

T.C.

**İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

MİR499'UN PROSTAT KANSERİNDEKİ ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Sina KASHANİ

1800001275

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Programı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Pınar OBAKAN YERLİKAYA

MAYIS 2021

T.C.
İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

MİR499’UN PROSTAT KANSERİNDEKİ ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEKLİSANS TEZİ

Sina KASHANİ

1800001275

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Programı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Pınar OBAKAN YERLİKAYA

Jüri Üyeleri: Prof. Dr. Elif Damla ARISAN (Gebze Teknik Üniv.)

Prof. Dr. Özge ÇELİK

MAYIS 2021

ÖNSÖZ

Bana her zaman gülümsemeyle destek olan değerli hocam Prof. Dr. Pınar Obakan Yerlikaya ve tüm hocalarım, Sayın Prof. Dr. Narçin Palavan Ünsal, Prof. Dr. Elif Damla Arısan, Prof. Dr. Ajda Çoker Gürkan'a yardımları ve vizyonları için müteşekkürüm. Her zaman yanımda olan ve laboratuvarında çalışırken becerilerimi ve bilgilerimi geliştirmeme yardımcı olabilecek bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan eski danışmanım Sayın Prof. Dr. Elif Damla Arısan'a teşekkür etmek istiyorum.

Daha sonra yüksek lisans çalışmalarım sırasında laboratuvarında deneyler yapmam için bana her zaman yardımcı olan araştırma görevlileri Dr. Özge Berrak Rencüzoğulları, Pelin Özfiliz Kılbaş ve Burcu Ayhan Şahin'e teşekkür ederim.

Laboratuvarında olduğum için her zaman şanslıydım çünkü deneyleri yaparken ve çalışırken birlikte vakit geçirmekten zevk aldığım arkadaşlarım ve sınıf arkadaşlarım vardı. Sevgili arkadaşlarım ve laboratuvar arkadaşlarım Amani Abdulmunem, Elif Kansız, Kadriye Koyuncu, Zeynep Elif Apaydın, Tamer Gümüş, Börteçine Sevgin, Mervenur Çoban, Osman Orçun Okumuş, Fedine Koray ve en önemlisi Gizat Rakhmatula ve ismini yazamadığım tüm arkadaşlarıma teşekkür ediyorum.

Çalışmalarım süresince beni bir kez bile yalnız bırakmayan ve bana her türlü şekilde yardımcı olan ve sahip olabileceğim en sevgili ebeveynlerime, annem Zoya Alvandi'ye ve babam Ali Kashani'ye ve sahip olabileceğim en iyi erkek kardeşime, her zaman benden uzak olsalar da her zaman arkamı kollayan Amirhossein Kashani'ye sevgi ve minnettarlığımı ifade etmek istiyorum.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
KISALTMALAR	iv
SEMBOL VE BİRİM LİSTESİ	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ	ix
ÖZET	x
ABSTRACT	2
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	1
2.1. KANSER.....	1
2.1.1. KANSERİN NEDENLERİ	3
2.1.2. PROSTAT KANSERİ.....	5
GRİ BÖLGEDE' KANSER RİSKİ SINIFLANDIRMASI- ŞÜPHELİ DRE VE PSA 2,5–10 NG / ML.....	11
2.2. MİKORNA'LARIN BİYOLOJİK MEKANİZMASI	13
2.3. PROSTAT KANSERİNDE MİRNA'LARIN ÖNEMİ.....	17
2.4. MİKORNA-499A-5P	25
3. MATERYAL VE YÖNTEM	28
3.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ	28

