

ELİF BİLGİN DOĞRU

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

DOKTORA TEZİ

İSTANBUL-2021



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

(DOKTORA TEZİ)

**PROSTAT KANSERLİ HASTALARDA FMNL1 VE PAK1
SEVİYELERİNİN BELİRLENMESİ**

ELİF BİLGİN DOĞRU

**DANIŞMAN
PROF. DR. DERYA DURANYILDIZ**

**TEMEL ONKOLOJİ ANABİLİM DALI
KANSER BİYOKİMYASI PROGRAMI**

İSTANBUL-2021

İTHAF

Aileme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Onkoloji Enstitü Müdürümüz **Sn. Prof. Dr. Ahmet KİZİR**'e,

Temel Onkoloji Anabilim Dalı Başkanımız **Sn. Prof. Dr. Hatice Bilge BECERİR**'e,

Yüksek lisans ve doktora eğitimim boyunca deneyim ve birikimlerini aktararak beni en doğru şekilde yönlendiren, her zaman her konuda yanımda olan, sevgili hocam, tez danışmanım **Sn. Prof. Dr. Derya DURANYILDIZ**'a,

Hastalara ait materyal ve klinik verilerin sağlanmasında destek veren **Sn. Doç. Dr. Selçuk ERDEM**, **Sn. Öğr. Gör. Dr. Yavuz DİZDAR** ve **Sn. Uzm. Dr. Ayça İRİBAŞ**'a,

Tez çalışmam süresince beni yalnız bırakmayan, bana her zaman destek olan **Doç. Dr. Hilal OĞUZ SOYDİNÇ**'e,

Her zaman yanımda olduğunu hissettiren sevgili arkadaşım **Arş. Gör. Ceren TİLGEN YASASEVER**'e,

Attığım her adımda benimle heyecanlanıp bana güç veren **AİLEM**'e,

Varlıklarına bütün zorlukları aşabilmemi sağlayan sevgili **EŞİM** ve sevgili **KIZIM**'a teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 24746

İÇİNDEKİLER

İTHAF.....	İİ
TEŞEKKÜR.....	İİİ
İÇİNDEKİLER.....	İV
TABLolar LİSTESİ.....	Vİ
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	Vİİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ.....	Vİİİ
ÖZET.....	X
ABSTRACT.....	Xİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Prostat Kanseri.....	3
2.1.1. Epidemiyoloji.....	3
2.1.2. Prostat Kanseri Etiyolojisindeki Risk Faktörleri.....	3
2.1.3. Tanı.....	4
2.1.4. Prostat Kanserinin Histolojik Sınıflandırılması.....	5
2.1.5. Evreleme ve Tedavi.....	5
2.2. Prostat Kanserinde Moleküler Onkogeneze.....	8
2.2.1. Androjen Yolağı.....	8
2.2.2. Apoptoz.....	9
2.2.3. Anjiyogeneze.....	10
2.2.4. Ekstrasellüler Matriks.....	10
2.2.5. Sinyal İletimi.....	11
2.3. Aktin Hücre İskeleti ve FMNL1.....	14
2.4. PAK1.....	17
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	19
3.1. Araştırmada Kullanılan Örnekler.....	19
3.2. Gen Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi.....	20
3.2.1. RNA İzolasyonu.....	20
3.2.2. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi.....	20
3.2.3. Gerçek-Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR).....	22

3.3. Protein Düzeylerinin Belirlenmesi.....	24
3.3.1. ELISA Yöntemi	24
3.3.2. FMNL1 Düzeylerinin Belirlenmesi	24
3.3.3. PAK1 Düzeylerinin Belirlenmesi	26
3.4. Sonuçların Değerlendirilmesinde Kullanılan İstatistiksel Yöntemler	27
4. BULGULAR.....	28
4.1. Gen Ekspresyon Düzeyleri	28
4.2. Protein Düzeyleri	37
5. TARTIŞMA	46
KAYNAKLAR	52



TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Prostat kanseri histolojik sınıflandırması	5
Tablo 2-2: Prostat kanserinde TNM klasifikasyon sistemi	6
Tablo 2-3: D'Amico risk sınıflaması	7
Tablo 2-4: Risk gruplarına göre prostat kanseri tedavi seçenekleri	8
Tablo 3-1: PCa hastalarının özellikleri	19
Tablo 3-2: cDNA sentezi reaksiyon bileşenleri	20
Tablo 3-3: cDNA sentezi reaksiyon koşulları	21
Tablo 3-4: Çalışılan genlere ait primerler	21
Tablo 3-5: Gerçek-Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyon koşulları	23
Tablo 3-6: Gerçek-Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyon bileşenleri	23
Tablo 4-1: Prostat kanserli hasta ve sağlıklı kontrol gruplarında gen ekspresyonlarının aritmetik ortalama (x), standart sapma (sd), ortanca (m), minimum (min) ve maksimum (max) değerleri	28
Tablo 4-2: Prostat kanserli hastalar ile sağlıklı kontrol gruplarında gen ekspresyon düzeylerinin istatistiksel anlamlılıkları	29
Tablo 4-3: Prostat kanserli hasta ve sağlıklı kontrol gruplarında protein düzeylerine ait aritmetik ortalama (x), standart sapma (sd), ortanca (m), minimum (min) ve maksimum (max) değerleri	37
Tablo 4-4: Prostat kanserli hastalar ile sağlıklı kontrol gruplarında protein düzeylerinin istatistiksel anlamlılıkları (p değerleri)	38

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Prostat kanserinde Gleason skoru yöntemi	7
Şekil 2-2: Androjen Reseptör Yolağı.....	9
Şekil 2-3: Aktin polimerizasyonu	14
Şekil 2-4: Forminlerin genel yapısı ve dimerizasyonu	15
Şekil 3-1: FMNL1 ELISA protokolü.....	25
Şekil 3-2: PAK1 ELISA protokolü.....	26
Şekil 4-1: Prostat kanserli hastaların ve sağlıklı kontrollerin plazma FMNL1 gen ekspresyon değerleri	30
Şekil 4-2: Prostat kanserli hastaların ve sağlıklı kontrollerin idrar FMNL1 gen ekspresyon değerleri	31
Şekil 4-3: Prostat kanserli hastaların ve sağlıklı kontrollerin plazma PAK1 gen ekspresyon değerleri	32
Şekil 4-4: Prostat kanserli hastaların ve sağlıklı kontrollerin idrar PAK1 gen ekspresyon değerleri	33
Şekil 4-5: Gen ekspresyon testlerinin ROC analizi	34
Şekil 4-6: Plazma gen ekspresyonları korelasyon grafiği.....	35
Şekil 4-7: İdrar gen ekspresyonları korelasyon grafiği.....	36
Şekil 4-8: Plazma FMNL1 Dağılım Grafiği	39
Şekil 4-9: İdrar FMNL1 Dağılım Grafiği	40
Şekil 4-10: Plazma PAK1 Dağılım Grafiği	41
Şekil 4-11: İdrar PAK1 Dağılım Grafiği	42
Şekil 4-12: Protein testlerinin ROC analizi	43
Şekil 4-13: Plazma protein seviyeleri korelasyon grafiği.....	44
Şekil 4-14: İdrar protein seviyeleri korelasyon grafiği.....	45

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

PSA:	Prostat spesifik antijen
FMNL1:	Formin like-protein 1
KLL:	Kronik lenfositik lösemi
PAK:	p21 ile aktiflenmiş kinaz
PCa:	Prostat kanseri
PCA3:	Prostat kanser antijeni 3
WHO:	Dünya Sağlık Örgütü
DHT:	Dihidrotestosteron
AR:	Androjen reseptörü
HSP:	Heat shock protein (Isı şok protein)
VEGF:	Vasküler endotelial büyüme faktörü
PDGF:	Platelet kökenli büyüme faktörü
ECM:	Ekstrasellüler matriks
FAK:	Fokal adezyon kinaz
MT1-MMP:	Membran tip matriks metalloproteinaz 1
uPA:	Ürokinaz tipi plazminojen aktivatörü
KLK:	Kallikrein
IGFBP:	İnsülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein
IGF:	İnsülin benzeri büyüme faktörü
TGF β :	Transforme edici büyüme faktörü β
HGF:	Hepatosit büyüme faktörü
PTEN:	Fosfataz ve tensin homologue
PI3K:	Fosfoinozid-3 kinaz
EGF:	Epidermal büyüme faktörü
FGF:	Fibroblast büyüme faktörü
KGF:	Keratinosit büyüme faktörü
GBD:	GTPaz bağlanma domaini
DID:	Diyaforöz inhibitör domain

DAD: Diyafanöz otoregulator domain

HDAC1: Histondeasetilaz 1

MTA1: Metastaz ilişkili protein 1

EMT: Epitelden mezenkimale geçiş

IL-8: İnterlökin-8

NIK: NF- κ B indükleyen kinaz

RT-PCR: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

Ct: Cycle threshold (Döngü eşiği)

KHDAK: Küçük hücre dışı akciğer kanseri

HCC: Hepatosellüler karsinoma

ÖZET

Bilgin Dogru E. Prostat Kanserli Hastalarda FMNL1 ve PAK1 Seviyelerinin Belirlenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Temel Onkoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul. 2021.

Prostat kanseri klinik olarak çok heterojen bir hastalıktır. Prostat spesifik antijenin (PSA) kansere spesifik bir belirteç olmaması nedeniyle ve ayrıca ileri evrede görülen yaygın kemik metastazları ve hormon tedavisinden kaynaklanan kemik deformasyonları sebebiyle hem prostat kanserine spesifik olan, hem de erken evrede tanı sağlayacak yeni biyobelirteçlerden faydalanılması gerekmektedir. Çok domainli polipeptidler olan formin protein ailesinin üyesi Formin like-protein 1 (FMNL1), aktin polimerizasyonu, hücre yüzey uzantıları oluşumu, vezikül transportu, hücre-hücre ve matriks-hücre bağlantısı (adezyon) ile hücre göçü süreçlerinde büyük öneme sahiptir. Protein kinaz olan p21 ile aktiflenmiş kinaz (PAK) proteinleri filopodyum ve lamellipodyum oluşumunu destekleyerek hücre iskeleti organizasyonunda rol oynar, aynı zamanda hücre sağkalımı, mitoz ve transkripsiyon gibi diğer hücrel aktivite de düzenler. Çalışmamızda 60 prostat kanserli hasta ile 20 sağlıklı kontrolün plazma ve idrar örneklerinde çalışıldı. FMNL1 ve PAK1 mRNA ve protein ekspresyonlarının incelendiği çalışmada hasta ve kontrollerin FMNL1 mRNA ve protein ekspresyon seviyeleri arasında hem plazma hem idrar örneklerinde istatistiksel bir farklılık bulunamadı ($p>0.05$). Hasta ve kontrollerin PAK1 mRNA ekspresyon seviyeleri arasında plazma ve idrar örneklerinde istatistiksel bir farklılık bulunmadı ($p>0.05$). PAK1 protein seviyelerinde de plazma örneklerinde anlamlı fark bulunamazken ($p>0.05$) idrar örneklerinde hastalarda kontrol grubuna göre düşük bulundu ($p=0.00$). Hastaların PSA ve diğer klinik özellikleriyle plazma ve idrar FMNL1 ve PAK1 seviyeleri arasında herhangi bir ilişki bulunamadı.

Anahtar Kelimeler: Prostat Kanseri, FMNL1, PAK1, mRNA, ELISA

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 24746

ABSTRACT

Bilgin Dogru E. Determination of FMNL1 and PAK1 Levels in Patients with Prostate Cancer. Istanbul University, Institute of Health Sciences, Department of Basic Oncology. Phd Thesis. Istanbul. 2021.

Prostate cancer is clinically very heterogeneous disease. Since PSA is not a cancer specific marker, and also due to the common bone metastases seen in the advanced stage and bone deformations caused by hormone therapy, it is necessary to use new biomarkers that are both specific to prostate cancer and will provide early diagnosis. Formin like-protein 1 (FMNL1), a member of the formin protein family which are multi-domain polypeptides, is of great importance in actin polymerization, cell surface protrusion formation, vesicle transport, cell-cell and matrix-cell attachment (adhesion) and cell migration processes. p21 activated kinase (PAK) proteins, a protein kinase, play a role in cytoskeletal organization by promoting the formation of phyllopodium and lamellipodium, as well as regulating other cellular activities such as cell survival, mitosis, and transcription. In our study, plasma and urine samples of 60 prostate cancer patients and 20 healthy controls were studied. In the study in which FMNL1 and PAK1 mRNA and protein expressions were examined, no statistical difference was found between FMNL1 mRNA and protein expression levels of patients and controls in both plasma and urine samples ($p>0.05$). There was no statistical difference between the PAK1 mRNA expression levels of patients and controls in plasma and urine samples ($p>0.05$). While no significant difference was found in PAK1 protein levels in plasma samples ($p>0.05$), it was found to be lower in urine samples compared to the control group ($p=0.00$). No correlation was found between PSA and other clinical features of the patients and plasma and urine FMNL1 and PAK1 levels.

Key Words: Prostate cancer, FMNL1, PAK1, mRNA, ELISA

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 24746

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Prostat kanseri (PCa), etiolojisinde hem genetik hem de çevresel faktörlerin rol oynadığı, klinik olarak çok heterojen bir hastalıktır. Batı toplumlarında erkeklerde en sık görülen kanser tipi olan PCa dünyada her yıl ortalama 900.000 yeni vaka ile karşımıza çıkmaktadır (1). Prostat spesifik antijen (PSA), transrektal ultrason ve parmakla rektal muayene ile tanı sıklığı arttırılmış olsa da PSA'nın kansere spesifik bir belirteç olmaması nedeniyle yanlış pozitif sonuçlar ve gereksiz klinik müdahalelerle karşı karşıya kalınmaktadır. Ayrıca ileri evrede görülen yaygın kemik metastazları ve hormon tedavisinden kaynaklanan kemik deformasyonları sebebiyle hem prostat kanserine spesifik olan, hem de erken evrede tanı sağlayacak yeni biyobelirteçlerden faydalanılması gerekmektedir.

Formin like-protein 1 (FMNL1), aktin polimerizasyon sürecinde görev alarak aktin hücre iskeleti oluşumunda rol oynayan Formin protein ailesinin bir üyesidir. Bu işlevi sayesinde hücre yüzey uzantıları oluşumu, vezikül transportu, hücre-hücre ve matriks-hücre bağlantısı (adezyon) ile hücre göçü süreçlerinde büyük öneme sahiptir (2). Başta T hücreli non-Hodgkin lenfoma olmak üzere lenfoid tümörlerde, kronik lenfositik lösemi (KLL) hastalarında ve hematopoietik kökenli kanserlerde FMNL1 ekspresyonunun arttığı birçok çalışmada belirtilmiştir (3, 4). 2014'te yapılan bir çalışmada ise (5) solid tümörlerde ekspresyonunun varlığı ilk defa ispatlanmıştır. Fakat bu çalışmada çok farklı tip solid tümörle çalışılmış, spesifik bir tümör tipinde gözlem yapılmamıştır. Bu yüzden belirli solid tümör tiplerinde ve farklı yöntemlerle FMNL1 ekspresyonunun tespit edilmesinin literatüre katkı sağlayacağını ve klinik uygulamalara ışık tutacağını düşünmekteyiz.

p21 ile aktiflenmiş kinaz (PAK) proteinleri 6 izoformu bulunan serin/treonin protein kinazlardır. Genel işlevleri Cdc42 ve Rac proteinlerine bağlanıp filopodium ve lamellipodium oluşumunu destekleyerek hücre iskeleti organizasyonunda rol oynamak olsa da hücre sağkalımı, mitoz ve transkripsiyon gibi diğer hücresel aktiviteleri de düzenledikleri gösterilmiştir (6). PAK proteinlerinin arasında en karakterize olanı ve kanserde en fazla değişiklik görüleni PAK1 izoformudur (7-9) PAK1'in normal hücrelerde hücre iskeleti değişikliklerini indüklediği ve birçok kanserde Akt ve ERK yollarını etkileyerek onkogenik transformasyona aracı olduğu çalışmalarda

gösterilmiştir (10, 11). Birçok kanser tipinde yüksek ekspresyonu gözlemlenen PAK1'in prostat kanserli hücrelerin invazyonunda rol oynadığı düşünülmektedir (12, 13). Bu bilgilerden yola çıkarak PAK1 proteininin FMNL1 ile bağlantılı bir şekilde invazyonu destekliyor olabileceğini düşünmekteyiz.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Prostat Kanseri

2.1.1. Epidemiyoloji

Prostat kanseri, erkeklerde akciğer kanserinden sonra en sık görülen ikinci kanser türüdür. GLOBOCAN verilerine göre 2020 yılında dünya çapında 1.414.259 yeni prostat kanseri vakası görülmüş olup bu sayı erkeklerdeki kanserlerin %7.3'ünü oluşturmaktadır. Aynı yılda hastalıktan 375.304 ölüm gerçekleşmiş olup, bu sayı kanser ölümlerinin %3.8'ini oluşturmaktadır (14). PCa insidansı yaşla artmaktadır. 50 yaşın altında yalnızca 350 erkekte 1'ine PCa teşhisi konulurken, 50-59 yaşları arasında insidans oranı her 52 erkekte 1'e kadar çıkmaktadır. 65 yaş üstü erkeklerde görülme oranı yaklaşık %60'tır (15, 16). Mortalite oranları ise yaşla beraber etnik kökene ve yere göre değişmektedir. Ölümlerin yaklaşık %55'i 65 yaşından sonra görülür. Afro-Amerikanlarda Beyaz Irk'a göre ölüm oranının yaklaşık 2 kat arttığı görülmektedir. 2018'de en yüksek ölüm oranları Orta Amerika (10,7/100.000), Avustralya ile Yeni Zelanda (10,2/100.000) ve Batı Avrupa'da (10,1/100.000), en düşük ölüm oranları ise Asya (Güney-Orta, 3,3/100.000; Doğu, 4,7/100.000 ve Güneydoğu, 5,4/100.000) ve Kuzey Afrika (5,8/100.000) ülkelerinde bildirilmiştir (17). İnsidansı yüksek olmasına rağmen PCa tespit edildiğinde çoğunlukla prostata sınırlı evrededir, bu da sağkalımın yüksek olması avantajını sağlar. ABD'de PCa teşhisi konan erkekler için 5 yıllık sağkalım oranı %98 civarındadır. 2003'ten 2007'ye kadar PCa teşhisi konan hastaların Eurocare projesinden (EUROCORE-5) elde edilen veriler, Avrupa'da 5 yıllık sağkalım oranlarının %83 olduğunu göstermiştir (18).

2.1.2. Prostat Kanseri Etiyolojisindeki Risk Faktörleri

PCa gelişmesindeki risk faktörleri kesin olarak tanımlanmamıştır, PCa endojen ve eksojen risklerin birlikte ortaya çıkardığı çok faktörlü bir hastalıktır. Kalıtım ve yaşın bu faktörler arasında en önemlisi olduğu düşünülmektedir. Birinci derece akrabada hastalık varsa risk 2 katına, 2 veya daha fazla akrabada hastalık varsa risk 5-11 katına çıkmaktadır (19). PCa görülme riski yaşla birlikte artmaktadır. Vakaların ortalama %60'ı 65 yaş ve sonrasında tanı konulmuş vakalardır. Ortalama tanı yaşı 66'dır (20). 55 yaş ve üstünde görülme riski 55 yaş öncesine göre 17 kata kadar artmaktadır (21). PSA taramasının artması ve artan yaşam beklentisiyle günümüzde daha fazla erkeğe PCa

tanısı konulmaktadır. Buna en büyük örnek PSA taraması sayesinde 50-59 yaş arası tanı sayısının 1989'dan 1992'ye %50 oranında artmış olmasıdır (22). Etnik kökenin de PCa riskleri arasında olduğu bilinmektedir. Dünya üzerinde en yüksek PCa görülme oranı beyaz ırk'a göre %60 daha fazla risk oranıyla Afro-Amerikan ırkındadır (16). Irksal özelliklerin hastalığın sıklığını etkilediği bilinmektedir, bununla birlikte aynı ırktan olup farklı bölgelerde yaşayanlarda hastalık sıklığının bölgeye uyum göstermesi eksojen etkilerin de göz ardı edilmemesi gerektiğine işaret etmektedir. Hastalığın etiyolojisinde önemli olabilecek eksojen etkenlerin başlıcaları; beslenme tarzı, cinsel davranış, alkol tüketimi, ultraviyole ışınlara maruziyet ve kronik enflamasyon olarak bilinmektedir (23).

