (gonozomal) baęlıdır⁴².

Prostat kanserinde duyarlılık genlerinden söz etmek mümkündür. Genetik predispozisyonu olan hastaların 85 yaşında %97'sinde prostat kanseri gelişirken, bu genoma sahip olmayan erkeklerin sadece %10'unda kanser gelişir. Bu genler 65 yaşından önce de prostat kanserlerinin %65'inde ilişkili bulunmuştur^{43,44}. Prostat kanserine duyarlılık lokuslarını tanımlayabilmek için yapılan bağlantı (linkaj) analizlerinde, ailesel fenokopilerin aynı zamanda eski sporadik prostat kanserli bireyleri de içermesi nedeniyle zorluklar yaşanmaktadır.

Monozigot ve dizigot ikizlerle yapılan çalışmalarda, prostat kanseri riskinin monozigotik ikizlerde iki kat fazla olması, riskin kalıtımsal bileşenini göstermektedir⁴⁵. Monozigotik dizigotik ikizler konusunda prostat kanseri tanısı alan 1009 erkek üzerine yapılan çalışmada sırasıyla oranın %27.1 ve %7.1 olarak bulunduğu gösterilmiřtir⁴⁶.

2.3.1. Androjen Reseptör (AR) ve Steroid Hormon Metabolizma Genleri

Androjenler prostatın büyümesi ve gelişmesi için hayati olup prostat epitelinin bir sağkalım faktörü olarak çalıřırlar⁴⁷. AR geni prostatik hücredeki fizyolojik ve patolojik fonksiyonları sebebiyle büyük önem taşımaktadır. Androjen reseptörü steroid ve tiroid hormon reseptör geni süper ailesinin üyesidir. AR geni lokalizasyonu X kromozomu kısa

kolundadır (Xq11-12). Bu nükleer reseptör, hormonu sitoplazmada bağlayıp nükleusa aktarır. Nükleusda DNA bağlanması aşamasında dimerize olan hormon, androjene yanıt veren genin promotör bölgesine bağlanarak transkripsiyonel kompleks oluşturur⁴⁸.

Bu lokus insan genomunun en konservatif bölgelerinden bir tanesidir. Bu sebeple bu bölgede çok az sayıda mutasyon olmaktadır^{49,50}. Genin büyüklüğü 90 kb olup ve AR 918 aminoasit içermektedir. AR transaktivasyon, DNA bağlanma ve ligand bağlanma bölgeleri içermektedir. Ayrıca ligand bağımsız reseptör aktivasyonundan sorumlu bir aktivasyon bölgesi de bulunmaktadır. Reseptör aktivasyonundan sonra DNA zinciri (androjen sorumlu elementler) üzerindeki uygun hedef bölgeler üzerine etki oluşur ve sonuç olarak androjene-bağımlı genlerde (PSA, büyüme faktörleri EGFR, VEGF, IGF, KGF, ARA ve diğer birçok faktör) kodlanan bilgi ifadenir⁵⁰.

AR gen uzunluğundaki değişiklikler N-terminal ucundaki polimorfizmlerle belirlenmektedir. N-terminal transkripsiyonel aktive edici protein bölgesini kodlayan AR geninin ilk eksonu bir baz üçlüsü olan CAG'ın değişik uzunlukta tekrarını içerir ki bu sekans replikasyon sırasında DNA polimeraz kaymasına göre tipiktir. AR geni birinci eksonundaki CAG baz üçlüsü (poliglutamin) ve GGC baz üçlüsü (poliglisin) tekrar sayıları ve prostat kanser riski arasında ilişki bulunmaktadır⁶.

Poliglutamin tekrarının normal sayısı 8-35'dir ve birçok erkekte 21 tekrar bulunmaktadır. Poliglutamin uzamasını kodlayan CAG tekrarlarının uzunluğu ile AR transkripsiyon aktivitesinin arasında ters bir ilişki söz konusudur⁵¹⁻⁵³.

21'den az poliglutamin tekrarlarının daha kuvvetli bağlanma, AR'de uzun süreli hiperstimulasyona (Afroamerikalılarda 18, beyazlarda

21, Asyalılarda 22 tekrar) bağı olarak yüksek prostat kanser riski, hastalığın erken yaşlarda ortaya çıkması ve çok daha şiddetli seyretmesi ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Ters olarak poliglutamin tekrarlarını daha fazla sayıları (40'dan fazla olan) AR ve koaktivatöründe değişikliğe (düşük fertilité sonucuna götürebilen) yol açmaktadır. Glisin tekrar sayıları 10-30 arasında değişebilir ancak anormal tekrarların prostat kanseri üzerine etkisi poliglutamin zincir uzunluğunda olduğu kadar kanıtı sahip değildir⁵⁴⁻⁵⁸. Lokalize prostat kanserlerinde AR gen mutasyonları nadirdir (yaklaşık %1) ancak metastatik veya hormon dirençli prostat kanserlerinde %30-45 bulunmaktadır⁵⁹.

Androjen çekilmesine rağmen progresyon gösteren ileri evre prostat kanserlerinde AR dominant onkogen olarak etki etmektedir. Androjen seviyeleri kastre düzeyde olduğunda tümörlerin yaklaşık üçte birinde AR aktivitesi gen amplifikasyonu ile artmıştır⁶⁰⁻⁶⁴. AR ekspresyonu prostat kanserinin klinik süreci boyunca korunur ve en ileri evre androjen bağımsız hastalarda bile mevcuttur⁶⁵. AR aynı zamanda missens mutasyonlarla⁶⁶⁻⁷⁶ da aktive olabilir ki bu hormon spesifitesini genişletir ve/veya fazla miktarda hormon yanıtının olmasını sağlar⁷⁷⁻⁷⁹. İzole olgularda, CAG tekrarları mutasyonla etkilenmiştir ve androjen bağımsız prostat kanserinde ya kesilmiş veya fragmente olmuş tekrar sekansı mevcut olup reseptörün hiperaktivasyonuna neden olurlar⁸⁰⁻⁸².

Androjen bağımsız hastalığa, prostat kanserinde nadiren mutasyona uğrayan p160 ailesi üyeleri⁸³ ve β -katenin gibi koaktivatörlerin aktivasyonu eşlik edebilir. Bu koaktivatörler proteolitik yarıklanma⁸⁴ ile AR'yi aktifleştirip hücre içinde nükleusa kolokalizasyonuna neden olur ve hormon duyarlılığını artırır⁸⁶⁻⁸⁷. Muhtemelen androjenden bağımsız prostat kanserinde, AR aktivasyonuna neden olan MAP kinaz⁸⁸ ile fosforilasyon ve HER ailesi kinazları^{89,90} ile aktivasyon gibi başka mekanizmalar da bulunmaktadır.

2.3.2. Prostat Spesifik Antijen (PSA) Geni

AR, hedef genlerdeki düzenleyici bölgelerde bulunan androjen yanıt elementlerine (androgen response elements [ARE]) bağlanır. Bu hedef genlerden bir tanesi *PSA* genidir. *PSA* geni *KLK3* olarak da bilinir ve 19. kromozomun uzun koluna lokalize olmuştur. Bu gen kallikrein benzeri bir serin proteaz enzimi olan prostat spesifik antijeni (PSA) kodlar⁹¹. *PSA* prostat kanseri tanı belirleyicileri arasında çok yaygın olarak kullanılmaktadır.

PSA promoter proksimal bölgesi -170 bç'nde bulunan androjen yanıt elementi I (ARE I) ve -394 bç'nde bulunan ARE II içermektedir^{92,93}. Proksimal *PSA* promoter bölgesinde ARE I'de -158 pozisyonunda bulunan G/A transizyonu ve -252'de bulunan G/A transizyonu olmak üzere iki tek nükleotid polimorfizmi (SNPs) tanımlanmaktadır⁹³⁻⁹⁵. Bazı çalışmalarda bu polimorfizmin prostat kanseri gelişimi ve dolaşımdaki yüksek düzeyde *PSA* miktarları ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir⁹⁶⁻⁹⁸. Xue ve ark *PSA* serum düzeylerinin -158 genotipi ile ilişkili olduğunu yanı sıra AA genotipi olanların *PSA* serum düzeylerinin AG veya GG genotipi olanlardan daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir⁹⁶. Cramer ve ark. *PSA* promoter bölgesindeki genetik değişikliklerin serum *PSA* düzeyleri ile ilişkili olduğunu bildirmiştir⁹⁹.

PSA proksimal promoter -158 dışında -205 ve -252 pozisyonundaki polimorfizmlerin de *PSA* mRNA ifadenmesi, meme kanserli hastaların tümör-ekstrakt *PSA* konsantrasyonları veya prostat kanserli hastaların serum *PSA* düzeyleri ile ilişkili olabileceği ortaya konmuştur¹⁰⁰⁻¹⁰².

2.3.3. Kalıtsal Prostat Kanseri İle İlişkili Genler ve Lokuslar

Uluslararası Prostat Kanseri Genetik Konsorsiyum'u, meta-analizler hazırlamak ve araştırma verilerinin paylaşılması için sistematik bir organizasyon oluşturmuştur¹⁰³. Prostat kanseri ile ilişkili olduğu varsayılan bazı aday genler bildirilmiştir¹⁰⁴⁻¹⁰⁸ (Tablo 1).

Prostat kanseri ile ilişkili aday genler arasında en önemli gen HPC1 (Hereditary Prostate Cancer 1 - Kalıtsal Prostat Kanseri 1) lokusunda bulunan RNaseL'dir. Yanısıra diğer üzerinde çalışılanlar, HPC2 lokusunda bulunan ELAC2, 8. kromozomda bulunan MSR1, BRCA1, BRCA2 ve diğer HPCX, HPC20 genleridir¹⁰⁹. Prostat kanseri gelişimi ve ilerlemesi ile ilişkili haritalanan ve kronolojik olarak isimlendirilen birçok lokus (HPC1-HPC20, KLF6, PTEN, MAD1L1 gibi) tanımlanmıştır⁶.

Tablo1: Kalıtsal prostat kanseri gelişimi ile ilişkili genler⁶

Lokalizasyon	Aday Gen/Lokus	İlişki
1q25.3	RNaseL /HPC1	65 yaşından daha genç yüksek Gleason skor, tanıda ileri evre kanser, prostat kanseri ile kuvvetli ilişki, ailede 5'den fazla etkilenen erkek Apoptozis indüksiyonu ve enfeksiyona duyarlılığı etkiler
17p11	ELAC2	Fonksiyonu bilinmemekte
Xq27-28	HPCX	Etkilenmiş erkek kardeşi olan erkeklerde yüksek prostat kanseri riski
20q13	HPC20	Prostat kanseri tanısında daha yüksek yaş
8p22-23	MSR1	İnflamasyon başlangıcı; indüksiyon ve enfeksiyon sürecini etkiler
17q21	BRCA1	Genç erkeklerde daha sık
13q12-13	BRCA2	DNA tamirindeki fonksiyonlar

2.3.3.1. Hereditary Prostate Cancer 1 (HPC1) Geni

Prostat kanser gelişimi ile ilişkili en önemli lokus olduğu düşünülmektedir. Yüksek penetrasyonlu erken ailesel prostat kanserlerinin üçte birinde görülen bir lokusdur^{110,111}. 1q24-25 kromozomu üzerinde lokalize olmuştur ve 1q25.3 pozisyonunda endoribonükleaz kodlayan RNASEL geni bulunmaktadır. RNASEL, interferon ile indüklenen bir viral veya hücrel RNA parçalanma yolağına aracılık eden bir tümör supresör proteini adaydır.

Bu enzim organizmanın viral enfeksiyona immün yanıtı (tek zincirli RNA'nın IFN α ile degradasyonu), apoptozis indüksiyonu, hücre siklusu ve hücre diferansiyasyon regülasyonunda önemlidir. Otozomal dominant kalıtım RNASEL için tipiktir ve bu gen oldukça penetrandır. Bu mutant varyantı taşıyan, prostat kanser gelişiminde yüksek risk taşımaktadır. Bu şekilde predispozisyonu olan erkeklerde düşük yaş (<65), lokal ise daha ileri evre veya metastatik olacak şekilde daha agresif kanser (Gleason skora göre) bulunmuştur¹¹²⁻¹¹⁵.

Amerika ve İsveç'te prostat kanserli 91 aile üzerine yapılan genom analizi, %35 RNASEL lokusunda mutasyon saptamıştır. Yapılan çalışmalarda kalıtsal prostat kanserinde ailede 4'den fazla etkilenen erkek olduğu koşulda öneminin arttığı vurgulanmıştır. Ashkenazi Yahudileri'nde HPC1'de 4 bazlık delesyonun prostat kanseri için predispozan bir faktör olduğunu gösteren çalışma prostat kanseri ve RNASEL gen mutasyonu arasındaki ilişkiyi desteklemektedir¹¹⁶; ancak Afroamerikalarda yapılan çalışmalar bu ilişki konusunda bir kesinlik ortaya koymamaktadır¹¹⁵⁻¹¹⁸.

HPC1 lokusundaki diğer aday genler siklin-bağımlı kinaz PCTAIRE, protoonkogen TRK ve insan laminin B2 genidir. Bu genlerin

fonksiyon kaybı veya yokluğuyla ilişkili mutasyonlar prostat kanser gelişimini arttırmaktadır⁶.

2.3.3.2. Hereditary Prostate Cancer 2, X ve 20 (HPC2, X ve 20) Geni

17p11 kromozomu üzerinde bulunan HPC2 de prostat kanseri ile ilişkisi olan bir lokus olarak düşünülmektedir. Bu lokusta bulunan genin ElaC homolog protein 2 veya Zn-fosfodiesteraz proteinini kodladığı belirlenmiştir. Ancak mutasyon ve polimorfizm arasındaki direkt ilişki kanıtlanmamıştır^{119,120}. HPCX, X kromozom üzerinde bulunan birkaç lokustan biridir ve Xq27-28 pozisyonundadır; kalıtsal prostat kanseri ile ilişkili olması muhtemeldir. Herediter karsinomların %16'sından sorumlu olduğu düşünülmektedir¹²¹⁻¹²². HPC20 ise kromozom 20q13 üzerindedir; ileri yaşta prostat kanseri tanısı alan erkeklerde rol oynayabileceği düşünülmektedir¹²³.

2.3.3.3. Macrophage Scavenger Receptor 1 (MSR 1) Geni

Tümör supresör genlerin lokalizasyonu karakteristik olarak 8. kromozomun kısa kolundadır. Bu genlerin inaktivasyonu sadece prostatta değil aynı zamanda akciğer, karaciğer, bağırsakda da karsinogenezle ilişkilendirilebilir. MSR1 biyolojik fonksiyonu yabancı hücre ve makrofaj, hücre adezyonu ve fagositoz arasındaki ilişkinin modülasyonudur. Oksidatif hasar aynı zamanda MSR1 geninin inaktivasyonuna bağlı olarak azalmış makrofaj aktivitesine bağlı olarak da artabilir. MSR1, 8p22'de yer almaktadır ve oksidize düşük dansiteli lipoprotein de dahil olmak üzere birçok polianyonik ligandları bağlayan hücre yüzeyi reseptörünü kodlamaktadır^{124,125}. Bunun sonucunda MSR1 fonksiyonunun kaybı azalmış makrofaj özelliklerine bağlı olarak prostat ve diğer organları oksidatif strese açık bırakmaktadır. Çalışmalarda MSR1'in mikrobik

mutasyonları ve polimorfizmleri, ailesel özellikli erken başlangıçlı prostat kanseriyle ilişkili bulunmuştur¹²⁶⁻¹²⁸. Reseptör bütünlüğü üzerinde dominant negatif etkileri bulunan bir proteini kodlayan MSR1'deki bir "truncating" mutasyon, prostat kanserli Afroamerikalılarda rastlanmıştır¹²⁹. MSR1 prostat epitel hücrelerini direkt olarak etkilemediğinden ama oksidatif hasar için predispozan olduğundan pozitif olduğu çalışmalarda bile LOD değeri düşük çıkmaktadır¹³⁰. Meta-analiz verileri MSR1 ve kalıtsal prostat kanseri arasında net bir bağlantı ortaya koyamamışlardır¹³¹.

2.3.3.4. BRCA1 ve BRCA Genleri

Kadınlardaki meme ve over kanser genetik predispozisyonunun araştırılması için kullanılan BRCA 1 ve 2 gen mutasyonlarının kalıtsal prostat kanserinde de büyük riskle ilişkili olduğu ortaya konulmuştur⁶.

2.3.4. Prostat Kanseri ile İlişkili Diğer Genler

Sitogenetik veriler eşliğinde prostat epitel hücrelerinin transformasyonu ile ilişkili prostat kanserlerinin belirgin bir bölümünde bir kısım tümör süpresor genler ve bir potansiyel onkogen ailesi tanımlanmıştır (Tablo 2).

Tablo 2: Prostat kanser sitogenetiği ile ilişkili genler¹³²

Lokus	Gen	İlişki
8p21	NKX3.1	Prostat epitel büyüme ve diferensiasyonunu düzenleyen prostat spesifik homeoprotein
10q23	PTEN	Fosfatidilinositol 3 kinaz yolunu negatif olarak regüle eden lipid fosfataz
12p11-13	CDKN1B	Hücreye bağlı bir kinaz olan P27 inhibitörü (Cip/Kip)
16p22	ATBF1	Hücre siklusu düzenleyicisi
10p15	KLF6	Kruppel benzeri çinko parmaklar transkripsiyon faktörü
(21q22.3) ve (7p21.2)	ERG ve ETV1	ETS transkripsiyon faktörleri

NKX3.1 prostata spesifik ekspresyonu olan bir homeobox gen olup, 8p21 bölgesinde yer alır ve prostat kanserlerinin %85'inde bu bölgede heterozigozite kaybı görülmektedir¹³³. NKX3.1 ekspresyonunun tam kaybı ise prostat kanserinde tümör progresyonu ile birlikte dir¹³⁴.

PTEN fosfataz ve tensin homologudur. 10q23 de bulunan ve prostat kanserlerinde delesyon ve baskılanmaya uğrayan bir tümör supresör gen dir^{135,136}. PTEN ekspresyonunun kaybı geç evre ve yüksek dereceli prostat tümörlerde daha sıklıkla görülür¹³⁷. Primer prostat kanserlerinin yalnızca küçük bir bölümünde PTEN delesyonu veya mutasyonu olmasına rağmen, metastatik lezyonların yarısından fazlasında PTEN gen değişiklikleri mevcuttur¹³⁸. NKX3.1 ve PTEN kaybının birlikte olması PTEN in tek başına yokluğundan daha agresif seyreden kansere neden olur¹³⁹.

CDKN1B siklin bağlı kinaz inhibitörü olan ve Cip/Kip ailesine üye bir hücre siklusu inhibitörüdür. İnhibitör p27'nin tasarlanmış modellerde tümör baskılayıcı özellikleri olduğu gösterilmiştir¹⁴⁰. PTEN ve CDKN1B alellerinin prostat kanserinde birlikte ayrıştıkları ve ikisinin prostat kanseri riskini arttırdığı önerilmiştir¹⁴¹.

ATFB1 prostat kanserinde son zamanlarda, bir hücre siklusu, aktif proteini kodlayan bir başka gen olarak tanımlanmıştır. ATFB1 16q22'de lokalizedir ve heterozigozite için bir hedefdir. Yanısıra tümörlerin %36'sında yanlış anlamlı mutasyonlar olup, büyük olasılıkla protein fonksiyonunu inaktive etmektedirler¹⁴². ATFB1, çoklu bir homodomain transkripsiyon faktörü olup MYB onkoproteini ile ilişkilidir¹⁴³.

KLF6 Kruppel benzeri çinko parmak transkripsiyon faktörü 6 10p15'de lokalizedir ve prostat kanseri örneklerinin beşte birinde heterozigositesinde kayıp mevcuttur¹⁴⁴. KLF6'nın nokta mutasyonları ve azalmış protein ekspresyonu yüksek dereceli prostat kanserlerinin küçük bir kısmında görülmekte olsa da ikincil küçük serilerde gözlenmemektedir¹⁴⁵.

ERG ve ETV1, ETS transkripsiyon ailesinden olup, arşive alınmış gen ekspresyon profillerinden yapılmış yeni bir çalışmada prostat kanseri dokularının belirgin bir bölümünde artmış ekspresyonu gözlenmiştir. ERG veya ETV1'in artmış ekspresyonu hem primer hem de metastatik hastalıkta hemen hemen aynı oranda görülse de, PIN de gözlenmez ve bu ETS faktörünü etkileyen translokasyonların invazif hastalığın erken dönemlerinde etkili olduğunu düşündürmektedir¹⁴⁶.

2.4. Proteomik

Proteomik ve proteom terimleri 1995'de ortaya konmuştur¹⁴⁷. Karmaşık ve fazla miktarda olan genom dizi analizi verilerinden sonra ortaya çıkmıştır. Belli bir zamanda, belli bir hücrede, belli bir dokuda, belli bir organizmada bulunan gereken tüm biyokimyasal tepkimeleri yürüten proteinlerin tamamına proteom denir. Proteomik, belli bir organizmada bulunan proteinlerin toplamını incelemek için kullanılan yöntemlerin

tümüdür. Proteomik analizi vital veriler sağlar çünkü proteinlerin direkt etkisini ortaya koyar¹⁴⁸. Proteomikler belirli bir hücre içindeki tüm veya seçilen proteinlerin tanımlanmasına ve protein ağındaki bilgi akışına olanak sağlar¹⁴⁹. Proteomik ifadeleneşinin belirlenmesinde bazı teknikler sıkça kullanılmaktadır¹⁴⁷⁻¹⁵⁴.

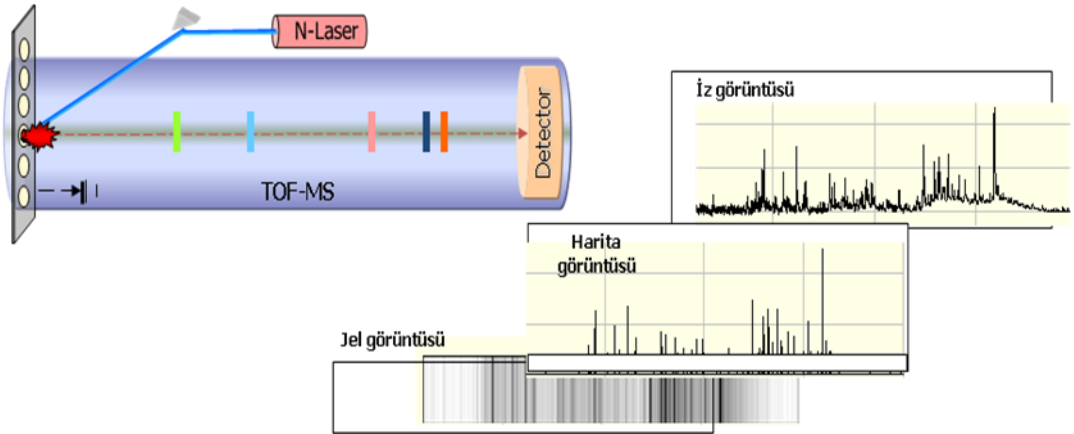
Proteomik çalışmalarda sıkça kullanılan yöntemler:

- ELISA
- İki yönlü elektroforez (2D-PAGE)
- Doku ve protein çip teknolojisi (mikroarray)
- Kütle spektrometresi
 - MALDI-TOF MS (Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight Mass Spectrometry)
 - SELDI-TOF MS (Surface enhanced laser desorption/ionization time-of-flight Mass Spectrometry)
- Kantitatif kütle spektrometresi
- Lazer yakalama mikrodiseksiyon [Laser capture microdissection (LCM)]
- Protein-protein, protein-DNA bağlanma reaksiyonları için afinite kromatografi, floresans rezonans enerji transferi (FRET)
- Peptid ve proteinlerin üç boyutlu incelenmesi
 - X- ışını kristalografi, nükleer manyetik rezonans

2.4.1. Surface enhanced laser desorption/ionization time-of-flight (SELDI-TOF) MS (Yüzey etkisi arttırılmış lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi)

1990'ların başında T. William Hutchens ve Tai-Tung Yip tarafından geliştirilmiştir. Gaz haline gelmeyen bileşiklerin desorpsiyon/iyonizasyon yöntemi ile çalışılmasında örneği sunan yüzey çalışılan örneğin yapısal modifikasyon, amplifikasyon ve/veya

iyonizasyonunda aktif rol oynar. Dakikalar içinde çalışılan örneğin alt proteomları protein parmak izi gibi görüntülenebilir (Şekil 6). Çok yüksek çıktılı veriler dakikalar içinde oluşur. Geniş grup çalışmaları için birkaç saatte sonuç alınırken 2D-PAGE’de aynı çalışma günler almaktadır¹⁵¹.



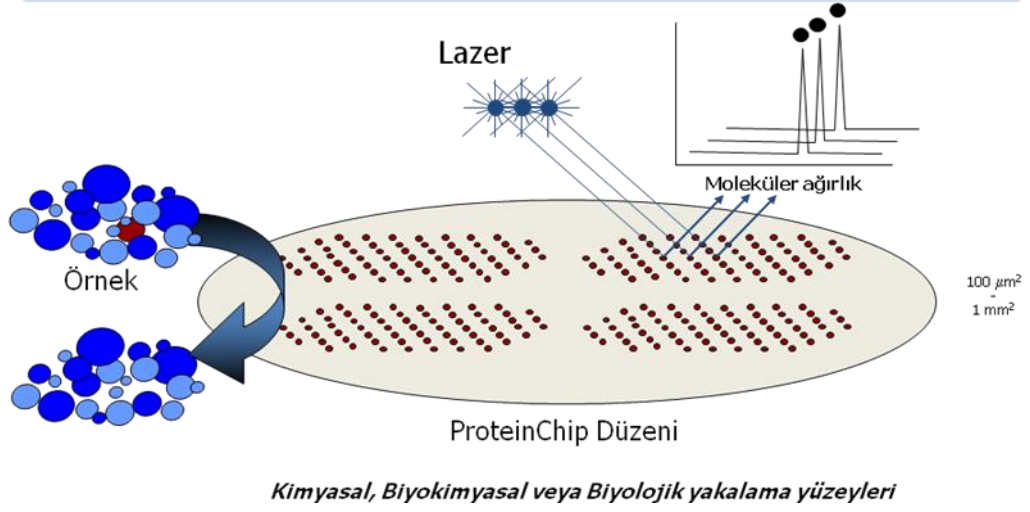
Şekil 6: SELDI-TOF içinde proteinlerin ayrıştırılması ve protein parmak izinin çıkarılması.

SELDI-TOF teknolojisi biyoçip üzerinde kimyasal olarak modifiye edilmiş yüzeye, selektif olarak adsorbe edilen ilgili proteinlerin affinite-esaslı kütle spektrometrik yöntemle analiz edilmesidir (Şekil 7). Bu teknoloji duyarlı ve yüksek bir verimde kompleks biyolojik örneklerin protein profillerine ulaşmayı sağlar.

ProteinChip® Teknolojisi

ProteinChip Düzeni ve SELDI-TOF-MS Saptama

1. Örnek doğrudan protein çipine konur.
2. Proteinler çip üzerinde yakalanır ve tutulur (affinite yakalanması)
3. Yüze Surface-Enhanced Laser Desorpsiyon/Iyonizasyon (SELDI) ile okunur.
4. Yakalanan proteinler doğrudan çip üzerinde işleme alınır.