3.2.	HÜCRELERİN DONDURULMASI	28
3.3.	HÜCRELERİN ÇÖZÜLMESİ.....	29
3.4.	HÜCRE CANLILIĞIN MTT TESTİ İLE BELİRLENMESİ.....	29
3.5.	KOLONİ FORMASYON DENEYİ.....	29
3.6.	FLORESAN MİKROSKOBU	30
3.7.	TOTAL PROTEİN İZOLASYONU	30
3.8.	PROTEİN MİKTARININ BRADFORD ANALİZİ İLE BELİRLENMESİ.....	31
3.9.	SDS-PAGE JEL HAZIRLANMASI	31
3.10.	PROTEİN ÖRNEKLERİNİN HAZIRLANMASI.....	31
3.11.	PROTEİNLERİN MEMBRANA TRANSFERİ	32
3.12.	BLOKLAMA İŞLEMİ VE PRİMER-SEKONDER ANTİKORLA İŞARETLEME.....	33
3.13.	PROTEİN BANTLARIN GÖRÜNTÜLENMESİ	33
3.14.	MİKRORNA İN SİLİCO ANALİZLERİ	33
4.	SONUÇLAR	34
4.1.	CİSPLATİN VE PAKLİTAKSEL SİTOTOKSİK AJANLAR OLARAK PC3 DT VE P53 HÜCRELERDE APOPTOZA NEDEN OLMAKTADIR.....	34
4.2.	MİR-499'UN PROSTAT KANSERİNDE ÖNEMİNİN GÖSTERİLMESİ.....	37
5.	TARTIŞMA	43
6.	KAYNAKÇA.....	53

KISALTMALAR

PCa:	Prostat Kanser
miRNA:	mikro RNA
WHO:	Dünya sağlık örgütü
HPV:	İnsan papiloma Virüsü
KSHV:	Kaposi sarkoması ile ilişkili herpes virüs
PSA:	Prostat spesifik antijen
DRE:	Dijital rektal muayeneyi
DT:	Doğal tip BPH: İyi huylu prostat hiperplazisi
GS:	Gleason skoru
ISUP:	Uluslararası Ürolojik Patoloji Derneği
ADT:	Androjen yoksunluk terapisi
LHRH:	Luteinize edici hormon salgılayan hormon
AA:	Abirateron asetat
Pre-miRNA:	Birinciduyarlı 1 miRNA
DGCR8:	DiGeorge sendromu kritik bölge 8
RanGTP:	Protein Ran
XPO5:	Exportin-5
TARBP2:	Transaktivasyona RNA bağlayıcı protein 2
AGO:	Argonaute proteini
RISC:	Sitoplazmada RNA indüklü sessizlik kompleksi
ceRNA:	Rekabetçi endojen RNA
3'UTR:	3'çevrilmemiş bölgesi

RT-qPCR:	Ters transkripsiyon PCR
NGS:	Yeni nesil sekanslama
miR499a:	mikroRNA499a
FBS:	fetal sığır serum
PBS:	fosfat tamponlu tuz
MTT boyası:	3-(4,5Dimethlythiazol-2-yl)-2,5Diphenlytetrazolium Bromide
DiOC6 boyası:	3,3' diheksiloksakarbosiyanin iyodür
BSA:	Bovine Srume Albumin
SDS-PAGE:	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
TEMED:	Tetrametiletildiamin
4x laemmli:	Protein indirgeme tamponu
PVDF:	Poliviniliden diflorür
TBS:	Tris tamponlu tuz
TBS-T:	TBS-Tween