2.1.3. Tanı

PCa'da serum PSA ölçümü, parmakla rektal muayene ve transrektal ultrasonografi tanı konulmasında başvurulan yöntemlerdir. Nihai tanı prostat biyopsisi ile konulur. Histopatolojik değerlendirmeye tümör derecelendirilir ve uygun tedavi planlaması yapılır. Prostat periferinde yerleşimli 0.2 cc veya daha büyük boyutlu tümörler parmakla rektal muayene ile tespit edilebilmektedir. Transrektal ultrasonografinin PCa tanısında malignite şüpheli odakları belirlemek ve prostat biyopsisinin doğruluğunu arttırmak gibi önemleri vardır.

PSA, prostat epitelyal hücreleri tarafından salınan, 237 aminoasit ve 4 karbohidrat yan zinciri içeren kallikrein benzeri serin proteazdır. Prostat duktal epiteli ve asinilerinde sentezlenen PSA ekzositoz yoluyla prostat lümeninden seminal plazmaya geçer ve seminal sıvıdaki proteinleri proteoliz ederek semenin sıvılaşmasını sağlar (24). PCa için klinikte çok kullanılıyor olsa da PSA organ spesifitesi yüksek, kanser spesifitesi ise düşük bir belirteçtir. Benign durumlarda da PSA artışı görülebilir, bu da gereksiz biyopsi gibi invaziv yöntemlerin artışı problemlerini doğurmaktadır. PSA belirtecini daha özgül hale getirebilmek için serbest/total PSA oranı da kullanılmaktadır. Bu oranın düşük olması kanser lehine değerlendirilirken yüksek olması kanser dışı etyolojileri akla getirmektedir. Seçilen eşik değerine bağlı olarak değişmekle beraber çok düşük eşik değerleri kullanılsa dahi bir grup hastaya gereksiz yere biyopsi yapılmaktadır. Bu alanda yapılan çalışmalar gereksiz yapılan biyopsi sayısını azaltmaya yönelik olmaktadır. PSA için uluslararası kabul edilmiş bir eşik değeri olmamasına karşın genellikle 4 ng/mL değeri baz alınmaktadır.

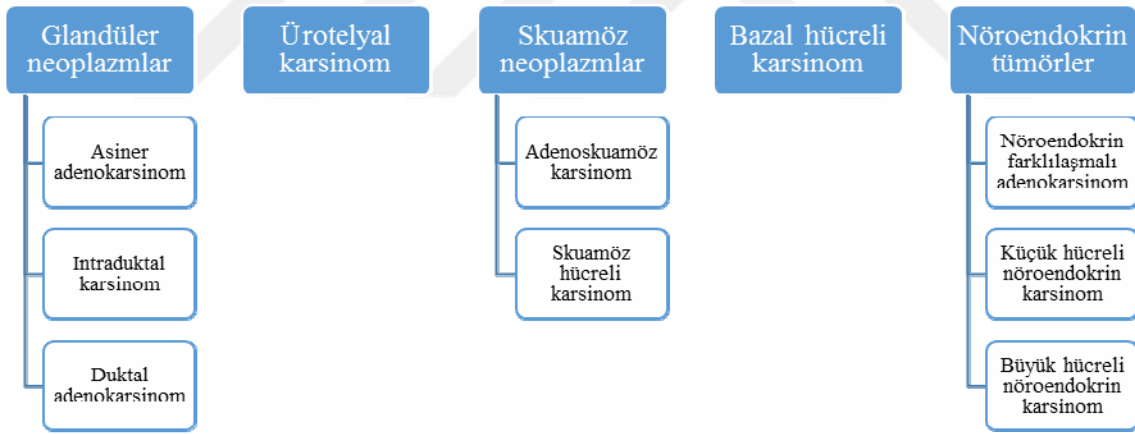
Yukarıda sayılan tanı yöntemlerinin çeşitli kombinasyonlarının pozitif prediktif değeri %20-80 arasında değişmektedir (25).

Son yıllarda tarama ve tanıda, tedaviye yanıt izleminde ve progresyon takibinde non-invaziv yöntemlerle elde edilebilmesi nedeniyle idrar temelli belirteçler üzerinde durulmaya başlanmıştır. Bunlar içinde en fazla çalışılan grup olan RNA temelli belirteçlerden prostat kanser antijeni 3 (PCA3), kanser spesifikliğı yüksek, kodlamayan RNA üreten bir gendir ve günümüzde rutin uygulamaya girmiştir. Parmakla rektal muayene sonrası alınan ilk idrar örneğinin RT-PCR yöntemi ile incelenmesi sonucu PCA3 geninin kodlamayan mRNAları tespit edilmektedir (26).

2.1.4. Prostat Kanserin Histolojik Sınıflandırılması

Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) 2016'da yayınladığı PCa sınıflandırması tablodaki gibidir (27).

Tablo 2-1: Prostat kanseri histolojik sınıflandırması



2.1.5. Evreleme ve Tedavi

Evrelendirmenin amacı organa sınırlı hastalık, lokal yayılım ve metastaz varlığını belirleyerek hastanın en uygun tedaviyi almasını sağlamaktır. Evrelemede TNM sınıfı, PSA ve Gleason skoru aracılığıyla risk grupları saptanır ve tedavi seçeneğı belirlenir. NCCN Kılavuzuna göre risk grupları çok düşük, düşük, orta, yüksek, çok yüksek, metastatik olarak detaylı altı sınıfa ayrılmıştır. Ancak daha basit ve pratik olması açısından PCa risk sınıflamasında D'Amico sisteminin kullanımı önerilmektedir (28).

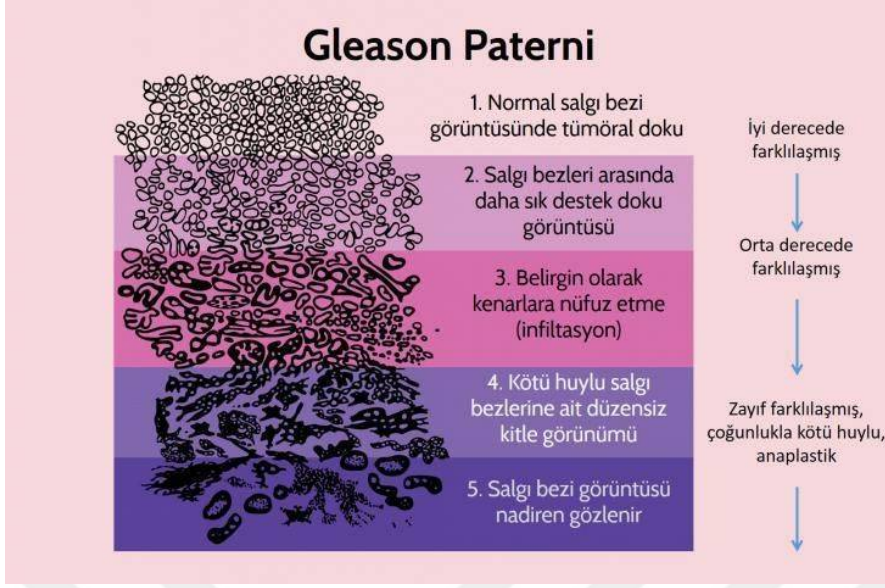
- **TNM Klasifikasyon Sistemi**

Tablo 2-2: Prostat kanserinde TNM klasifikasyon sistemi

T	Primer Tümör	
	Tx	Primer tümör değerlendirilemiyor
	T0	Primer tümörün kanıtı yok
T1	Klinik olarak saptanamayan, palpe edilemeyen veya görüntülenmeyen tümör	
	T1a	Tümör TUR ile rezeke edilen dokunun %5'inden azında
	T1b	Tümör TUR ile rezeke edilen dokunun %5'inden fazlasında
	T1c	İğne biyopsisinde tümör saptanması
T2	Tümör palpe ediliyor, prostata sınırlı	
	T2a	Bir lobun yarısı veya daha az
	T2b	Bir lobun yarısından fazla
	T2c	Her iki lobu kapsayan tümör
T3	Prostat kapsülünü aşmış tümör	
	T3a	Kapsül dışı yayılım; tek veya çift taraf
	T3b	Seminal vezikül infiltrasyonu; tek veya çift taraf
T4	Tümör fiske veya seminal vezikül dışındaki komşu yapılara yayılmış (rektum, mesane, eksternal sfinkter, levatör adele, pelvik duvar)	
N	Bölgesel Lenf Notları	
	Nx	Bölgesel lenf notları değerlendirilemiyor
	N0	Bölgesel lenf notu metastazı yok
	N1	Bölgesel lenf notu metastazı mevcut
M	Uzak Metastaz	
	Mx	Uzak metastaz değerlendirilemiyor
	M0	Uzak metastaz yok
	M1	Uzak metastaz
	M1a	Bölgesel olmayan lenf notlarında metastaz
	M1b	Kemik metastazı mevcut
	M1c	Kemik dışında bölgelere metastaz mevcut

- **Gleason Skorlaması**

PCa evrelemesinde en sık kullanılan sistem Gleason skorlamasıdır. Bu sistemde tümörden alınan biyopsi örnekleri farklılaşma derecesine göre 1 ile 5 arasında derecelendirilir. Tümörde en çok bulunan iki paternin derecelerinin toplamına en az agresif 2, en fazla agresif 10 olmak üzere 2 ile 10 arasında bir değer verilerek Gleason skoru belirlenir.



Şekil 2-1: Prostat kanserinde Gleason skoruyla değerlendirilmesi

- **D'Amico Risk Sınıflaması**

Tablo 2-3: D'Amico risk sınıflaması

Düşük	Orta	Yüksek
• PSA $\leq$ 10 ng/mL	• PSA 10-20 ng/mL	• PSA $>$ 20 ng/mL
• Biyopside Gleason $\leq$ 6	• Biyopside Gleason 7	• Biyopside Gleason 8-10
• T1c veya T2a	• T2b	• T2c veya daha yüksek

- **Tedavi**

PCA’da tedavi seçimi hastanın da dahil edildiği multidisipliner bir yaklaşımla yapılmalıdır. Tedavi kararı verilirken hastanın yaşı, yaşam beklentisi, preformansı, eşlik eden sağlık sorunları ve aile öyküsü dikkate alınmalıdır.

Genelde tedavi seçenekleri hastalığın risk derecesine göre değerlendirilir (29):

Tablo 2-4: Risk gruplarına göre prostat kanseri tedavi seçenekleri

Düşük Risk	Orta Risk	Yüksek Risk
Aktif İzlem	Radikal RT ± HT	Radikal RT ± HT
RT	Cerrahi (RP)	Cerrahi (RP)
Cerrahi (RP)		RP sonrası RT

2.2. Prostat Kanserinde Moleküler Onkogeneze

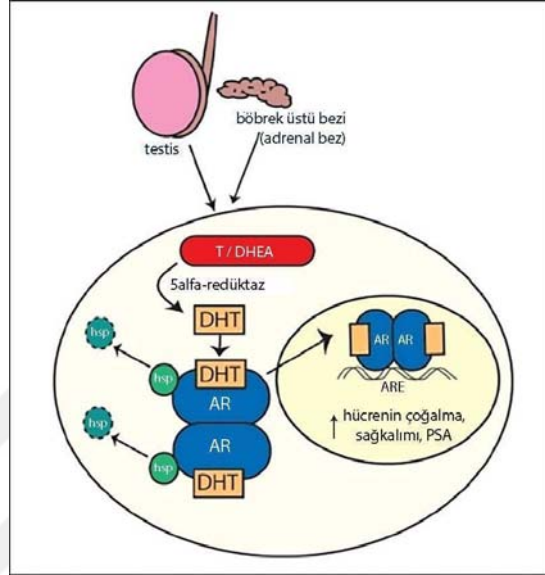
2.2.1. Androjen Yolağı

Prostat dokusunun farklılaşması ve gelişimi, %90-95’i testis, %5 kadarı ise adrenal kaynaklı olan steroid yapılı androjenlere, özellikle testosteron ve dihidrotestosterona (DHT) bağlıdır. Prostat hücresine giren testosteronun %95’i 5 α -redüktaz aracılığı ile DHT’ye dönüşmektedir. DHT’nin androjen reseptörüne (AR) afinitesi testostosterone göre 10 kat fazladır (30).

AR, steroid yapılı nükleus reseptörleridir. Normal koşullarda prostat epitel ve stroma hücrelerinde Heat Shock Protein’e (HSP) bağlı halde bulunurken ligandın bağlanmasıyla AR HSP’den ayrılır, DHT-AR kompleksinin nükleer translokasyonu ile hedef genlerin promotor bölgelerindeki Androgen-Response Elements’e bağlanır (31). Ko-aktivatörler ve ko-represörler de AR kompleksine bağlanarak hedef genin transkripsiyonunu etkilerler. Nükleusta ise DNA’ya bağlanarak ve androjen yanıtı genlerin transkripsiyonu ile prostat hücre metabolizması düzenlenir. Hedef genlerin

aktivasyonu ya da baskılanması ile prostat hücrelerinin gelişimi, proliferasyonu ve PSA üretimi düzenlenir (32) (Şekil 2-2).

PCa'da ise AR gen amplifikasyonu, aşırı ekspresyonu, fonksiyon kazandırıcı mutasyonlar ve AR aktivatör/baskılayıcılarının deregülasyonu gibi birçok faktörden dolayı AR yolağının aşırı aktifliği söz konusudur (33).



Şekil 2-2: Androjen Reseptör Yolağı

Lokal ileri veya metastatik PCA'da cerrahi veya medikal kastrasyon ile androjen baskılama tedavisi temel tedavi yöntemleri arasındadır. Tedavinin başında cevap iyi iken ilerleyen zamanlarda serum testosteron seviyesi kastre düzeyde (<50 ng/mL) olmasına rağmen biyokimyasal ya da radyolojik progresyon gelişir. Bu durum kastrasyona dirençli prostat kanseri olarak adlandırılır.

2.2.2. Apoptoz

- DNA tamir geni olan p53, DNA hasarına cevap olarak hücre döngüsünün G1 fazı için gerekli gen transkripsiyonunu düzenler, S fazına geçişi düzenler veya onarılamayan DNA hasarında hücre döngüsünü durdurarak hücreyi apoptoza yönlendirir. Kanserde en sık görülen gen anomalisi olan p53 mutasyonunun lokalize PCA'da görülme sıklığı %10, metastatik PCa'da ise %50 civarındadır (34). p53'ün primer tümörle karşılaştırıldığında metastatik ve nüks PCa'da prognostik değerinin daha yüksek olduğu belirtilmiştir.

- Antiapoptotik protoonkogen olan bcl-2'nin özellikle yüksek gradı ve metastatik PCa'da kötü prognozla ilişkili olduğu ve aşırı ekspresyonunun radyoterapiye dirençle ilişkili olduğu bilinmektedir (35).

2.2.3. Anjiyogenez

- Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) tarafından düzenlenen yeni damar oluşumu, tümörün gelişimi ve yayılımı için temel gerekliliktir. PCa'da VEGF ekspresyonunun metastatik potansiyel ve sağkalım ile ilişkili olduğu bilinmektedir (36).
- Anjiyogenezle ilgili bir başka büyüme faktörü olan platelet kökenli büyüme faktörü (PDGF) reseptörünün aşırı ekspresyonu hem PCa epitelyal ve stromal hücrelerinde, hem de metastatik hastalıkta kemik iliğinde tespit edilmiştir. Yüksek kemik metastazı potansiyeline sahip hücrelerde non-metastatik hücrelere göre daha yüksek oranda eksprese edilmektedir (37, 38).

2.2.4. Ekstrasellüler Matriks

PCa da dahil olmak üzere tüm kanserlerde hücre hareketliliği için ekstrasellüler matriks (ECM) degradasyonu gereklidir. ECM hasarı aracılığıyla hücre adezyonu, motilitesi ve migrasyon potansiyeli üzerinde değişiklikler ortaya çıkar.

- ECM enzimlerinden fokal adezyon kinazın (FAK) artmış ekspresyonunun birçok tümör tipinde malign ve metastatik fenotiple ilişkili olduğu bilinmektedir. FAK aracılığıyla membrane type matrix metalloproteinase 1 (MT1-MMP) ekspresyonu uyarılarak ECM degradasyonu ve invazyon tetiklenir (39).
- Yara iyileşmesi, tümör invazyonu gibi mekanizmalarda ECM'nin şekillenmesinde etkili olan bir mekanizma da plazminojen-plazmin proteolitik sürecidir. Bu süreç ürokinaz tipi plazminojen aktivatörü (uPA) ve reseptörü uPAR'ın plazminojeni plazmine çevirmesiyle başlar, plazmin tarafından da ECM bileşenleri parçalanarak MMPLer aktiflenir. Bu moleküllerin yüksek ekspresyonu PCa da dahil olmak üzere birçok kanserde gösterilmiştir. Ekspresyonlarının baskılanması ile de metastaz potansiyelinde azalma görülür (40, 41).

- Serin proteaz aktivitesine sahip proteinler olan kallikreinler de (KLK) PCa'da proteolitik süreçte etkin rol oynarlar. KLK2, bazı insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı proteinleri (IGFBP) proteoliz ederek insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) yolağını aktifleştirir. Ayrıca KLK4 ile beraber pro-uPA'yı uyararak plazminojen-plazmin proteolitik sürecini başlatır. KLK3 ise pro-transforming growth factor β 'yi (TGF β) parçalayarak TGF'i aktifleştirir, böylece prostatik hücre büyümesini düzenler, aynı zamanda laminin degradasyonu ile ECM'nin yeniden düzenlenmesinde rol oynar (42).
- ECM moleküllerinden olan Tip IV kollajeni parçalama etkileriyle MMP2 ve MMP9, prostat kanserinin progresyon ve metastazında etkilidir. Yüksek MMP9 seviyelerinin yüksek Gleason skoru ile ilişkili olduğu bilinmektedir (43). MMP9'un kemik tutulumunda da önemli rolü vardır. MMP9 osteoklast hareketi için önemli bir moleküldür. İleri evre ve metastatik prostat kanserlerinde MMP9 seviyelerinde artış olduğu bilinmektedir (44). MMP2'nin ise tümör hücrelerinin primer lezyondan lenf/dolaşım sistemine geçişini sağlayarak, metastazın başlangıç aşamasında etkili olduğu, kemik dokuya yerleşmesinde aktif bir rolü olmadığı gösterilmiştir. Aynı şekilde MMP2 genindeki polimorfizmler yüksek Gleason skoru ile ilişkilidir (45).

2.2.5. Sinyal İletimi

- Kaveolinler, plazma membran girintileri olan kaveola'nın primer yapısal proteinleridir. Sinyal iletiminde ve patojenlerin hücre içine alımında rol oynarlar. Prostat dahil olmak üzere bazı tümör tiplerinde kaveolin-1'in onkogenik hücre transformasyonunda ve metastaz gelişiminde önemli olduğu bilinmektedir. PCa'da hem genetik hem posttranslasyonel modifikasyonlara yol açarak tümörü tetiklediği düşünülmektedir (46). Yüksek kaveolin-1 pozitifliğinin Gleason skoru ile ilişkili olduğu gösterilmiş olup organa sınırlı hastalıkta da post-operatif progresyon belirteci olduğu bildirilmiştir (47).
- Hepatosit büyüme faktörü (HGF)/c-Met sinyal yolağı, epitelyal-stromal etkileşimde rol oynamaktadır. Günümüze kadar elde edilen veriler, HGF/c-Met yolak aktivasyonunun PCa progresyonunda geç evrede devreye girdiğini göstermektedir. c-Met ekspresyonu hastalığın ileri evrelerinde, özellikle kemik metastazlarında artar. Kemik stromasında üretilen HGF, reseptörü olan

c-Met aktivasyonuna katkıda bulunarak kemik metastazı oluşumunu indükler (48).