Şekil 7: SELDI-TOF teknolojisi

Bugün proteomiklerle yapılan çalışmalarda birçok kanser türlerinin erken tanısı ile ilgili olarak sağlıklı ve kanserli hastaların protein bantları karşılaştırılarak birden fazla tümör belirleyici bantlar tespit edilmiş ve değişik bilgisayar karar ağaçları oluşturularak test duyarlılık ve özgüllükleri arttırılmıştır¹⁴⁸. Klinik proteomik yaklaşımları arasında SELDI-TOF birçok kanser tipinin serum esaslı saptama ve ayırımında başarılı bir yöntem olarak görülmektedir. Yapılan çalışmalar, tüm kanser hastalarında %93-97 duyarlılık, kontrollerde %91-100 özgüllük (bootstrap cross validation) gösterdiğini ortaya koymaktadır^{148,155}.

Bu çalışmada prostat kanser proteomik araştırılmasında, protein profillerinin belirlenebilmesi için SELDI-TOF kütle spektrometre yönteminden yararlanılmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araç ve Gereçler

3.1.1. Cihazlar

- Otomatik ısı döngü cihazı (Applied Biosystems, ABD)
- Otomatik DNA dizi analiz cihazı (Applied Biosystems, ABD)
- SELDI-TOF MS (Surface enhanced desorption and ionization time of flight, mass spectrometry - Yüzey etkisi artırılmış lazer desorpsiyon/iyonizasyon kütle spektrometresi BioRAD, ABD)
- Spektrofotometre (NanoDrop ND-1000) (Thermo Scientific, ABD)
- Kuru blok ısıtıcı (heater) (Boeko, Almanya)
- Mikrosantrifüj (Hettich Zentrifugen, ABD)
- Vorteks (MS2 IKA, Almanya)
- Karıştırıcı (MS2 IKA, Almanya)
- Hava akım kabini (Laminar flow, Nuair, ABD)
- Elektroforez güç kaynağı (Consort, Belçika)
- Elektroforez tankı (Consort, Belçika)
- UV Transilüminatör ve jel görüntüleme sistemi (Syngene Ingenius Bioimaging, ABD)
- Hassas terazi (Libror Shimadzu, Japonya)
- Manyetik karıştırıcı
- pH metre
- Otomatik pipetler(0.1-10, 10-100, 100-1000 µl) (Eppendorf, Almanya)
- Etüv (Nüve, Türkiye)
- Otoklav (Sanyo, Japonya)
- Derin dondurucu (-80°C) (Nuair, ABD)
- Buzdolabı (Arçelik, Türkiye)
- Mikrodalga fırın (Whitewestinghouse, ABD)

3.1.2. Kitler

- Proteomik inceleme kiti (Invitek, Almanya)
- Peptid protein standart kiti (Invitek, Almanya)
- Parafin blok ekstraksiyon kiti (Quiagen, Almanya)
- DNA saflaştırma kiti (Invitek, Almanya)
- BigDyeR terminator V3.1 dizi analizi kiti (ABI, ABD)

3.1.3. Sarf Malzemeler

- Protein Chip IMAC 30 Array (Immobilized Metal Affinity Capture) (BioRAD, ABD)
- Eppendorf tüp (0.2, 0.5, 1.5 ml) (Citotest, Çin)
- Pipet ucu (10, 100, 1000 µl) (Eppendorf, Almanya)

3.1.4. Kimyasal Maddeler

- Primerler (Metabion, Almanya)
- Hot start Ampli Taq (Bioneer, Kore)
- Taq DNA polimeraz (Fermentas, Litvanya)
- PZT tamponu (Fermentas, Litvanya)
- dNTP karışımı (Fermentas, Litvanya)
- MgCl₂ (Fermentas, Litvanya)
- Nla III restriksiyon enzimi ve tamponu (Biolabs, ABD)
- Nhe I restriksiyon enzimi ve tamponu (Bioron, Almanya)
- Mbo I restriksiyon enzimi ve tamponu (Bioron, Almanya)
- Gene Scan - 500 Rox size standart (Applied Biosystems, ABD)
- POP 4 Polimer (Applied Biosystems, ABD)
- POP 6 Polimer (Applied Biosystems, ABD)
- Formamide (Applied Biosystems, ABD)

- Agaroz (Sigma, ABD)
- Trizma Baz (Sigma, ABD)
- Borik Asit (Sigma, ABD)
- Etilendiamintetraasetikasit (EDTA) (Sigma, ABD)
- Yükleme tamponu (Fermentas, Litvanya)
- 100 bç'lik moleküler ağırlık belirteci (Seegene, Kore)
- Etidyum Bromür (Sigma, ABD)
- Sodyum asetat (Carlo Erba, İtalya)
- Etanol (Riedel de Haen, Almanya)

3.2. Çözeltilerin Hazırlanışı

3.2.1. 5X Tris Borat EDTA (TBE) Çözeltisi Hazırlanışı

Trizma Baz 54 g

Borik Asit 27.5 g

0.5 M EDTA (pH: 8) 20 ml

Kimyasallar çözüldükten sonra 1 litre olacak şekilde üzerine distile su eklendi.

3.2.2. 1X TBE Çözeltisi Hazırlanışı

200 ml 5X TBE, distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

3.2.3. 0.5M EDTA Çözeltisi Hazırlanışı

186.1 g disodyum EDTA tartıldı. 800 ml distile su içerisinde çözüldü. NaOH ile pH 8 olacak şekilde hazırlandı.

3.2.4. Stok Etidyum Bromür Çözeltisi Hazırlanışı

10 mg etidyum bromür 1 ml distile suda çözülerek hazırlandı.

3.2.5. 3M Sodyum asetat (NaOAc) Çözeltisi Hazırlanışı

NaOAc \cdot 3H₂O 0.04 g

80 ml distile suda çözüldükten sonra, glisial asetik asit ile (pH:4.6)'ya ayarlanarak hacim 100 ml'ye tamamlandı.

3.3. Agaroz Jel Hazırlanışı

%2'lik agaroz jel hazırlamak için 2 g agaroz hassas terazide tartıldı. 1X TBE çözeltisi ile 100 ml'ye tamamlandı. Mikrodalga fırın kullanılarak kaynatıldı. Agarozun homojen bir şekilde eritilmesinden ve sıcaklık 60°C' ye düştükten sonra elektroforez tepsisine döküldü. Jel donduktan sonra yatay elektroforez tankına yerleştirildi. Jelin üzerini örtecek şekilde 1X TBE çözeltisinden eklendi.

3.3.1 Jel Boyasının Hazırlanması

100 ml 1X TBE çözeltisi içinde 10 ml etidyum bromür solüsyonu hazırlandı.

3.3.2. Orange G Jel Yükleme Boyası Hazırlanışı

Gliserol 55 ml

Orange G 100 mg

1X TBE çözeltisi 45 ml karıştırılarak çözülür.

3.4. Yöntemler

Çalışma iki bölümde gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın birinci bölümünde proteomik analizler, ikinci bölümünde ise moleküler genetik analizler yapılmıştır.

3.5. Proteomik Analizler:

3.5.1. Çalışma Grubu ve Klinik Özellikler:

Bu çalışmaya Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Kliniği'ne başvuran BPH, prostat kanseri hastaları ve sağlıklı kişilerden oluşan kontrol grubu dahil edilmiştir.

Çalışmanın protein profil analizi ile ilişkili olan kısmını 50 BPH, 47 prostat kanseri hastası, 20 radikal prostatektomi sonrası PSA değeri 0 olan hasta ve 20 sağlıklı kişilerden oluşan kontrol grubu oluşturmuştur. Çalışmaya dahil edilen kişilerden kan örnekleri alınarak ayrılan serum örnekleri 100µl hacimlerde çalışılana kadar -80°C'de saklanmıştır. Prostat kanseri hasta grubunda yaş aralığı 52-76 olup, yaş ortalaması 61 ± 0.3 'dür. BPH hasta grubunda yaş aralığı 50-77 olup, yaş ortalaması 62 ± 0.2 'dir. Radikal prostatektomi sonrası PSA değeri 0 olan hasta grubunda yaş aralığı 51-72 olup, yaş ortalaması 59 ± 0.4 'dür. Sağlıklı kişilerden oluşan kontrol grubunda yaş aralığı 25-30 olup, yaş ortalaması 28 ± 0.65 'dir. Çalışma grubunun demografik özellikleri Tablo 3'de verilmiştir.

Çalışmanın genomik analizi ile ilişkili olan kısmında, retrospektif elde edilen prostat kanser ve benign prostat hipertrofisi parafin blok örnekleri Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'ndan alınmıştır. Çalışmaya 43 prostat kanseri hastası ve 44 benign prostat hipertrofisi dahil edilmiştir.

Tablo 3: Çalışma grubunun demografik özellikleri.

	PSA 0-10 (ng/ml) Arası Olan Hastalar (N=47)	PSA 0 Olan Hastalar (N=20)	Kontrol (BPH) (N=50)	Sağlıklı Kontrol (N=20)
Yaş Ortalama	61±0.3	59 ±0.4	62±0.2	28±0.65
Yaş Aralığı	(52-76)	(51-72)	(50-77)	(25-30)
Klinik evre (cTNM)				
Grup I (cT1a- cT1c)	32	-	-	-
Grup II (cT2a- cT2c)	15	-	-	-
Grup III (cT3a- cT4)	-	-	-	-
Lenf nodu metastazi				
N0	-	-	-	-
Metastaz				
M0	-	-	-	-
Patolojik grade (GS)				
7	44	-	-	-
≥7	3	-	-	-
PSA Ortalama (ng/ml)	5.75	-	6.24	0.3
Serbest PSA Ortalama (ng/ml)	1.04	-	1.29	-

Bu çalışma için Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurulu'ndan 16.06.2006 tarihli ve 220 sayılı etik kurul onayı alınmıştır.

3.5.2. Protein Profil Analizi: SELDI TOF (Surface Enhanced Desorption and Ionization Time of Flight) Tekniği ile Proteomik Çalışması

3.5.2.1. SPA Matriks (EAM- Energy Absorbing Molecules, Enerji absorbe eden moleküller) Hazırlanması

- SPA matriks tüp içine 150 µl %1 Trifluoroasetik asit (TFA) ve 150 µl %100 asetonitrol (ACN) eklendi.

- 5 dakika düşük hızda vortekslenip, 1 dakika 12.000 rpm'de santrifüj edildi.

3.5.2.2. CHCA Matriks (EAM- Energy Absorbing Molecules,

Enerji Absorbe Eden Moleküller) Hazırlanması

- CHCA matriks tüp içine 500 µl %1 Trifluorasetik asit (TFA) ve 500 µl %100 asetonitrol (ACN) eklendi.
- 5 dakika düşük hızda vortekslenip, 1 dakika 12.000 rpm'de santrifüj edildi.

3.5.2.3. Protein ve Peptid Standartlarının Hazırlanması

Proteomik inceleme kiti içinde bulunan protein standartı 25 µl 20 mM amonyum asetat ile kuvvetlice karıştırıldı. Bu karışımdan 2 µl'lik hacimler -20°C'de çalışılana kadar saklandı.

Protein standardının kalibrasyon için kullanımı: 2 µl eritilen protein kalibrasyon standartı 4 µl sature SPA matriks ile karıştırıldı. Protein standart kalibrasyonu için 1 µl karışım IMAC 30 bakır çip üzerine uygulandı.

Proteomik inceleme kiti içinde bulunan 50 µl peptid standartı üzerine 1.5 ml tüp içinde 100 µl %5 TFA, 100 µl % 100 ACN, 200 µl 20mM amonyum asetat eklendi ve kuvvetlice karıştırıldı ve oda ısısında 5 dakika inkübe edildi. 5 µl hacimlerde -20°C'de saklandı.

Peptid standardının kalibrasyon için kullanımı: 2 µl eritilen peptid standartı 10 µl CHCA matriks ile karıştırıldı. Peptid standart kalibrasyonu için 1 µl karışım IMAC 30 bakır çip üzerine uygulandı.

3.5.2.4.Örneklerin Hazırlanması

- -80°C'de saklanan serum örnekleri çalışma başlamadan önce oda ısısında bekletilerek eritilmiştir. Üretici firma önerileri doğrultusunda aşağıdaki çalışma basamakları gerçekleştirilmiştir.
- 20 µl serum örneği 30 µl Chaps tamponu 1 ile karıştırıldı, 10 dakika +4°C'de soğutuldu.
- Soğutulan örnekler üzerine 100 µl PBS tamponu eklendi. Çip hazırlanana kadar oda ısısında bekletildi.

3.5.2.5. Çipin Hazırlanması (Çip Aktivasyonu)

- 20 µl Aktivasyon Tampon C çipin yüzeyine eklendi. 5 dakika oda sıcaklığında çalkalanarak inkübe edildi. Bu işlem 2 kere tekrarlandı.
- İnkübasyon süresi sonunda çip yüzeyindeki sıvı boşaltıldı.
- Çipin yüzeyi 10 kez 100 µl deiyonize su ile yıkandı.
- Çip yüzeyindeki sıvı boşaltıldı. Çipin yüzeyine 20 µl Nötralizasyon Tampon E eklendi. 5 dakika oda sıcaklığında çalkalanarak inkübe edildi.
- İnkübasyon süresi sonunda çip yüzeyindeki sıvı boşaltıldı.
- Çipin yüzeyi 10 kez deiyonize su ile yıkandı.
- Çip yüzeyindeki sıvı boşaltıldı. Çipin yüzeyine 200 µl PBS tamponu eklendi. 5 dakika oda sıcaklığında çalkalanarak inkübe edildi.
- İnkübasyon süresi sonunda çip yüzeyindeki sıvı boşaltıldı.

3.5.2.6.Örneklerin Çipe Yüklenmesi

- Hazırlanan örneklerin 50 µl'si IMAC 30 bakır protein çipe yüklendi.
- 30 dakika oda sıcaklığında karıştırıcıda sallayarak inkübe edildi. Takiben üzerindeki sıvı boşaltıldı.

- Çip 3 kez 100 µl PBS tamponuyla, ardından 3 kez deiyonize su ile yıkandı.
- Yıkamalar sonrasında çip kurumaya bırakıldı.
- Çipin yüzeyi kuruduktan sonra önceden hazırlanan 2 µl SPA matriks eklendi.
- Çip karanlık ortamda kurumaya bırakıldı.
- Çipin yüzeyi tamamen kuruduktan sonra çip yüzeyine bağlanan proteinler protein çip okuyucusu SELDI-TOF MS cihazında değerlendirildi.

3.5.2.7. SELDI-TOF MS ile Protein Profillerinin Değerlendirilmesi

- Veriler ortalama 80 lazer vuruşundan sonra 240 yoğunlukta 8 detektör duyarlılığında değerlendirildi¹⁵⁶.
- Gruplar arasındaki karşılaştırmalar SELDI-TOF MS cihazında bulunan yazılım programı Proteinchip Data Manager Software (Biorad, USA) ile yapıldı.

3.6. Moleküler Genetik Analizler:

Çalışmanın bu bölümünde AR CAG tekrarları, PSA, RNASEL genlerindeki polimorfizmlerin moleküler genetik analizi yapılmıştır.

3.6.1. Parafin Bloklardan Genomik DNA Eldesi:

- Örnek bloklarındaki parafin fazlalıkları bistüri yardımıyla temizlendi.
- 5-10 µm kalınlıkta kesitler alındı.
- Kesitler hemen 1.5-2 ml mikrosanrifüj tüplerine alındı ve üzerine 1 ml ksilen eklendi. Kapağı kapatılıp 10 saniye vortekslendi.
- Oda ısısında maksimum hızla 2 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant pipetlenerek atıldı.

- Pellete 1 ml etanol (%96-100) eklendi, vorteksle karıştırıldı.
- Oda ısısında maksimum hızla 2 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant pipetlenerek atıldı.
- Tüpler 10 dakika oda ısısında etanol tamamen buharlaşmaya kadar inkübe edildi.
- Pellet 180 µl ATL tamponu ile süspansiyon edildi, 20 µl proteinaz K eklendi ve vortekslenerek karıştırıldı.
- 1 saat 56°C'de inkübe edildi.
- 1 saat 90°C'de inkübe edildi.
- Kapakta biriken damlalar için kısa süreli santrifüjlendi.
- Örneğe 200 µl AL tamponu eklendi, vortekslenerek karıştırıldı ve 200 µl etanol eklenerek tekrar karıştırıldı.
- Kapakta biriken damlalar için kısa süreli santrifüjlendi.
- Oluşan lizat dikkatlice QIAamp MinElute kolonlarına aktarıldı, kapak kapatılıp 6000 x g (8000 rpm) hızla 1 dakika santrifüj edildi. QIAamp MinElute kolonu 2 ml'lik temiz bir tüpe aktarıldı.
- QIAamp MinElute kolonu dikkatlice açıldı üzerine 500 µl AW1 tamponu eklendi. Kapak kapatılıp 6000 x g (8000 rpm) hızla 1 dakika santrifüj edildi. QIAamp MinElute kolonu 2 ml'lik temiz bir tüpe aktarıldı.
- QIAamp MinElute kolonu dikkatlice açıldı üzerine 500 µl AW2 tamponu eklendi. Kapak kapatılıp 6000 x g (8000 rpm) hızla 1 dakika santrifüj edildi. QIAamp MinElute kolonu 2 ml'lik temiz bir tüpe aktarıldı.
- Maksimum hızda (20,000 x g; 14000rpm) 3 dakika santrifüj edildi ve membran tamamen kurumaya bırakıldı.
- QIAamp MinElute kolonu 1,5 ml'lik temiz bir tüpe yerleştirildi ve QIAamp MinElute kolonu dikkatlice açıldı. Membranın ortasına 20-100 µl ATE tamponu eklendi.

Tablo 4: PZT ürünlerinin uzunlukları ve tekrar sayıları

PZT ürünü (bp)	Tekrar sayısı
261	13
264	14
267	15
270	16
273	17
276	18
279	19
282	20
285	21
288	22

3.6.2.2. AR Geni Ekson 1'deki (CAG)_n Tekrarları İçeren

Bölgenin Tepkime Karışımı

PZT tepkimesi karışımını hazırlamak için 1.5 mM MgCl₂, 20 µM dNTP, 20 pmol/µl her primerden, 1.0 U/µl Taq DNA polimeraz enzimi ve PZT tamponu kullanıldı. PZT karışımı ince çeperli 0.2'lik tüplere dağıtıldıktan sonra saflaştırılan genomik DNA eklendi. PZT tüpünde son hacim 25 µl olup içeriği Tablo-5'de verilmiştir.

Tablo 5: AR geni ekson 1'deki (CAG)_n tekrarları içeren bölgenin tepkime karışımı

Karışım	Stok	Final konsantrasyon	Toplam : 25µl
dH ₂ O	-	-	17.2 µl
PZT tamponu	10x	1x	2.5 µl
MgCl ₂	25 mM	1.5 Mm	1.5 µl
	10 mM	20 µM	0.2 µl
dNTP			
Primer F	100 pmol/µl	20 pmol/µl	0.2 µl
Primer R	100 pmol/µl	20 pmol/µl	0.2 µl
Taq DNA polimeraz	5 U/µl	1.0 U/µl	0.2 µl
DNA	-	-	3 µl

3.6.2.3. AR Geni Ekson 1'deki (CAG)n Tekrarlarını İçeren Bölgenin PZT Programı

Başlangıç ayrılma işlemi için 94°C'de 5 dk bir döngü bunu takiben aşağıda belirtilen program ayarlanarak 30 döngü ve son uzama için ise 72°C'de 5 dk bir döngü olacak şekilde PZT tepkimesi gerçekleştirildi.

Ayrılma	94°C'de 30 sn	}	30 döngü
Primer bağlanması	62°C'de 1dk		
Uzama	72°C'de 1dk		

Program sonunda hedef DNA bölgesi çoğaltılmış oldu.

3.6.2.4. AR Geni Ekson 1'deki (CAG)n Tekrarlarını İçeren PZT Ürünlerinin Analizi

PZT ürünlerinin analizi agaroz jel elektroforez yöntemi ile gerçekleştirildi. Agaroz jel elektroforezi için hazırlanan kimyasal karışımların içerikleri belirtilmiştir. Bu bölge için %2'lik agaroz jel hazırlanmıştır.

3.6.2.5. AR Geni Ekson 1'deki (CAG)n Tekrarlarının Analizi

Herbir örnek için aşağıda belirtilen oranlarda fragment karışımı ayrı ayrı hazırlandı. Fragment uzunluklarının belirlenmesinde internal standard olarak GeneScan-500 ROX kullanıldı. Bu karışım uzunlukları 35 ve 500 arasında değişen (35, 50, 75, 100, 139, 150, 160, 200, 250, 300, 340, 350, 400, 450, 490, 500) 16 adet ROX işaretli tek zincirli DNA fragmanını içermektedir. Sıcaklık 80°C'ye geldikten sonra tüpler PZT cihazına yerleştirildi. 5 dk denatüre edildikten sonra -20°C'de 2

dk bekletildi. Tüpler otomatik DNA dizi analizi sistemine yerleştirildi. Tablo 6'da fragment analiz karışımı ve miktarları gösterildi.

Tablo 6: AR geni ekson 1'deki (CAG)n tekrarlarına ait fragment analizi karışımı

Karışım	Toplam: 21.5 µl
Formamid	20 µl
ROX işaretli size Standard	0.5 µl
FAM işaretli PZT ürünü	1 µl

Örnekler 32 dk 60⁰C'de yürütüldükten sonra, GENESCAN v. 3.0 programı kullanılarak analiz edildi.

3.6.2.6. Döngüsel DNA Analizi Yöntemi ile AR Geni Ekson 1'deki (CAG)n Tekrar Sayılarının Doğrulanması

Fragment analizi yöntemi ile TA tekrar sayıları belirlenen örneklerden her iki allelinde de tekrar sayıları eşit olanlar, sonuçların doğrulanması amacıyla DNA dizi analizine tepkimesine alındı.

Daha önceden çoğaltılmış olan örneklerle ait PZT ürünleri Invisorb Spin PCRapid Kit kullanılarak saflaştırıldı.

1-2 ml'lik ependorf tüpüne filtre yerleştirdi.

2-PZT tüpüne 130 µl tampon fosfat eklendi. Karışım filtreye aktarılıp 1 dk bekletildi.

3-30 sn 10.000 x rpm de santrifüj edildi. Çökelti kısmı atıldı.

4-700 µl yıkama çözeltisi filtrenin üzerine eklenip, 30 sn 10.000 x rpm de santrifüj edildi.

5-Çökelti kısmı atıldı. Filtre aynı ependorf tüpüne tekrar yerleştirilip, 3 dk 14.000 x rpm de kalan yıkama çözeltisi uzaklaştırılması için santrifüj edildi.

6-Filtre yeni 1.5 ml'lik ependorf tüpüne aktarıldı. 20 µl örnek seyrelti çözeltisi filtreye yüklendi. 3 dk oda sıcaklığında bekletildi.

7-1 dk 10.000 x rpm de santrifüj edildi. Filtre atıldı. Böylelikle çökeltideki PZT ürünü kontrol amaçlı saf halde elde edildi.

3.6.2.7. Saflaştırılan PZT Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezinde Analizi

Saflaştırılan PZT ürünlerinin analizi agaroz jel elektroforez yöntemi ile gerçekleştirildi. %2'lik agaroz jele örneklerden 5µl yüklenerek PZT ürünleri kontrol edildi.

3.6.2.8. Döngüsel DNA Dizi Analizi Tepkime Karışımı

AR geni, (CAG)_n tekrarlarını içeren gen bölgesinin döngüsel dizi analizi tepkimesi BigDyeR Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit ve ona ait protokol kullanılarak gerçekleştirildi. DNA dizi analizi tepkimesi için kullandığımız primer dizisi aşağıda gösterilmiştir. DNA dizi analizi amplifikasyon karışımı Tablo 7'de verildi.

AR-CAGR; 5' GCTGTGAAGGTTGCTGTTCCCTCAT-3'

Tablo 7 : DNA dizi analizi amplifikasyon karışımı

dH ₂ O	7.5 µl
Dizi Analizi kit karışımı	8 µl
Primer	0.5 µl
Saflaştırılmış PZT ürünü	4 µl

Isı 94 °C'ye geldikten sonra tüpler otomatik ısı döngü cihazına yerleştirildi. Başlangıç ayrılma işlemi için 95°C'de 5 dk bir döngü bunu takiben aşağıda belirtilen program ayarlanarak 25 döngü olacak şekilde PZT tepkimesi gerçekleştirildi.

Ayrılma	95°C'de 10 sn	} 25 döngü
Primer bağlanması	50°C'de 5 sn	
Uzama	60°C'de 4dk	

Döngüler tamamlandıktan sonra, DNA dizi analizi tepkimesi sonrası saflaştırma işlemi aşağıda yazılı protokole göre yapıldı:

1-Döngüsel dizi analizi tepkimesi sonrası PZT tüpünün üzerine 2 µl (3mM pH:4.6) NaOAc dan eklendi.

2-Üzerine 50 µl % 96'lık etil alkol eklendi.

3-Karışım 1.5 ml'lik ependorf tüpüne aktarıldı, hafifçe vurularak karıştırıldı.

4-Buz üzerinde 15 dk bekletildi.

5-Süre sonunda beklemeden 20 dk 13.000 x rpm de santrifuj edildi.

6-Üstte kalan kısım pipet yardımıyla uzaklaştırıldı.

7-Geriye kalan çökelti oda ısısında kurumaya bırakıldı.

8-Üzerine 20 µl formamid eklenerek 0.5 ml'lik ependorf tüpüne aktarıldı.

9-94 °C' de denaturasyon işlemi yapıldıktan sonra -20 °C' de 2 dk bekletildi.

10-Tüpler Otomatik DNA dizi analizi sistemine yerleştirilerek örnekler okutularak analiz edildi.

3.6.3. PSA/KLK3 Geni Kontrol Bölgesinde Yer Alan -158

G>A (rs266882) Polimorfizminin Moleküler Genetik Analizi

PSA/KLK3 Geninin kontrol bölgesinde yer alan -158 G>A (rs266882) polimorfizminin belirlenmesi için PZT-RFLP yöntemi kullanıldı.

3.6.3.1. PSA/KLK3 Geni Kontrol Bölgesinde Yer Alan -158

G>A (rs266882) Polimorfizmini İçeren Bölgenin PZT ile Çoğaltılması

Aşağıda belirtilen özgül primerler kullanılarak polimorfizmi içeren bölge PZT yöntemi ile çoğaltıldı. PSA/KLK3 geninin 297 bç'lik

bölgesini çoğaltmak üzere seçilen primerler Şekil 9 ve tepkime karışımları Tablo 8'de verilmiştir¹⁵⁸.

İleri Primer (forward primer) 5'-TTGTATGAAGAATCGGGGATCGT-3'

Geri Primer (reverse Primer) 5'-TCCCCCAGGAGCCCTATAAAA-3'

```
                    5' TTGTATGAAGAATCGGGGATCGT 3'
GTCTTGGAGTGCAAAGGATCTAGGCACGTGAGGCTTTGTATGAAGAATCGGGGATCGTAC
CACCCCCTGTTTCTGTTTCATCCTGGGCRTGTCTCCTCTGCCTTTGTCCCCTAGATGAAG
TCTCCATGAGCTACAGGGCCTGGTGCATCCAGGGTGATCTAGTAATTGCAGAACAGCAAG
PSA-158
↓
TR*CTAGCTCTCCCTCCCCTTCCACAGCTCTGGGTGTGGGAGGGGGTTGTCCAGCCTCAG
CAGCATGGGGAGGGCCTTGGTCAGCCTCTGGGTGCCAGCAGGGCAGGGCGGAGTCCTGG
GGAATGAAGGTTTATAGGGCTCCTGGGGAGGCTCCCCAGCCCCAAGCTTACCACCTG
3'AAAATATCCCAGGACCCCCT5'
```

Şekil 9: PSA/KLK3 genine ait 297 bç'lik bölümünü çoğaltan primerler, bölgenin genomdaki yerlesimi ve -158 G>A (rs266882) polimorfizmi için kullanılan restriksiyon enzimi ve kesim yeri. Referans: ENSG00000142515 giriş no'lu dizi.