SEMBOL VE BİRİM LİSTESİ

%: Yüzde

°C: Santigrat derece

µg: Mikrogram

µl: Mikre

cm²: Santimeolitre

µM: Mikromolar

bç : Baz çifti

cm : Santimetrtre kare

g: Santrifüj kuvveti

gr: Gram

kDa: Kilodalton

L: Litre

M: Molar

mA: Miliamper

ml: Mililitre

mm: Milimetre

nm: Nanometre

pH: Hidrojen kuvveti

rpm: Dakikadaki dönüş sayısı

V: Volt

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. miRNA ve kanser ilişkisi. miRNAlar mRNA düzeyinde düzensizlikle kanserli hücrelerde karakterize edilebilir. Tasarım BioRender.com’da gerçekleştirildi.....	14
Şekil 2. miRNA ve mRNA etkileşiminin prostat kanseri hücrelerinde agresif hücre fenotipine olan etkileri	19
Şekil 3. miRBase veri tabanında hsa-miR-499a için verilen karakteristik özellikler	25
Şekil 4. Genomik miR-499a lokasyonu [30].....	26
Şekil 5. Cisplatine 24 saat boyunca maruz bırakılan PC3 ve p53+ prostat kanseri hücrelerinde bağıl hücre canlılığı MTT testi ile belirlenmiştir.....	34
Şekil 6. Paklitaksele 24 saat boyunca maruz bırakılan PC3 ve p53+ prostat kanseri hücrelerinde bağıl hücre canlılığı MTT testi ile belirlenmiştir.....	35
Şekil 7. Koloni oluşum deneyi, doza bağımlı cisplatin ve paklitakselin, PC3 WT ve PC3 p53 + hücrelerinin koloni oluşturma potansiyelini azalttığını gösterdi	36
Şekil 8. p53'ün aşırı ekspresyonu, cisplatin ve paklitaksel ile tedaviyi takiben bir apoptoz markörü olarak Kaspaz-3 ve Kaspaz-9'un ekspresyon seviyelerini modüle etti.	36
Şekil 9. Xena Browser TCGA Prostate Cancer veri tabanına göre miR499 ifadesi prognozda önemlidir	37
Şekil 10. Gleason skora göre miR499a ifadesinin dağılım grafiği Pearson korelasyon faktörüne göre Xena Browser veritabanında incelenmiştir	38
Şekil 11. miR499a ifade edildiği dokular ve biyolojik özellikleri	38
Şekil 12. IMOGA atlas uygulamasına göre dokularda miR-499-5p bulunurluğu ve etkileşimde olduğu gen hedefleri	39
Şekil 13. IMOGA atlas uygulamasına göre dokularda miR-499-3p bulunurluğu ve etkileşimde olduğu gen hedefleri	40

Şekil 14. Log 2 tabanında farklı ifadesi görülen genlerin (artan kırmızı, azalan mavi) PC3 mir499 transfekte edilen hücrelerle PC3 metastatik (PC3 M) miR499 arasında ortalama ifade düzeylerinden herbir gen hedefi için karşılaştırılma yapılmıştır 41

Şekil 15. Log 2 ve log 10 anlamlılık düzeyinde farklı ifadesi görülen genlerin (artan kırmızı, azalan mavi) PC3 dt ve miR499 arasında ortalama ifade düzeylerinden herbir gen için karşılaştırılmıştır..... 41

Şekil 16. miR499 etkisi ile değişen mRNA ifadelerinin PC3 dt ve PC3 metastatik hücrelerdeki etkisinin diğer hedeflere göre değişime uğrayan hedeflerin gösterimi. 42

Şekil 17. STRING veri tabanında miR499 transfeksiyonu sonrasında PC3 dt ve PC3M hücreleri arasında değişim gösteren protein hedefleri ve etkileşim öngörülleri 45



TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Önerilen prostat kanseri biyobelirteçlerine genel bakış. Prostat kanseri biyobelirteçlerinin klinik değeri literatürde değişiklik gösterir. ABD FDA bugüne kadar sadece Prostat Sağlık Endeksini ve prostat kanseri antijen-3'ü klinik kullanım için onayladı [16]..... 9

Tablo 2 miRNA ve prostat kanseri hedeflerine yönelik literatür (Song ve ark.) 20

Ek tablo 1. Reactom veri tabanına göre PC3 ve PC3M hücreleri arasında hsa-miR-499 transfeksiyonu sonrasında değişen gen ifadelerinin etkili oldukları sinyal yollarının gösterimi..... 64

Ek tablo 2. Uzun kodlamaya yapmayan ve miR499 transfeksiyonu sonrasında PC3 ve PC3M hücreleri arasında değişen hedefler 128