- PCa'da IGF-1 ile MMP2 ve uPA ekspresyon artışının uyarıldığı, ayrıca kastrasyona dirençli prostat kanseri gelişiminin IGF1/IGF1R yolak düzensizliği ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (49). Yüksek IGF1 ve IGF2 ekspresyonunun yüksek (>10) serum PSA ile pozitif bir korelasyonu olduğu, aynı zamanda IGF2 ekspresyonunun Gleason skoru ile istatistiksel olarak anlamlı şekilde korele olduğu gösterilmiştir (50). Reseptör işleyişini durdurma yoluyla hepatik IGF1 üretimini ve salgılanmasını azaltmak, prostat karsinogenezini azaltmakta ve olası farmakolojik süreçlerde önemli ölçüde rol oynamaktadır (51).
- Normal hücrede Wnt ligandı Frizzled reseptör kompleksine bağlandığı zaman Axin'in ayrılmasıyla inaktif β -katenin/Axin/GSK3 β /CK1/APC kompleksi bozulur ve β -katenin serbestleşerek çekirdeğe transloke olur, c-myc, siklin-D gibi proliferatif transkripsiyon faktörlerini uyarır. Prostat kanserli hücrede bu kompleksten ayrılan β -katenin, ekspresyonu artmış AR proteinleriyle kompleks halinde transkripsiyon faktörü olarak proliferatif ve antiapoptotik faktörlerin ekspresyonunu artırır (52). PCa'daki yüksek β -katenin seviyeleri aşırı AKT sinyalinin sonucunda GSK3 β 'nin fosforillenerek inaktivasyonu ile β -katenin'in serbest halde kalmasından ileri gelmektedir (53). Yüksek Wnt seviyelerinin PCa'da yüksek Gleason skoru, progresyon, yüksek PSA seviyeleri ve metastazla ilişkili olduğu bulunmuştur (54).
- NF- κ B indükleyici bir proinflatuar sitokin olan TNF- α ve reseptörleri TNFR1 ve TNFR2, normal prostat epiteliyle karşılaştırıldığında PCa epitelinde daha yüksek seviyelerde eksprese edilir. Yüksek TNF- α seviyeleri, PCa hücrelerinin artmış sağkalım ve proliferasyonu, anjiyogenez, metastaz ve kemoterapötik ajanlara yanıtındaki değişiklikler ile ilişkilendirilmiştir (55, 56). Prostat tümör hücrelerinde TNF reseptörlerinin yüksek seviyelerine bağlı olarak NF- κ B yolağının sıklıkla arttığı gözlenmektedir (57). Son çalışmalarda elde edilen klinik verilerde NF- κ B'nin AR yolağıyla ilişkili olduğu öne sürülmüştür. NF- κ B, androjenden bağımsız ksenograftlarda artmış AR ekspresyonu ve daha yüksek bağlanma aktivitesi ile ilişkilidir. Aslında AR,

bir NF- κ B hedef geni olarak tanımlanırken, bu yolaktaki p65 / RelA aktivitesi, hem mRNA hem de protein seviyelerinde AR artışına neden olur (58).

- PCa vakalarının % 30-50'sinde fosfataz ve tensin homologu (PTEN) fonksiyonunun kaybına bağlı olarak Fosfoinozitol-3 kinaz (PI3K) / AKT / mTOR sinyal yolağının sıklıkla ifadesinin arttığı, bunun da AKT hiperaktivasyonuna yol açtığı düşünülmektedir. PTEN, PIP3'ün PIP2'ye defosforilasyonundan sorumludur ve bu şekilde PI3K / AKT sinyalleşmesinin aktivitesini negatif olarak kontrol eder. PTEN fonksiyon kaybıyla beraber p53 mutasyonunun görüldüğü PCa vakalarında hastalık süreci daha agresif seyretmektedir (59). PTEN fonksiyon kaybında delesyonların yanısıra PTEN'i hedefleyen miRNAların yüksek ekspresyonları da rol oynamaktadır (60).
- PCA'da sürekli aktif olan JAK/STAT yolağının etkisiyle tümör hücresi proliferasyonu, apoptoz inhibisyonu indüklenmektedir. Normal hücrelerde DNA tamiri için gerekli olan BRCA1, PCa'da JAK1 ve JAK2'ye bağlanarak STAT3 fosforilasyonu ile yolağı aktive edebilmektedir. Aynı zamanda aktif AR'nin de STAT3'e bağlanmasıyla yolak aktive olabilir (61).
- Normal hücrede stres durumunda ATF3 AR'yle etkileşime girerek hücre homeostazını sağlamak için önemli rol oynar; androjen sinyalini inhibe eder ve hücre proliferasyonunu durdurur. Fakat PCa hücrelerinde ATF3'ün ekspresyonunun düştüğü görülmüştür (52).
- PCA'da epidermal büyüme faktörü (EGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF), IGF ve keratinosit büyüme faktörü (KGF) aşırı ekspresyonu Ras ve MAPK yollarının aktivasyonu ile sonuçlanır. MAPK/ERK yolağının PCa'da özellikle ileri evrelerde aktiflendiği gösterilmiştir (62-64).

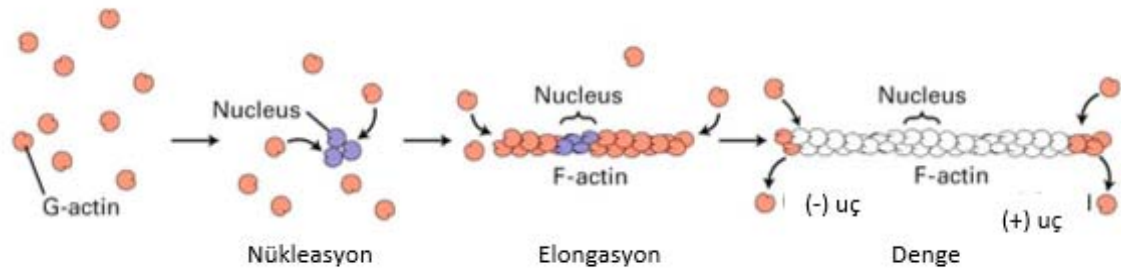
2.3. Aktin Hücre İskeleti ve FMNL1

Aktin hücre iskeleti, aktin polimerlerinden oluşan hücresel filaman ağıdır. Hücreye yapısal destek verir, adezyonu düzenler ve hücre göçü için gerekli hücresel çıkıntıları oluşturur.

Aktin molekülleri globüler (G) proteindir, polimerize olarak filamentöz (F) aktin oluşturur. Aktin lifleri polimerizasyon işleminden sonra hücrede aktin demetleri veya aktin ağı şeklinde bulunurlar (65).

Aktin polimerizasyonu 3 evrede gerçekleşir:

1. Başlangıç (Nükleasyon): G-aktin kısa küçük oligomerler olarak birleşir ve çekirdek yapıyı oluşturur.
2. Uzama (Elongasyon): Aktin monomerlerinin her iki uca eklenmesiyle uzama gerçekleşir.
3. Sabit devre (Denge): Lif kütleğinde polimerizasyon - depolimerizasyon dengesi ortaya çıkar.

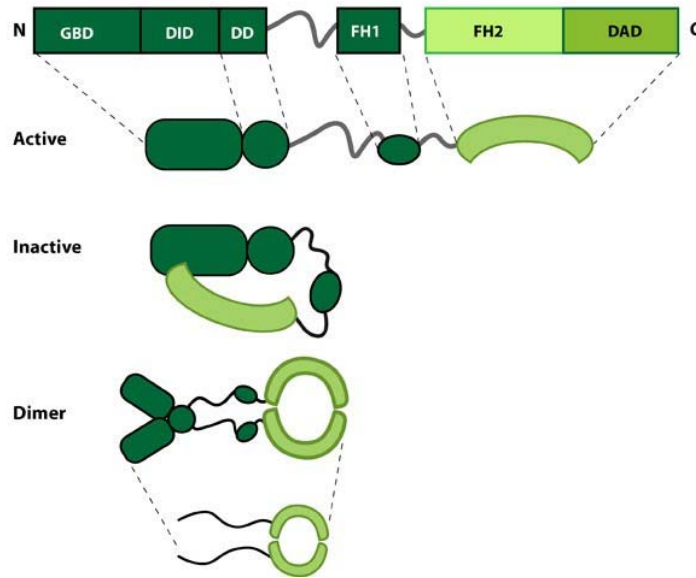


Şekil 2-3: Aktin polimerizasyonu

Aktin polimerizasyonu ile çok çeşitli hücresel olaylar kontrol edilir. Çoğu hücrede hücre zarında endo-ekzositoz, hücre hareketi (yara iyileşmesinde trombositler, enfeksiyonda lökositler, tümör metastazı) yanı sıra sitoplazmik vezikül transportu, hücre zarında integrinler ile adezyon plaklarında (matriks - hücre bağlantısı), kaderinler ile bağlantı komplekslerinde (hücre - hücre bağlantısı) ve hücre hareketi için hücre yüzey uzantıları oluşumunda (tek hücrelilerde pseudopod, doku kültüründe çoğalan fibroblastlarda lammellipod, bazı hücrelerde ise ince, katı ve esnek olmayan filopodlar) görev alır.

Forminler, homodimer oluşturarak işlev gösteren çok domainli polipeptidlerdir. FH2 domainleri ile hem aktin polimerizasyonunun uzama aşamasında görev alırlar hem de polimerizasyonu durduran capping proteinlerden korurlar. Bazı forminlerin FH2 domaini ayrıca G-aktin'den yeni aktin filamanlarının oluşumunu başlatabilir. FH1 domaini ise uzama aşamasında profiline bağlı aktin monomerlerinin toplanmasına aracılık eder profilin aracılığıyla aktin homeostazını ve hücre motilitesini kontrol eder (66).

Forminler ayrıca konformasyonel otoinhibisyon ve aktivasyonda rol oynayan domainler de içerir. Bunlar GTPaz bağlanma domaini (GBD), N-terminal uçta bulunan diyafanöz inhibitör domain (DID) ve C-terminal uçta bulunan diyafanöz otoregülatör domainidir (DAD). DAD ve DID birbiriyle etkileşime girerek FH2 domainini maskeler ve forminin inaktif durumda kalmasına neden olur. Bu da aktin polimerizasyon başlangıcını ve uzamasını engeller. GBD'ye spesifik bir Rho GTPaz'ın bağlanması ile bu otoinhibisyon ortadan kalkar ve fonksiyonel FH2 alanı açığa çıkmış olur (67).



Şekil 2-4: Forminlerin genel yapısı ve dimerizasyonu

Lökositlerde, dalak ve timusta eksprese edilen FMNL1, F-aktin ağlarının oluşumunu ve aktin filamentlerinin demet haline gelmesini düzenler (3, 68, 69). Ayrıca makrofajların podozom adı verilen aktince zengin adezyon birimlerini oluşturarak fagositoz, adezyon ve göç kabiliyetlerini kazanmasına yardımcı olarak birçok immünolojik süreçte de rol oynar (70).

Bu işlevlerini Rho GTPaz ailesi üyeleri olan Rac1 ve RhoA ile etkileşime girerek gerçekleştirir (71).

FMNL1'in nazofarenks karsinoma hücrelerinde histondeasetilaz 1'in (HDAC1) metastasis-associated protein 1 (MTA1) geninin promotör bölgesine bağlanmasını inhibe ederek MTA1'in yukarı doğru regüle edilmesini ve invadopodia oluşumuyla epigenetik yolla epitelden mezenkimale geçişi (EMT) kolaylaştırdığı tespit edilmiştir (72).

FMNL1'in VEGF, N-kaderin, Vimentin, VCAM, MMP2, MMP13 ve interlökin-8 (IL-8) birçok gen ile ilişkili bir şekilde EMT'de etkili olduğu, ayrıca TGF- β 1 yolağında yer alan fosforile SMAD2 ve SMAD3 proteinlerinin de ekspresyonunun FMNL1'in susturulmasıyla azaldığı görülmüştür (73).

Yakın zamanda, FMNL'in CXCR2'yi yukarı regüle ederek migrasyon ve invazyonu arttırdığı, bunu da yine HDAC1 aracılığıyla gerçekleştirdiği bulunmuştur. Fakat bu bağlantıyı etkileyen yolak hâlen tam olarak bulunamamıştır (74).

2.4. PAK1

Serin/treonin kinazların PAK ailesi, hücre iskeleti düzenlemesi için anahtar proteinler olan CDC42 ve Rac için efektör proteinlerdir. PAKların ana işlevleri; hücre şeklini, hareketliliğini ve adezyonunu etkileyerek hücre düzenlemesine katkı sağlamaktır. PAKlar hücre iskeletinin polimerize aktin yapılarını düzenleyerek, özellikle de filopodia ve lamellipodia oluşumuyla kontrol ederler (75).

PAK1'in hemen hemen tüm kanser türlerinde aşırı ekspresyonunun görüldüğü bilinmektedir. İlk olarak 1995 yılında PAK1'in MAPK yolağında etkili olduğu tespit edilmiş, 1997 yılında da aktin iskeleti oluşumunda rol aldığı bildirilmiştir. Meme kanserinde proliferasyon ve progresyonda etkili olduğu tespit edildikten bu yana geçen 20 yıl içinde PAK1'in kanser oluşumundaki rolü araştırılmaya devam etmektedir (76, 77).

PAK1'in HIFleri aktive ederek tümör hücrelerinin hipoksik ortama adaptasyonlarını kolaylaştırmak, bFGF ve VEGF ile etkileşime girerek anjiyogenezi desteklemek, tümör hücrelerinin immün sistemden ve apoptozdan kaçmasına yardımcı olmak gibi onkogenik transformasyonu etkileyen işlevlerinin yanında birçok sinyal yolağında rolü bulunmaktadır (78-82).

Wnt/ β -Catenin yolağının düzenlenmesinde çok önemli bir role sahiptir. PAK1 aktivasyonu β -Catenin'in S675 ve S663'ten fosforillenmesine yol açarak MYC, SiklinD1, MMP ve PPAR γ gibi hedef genlerin transkripsiyonunu sağlar (83).

Normal şartlarda GSK3 aktif haldeyken β -Catenin'i 3 yerden fosforilleyerek proliferasyona yol açan hedef genlerin transkripsiyonunu durdurur, fakat PAK1 aracılığıyla AKT aktivasyonu ile GSK3 fosforillenerek β -Catenin üzerindeki inhibisyon etkisi ortadan kalkar (84).

PI3K, Rac1'i fosforilleyerek PAK1'i aktifleştirir. Rac1 aynı zamanda AKT'yi de aktifleştirir. AKT ve PAK1 birbirlerinin aktivitelerini doğrudan uyarıp etkileyebilir. PI3K-AKT ve MAPK-ERK yolakları günümüzde özellikle kanserde ilaç direncinde aktif rol oynar. Bu iki yolağın ortak hareketi ile kanser hücreleri çeşitli antikanser ilaçlar varlığında da hayatını sürdürebilir (85).

Ras, PI3K'yi doğrudan aktive edebilirken, AKT ve Raf, birbirlerini düzenleyerek hücre proliferasyonunu veya hücre döngüsü ilerlemesini etkiler. PAK1 ayrıca Raf,

MEK ve ERK'yı etkinleştirerek bu ağa katkıda bulunurken, Raf da aynı şekilde PAK1'i etkinleştirir (86, 87).

PAK1, Raf1'i Ser338 ve Ser339'dan fosforilleyerek mitokondriye translokasyonunu sağlayarak proapoptotik BAD'ın Ser112'den fosforillenmesine sebep olur. Mitokondride Raf1, Bcl2-BAD kompleksini bozar ve Bcl2'nin antiapoptotik özelliğini arttırır. PAK1 ayrıca BAD'ı Ser111'de direkt fosforile edebilir (88, 89).

PAK1, JNK ve NIK (NF-κB interacting kinase)'in üzerinden NF-κB yolağını da destekler ve hedef genlerin aktivasyonu sonucu proliferasyon, hücre göçü ve sağkalımını arttırır (90).

PAK1, EMT ve metastazı birçok yol üzerinden destekler. EMT'nin özelliği, epitel hücreler arasındaki teması sağlayan adeziv bağlantıların degradasyonundan kaynaklanan hücre bütünlüğü kaybıdır. Bu degradasyonu twist, snail ve slug gibi EMT-transkripsiyon faktörleri tarafından yönlendirilen MMPlar gerçekteştirir. Aynı zamanda bu transkripsiyon faktörleri, E-kaderin gibi epitelyal hücreye özgü proteinlerin ekspresyonunu inhibe eder. Bu transkripsiyon faktörlerinin tümü de PAK1 tarafından aktiflenebilir. Böylece kanser hücreleri PAK1 tarafından düzenlenen bir sinyal ağı aracılığıyla daha da fazla metastaz özelliği kazanırlar (91, 92).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmada Kullanılan Örnekler

Çalışmaya 2017-2019 yılları arasında İ.Ü. İTF Üroloji Ana Bilim Dalı ve/veya İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü'ne başvuran; klinik, radyolojik ve histopatolojik olarak prostat kanseri tanısı alan 60 hasta ve kontrol grubu olarak 20 sağlıklı gönüllü dahil edildi. Prostat kanserli hastaların yaş ortalaması 65.7 (46-78) olarak belirlendi. 60 prostat kanserli hastanın 38i lokal, 18i lokal ileri ve 4ü metastatik olarak belirlendi. Prostat kanserli hastaların özellikleri Tablo 3.1'de verilmiştir.

Hastalardan alınan kan ve idrar örnekleri 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj (Hettich Universal 32) edildi. Ayrılan plazma ve idrar örnekleri testler gerçekleştirilene kadar -80°C'de saklandı.

Tablo 3-1: PCa hastalarının özellikleri

		Yaş Ortalaması		Evre		
		< 65	≥ 65	Lokal	Lokal İleri	Metastatik
N	60	21	39	38	18	4
%	100	35	65	63.3	30	6.7

3.2. Gen Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi

3.2.1. RNA İzolasyonu

Örneklerden tüplere 1 mL alınarak üzerine 2 mL RNazol BD (Molecular Research Center, Inc. USA), 10 µL glacial asetik asit ve 1 µL Polyacryl Carrier (Molecular Research Center, Inc. USA) eklendi. 15-30 saniye çalkalandı. 150 µL 1-bromo-3-kloropropan (BCP) (Molecular Research Center, Inc. USA) lizatin üzerine eklendi. 15-30 saniye çalkalandı. 15 dakika oda sıcaklığında inkübasyon yapıldı. İnkübasyon sonrası 12.000 g'de 15 dakika santrifüj edildi. 1.5 mL süpernatant yeni bir tüpe aktarıldı. Supernatantın üzerine 1.5 mL izopropanol eklendi. 15 dakika oda sıcaklığında inkübasyon yapıldı. İnkübasyon sonrası 12.000 g'de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra sıvı atılıp dipteki pellet üzerine 0.5 mL %75 etanol eklenip karıştırıldı. 12.000 g'de 3 dakika santrifüj yapıldı. Yıkama işlemi 2 kez tekrarlandı. RNA peletini kurutmadan su içinde çözüldü. Suda iyi çözünebilmesi için 3-5 dakika vortekslandı. İzole edilen RNAların ölçümleri yapıldı.

3.2.2. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

Elde edilen total RNA'lerden cDNA sentezi için ticari olarak temin edilen cDNA kiti (Jena Bioscience GmbH, Germany) kullanıldı. cDNA sentezi öncesi tüm RNA konsantrasyonları eşitlendi. Toplam hacim 20 µL olacak şekilde reaksiyon örnek başına tablodaki gibi gerçekleştirildi. Hazırlanan reaksiyon karışım pipetleme yapıldıktan sonra kuyucuklara dağıtıldı ve ardından RNA ürünleri dağıtıldı. Daha sonra plate içine konulan örnek karışımları konvansiyonel PCR cihazına konularak reaksiyon aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi. Elde edilen cDNA örnekleri -20°C'de saklandı.

Tablo 3-2: cDNA sentezi reaksiyon bileşenleri

Reaksiyon Bileşenleri	1 Örnek İçin Hacim
RNase free su	10.5 µL
SCRIPT RT Reaksiyon Tamponu	4 µL
10 mM Deoksiniükleotid Karışımı	1 µL
DTT stok solüsyonu	1 µL
RNase inhibitörü	1 µL
SCRIPT Reverse Transkriptaz	0.5 µL
RNA ürün	2 µL

Tablo 3-3: cDNA sentezi reaksiyon koşulları

Sıcaklık (°C)	Süre
42	10 dk.
50	60 dk.
70	10 dk.

Tablo 3-4: Çalışılan genlere ait primerler

Gen	İleri primer F (5'-3')	Geri primer R (5'-3')
FMNL1	AAC TTCCGTGTCTTCCTGCAA	CTTG TCACTCTCGGTGAGCC
PAK1	TTGTGAAATGCTCTCGGCTATG	TCACCATTTTCCCCGACTTC

3.2.3. Gerçek-Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

FMNL1 ve PAK1 moleküllerinin mRNA ekspresyon düzeyleri SYBR Green Master PCR Kit (Jena Bioscience GmbH, Germany) kullanılarak LightCycler 480 (Roche Diagnostics) cihazında gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile analiz edildi. Referans gen olarak β -aktin geni kullanıldı. RT-PCR koşulları kitin protokolüne göre uygulandı.

cDNA eldesinden sonra diğer işlem olan Real Time PCR işlemi için hazır ticari kitler kullanıldı. Jena Bioscience firmasının (Jena Bioscience GmbH, Germany Cat no: PCR-372) qPCR Sybr Master Mix kiti kullanılarak RT-PCR gerçekleştirildi. Tüm işlemler buz içerisinde, reaksiyon hacmi 20 μ L olacak şekilde gerçekleştirildi. Bunun için 0.6 μ L ileri primer, 0.6 μ L geri primer 6,8 μ L PCR grade su, 10 μ L qPCR SybrMasterMix ve 2 μ L cDNA içeren reaksiyon karışımı hazırlandı. Daha sonra 96 kuyucuklu plate içine konulan örnek karışımları RT-PCR cihazına konularak reaksiyon tabloda gösterildiği şekilde gerçekleştirildi (Tablo 3-5).