3.6.3.2. KLK3 -158 Polimorfizmini İçeren Bölgenin PZT

Tepkime Karışımı

Hedef DNA bölgesini çoğaltmak için tepkime esnasında son konsantrasyonları 1xPZT tamponu, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, her iki primerden 0.6 µM, 1 U / 50 µl Taq DNA polimeraz enzimi olacak şekilde stok çözeltilerden Tablo 8'de belirtilen miktarda mikropipet yardımı ile çekildi. Tepkime karışımı 0.2 ml'lik tüplere dağıtıldı ve üzerine saflaştırılan genomik DNA eklendi. Tüm işlemler, tepkimenin doğru gerçekleşmesi için buz üstünde yapıldı. Ardından otomatik ısı döngü cihazına yerleştirilerek tepkime gerçekleştirildi.

Tablo 8: KLK3-158 gen bölgesi için PZR tepkime karışımı

	Stok	Son konsantrasyon	Toplam hacim: 50 µL
dH ₂ O	-	-	37.3 µl
Tampon Çözeltisi (10X)	10X	1X	5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	25 mM	1.5 mM	3 µl
dNTP'ler (10 mM)	10 mM	0.2 mM	0.5 µl
Primer F (100 µM)	100 µM	0.6 µM	0.5 µl
Primer R (100 µM)	100 µM	0.6 µM	0.5 µl
Taq DNA polimeraz (5 U/µl)	5 U/µl	0.026 U/µl	0.2 µl
DNA	-	-	3 µl

3.6.3.3. KLK3-158 Polimorfizmini İçeren Bölgenin PZT Programı

Başlangıç ayrılma işlemi için 94°C'de 5 dk bir döngü bunu takiben aşağıda belirtilen program ayarlanarak 30 döngü ve son uzama için ise 72°C'de 5 dk bir döngü olacak şekilde PZT tepkimesi gerçekleştirildi.

Ayrılma	94°C'de 30 sn	} 30 döngü
Primer bağlanması	60°C'de 1 dk	
Uzama	72°C'de 1.5 dk	

Program sonunda hedef DNA bölgesi çoğaltılmış oldu.

3.6.3.4. KLK3 -158 Polimorfizmini İçeren Bölgeye Ait PZT Ürünlerinin Analizi

PZT tepkimesi sonrasında elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jelde elektroforezi yapıldı. Bunun için daha önceden hazırlanmış 1X TBE tamponu ile hazırlanmış olan %2'lik agaroz jele DNA örneklerinden 7 µL alınarak, 3 µl Orange G jel yükleme tamponu ile

karıştırılıp jeldeki kuyulara yüklendi. Aynı zamanda kuyulardan birine de 100 baz çiftlik (bç) DNA moleküler ağırlık belirteci yüklenerek, 1X TBE tamponunun içerisinde 45 dk 100 volt sabit akımda yürütüldü. Süre sonunda “Syngene Ingenius Bioimaging” görüntüleme sistemi kullanılarak jellerin fotoğrafı çekildi.

3.6.3.5. KLK3-158 Polimorfizminin Belirlenmesi İçin PZR Ürünlerinin *NheI* Restriksiyon Enzimi ile Kesimi

NheI, *Neisseria mucosa heidelbergensis* bakterisinden elde edilen bir restriksiyon enzimidir. Çift zincirli DNA' yı aşağıda gösterilen diziden tanıyarak kesim yapar.

5'-G↓CTAGC-3'

3'-CGATC↑G-5'

PZR tepkimesi sonrası 297 baz çiftlik PZR ürünü *NheI* restriksiyon enzimi ile kesimlenmiştir. Bu bölgede -158. nükleotit *NheI* kesim noktası taşımaktadır. Guanin→ Adenin (G→A) bir nükleotit değişimi olması halinde *NheI* enziminin tanıdığı bir bölge kaybolmaktadır. Bu nükleotit değişimi olmayan (AA) bireylerde 297 baz çiftlik tek bant, heterozigot bireylerde (GA) 297, 149 ve 148 baz çiftlik üç bant, her iki alelinde değişim görülen bireylerde (GG) 149 ve 148 baz çiftlik iki bant görülecektir.

3.6.3.5.1 Deneğin Yapılışı

1- 1.5 ml' lik ependorf tüpünün içine 15 µl PCR ürünü eklendi.

2- 18 µl son hacim içerisinde 10 U/µl *NheI* enzimi ve 1x kesim tamponu (pH 7.9, 25 °C) ilave edildi.

3- 37°C' de 60 dk inkübe edildi.

4- İnkübasyon sonrası tüplerin içine 3 µl Orange G jel yükleme boyası eklendi.

5- %2' lik agaroz jelde ΦX_{174} DNA moleküler ağırlık belirteci eşliğinde 30 dakika 100 volt sabit akımda yürütüldü.

3.6.4. PSA/KLK3 Geni Kontrol Bölgesinde Yer alan -252 G>A (rs4802754) Polimorfizmini Moleküler Genetik Analizi

PSA/KLK3 Geninin kontrol bölgesinde yer alan -252 G>A (rs402754) polimorfizminin belirlenmesi için PZT-RFLP yöntemi kullanıldı.

3.6.4.1. PSA/KLK3 Geni Kontrol Bölgesinde Yer alan -252 G>A (rs4802754) Polimorfizmini İçeren Bölgenin PZT ile Çoğaltılması

Aşağıda belirtilen özgül primerler kullanılarak polimorfizmi içeren bölge PZT yöntemi ile çoğaltıldı. PSA/KLK3 geninin 204 bç'lik bölgesini çoğaltmak üzere seçilen primerler Şekil 10 ve tepkime karışımları Tablo 9'da verilmiştir¹⁵⁹.

İleri Primer (forward primer) 5'-ATCTCCTGAGTGCTGGTGTCTTA-3'

Geri Primer (reverse primer) 5'-GCAATTACTAGATCACCCCTGGATG-3'



Şekil 10: PSA/KLK3 genine ait 204 bç'lik bölümünü çoğaltan primerler, bölgenin genomdaki yerlesimi ve -252 G>A (rs4802754) polimorfizmi için kullanılan restriksiyon enzimi ve kesim yeri. Referans: ENSG00000142515 giriş no'lu dizi.

3.6.4.2. KLK3 -252 Polimorfizmini İçeren Bölgenin PZT

Tepkime Karışımı

Hedef DNA bölgesini çoğaltmak için tepkime esnasında son konsantrasyonları 1xPZT tamponu, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, her iki primerden 0.6 µM, 1 U / 50 µl Taq DNA polimeraz enzimi olacak şekilde stok çözeltilerden Tablo 9'da belirtilen miktarda mikropipet yardımı ile çekildi. Tepkime karışımı 0.2 ml' lik tüplere dağıtıldı ve üzerine saflaştırılan genomik DNA eklendi. Tüm işlemler, tepkimenin doğru gerçekleşmesi için buz üstünde yapıldı. Ardından otomatik ısı döngü cihazına yerleştirilerek tepkime gerçekleştirildi.

Tablo 9: KLK3-252 gen bölgesi için PZR tepkime karışımı

	Stok	Son konsantrasyon	Toplam hacim: 50 µL
dH ₂ O	-	-	37.3 µl
Tampon Çözeltisi (10X)	10X	1X	5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	25 mM	1.5 mM	3 µl
dNTP'ler (10 mM)	10 mM	0.2 mM	0.5 µl
Primer F (100 µM)	100 µM	0.6 µM	0.5 µl
Primer R (100 µM)	100 µM	0.6 µM	0.5 µl
Taq DNA polimeraz (5 U/µl)	5 U/µl	0.026 U/µl	0.2 µl
DNA	-	-	3 µl

3.6.4.3. KLK3-252 Polimorfizmini İçeren Bölgenin PZT

Programı

KLK3-252 gen bölgesi için başlangıç ayrılma işlemi için 95°C'de 5 dk bir döngü bunu takiben aşağıda belirtilen program ayarlanarak 30 döngü ve son uzama için ise 72°C'de 5 dk bir döngü olacak şekilde PZT tepkimesi gerçekleştirildi.

Ayrılma	95°C'de 30 sn	} 30 döngü
Primer bağlanması	68°C'de 1 dk	
Uzama	72°C'de 1 dk	

Program sonunda hedef DNA bölgesi çoğaltılmış oldu.

3.6.4.4. KLK3 -252 Polimorfizmini İçeren Bölgeye Ait PZT Ürünlerinin Analizi

PZT tepkimesi sonrasında elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jelde elektroforezi yapıldı. Bunun için daha önceden hazırlanmış 1X TBE tamponu ile hazırlanmış olan %2'lik agaroz jele DNA örneklerinden 7 µL alınarak, 3 µl Orange G jel yükleme tamponu ile karıştırılıp jeldeki kuyulara yüklendi. Aynı zamanda kuyulardan birine de 100 baz çiftlik (bç) DNA moleküler ağırlık belirteci yüklenerek, 1X TBE tamponunun içerisinde 45 dk 100 volt sabit akımda yürütüldü. Süre sonunda "Syngene Ingenius Bioimaging" görüntüleme sistemi kullanılarak jellerin fotoğrafı çekildi.

3.6.4.5. KLK3-252 Polimorfizminin Belirlenmesi için PZT Ürünlerinin NlaIII Restriksiyon Enzimi ile Kesimi

NlaIII, *Neisseria lactamica* bakterisinden elde edilen bir restriksiyon enzimidir. Çift zincirli DNA' yı aşağıda gösterilen diziden tanıyarak kesim yapar.

5'-C↓ATG-3'

3'-GTA↑C-5'

PZR tepkimesi sonrası 204 baz çiftlik PZR ürünü *NlaIII* restriksiyon enzimi ile kesimlenmiştir. Bu bölgede -252. nükleotit *NlaIII* kesim noktası taşımaktadır. Guanin→ adenin (G→A) bir nükleotit değişimi olması halinde *NlaIII* enziminin tanıdığı bir bölge ortadan kalkmaktadır. Bu nükleotit değişimi olmayan (GG) bireylerde 163,41 baz çiftlik iki bant, heterozigot bireylerde (GA) 163, 126, 41 ve 37 baz çiftlik dört bant, her iki alelinde değişim görülen bireylerde (AA) 126, 41, 37 baz çiftlik bantlar görülecektir.

3.6.4.5.1. Deneyin Yapılışı

- 1- 1.5 ml' lik ependorf tüpünün içine 15 µl PCR ürünü eklendi.
- 2- 18 µl son hacim içerisinde 10 U/µl *NlaIII* enzimi ve 1x kesim tamponu (pH 7.9, 25 °C) ilave edildi.
- 3- 37°C' de 60 dk inkübe edildi.
- 4- İnkübasyon sonrası tüplerin içine 3 µl Orange G jel yükleme boyası eklendi.
- 5- %2' lik agaroz jelde ΦX174 DNA moleküler ağırlık belirteci eşliğinde 30 dakika 100 volt sabit akımda yürütüldü.

3.6.5. RNASEL Geni D541E T>G (rs627928) Polimorfizminin Moleküler Genetik Analizi

RNASEL geninde yer alan D541E T>G (rs627928) polimorfizminin belirlenmesi için PZT-RFLP yöntemi kullanıldı.

3.6.5.1. RNASEL Geni D541E T>G (rs627928) Polimorfizmini İçeren Bölgenin PZT ile Çoğaltılması

Aşağıda belirtilen özgül primerler kullanılarak polimorfizmi içeren bölge PZT yöntemi ile çoğaltıldı. PSA/KLK3 geninin 361 bç'lik

bölgesini çoğaltmak üzere seçilen primerler Şekil 11 ve tepkime karışımları Tablo 10'da verilmiştir.

İleri Primer (forward primer) 5'-TCCCATCATCTTGTTTGC-3'

Geri Primer (reverse primer) 5'-CACCCACCTTACCCTTTCC-3'

5'TCCCATCATCTTGTTTGC3'

TCCCATCATCTTGTTTGC TAATAGCGTGCACCACTCCTTCCAGGGTTACCCAAATAATTAGTAAGC
ATCTTTGGCTTGATTTATGGCTTTGTGCAGGACCTGGACGGCTGGTCTCTATGTGGTAAAGA

D541E



AGGGAAGCATCTCATTTGAG*GAKCTGAAAGCTCAAAGTAATGAAGAGGTGGTTCACTTTCTC
CAGATGAGGAAACTAAGGACCTCATTATCGTCTCTCCATCCTGGGGAACATGTGAGGGACTG
TCTGAGTGACCTGCTGGGTCATCCCTCTTTTGGACTTGGGAGAGGTAAGTAAAACCTTTGTGCA
GATGCCACAGGCCTCCAGGATGGAAAGGGTAAGGTGGTG

3'CCTTCCATTCCACCAC 5'

Şekil 11: RNASEL genine ait 361 bç'lik bölümünü çoğaltan primerler, bölgenin genomdaki yerlesimi ve D541E T>G (rs627928) polimorfizmi için kullanılan restriksiyon enzimi ve kesim yeri. Referans: ENSG00000135828 giriş no'lu dizi.

3.6.5.2. RNASEL D541E Polimorfizmini İçeren Bölgenin PZT

Tepkime Karışımı

Hedef DNA bölgesini çoğaltmak için tepkime esnasında son konsantrasyonları 1xPZT tamponu, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, her iki primerden 0.6 µM, 1 U / 50 µl Taq DNA polimeraz enzimi olacak şekilde stok çözeltilerden Tablo 10'da belirtilen miktarda mikropipet yardımı ile çekildi. Tepkime karışımı 0.2 ml' lik tüplere dağıtıldı ve üzerine saflaştırılan genomik DNA eklendi. Tüm işlemler, tepkimenin doğru gerçekleşmesi için buz üstünde yapıldı. Ardından otomatik ısı döngü cihazına yerleştirilerek tepkime gerçekleştirildi.

Tablo 10: RNASEL D541E gen bölgesi için PZR tepkime karışımı

	Stok	Son konsantrasyon	Toplam hacim: 50 µL
dH ₂ O	-	-	37.3 µl
Tampon Çözeltisi (10X)	10X	1X	5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	25 mM	1.5 mM	3 µl
dNTP'ler (10 mM)	10 mM	0.2 mM	0.5 µl
Primer F (100 µM)	100 µM	0.6 µM	0.5 µl
Primer R (100 µM)	100 µM	0.6 µM	0.5 µl
Taq DNA polimeraz (5 U/µl)	5 U/µl	0.026 U/µl	0.2 µl
DNA	-	-	3 µl

3.6.5.3. RNASEL D541E Polimorfizmini İçeren Bölgenin PZT

Programı

RNASEL D541E gen bölgesi için başlangıç ayrılma işlemi için 95°C'de 5 dk bir döngü bunu takiben aşağıda belirtilen program ayarlanarak 30 döngü ve son uzama için ise 72°C'de 5 dk bir döngü olacak şekilde PZT tepkimesi gerçekleştirildi.

Ayrılma	95°C'de 30 sn	} 30 döngü
Primer bağlanması	55°C'de 1 dk	
Uzama	72°C'de 1 dk	

Program sonunda hedef DNA bölgesi çoğaltılmış oldu.

3.6.5.4. RNASEL D541E Polimorfizmini İçeren Bölgeye Ait

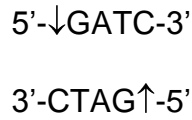
PZT Ürünlerinin Analizi

PZT tepkimesi sonrasında elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jelde elektroforezi yapıldı. Bunun için daha önceden hazırlanmış 1X TBE tamponu ile hazırlanmış olan %2'lik agaroz jele DNA

örneklerinden 7 µL alınarak, 3 µl Orange G jel yükleme tamponu ile karıştırılıp jeldeki kuyulara yüklendi. Aynı zamanda kuyulardan birine de 100 baz çiftlik (bç) DNA moleküler ağırlık belirteci yüklenerek, 1X TBE tamponunun içerisinde 45 dk 100 volt sabit akımda yürütüldü. Süre sonunda “Syngene Ingenius Bioimaging” görüntüleme sistemi kullanılarak jellerin fotoğrafı çekildi.

3.6.5.5. RNASEL 541 Polimorfizminin Belirlenmesi için PZR Ürünlerinin *Mbol* Restriksiyon Enzimi ile Kesimi

Mbol, *Moraxella bovis* bakterisinden elde edilen bir restriksiyon enzimidir. Çift zincirli DNA' yı aşağıda gösterilen dizisinden tanıyarak kesim yapar.



PZR tepkimesi sonrası 361 baz çiftlik PZR ürünü *Mbol* restriksiyon enzimi ile kesimlenmiştir. Timinin → Guanine (T→G) değişimi durumunda *Mbol* enziminin tanıdığı bir bölge kaybolmaktadır. Bu nükleotit değişimi olmayan (GG) bireylerde 361 baz çiftlik tek bant, heterozigot bireylerde (GT) 361, 210, ve 151 baz çiftlik üç bant, her iki alelinde değişim görülen bireylerde (TT) 210,151 baz çiftlik iki bant görülecektir.

3.6.5.5.1. Deneyin Yapılışı

- 1- 1.5 ml' lik ependorf tüpünün içine 15 µl PZR ürünü eklendi.
- 2- 18 µl son hacim içersinde 10 U/µl *Mbol* enzimi ve 1x kesim tamponu (pH 7.9, 25 °C) ilave edildi.
- 3- 37°C' de 60 dk inkübe edildi.

4- İnkübasyon sonrası tüplerin içine 3 µl Orange G jel yükleme boyası eklendi.

5- %2' lik agaroz jelde Φ X174 DNA moleküler ağırlık belirteci eşliğinde 30 dakika 100 volt sabit akımda yürütüldü.

3.7. Biyoinformatik analiz programları

Çalışmanın proteomik verileri SELDI-TOF MS için tasarlanmış olan yazılım programı Proteinchip Data Manager Software (BioRAD, ABD) ile değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR

Çalışma grubumuzu GÜTF Üroloji Kliniğine başvuran 47 prostat kanseri hastası, 50 BPH olan birey (rebiyopsi yapılan) 20 radikal prostatektomi sonrası PSA değeri 0 olan hasta ve 20 sağlıklı kontroller oluşturdu. Çalışmanın ilk bölümünde tüm bireylerden elde edilen serum örnekleri proteomik düzeyde araştırıldı.

Çalışmanın ikinci bölümünde ise prostat kanseri hastalarının ve BPH bireylerin parafine gömülü dokularından DNA izole edilerek, PSA RNASEL ve AR genlerinde tanımlanan polimorfizmlerin sıklıkları araştırıldı. Polimorfizmlerin prostat kanseri ve BPH kontrol grubuna ait verilerinin Hardy-Weinberg eşitliğine uygunluğu araştırıldığında, prostat kanserli hasta grubunda PSA -158, PSA -252, ve RNASEL D541E için sırasıyla p değeri, 0.00030, 0.0098 ve 0.0070, BPH kontrol grubunda ise bu değerler 0.145, 0.758 ve 0.068 olarak tespit edildi.

4.1. Proteomik Analiz Sonuçları

Kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında prostat kanseri olan grupta 7 farklı serum proteini belirlendi ($p < 0.01$). Prostat kanseri grubunda normal serum seviyesinden düşük olan 4 ve yüksek olan 3 tane protein bulundu (Tablo 11).

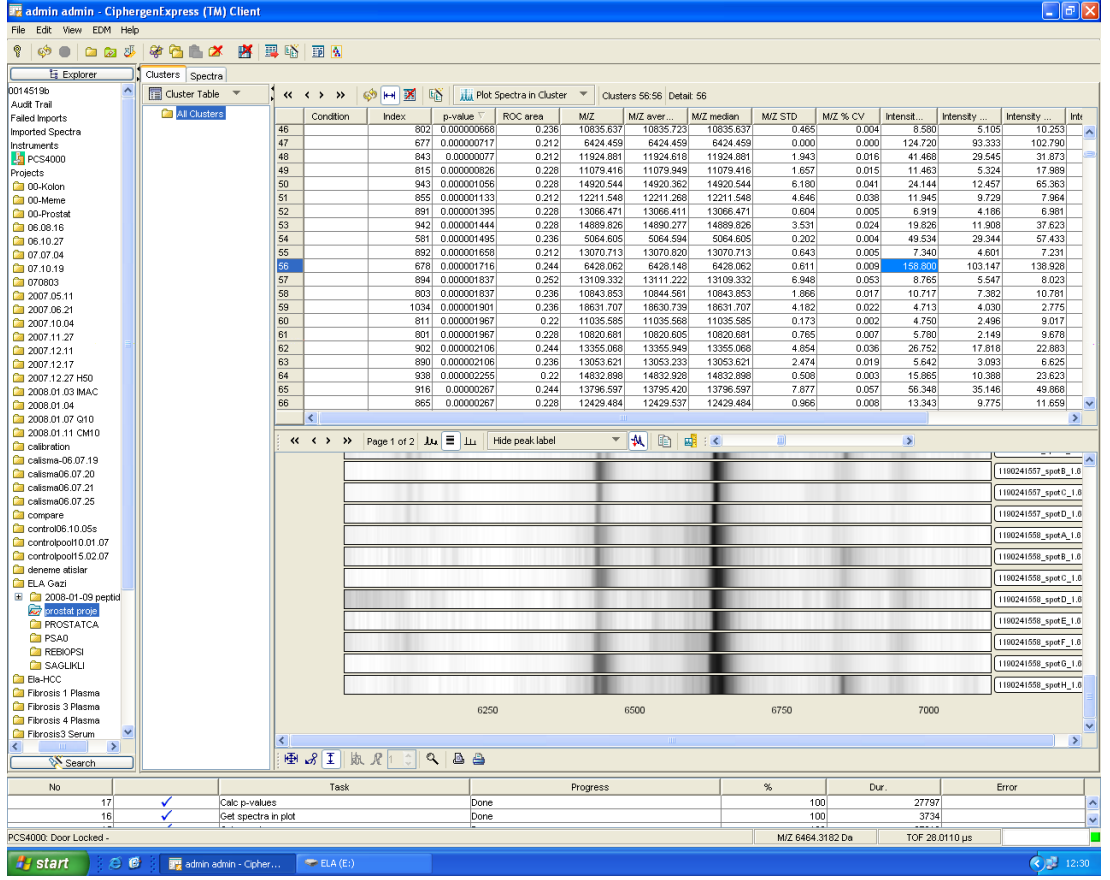
Tablo 11. Proteomik analiz sonuçları

Gruplar	Belirleyici	Ekspresyon
Prostat Kanseri – Sağlıklı Kontrol	6447 Da (p=0.00000012)	Azalan – Artan ekspresyon
	6628 Da (p=0.00000024)	Azalan – Artan ekspresyon
	8134 Da (p=0.00106993)	Artan - Azalan ekspresyon
Prostat Kanseri – Benign Prostat Hipertrofisi (Rebiyopsi)	6428 Da (p= 0.000001716)	Azalan – Artan ekspresyon
	4481 Da (p= 0.000567038)	Artan - Azalan ekspresyon
Prostat Kanseri – PSA 0	5580 Da (p=0.001973913)	Azalan – Artan ekspresyon
	6628 Da (p=0.00001953)	Azalan – Artan ekspresyon
	8939 Da(p= 0.002154045)	Artan - Azalan ekspresyon

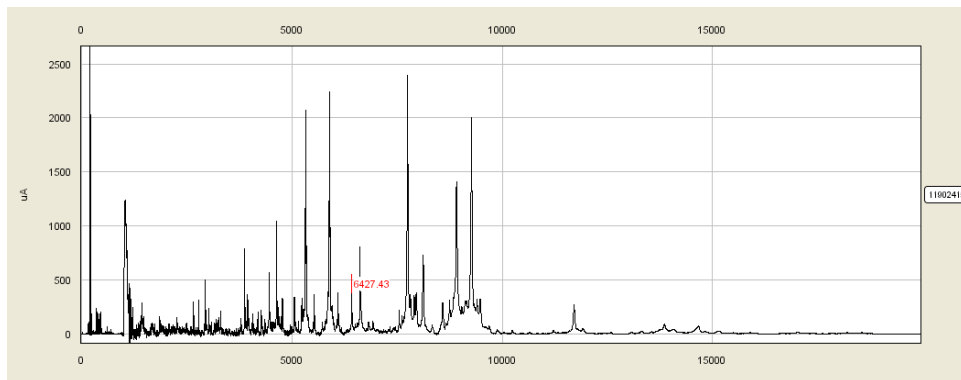
Sağlıklı erkek hastalar grubuyla karşılaştırıldığında prostat kanseri grubunda 6447 Da ve 6628 Da ağırlığındaki proteinler serumda düşük seviyelerde ve 8134 Da protein yüksek seviyelerde bulundu.

PSA yüksekliğine sekonder birden fazla biopsi yapılmış ve prostat kanseri saptanmamış hasta grubuyla karşılaştırıldığında prostat kanseri grubunda 6428 Da ağırlığındaki protein serumda düşük seviyelerde ve 4481 Da protein yüksek seviyelerde bulundu. Prostat kanseri ve BPH karşılaştırılmasında saptanan 6428 Da ağırlığındaki proteine ait biyoinformatik analiz ve proteinin parmak izi haritası Şekil12’de gösterildi. Aynı proteinin kromatografik analiz görüntüsü Şekil 13’de verildi.

PSA 0 olan hasta grubuyla karşılaştırıldığında prostat kanseri grubunda 5580 Da ve 6628 Da ağırlığındaki proteinler serumda düşük seviyelerde ve 8939 Da protein yüksek seviyelerde bulundu.



Şekil 12: Prostat kanseri ve BPH karşılaştırılmasında saptanan 6428 Da ağırlığındaki proteine ait biyoinformatik analiz ve proteinin parmak izi haritası.



Şekil 13: 6428 Da ağırlığındaki proteinin kromatografik analiz görüntüsü.