ÖZET

Günümüzde insanların mücadele ettiği en büyük zorluklardan biri kanserdir. Prostat kanseri, dünya çapında erkeklerde kansere bağlı ölüm nedenleri arasında en yüksek sırada yer alan erkeklerdeki kanserler arasındadır. Kanser araştırmalarında önemli hedeflerden biri miRNA'lardır. Bu tezin ana konusu, özellikle prostat kanseri tedavisinde kanser tedavisinde olası hedefe özgü tedavi için mikroRNA'ları gelecekteki hedef moleküller olarak araştırmaktır. Tez kapsamında, kötü ilerlemeye sahip agresif prostat kanseri hücreleri arasında miRNA'ların ekspresyon seviyelerindeki farklılıklar ve hedefe özgü bir terapi olarak seçilen miRNA'ların nasıl seçildiği tartışılmıştır. Ayrıca prostat kanseri etiyolojisindeki genetik farklılıkların değerlendirilmesi hem *in vitro* hem de *in silico* yöntemlerle araştırılması hedeflenmiştir. Kanser genom atlas programı (TCGA) ve mirBase gibi miRNA ile ilgili veritabanları kullanılarak detaylı aramalar sonucunda hsa-miR-499a ve hsa-miR-499b, miRBASE veri tabanından toplanan verilere dayanarak 136 farklı literatürde atfedilen bir mikroRNA ailesi olarak bu tezin konusunu oluşturmaktadır. Tez kapsamında ayrıca konvansiyonel kemoterapi ajanları olan cisplatin ve paklitaksel'in yüksek metastatik özellikte PC3 ve PC3 p53+ hücrelerindeki rolleri de incelenmiştir. Bu bağlamda, prostat kanseri ile ilgili gelecekteki projeler için ön veri olarak değerlendirilebilecek tezin sonuçları umut vericidir.

ABSTRACT

One of the biggest challenges people face today is cancer. Prostate cancer is among the highest cancer death in men worldwide, cancers. One of the important goals in cancer research is to search on the role of miRNAs in cancer. The main topic of this thesis is to investigate microRNAs as future target molecules for target-specific therapy in the treatment of prostate cancer. Within the scope of the thesis, differences in expression levels of miRNAs and how miRNAs are selected as a target-specific therapy were discussed. In addition, it was aimed to investigate the genetic secrets of prostate cancer etiology by in vitro, in vitro and in silico methods. Learn about the cancer genome atlas program (TCGA) and miRNA-related communications such as mirBase hsa-miR-499a and hsa-miR-499b remove this thesis as a group of microRNAs attributed in 136 different litratures based on data collected from the miRBASE database. High metastatic features were examined in PC3 and PC3 p53 + cells. In this context, the results of the thesis, which can be considered as preliminary data for projects related to prostate cancer, are promising.



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser önemli bir halk sağlığı sorunu olup, 2025 yılında yeni tanı alan 17 milyon kişinin olması beklenmektedir. Bu nedenle kanser tanısı, kanserli hücrelerin progresyonunun izlenmesi ve kanserin önlenmesine yönelik birçok çalışma güncel bir şekilde araştırmacılar tarafından yürütülmektedir. Tez konusunu oluşturan mikroRNA'lar (miRNA) ve etkili oldukları kanser tiplerinde tanımlanan her sinyal etkileşimi ileride gerçekleştirilmesi muhtemel hedefe özgü terapi veya evde tanı sistemleri için hedef moleküller olarak önemlidirler. Tez kapsamında ele alınan prostat kanseri için seçili miRNA hedeflerinin nasıl değiştiği, kötü prognoza sahip agresif prostat kanseri hücreleri arasında görülen miRNA hedefleri için ifade düzeyinde farklılıklar aslen kanserin tedavisine ve anlaşılmasına yönelik önemli sonuçlar sağlamaktadır. Bu kapsamda ele alınan tez çalışmasında, yüksek görülme sıklığına sahip olan prostat kanseri seçilmiştir. Prostat kanseri ırk, genetik yatkınlık, beslenme gibi çok faktörlü risk grupları ile birlikte değerlendirilmektedir. Prostat kanseri etiyolojisinde genetik farklılıklar özellikle agresif profile sahip kanserli hücrelerde hem *in vitro* hem de *in silico* yöntemler ile değerlendirilmektedir. Tez kapsamında kanser atlası (TCGA) verileri değerlendirilmiş ve prostat kanserine ait alt veri gruplarında miR-499 hedef sinyal yolları ile birlikte değerlendirilmiştir. hsa-miR-499a ve hsa-miR-499b miRBASE veri tabanına göre 136 farklı literatürde atfedilmiş bir mikroRNA ailesidir. Bu makalelerin hiçbirisinde prostat kanserinde yer alan mekanistik rolü, hedef genler ve bu genlerin etkili sinyal yolları konusunda bilgi yer almamaktadır. Bu çalışma ile amacımız miR-499 etkileşimde prostat kanseri için etkili sinyal yollarının tanımlanması, prostat kanseri hücreleri için miR-499 hedefinin öneminin gösterilmesi, etkili olduğu mRNA'lar ile ilgili olarak hedef sinyal yollarının tanımlanmasıdır. Ayrıca tez çalışmasında *in vitro* kültür ortamında PC3 doğal tip ve p53^{-/-} hücreler ile çalışılmıştır. Ancak COVID-19 pandemisi nedeni ile tez çalışmasında ilk kısımda elde edilen sonuçlar *in silico* veriler ile tamamlanabilmiştir. Hücre kültürü modelinde prostat kanseri hücrelerinde cisplatin ve