Oluşan reaksiyon ürünlerinin istenilen hedef bölge olup olmadığının doğrulanması ve non-spesifik çoğalma ile primer dimerleri gibi kontaminasyonların saptanması için “erime eğrisi analizi” gerçekleştirildi. Bu yöntemde RT-PCR ürünlerinin sıcaklığının kademeli olarak arttırılmasıyla (55°C $\rightarrow$ 95°C, 0.2°C/sn) elde edilen sinyalin sıcaklığa bağlı değişimini veren erime eğrileri ortaya çıkmaktadır.

Gen ifadelerinin analizi, iki bağımsız tekrarlı deneyin sonucunda elde edilen Ct (cycle threshold) değerlerinin ortalaması alınarak yapıldı. Araştırılmak istenen ilgili genin Ct değeri, referans genin Ct değerinden çıkartılarak normalize edilip delta Ct (Δ Ct) değeri hesaplandı. Daha sonra kontrol grubunun Δ Ct değerleri, deney grubunun Δ Ct değerlerinden çıkartılarak $\Delta\Delta$ Ct değeri bulundu. Gen ifadelerinin kat cinsinden artan ya da azalan değerleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ olarak hesaplandı.

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

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

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

Tablo 3-5: Gerçek-Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyon koşulları

Basamak	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
İlk Denatürasyon ve Polimeraz Aktivasyon	95°C	2 dk.	1 döngü
Denatürasyon	95°C	15 sn.	40 döngü
Bağlanma ve Uzama	60-65°C	1 dk.	

Tablo 3-6: Gerçek-Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyon bileşenleri

RT-PCR Reaksiyon Bileşenleri	1 Örnek için Hacim
Primer F	0.6 µL
Primer R	0.6 µL
PCR grade su	6.8 µL
qPCR SybrMasterMix	10 µL
cDNA	2 µL
TOPLAM	20 µL

3.3. Protein Düzeylerinin Belirlenmesi

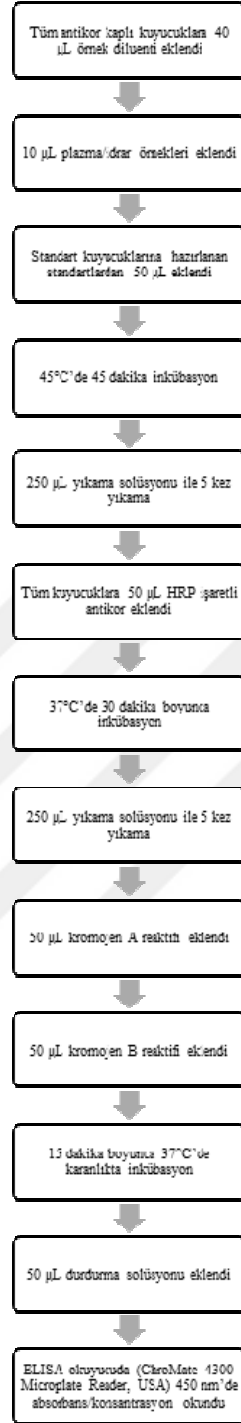
3.3.1. ELISA Yöntemi

Bir örnekteki protein konsantrasyonunu tespit etmek için kullanılan Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) yönteminin temeli enzim aracılığıyla işaretleme işlemine dayanır.

Bu yöntemde kullanılan plakanın kuyucukları ilgili antijene dair antikorla kaplanmıştır. Bu kuyucuklara bilinen miktarda antijen içeren standartlar ve örnekler eklenerek antikor-antijen bağlanması sağlanır. Bağlanmayan antijenin ve diğer maddelerin yıkama işlemi ile uzaklaştırılmasından sonra ortama primer antikordan farklı, enzim ile işaretlenmiş sekonder bir antikor ilave edilir. Bu komplekse Antikor-Antijen-Antikor* “enzim solid faz sandviç kompleksi” denir. Yıkama işlemi ile bağlanmamış sekonder antikorlar uzaklaştırılarak sonraki aşamada ortama sekonder antikorun işaret enziminin substratı eklenir. Enzim substratı ile etkileştiğinde örnekteki primer antijen konsantrasyonu ile doğru orantılı renk reaksiyonu oluşur. Bu rengin absorbansı spektrofotometrik olarak belli dalga boyunda okunarak konsantrasyonu bilinen standartlarla çizilen standart eğri yardımıyla örnekler ait konsantrasyonlar belirlenir.

3.3.2. FMNL1 Düzeylerinin Belirlenmesi

FMNL1 protein düzeylerini belirlemek için temin edilen ticari ELISA kiti (Abbkine Scientific Co., Ltd, Wuhan, China) kullanıldı. Çalışma öncesinde plazma ve idrar örnekleri -80°C’den çıkartılarak oda sıcaklığına getirildi. FMNL1 düzeylerini belirlemek için 640 pg/mL stok standarttan 20 pg/mL, 40 pg/mL, 80 pg/mL, 160 pg/mL ve 320 pg/mL değerlerinde standartlar standart diluenti kullanılarak hazırlandı. Deney protokolü Şekil 3.1’de belirtildiği gibi gerçekleştirildi.

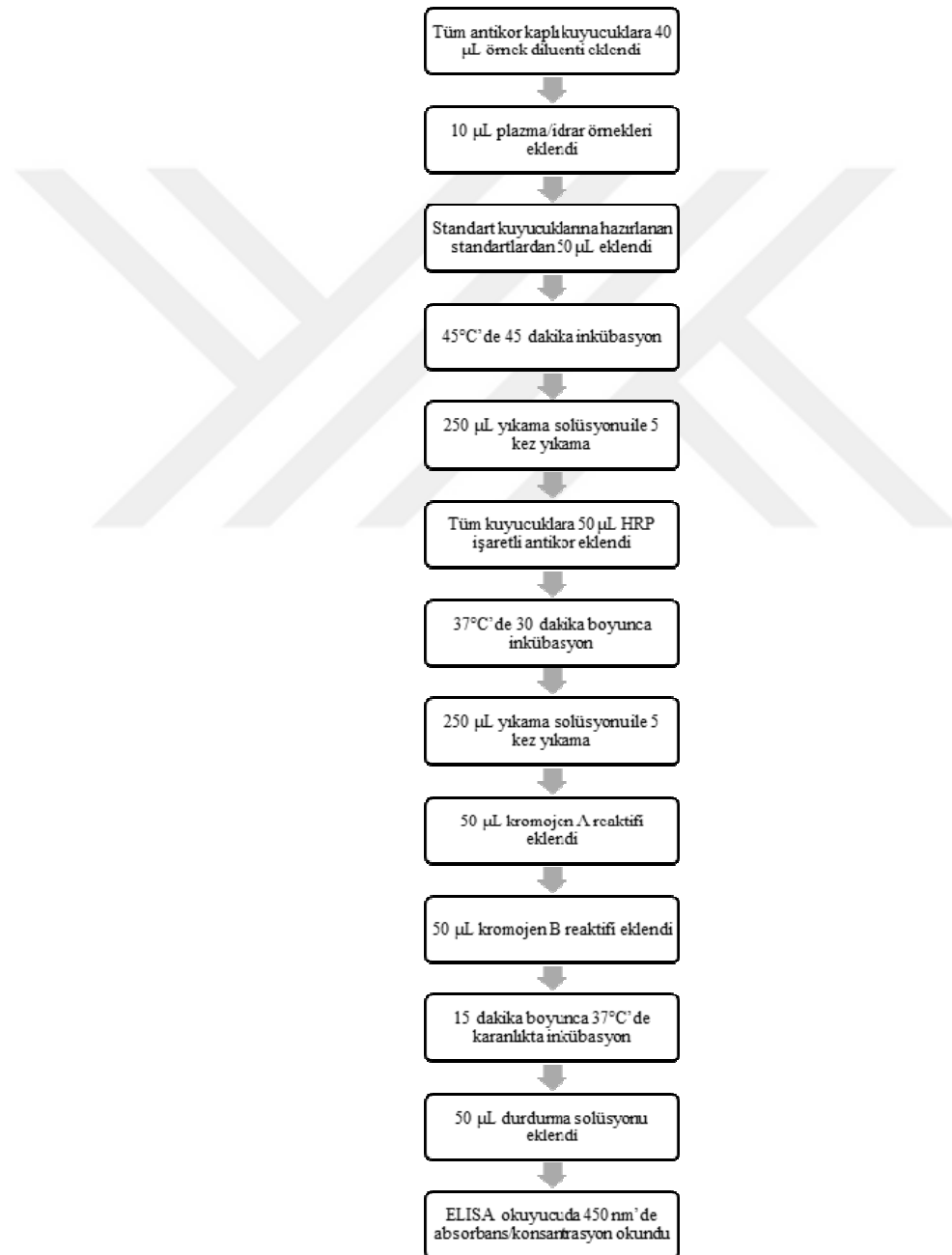


Şekil 3-1: FMNL1 ELISA protokolü

Absorbansları okunan ve değerleri bilinen standartlar yardımıyla çizilen standart eğriden hesaplanan konsantrasyon değerleri otomatik olarak okunan konsantrasyonlarla karşılaştırıldı. Elde edilen konsantrasyon değerleri dilüsyon faktörü (5) ile çarpıldı.

3.3.3. PAK1 Düzeylerinin Belirlenmesi

PAK1 protein düzeylerini belirlemek için temin edilen ticari ELISA kiti (Abbkine Scientific Co., Ltd, Wuhan, China) kullanıldı. Çalışma öncesinde plazma ve idrar örnekleri -80°C 'den çıkartılarak oda sıcaklığına getirildi. PAK1 düzeylerini belirlemek için 1200 pg/mL stok standarttan 37.5 pg/mL, 75 pg/mL, 150 pg/mL, 300 pg/mL ve 600 pg/mL değerlerinde standartlar standart diluenti kullanılarak hazırlandı. Deney protokolü Şekil 3.2'de belirtildiği gibi gerçekleştirildi.



Şekil 3-2: PAK1 ELISA protokolü

Absorbansları okunan ve değerleri bilinen standartlar yardımıyla çizilen standart eğriden hesaplanan konsantrasyon değerleri otomatik olarak okunan konsantrasyonlarla karşılaştırıldı. Elde edilen konsantrasyon değerleri dilüsyon faktörü (5) ile çarpıldı.

3.4. Sonuçların Değerlendirilmesinde Kullanılan İstatistiksel Yöntemler

İstatistiksel analizler SPSS Software (SPSS 16, Chicago, IL, USA) ile gerçekleştirildi. Değişkenlerin Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk yöntemleri ile yapılan normal dağılıma uygunluk testleri sonucunda parametreler arasındaki istatistiksel anlamlılıkların hesaplanması için non-parametrik Mann-Whitney U testi uygun görüldü. Anlamlılık sınırı $p < 0.05$ olarak kabul edildi. Korelasyon katsayıları ve istatistiksel anlamlılıklar Spearman testi ile hesaplandı. Testlerin tanısal değerleri ROC eğrisi kullanılarak belirlendi.

4. BULGULAR

4.1. Gen Ekspresyon Düzeyleri

Plazma FMNL1 gen ekspresyon düzeylerinin aritmetik ortalama, standart sapma ve ortanca değerleri prostat kanserli hastalarda ve sağlıklı kontrollerde sırasıyla 1.33 ± 1.96 ; 0.66 ve 1.64 ± 1.61 ; 1.44 olarak bulundu. İdrar FMNL1 gen ekspresyon düzeylerinin aritmetik ortalama, standart sapma ve ortanca değerleri hastalarda 1.93 ± 6.58 ; 0.42 ; kontrollerde 1.06 ± 1.61 ; 1.44 olarak bulundu. Plazma PAK1 gen ekspresyon düzeylerinin aritmetik ortalama, standart sapma ve ortanca değerleri hastalarda ve kontrollerde sırasıyla 0.70 ± 1.37 ; 0.15 ve 0.96 ± 1.52 ; 0.25 olarak bulundu. İdrar PAK1 gen ekspresyon düzeylerinin aritmetik ortalama, standart sapma ve ortanca değerleri hastalarda 1.07 ± 2.16 ; 0.39 ve kontrollerde 0.93 ± 0.66 ; 0.83 olarak bulundu (Tablo 4-1).

Tablo 4-1: Prostat kanserli hasta ve sağlıklı kontrol gruplarında gen ekspresyonlarının aritmetik ortalama (x), standart sapma (sd), ortanca (m), minimum (min) ve maksimum (max) değerleri

Gen Ekspresyon Düzeyleri	Prostat kanseri (n=60) x±sd m(min,max)	Kontrol (n=20) x±sd m(min,max)
Plazma FMNL1	1.33 ± 1.96 $0.66(0.07-13.44)$	1.64 ± 1.61 $1.44(0.09-5.78)$
İdrar FMNL1	1.93 ± 6.58 $0.42(0.01-48.44)$	1.06 ± 0.85 $0.83(0.15-3.55)$
Plazma PAK1	0.70 ± 1.37 $0.15(0.02-5.43)$	0.96 ± 1.52 $0.25 (0.03-4.85)$
İdrar PAK1	1.07 ± 2.16 $0.39(0.01-11.48)$	0.93 ± 0.66 $0.83(0.03-2.09)$

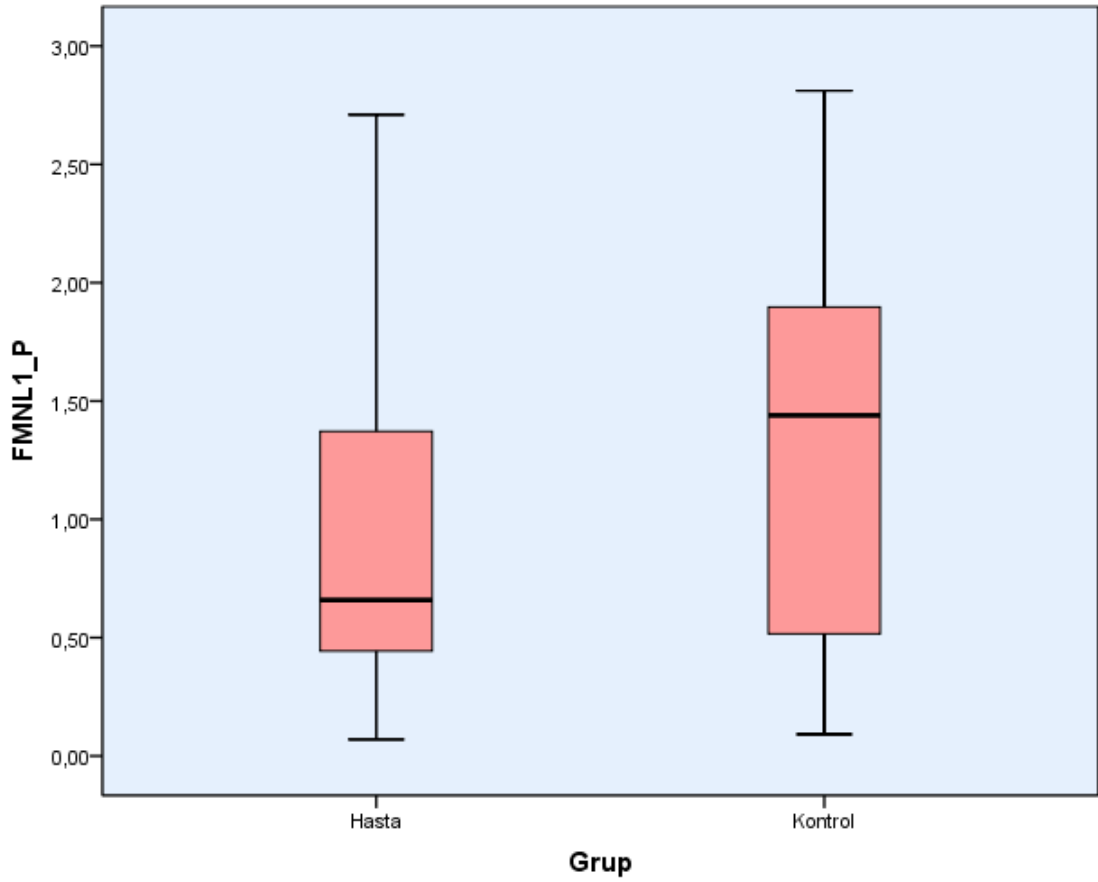
Prostat kanserli hastalarda plazma ve idrar FMNL1 gen ekspresyon düzeyleri sağlıklı kontrol grubuna göre düşük bulunsa da istatistiksel açıdan anlamlılık bulunamadı ($p=0.182$, $p=0.126$). Hasta grubunda plazma ve idrar PAK1 gen ekspresyon seviyeleri kontrol grubuna göre düşük bulundu, fakat istatistiksel anlamlılık bulunamadı ($p=0.191$, $p=0.071$). (Tablo 4-2).

Tablo 4-2: Prostat kanserli hastalar ile sağlıklı kontrol gruplarında gen ekspresyon düzeylerinin istatistiksel anlamlılıkları

PLAZMA GEN	FMNL1	PAK1
Prostat Ca. / Kontrol	$p=0.182$	$p=0.191$
İDRAR GEN	FMNL1	PAK1
Prostat Ca. / Kontrol	$p=0.126$	$p=0.071$

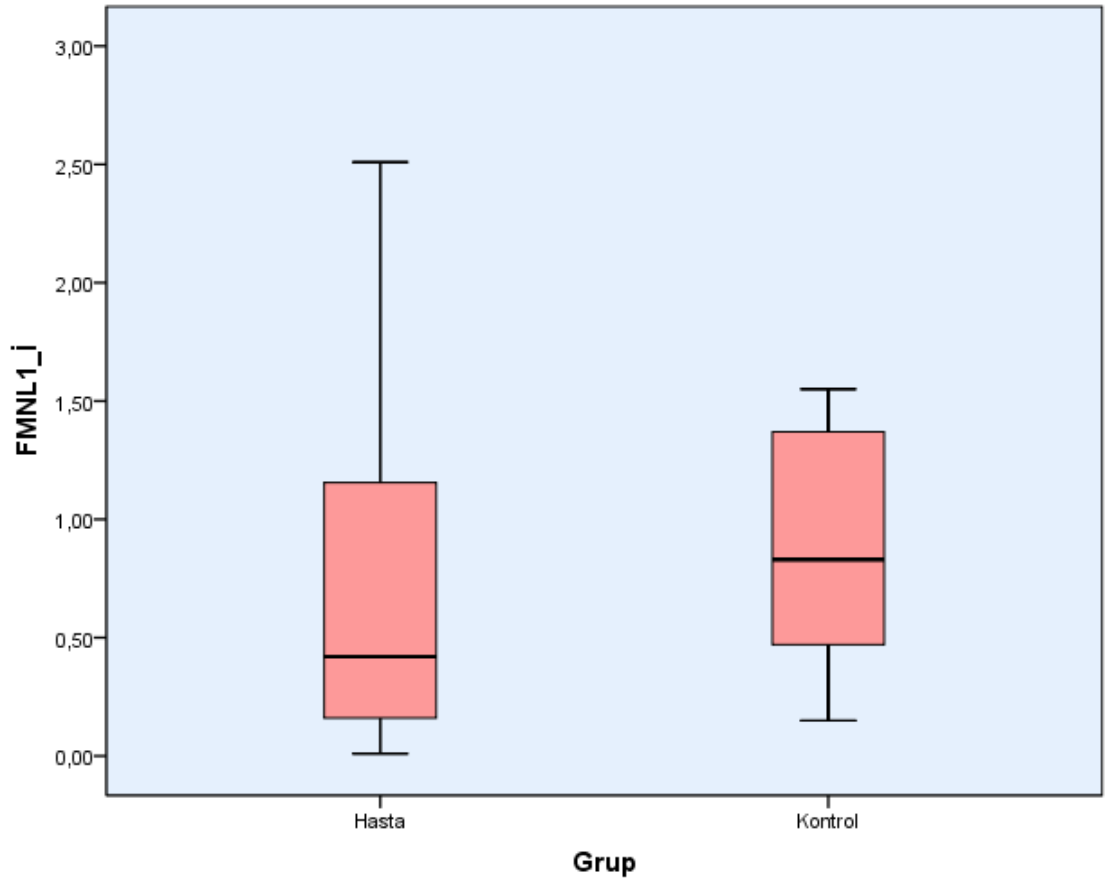
Hastaların yaş, evre ve PSA değerleriyle testler arasında herhangi bir istatistiksel anlamlılık bulunamadı ($p>0.05$).

Hasta ve kontrol grubunda gen ekspresyon düzeylerinin dağılımı grafiklerde verilmiştir (Şekil 4-1-4-4).