Tüm bu proteinler içerisinde kontrol grupları (sağlıklı grup ve PSA 0) ve prostat kanserli hasta grubu karşılaştırılmasında serumda daha düşük seviyelerde saptanan 6428 Da ağırlığındaki protein ayrıcalıklı olarak

değerlendirildi ($p < 0.001$) (Şekil 14). Aynı proteinin kromatografik analiz görüntüsü Şekil 15’de verildi.

admin admin - CiphergenExpress (TM) Client

File Edit View EDM Help

Cluster Table

Condition	Index	p-value	ROC area	M/Z	M/Z aver.	M/Z median	M/Z STD	M/Z % CV	Intens.	Intensity	Intensity	Intr
4	930	0.00000004	0.052	14319.602	14319.625	14319.602	8.390	0.045	13.935	9.501	12.026	
5	928	0.00000006	0.066	14295.981	14296.745	14295.981	3.145	0.022	14.217	10.178	12.213	
6	925	0.00000007	0.066	14164.694	14164.425	14164.694	2.250	0.016	31.469	20.852	27.886	
7	926	0.00000007	0.066	14221.389	14221.389	14221.389	0.617	0.004	16.847	11.355	14.869	
8	202	0.00000007	0.908	2016.767	2016.160	2016.071	1.020	0.051	395.629	199.724	510.564	
9	815	0.00000008	0.052	11079.416	11079.953	11079.416	1.552	0.014	10.421	5.052	14.299	
10	818	0.00000008	0.066	11123.752	11123.713	11123.752	0.327	0.003	7.768	3.238	11.090	
11	813	0.00000008	0.052	11071.716	11071.614	11071.716	0.852	0.008	8.344	4.038	11.274	
12	933	0.00000001	0.066	14492.253	14491.735	14492.253	9.951	0.048	11.958	8.788	9.807	
13	934	0.00000001	0.066	14569.361	14569.176	14569.361	7.380	0.051	16.590	11.996	12.328	
14	814	0.00000011	0.066	11074.996	11074.981	11074.996	0.083	0.001	9.071	4.265	12.638	
15	927	0.00000011	0.08	14247.474	14247.601	14247.474	1.063	0.007	14.483	10.190	12.848	
16	680	0.00000012	0.08	6447.892	6448.128	6447.892	1.398	0.022	227.776	104.544	133.221	
17	918	0.00000012	0.066	13926.397	13926.211	13926.397	3.353	0.024	59.268	43.915	46.127	
18	931	0.00000016	0.08	14369.197	14369.015	14369.197	5.547	0.039	11.059	7.148	10.196	
19	817	0.00000017	0.08	11108.142	11107.645	11108.142	2.113	0.019	11.593	4.816	15.647	
20	919	0.00000017	0.066	13972.428	13972.428	13972.428	0.000	0.000	34.955	27.464	26.797	
21	928	0.00000017	0.08	14270.928	14270.997	14270.928	1.549	0.011	14.109	10.120	12.671	
22	689	0.00000024	0.08	6628.856	6628.923	6628.856	0.418	0.006	256.746	147.033	175.857	
23	921	0.00000024	0.084	14057.159	14057.357	14057.159	3.358	0.024	42.894	33.695	34.171	
24	932	0.00000024	0.168	14434.755	14433.945	14434.755	7.644	0.053	10.048	6.265	8.933	

le n... Group na... TOF(us) Estimated Cluster in... Substanc... Charge Ion mass SIN MZ TOF Intensity / Peak typ

1	SAGLIKLI	28.352	✓	689	6627.856	1.000	1.000	30.456	6628.856	0.000	715.339	ESTIMATE
2	SAGLIKLI	28.364	✓	689	6627.856	1.000	1.000	21.629	6628.856	0.000	527.969	ESTIMATE
3	SAGLIKLI	28.354	✓	689	6627.856	1.000	1.000	16.480	6628.856	0.000	460.959	ESTIMATE
4	SAGLIKLI	28.360	✓	689	6631.043	1.000	1.000	22.813	6632.051	0.000	735.338	AUTOMA
5	SAGLIKLI	28.362	✓	689	6627.856	1.000	1.000	32.929	6628.856	0.000	619.147	ESTIMATE
6	SAGLIKLI	28.350	✓	689	6627.856	1.000	1.000	21.891	6628.856	0.000	656.376	ESTIMATE
7	SAGLIKLI	28.356	✓	689	6627.849	1.000	1.000	26.464	6628.856	0.000	720.270	AUTOMA
8	SAGLIKLI	28.347	✓	689	6627.856	1.000	1.000	16.081	6628.856	0.000	490.231	ESTIMATE
9	SAGLIKLI	28.360	✓	689	6627.856	1.000	1.000	25.218	6628.856	0.000	633.142	ESTIMATE
10	SAGLIKLI	28.344	✓	689	6627.856	1.000	1.000	12.176	6628.856	0.000	369.091	ESTIMATE
11	SAGLIKLI	28.359	✓	689	6628.328	1.000	1.000	16.952	6630.335	0.000	429.900	AUTOMA
12	PROSTATCA	28.344	✓	689	6627.856	1.000	1.000	14.622	6628.856	0.000	392.651	ESTIMATE
13	SAGLIKLI	28.349	✓	689	6627.856	1.000	1.000	16.046	6628.856	0.000	498.594	ESTIMATE
14	SAGLIKLI	28.367	✓	689	6627.856	1.000	1.000	21.813	6628.856	0.000	443.113	ESTIMATE
15	PROSTATCA	28.348	✓	689	6627.856	1.000	1.000	9.500	6628.856	0.000	236.919	ESTIMATE
16	SAGLIKLI	28.346	✓	689	6627.856	1.000	1.000	7.963	6628.856	0.000	238.887	ESTIMATE
17	SAGLIKLI	28.343	✓	689	6627.856	1.000	1.000	9.313	6628.856	0.000	307.703	ESTIMATE
18	SAGLIKLI	28.344	✓	689	6627.856	1.000	1.000	12.440	6628.856	0.000	317.747	ESTIMATE
19	PROSTATCA	28.347	✓	689	6627.856	1.000	1.000	2.760	6628.856	0.000	115.657	ESTIMATE
20	PROSTATCA	28.340	✓	689	6627.856	1.000	1.000	6.797	6628.856	0.000	146.833	ESTIMATE
21	PROSTATCA	28.344	✓	689	6627.856	1.000	1.000	10.259	6628.856	0.000	325.472	ESTIMATE
22	SAGLIKLI	28.347	✓	689	6627.856	1.000	1.000	13.678	6628.856	0.000	390.141	ESTIMATE
23	PROSTATCA	28.337	✓	689	6627.856	1.000	1.000	6.096	6628.856	0.000	157.261	ESTIMATE

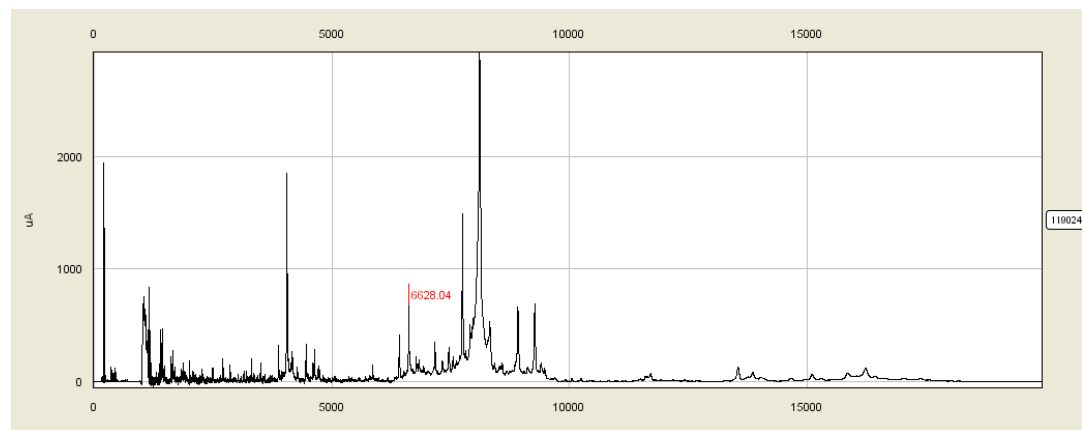
No Task Progress % Dur Error

14	Centroid peaks in spectra	Running	0	235	Cannot perform operation on EDM
13	Get spectra in plot	Done	100	23985	

PCS4000: Door Locked -

start admin admin - Cipher... 11:16

Şekil 14: Prostat kanseri ve kontrol grupları karşılaştırılmasında saptanan 6628 Da ağırlığındaki proteine ait biyoinformatik analizi.



Şekil 15: 6628 Da ağırlığındaki proteinin kromatografik analiz görüntüsü.

Prostat kanseri, BPH ve PSA 0 olan tüm hastalıkla ilişkili gruplar ve sağlıklı kontrol grubu karşılaştırıldığında hastalıkla ilişkili

gruaplarda 2566 Da, 5152 Da ve 6438 Da ağırlığındaki proteinler serumda düşük seviyelerde kontrol grubunda ise yüksek seviyelerde bulundu. Prostat kanseri, BPH ve PSA 0 olan tüm hastalıkla ilişkili gruplar ve sağlıklı kontrol grubu karşılaştırılması sonucunda elde edilen biyoistatistik sonuçları ile ilişkili bilgisayar verileri Şekil 16, 17 ve 18'de ve grafiksel değerlendirilmeleri de Grafik 1, 2 ve 3'de gösterildi.

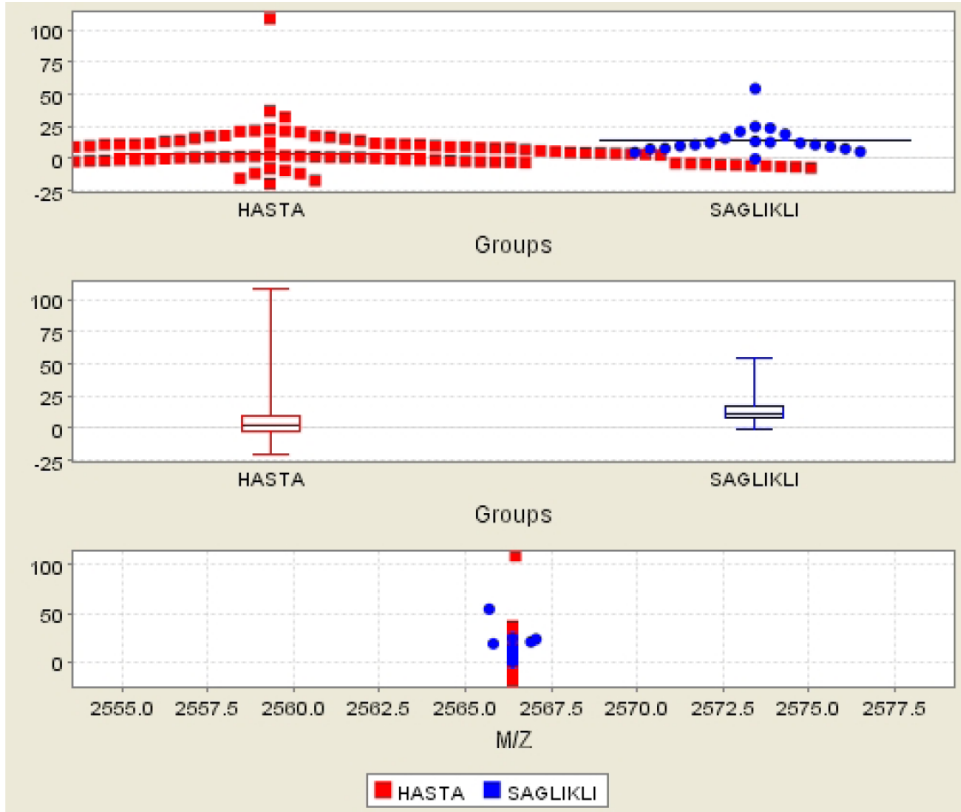
Cluster Statistics

Condition: M/Z: 2566.375 Cluster: 362 P-Value: 0.000 ROC area: 0.197 Row 1138 of 1140

Group	M/Z avg	M/Z std	Intensity avg	Intensity std	# of peaks	# estimated
HASTA	2566.375	0.007	4.108	13.407	120	119
SAGLIKLI	2566.373	0.284	14.041	11.430	20	16

Spectrum	Group	Estimated	M/Z	Intensity
1190241543_spotA_1.6	HASTA	true	2,566.375	9.063
1190241543_spotB_1.6	HASTA	true	2,566.375	-5.137
1190241543_spotC_1.6	HASTA	true	2,566.375	11.11
1190241543_spotD_1.6	HASTA	true	2,566.375	21.571
1190241543_spotE_1.6	HASTA	true	2,566.375	1.378
1190241543_spotF_1.6	HASTA	true	2,566.375	11.474
1190241543_spotG_1.6	HASTA	true	2,566.375	2.541
1190241543_spotH_1.6	HASTA	true	2,566.375	3.575
1190241544_spotA_1.6	HASTA	true	2,566.375	-5.3
1190241544_spotB_1.6	HASTA	true	2,566.375	3.721
1190241544_spotC_1.6	HASTA	true	2,566.375	2.695
1190241544_spotD_1.6	HASTA	true	2,566.375	6.729
1190241544_spotE_1.6	HASTA	true	2,566.375	-1.098
1190241544_spotF_1.6	HASTA	true	2,566.375	-5.92
1190241544_spotG_1.6	HASTA	true	2,566.375	-6.158
1190241544_spotH_1.6	HASTA	true	2,566.375	15.363
1190241545_spotA_1.6	HASTA	true	2,566.375	3.997
1190241545_spotB_1.6	HASTA	true	2,566.375	13.881
1190241545_spotC_1.6	HASTA	true	2,566.375	-1.111
1190241545_spotD_1.6	HASTA	true	2,566.375	0.77
1190241545_spotE_1.6	HASTA	true	2,566.375	8.757
1190241545_spotF_1.6	HASTA	true	2,566.375	3.41

Şekil 16: Tüm hastalıkla ilişkili gruplar ve sağlıklı kontrol grubu karşılaştırılmasında saptanan 2566 Da ağırlığındaki proteine ait biyoistatistik analiz verileri.



Grafik 1: Tüm hastalıkla ilişkili gruplar ve sağlıklı kontrol grubu karşılaştırılmasında saptanan 2566 Da ağırlığındaki proteinin grafiksel değerlendirilmesi.

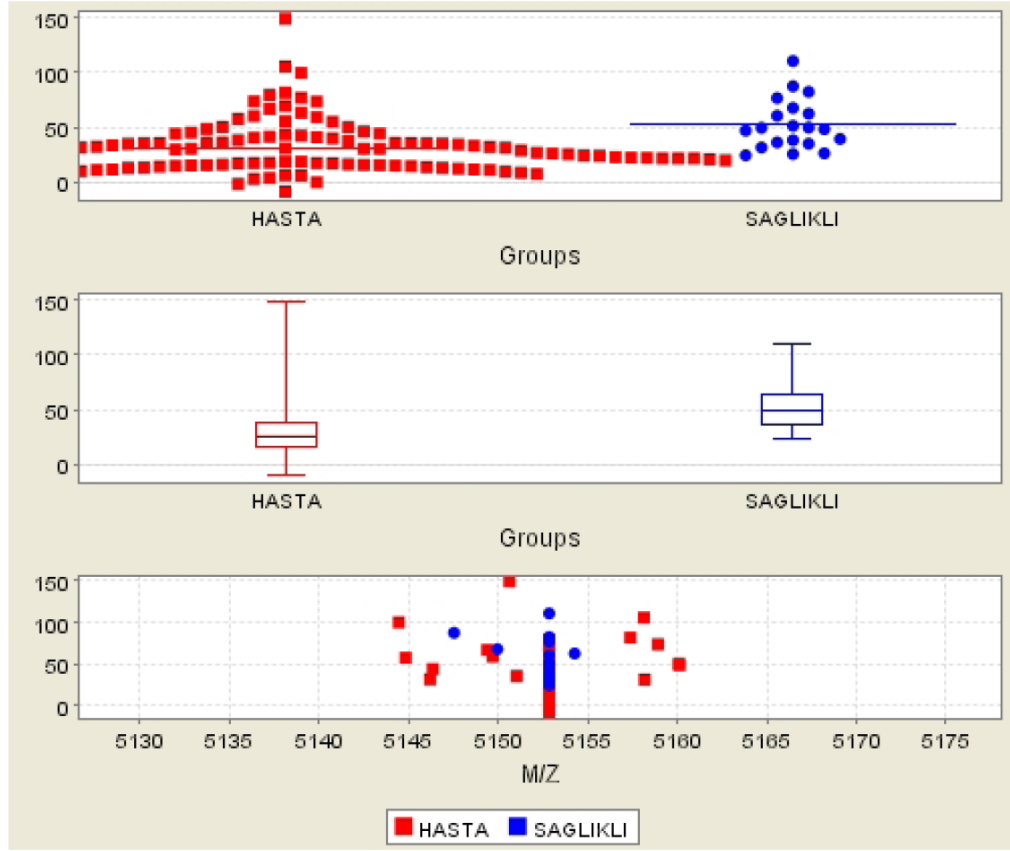
Cluster Statistics

Condition: M/Z: 5152.836 Cluster: 629 P-Value: 0.000 ROC area: 0.197 Row 1139 of 1140

Group	M/Z avg	M/Z std	Intensity avg	Intensity std	# of peaks	# estimated
HASTA	5152.799	1.988	30.862	23.024	120	106
SAGLIKLI	5152.497	1.382	52.518	23.088	20	17

Spectrum	Group	Estimated	M/Z	Intensity
1190241543_spotA_1.6	HASTA	true	5,152.836	11.631
1190241543_spotB_1.6	HASTA	true	5,152.836	15.611
1190241543_spotC_1.6	HASTA	true	5,152.836	17.525
1190241543_spotD_1.6	HASTA	true	5,152.836	15.523
1190241543_spotE_1.6	HASTA	true	5,152.836	12.845
1190241543_spotF_1.6	HASTA	true	5,152.836	19.653
1190241543_spotG_1.6	HASTA	true	5,152.836	11.103
1190241543_spotH_1.6	HASTA	true	5,152.836	54.93
1190241544_spotA_1.6	HASTA	true	5,152.836	3.634
1190241544_spotB_1.6	HASTA	true	5,152.836	11.043
1190241544_spotC_1.6	HASTA	true	5,152.836	20.839
1190241544_spotD_1.6	HASTA	true	5,152.836	22
1190241544_spotE_1.6	HASTA	true	5,152.836	16.089
1190241544_spotF_1.6	HASTA	true	5,152.836	21.342
1190241544_spotG_1.6	HASTA	true	5,152.836	24.041
1190241544_spotH_1.6	HASTA	false	5,160.104	48.633
1190241545_spotA_1.6	HASTA	true	5,152.836	28.852
1190241545_spotB_1.6	HASTA	true	5,152.836	9.977
1190241545_spotC_1.6	HASTA	true	5,152.836	8.667
1190241545_spotD_1.6	HASTA	true	5,152.836	9.544
1190241545_spotE_1.6	HASTA	true	5,152.836	15.033
1190241545_spotF_1.6	HASTA	true	5,152.836	17.189

Şekil 17: Tüm hastalıkla ilişkili gruplar ve sağlıklı kontrol grubu karşılaştırılmasında saptanan 5152 Da ağırlığındaki proteine ait biyoistatistik analiz verileri.



Grafik 2: Tüm hastalıkla ilişkili gruplar ve sağlıklı kontrol grubu karşılaştırılmasında saptanan 5152 Da ağırlığındaki proteinin grafiksel değerlendirilmesi.

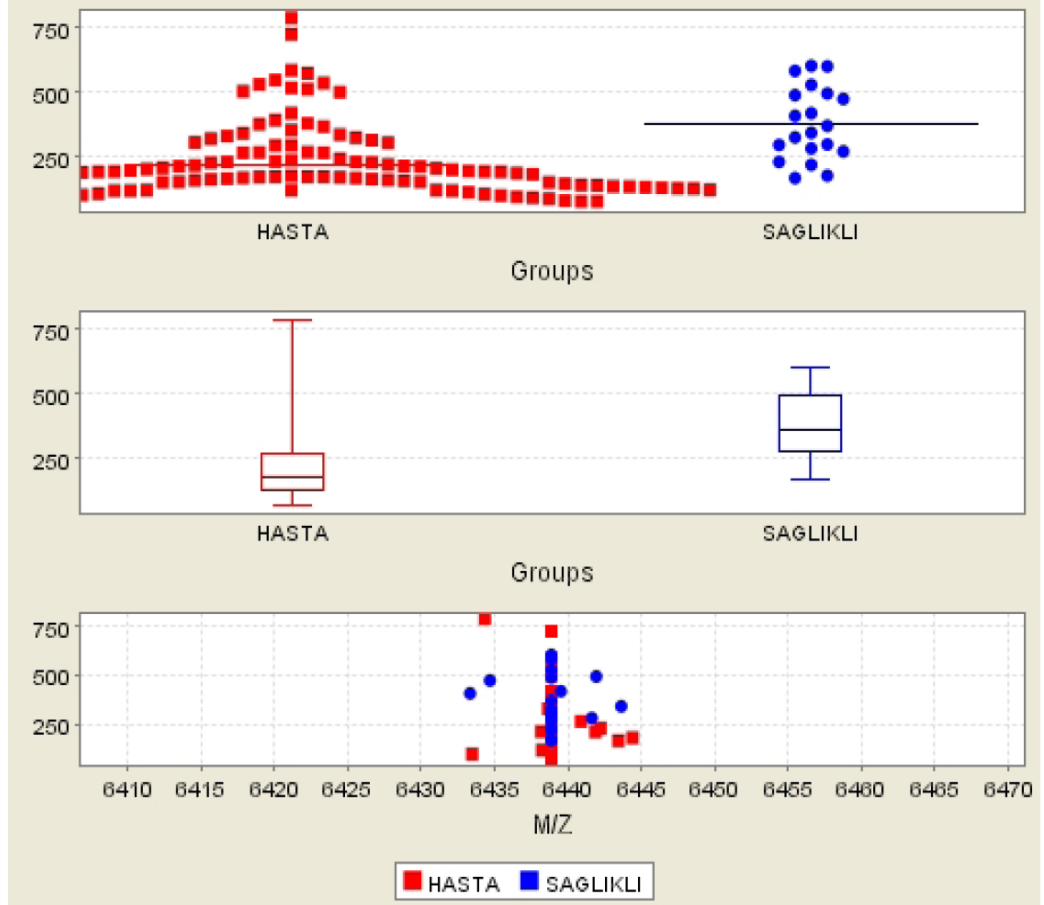
Cluster Statistics

Condition: M/Z: 6438.858 Cluster: 713 P-Value: 0.000 ROC area: 0.185 Row 1140 of 1140

Group	M/Z avg	M/Z std	Intensity avg	Intensity std	# of peaks	# estimated
HASTA	6438.916	1.029	217.570	140.420	120	110
SAGLIKLI	6438.933	2.154	377.362	140.892	20	14

Spectrum	Group	Estimated	M/Z	Intensity
1190241543_spotA_1.6	HASTA	true	6,438.858	148.756
1190241543_spotB_1.6	HASTA	true	6,438.858	76.952
1190241543_spotC_1.6	HASTA	true	6,438.858	170.116
1190241543_spotD_1.6	HASTA	true	6,438.858	91.149
1190241543_spotE_1.6	HASTA	true	6,438.858	68.925
1190241543_spotF_1.6	HASTA	true	6,438.858	73.1
1190241543_spotG_1.6	HASTA	true	6,438.858	109.19
1190241543_spotH_1.6	HASTA	false	6,440.873	263.176
1190241544_spotA_1.6	HASTA	true	6,438.858	87.726
1190241544_spotB_1.6	HASTA	true	6,438.858	83.455
1190241544_spotC_1.6	HASTA	true	6,438.858	118.744
1190241544_spotD_1.6	HASTA	true	6,438.858	194.68
1190241544_spotE_1.6	HASTA	true	6,438.858	155.99
1190241544_spotF_1.6	HASTA	true	6,438.858	138.394
1190241544_spotG_1.6	HASTA	true	6,438.858	136.602
1190241544_spotH_1.6	HASTA	true	6,438.858	73.728
1190241545_spotA_1.6	HASTA	true	6,438.858	196.851
1190241545_spotB_1.6	HASTA	true	6,438.858	165.635
1190241545_spotC_1.6	HASTA	true	6,438.858	169.818
1190241545_spotD_1.6	HASTA	true	6,438.858	136.895
1190241545_spotE_1.6	HASTA	true	6,438.858	114.987
1190241545_spotF_1.6	HASTA	true	6,438.858	131.828

Şekil 18: Tüm hastalıkla ilişkili gruplar ve sağlıklı kontrol grubu karşılaştırılmasında saptanan 6438 Da ağırlığındaki proteine ait biyoistatistik analiz verileri.

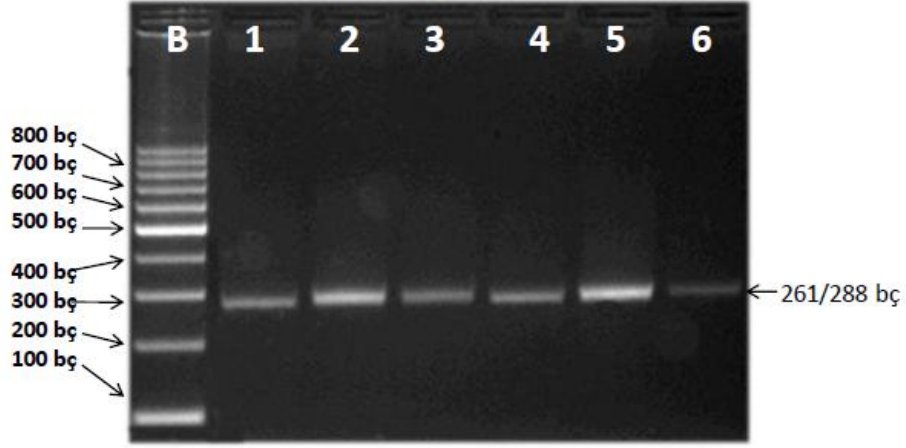


Grafik 3: Tüm hastalıkla ilişkili gruplar ve sağlıklı kontrol grubu karşılaştırılmasında saptanan 6438 Da ağırlığındaki proteinin grafiksel değerlendirilmesi.

4.2. Moleküler Genetik Analiz Sonuçları

4.2.1 AR Geni Ekson 1 bölgesinde (CAG)_n Tekrarlarının PZT Sonuçları

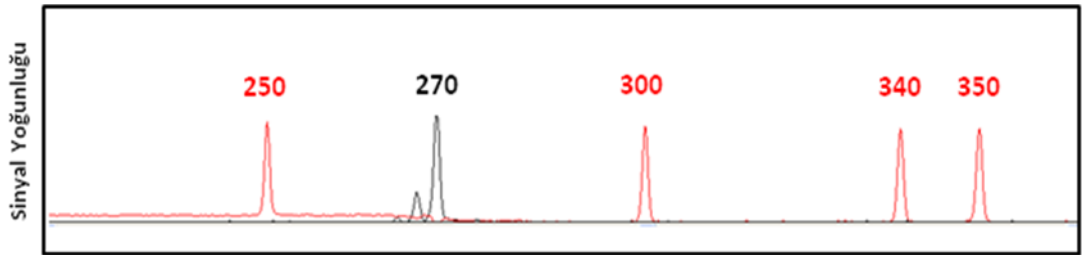
43 prostat kanseri ve 44 kontrole ait PZT ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütüldü. (CAG)_n polimorfizmini içeren (261-288) baz çifti arasına karşılık gelen bantlar moleküler ağırlık belirteci ile karşılaştırıldı (Şekil 19).



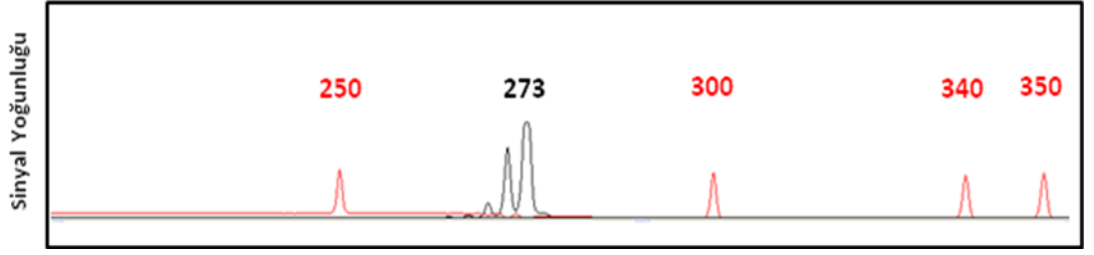
Şekil 19: 261-288 bç'lik bantları gösteren jel görüntüsü: (CAG)n tekrar polimorfizmini içine alan gen bölgesine ait PZT sonuçlarının %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü B: 100 bç'lik moleküler ağırlık belirteci, 1, 2, 3, 4, 5, 6 no'lu kuyular - PZT ürünleri.