paklitaksele olan apoptotik cevap modellenenilmiş, her iki hücre hattında ilaçların etkisi hücre sağ kalımı ve canlılık açısından gösterilebilmiştir. Ardından yapılan tez çalışması kapsamında prostat kanseri hücre serilerinden elde edilen *in silico* veriler incelenmiştir. Tez çalışması miRNA-mRNA etkileşimlerinin birden fazla algoritma üzerinde doğrulanması ve hedef sinyal yollarının protein düzeyinde etkileşimlerinin veri analizi üzerinden öngörülmesine yönelik bir içerik sağlamaktadır. Bu kapsamda tez çalışmasının prostat kanseri ile ilgili ileride yapılabilecek projeler için ön veri niteliğinde değerlendirilebilecek sonuçları umut vaat etmektedir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. KANSER

İstenmeyen kontrolsüz hücre bölünmesi olarak oldukça eski bir terim olan kanser sözcüğü eski Yunancada yengeç kelimesinden türevlenmektedir[1]. Temel olarak, normal bir vücut hücresinin anormal şekilde gelişmesine neden olabilecek herhangi bir şey, kansere neden olabilir.[2]Kanserin ortaya çıkmasına neden olan bu değişiklikler, çeşitli etken maddeler ile tanımlanmakla birlikte proto-onkogenler, tümör baskılayıcı genler ve DNA onarım genleri olacak şekilde üç farklı gen grubunun üzerindeki değişimler ile birlikte irdelenmektedir[3] . Proto-onkogenler, normal hücre büyümesi ve bölünmesinde rol oynayan önemli moleküler hedeflerdir. Bununla birlikte, bu genler belirli şekillerde değiştiklerinde veya normalden daha aktif olduklarında, kansere neden olan genler (veya onkogenler) haline gelebilirler, bu da hücrelerin büyümemesi ve hayatta kalmasını sağlar[4] .

Tümör baskılayıcı genler ayrıca hücre büyümesi ve bölünmesinin kontrolünde rol oynar. Tümör baskılayıcı genlerde belirli değişiklikler olan hücreler, kontrolsüz bir şekilde bölünebilir [5]. DNA onarım genleri, hasarlı DNA'nın sabitlenmesinde rol oynar[6]. Bu genlerde mutasyona sahip hücreler, diğer genlerde ek mutasyonlar geliştirme eğilimindedir. Bu mutasyonlar birlikte, hücrelerin kanserli olmasına neden olabilir[7]. Hücreler çoğu zaman DNA'da meydana gelen bu hasarları tespit edebilir ve onarabilir, böylece anormal olarak üretilen hücreler programlanmış hücre ölümüne veya apoptoza uğrayacaktır[7]. Diğer durumlarda, anormal şekilde üretilmiş hücreler hızla bölünecek ve sonunda insan vücuduna yayılacaktır. Kötü huylu hücreler veya tümör hücreleri, normal vücut dokularına yayılabilir bu anormal şekilde üretilmiş kanserli hücreler olarak adlandırılan diğer isimlerdir [8]. Birçok kanser ve kanser dokusunu oluşturan anormal hücreler, prostat kanseri gibi anormal hücrelerin kökenini oluşturan dokunun adıyla da tanımlanır [9].