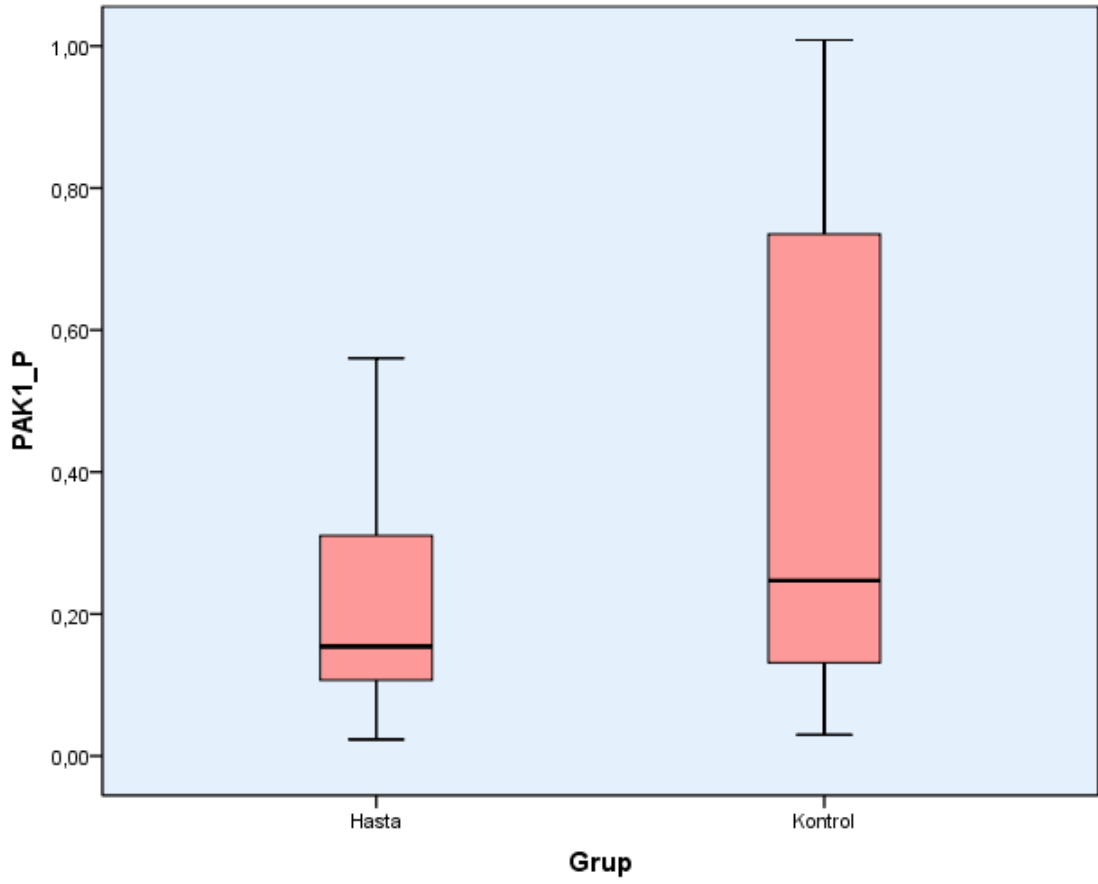
Şekil 4-1: Prostat kanserli hastaların ve sağlıklı kontrollerin plazma FMNL1 gen ekspresyon değerleri

Şekil 4-1’de görüldüğü gibi plazma FMNL1 gen ekspresyon düzeyleri prostat kanserli hastalarda ortalanca değerinin ($m=0.66$) üzerinde dağılım göstermekte olup sağlıklı kontrol grubunda medyan değerinin ($m=1.44$) altında bir dağılım göstermektedir.



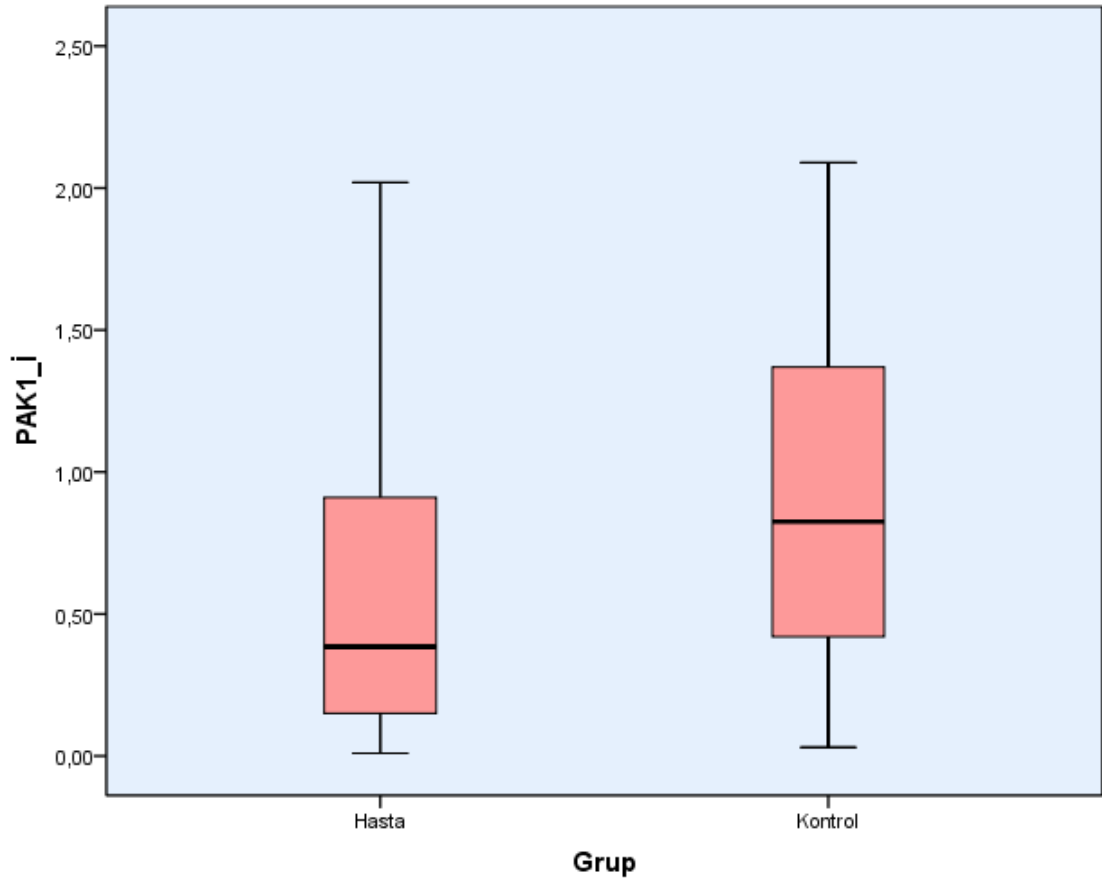
Şekil 4-2: Prostat kanserli hastaların ve sağlıklı kontrollerin idrar FMNL1 gen ekspresyon değerleri

Şekil 4-2’de görüldüğü gibi idrar FMNL1 gen ekspresyon düzeyleri prostat kanserli hastalarda ortanca değerinin ($m=0.42$) üzerinde dağılım göstermekte olup sağlıklı kontrol grubunda ortanca değerine ($m=0.83$) yakın bir dağılım göstermektedir.



Şekil 4-3: Prostat kanserli hastaların ve sağlıklı kontrollerin plazma PAK1 gen ekspresyon değerleri

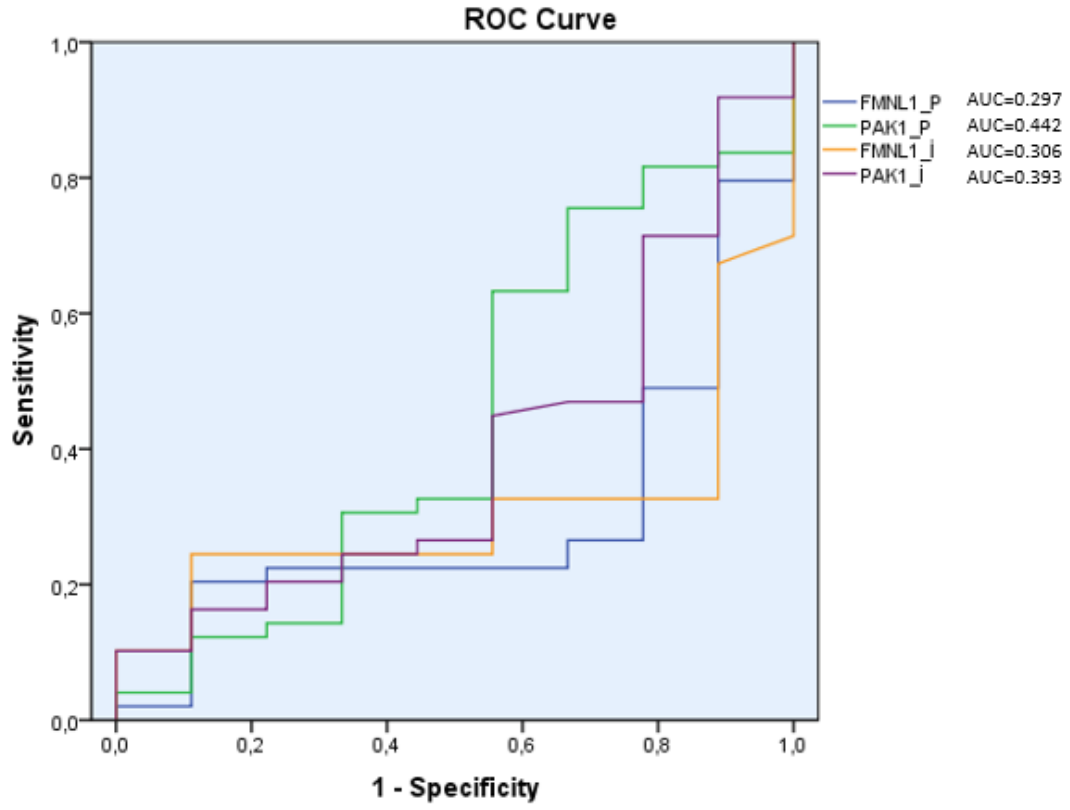
Şekil 4-3'te görüldüğü gibi plazma PAK1 gen ekspresyon düzeyleri prostat kanserli hastalarda ortanca değerinin ($m=0.15$) üzerinde dağılım göstermekte olup sağlıklı kontrol grubunda ortanca değerinin ($m=0.25$) üzerinde bir dağılım göstermektedir.



Şekil 4-4: Prostat kanserli hastaların ve sağlıklı kontrollerin idrar PAK1 gen ekspresyon değerleri

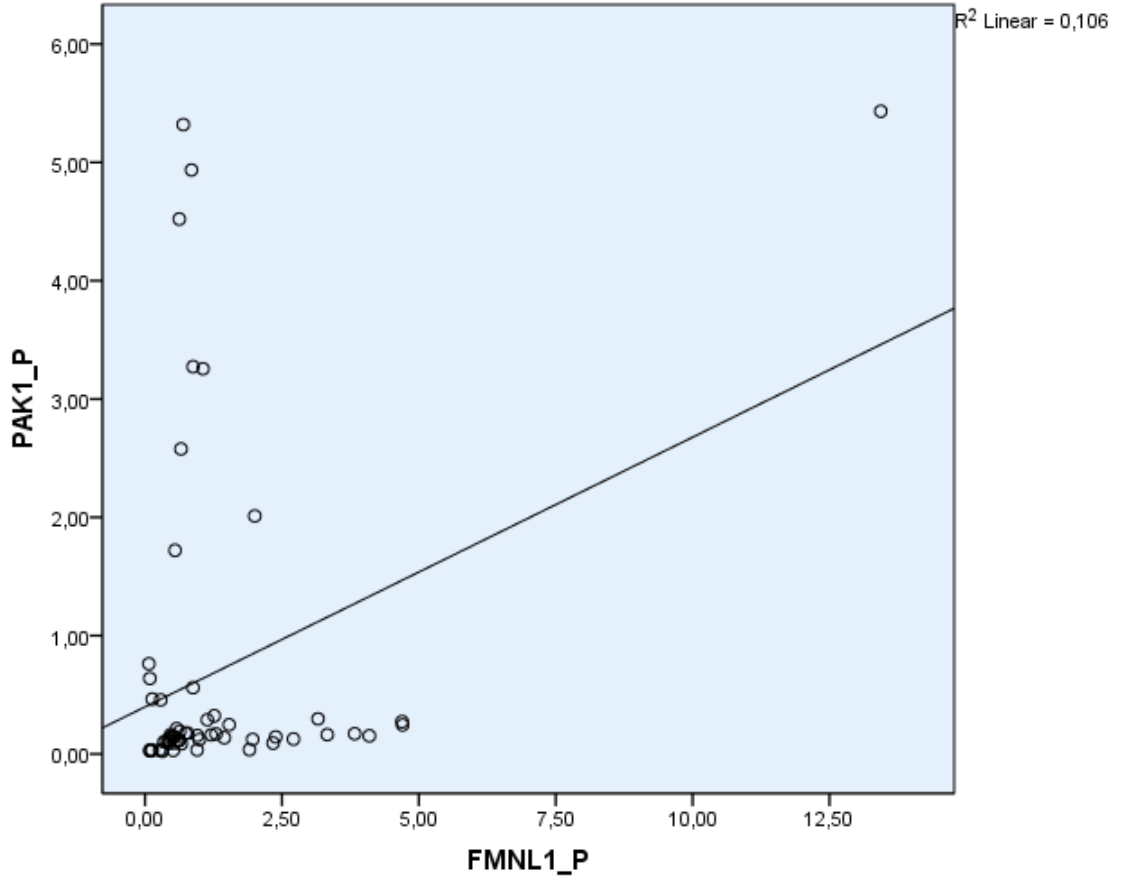
Şekil 4-4'te görüldüğü gibi idrar PAK1 gen ekspresyon düzeyleri prostat kanserli hastalarda ortanca değerinin ($m=0.39$) üzerinde dağılım göstermekte olup sağlıklı kontrol grubunda ortanca değerine ($m=0.83$) yakın bir dağılım göstermektedir.

Testlere ait ROC analizi gerçekleştirildi ve ROC eğrilerine göre Eğri Altında Kalan Alan (Area Under Curve/AUC) hesaplandı. Yapılan değerlendirme sonucunda testlerin tanısal değerinin düşük olduğu belirlendi (şekil 4-5).



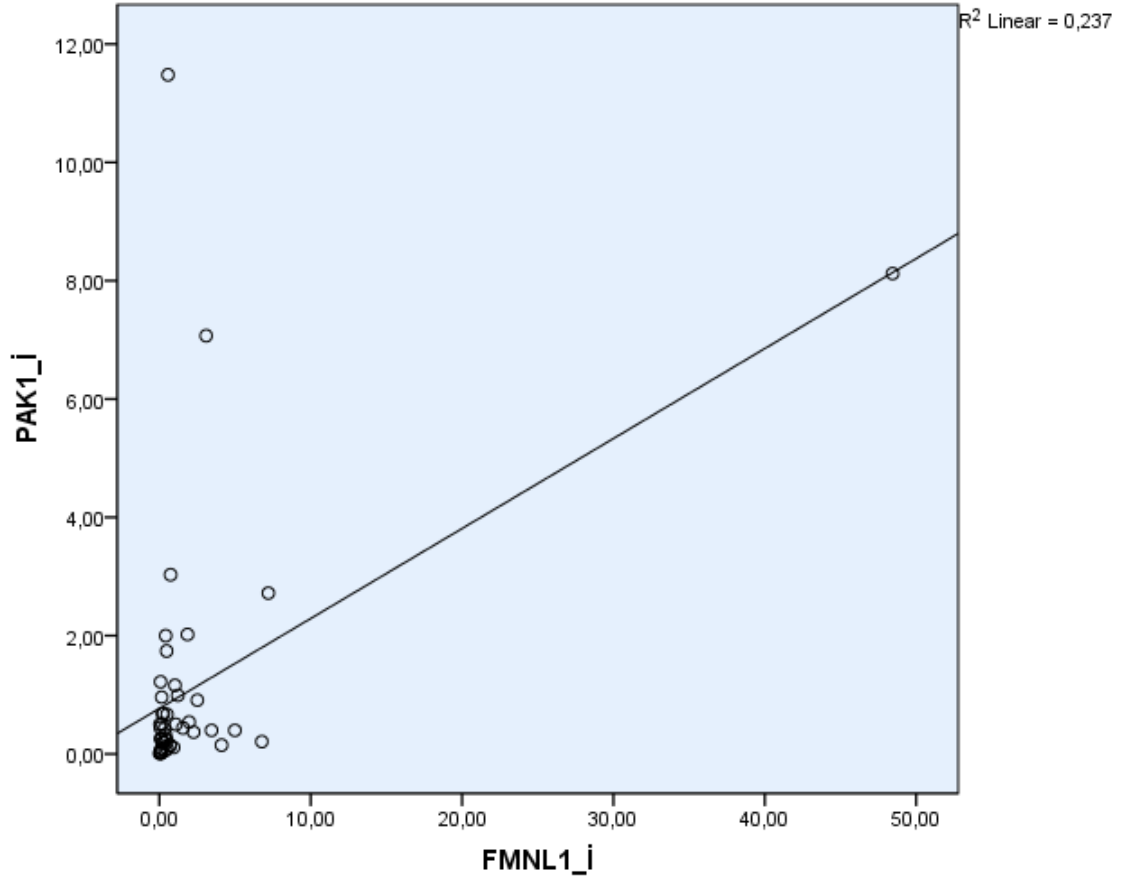
şekil 4-5: Gen ekspresyon testlerinin ROC analizi

Testler arası korelasyon Spearman testi ile saptandı. Plazma FMNL1 gen ekspresyon seviyeleri ile plazma PAK1 gen ekspresyon seviyeleri arasında korelasyon mevcut bulundu ($p=0.005$, $r=0.354$) (Şekil 4-6).



Şekil 4-6: Plazma gen ekspresyonları korelasyon grafiği

Testler arası korelasyon Spearman testi ile saptandı. İdrar FMNL1 gen ekspresyon seviyeleri ile idrar PAK1 gen ekspresyon seviyeleri arasında korelasyon mevcut bulundu ($p=0.002$, $r=0.439$) (Şekil 4-7).



Şekil 4-7: İdrar gen ekspresyonları korelasyon grafiği

4.2. Protein Düzeyleri

Plazma protein FMNL1'in aritmetik ortalama (x), standart sapma (sd) ve ortanca (m) değerleri prostat kanserli hastalarda ve sağlıklı kontrollerde sırasıyla 425.9±460.2;357.5 ng/L ve 389.7±68.4;379.8 ng/L bulundu. İdrar protein FMNL1'in aritmetik ortalama, standart sapma ve ortanca değerleri hastalarda 509.5±47.8;508.5 ng/L; kontrollerde 520.7±80.3;544.8 ng/L olarak bulundu. Plazma protein PAK1'in aritmetik ortalama, standart sapma ve ortanca değerleri hastalarda ve kontrollerde sırasıyla 682.5±504.4;631.8 ng/L ve 683.3±101.7;658.5 ng/L olarak bulundu. İdrar protein PAK1'in aritmetik ortalama, standart sapma ve ortanca değerleri hastalarda 614.3±201.1;669.5 ng/L; kontrollerde 868.8±117.2;893.5 ng/L olarak bulundu (Tablo 4-3).