4.2.1.1 AR Geni Ekson 1'deki (CAG)n Tekrarlarının Fragment Analizi Sonuçları

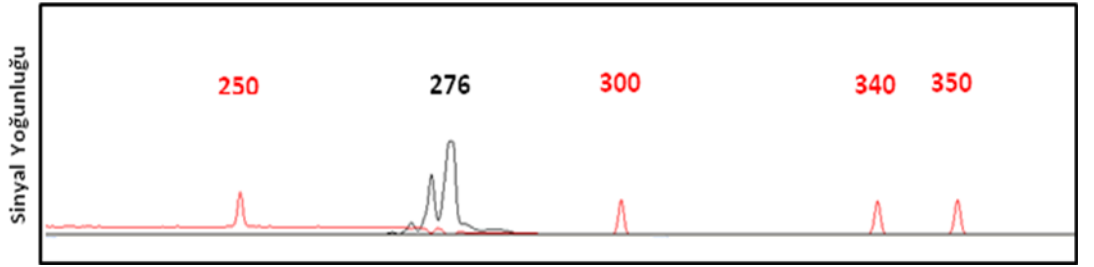
Fragment analizi yöntemi ile herbir bireye ait (CAG)n tekrar sayıları belirlendi. Hasta ve kontrol grubunda en fazla gözlenen tekrar sayıları örnek olarak seçilerek (Şekil 20-24) arasında gösterildi.



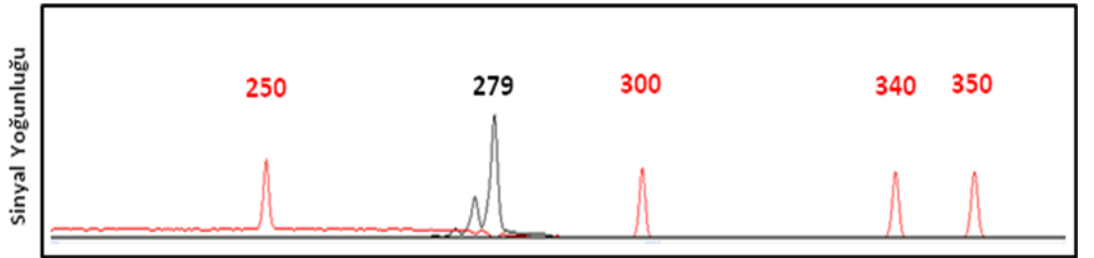
Şekil 20: AR geni ekson 1 bölgesinde 16 CAG tekrar sayısına sahip bireyin fragment analizi görüntüsü.



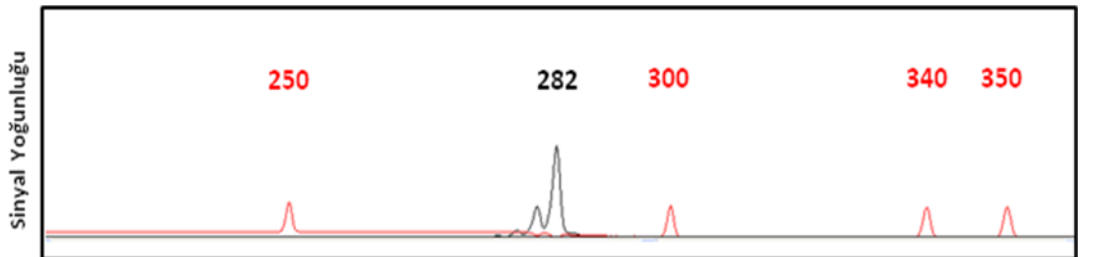
Şekil 21: AR geni ekson 1 bölgesinde 17 CAG tekrar sayısına sahip bireyin fragment analizi görüntüsü.



Şekil 22: AR geni ekson 1 bölgesinde 18 CAG tekrar sayısına sahip bireyin fragment analizi görüntüsü.



Şekil 23: AR geni ekson 1 bölgesinde 19 CAG tekrar sayısına sahip bireyin fragment analizi görüntüsü.



Şekil 24: AR geni ekson 1 bölgesinde 20 CAG tekrar sayısına sahip bireyin fragment analizi görüntüsü.

Fragment analizi yöntemi ile tekrar sayıları belirlenen örneklerden aynı tekrar sayısına sahip 5 bireyin sonuçları DNA analizi yöntemi ile doğrulandı (Şekil 25).

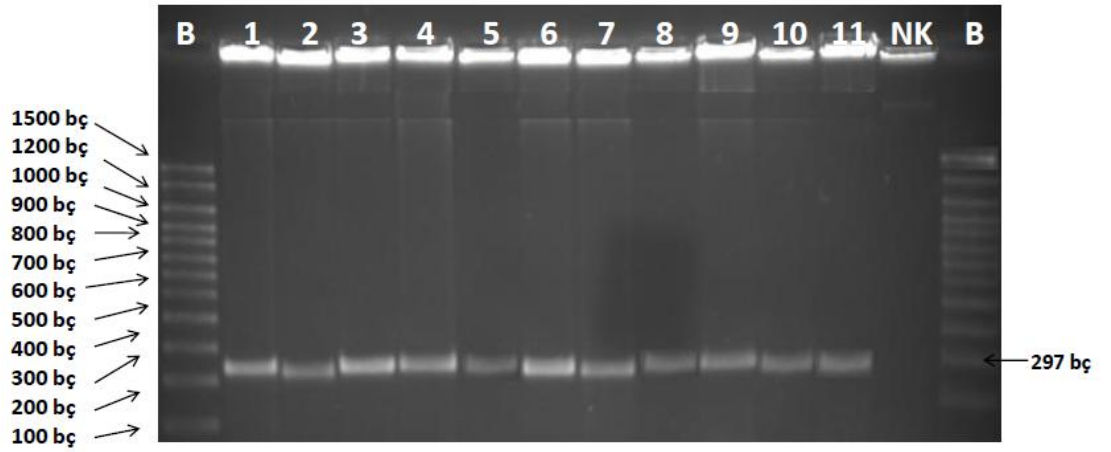
Tablo 12: Prostat kanserli bireylerde ve kontrollerde AR geni CAG tekrar sayısı polimorfizminin dağılımı

Genotipler	BPH n= 47		PCa N=50		P değeri	OO (%95 GA)	P değeri
	N	(%)	N	(%)			
(CAG)n tekrarları					0.666		
<17	12	27.3	10	23.3		1	
≥17	32	72.7	33	76.7		1.24 (0.47-3.26)	0.666

4.2.2. PSA/KLK3 Geni Kontrol Bölgesinde Yer alan -158

G>A (rs266882) Polimorfizmini İçeren Bölgenin PZT Sonuçları

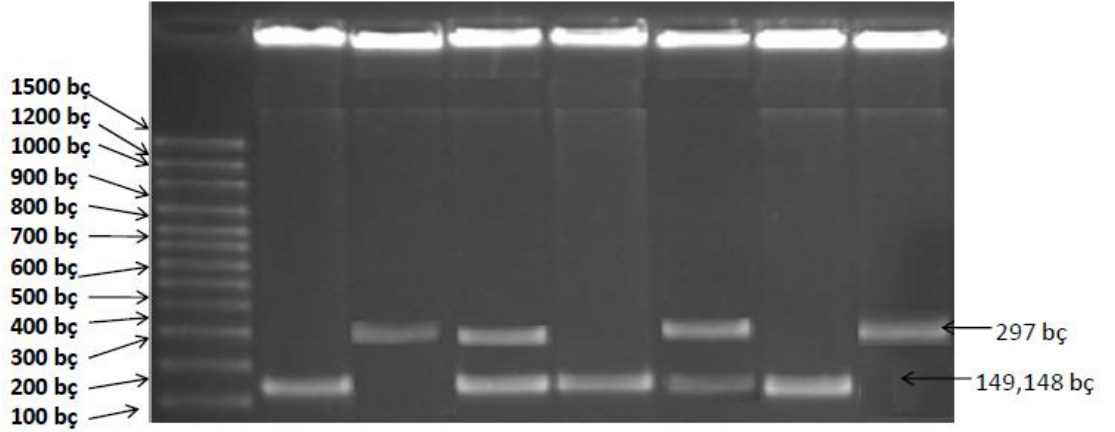
44 prostat kanseri ve 43 kontrole ait PZT ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütüldü. -158 G>A (rs266882) polimorfizmini içeren 297 bç uzunluğuna karşılık gelen bantlar moleküler ağırlık belirteci ile karşılaştırıldı (Şekil 26).



Şekil 26: 297 bç'lik bantları gösteren jel görüntüsü: -158 G>A (rs266882) polimorfizmini içine alan gen bölgesine ait PZT sonuçlarının %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü B: 100 DNA moleküler ağırlık belirteci, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9,10, 11 no'lu kuyular - PZT ürünleri.

4.2.2.1. PSA/KLK3 Geni Kontrol Bölgesinde Yer alan -158 G>A (rs266882) Polimorfizmini İçeren PZT Ürünlerinin *NheI* Restriksiyon Enzimi Kesim Sonuçları

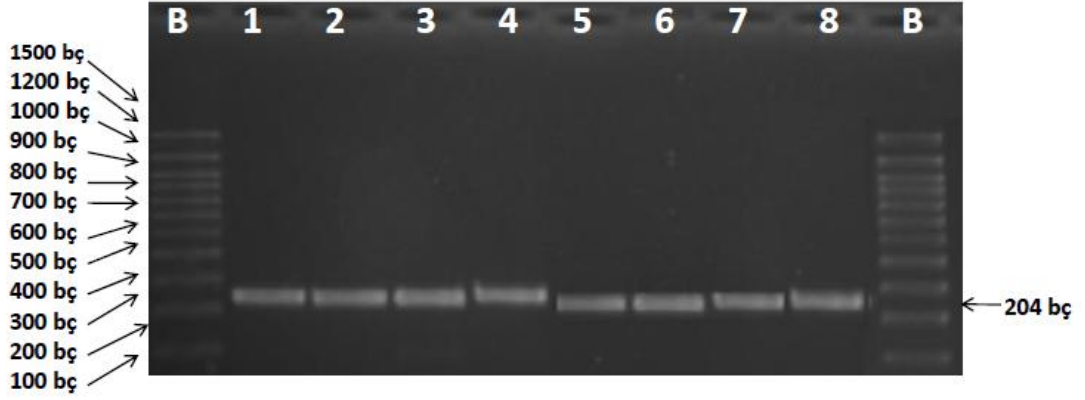
Prostat kanseri ve BPH çalışma grubunu oluşturan bireylerin -158 G>A (rs266882) polimorfizmi genotip sıklıklarını belirlemek için PZT ürünleri *NheI* restriksiyon enzimi ile kesime bırakıldı. Kesim ürünleri %2' lik agaroz jelde 100 bç'lik moleküler ağırlık belirteci eşliğinde 30 dk 100 volt sabit akımda yürütüldü ve Şekil 27' deki jel görüntüleri elde edildi.



Şekil 27: PSA/KLK3 geni kontrol bölgesinde yer alan -158 G>A (rs266882) polimorfizmini içeren PZT ürünlerinin *NheI* restriksiyon enzim kesimi B: 100 bç'lik moleküler ağırlık belirteci, 1, 4, 6. kuyular: GG genotipi, 3 ve 5. kuyular: GA genotipi, 2. kuyu: AA genotipi, 7. kuyu: Kesim yapılmamış PZT ürünü

4.2.3. PSA/KLK3 Geni Kontrol Bölgesinde Yer alan -252 G>A (rs4802754) Polimorfizmini İçeren Bölgenin PZT Sonuçları

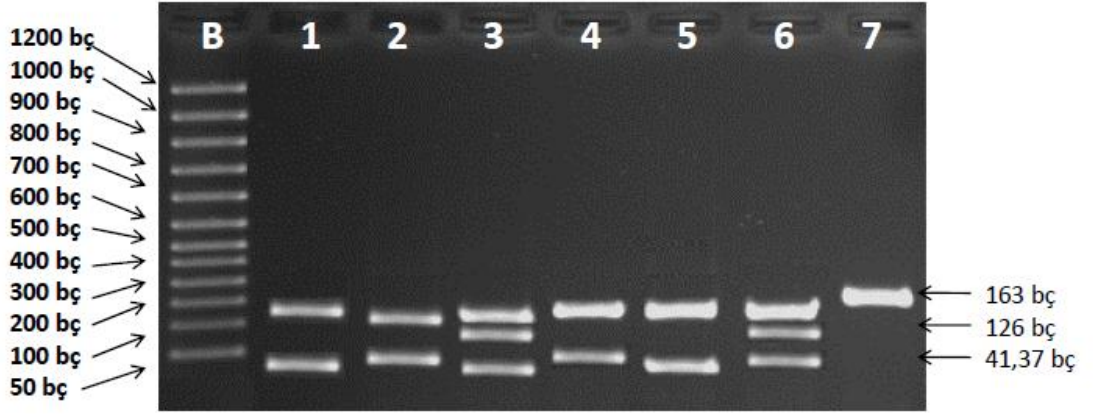
44 prostat kanseri ve 43 kontrole ait PZT ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütüldü. -252 G>A (rs4802754) polimorfizmini içeren 204 bç uzunluğuna karşılık gelen bantlar moleküler ağırlık belirteci ile karşılaştırıldı (Şekil 28).



Şekil 28: 204 bç'lik bantları gösteren jel görüntüsü: -252 G>A (rs4802754) polimorfizmini içine alan gen bölgesine ait PZT sonuçlarının %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü B: 100 bç'lik DNA moleküler ağırlık belirteci, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 no'lu kuyular - PZT ürünleri.

4.2.3.1. PSA/KLK3 Geni Kontrol Bölgesinde Yer alan -252 G>A (rs4802754) Polimorfizmini İçeren PZT Ürünlerinin *Nla*III Restriksiyon Enzimi Kesim Sonuçları

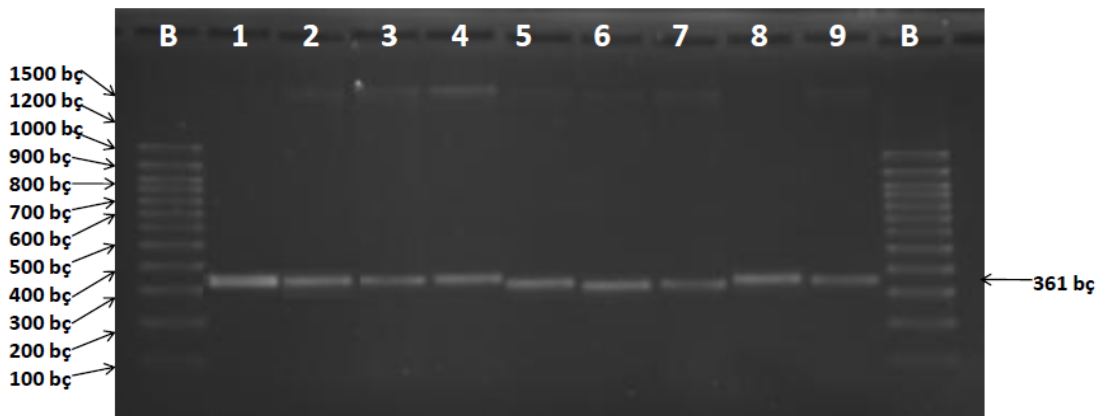
Prostat kanseri ve BPH çalışma grubunu oluşturan bireylerin -252 G>A (rs4802754) polimorfizmi genotip sıklıklarını belirlemek için PZT ürünleri *Nhe*I restriksiyon enzimi ile kesime bırakıldı. Kesim ürünleri %2'lik agaroz jelde 100 bç'lik moleküler ağırlık belirteci eşliğinde 30 dk 100 volt sabit akımda yürütüldü ve Şekil 29' deki jel görüntüleri elde edildi.



Şekil 29: PSA/KLK3 geni kontrol bölgesinde yer alan -252 G>A (rs4802754) polimorfizmini içeren PZT ürünlerinin *Nla*III restriksiyon enzimi kesimi. B: 100 bç'lik moleküler ağırlık belirteci, 1, 4, 5. kuyular: GG genotipi, 3 ve 6. kuyular: GA genotipi, 2. kuyu: AA genotipi, 7. kuyu: Kesim yapılmamış PZT ürünü

4.2.4. RNASEL Geni D541E T>G (rs627928) Polimorfizmini İçeren Bölgenin PZT Sonuçları

44 prostat kanseri ve 43 kontrole ait PZT ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütüldü. RNASEL Geni D541E T>G (rs627928) polimorfizmini içeren 361 bç uzunluğuna karşılık gelen bantlar moleküler ağırlık belirteci ile karşılaştırıldı (Şekil 30).

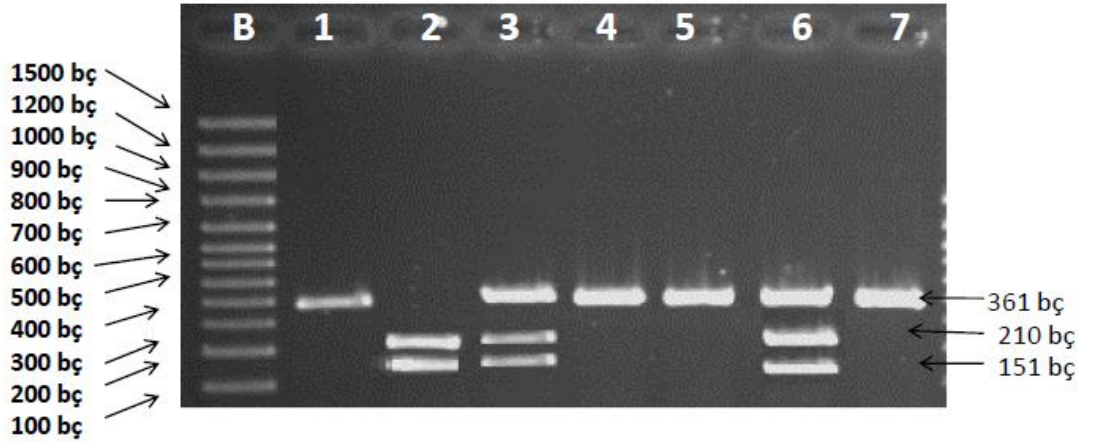


Şekil 30: 361 bç'lik bantları gösteren jel görüntüsü: RNASEL Geni D541E T>G (rs627928) polimorfizmini içeren gen bölgesine ait PZT sonuçlarının %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü B: 100 bç'lik DNA moleküler ağırlık belirteci, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 no'lu kuyular - PZT ürünleri.

4.2.4.1. RNASEL Geni D541E T>G (rs627928)

Polimorfizmini İçeren Bölgenin PZT Ürünlerinin *Mbol* Restriksiyon Enzimi Kesim Sonuçları

Prostat kanseri ve BPH çalışma grubunu oluşturan bireylerin RNASEL Geni D541E T>G (rs627928) polimorfizmi genotip sıklıklarını belirlemek için PZT ürünleri *Mbol* restriksiyon enzimi ile kesime bırakıldı. Kesim ürünleri %2' lik agaroz jelde 100 bç'lik moleküler ağırlık belirteci eşliğinde 30 dk 100 volt sabit akımda yürütüldü ve Şekil 31' deki jel görüntüleri elde edildi.



Şekil 31: RNASEL geni D541E T>G (rs627928) polimorfizmini içeren bölgenin PZT ürünlerinin *Mbol* restriksiyon enzim kesimi. B: 100 bç'lik moleküler ağırlık belirteci, 1, 4, 5. kuyular: GG genotipi, 3 ve 6. kuyular: GT genotipi, 2. kuyu: TT genotipi, 7. kuyu: Kesim yapılmamış PZT ürünü

Çalışmamızda PSA/KLK3 geninde tanımlanan -158 G>A (rs266882) polimorfizmi incelendiğinde, hasta grubunda 16 bireyde AA genotipi (%36.4), 10 bireyde GA genotipi (%22.7), 18 bireyde GG genotipi (%40.9) olarak belirlenirken, kontrol grubunda 18 bireyde AA genotipi (%41.9), 16 bireyde GA genotipi (%37.2), 9 bireyde GG genotipi (%20.9) olarak bulundu (Tablo 13). Hasta grubunda A alleli görülme sıklığı %47.7, G alleli görülme sıklığı %52.3 iken, kontrol grubunda A alleli görülme sıklığı %60.5 ve G alleli görülme sıklığı %39.5 olarak belirlendi (Tablo 13).

PSA/KLK3 geninin -158 G>A (rs266882) bölgesinin polimorfik dağılımları karşılaştırıldığında, prostat kanseri hastaları ve BPH kontrolleri arasında istatistiksel olarak bir fark elde edilmemiştir ($p>0.05$).

Tablo 13: Prostat kanserli hasta ve kontrollerde PSA/KLK3 geninin -158 G>A (rs266882) polimorfizminin dağılımı

Genotipler	BPH n= 43		PCa N=44		p değeri	OO (%95 GA)	p değeri
	N	(%)	N	(%)			
rs266882					0.106		
AA	18	41.9	16	36.4		1	
GA	16	37.2	10	22.7		0.70 (0.25-1.99)	0.505
GG	9	20.9	18	40.9		2.25 (0.79-6.40)	0.126
Alleler							
A	52	60.5	42	47.7		1	
G	34	39.5	46	52.3		1.67 (0.92-3.06)	0.092

OO, olasılıklar oranı; GA, güvenlik aralığı

Çalışmamızda PSA/KLK3 geninde tanımlanan -252 G>A (rs4802754) polimorfizmi incelendiğinde, hasta grubunda 32 bireyde GG genotipi (%72.7), 8 bireyde GA genotipi (%18.2), 4 bireyde AA genotipi (%9.1) olarak belirlenirken, kontrol grubunda 28 bireyde GG genotipi (%65.1), 13 bireyde GA genotipi (%30.2), 2 bireyde AA genotipi (%4.7) olarak bulundu (Tablo 14). Hasta grubunda G alleli görülme sıklığı %81.8, A alleli görülme sıklığı %18.2 iken, kontrol grubunda G alleli görülme sıklığı %80.2 ve A alleli görülme sıklığı %19.8 olarak belirlendi (Tablo 14).

PSA/KLK3 geninin -252 G>A (rs4802754) bölgesinin polimorfik dağılımları karşılaştırıldığında, prostat kanseri hastaları ve BPH kontrolleri arasında istatistiksel olarak bir fark elde edilmemiştir ($p>0.05$).

Tablo 14: Prostat kanserli hasta ve kontrollerde PSA/KLK3 geninin -252 G>A (rs4802754) polimorfizminin dağılımı

Genotipler	BPH n= 43		PCa N=44		p değeri	OO (%95 GA)	p değeri
	N	(%)	N	(%)			
rs4802754					0.348		
GG	28	65.1	32	72.7		1	
GA	13	30.2	8	18.2		0.54 (0.19-1.49)	0.229
AA	2	4.7	4	9.1		1.75 (0.30-10.29)	0.681
Alleler							
G	69	80.2	72	81.8		1	
A	17	19.8	16	18.2		0.90 (0.42-1.92)	0.790

OO, olasılıklar oranı; GA, güvenlik aralığı

Çalışmamızda RNASEL geninde tanımlanan D541E T>G (rs627928) polimorfizmi incelendiğinde, hasta grubunda 14 bireyde TT genotipi (%31.8), 13 bireyde TG genotipi (%29.6), 17 bireyde GG genotipi (%38.6) olarak belirlenirken, kontrol grubunda 18 bireyde TT genotipi (%41.9), 15 bireyde TG genotipi (%34.8), 10 bireyde GG genotipi (%23.3) olarak bulundu (Tablo 14). Hasta grubunda T alleli görülme sıklığı %46.6, G alleli görülme sıklığı %53.4 iken, kontrol grubunda T alleli görülme sıklığı %59.3 ve G alleli görülme sıklığı %40.7 olarak belirlendi (Tablo 15).

RNASEL geninin D541E T>G (rs627928) bölgesinin polimorfik dağılımları karşılaştırıldığında, prostat kanseri hastaları ve BPH kontrolleri arasında istatistiksel olarak bir fark elde edilmemiştir ($p>0.05$).

Tablo 15: Prostat kanserli hasta ve kontrollerde RNASEL geninin D541E T>G (rs627928) polimorfizminin dağılımı

Genotipler	BPH N= 43		PCa N=44		p değeri	OO (%95 GA)	p değeri
	N	(%)	N	(%)			
rs627928					0.294		
TT	18	41.9	14	31.8		1	
TG	15	34.8	13	29.6		1.11 (0.40-3.09)	0.835
GG	10	23.3	17	38.6		2.19 (0.77-6.23)	0.141
Alleler							
T	51	59.3	41	46.6		1	
G	35	40.7	47	53.4		1.67 (0.92-3.04)	0.093

OO, olasılıklar oranı; GA, güvenlik aralığı

5. TARTIŞMA

Kanser gelişimi ile ilişkili moleküler olaylar çok çeşitlidir ve henüz tam olarak tanımlanamamıştır. Kanser gibi hastalıkların mekanizmasına bakıldığında genelde komplike ve sıklıkla çoklu proteinlerin düzensizliklerinden oluştuğu görülmektedir. Proteinlerin yoğunluklarında, yapılarında veya fonksiyonlarındaki değişiklikler klinik semptomların ve tanıda önem taşıyan belirleyicilerin oluşumunda önemli rol oynamaktadırlar. Proteinlerin tanımlanması, kantitasyonu, sınıflandırılması bu moleküler olayların tam olarak anlaşılmasında çok önemlidir^{160,161}.

Organizmanın biyolojik özellikleri, genlerle kodlanan ürünlerin yapısı ve oluşan proteom fonksiyonları ile ortaya konur. Günümüzde proteomiklerle yapılan çalışmalarda en üzerinde durulan konu sağlıklı ve hastalık koşullarındaki yapı fonksiyon ilişkisinin tanımlanması ve seçiminde ifade edilen proteinlerdir. Genomik ve proteomik birlikteliği hastalık sürecinin bütünsel olarak anlaşılmasına olanak sağlayacaktır. Proteom düzeyindeki bilgi spesifik hücre fonksiyonları ve bunların sağlık ve hastalıktaki fonksiyonlarının anlaşılmasında çok önemlidir. Hastalık patogeneğinde oluşan önemli değişikliklerin açığa çıkarılmasında protein düzeyindeki ekspresyon analizi gereklidir. Proteomikler hücre ve çevre koşullarının fonksiyonel yolları arasındaki ilişkileri RNA düzey değişikliklerinden bağımsız olarak anlaşılmasını sağlar¹⁶².

Kanser proteomikleri, sağlıklı dokudan farklı hastalık evrelerinde tanımlama ve kantitatif analiz için eksprese edilen proteinleri kapsar. Proteom hem hücrenin intrinsek genetik programı hem de bulunduğu çevrenin etkisini yansıttığı için proteomikler biyobelirleyici keşfinde de önemlidir.

Kanser kontrolü ve önlenmesinde erken saptama önemlidir. Biyobelirleyiciler hücrenin herhangi bir zamandaki durumuyla ilişkili çok değerli bilgiler sağlamaya yardımcı olurlar. Bir hücre sağlıklı halden neoplastik duruma transforme olurken uygun biyobelirleyiciler kullanılarak oluşan değişiklikler gösterilebilir. Biyobelirleyici araştırmaları teknolojiadaki gelişmelerden proteomikler alanında çok faydalar sağlamıştır.

Prostat kanseri erkeklerde diğer solid tümörlerden daha yüksek insidansa sahip en ciddi onkolojik hastalıklardan biridir. Günümüzde dünyada ikinci kanser mortalite nedenidir. Prostat kanserinin tanınmasında tümör belirleyici olarak Prostat-Spesifik-Antijenin (PSA) keşfi önemli bir buluş olmuştur. Ancak PSA testinin prostat kanserini benign prostat hiperplazisinden ayırt edilmesinde düşük özgüllüğü nedeniyle zorluk yaşanmakta ve kanserin erken evre tanısını kısıtlamaktadır.