Kanserli hücreler bulundukları yerlerden daha uzak dokulara göçme yetkinliğine sahip olabilirler. Kanser yayıldığında, kanser hücreleri ilk oluştukları yerden (birincil kanser) ayrılır, kan veya lenf sistemi boyunca hareket eder ve vücudun diğer bölgelerinde yeni tümörler (metastatik tümörler) oluşturur[10]. Metastatik tümörler primer olarak orjin aldıkları dokunun özelliklerini taşıyabilirler, ancak tohum ve toprak hipotezine göre her göme eğiliminde olan hücre, bir noktada birikime uğruyorsa, birikim gösterilen yerin bu hücre ile uyumlu bir mikroçevre özelliği gösterdiği ifade edilmektedir. Bu uyum hücrenin farklanma süreci sonucunda da meydana gelebilmektedir. Vücutta ilk başladığı yerden başka bir yere yayılan kansere bu nedenle metastatik kanser denir. Kanser hücrelerinin vücudun diğer bölgelerine yayılma sürecine metastaz denir [9]. Kanser ve kanser türlerinin görülme sıklığı yaş, cinsiyet, ırk, yerel çevresel faktörler, diyet ve genetik gibi birçok faktörden etkilenir. Sonuç olarak kanser ve kanser türlerinin görülme sıklığı bu değişken faktörlere bağlı olarak değişmektedir [11][12]. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) dünya çapında kanser hakkında aşağıdaki genel bilgileri sağlar: Kanser, dünya çapında önde gelen bir ölüm nedenidir. Akciğer, mide, karaciğer, kolon ve meme kanseri her yıl kanserden en çok ölüme neden olur. 2030'da tahmini 13,1 milyon ölümlerle (yaklaşık % 70 artış) dünya çapında kanserden dolayı meydana gelen ölümlerin artmaya devam edeceği tahmin ediliyor. Dünyanın farklı bölgelerinde, kanser tipine göre görülme sıklığı ve ölüm oranları değişkenlik göstermektedir[13]. Pek çok çalışma, ölüm oranlarında ilgili etnik çeşitliliği ortaya koymaktadır: Karayipler, Sahra altı Afrikalıları (% 10) takiben dünyadaki en yüksek oranlara (% 26,3) sahiptir ve sonunda, Asyalılar en düşük (% 2,5) göstermektedir[14]. Belki de genetik ve çevresel bileşenler bu etnik çeşitliliğin oluşmasına katkıda bulunur. Dahası, Amerikalı erkekler, özellikle Afrikalı Amerikalılar arasında prostat kanseri gelişme riskinin, Amerika Birleşik Devletleri'ndeki diğer popülasyonlardan daha yüksek olduğu bulunmuştur. Bu duruma bir başka örnek ise mide kanseri yüksek sıklıkla Japonya'da görülürken, ABD'de nadiren bir kanser tipi olarak dikkati çekmektedir. Bu durum genellikle çevresel ve genetik etkenlerin bir kombinasyonu sonucunda ortaya çıkmaktadır [15].

2.1.1. Kanserin Nedenleri

Normal bir vücut hücresinin anormal şekilde gelişmesine neden olabilecek her şey, kansere neden olabilir[16]. Pek çok şey hücre anormalliklerine neden olabilir ve kanser gelişimiyle ilişkilendirilmiştir. Bazı kanser nedenleri bilinmezken, diğer kanserlerin çevresel veya yaşam tarzı tetikleyicileri vardır veya birden fazla bilinen nedenden kaynaklanabilir. Bazıları, bir kişinin genetik yapısından gelişimsel olarak etkilenebilir[17]. Birçok hasta bu faktörlerin bir kombinasyonu nedeniyle kanser geliştirir. Belirli bir kişide bir kanserin gelişmesine neden olan başlangıç olay (lar) ını belirlemek genellikle zor veya imkansız olsa da, araştırmalar klinisyenlere tek başına veya diğer nedenlerle uyumlu bir dizi olası neden sağlamıştır. Aşağıdakiler ana nedenlerin bir listesidir ve araştırma ilerledikçe belirli nedenler rutin olarak eklendiğinden her şeyi kapsamamaktadır[18][19]. Kansere ilişkili veya nedensel ajanların genel kategorileri şunlardır: kimyasal veya toksik bileşik maruziyetleri, iyonlaştırıcı radyasyon, bazı patojenler ve insan genetiği[20].