Tablo 4-3: Prostat kanserli hasta ve sağlıklı kontrol gruplarında protein düzeylerine ait aritmetik ortalama (x), standart sapma (sd), ortanca (m), minimum (min) ve maksimum (max) değerleri

PROTEİN DÜZEYLERİ (ng/L)	Prostat Ca. (n=60) x±sd m(min,max)	Kontrol (n=20) x±sd m(min,max)
Plazma FMNL1	425.9±460.2 357.5(219.0-3505.0)	389.7±68.4 379.8(266.5-553.5)
İdrar FMNL1	509.5±47.8 508.5(421.0-637.0)	520.7±80.3 544.8(330.0-592.0)
Plazma PAK1	682.5±504.4 631.8(242.5-4175.0)	683.3±101.7 658.5(514.5-846)
İdrar PAK1	614.3±201.1 669.5(197.5-950.5)	868.8±117.2 893.5(457.0-1005.0)

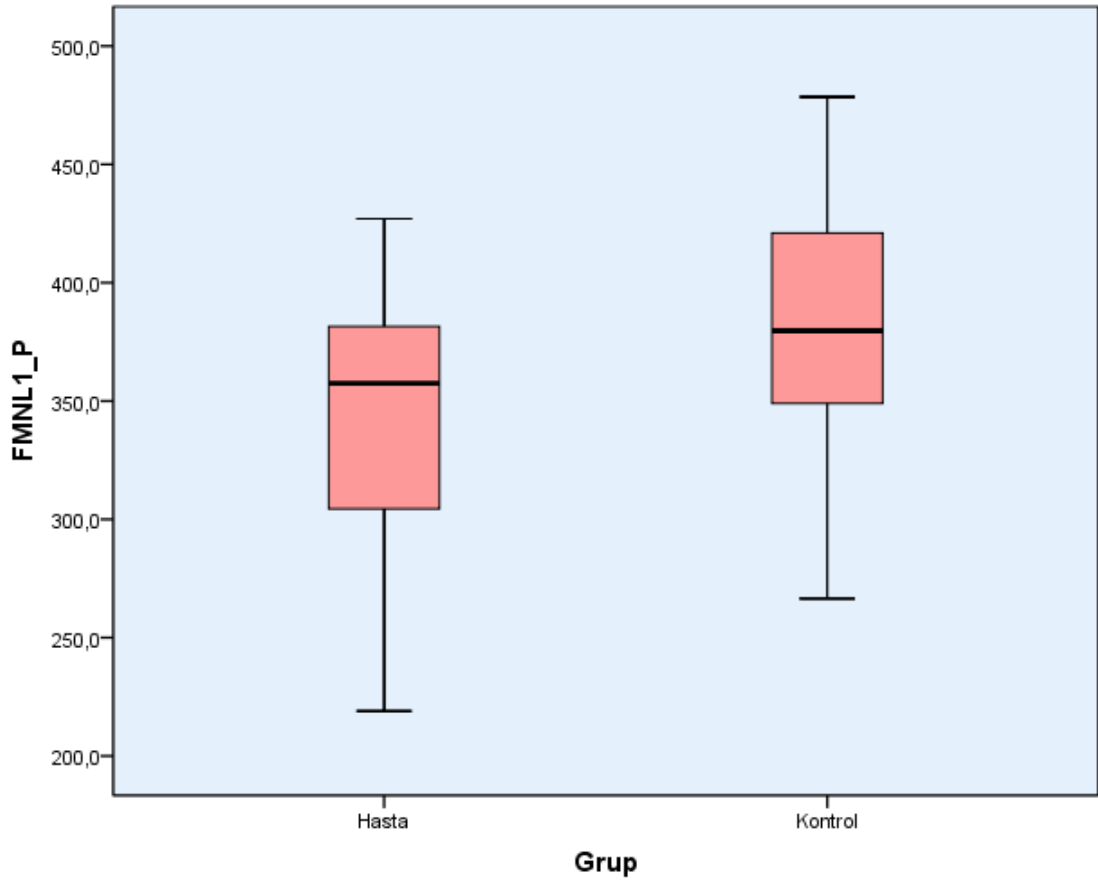
Prostat kanserli hastalarda plazma ve idrar protein FMNL1 düzeyleri sağlıklı kontrol grubuna göre düşük olsa da istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p=0.077$, $p=0.068$). Prostat kanserli hasta grubuyla sağlıklı kontrol grubu plazma protein PAK1 düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p=0.089$). Prostat kanserli hastalarda idrar protein PAK1 düzeyleri sağlıklı kontrol grubuna göre düşük bulunmuş ve istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır ($p=0.00$) (Tablo 4-4).

Tablo 4-4: Prostat kanserli hastalar ile sağlıklı kontrol gruplarında protein düzeylerinin istatistiksel anlamlılıkları (p değeri)

PLAZMA PROTEİN	FMNL1	PAK1
Prostat Ca. / Kontrol	$p=0.077$	$p=0.089$
İDRAR PROTEİN	FMNL1	PAK1
Prostat Ca. / Kontrol	$p=0.068$	$p=0.000$

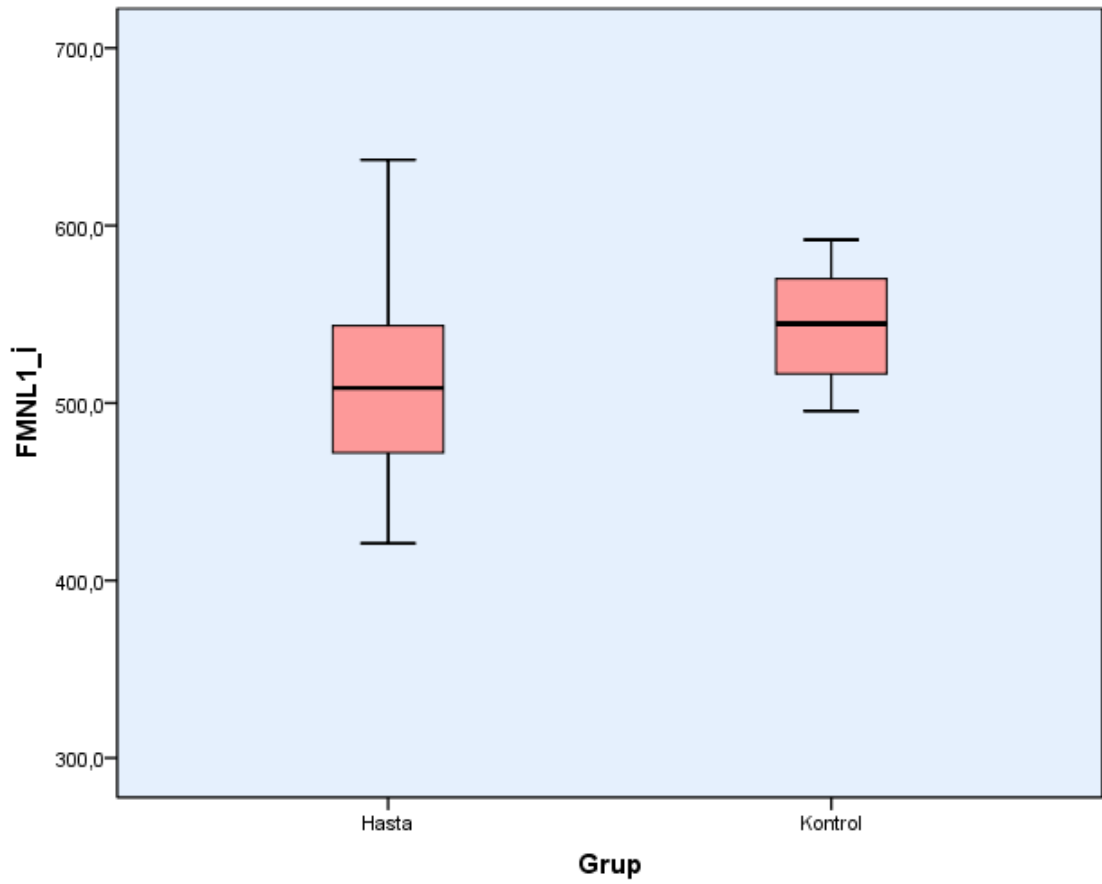
Hastaların yaş, evre ve PSA değeriyle testler arasında herhangi bir istatistiksel anlamlılık bulunamamıştır ($p>0.05$).

Hasta ve kontrol grubunda gen ekspresyon düzeylerinin dağılımı grafiklerde verilmiştir (Şekil 4-8-4-11).



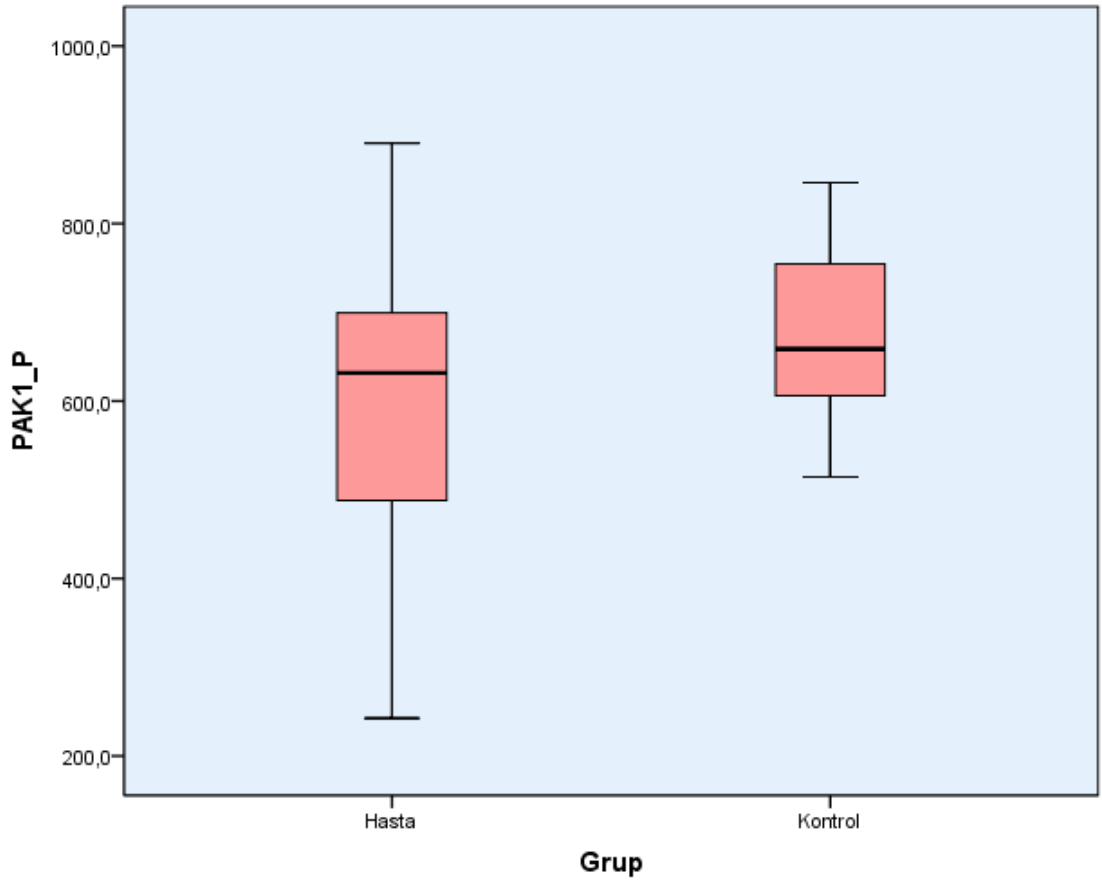
Şekil 4-8: Plazma FMNL1 Dağılım Grafiği

Şekil 4-8’de görüldüğü gibi plazma FMNL1 protein düzeyleri prostat kanserli hastalarda ortalanca değerinin ($m=357.5$ ng/L) altında bir dağılım göstermekte olup sağlıklı kontrol grubunda ortalanca değerine ($m=379.8$ ng/L) yakın dağılım göstermektedir.



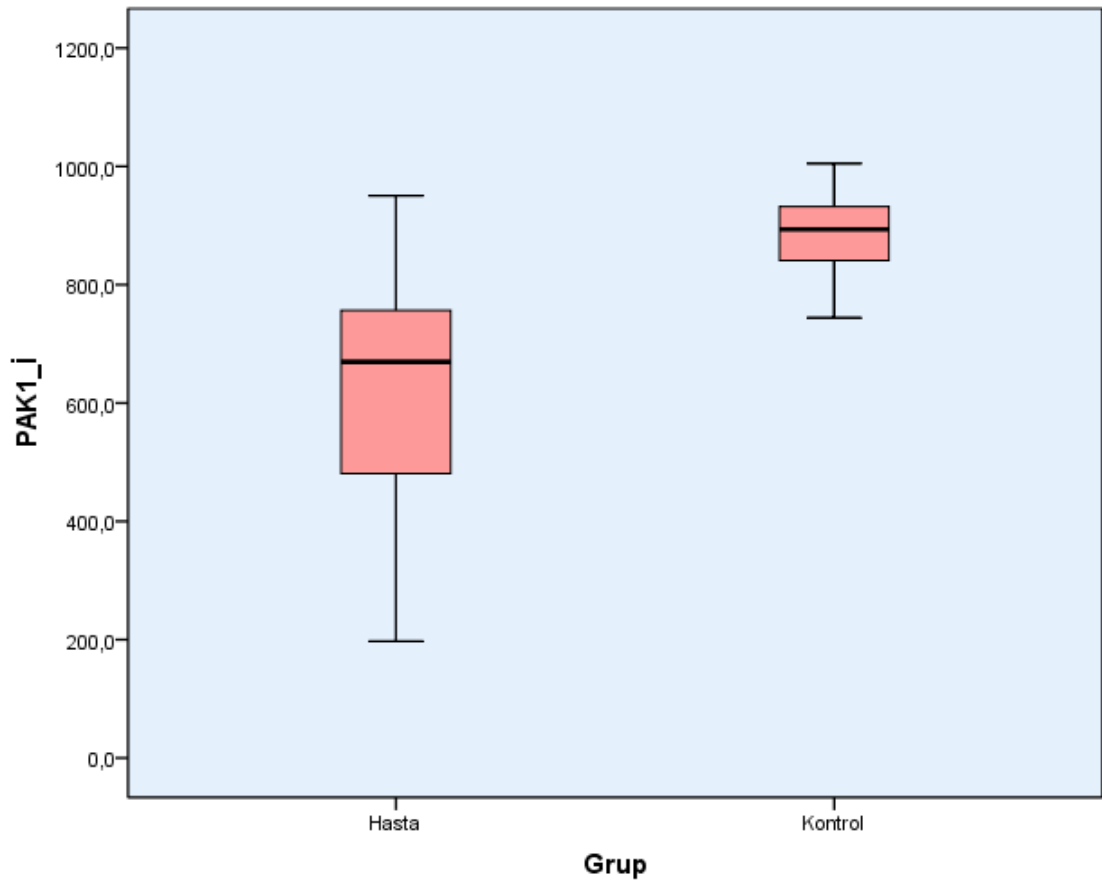
Şekil 4-9: İdrar FMNL1 Dağılım Grafiği

Şekil 4-9’da görüldüğü gibi idrar FMNL1 protein düzeyleri prostat kanserli hastalarda ortalanca değerine ($m=508.5$ ng/L) yakın dağılım göstermekte olup sağlıklı kontrol grubunda ortalanca değerine ($m=544.8$ ng/L) yakın dağılım göstermektedir.



Şekil 4-10: Plazma PAK1 Dağılım Grafiği

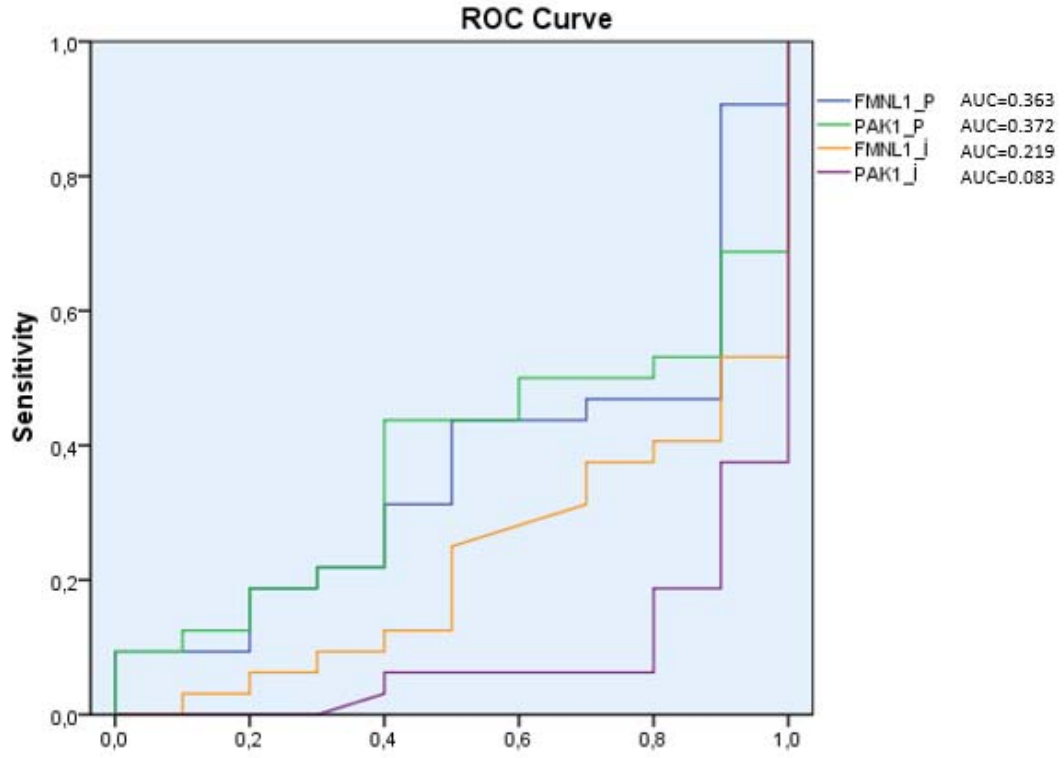
Şekil 4-10’da görüldüğü gibi plazma PAK1 protein düzeyleri prostat kanserli hastalarda ortalanca değerinin ($m=631.8$ ng/L) altında bir dağılım göstermekte olup sağlıklı kontrol grubunda ortalanca değerinin ($m=658.5$ ng/L) üzerinde dağılım göstermektedir.



Şekil 4-11: İdrar PAK1 Dağılım Grafiği

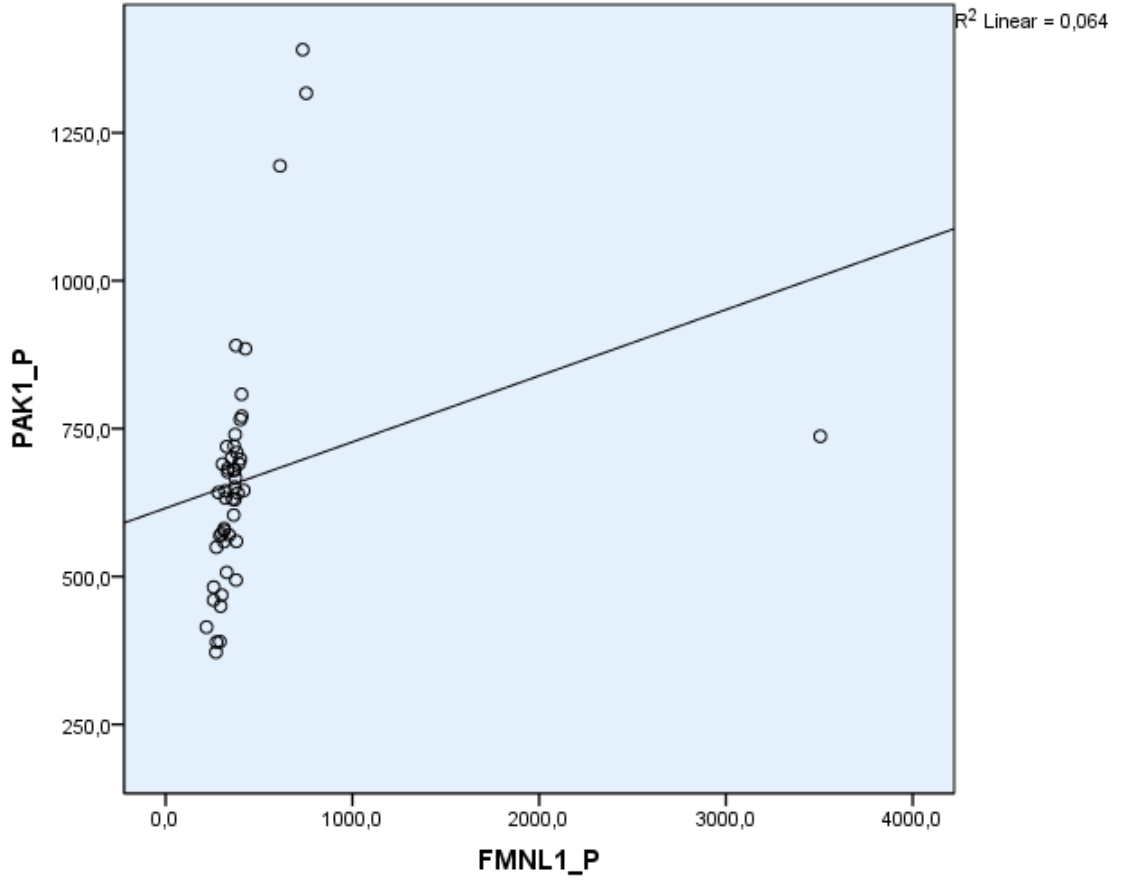
Şekil 4-11’de görüldüğü gibi idrar PAK1 protein düzeyleri prostat kanserli hastalarda ortalanca değerinin ($m=669.5$ ng/mL) biraz altında bir dağılım göstermekte olup sağlıklı kontrol grubunda ortalanca değerine ($m=893.5$ ng/mL) yakın dağılım göstermektedir.

Testlere ait ROC analizi gerçekleştirildi ve ROC eğrilerine göre AUC hesaplandı. Yapılan değerlendirme sonucunda testlerin tanısal değerinin düşük olduğu belirlendi (şekil 4-12).