Prostat spesifik antijenin prostat adenokarsinomunun tanımlanmasında kullanılabilecek bir serum belirleyicisi olduğunu bildiren ilk bilim adamı olan Stamey¹⁶³, 2004 yılında PSA çağının artık tamamlandığını PSA'nın sadece BPH tanımlanmasında kullanılabileceğini, prostat kanserinin ve evrelerinin belirlenebilmesi için acilen yeni belirleyicilere gereksinim olduğunu bildirmiştir^{164,165}. Qu ve ark. da PSA testinin prostat kanseri taramasında %90 üzerinde duyarlılık taşımasına rağmen prostat kanserini BPH'dan ayırmadaki özgüllüğünün sadece %25 olduğunu vurgulamışlardır¹⁶⁶.

Bugüne kadar laboratuvarlarda tanıya yönelik olarak yapılmış olan protein miktar tayinleri kanser erken tanısından çok uzak olup, halen tanı amacıyla kullanılan belirleyiciler de gerek özgüllüğü ve gerekse duyarlılıkları yönünden çok sayıda yalancı pozitiflik nedeniyle gereksiz biyopsi yapılmasına neden olmaktadır. Ayrıca duyarlılıkların düşük olması

nedeniyle de kanser erken tanısı amacıyla kullanılamamaktadır. Günümüzde kullanılan tanımlama sistemleri ile yapılan tek belirleyici analizleri ile tümör belirleyici olarak kullanılan proteinlerin özgüllük ve duyarlılıkları eşik değeri ile değişmektedir. Eşik değeri tüm negatifleri tespit etmek üzere ayarlandığında bir miktar kanser oluşumu başlayan hastaların negatif gibi değerlendirilmesi söz konusu iken, eşik değeri tüm pozitifleri tespit etmek üzere ayarlandığında ise yalancı pozitif sonuç verilen bir hasta grubu olduğu gözlenmektedir. Tek belirleyici analizinde karşılaşılan bu 'gri bölge' çoklu-belirleyici analizi ile ortadan kaldırılmakta, yüksek özgüllük ve duyarlılıkta erken dönemde kanser tanısı mümkün olmaktadır^{160,161,168,169}.

Birden fazla belirleyici tanımlanması ve analizinin yapılmasının kanser oluşumunun erken dönemde tespitinde önemli rol oynadığı bilinmektedir. Günümüzde kullanılan tek belirleyici analizi ile elde edilen yalancı negatif ve yalancı pozitifliklerin ortadan kaldırılması ve kanser varlığının tespit edilebilme düzeyini son evrelerden ilk ve ikinci evrelere taşımak çoklu-belirleyici protein analizi ile mümkün olmaktadır. Bu bilgiler ışığında bir belirleyici panelinin oluşturulması ve tespiti ile tek belirleyici analize göre daha yüksek duyarlılık ve özgüllükte hastalık tanımlanması yapılabilmektedir^{160,161,168}.

SELDI-TOF teknolojisi biyoçip üzerinde kimyasal olarak modifiye edilmiş yüzeye, selektif olarak adsorbe edilen ilgili proteinlerin affinite-esaslı kütle spektrometrik yöntemle analiz edilmesidir. Bu teknoloji duyarlı ve yüksek bir verimde kompleks biyolojik örneklerin protein profillerine ulaşmayı sağlar. Bugün proteomiklerle yapılan çalışmalarda birçok kanser türlerinin erken tanısı ile ilgili olarak sağlıklı ve kanserli hastaların protein bantları karşılaştırılarak birden fazla tümör belirleyici bantlar tespit edilmiş ve değişik bilgisayar karar ağaçları oluşturularak test duyarlılık ve özgüllükleri artırılmıştır^{161,169}. Protein profillerinin

değerlendirilmesi için geliştirilmiş olan yazılım programları proteomik verilerin analizi için çok önem taşımaktadır.

Klinik proteomik yaklaşımları arasında SELDI-TOF birçok kanser tipinin serum esaslı saptama ve ayırımında başarılı bir yöntem olarak görülmektedir. Yapılan çalışmalar, tüm kanser hastalarında %93-100 duyarlılık, kontrollerde %91-100 özgüllük (bootstrap cross validation) gösterdiğini ortaya koymaktadır^{168,169}.

SELDI esaslı kütle spektrometre yöntemlerinin prostat kanserinin erken tanısında PSA'ya alternatif ve tamamlayıcı belirleyiciler keşfedilmesinde çok başarılı olduğu konusunda birçok araştırma bulunmaktadır.

1999 yılında çip platformunda SELDI sisteminin prostat kanseri biyobelirleyicileri konusunda serum ve seminal plazmada çok hızlı verimli maliyet etkin sonuçlar verebileceği ile ilgili çalışmayı¹⁷⁰ takiben yapılan araştırmalarda birçok protein hastalık ve sağlık koşullarını ayırt edebilmek için tanımlanmıştır. Bu izleyen çalışmalarda da kütle spektrometresinin prostat kanseri tanı ve prognoz takibinde kullanılabileceğine dikkat çekmiştir¹⁷¹.

SELDI-TOF'un ilk prostat kanseri biyobelirleyici saptanmasına ilişkin yapılan çalışmalardan biri Adam ve ark 167 prostat kanseri, 77 BPH hastası ve 82 sağlıklı kontrolle yapılan araştırmadır¹⁷². Değerlendirmede oluşturulan karar ağaçlarının örneklerin %96'sını doğru olarak tanımladığını, algoritmanın körlemesine test sonuçlarında duyarlılığın %97, özgüllüğün ise %83 olduğunu ortaya koymuştur. Aynı araştırma grubu 3000-5000 Da proteinlerinin intraepitelyal neoplazi ve prostat kanseri hastalarında yüksek miktarlarda olduğunu bildirmişlerdir¹⁷³.

SELDI-MS ile 386 hasta (98 geç evre prostat kanseri, 99 erken evre prostat kanseri, 93 benign prostat hipertrofisi ve 96 normal kontrol) üzerine yapılan çalışmada kanser ve BPH grubunun normal kontrol grubundan kolayca ayrılabilirdiğini ancak prostat kanseri ve BPH ayırımının doğru olarak yapılamadığını bildirilmiştir¹⁷⁴.

Qu ve ark 2002 yılında yayınladığı PSA özgüllüğünün prostat kanseri ve BPH ayırımında yetersiz olduğunu vurguladıkları 386 hastada yaptıkları çalışmalarında (197 prostat kanseri, 93 BPH ve 96 sağlıklı birey), prostat kanseri ve kanser olmayan örneklerdeki ayırımın AdaBoost classifier analiz programı ile %100 duyarlılık ve özgüllük, Boosted Decision Tree programı ile %97 duyarlılık ve özgüllükte yapılabildiğini bildirmişlerdir¹⁶⁶.

Grizzle ve ark 2003 yılında yaptıkları bir kohort çalışmada prostat kanseri ve sağlıklı grup karşılaştırılması için kullanılacak serum protein parmak izi çıkarılmasında SELDI-TOF'un PSA ile karşılaştırıldığında çok yüksek duyarlılık ve özgüllük taşıdığını göstermişlerdir¹⁷⁵.

Serumun yanı sıra doku örnekleri de proteomik yöntemlerle çalışılmıştır. Kanserli ve kansersiz doku örneklerinin proteom çalışmaları, doku metalloproteinaz inhibitor-1 ekspresyon azalması ile hastalık ve sağlık durumlarının ayrılabilirdiğini ve doku örneklerinin de protein çip kütle spektrometre sistemi ile kantitatif olarak değerlendirilebileceğini ortaya koymuştur¹⁷⁶.

Pan ve ark. 83 prostat kanseri 95 sağlıklı kontrol grubunun değerlendirildiği araştırmalarında, prostat kanserinde 15000-16000 Da ağırlığı arasında 4 yükselen düzeyde, 3000-9000 Da ağırlığı arasında 14 azalan düzeyde serum proteini bildirmişlerdir¹⁷⁷.

Protein profillemeye ile biyobelirleyici validasyonu doğru olarak yapıldığı zaman hastanın tanısı ve tedavi optimizasyonunun birçok kanser hastalığına katkısı olacağı bir başka çalışma ile vurgulanmıştır¹⁵¹.

SELDI-TOF MS ile serum ve doku dışında kan, idrar, seminal plazma gibi farklı örnekler de çalışılabilmektedir¹⁷⁸. Post-prostatik masaj ile idrar örneklerinin Q10, CM10, IMAC30 farklı çipler ve optimizasyon koşulları ile çalışıldığı SELDI-TOF MS araştırması benign hastalık ve kanser ayırımında farklı örneklerin de kullanılabileceğini ortaya koymuştur¹⁷⁹.

Son yıllarda yapılan araştırmalarda ise kanser evreleri arasındaki protein profillerinin de SELDI-TOF MS ile ayırt edilebileceğini vurgulamaktadır. Gleason skorları ile tanımlanan agresif olmayan ve olan prostat kanserleri farklı protein ekspresyonları gösterilebilmektedir¹⁸⁰.

Kütle spektrometre yöntemlerindeki gelişmeler de daha spesifik protein biyobelirleyicilerin keşfedilebileceğini göstermektedir. Sun ve ark göreceli ve mutlak kantitasyon için izobarik işaretleyicilerle çalıştıkları proteomik araştırmasında, periostinin spesifik bir belirleyici olarak prostat kanseri ve BPH ayırımında ve tedavi gelişmelerinde de hedef olarak kullanılabileceğini göstermişlerdir¹⁸¹.

Bu çalışma bildiğimiz kadarıyla prostat kanseri proteomikleri konusunda ülkemizde yapılan ilk araştırmadır. Bu çalışmanın ilk bölümünde prostat kanseri, BPH ve sağlıklı kontrol grup serum örneklerinin protein profilleri SELDI-TOF MS ile incelenmiştir.

Prostat kanseri olan grupta BPH ve sağlıklı kontrol grubuyla karşılaştırıldığında ekspresyonları değişen 7 farklı serum proteini saptanmıştır. Prostat kanseri grubunda normal serum seviyesinden düşük

olan 4 ve yüksek olan 3 tane protein belirlenmiştir. Sağlıklı erkek hastalar grubuyla karşılaştırıldığında prostat kanseri grubunda 6447 Da ve 6628 Da ağırlığındaki proteinler serumda düşük seviyelerde ve 8134 Da protein yüksek seviyelerde bulunmuştur.

Kontrol grubu olarak kullanılan radikal prostatektomi yapılmış PSA değeri 0 olan bireyler hasta grubuyla karşılaştırıldığında prostat kanseri grubunda 5580 Da ve 6628 Da ağırlığındaki proteinler serumda ekspresyonlarının azaldığı ve 8939 Da protein ekspresyonunun arttığı belirlenmiştir.

PSA yüksekliğine sekonder birden fazla biopsi yapılmış ve prostat kanseri saptanmamış hasta grubuyla karşılaştırıldığında prostat kanseri grubunda 6428 Da ağırlığındaki protein serumda düşük seviyelerde ve 4481 Da protein yüksek seviyelerde bulunmuştur. Tüm bu proteinler içerisinde tüm hasta grupları ile karşılaştırmada prostat kanserli hasta grubunda serumda daha düşük seviyelerde saptanan 6628 Da ağırlığındaki protein ayrıcalıklı olarak değerlendirilmiştir. 6628 Da ağırlığındaki proteinin azalan ekspresyonu Türk toplumunda prostat kanser biyobelirleyicileri arasında dikkat çekici bir özellik taşımaktadır.

Hastalık ve sağlık durumunun ayrılmasında SELDI-TOF MS etkinliği değerlendirilecek olursa, prostat kanseri, benign hipertrofi ve PSA 0 olan tüm hastalıkla ilişkili gruplar ve sağlıklı kontrol grubu karşılaştırıldığında hastalıkla ilişkili gruplarda 2566 Da, 5152 Da ve 6438 Da ağırlığındaki proteinler serumda ekspresyonunun azaldığı kontrol grubunda ise arttığı gözlenmiştir.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar diğer araştırmaların belirttiği prostat kanserinde 3000-9000 Da arası azalan protein profilleri ile uyum göstermektedir. Ancak benzer aralıklarda olsa da ülkemizdeki protein profilleri belirtilen diğer verilerden toplumsal değişikliklerle ilişkili

olduğunu düşündüğümüz farklılıklar göstermektedir. Belirlediğimiz proteinler içinde en ayrıcalıklı aday biyobelirleyici olduğunu düşündüğümüz 6628 Da proteini, Yang ve ark bir başka kanser türünde küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde SELDI-TOF MS ile bir azalan miktarda olan bir belirleyici olarak bildirmişlerdir¹⁸². Küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde geçerliliğini geriye dönük çalışmalarla ortaya koydukları 6628 Da ağırlığındaki protein, apolipoprotein C-1 olarak tanımlanmıştır. Engwegen ve ark ise bir başka çalışmada 6.6 kDa ağırlığındaki proteini apolipoprotein C-1 olarak tanımlamış ve kolorektal kanserlerde bir biyobelirleyici olarak saptamışlardır¹⁸³. Fan ve ark ise 6631 Da proteini tiroid papiller karsinomda aday biyobelirleyici olarak öne sürmüşlerdir¹⁸⁴.

Kansere genetik duyarlılığın aydınlatılması konusunda son yıllarda yoğun çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Uluslar arası İnsan Genom Sekanslama Projesi ve Uluslararası HapMap Projesi insan genomundaki lokasyon, kantite ve genetik varyantların sıklığı ve tipi konusunda çok fazla miktarda veri sağlamıştır. Teknolojik gelişmeler de daha hızlı ve ucuz genotiplendirme sonuçları sağladıkça aday genlerdeki varyantlar ve kanser riski arasındaki ilişkiye yönelik çok sayıda araştırma bulunmaktadır¹⁸⁵⁻¹⁸⁷. Genetik polimorfizmler kanser riski konusunda yapılan meta-analizler ve havuzlanmış analizlerin sonucunda prostat kanseri ile en çok ilişkili gen ve varyant değerlendirilmesi, 4274 olguda AR geninde CAG21 tekrar varyantları, 8013 olguda CYP17 rs6892 varyantları ve 3038 olguda RNASEL Asp541Glu varyantları olduğunu ortaya koymuştur¹⁸⁵. Üzerinde en çok çalışılan bölgelerden biri de PSA geni ve gen promoter aktivitesini etkileyecek polimorfizmlerin serum PSA düzeyine etkileri olarak dikkat çekmektedir¹⁸⁶.

AR geni 20'nin altında olan CAG tekrarlarının prostat kanseri riskini arttırdığı özellikle Afroamerikan, Kafkasyalı ve Yahudi

populasyonları gibi kapalı toplumlarda yapılan çalışmalarda bildirilmiştir. Ancak farklı çalışmalarda çelişkili sonuçlar gözlenmektedir. Kısa CAG tekrarlarının prostat kanserinin şiddeti ve erken yaşta tanısı ile olan ilişkisi saptanırken prostat kanser riski konusunda bir belirleyici olamayacağı vurgulanmıştır¹⁸⁸. Price ve ark. 1159 prostat kanseri ve 1353 kontrol grubu üzerine yaptıkları çalışma ile CAG tekrarları arasında herhangi bir anlamlı fark olmadığını ve prostat kanser riskinin ön görülmesinde klinik olarak önemli bir bilgi vermediğini bildirmektedirler¹⁸⁹.

Çalışmamızda prostat kanserli hastalarda AR geni ekson 1'deki (CAG tekrar sayısı 17'den düşük olanların sıklığı %23.3 ve 17 ve üzeri CAG tekrar sayısına sahip bireylerin sıklığı ise %76.7'dir. Kontrol grubunda ise CAG tekrar sayısı 17'den düşük olanların sıklığı %27.3 ve 17 ve üzeri CAG tekrar sayısına sahip bireylerin sıklığı ise %72.7'dir. Ancak hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak bir fark belirlenmemiştir ($p>0.05$).

PSA ve RNASEL gen polimorfizmleri ile ilişkili sonuçlar da çelişkiler göstermektedir. -158 ve -252 PSA gen polimorfizmlerinin incelendiği Japon toplumunda prostat kanser riski ve hastalık progresyonu, BPH riski ve serum PSA düzeyleri ile ilişkisi gösterilememiştir¹⁹⁰. Güney Brezilya toplumunda yaşları 60 ile 79 arası değişen 170 hasta ile yapılan çalışmada, kısa CAG tekrarları yanısıra PSA GG genotipinin artmış prostat kanser riski ve tümör agresifliği ile ilişkisi bildirilmiştir¹⁹¹. A.B.D.'de 193 olgu, 391 kontrol grubuyla yapılan PSA-252 G/A and -158 G/A SNPs ve AR CAG tekrarlarının prostat kanser riski ile ilişkisinin incelendiği çalışmada, -252 G / -158G haplotipleri ve kısa AR CAG tekrarlarının prostat kanseri oluşma riskini 4 kat, ileri evre kanser riskini 7 kat arttırdığı gösterilmiştir¹⁹².

PSA/KLK3 geninde tanımlanan -158 G>A (rs266882) polimorfizmi incelendiğinde, hasta grubunda 16 bireyde AA genotipi

(%36.4), 10 bireyde GA genotipi (%22.7), 18 bireyde GG genotipi (%40.9) olarak belirlenirken, kontrol grubunda 18 bireyde AA genotipi (%41.9), 16 bireyde GA genotipi (%37.2), 9 bireyde GG genotipi (%20.9) olarak bulunmuştur. Hasta grubunda A alleli görülme sıklığı %47.7, G alleli görülme sıklığı %52.3 iken, kontrol grubunda A alleli görülme sıklığı %60.5 ve G alleli görülme sıklığı %39.5 olarak belirlenmiştir. PSA/KLK3 geninin -158 G>A (rs266882) bölgesinin polimorfik dağılımları karşılaştırıldığında, prostat kanseri hastaları ve BPH kontrolleri arasında istatistiksel olarak bir fark elde edilmemiştir ($p>0.05$).

Çalışmamızda PSA/KLK3 geninde tanımlanan -252 G>A (rs4802754) polimorfizmi incelendiğinde, hasta grubunda 32 bireyde GG genotipi (%72.7), 8 bireyde GA genotipi (%18.2), 4 bireyde AA genotipi (%9.1) olarak belirlenirken, kontrol grubunda 28 bireyde GG genotipi (%65.1), 13 bireyde GA genotipi (%30.2), 2 bireyde AA genotipi (%4.7) olarak bulunmuştur. Hasta grubunda G alleli görülme sıklığı %81.8, A alleli görülme sıklığı %18.2 iken, kontrol grubunda G alleli görülme sıklığı %80.2 ve A alleli görülme sıklığı %19.8 olarak belirlenmiştir. PSA/KLK3 geninin -252 G>A (rs4802754) bölgesinin polimorfik dağılımları karşılaştırıldığında, prostat kanseri hastaları ve BPH kontrolleri arasında istatistiksel olarak bir fark elde edilmemiştir ($p>0.05$).

Ribonükleaz L kodlayan RNASEL, son yıllarda prostat kanseri ile ilişkili genler konusunda üzerinde en çok çalışılan gen bölgelerinden biridir. Wie ve ark. 19 olgu-kontrol çalışmasını inceledikleri meta-analizlerinde RNASEL Asp541Glu ve Arg462Gln polimorfizmlerinin prostat kanseri ile ilişkisini değerlendirmişlerdir. Analiz sonucuna göre özellikle Kafkas popülasyonunda RNASEL polimorfizmleri ve prostat kanser riski arasında herhangi bir ilişki saptanamazken, alt grup analizlerinde sporadik prostat kanserinde RNASEL 541Gln allelinin düşük penetrasyonlu risk faktörü olabileceğini bildirmişlerdir¹⁹³.

Meyer ve ark.'nın 1286 olgu ve 1264 kontrolle yaptıkları RNASEL ile prostat kanseri risk ve progresyon ilişkisini araştırdıkları çalışmada özellikle rs12757998 allelinin artmış prostat kanser riski ile ilişkisini ortaya koymuştur. Viral enfeksiyonlarda interferon aracılı immün yanıtın bir parçası olan RNASEL'in prostat kanser risk bağlantısının da inflamasyon üzerinden olabileceğini öne sürmüşlerdir¹⁹⁴.

Mi ve ark.'nın RNASEL polimorfizmleri ve prostat kanser risk ilişkisini değerlendirdikleri 13372 olgu ve 11953 kontrol içeren 14 araştırmayı değerlendirdikleri çalışmada R462Q and D541E polimorfizmlerinin rolünü özellikle Afrikalı ve Kafkasyalı'larda belilemişler ve sporadik prostat kanserinde de artmış riski saptamışlardır¹⁹⁵.

Ülkemizden Güneş ve ark yapmış oldukları 148 prostat kanseri ve 136 BPH hasta ve 102 sağlıklı kontrol grubunda PSA promoter bölge -158 (G/A) ve 17 hidroksilaz (CYP17 -34T/C) polimorfizmi ile ilişki tek çalışmada, PSA gen promoter varyasyonlarının prostat kanseri ve BPH'da, CYP 17 gen polimorfizminin de sadece BPH'da önemli rol oynayabileceği bildirilmiştir¹⁹⁶. Prostat kanseri ile ilişkili olduğu düşünülen farklı gen bölgeleriyle ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Bir başka ülkemizden yapılan benzeri gen bölgesi 17 hidroksilaz ve 5- α redüktaz II polimorfizmleri ve prostat kanseri ilişkisinin incelendiği çalışmada da herhangi bir anlamlı sonuç elde edilememiştir¹⁹⁷.

Çalışmamızda RNASEL geninde tanımlanan D541E T>G (rs627928) polimorfizmi incelendiğinde, hasta grubunda 14 bireyde TT genotipi (%31.8), 13 bireyde TG genotipi (%29.6), 17 bireyde GG genotipi (%38.6) olarak belirlenirken, kontrol grubunda 18 bireyde TT genotipi (%41.9), 15 bireyde TG genotipi (%34.8), 10 bireyde GG genotipi (%23.3) olarak bulunmuştur. Hasta grubunda T alleli görülme sıklığı %46.6, G alleli görülme sıklığı %53.4 iken, kontrol grubunda T alleli görülme sıklığı %59.3

ve G alleli görülme sıklığı %40.7 olarak belirlenmiştir. RNASEL geninin D541E T>G (rs627928) bölgesinin polimorfik dağılımları karşılaştırıldığında, prostat kanseri hastaları ve BPH kontrolleri arasında istatistiksel olarak bir fark elde edilmemiştir ($p>0.05$). Çalışılan gen polimorfizmlerinin daha fazla sayıda hasta ve kontrol gruplarında değerlendirilmesinin, Türk toplumunun geneli hakkında daha anlamlı veriler elde edilmesini sağlayacağını düşünmekteyiz.

Gen polimorfizmlerinin aydınlatılması birçok hastalığın patogenezinin, tanı, prognoz takibi ve tedavisinin belirlenmesinde çok önemli faydalar sağlamaktadır. Proteinler ise bir hücrenin fonksiyonel çıktısıdır ve dinamik ağın intrinsek kısmını oluştururlar. Hücrel proteom dinamiktir ve hastalık gelişimini bir parçası olarak değişik sinyallere değişik yanıtlar oluşumun göstergesidir. Bu posttranslasyonel modifikasyonlar, translokasyon, protein-protein ve protein-nükleik asit etkileşimleri yoluyla oluşur¹⁹⁸. Kanser proteomiklerinin önemli bir yönü protein gruplarına hedeflenebilme ve analiz edebilme özellikleridir.

Proteomikler kanser çalışmalarında genomik esaslı yaklaşımları tamamlarlar. Erken evre kanserlerin saptanması için presemptomatik tarama kanserle ilişkili mortalite ve tedavi ile ilişkili morbiditeyi azaltır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar proteomiklerin kanser erken tanısında oldukça doğru ve yeni bir yaklaşım yaratacağını ortaya koymaktadır. Genotip ve proteom ilişkisinin ortaya konulabilmesi için daha geniş gruplarda ve daha ileri çalışmalara gerek duyulmaktadır.

6. SONUÇLAR

Bu tez çalışmasında Türk toplumundaki prostat kanseri protein profilleri ve prostat kanseri ile ilişkili sıklıkla üzerinde çalışılan gen polimorfizmleri incelendi.

Çalışmanın ilk bölümünde proteom analizi prostat kanseri, benign hastalık ve sağlıklı kontrol gruplarına SELDI-TOF MS ile yapıldı. Çalışmanın ikinci bölümünde yapılan moleküler genetik analiz ise Androjen Reseptör (AR), Prostat Spesifik Antijen (PSA) promotör bölge ve RNASEL gen polimorfizmlerine yönelik gerçekleştirildi. Yapılan proteom ve moleküler genetik analizler sonucunda aşağıdaki veriler elde edildi.

Çalışmanın ilk bölümündeki proteom analizi verilerine göre,

1. Kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında prostat kanseri olan grupta 7 farklı serum proteini belirlendi ($p < 0.01$) Prostat kanseri grubunda normal serum seviyesinden düşük olan 4 ve yüksek olan 3 tane protein bulundu.
2. Sağlıklı erkek hastalar grubuyla karşılaştırıldığında prostat kanseri grubunda 6447 Da ve 6628 Da ağırlığındaki proteinler serumda düşük seviyelerde ve 8134 Da protein yüksek seviyelerde bulundu.
3. PSA yükseklğine sekonder birden fazla biopsi yapılmış ve prostat kanseri saptanmamış hasta grubuyla karşılaştırıldığında prostat kanseri grubunda 6428 Da ağırlığındaki protein serumda düşük seviyelerde ve 4481 Da protein yüksek seviyelerde bulundu.
4. PSA 0 olan hasta grubuyla karşılaştırıldığında prostat kanseri grubunda 5580 Da ve 6628 Da ağırlığındaki proteinler serumda düşük seviyelerde ve 8939 Da protein yüksek seviyelerde bulundu.
5. Prostat kanseri, BPH ve PSA 0 olan tüm hastalıkla ilişkili gruplar ve sağlıklı kontrol grubu karşılaştırıldığında hastalıkla ilişkili gruplarda 2566 Da, 5152 Da ve 6438 Da ağırlığındaki proteinler serumda

düşük seviyelerde kontrol grubunda ise yüksek seviyelerde bulundu.

6. Tüm bu proteinler içerisinde tüm hasta grupları ile karşılaştırmada prostat kanserli hasta grubunda serumda daha düşük seviyelerde saptanan 6628 Da ağırlığındaki protein ayrıcalıklı olarak değerlendirildi ($p<0.001$).

Çalışmanın ikinci bölümündeki moleküler genetik analiz verilerine göre,

7. AR geni ekson 1 bölgesinde CAG tekrar polimorfizmleri için 13 ve 22 arasında farklı tekrar sayıları izlendi. Ancak hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak bir fark belirlenmedi ($p>0.05$).
8. PSA/KLK3 geni kontrol bölgesinde yer alan -158 G>A (rs266882) polimorfizmini incelendiğinde, hasta grubunda 16 bireyde AA genotipi (%36.4), 10 bireyde GA genotipi (%22.7), 18 bireyde GG genotipi (%40.9) olarak belirlenirken, kontrol grubunda 18 bireyde AA genotipi (%41.9), 16 bireyde GA genotipi (%37.2), 9 bireyde GG genotipi (%20.9) olarak bulundu. Hasta grubunda A alleli görülme sıklığı %47.7, G alleli görülme sıklığı %52.3 iken, kontrol grubunda A alleli görülme sıklığı %60.5 ve G alleli görülme sıklığı %39.5 olarak belirlendi.
9. PSA/KLK3 geninin -158 G>A (rs266882) bölgesinin polimorfik dağılımları karşılaştırıldığında, prostat kanseri hastaları ve BPH kontrolleri arasında istatistiksel olarak bir fark elde edilmedi ($p>0.05$).
10. PSA/KLK3 geninde tanımlanan -252 G>A (rs4802754) polimorfizmi incelendiğinde, hasta grubunda 32 bireyde GG genotipi (%72.7), 8 bireyde GA genotipi (%18.2), 4 bireyde AA genotipi (%9.1) olarak belirlenirken, kontrol grubunda 28 bireyde GG genotipi (%65.1), 13 bireyde GA genotipi (%30.2), 2 bireyde AA genotipi (%4.7) olarak bulundu. Hasta grubunda G alleli görülme sıklığı %81.8, A alleli

görülme sıklığı %18.2 iken, kontrol grubunda G alleli görülme sıklığı %80.2 ve A alleli görülme sıklığı %19.8 olarak belirlendi.