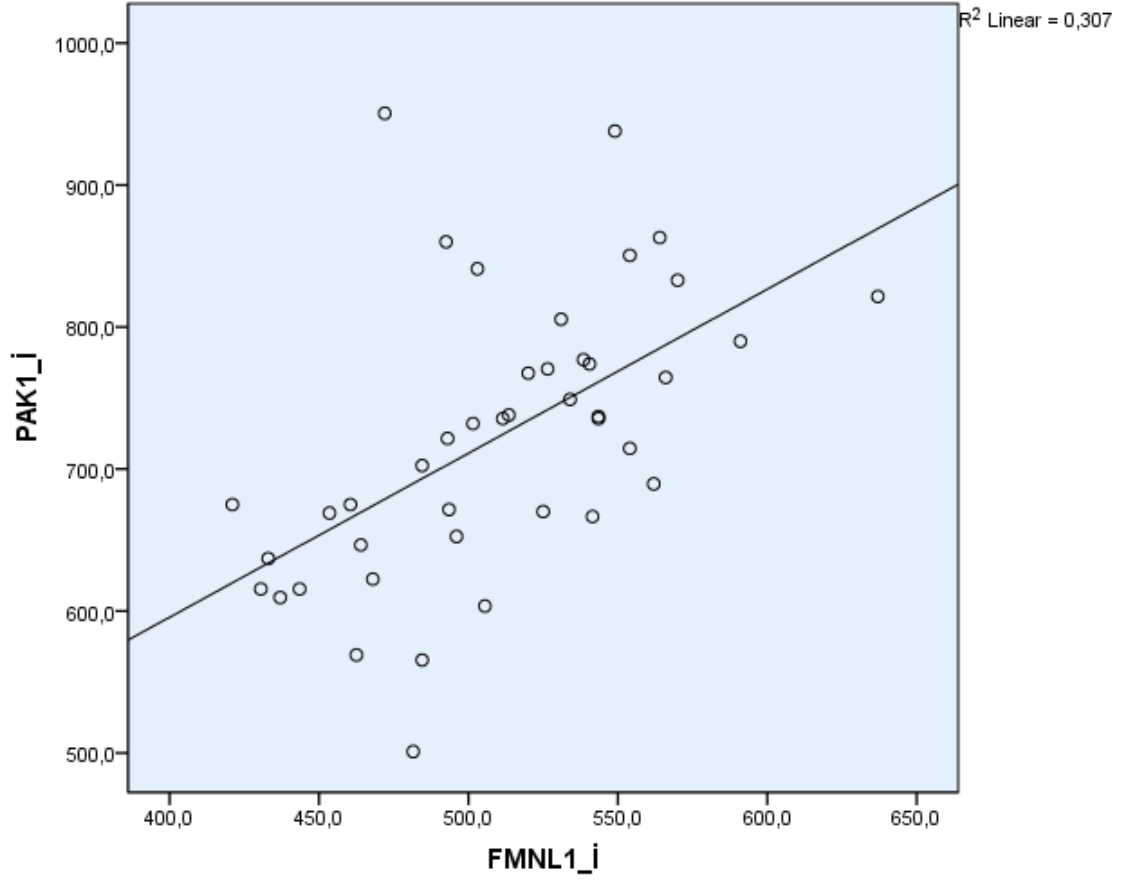
şekil 4-12: Protein testlerinin ROC analizi

Testler arası korelasyon Spearman testi ile saptandı. Plazma protein FMNL1 seviyeleri ile idrar protein PAK1 seviyeleri arasında korelasyon mevcut bulundu ($p=0.000$, $r=0.779$) (Şekil 4-13).



Şekil 4-13: Plazma protein seviyeleri korelasyon grafiği

İdrar FMNL1 protein seviyeleri ile idrar PAK1 protein seviyeleri arasında korelasyon mevcut bulundu ($p=0.000$, $r=0.627$) (Şekil 4-14).



Şekil 4-14: İdrar protein seviyeleri korelasyon grafiği

5. TARTIŞMA

Prostat kanseri; görülme sıklığı, metastaz gelişimi ve bunlara bağlı olarak hayat kalitesini düşürmesi nedeniyle araştırmalara fazlasıyla konu olmuş bir kanser tipidir. Hastalığın tanısının konulması, tedavi etkinliğinin takibi, metastaz riskinin değerlendirilmesi için rutinde kullanılan yöntemlerin yeterli bilgi sağlamaması hem biyokimyasal hem moleküler belirteç arayışlarını gündemde tutmaktadır.

Kanser metastazı, EMT, invazyon, intravazasyon, ekstrasvazasyon ve metastatik koloni oluşumu basamaklarını içerir. Hücre bağlantılarını sağlayan proteinlerin ekspresyonunda azalma ve fonksiyon kaybı ile ECM yapısını bozan proteinlerin ekspresyonunun artması, hücre iskeletinin yapısını bozarak tümörün yayılımına yol açar. Hücre iskeletinin temel yapı elemanlarından olan aktin mikrofilamentleri, hücreye sağladığı mekanik destek ile hücrenin şeklini belirler ve hareketini sağlar. Aktin iskeletinin yapısal değişimi sonucunda hücre uzantılarının oluşumu ile hücre hareketinde artış, hücre-matriks bağlantılarında (adezyon plakaları) ve hücre-hücre bağlantı komplekslerinde azalma görülmesiyle hücrenin invaziv kapasite kazanması kolaylaşır.

Hücre bölünmesi, membran trafiği, göç, morfogenez ve filopodyum oluşumu gibi aktin bazlı süreçler son yıllarda tümör invazyonu ve metastazıyla daha fazla ilişkilendirilmektedir. Aktin dinamiklerinin düzenleyicileri olarak bilinen forminler aktin polimerizasyonunu stimüle ederek hücre hareketini arttırmakta ve tümör invazyonu ile metastazında rol oynamaktadır. Aktinle birlikte sitoplazmada yerleşim gösteren FMNL1'in; nükleasyon, uzama, polimerizasyon, depolimerizasyon ve paketlenme gibi aktin ile ilişkili temel süreçlerde rol oynadığı düşünülmektedir ancak, işlevi tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır. FMNL1'in miyeloid lösemi, lenfoid lösemi, non-Hodgkin lenfoma gibi hematopoietik kökenli birçok kanser tipinde ekspresyonunun yükseldiği tespit edilmiştir fakat solid tümörlerde ekspresyonu, üzerinde yeni çalışılmaya başlanmış bir konudur. Günümüze kadar yayınlanan araştırmalarda kanda ve diğer vücut sıvılarında yapılmış bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamız bu molekülün prostat kanserindeki etkinliğine dair yapılmış ilk çalışma olmakla beraber plazma ve idrardaki ekspresyonunun araştırıldığı tek çalışmadır.

FMNL1 ilk defa Favaro ve arkadaşları tarafından 2003 yılında lenfoid tümörlerde izole edilmiştir (3). Aynı ekibin daha sonra yaptıkları çalışmalarda T hücreli non-Hodgkin lenfomalarda da hem Western blot, hem de immünohistokimya

yöntemleriyle yüksek ekspresyonunu tespit edilmiş olup lösemi hücrelerinin de proliferasyon ve göçünde etkili olduğu belirtilmiştir (4, 93).

2008 yılında Kilpinen ve ekibinin çalışmasında 18 farklı doku tipinin hem sağlıklı hem tümörlü örneklerinde FMNL1 mRNA ekspresyon profili çıkarılmış olup, prostatın hem sağlıklı hem tümörlü dokularında az da olsa ekspresyonu gözlenmiştir (94).

2011 yılında Jurkat, HeLa ve pankreas kanseri hücre hatlarında da ekspresyonları bulunarak FMNL1'in epitelyal kanserlerde varlığının ilk defa gösterildiği çalışmada FMNL1'in hem Golgi mimarisini düzenlediği, hem de F-aktin'in dikenli uçlarını bağlayarak aktin hücre iskeletinin düzenlenmesinden sorumlu olduğu bulunmuştur. Bu bulgular metastaz potansiyeli yüksek solid tümörlerde yüksek FMNL1 ekspresyonu olduğu düşüncesine yönlendirmektedir (95).

Hematolojik kanserler dışındaki kanser tiplerinde FMNL1 protein ekspresyonunu raporlayan ilk çalışma olarak 2014'te yapılan ve 28 farklı kanser dokusunun incelendiği çalışma göze çarpmaktadır. PCa da dahil olmak üzere birçok dokunun immünohistokimya yöntemiyle incelenmesinde epitel hücrelerde ekspresyona rastlanmamış, düz kas hücrelerinde yüksek ekspresyon görülmüştür (5). Doku dışına dökülen hücreler genellikle epitel doku kaynaklı olduğu için hasta grubumuzda plazma ve idrarda düşük seviyelerle karşılaşmış olmamız bu çalışmanın bulgularıyla uyumlu olup aynı çalışmada neoplastik olmayan dokularda da FMNL1 ekspresyonuna rastlanmış olması bizim sağlıklı grubumuzda bulduğumuz yüksek seviyelerle tutarlılık göstermektedir.

Yi Yang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 117 küçük hücre dışı akciğer kanseri (KHDAK) dokusu, 37 KHDAK kemik metastaz dokusu ve 70 normal akciğer dokusunda FMNL1 mRNA ekspresyonuna ve protein seviyelerine bakılmış olup, kanserli dokuda normal dokudan daha yüksek, metastaz dokusunda da primer kanser dokusundan daha yüksek seviyeler tespit edilmiştir. Yüksek FMNL1 seviyeleri hastalığın kötü prognozuyla ilişkilendirilmiştir. Ayrıca hem hasta dokularında hem hayvan modellerinde FMNL1'in susturulmasının EMT ilişkili genleri ve TGF- β 1 sinyal yolağını baskılayarak hücre göçünü inhibe ettiğini ve kemik metastazını yavaşlattığını göstermiş ve FMNL1'in KHDAK'de kemik metastazlarını düzenlemede önemli rol oynadığını belirtmişlerdir (96). PCa da çoğunlukla kemik metastazı görülen bir tümör tipi olduğu için bu çalışmayla yakın sonuçlar görülebileceğini düşünmüş olsak da bizim çalışmamızda metastatik hasta sayısı çok az olduğu için bu bağlamda istatistiksel olarak değerlendirebilecek bir sonuç elde edilememiştir.

Nazofarenks kanserine dair yapılan çalışmalarda kanserli dokularda sağlam dokulara göre FMNL1 ekspresyonunun arttığı, yüksek FMNL1 ekspresyonunun da TNM evresiyle, düşük sağkalım oranı ve kötü prognozla da korele olduğu belirtilmiştir. Susturulması durumunda proliferasyon, göç ve invazyonun baskılandığı belirtilmiştir. FMNL1 gen amplifikasyonu veya ilişkili miR (miR16 ve miR143) baskılanmasından kaynaklanan yüksek FMNL1 ekspresyonu nazofarenks kanserinin agresif fenotipinde rol oynamaktadır. FMNL1 aktivasyonu HDAC1'in Profilin2'ye bağlanmasıyla MTA1'in aktivasyonunu sağlayarak hücrenin malign özelliğini kazanmasını ve EMT'yi teşvik etmektedir (72, 97).

Higa ve arkadaşlarının çalışmasında glioblastomalı 217 vakanın doku örneklerinde immünohistokimya yöntemiyle FMNL1 ekspresyonu incelenmiş olup çalışma sonucunda yüksek FMNL1 seviyelerinin kötü prognoz ve düşük sağkalım göstergesi olduğu, FMNL1 susturulmasının aktin polimerizasyonunu baskılayarak glioblastomada hücre göçü ve invazyonunu bloke ettiği açıklanmıştır. FMNL1'in lamellipod, fokal adezyon, invadopod, metastaz ve migrasyonla ilişkili gen setleri ile anlamlı ilişkisi, bu genin tümörün agresif fenotipini etkilediği fikrini daha da güçlendirmektedir (98).

306 berrak hücreli renal hücreli karsinom dokusunda yapılan immünohistokimya ve mRNA ekspresyon çalışmasının sonucunda FMNL1'in berrak hücreli renal hücreli karsinomda yüksek eksprese olduğu ve CXCR2 indüksiyonu aracılığıyla prometastatik aktiviteyi arttırdığı gözlemlenmiştir. Yüksek FMNL1 ekspresyonunun hücre göçünü ve istilasını arttırarak yüksek tümör derecesi, tümör metastazı ve kötü prognoz ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (74).

Çalışmamızda prostat kanserli hastalar ve kontrollerin FMNL1 mRNA ekspresyon seviyeleri arasında hem plazma hem idrar örneklerinde istatistiksel bir farklılık bulunamamıştır. Protein seviyelerinde de aynı şekilde istatistiksel bir anlamlılık bulunamamıştır ($p>0.05$). Hastaların PSA ve diğer klinik özellikleriyle plazma ve idrar FMNL1 seviyeleri arasında herhangi bir ilişki bulunamamıştır.

Serin/treonin kinaz olan PAK ailesi üyelerinin çeşitli kanser tiplerinde yüksek ekspresyonu ve aktivasyonunun olduğu bilinmektedir. PAK izoformları arasında, grup I PAKlar (özellikle PAK1 ve PAK2) kanserlerde en iyi karakterize edilmiş ve en çok deregüle olanlardır (9, 99, 100).

Kanserde aşırı PAK1 ekspresyonunun hem gen amplifikasyonu, hem de miRNA etkileşiminin sonucu olduğu düşünülmektedir. Mesane, over ve meme kanserlerinde

PAK1'in bulunduğu 11q13 bölgesinde 11q13.5-q14 amplifikasyonları tespit edilmiştir (101-103). Reddy ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada ise endojen miRNA-7 seviyelerinin çeşitli kanser hücre hatlarında PAK1 ekspresyonu ile ters orantılı olduğu ve miRNA-7 transfeksiyonunun meme kanseri hücrelerinde PAK1 ekspresyonunu azalttığı tespit edilmiştir (104). Araştırmalar, PAK1'in potansiyel bir tümör onkogeni davranışı sergileyebileceğini ve kanser tedavisi için terapötik bir hedef olabileceğini öne sürmektedir.

PAK1 ile ilgili çoğunlukla gastrointestinal sistem tümörleri olmak üzere, over, baş-boyun, pankreas ve prostat kanserlerinde çalışmalar yapılmıştır.

Gastroözofageal tümör dokularında PAK1 protein ve mRNA seviyelerinin normal epitel, atipik hiperplazi ve adenokarsinomaya doğru progresyon yolunda aşama aşama artışı görülmüş ve PAK1 aşırı ekspresyonu lenf nodu metastazı, ileri tümör evresi, büyük tümör boyutu, pozitif cerrahi sınır ve kötü sağkalımla ilişkili bulunmuştur (105).

Kolorektal kanserde yapılan çalışmalarda PAK1 ekspresyonu ve aktivitesinin tümörün agresif davranışıyla ilişkili olduğu belirtilmiştir. PAK1 aktiflenmesi fokal adezyon kompleksleri oluşumunu engelleyerek hücre motilitesi ve invazyonunu artırırken susturulması da hücre göçünü ve invazyonunu azaltmaktadır (106, 107).

Gastrik kanserle ilişkisinin incelendiği çalışmalarda ise PAK1'in aşırı ekspresyonunun progresyon, metastaz ve prognozla ilişkili olduğu, susturulması durumunda ise gastrik kanser hücrelerinin büyümesinin inhibe edildiği gözlemlenmiştir (108).

Over kanserli hastalardan alınan peritoneal ve plevral efüzyonlarda yüksek gradlı tümörlerde daha fazla olmak üzere PAK1 boyanması görülmüş olup kemoterapi öncesi hastalarda yüksek PAK1 seviyeleri daha uzun sağkalımla ilişkili, yüksek boyanma derecesi de daha iyi progresyonsuz sağkalımla korele bulunmuştur. Kemoterapi sonrasında ise tam tersi şekilde yüksek PAK1 boyanma derecesi kötü sağkalımla korele bulunmuştur. Hasta takiplerinin sonunda yüksek boyanma derecesinin primer tümörde uzun progresyonsuz sağkalımı, nüks hastalıkta daha düşük sağkalımı gösterdiği bulunmuştur. Bu çalışma PAK1'in primer ile nüks hastalıkta ters prognostik rolleri olduğunu ve hücresel fonksiyonunun kemoterapi ile değişebileceğini göstermektedir (109).

Park J ve ekibinin baş-boyun karsinomu hücrelerinde yaptığı çalışmada PAK1'in tümör hücresi göçü ve invazyonunda rol oynadığı, aşırı ekspresyonunun tümör hücresinin agresif davranışı ve düşük sağkalım ile korele olduğu belirtilmiştir (110).

Han ve ekibi tarafından primer ve metastatik pankreas kanserli dokularda yapılan ekspresyon çalışmasında ise metastatik dokularda primer dokulara göre daha düşük PAK1 seviyeleri tespit edilmiştir. Primer tümör dokularındaki PAK1 seviyelerinin de literatürdeki diğer çalışmaların tersine iyi diferansiyasyon derecesi ve daha uzun sağkalım ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Çalışmanın sonucunda PAK1'in pankreas kanseri metastazında etkisinin düşük olabileceği düşüncesi belirtilmiş olup, bu bulgular her dokuda aynı etkiye sahip olmadığını, hücresel fonksiyonlarında değişkenlik gösterebileceğini düşündürmektedir (111).

Prostat kanserinde grup II PAKlardan (PAK4, 5, 6) PAK4 ve PAK6'nın yüksek ekspresyonunun bilinmektedir (112, 113). Bu yüzden prostat dokusunda mevcut olmasına rağmen, grup I PAKlar (PAK1, 2, 3) prostat kanserinde çok fazla çalışılmamıştır.

PAK1'in PCa'daki rolüne dair yapılan ilk çalışmada doku ve hücre hatlarında PAK1 seviyeleri PAK6 ile karşılaştırılmıştır. 2013 yılında yayınlanan çalışmada PAK1'in invaziv/metastatik potansiyeli yüksek hücre hatlarında erken evre tümörlü hücre hatlarına göre çok daha yüksek ekspresyonu görülürken PAK6 ekspresyonu bütün hücre hatlarında yakın seviyelerde tespit edilmiştir. PAK1 protein seviyeleri normal ve benign hiperplazi dokularında en düşük değerlerde iken tümörlü ve metastatik dokularda çok daha yüksek değerlerde bulunmuştur (114).

73 PCa ve 40 BPH hastası ile yapılan çalışmada PAK1 seviyelerinin PSA değerleri ile korele olduğu bulunmuş olup PAK1 mRNA seviyeleri en yüksek metastatik hücre hatlarında, sonrasında erken evre PCa hücre hatlarında ve en az normal prostat epitelyal hücre hattında tespit edilmiştir. PAK1 gen ifadesinin susturulmasıyla proliferasyon, göç ve invazyonun yavaşladığı gösterilmiştir (115).

Çalışmamızda prostat kanserli hastalar ve kontrollerin PAK1 mRNA ekspresyon seviyeleri arasında plazma örneklerinde istatistiksel bir farklılık bulunmamıştır ($p>0.05$). Protein seviyelerinde de plazma örneklerinde anlamlı fark bulunamazken ($p>0.05$) idrar örneklerinde hastalarda kontrol grubuna göre düşük bulunmuştur ($p=0.00$). Hastaların PSA ve diğer klinik özellikleriyle plazma ve idrar FMNL1 seviyeleri arasında herhangi bir ilişki bulunamamıştır.

Tümör hücrelerinin dolaşımında tespit edilebilmesi için hücrelerin birbirinden ayrılıp ECM komponentlerine tutunması, ECM'yi degrade ederek damar dışına çıkmaları

gereklidir. Lokal evredeki kanserlerde tümör hücreleri henüz yayılma aşamasında olmadığı için dolaşımda veya diğer vücut sıvılarında tümöre dair hücresel elemanların tespiti zor olmaktadır. Tümör dokusunda yapılan çalışmalarda hastalık hangi evrede olursa olsun tümör hücreleri ve onların komponentleri gerek kalitatif gerek kantitatif olarak daha kolay tespit edilebilmektedir.

Literatürdeki bilgiler doğrultusunda FMNL1 ve PAK1'in PCalı hastalarda yüksek ekspresyon göstereceğini düşünürken, doku dışında ve çoğunluğu erken evre hastalarda çalıştığımızdan dolayı sonuçlarımızın bu yönde olduğunu düşünmekteyiz. Çalışmamız FMNL1 ve PAK1'in hem gen hem protein ürününün dolaşımda ve idrarda tespit edilerek karşılaştırıldığı ilk çalışmadır ve her iki marker molekülün de erken evre PCa'da düşük ekspresyon seviyeleri olduğunu göstermesi açısından önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

1. Dhawan M ve ark. DNA Repair Deficiency Is Common in Advanced Prostate Cancer: New Therapeutic Opportunities. *Oncologist* 2016; **21(8)**: 940-5.
2. Kovar DR. Molecular details of formin-mediated actin assembly. *Curr Opin Cell Biol* 2006; **18(1)**: 11-7.
3. Favaro PM ve ark. Human leukocyte formin: a novel protein expressed in lymphoid malignancies and associated with Akt. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; **311(2)**: 365-71.
4. Favaro PM ve ark. High expression of FMNL1 protein in T non-Hodgkin's lymphomas. *Leuk Res* 2006; **30(6)**: 735-8.
5. Gardberg M ve ark. Characterization of Leukocyte Formin FMNL1 Expression in Human Tissues. *J Histochem Cytochem* 2014; **62(6)**: 460-470.
6. Rane CK ve Minden A. P21 activated kinases: structure, regulation, and functions. *Small GTPases* 2014; **5**: e28003.
7. Kichina JV ve ark. PAK1 as a therapeutic target. *Expert Opin Ther Targets* 2010; **14(7)**: 703-25.
8. Eswaran J ve ark. Crystal Structures of the p21-activated kinases PAK4, PAK5, and PAK6 reveal catalytic domain plasticity of active group II PAKs. *Structure* 2007; **15(2)**: 201-13.
9. Kumar R ve ark. p21-activated kinases in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; **6**: 459-71.
10. Somanath PR ve Byzova TV. 14-3-3beta-Rac1-p21 activated kinase signaling regulates Akt1-mediated cytoskeletal organization, lamellipodia formation and fibronectin matrix assembly. *J Cell Physiol* 2009; **218(2)**: 394-404.
11. Somanath PR ve ark. The role of PAK-1 in activation of MAP kinase cascade and oncogenic transformation by Akt. *Oncogene* 2009; **28(25)**: 2365-9.
12. Dummler B ve ark. Pak protein kinases and their role in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2009; **28**: 51-63.
13. Goc A ve ark. P21 activated kinase-1 (Pak1) promotes prostate tumor growth and microinvasion via inhibition of transforming growth factor β expression and enhanced matrix metalloproteinase 9 secretion. *J Biol Chem* 2013; **288**: 3025-35.

14. Ferlay J ve ark. *Global Cancer Observatory: Cancer Today*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer [web page on the Internet], Erişim 16.01.2021, <https://gco.iarc.fr/today>
15. Perdana NR ve ark. The Risk Factors of Prostate Cancer and Its Prevention: A Literature Review. *Acta Med Indones* 2016; **48(3)**: 228-238.
16. Bethesda, MD. *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2013*. Available from: Accessed [web page on the Internet], Erişim 04.02.2021, National Cancer Institute, 2016. https://seer.cancer.gov/csr/1975_2015/
17. Rawla P. Epidemiology of Prostate Cancer. *World J Oncol* 2019; **10(2)**: 63-89.
18. European Commission. Epidemiology of prostate cancer in Europe [web page on the Internet], Erişim 04.02.2021, <https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/epidemiology-prostatecancer-europe>.
19. Bratt O. Hereditary prostate cancer: clinical aspects. *J Urol* 2002; **168(3)**: 906-13
20. American Cancer Society: Facts & Figures 2015. Atlanta, G A: American Cancer Society, 2015.
21. Bashir MN ve ark. Risk factors of prostate cancer: a case- control study in Faisalabad, Pakistan. *Asian Pac J cancer Prev* 2014; **15**: 10327-30.
22. Hankey BF ve ark. Cancer surveillance series: interpreting trends in prostate cancer-part I: evidence of the effects of screening in recent prostate cancer incidence, mortality, and survival rates. *J Natl Cancer Inst* 1999; **91**: 1017-24.
23. Leitzmann MF ve Rohrmann S. Risk factors for the onset of prostatic cancer: age, location, and behavioral correlates. *Clin Epidemiol* 2012; **4**: 1-11.
24. Lilja H. Biology of prostate-specific antigen. *Urology* 2003; **62**: 27-33.
25. Heidenreich A ve ark. European Association of Urology. EAU guidelines on prostate cancer. *Eur Urol* 2008; **53(1)**: 68-80.
26. Tefekli AH. Prostat Kanserinde Yeni Belirteçler ve Phi Skoru. *Turk Urol Sem* 2012; **3**: 61-9.
27. Humphrey PA ve ark. The 2016 WHO classification of tumours of the urinary system and male genital organs-part B: prostate and bladder tumours. *European urology* 2016; **70(1)**: 106-119.
28. D'Amico AV ve ark. Calculated prostate carcinoma volume. *Cancer* 1998; **82(2)**: 334-41.

29. Başaran M ve ark. Prostat Kanseri Yol Haritası: Uluslararası Kılavuzlar ve Klinik Deneyimler Işığında Prostat Kanserine Yaklaşım Önerileri
30. Kokontis JM ve Liao S. Molecular action of androgen in the normal and neoplastic prostate. *Vitam Horm* 1999; **55**: 219-307.
31. Feldman BJ ve Feldman D. The development of androgen- independent prostate cancer. *Nat Rev Cancer* 2001; **1(1)**: 34-45.
32. Hacıbekiroğlu İ ve ark. İleri evre prostat kanserinde hormon tedavisi Hormonal therapy in advenced stage prostate cancer. *Türk Onkoloji Dergisi* 2015; **30(1)**: 25-33.
33. Dai C ve ark. Androgen Signaling in Prostate Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2017; **7(9)**: a030452.
34. Barratt AL ve Coates AS. Screening decreases prostate cancer death: first analysis of the 1988 Quebec Prospective Randomized Controlled Trial. *Med J Aust* 2004; **181(4)**: 213-4.
35. Quinn DI ve ark. Prognostic significance of p53 nuclear accumulation in localized prostate cancer treated with radical prostatectomy. *Cancer Res* 2000; **60(6)**: 1585-94.
36. Borre M ve ark. Association between immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF-expressing neuroendocrine-differentiated tumor cells, and outcome in prostate cancer patients subjected to watchful waiting. *Clin Cancer Res* 2000; **6(5)**: 1882-90.
37. Fudge K ve ark. Immunohistochemistry analysis of platelet-derived growth factor A and B chains and platelet-derived growth factor alpha and beta receptor expression in benign prostatic hyperplasias and Gleason-graded human prostate adenocarcinomas. *Mod Pathol* 1994; **7(5)**: 549-54.
38. Dolloff NG ve ark. Bone-metastatic potential of human prostate cancer cells correlates with Akt/PKB activation by alpha platelet-derived growth factor receptor. *Oncogene* 2005; **24(45)**: 6848-54.
39. Zeng ZZ ve ark. Role of focal adhesion kinase and phosphatidylinositol 3'-kinase in integrin fibronectin receptor-mediated, matrix metalloproteinase-1-dependent invasion by metastatic prostate cancer cells. *Cancer Res* 2006; **66(16)**: 8091-9.

40. Choong PF ve Nadesapillai AP. Urokinase plasminogen activator system: a multifunctional role in tumor progression and metastasis. *Clin Orthop Relat Res* 2003; **415**: 46-58.
41. Gonzalez-Gronow M ve ark. Angiostatin directly inhibits human prostate tumor cell invasion by blocking plasminogen binding to its cellular receptor, CD26. *Exp Cell Res* 2005; **303(1)**: 22-31.
42. Clements JA ve ark. The tissue kallikrein family of serine proteases: functional roles in human disease and potential as clinical biomarkers. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2004; **41(3)**: 265-312.
43. Trudel D ve ark. Matrix metalloproteinase 9 is associated with Gleason score in prostate cancer but not with prognosis. *Human Pathol* 2010; **41**: 1694-701.
44. Pego ER ve ark. Molecular basis of the effect of MMP-9 on the prostate bone metastasis: A review. *Urol Oncol* 2018; **36(6)**: 272-282.
45. dos Reis ST ve ark. Matrix metalloproteinase-2 polymorphism is associated with prognosis in prostate cancer. *Urol Oncol* 2010; **28**: 624-7.
46. Williams TM ve Lisanti MP. Caveolin-1 in oncogenic transformation, cancer, and metastasis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005; **288(3)**: 494-506.
47. Yang G ve ark. Combined c-Myc and caveolin-1 expression in human prostate carcinoma predicts prostate carcinoma progression. *Cancer* 2005; **103(6)**: 1186-94.
48. Varkaris A ve ark. The role of HGF/c-Met signaling in prostate cancer progression and c-Met inhibitors in clinical trials. *Expert Opin Investig Drugs* 2011; **20(12)**: 1677-84.
49. Hideshima T ve ark. Cytokines and signal transduction. *Best Pract Res Clin Haematol* 2005; **18(4)**: 509-24.
50. Liao Y ve ark. Up-regulation of insulin-like growth factor axis components in human primary prostate cancer correlates with tumor grade. *Hum Pathol* 2005; **36**: 1186-96.
51. Wang Z ve ark. Disruption of growth hormone signaling retards early stages of prostate carcinogenesis in the C3(1)/T antigen mouse. *Endocrinology* 2005; **146**: 5188-96.
52. da Silva HB ve ark. Dissecting Major Signaling Pathways throughout the Development of Prostate Cancer. *Prostate Cancer* 2013; **2013**: 920612.

53. Sharma M ve ark. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt stimulates androgen pathway through GSK3 β inhibition and nuclear β -catenin accumulation. *J Biol Chem* 2002; **277(34)**: 30935-41.
54. Chesire DR ve Isaacs WB. β -catenin signaling in prostate cancer: an early perspective. *Endocr Relat Cancer* 2003; **10(4)**: 537-60.
55. M. Paz De Miguel ve ark. Immunoexpression of tumour necrosis factor- α and its receptors 1 and 2 correlates with proliferation/apoptosis equilibrium in normal, hyperplastic and carcinomatous human prostate. *Cytokine* 2000; **12(5)**: 535-538.
56. G. Rodriguez-Berriguete ve ark. Expression of NF- κ B-related proteins and their modulation during TNF- α -provoked apoptosis in prostate cancer cells. *Prostate* 2012; **72**: 40-50.
57. J Suh ve ark. Mechanisms of constitutive NF- κ B activation in human prostate cancer cells. *Prostate* 2002; **52(3)**: 183-200.
58. L Zhang ve ark. NF- κ B regulates androgen receptor expression and prostate cancer growth. *American Journal of Pathology* 2009; **175(2)**: 489-499.
59. TM Morgan ve ark. Targeted therapy for advanced prostate cancer: inhibition of the PI3K/Akt/mTOR pathway. *Current CancerDrug Targets* 2009; **9(2)**: 237-249.
60. L Poliseno ve ark. Identification of the miR-106b~25 microRNA cluster as a proto-oncogenic PTEN-targeting intron that cooperates with its host gene MCM7 in transformation. *Science Signaling* 2010; **3(117)**: ra29.
61. B Gao ve ark. Constitutive activation of JAK/STAT3 signaling by BRCA1 in human prostate cancer cells. *FEBS Letters* 2001; **488(3)**: 179-184.
62. Dorkin TJ ve ark. FGF8 over-expression in prostate cancer is associated with decreased patient survival and persists in androgen independent disease. *Oncogene* 1999; **18(17)**: 2755-2761.
63. Steiner H ve ark. Accelerated in vivo growth of prostate tumors that up-regulate interleukin-6 is associated with reduced retinoblastoma protein expression and activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. *American Journal of Pathology* 2003; **162(2)**: 655-663.
64. Bakin RE ve ark. Attenuation of Ras signaling restores androgen sensitivity to hormone refractory C4-2 prostate cancer cells. *Cancer Research* 2003; **63(8)**: 1975-1980.

65. Lodish H ve ark. The Dynamics of Actin Assembly İçinde *Molecular Cell Biology 4th Edition*. New York: W. H. Freeman; 2000.
66. Higgs HN. Formin proteins: a domain-based approach. *Trends Biochem Sci* 2005; **30(6)**: 342-53.
67. Gardberg M. Formin proteins in normal tissues and cancer. University of Turku 2015.
68. Esue O ve ark. The filamentous actin cross-linking/bundling activity of mammalian formins. *J. Mol. Biol* 2008; **384(2)**: 324-334.
69. Harris E ve ark. Mechanistic differences in actin bundling activity of two mammalian formins, FRL1 and mDia2. *J. Biol. Chem* 2006; **281**: 14383-14392.
70. Miller MR ve Blystone SD. Human Macrophages Utilize the Podosome Formin FMNL1 for Adhesion and Migration. *Cellbio (Irvine, Calif)* 2015; **4(1)**: 1-11.
71. Yayoshi-Yamamoto S ve ark. FRL, a novel formin-related protein, binds to Rac and regulates cell motility and survival of macrophages. *Mol. Cell. Biol* 2000; **20(18)**: 6872-81.
72. Chen WH ve ark. FMNL1 mediates nasopharyngeal carcinoma cell aggressiveness by epigenetically upregulating MTA1. *Oncogene* 2018; **37(48)**: 6243-6258.
73. Yang XY ve ark. FMNL1 down-regulation suppresses bone metastasis through reducing TGF- β 1 expression in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Biomed Pharmacother* 2019; **117**: 109126.
74. Zhang MF ve ark. FMNL1 Exhibits Pro-Metastatic Activity via CXCR2 in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Front Oncol* 2020; **10**: 564614.
75. Manser E ve ark. A brain serine/threonine protein kinase activated by Cdc42 and Rac1. *Nature* 1994; **367**: 40-6.
76. Zhang S ve ark. Rho family gtpases regulate p38 mitogen-activated protein kinase through the downstream mediator pak1. *J Biol Chem* 1995; **270**: 23934-6.
77. Sells MA ve ark. Human p21-activated kinase (pak1) regulates actin organization in mammalian cells. *Curr Biol* 1997; **7**: 202-10.
78. Liu KH ve ark. P21-activated kinase 1 promotes colorectal cancer survival by up-regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha. *Cancer Lett* 2013; **340**: 22-9.
79. Alavi A ve ark. Role of raf in vascular protection from distinct apoptotic stimuli. *Science* 2003; **301**: 94-6.

80. Yao D ve ark. P21-Activated Kinase 1: Emerging biological functions and potential therapeutic targets in Cancer. *Theranostics* 2020; **10(21)**: 9741-9766.
81. Zhu Y ve ark. P21-activated kinase 1 determines stem-like phenotype and sunitinib resistance via nf-kappab/il-6 activation in renal cell carcinoma. *Cell Death Dis* 2015; **6**: e1637.
82. He H ve ark. P-21 activated kinase 1 knockdown inhibits beta-catenin signalling and blocks colorectal cancer growth. *Cancer Lett* 2012; **317**: 65-71.
83. Wei S ve ark. The guanine nucleotide exchange factor net1 facilitates the specification of dorsal cell fates in zebrafish embryos by promoting maternal beta-catenin activation. *Cell Res* 2017; **27**: 202-25.
84. Manning BD ve Toker A. Akt/pkb signaling: Navigating the network. *Cell* 2017; **169**: 381-405.
85. Fruman DA ve ark. The pi3k pathway in human disease. *Cell* 2017; **170**: 605-35.
86. Higuchi M ve ark. Scaffolding function of pak in the pdk1-akt pathway. *Nat Cell Biol* 2008; **10**: 1356-64.
87. El-Baba C ve ark. Thymoquinone-induced conformational changes of pak1 interrupt prosurvival mek-erk signaling in colorectal cancer. *Mol Cancer* 2014; **13**: 201.
88. Jin S ve ark. p21-activated Kinase 1 (Pak1)-dependent phosphorylation of Raf-1 regulates its mitochondrial localization, phosphorylation of BAD, and Bcl-2 association. *J Biol Chem* 2005; **280(26)**: 24698-705.
89. Ye DZ ve ark. P21-activated kinase 1 (pak1) phosphorylates bad directly at serine 111 in vitro and indirectly through raf-1 at serine 112. *PLoS One* 2011; **6**: e27637.
90. Gan J ve ark. Growth hormone-releasing hormone receptor antagonists inhibit human gastric cancer through downregulation of pak1-stat3/nf-kappab signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016; **113**: 14745-50.
91. Kim E ve ark. Pak1 tyrosine phosphorylation is required to induce epithelial-mesenchymal transition and radioresistance in lung cancer cells. *Cancer Res* 2014; **74**: 5520-31.
92. Williams ED ve ark. Controversies around epithelial-mesenchymal plasticity in cancer metastasis. *Nat Rev Cancer* 2019; **19**: 716-32.

93. Favaro P ve ark. FMNL1 promotes proliferation and migration of leukemia cells. *J Leukoc Biol* 2013; **94(3)**: 503-12.
94. Kilpinen S ve ark. Systematic bioinformatic analysis of expression levels of 17,330 human genes across 9,783 samples from 175 types of healthy and pathological tissues. *Genome Biol* 2008; **9(9)**: R139.
95. Colón-Franco JM ve ark. Dynamic remodeling of the actin cytoskeleton by FMNL1 γ is required for structural maintenance of the Golgi complex. *J Cell Sci* 2011; **124**: 3118-26.
96. Yang XY ve ark. FMNL1 down-regulation suppresses bone metastasis through reducing TGF- β 1 expression in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Biomed Pharmacother* 2019; **117**: 109126.
97. Cui F ve ark. miR-143 inhibits proliferation and metastasis of nasopharyngeal carcinoma cells via targeting FMNL1 based on clinical and radiologic findings. *J Cell Biochem* 2019; **120(10)**: 16427-34.
98. Higa N ve ark. Formin-like 1 (FMNL1) Is Associated with Glioblastoma Multiforme Mesenchymal Subtype and Independently Predicts Poor Prognosis. *Int J Mol Sci* 2019; **20(24)**: 6355.
99. Kichina JV ve ark. PAK1 as a therapeutic target. *Expert Opin Ther Targets* 2010; **14**: 703–725.
100. Eswaran J ve ark. Crystal Structures of the p21-activated kinases PAK4, PAK5, and PAK6 reveal catalytic domain plasticity of active group II PAKs. *Structure* 2007; **15**: 201–213.
101. Bekri S ve ark. Detailed map of a region commonly amplified at 11q13→q14 in human breast carcinoma. *Cytogenet Cell Genet* 1997; **79(1–2)**: 125-31.
102. Brown LA ve ark. Amplification of 11q13 in ovarian carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2008; **47(6)**: 481-9.
103. Bostner J ve ark. Amplification of CCND1 and PAK1 as predictors of recurrence and tamoxifen resistance in postmenopausal breast cancer. *Oncogene* 2007; **26(49)**: 6997-7005.
104. Reddy SD ve ark. MicroRNA-7, a homeobox D10 target, inhibits p21-activated kinase 1 and regulates its functions. *Cancer Research* 2008; **68(20)**: 8195-200.

105. Li Z ve ark. Prognostic importance and therapeutic implications of PAK1, a drugable protein kinase, in gastroesophageal junction adenocarcinoma. *PLoS One*. 2013; **8(11)**: e80665.
106. Song B ve ark. P21-activated kinase 1 and 4 were associated with colorectal cancer metastasis and infiltration. *J Surg Res* 2015; **196(1)**: 130-5.
107. Li LH ve ark. P21-activated protein kinase 1 induces colorectal cancer metastasis involving ERK activation and phosphorylation of FAK at Ser-910. *Int J Oncol* 2010; **37(4)**: 951-62.
108. Liu F ve ark. Downregulation of p21-activated kinase-1 inhibits the growth of gastric cancer cells involving cyclin B1. *Int J Cancer* 2009; **125(11)**: 2511-9.
109. Davidson B ve ark. Different clinical roles for p21-activated kinase-1 in primary and recurrent ovarian carcinoma. *Hum Pathol* 2008; **39(11)**: 1630-6.
110. Park J ve ark. Association of p21-activated kinase-1 activity with aggressive tumor behavior and poor prognosis of head and neck cancer. *Head Neck* 2015; **37(7)**: 953-63.
111. Han J ve ark. Reduced expression of p21-activated protein kinase 1 correlates with poor histological differentiation in pancreatic cancer. *BMC Cancer* 2014; **14**: 650.
112. Schrantz N ve ark. Mechanism of p21-activated kinase 6-mediated inhibition of androgen receptor signaling. *J Biol Chem* 2004; **279**: 1922-1931.
113. Yang F ve ark. Androgen receptor specifically interacts with a novel p21-activated kinase, PAK6. *J Biol Chem* 2001; **276**: 15345-53.
114. Goc A ve ark. P21 activated kinase-1 (Pak1) promotes prostate tumor growth and microinvasion via inhibition of transforming growth factor β expression and enhanced matrix metalloproteinase 9 secretion. *J Biol Chem* 2013; **288(5)**: 3025-35.
115. Zhanyu W ve ark. Clinicopathological signature of p21-activated kinase 1 in prostate cancer and its regulation of proliferation and autophagy via the mTOR signaling pathway. *Oncotarget* 2017; **8(14)**: 22563-80.