11. PSA/KLK3 geninin -252 G>A (rs4802754) bölgesinin polimorfik dağılımları karşılaştırıldığında, prostat kanseri hastaları ve BPH kontrolleri arasında istatistiksel olarak bir fark elde edilmedi.
12. RNASEL geninde tanımlanan D541E T>G (rs627928) polimorfizmi incelendiğinde, hasta grubunda 14 bireyde TT genotipi (%31.8), 13 bireyde TG genotipi (%29.6), 17 bireyde GG genotipi (%38.6) olarak belirlenirken, kontrol grubunda 18 bireyde TT genotipi (%41.9), 15 bireyde TG genotipi (%34.8), 10 bireyde GG genotipi (%23.3) olarak bulundu (Tablo 14). Hasta grubunda T alleli görülme sıklığı %46.6, G alleli görülme sıklığı %53.4 iken, kontrol grubunda T alleli görülme sıklığı %59.3 ve G alleli görülme sıklığı %40.7 olarak belirlendi (Tablo 14).
13. RNASEL geninin D541E T>G (rs627928) bölgesinin polimorfik dağılımları karşılaştırıldığında, prostat kanseri hastaları ve BPH kontrolleri arasında istatistiksel olarak bir fark elde edilmedi ($p>0.05$).
14. Prostat kanserinde kapalı toplumlarda daha sıklıkla saptanan polimorfizmler, BPH ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

Sonuç olarak prostat kanseri kesitsel proteom incelemesinde Türk toplumuna özgü protein profilleri ilk kez belirlenmiştir. Bunlar arasında 6628 Da ağırlığındaki protein ayrıcalıklı olarak dikkat çekmektedir. Çoklu biyobelirleyici çalışmaları kanser gibi karmaşık patogeneze sahip hastalıkların erken tanı, takip ve yeni tedavi stratejilerinin belirlenmesinde önemli faydalar sağlayacaktır.

7. ÖZET

Türk toplumunda prostat kanseri proteom profillerinin ve androjen reseptör, PSA, RNASEL gen polimorfizmlerinin incelenmesi

Kanserin erken tanısı, kontrol ve önlenmesinde en önem taşıyan basamaktır. Proteom ve genom çalışmaları, kanser tanısı, prognoz takibi ve tedavi planlanmasını aydınlatacak veriler sağlamaktadır. Kanserin proteomik analizi aday biyobelirleyicilerin saptanması konusunda yeni fırsatlar sunmaktadır.

Bu çalışmanın amacı Türk toplumunda prostat kanseri protein profillerinin proteomiklerle belirlenmesi, Türk toplumuna ait prostat kanseri serum çoklu biyobelirleyicilerin tanımlanması ve prostat kanseri ile ilişkili sıklıkla üzerinde çalışılan gen polimorfizmlerinin incelenmesidir.

Proteom profilleri 47 prostat kanseri, 50 benign prostat hiperplazisi, 20 PSA 0 prostatektomi sonrası hasta ve 20 sağlıklı kişi serumlarında surface enhanced laser desorption/ionization time-of-flight (SELDI-TOF) kütle spektrometresi ile analiz edildi. Moleküler genetik analiz Androjen Reseptör (AR) CAG tekrarları, Prostat Spesifik Antijen (PSA) promoter bölge ve RNASEL gen polimorfizmlerine yönelik yapıldı.

Proteom analizi sonucunda kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında prostat kanseri olan grupta 7 farklı serum proteini belirlendi ($p<0.01$). Prostat kanseri grubunda normal serum seviyesinden düşük olan 4 ve yüksek olan 3 tane protein bulundu. 6628 Da ağırlığındaki protein ayrıcalıklı olarak değerlendirildi ($p<0.001$). Yapılan moleküler genetik analizler sonucunda ise AR geni ekson 1 bölgesinde (CAG)n tekrarları PSA -158, PSA -252, ve RNASEL D541E polimorfizmleri prostat

kanseri ve benign prostat hiperplazisi kontrol grubunda istatistiki olarak anlamlı bulunmadı.

Proteom alışmaları ile prostat kanseri için farklı biyobelirleyiciler tanımlanması mümkün olabilmektedir. Türk toplumu için kesitsel de olsa özellikle prostat kanserinde yeni bir biyobelirleyici (6628 Da) dikkat çekmektedir. AR geni CAG kısa tekrarları, PSA promoter bölge ve RNASEL D541E polimorfizmlerinin prostat kanser riski ile ilişkisi konusunda anlamlı bir sonuç elde edilememiştir. Proteom ve genotip ilişkisinin ortaya konulabilmesi için daha ileri çalışmalara gerek duyulmaktadır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar proteomik çalışmaların kanser erken tanısında oldukça doğru ve yeni bir yaklaşım yaratabileceğini ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler: Prostat kanseri, proteom, genetik polimorfizm, SELDI-TOF MS, biyobelirleyici

8. SUMMARY

Investigation of proteome profiles and androgen receptor, PSA, RNASEL gene polymorphisms related to prostate cancer in Turkish population

The early detection of cancer is crucial for its ultimate control and prevention. Proteome and genome studies provide data and new insights into cancer diagnosis, following the prognosis and treatment plans. Proteomic analysis of cancer provides new opportunities to identification of candidate biomarkers.

The aim of this study is to determine protein profiles of prostate cancer patients in Turkish population, identify multiple biomarkers in serum and investigate related frequent gen polymorphisms in prostate cancer.

Proteom profiles were analyzed for 47 prostate cancer, 50 benign prostate hiperplazi and 20 post prostatectomy PSA value 0 patients and 20 healthy control group by surface enhanced laser desorption/ionization time-of-flight (SELDI-TOF) mass spectrometry. Molecular genetic analysis were carried out towards the polymorphisms of Androgen Receptor (AR) CAG repeats, Prostate Specific Antigen (PSA) promoter region and RNASEL gene.

Seven serum differential proteins were identified in the PCa group compared with the control groups ($P < 0.01$) in proteome analysis. There were 4 proteins at the lower serum level and 3 proteins at the higher serum level in the PCa group. 6628 Da was evaluated as special and privileged for prostate cancer ($p < 0.001$). According to the molecular genetic analysis there were no statistical difference between prostate

cancer and benign prostate hyperplasia groups due to the polymorphisms of (CAG)_n repeats in AR gene ekson 1 region. PSA -158, PSA -252 and RNASEL D541E.

It is possible to identify different biomarkers for prostate cancer by means of proteomic studies. In this sectional study, a new serum biomarker (6628 Da) of PCa for Turkish population is remarkable. The results show that there is no significant relationship between AR gene short repeats and polymorphisms of promoter region of PSA gene and RNASEL D541E. Further studies should be performed to clarify the proteome and genotype association. Results obtained from this study show that proteomic researches will provide a highly accurate and innovative approach for the early diagnosis of cancer.

Key words: Prostate cancer, proteome, genetic polymorphism, SELDI-TOF MS, biomarker

9. KAYNAKLAR

1. Prostat hastalığı [online] 2008;
<http://www.prostathastaligi.blogspot.com>
2. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, et al. Cancer statistics, 2008. CA Cancer J Clin 2008; 58: 71-96.
3. Merrill RM, Stephenson RA. Trends in mortality rates in patients with prostate cancer during the era of prostate specific antigen screening. J Urol 2000; 163: 503-10.
4. Epstein JI, Allsbrook WC Jr, Amin MB, Egevad LL. The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. Am J Surg Pathol 2005; 29: 1228-42.
5. 9. Üroonkoloji Kongresi [online] 2009;
<http://www.uroonkoloji.org/content.php?id=94>
6. Kral M, Rosinska V, Student V, Grepl M, Hrabec M, Bouchal J. Genetic determinants of prostate cancer: a review. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2011; 155(1): 3-9.
7. Chan DW, Sell S. Tumor markers. In Burtis CA, Ashwood ER editors, Tietz Textbook of Clinical Chemistry, W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1999; p.722-749.

8. Connetl ID. Epidemiology, etiology, pathophysiology, and diagnosis of benign prostatic hyperplasia. In Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED, Wein AJ editors, Campbell's Urology, W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1998; p. 1429-1452.
9. Pienta KJ. Etiology, epidemiology, and prevention of the carcinoma of the prostate. In Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED, Wein AJ editors, Campbell's Urology, W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1998; p. 2489-2496.
10. Stephenson RA, Smart CR, Mineau GP. The fall in incidence of prostate carcinoma. *Cancer* 1995; 77: 1342-8.
11. Brothman AR. Cytogenetics and Molecular Genetics of Cancer of the Prostate. *Semin Med Genet*, 2002; 115: 150-156.
12. Carter BS, Bova S, Beaty TH, Steinberg GD, Childs B, Isaacs WB, et al. Hereditary prostate cancer: epidemiology and clinical features. *J Urol* 1993; 150:797 -802.
13. Ross RK, Bernstein L, Lobo RA, Shimizu H, Stanczyk FZ, Pike MC, et al. 5 alpha-reductase activity and risk of prostate cancer among Japanese and US white and black males. *Lancet* 1992; 339: 887-9.
14. Walsh P, Retik A, Vaughan D, Wein A; Campbell's Urology (Seventh Edition); Volume 3; 2489-2625, 1998.

- 15.Chan JM, Giovannucci E, Andersson SO, Yuen J, Adami HO, Wolk A. Dairy products, calcium, phosphorous, vitamin D, and risk of prostate cancer (Sweden). *Cancer Causes Control* 1998; 9: 559-66.
- 16.DiMascio P, Kaiser S, Sies H: Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Arch Biochem Biophys* 1989; 274: 532.
- 17.van den Brandt PA, Zeegers MP, Bode P, Goldbohm RA Toenail selenium levels and the subsequent risk of prostate cancer: a prospective cohort study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2003; 12(9): 866-71.
- 18.Sigounas G, Anagnostou A, Steiner M: dl-alpha-tocopherol induces apoptosis in erythroleukemia, prostate, and breast cancer cells. *Nutr Cancer* 1997;28:30.
- 19.Strope SA, Andriole GL. Update on chemoprevention for prostate cancer. *Curr Opin Urol* 2010;20: 194-7.
- 20.Klein EA, Platz EA, Thompson IM. Epidemiology, Etiology, and Prevention of Prostate Cancer. In: Wein AJ, Kavoussi LR, Novick AC, Partin AW, Peters CA. *Campbell-Walsh Urology*, Saunders, Philadelphia, 9th ed., 2007;2854-2867.
- 21.Bernal-Delgado, E., J. Latour-Perez, F. Pradas-Arnal & L. I. Gomez-Lopez. The association between vasectomy and prostate

- cancer: a systematic review of the literature. *Fertil Steril* 1998; 70: 191-200.
22. Dennis, L. K., D. V. Dawson & M. I. Resnick. Vasectomy and the risk of prostate cancer: a meta-analysis examining vasectomy status, age at vasectomy, and time since vasectomy. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2002; 5: 193-203.
23. Steroid Hormones and Receptors. 2011; <http://themedicalbiochemistrypage.org/steroid-hormones.html>
24. Hsing AW, Reichardt KVJ, Stanczyk ZF. Hormones and prostate cancer: current perspectives and future directions. *The Prostate* 2002; 52: 213-235.
25. Feldman BJ, Feldman D. The development of androgen-independent prostate cancer. *Nat Rev Cancer*. 2001;1(1):34-45.
26. Ntais C, Polycarpou A, Ioannidis JPA. SRD5A2 gene polymorphisms and the risk of prostate cancer: a meta-analysis, *Cancer Epidemiol Biomarkers & Prevent* 2003; 12: 618-624.
27. Heinlein C, Chang C. Androgen receptor (AR) coregulators: an overview. *Endoc Rev* 2002; 23(2): 175-200.
28. Cunha GR, Donjacour AA, Cooke P5, Mee S, Bigsby RM, Higgins SJ, et al. The endocrinology and developmental biology of the prostate. *Endocrine Reviews*. 1987; 8: 338- 362.

29. Imperato-McGinley J, Gautier T, Zirinsky K, Hom T, Palomo O, Stein E, et al. Prostate visualization studies in males homozygous and heterozygous for 5- α reductase deficiency. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1992; 75: 1022-1026.
30. Berry SJ, Coffey DS, Walsh PC, Ewing LL. The development of human benign prostatic hyperplasia with age. *J Urol* 1984; 132: 474- 479.
31. Behere HM, Bohmeyer J, Nieschlag E. Prostate volume in testosterone-treated untreated hypogonadal men in comparison to age-matched normal controls: *Clin Endocr* 1994; 40: 341-349.
32. Brawley WO. Hormonal prevention of prostate cancer. *Urologic Oncology* 2003; 21: 67-72.
33. Lamharzi N, Johnson MM, Goodman G, Etzioni R, Weiss NS, Dightman DA, et al. Polymorphic markers in the 5- reductase type II gene and the incidence of prostate cancer. *Int J Cancer* 2003; 105: 480-483.
34. Carter BS, Beaty TH, Steinberg GD, Childs B, Walsh PC. Mendelian inheritance of familial prostate cancer. *Proc Natl AcadSci U S A* 1992; 89: 3367-71.
35. Bratt O. Hereditary prostate cancer: clinical aspects. *J Urol* 2002; 168: 906-13.

36. Carter BS, Bova GS, Beaty TH, Steinberg GD, Childs B, Isaacs WB, et al. Hereditary prostate cancer: epidemiologic and clinical features. *J Urol* 1993; 150: 797-802.
37. Schaid DJ, McDonnell SK, Blute ML, Thibodeau SN. Evidence for autosomal dominant inheritance of prostate cancer. *Am J Hum Genet* 1998; 62: 1425-38.
38. Zeegers MP, Jellema A, Ostrer H. Empiric risk of prostate carcinoma for relatives of patients with prostate carcinoma: a metaanalysis. *Cancer* 2003; 97:1894-903.
39. Bruner DW, Moore D, Parlanti A, Dorgan J, Engstrom P. Relative risk of prostate cancer for men with affected relatives: systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer* 2003; 107:797-803.
40. Kalish LA, McDougal WS, McKinlay JB. Family history and the risk of prostate cancer. *Urology* 2000; 56:803-6.
41. Mastalski K, Coups EJ, Ruth K, Raysor S, Giri VN. Substantial family history of prostate cancer in black men recruited for prostate cancer screening: results from the Prostate Cancer Risk Assessment Program. *Cancer* 2008; 113:2559-64.
42. Chen YC, Page JH, Chen R, Giovannucci E. Family history of prostate and breast cancer and the risk of prostate cancer in the PSA era. *Prostate* 2008; 68:1582-91.

43. Valeri A, Briollais L, Azzouzi R, Fournier G, Mangin P, Berthon P, et al. Segregation analysis of prostate cancer in France: evidence for autosomal dominant inheritance and residual brother-brother dependence. *Ann Hum Genet* 2003; 67: 125-37.
44. Verhage BA, Baffoe-Bonnie AB, Baglietto L, Smith DS, Bailey-Wilson JE, Beaty TH, et al. Autosomal dominant inheritance of prostate cancer: a confirmatory study. *Urology* 2001; 57: 97-101.
45. Verkasalo PK, Kaprio J, Koskenvuo M, Pukkala E. Genetic predisposition, environment and cancer incidence: a nationwide twin study in Finland, 1976-1995. *Int J Cancer* 1999; 83: 743-749.
46. Page WF, Braun MM, Partin AW, Caporaso N, Walsh P. Heredity and prostate cancer: a study of World War II veteran twins. *Prostate* 1997; 33: 240-5.
47. Kokontis JM, Liao S. Molecular action of androgen in the normal and neoplastic prostate. *Vitam Horm* 1999; 55: 219-307.
48. Shang Y, Myers M, Brown M. Formation of the androgen receptor transcription complex. *Mol Cell* 2002; 9: 601-610.
49. Gottlieb B, Beitel LK, Wu JH, Trifiro M. The androgen receptor gene mutations database (ARDB): 2004 update. *Hum Mutat* 2004; 23: 527-33.

50. Brooke GN, Bevan CL. The role of androgen receptor mutations in prostate cancer progression. *Curr Genomics* 2009; 10: 18-25.
51. Beilin J, Ball EM, Favaloro JM, Zajac JD. Effect of the androgen receptor CAG repeat polymorphism on transcriptional activity: specificity in prostate and non-prostate cell lines. *J Mol Endocrinol* 2000; 25:85-96.
52. Kazemi-Esfarjani P, Trifiro MA, Pinsky L. Evidence for a repressive function of the long polyglutamine tract in the human androgen receptor: possible pathogenetic relevance for the (CAG)_n expanded neuropathies. *Hum Mol Genet* 1995; 4: 523-527.
53. Chamberlain NL, Driver ED, Miesfeld RL. The length and location of CAG trinucleotide repeats in the androgen receptor N terminal domain affect transactivation function. *Nucleic Acids Res* 1994; 22: 3181-3186.
54. Narla G, Friedman SL, Martignetti JA. Kruppel cripples prostate cancer: KLF6 progress and prospects. *Am J Pathol* 2003; 162: 1047- 52.
55. Suzuki H, Ueda T, Ichikawa T, Ito H. Androgen receptor involvement in the progression of prostate cancer. *Endocr Relat Cancer* 2003; 10: 209-16.

56. Chen C, Lamharzi N, Weiss NS, Etzioni R, Dightman DA, Barnett M et al. Androgen receptor polymorphisms and the incidence of prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; 11: 1033- 40.
57. Silva Neto B, Koff WJ, Biolchi V, Brenner C, Biolo KD, Spritzer PM, et al. Polymorphic CAG and GGC repeat lengths in the androgen receptor gene and prostate cancer risk: analysis of a Brazilian population. *Cancer Invest* 2008; 26: 74-80.
58. Brinkmann AO. Molecular basis of androgen insensitivity. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 179: 105-9.
59. Marcelli M, Ittmann M, Mariani S, Sutherland R, Nigam R, Murthy L, et al. Androgen receptor mutations in prostate cancer. *Cancer Res* 2000; 60: 944-9.
60. Visakorpi T, Hyytinen E, Koivisto P, Tanner M, Keinänen R, Palmberg C, et al. In vivo amplification of the androgen receptor gene and progression of human prostate cancer. *Nat Genet* 1995; 9:401-406.
61. Heinlein CA, Chang C. Androgen receptor in prostate cancer. *Endocr Rev* 2004; 25: 276-308.
62. Ford OH 3rd, Gregory CW, Kim D, Smitherman AB, Mohler JL. Androgen receptor gene amplification and protein expression in recurrent prostate cancer. *J Urol* 2003; 170: 1817-1821.

63. Koivisto P, Kononen J, Palmberg C, Tammela T, Hyytinen E, Isola J, et al. Androgen receptor gene amplification: a possible molecular mechanism for androgen deprivation therapy failure in prostate cancer. *Cancer Res* 1997; 57: 314-319.
64. Koivisto P, Visakorpi T, Kallioniemi OP. Androgen receptor gene amplification: a novel molecular mechanism for endocrine therapy resistance in human prostate cancer. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 1996; 226:57-63.
65. Linja MJ, Savinainen KJ, Saramaki OR, Tammela TL, Vessella RL, Visakorpi T. Amplification and overexpression of androgen receptor gene in hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 3550-3555.
66. Bentel JM, Tilley WD. Androgen receptors in prostate cancer. *J Endocrinol* 1996; 151:1-11.
67. Buchanan G, Greenberg NM, Scher HI, Harris JM, Marshall VR, Tilley WD. Collocation of androgen receptor gene mutations in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 1273-1281.
68. Culig Z, Hobisch A, Hittmair A, Cronauer MV, Radmayr C, Bartsch G, et al. Androgen receptor gene mutations in prostate cancer. Implications for disease progression and therapy. *Drugs Aging* 1997; 10: 50-58.

69. Marcelli M, Ittmann M, Mariani S, Sutherland R, Nigam R, Murthy L, et al. Androgen receptor mutations in prostate cancer. *Cancer Res* 2000; 60: 944-949.
70. Newmark JR, Hardy DO, Tonb DC, Carter BS, Epstein JI, Isaacs WB et al. Androgen receptor gene mutations in human prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 6319-6323.
71. Suzuki H, Sato N, Watabe Y, Masai M, Seino S, Shimazaki J. Androgen receptor gene mutations in human prostate cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1993; 46: 759-765.
72. Taplin ME, Rajeshkumar B, Halabi S, Werner CP, Woda BA, Picus J, et al. Androgen receptor mutations in androgen-independent prostate cancer: Cancer and Leukemia Group B Study 9663. *J Clin Oncol* 2003; 21:2673-2678.
73. Taplin ME, Bubley GJ, Ko YJ, Small EJ, Upton M, Rajeshkumar B, et al. Selection for androgen receptor mutations in prostate cancers treated with androgen antagonist. *Cancer Res* 1999; 59: 2511-2515.
74. Tilley WD, Buchanan G, Hickey TE, Bentel JM. Mutations in the androgen receptor gene are associated with progression of human prostate cancer to androgen independence. *Clin Cancer Res* 1996; 2: 277-285.

75. Wallen MJ, Linja M, Kaartinen K, Schleutker J, Visakorpi T. Androgen receptor gene mutations in hormone-refractory prostate cancer. *J Pathol* 1999; 189:559-563.
76. Taplin ME, Bubley GJ, Shuster TD, Frantz ME, Spooner AE, Ogata GK et al. Mutation of the androgen-receptor gene in metastatic androgen-independent prostate cancer. *N Engl J Med* 1995; 332:1393-1398.
77. Veldscholte J, Ris-Stalpers C, Kuiper GGJ, Jenster G, Berrevoets C, Claassen E, et al. A mutation in the ligand binding domain of the androgen receptor of human LNCaP cells affects steroid binding characteristics and response to anti-androgens. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;173: 534-540.
78. Veldscholte J, Voorhorst-Ogink MM, Bolt-de Vries J, van Rooij HC, Trapman J, Mulder E. Unusual specificity of the androgen receptor in the human prostate tumor cell line LNCaP: high affinity for progestagenic and estrogenic steroids. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1052: 187-194.
79. Tan J, Sharief Y, Hamil KG, Gregory CW, Zang DY, Sar M, et al. Dehydroepiandrosterone activates mutant androgen receptors expressed in the androgen-dependent human prostate cancer xenograft CWR22 and LNCaP cells. *Mol Endocrinol* 1997; 11: 450-459.
80. Alvarado C, Beitel LK, Sircar K, Aprikian A, Trifiro M, Gottlieb B. Somatic mosaicism and cancer: a micro-genetic examination into

the role of the androgen receptor gene in prostate cancer. *Cancer Res* 2005; 65: 8514-8518.

81. Buchanan G, Yang M, Cheong A, Harris JM, Irvine RA, Lambert PF, et al. Structural and functional consequences of glutamine tract variation in the androgen receptor. *Hum Mol Genet* 2004; 13: 1677-1692.

82. Schoenberg MP, Hakimi JM, Wang S, Bova GS, Epstein JI, Fischbeck KH, et al. Microsatellite mutation (CAG₂₄→18) in the androgen receptor gene in human prostate cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 198: 74-80.

83. Slagsvold T, Kraus I, Fronsdal K, Saatcioglu F. DNA binding independent transcriptional activation by the androgen receptor through triggering of coactivators. *J Biol Chem* 2001; 276: 31030-31036.

84. Rios-Doria J, Kuefer R, Ethier SP, Day ML. Cleavage of beta catenin by calpain in prostate and mammary tumor cells. *Cancer Res* 2004; 64: 7237-7240.

85. Pawlowski JE, Ertel JR, Allen MP, Xu M, Butler C, Wilson EM, et al. Liganded androgen receptor interaction with beta-catenin: nuclear co-localization and modulation of transcriptional activity in neuronal cells. *J Biol Chem* 2002; 277: 20702-20710.

86. Voeller HJ, Truica CI, Gelmann EP. Beta-catenin mutations in human prostate cancer. *Cancer Res* 1998; 58: 2520-2523.
87. Chesire DR, Ewing CM, Sauvageot J, Bova GS, Isaacs WB. Detection and analysis of betacatenin mutations in prostate cancer. *Prostate* 2000; 45: 323-334.
88. Bakin RE, Gioeli D, Sikes RA, Bissonette EA, Weber MJ. Constitutive activation of the ras/mitogen-activated protein kinase signaling pathway promotes androgen hypersensitivity in Incap prostate cancer cells. *Cancer Res* 2003; 63:1981-1989.
89. Mellinghoff IK, Vivanco I, Kwon A, Tran C, Wongvipat J, Sawyers CL. HER2/neu kinasedependent modulation of androgen receptor function through effects on DNA binding and stability. *Cancer Cell* 2004; 6:517-527.
90. MacGrogan D, Levy A, Bostwick D, Wagner M, Wells D, Bookstein R. Loss of chromosome arm 8p loci in prostate cancer: mapping by quantitative allelic imbalance. *Genes Chromosomes Cancer* 1994; 10: 151-159.
91. Balk SP, Ko YJ, Bubley GJ. Biology of prostate-specific antigen. *J Clin Oncol* 2003; 21: 383–391.
92. Riegman PH, Vlietstra RJ, van der Korput JA, Brinkmann AO, Trapman J. The promoter of the prostate-specific antigen gene contains a functional androgen responsive element. *Mol Endocrinol* 1991; 5: 1921-1930.

93. Cleutjens KB, van Eekelen CC, van der Korput HA, Brinkmann AO, Trapman J. Two androgen response regions cooperate in steroid hormone regulated activity of the prostate-specific antigen promoter. *J Biol Chem* 1996; 271: 6379-6388.
94. Yang QF, Sakurai T, Shan L, Yu Z, Yoshimura G, Suzuma T, et al. Novel polymorphisms of prostate-specific antigen (PSA) gene associated with PSA mRNA expression in breast cancer. *J Hum Genet* 2000; 45: 363-366.
95. Xue WM, Coetzee GA, Ross RK, Irvine R, Kolonel L, Henderson BE, et al. Genetic determinants of serum prostate-specific antigen levels in healthy men from a multiethnic cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10: 575-579.
96. Xue W, Irvine RA, Yu MC, Ross RK, Coetzee GA, Ingles SA. Susceptibility to prostate cancer: interaction between genotypes at the androgen receptor and prostate-specific antigen loci. *Cancer Res* 2000; 60(4): 839-841.
97. Gsur A, Preyer A, Haidinger G, Zidek T, Madersbacher S, Schatzl G, et al. Polymorphic CAG repeats in the androgen receptor gene, prostate-specific antigen polymorphism and prostate cancer risk. *Carcinogenesis* 2002; 23(10): 1647-1651.
98. Binnie MC, Alexander FE, Heald C, Habib FK. Polymorphic forms of prostate specific antigen and their interaction with androgen

receptor trinucleotide repeats in prostate cancer. *Prostate* 2005; 63(4): 309–315.

99. Cramer SD, Chang BL, Rao A, Hawkins GA, Zheng SL, Wade WN, et al. Association between genetic polymorphisms in the prostate-specific antigen gene promoter and serum prostate-specific antigen levels. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 1044-53.
100. Majumdar S, Diamandis EP. The promoter and the enhancer region of the KLK 3 (prostate specific antigen) gene is frequently mutated in breast tumours and in breast carcinoma cell lines. *Br J Cancer* 1999; 79: 1594–1602.
101. Tsuyuki D, Grass L, Diamandis EP. Frequent detection of mutations in the 5' flanking region of the prostate-specific antigen gene in female breast cancer. *Eur J Cancer* 1997; 33: 1851–1854.
102. Yang QF, Sakurai T, Shan L, Yu Z, Yoshimura G, Suzuma T, et al. Novel polymorphisms of prostate-specific antigen (PSA) gene associated with PSA mRNA expression in breast cancer. *J Hum Genet* 2000; 45: 363–366.
103. Ostrander EA, Johannesson B. Prostate cancer susceptibility loci: finding the genes. *Adv Exp Med Biol* 2008;617: 179-90.
104. Klein EA, Platz EA, Thompson IM. Epidemiology, Etiology, and Prevention of Prostate Cancer. In: Wein AJ, Kavoussi LR, Novick AC, Partin AW, Peters CA. *Campbell-Walsh Urology*, Saunders, Philadelphia, 9th ed., 2007; 2854-67.

105. Stanford JL, McDonnell SK, Friedrichsen DM, Carlson EE, Kolb S, Deutsch K et al. Prostate cancer and genetic susceptibility: a genome scan incorporating disease aggressiveness. *Prostate* 2006; 66: 317-25.
106. Easton DF, Schaid DJ, Whittemore AS, Isaacs WJ. Where are the prostate cancer genes? A summary of eight genome wide searches. *Prostate* 2003; 57: 261-9.
107. Schaid DJ. The complex genetic epidemiology of prostate cancer. *Hum Mol Genet* 2004; 13 Spec No 1: R103-21.
108. Hatcher D, Daniels G, Osman I, Lee P. Molecular mechanisms involving prostate cancer racial disparity. *Am J Transl Res* 2009;1: 235-48.
109. Simard J, Dumont M, Labuda D, Sinnott D, Meloche C, El-Alfy M, et al. Prostate cancer susceptibility genes: lessons learned and challenges posed. *EndocrRelat Cancer* 2003; 10: 225-59.
110. Smith JR, Freije D, Carpten JD, Grönberg H, Xu J, Isaacs SD, et al. Major susceptibility locus for prostate cancer on chromosome 1 suggested by a genome wide search. *Science* 1996; 274: 1371-1374.
111. Xu J. Combined analysis of hereditary prostate cancer linkage to 1q24-25: results from 772 hereditary prostate cancer

families from the International Consortium for Prostate Cancer Genetics. *Am J Hum Genet* 2000; 66: 945-957.

112. Smith JR, Freije D, Carpten JD, Gronberg H, Xu J, Isaacs SD, et al. Major susceptibility locus for prostate cancer on chromosome 1 suggested by a genome-wide search. *Science* 1996; 274: 1371-4.
113. Gronberg H, Isaacs SD, Smith JR, Carpten JD, Bova GS, Freije D, et al. Characteristics of prostate cancer in families potentially linked to the hereditary prostate cancer 1 (HPC1) locus. *JAMA* 1997; 278: 1251-5.
114. Li H, Tai BC. RNASEL gene polymorphisms and the risk of prostate cancer: a meta-analysis. *Clin Cancer Res* 2006;12: 5713-9.
115. Shook SJ, Beuten J, Torkko KC, Johnson-Pais TL, Troyer DA, Thompson IM, Leach RJ. KC et al. Association of RNASEL variants with prostate cancer risk in Hispanic Caucasians and African Americans. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 5959-64.
116. Kotar K, Hamel N, Thiffault I, Foulkes WD. The RNASEL 471delAAAG allele and prostate cancer in Ashkenazi Jewish men. *J Med Genet* 2003; 40: e22.
117. Rennert H, Bercovich D, Hubert A, Abeliovich D, Rozovsky U, Bar-Shira A, et al. A novel founder mutation in the RNASEL

gene, 471delAAAG, is associated with prostate cancer in Ashkenazi Jews. *Am J Hum Genet* 2002; 71: 981-4.

118. Orr-Urtreger A, Bar-Shira A, Bercovich D, Matarasso N, Rozovsky U, Rosner S, et al. RNASEL mutation screening and association study in Ashkenazi and non-Ashkenazi prostate cancer patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15: 474-9.
119. Rebbeck TR, Walker AH, Zeigler-Johnson C, Weisburg S, Martin AM, Nathanson KL, et al. Association of HPC2/ELAC2 genotypes and prostate cancer. *Am J Hum Genet* 2000; 67: 1014-9.
120. Shea PR, Ferrell RE, Patrick AL, Kuller LH, Bunker CH. ELAC2 and prostate cancer risk in Afro-Caribbeans of Tobago. *Hum Genet* 2002; 111: 398-400.
121. Baffoe-Bonnie AB, Smith JR, Stephan DA, Schleutker J, Carpten JD, Kainu T, et al. A major locus for hereditary prostate cancer in Finland: localization by linkage disequilibrium of a haplotype in the HPCX region. *Hum Genet* 2005;117:307-16.
122. Farnham JM, Camp NJ, Swensen J, Tavtigian SV, Albright LA. Confirmation of the HPCX prostate cancer predisposition locus in large Utah prostate cancer pedigrees. *Hum Genet* 2005; 116: 179-85.
123. Berry R, Schroeder JJ, French AJ, McDonnell SK, Peterson BJ, Cunningham JM, et al. Evidence for a prostate cancer-

susceptibility locus on chromosome 20. *Am J Hum Genet* 2000; 67: 82-91.

124. Kodama T, Freeman M, Rohrer L, Zabrecky J, Matsudaira P, Krieger M. Type I macrophage scavenger receptor contains alpha-helical and collagen-like coiled coils. *Nature* 1990; 343:531-535.
125. Platt N, Gordon S. Is the class A macrophage scavenger receptor (SR-A) multifunctional? - The mouse's tale. *J Clin Invest* 2001; 108:649-654.
126. Bova GS, Carter BS, Bussemakers JG, Emi M, Fujiwara Y, Kyprianou N, et al. Homozygous deletion and frequent allelic loss of chromosome 8p22 loci in human prostate cancer. *Cancer Res* 1993; 53: 3869-3873.
127. Xu J, Zheng SL, Komiya A, Mychaleckyj JC, Isaacs SD, Chang B, et al. Common sequence variants of the macrophage scavenger receptor 1 gene are associated with prostate cancer risk. *Am J Hum Genet* 2003; 72: 208-212.
128. Xu J, Zheng SL, Komiya A, Mychaleckyj JC, Isaacs SD, Hu JJ, et al. Germline mutations and sequence variants of the macrophage scavenger receptor 1 gene are associated with prostate cancer risk. *Nat Genet* 2002; 32: 321-325.
129. Miller DC, Zheng SL, Dunn RL, Sarma AV, Montie JE, Lange EM, et al. Germ-line mutations of the macrophage scavenger

receptor 1 gene: association with prostate cancer risk in African-American men. *Cancer Res* 2003; 63: 3486- 3489.

130. Wiklund F, Jonsson BA, Goransson I, Bergh A, Grönberg H. Linkage analysis of prostate cancer susceptibility: confirmation of linkage at 8p22-23. *Hum Genet* 2003; 112:414-418.
131. Sun J, Hsu FC, Turner AR, Zheng SL, Chang BL, Liu W, et al. Meta-analysis of association of rare mutations and common sequence variants in the MSR1 gene and prostate cancer risk. *Prostate* 2006;66:728-37.
132. Shand RL, Gelmann EP. Molecular biology of prostate-cancer pathogenesis. *Curr Opin Urol.* 2006;16(3):123-31.
133. Bhatia-Gaur R, Donjacour AA, Sciavolino PJ, Kim M, Desai N, Young P, et al. Roles for NKX3.1 in prostate development and cancer. *Genes Dev* 1999; 13: 966-977.
134. Bowen C, Bubendorf L, Voeller HJ, Slack R, Willi N, Sauter G, et al. Loss of NKX3.1 expression in human prostate cancers correlates with tumor progression. *Cancer Res* 2000; 60: 6111-6115.
135. Feilotter HE, Nagai MA, Boag AH, Eng C, Mulligan LM. Analysis of PTEN and the 10q23 region in primary prostate carcinomas. *Oncogene* 1998; 16: 1743-1748.

136. Wang SI, Parsons R, Ittmann M. Homozygous deletion of the PTEN tumor suppressor gene in a subset of prostate adenocarcinomas. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 811-815.
137. McMenamin ME, Soung P, Perera S, Kaplan I, Loda M, Sellers WR. Loss of PTEN expression in paraffin-embedded primary prostate cancer correlates with high Gleason score and advanced stage. *Cancer Res* 1999; 59: 4291-4296.
138. Suzuki H, Freije D, Nusskern DR, Okami K, Cairns P, Sidransky D, et al. Interfocal heterogeneity of PTEN/MMAC1 gene alterations in multiple metastatic prostate cancer tissues. *Cancer Res* 1998; 58: 204-209.
139. Abate-Shen C, Banach-Petrosky WA, Sun X, Economides KD, Desai N, Gregg JP, et al. NKX3.1; PTEN mutant mice develop invasive prostate adenocarcinoma and lymph node metastases. *Cancer Res* 2003; 63: 3886-3890.
140. Philipp-Staheli J, Payne SR, Kemp CJ. p27(Kip1): regulation and function of a haploinsufficient tumor suppressor and its misregulation in cancer. *Exp Cell Res* 2001; 264: 148-168.
141. Xu J, Langefeld CD, Zheng SL, Gillanders EM, Chang BL, Isaacs SD, et al. Interaction effect of PTEN and CDKN1B chromosomal regions on prostate cancer linkage. *Hum Genet* 2004; 115: 255-262.
142. Sun X, Frierson HF, Chen C, Li C, Ran Q, Otto KB, et al. Frequent somatic mutations of the transcription factor ATBF1 in human prostate cancer. *Nat Genet* 2005; 37: 407-412.

143. Kaspar P, Dvorakova M, Kralova J, Pajer P, Kozmik Z, Dvorák M. Myb-interacting protein, ATBF1, represses transcriptional activity of Myb oncoprotein. *J Biol Chem* 1999; 274: 14422-14428.
144. Narla G, Heath KE, Reeves HL, Li D, Giono LE, Kimmelman AC, et al. KLF6, a candidate tumor suppressor gene mutated in prostate cancer. *Science* 2001; 294: 2563-2566. 121.
145. Chen C, Hyytinen ER, Sun X, Helin HJ, Koivisto PA, Frierson HF Jr, et al. Deletion, mutation, and loss of expression of KLF6 in human prostate cancer. *Am J Pathol* 2003; 162: 1349-1354.
146. Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, Dhanasekaran SM, Mehra R, Sun XW, et al. Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science* 2005; 310: 644-648.
147. Banks RE, Dunn MJ, Hochstrasser DF, Sanchez JC, Blackstock W, Pappin DJ, et al. Proteomics: new perspectives, new biomedical opportunities. *Lancet* 2000; 356: 1749–1756.
148. Stein LD. Human genome: end of the beginning. *Nature* 2004; 431: 915–916.
149. Azad NS, Rasool N, Annunziata CM, Minasian L, Whiteley G, Kohn EC. Proteomics in clinical trials and practice: present uses and future promise. *Mol Cell Proteomics* 2006; 5(10): 1819-29.
150. Domon B, Aebersold R. Mass spectrometry and protein analysis. *Science* 2006; 312: 212–217.

151. Engwegen JY, Gast MC, Schellens JH, Beijnen JH. Clinical proteomics: searching for better tumour markers with SELDITOF mass spectrometry. *Trends Pharmacol. Science* 2006; 27: 251–259.
152. Elliott MH, Smith DS, Parker CE, Borchers C. Current trends in quantitative proteomics. *J Mass Spectrom* 2009; 44(12): 1637-60.
153. Matthiesen R, Carvalho AS. Methods and algorithms for relative quantitative proteomics by mass spectrometry. *Methods Mol Biol* 2010; 593: 187-204.
154. Li X, Pizarro A, Grosser T. Elective affinities--bioinformatic analysis of proteomic mass spectrometry data. *Arch Physiol Biochem* 2009; 115(5): 311-9.
155. Vlaanderen J, Moore LE, Smith MT, Lan Q, Zhang L, Skibola CF, et al. Application of OMICS technologies in occupational and environmental health research; current status and projections. *Occup Environ Med* 2010; 67(2): 136-43.
156. Pan YZ, Xiao XY, Zhao D, Zhang L, Ji GY, Li Y, et al. Application of surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight-based serum proteomic array technique for the early diagnosis of prostate cancer. *Asian J Androl.* 2006; 8(1):45-51.

157. La Spada AR, Wilson EM, Lubahn DB, Harding AE, Fischback KH. Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature*. 1991; 352 (6330):77-9.
158. Xue W, Irvine RA, Yu MC, Ross RK, Coetzee GA, Ingles SA. Susceptibility to prostate cancer: interaction between genotypes at the androgen receptor and prostate-specific antigen loci. *Cancer Res*. 2000;60(4):839-41.
159. Wang LZ, Sato K, Tsuchiya N, Yu JG, Ohyama C, Satoh S, et al. Polymorphisms in prostate-specific antigen (PSA) gene, risk of prostate cancer, and serum PSA levels in Japanese population. *Cancer Lett*. 2003;202(1):53-9.
160. Garcia-Foncillas J, Bandres E, Zarate R, Ramirez N. Proteomic analysis in cancer research: potential application in clinical use. *Clin Transl Oncol*. 2006; 8(4): 250-61.
161. Pratapa PN, Patz EF Jr, Hartemink AJ. Finding diagnostic biomarkers in proteomic spectra. *Pac Symp Biocomput*. 2006; 279-90.
162. Srinivas PR, Srivastava S, Hanash S, Wright GL Jr. Proteomics in early detection of cancer. *Clin Chem*. 2001; 47(10): 1901-11.
163. Stamey TA, Yang N, Hay AR, McNeal JE, Freiha FS, Redwine E. Prostate-specific antigen as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate. *N Engl J Med*. 1987;317(15):909-16.

164. Stamey TA, Caldwell M, McNeal JE, Nolley R, Hemenez M, Downs J. The prostate specific antigen era in the United States is over for prostate cancer: what happened in the last 20 years? *J Urol.* 2004;172(4 Pt 1):1297-301.
165. Stamey TA. The era of serum prostate specific antigen as a marker for biopsy of the prostate and detecting prostate cancer is now over in the USA. *BJU Int.* 2004;94(7):963-4.
166. Qu Y, Adam BL, Yasui Y, Ward MD, Cazares LH, Schellhammer PF, et al. Boosted decision tree analysis of surface-enhanced laser desorption/ionization mass spectral serum profiles discriminates prostate cancer from noncancer patients. *Clin Chem.* 2002;48(10):1835-43.
167. Bouamrani A, Ternier J, Ratel D, Benabid AL, Issartel JP, Brambilla E, et al. Direct-tissue SELDI-TOF mass spectrometry analysis: a new application for clinical proteomics. *Clin Chem.* 2006; 52(11):2103-6.
168. Kumar S, Mohan A, Guleria R. Biomarkers in cancer screening, research and detection: present and future: a review. *Biomarkers.* 2006;11(5):385-405.
169. Tong W, Xie Q, Hong H, Shi L, Fang H, Perkins R, et al. Using decision forest to classify prostate cancer samples on the basis of SELDI-TOF MS data: assessing chance correlation and prediction confidence. *Environ Health Perspect.* 2004;112(16):1622-7.

170. Jr GW, Cazares LH, Leung SM, Nasim S, Adam BL, Yip TT, et al. Proteinchip(R) surface enhanced laser desorption/ionization (SELDI) mass spectrometry: a novel protein biochip technology for detection of prostate cancer biomarkers in complex protein mixtures. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 1999;2(5/6):264-276.
171. Adam BL, Vlahou A, Semmes OJ, Wright GL Jr. Proteomic approaches to biomarker discovery in prostate and bladder cancers. *Proteomics.* 2001;1(10):1264-70.
172. Adam BL, Qu Y, Davis JW, Ward MD, Clements MA, Cazares LH, et al. Serum protein fingerprinting coupled with a pattern-matching algorithm distinguishes prostate cancer from benign prostate hyperplasia and healthy men. *Cancer Res.* 2002;62(13):3609-14.
173. Cazares LH, Adam BL, Ward MD, Nasim S, Schellhammer PF, Semmes OJ, et al. Normal, benign, preneoplastic, and malignant prostate cells have distinct protein expression profiles resolved by surface enhanced laser desorption/ionization mass spectrometry. *Clin Cancer Res.* 2002;8(8):2541-52.
174. Yasui Y, Pepe M, Thompson ML, Adam BL, Wright GL Jr, Qu Y, et al. A data-analytic strategy for protein biomarker discovery: profiling of high-dimensional proteomic data for cancer detection. *Biostatistics.* 2003;4(3):449-63.

175. Grizzle WE, Adam BL, Bigbee WL, Conrads TP, Carroll C, Feng Z, et al. Serum protein expression profiling for cancer detection: validation of a SELDI-based approach for prostate cancer. *Dis Markers*. 2003-2004; 19(4-5):185-95
176. Liu AY, Zhang H, Sorensen CM, Diamond DL. Analysis of prostate cancer by proteomics using tissue specimens. *J Urol*. 2005;173(1):73-8.
177. Pan YZ, Xiao XY, Zhao D, Zhang L, Ji GY, Li Y, et al. Application of surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight-based serum proteomic array technique for the early diagnosis of prostate cancer. *Asian J Androl*. 2006;8(1):45-51.
178. Schiffer E. Biomarkers for prostate cancer. *World J Urol*. 2007;25(6):557-62.
179. Okamoto A, Yamamoto H, Imai A, Hatakeyama S, Iwabuchi I, Yoneyama T, et al. Protein profiling of post-prostatic massage urine specimens by surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry to discriminate between prostate cancer and benign lesions. *Oncol Rep*. 2009;21(1):73-9.
180. Al-Ruwaili JA, Larkin SE, Zeidan BA, Taylor MG, Adra CN, Aukim-Hastie CL, et al. Discovery of serum protein biomarkers for

prostate cancer progression by proteomic analysis. *Cancer Genomics Proteomics*. 2010;7(2):93-103.

181. Sun C, Song C, Ma Z, Xu K, Zhang Y, Jin H, et al. Periostin identified as a potential biomarker of prostate cancer by iTRAQ-proteomics analysis of prostate biopsy. *Proteome Sci*. 2011;9: 22
182. Yang Y, Zhao S, Fan Y, Zhao F, Liu Q, Hu W, Liu D, Fan K, Wang J, Wang J. Detection and identification of potential biomarkers of non-small cell lung cancer. *Technol Cancer Res Treat*. 2009 Dec;8(6):455-66.
183. Engwegen JYMN, Helgason HH, Cats A, Harris N, Bonfrer JMG, Schellens JHM et al. Identification of serum proteins discriminating colorectal cancer patients and healthy controls using surface-enhanced laser desorption ionisation-time of flight mass spectrometry. *World J Gastroenterol* 2006; 12(10):1536-1544.
184. Fan Y, Shi L, Liu Q, Dong R, Zhang Q, Yang S, et al. Discovery and identification of potential biomarkers of papillary thyroid carcinoma. *Mol Cancer*. 2009; 8: 79.
185. Dong LM, Potter JD, White E, Ulrich CM, Cardon LR, Peters U. Genetic susceptibility to cancer: the role of polymorphisms in candidate genes. *JAMA*. 2008;299(20):2423-36
186. Gsur A, Feik E, Madersbacher S. Genetic polymorphisms and prostate cancer risk. *World J Urol*. 2004;21(6):414-23

187. Stanford JL, Just JJ, Gibbs M, Wicklund KG, Neal CL, Blumenstein BA, et al. Polymorphic repeats in the androgen receptor gene: molecular markers of prostate cancer risk. *Cancer Res* 1997; 57: 1194–1198
188. Bratt O, Borg A, Kristoffersson U, Lundgren R, Zhang QX, Olsson H. CAG repeat length in the androgen receptor gene is related to age at diagnosis of prostate cancer and response to endocrine therapy, but not to prostate cancer risk. *Br J Cancer* 1999; 81: 672–676 420
189. Price DK, Chau CH, Till C, Goodman PJ, Baum CE, Ockers SB et al. Androgen receptor CAG repeat length and association with prostate cancer risk: results from the prostate cancer prevention trial. *J Urol*. 2010;184(6):2297-302.
190. Wang LZ, Sato K, Tsuchiya N, Yu JG, Ohyama C, Satoh S, et al. Polymorphisms in prostate-specific antigen (PSA) gene, risk of prostate cancer, and serum PSA levels in Japanese population. *Cancer Lett*. 2003;202(1):53-9.
191. Kuasne H, Rodrigues IS, Fuganti PE, Losi-Guembarovski R, Ito K, Kishima MO, Rodrigues MA, et al. Polymorphisms in the AR and PSA genes as markers of susceptibility and aggressiveness in prostate cancer. *Cancer Invest*. 2010;28(9): 917-24.
192. Sieh W, Edwards KL, Fitzpatrick AL, Srinouanprachanh SL, Farin FM, Monks SA, et al. Genetic Susceptibility to Prostate Cancer: Prostate-specific Antigen and its Interaction with the Androgen Receptor (United States). *Cancer Causes Control*. 2006;17(2):187-97.

193. Wei B, Xu Z, Ruan J, Zhu M, Jin K, Zhou D, et al. RNASEL Asp541Glu and Arg462Gln polymorphisms in prostate cancer risk: evidences from a meta-analysis. *Mol Biol Rep.* 2011; [Epub ahead of print].
194. Meyer MS, Penney KL, Stark JR, Schumacher FR, Sesso HD, Loda M, et al. Genetic variation in RNASEL associated with prostate cancer risk and progression. *Carcinogenesis.* 2010;31(9):1597-603.
195. Mi YY, Zhu LJ, Wu S, Feng NH. An update analysis of two polymorphisms in encoding ribonuclease L gene and prostate cancer risk: involving 13,372 cases and 11,953 controls. *Genes Nutr.* 2011; [Epub ahead of print]
196. Gunes S, Bagci H, Sarikaya S, Bilen CY, Kara N. Prostate-specific antigen and 17-hydroxylase polymorphic genotypes in patients with prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *DNA Cell Biol.* 2007;26(12):873-8.
197. Onen IH, Ekmekci A, Eroglu M, Polat F, Biri H. The association of 5alpha-reductase II (SRD5A2) and 17 hydroxylase (CYP17) gene polymorphisms with prostate cancer patients in the Turkish population. *DNA Cell Biol.* 2007;26(2):100-7.
198. Bichsel VE, Liotta LA, Petricion EF III. Cancer proteomics: from biomarker discovery to signal pathway. *Cancer J* 2001;7: 69–78.

10. EKLER

Doktora eğitimim ve tez çalışmalarım süresince mesleki bilgi ve deneyimleri ile eğitimimde ve çalışmalarım da ilgisini ve desteğini daima hissettiğim, değerli hocam tez danışmanım Sn. Prof. Dr. Abdullah Ekmekçi'ye şükranlarımı sunarım.

Doktora eğitimim sırasında bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen destekleyici kişilik özellikleri ile değerli hocalarım Sn. Prof. Dr. Sevda Menevşe'ye ve Sn. Prof. Dr. Adnan Menevşe'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca, tez çalışmam boyunca her türlü yardımı ve desteğini esirgemeyen Sn. Öğr. Gör Dr. İlke Önen'e teşekkürü bir borç bilirim.

Doktora eğitimim boyunca dostluklarını, desteklerini esirgemeyen, Sn. Doç.Dr. Ece Konaç'a ve Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı çalışma arkadaşlarıma özellikle Sn Yasemin Işık Koç'a teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her döneminde gösterdikleri anlayış ve özveriler için sevgilerini ve desteklerini sürekli hissettiğim sevgili annem Özden Yalınay'a, babam Engin Yalınay'a, eşim Erşan Çırak'a, canım oğlum Alaz Çırak'a ve sevgili kardeşlerim Şebnem Yalınay Çinici ve Didem Yalınay'a sonsuz şükranlarımı sunarım.

11. ÖZGEÇMİŞ

- Adı Soyadı:** Ayşe Meltem Yalınay Çırak
- Doğum Yeri ve Tarihi:** Ankara, 1966
- Orta ve Lise Öğrenimi:** 1977 - 1984 TED Ankara Koleji
- Yüksek Öğrenim:** 1984 - 1990 Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
- Uzmanlık:** 1993 - 1997 Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Uzmanı
- Doktora:** 2005 - Halen Tıbbi Biyoloji ve Genetik Doktora eğitimi
- Doçentlik Ünvanı:** 15.04.2004 Mikrobiyoloji Bilim Alanı
- Çalıştığı Kuruluşlar:** 1991 - 1993 S. S. K. Ulus Hastanesi, mecburi hizmet görevi için Pratisyen Hekim olarak
1993 - 1997 Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi
1998 - 2000 Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda Öğretim Görevlisi

2000 - Nisan 2004 Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda Yardımcı Doçent

2004 - 2010 Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda Doçent

2010- Halen Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda Profesör

İdari Görevler:

2002 - Halen Moleküler Bakteriyoloji Rutin Laboratuvar Sorumlusu

2001 - 2003 tarihleri arasında İmmünoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi Müdür Yardımcılığı

Koordinatörlük Görevleri

2002 - 2004 tarihleri arasında Dönem I Koordinatör Yardımcılığı

2002 - 2008 Dönem I Koordinatörlüğü

Eğitim Kurullarındaki Görevler

2004 - Halen Eleştirel Düşünme ve Sanat Kurul Başkanlığı

2004 – 2010 Klinik Beceri Eğitim Kurulu Başkan Yardımcılığı

2005 - Halen İletişim Becerileri Kurul Üyeliği

2004- Halen Hastane Enfeksiyon Kontrol Komitesi Üyeliği

Buluş PATENT

TR200402876: ÇIRAK AYŞE MELTEM YALINAY (TR), ENGİN EVREN DORUK (TR); TÜRET SEVGİ (TR); ÜNAL

SELAHATTİN (TR); DURLU GYASEDDİN ŞÜKRÜ (TR). *Helicobacter pylori* DNA'sının ve makrolid dirençli genotiplerin tava problemler kullanılarak polimeraz zincirleme tepkimesi ile saptanması

Yurtdışında Çalışmalar: **Yaptığı** 2001 Amerika Birleşik Devletleri Columbia University College of Physicians and Surgeons araştırmacı
2003 Fransa Université Victor Segalen Bordeaux 2 Faculté de Médecine Victor Pachon Laboratoire de Bactériologie Bactériologie et Epidémiologie des Infections Digestives'de araştırmacı
2006 İngiltere CIPHERGEN Protein Chip Technology Basic Training Course

İlgi Alanı Moleküler Mikrobiyoloji ve Moleküler Bakteriyoloji, Klinik Mikrobiyolojide antibiyotikler ve antimikrobiyal direncin moleküler belirlenmesi, *Helicobacter pylori* moleküler genetiği ve moleküler saptanması, Rekombinant DNA Teknikleri, DNA dizi analizi

Bilimsel Kuruluşlara Üyelikler: Klinik Mikrobiyoloji Uzmanlık Derneği (Kurucu yönetim kurulu üyesi)
Bakteri Genetiği Çalışma Grubu
Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Derneği
Ankara Mikrobiyoloji Cemiyeti Derneği
Viral Hepatit Savaşım Derneği
Türkiye Parazitoloji Derneği

İletişim

meltemyc@gazi.edu.tr

Tel: 3122026977

Mobil tel: 0 542 4149191