Kimyasal veya toksik bileşik maruziyetleri: Benzen, asbest, nikel, kadmiyum, vinil klorür, benzidin, N-nitrozaminler, tütün veya sigara dumanı (en az 66 bilinen potansiyel kanserojen kimyasal ve toksin içerir), asbest ve aflatoxin[21][22].

İyonize radyasyon: Uranyum, radon, güneş ışığından gelen ultraviyole ışınları, alfa, beta, gama ve X-ışını yayan kaynaklardan gelen radyasyon[23].

Patojenler: İnsan papilloma virüsü (HPV), EBV veya Epstein-Barr virüsü, hepatit virüsleri B ve C, Kaposi sarkoması ile ilişkili herpesvirüs (KSHV), Merkel hücre poliomavirüsü, Schistosoma türleri ve Helicobacter pylori; diğer bakteriler olası ajanlar olarak araştırılmaktadır[24][25].

Genetik faktörler: Herkesin kanser için risk faktörlerine sahip olduğunu ve kansere neden olan maddelere (örneğin güneş ışığı, ikincil sigara dumanı ve X-ışınları) maruz kaldığını belirtmek önemlidir. Yaşamları boyunca, ancak birçok kişi kansere yakalanmaz. Ek olarak, birçok insan kansere bağlı ancak onu geliştirmeyen genlere sahiptir. Neden? Araştırmacılar her birey için tatmin edici bir cevap veremeyebilirse de, bir kişinin maruz kaldığı kansere neden olan maddelerin miktarı veya seviyesi ne kadar yüksek olursa, kişinin kansere yakalanma şansı o kadar yüksek olacaktır. Ek

olarak, kansere genetik bağı olan kişilerde benzer nedenlerle kanser gelişmeyebilir (genlerin işlev görmesi için yeterli uyarının olmaması). Ek olarak, bazı insanlar, kanser hücreleri olan veya potansiyel olarak kanser hücreleri haline gelebilecek hücreleri kontrol eden veya ortadan kaldıran yüksek bir bağışıklık tepkisine sahip olabilir. Bazı diyet yaşam tarzlarının bile, kanser hücrelerinin hayatta kalmasına izin vermek veya önlemek için bağışıklık sistemiyle birlikte önemli bir rol oynayabileceğine dair kanıtlar vardır. Bu nedenlerden dolayı, birçok kişiye belirli bir kanser nedeni atamak zordur [11][26][27].

Son zamanlarda, kanser riskini artırabilecek maddeler listesine başka risk faktörleri de eklenmiştir. Özellikle kırmızı et (sığır eti, kuzu eti ve domuz eti gibi), Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı tarafından potansiyel olarak kansere neden olma riski yüksek bir ajan olarak sınıflandırılmıştır; ayrıca işlenmiş etler (tuzlanmış, tütülenmiş, korunmuş ve / veya işlenmiş etler) kanserojen listeye alındı. Çok fazla mangalda et yiyen kişiler de yüksek sıcaklıklarda oluşan bileşikler nedeniyle riski artırabilir. Bazı kanserlerin riskini artırabilecek daha az tanımlanmış diğer durumlar arasında obezite, egzersiz eksikliği, kronik inflamasyon ve hormonlar, özellikle de replasman tedavisi için kullanılan hormonlar bulunur. Cep telefonları gibi diğer öğeler yoğun bir şekilde incelenmiştir. 2011'de Dünya Sağlık Örgütü, cep telefonu düşük enerjili radyasyonu "muhtemelen kanserojen" olarak sınıflandırdı, ancak bu, cep telefonlarını kafein ve salamurla sebzelerle aynı riske sokan çok düşük bir risk seviyesidir[11][15][28].

2.1.2. Prostat Kanseri

Prostat kanseri (PCa), erkekler arasında en sık teşhis edilen kanser tiplerinden birisidir. Ayrıca dünyada kansere bağlı ölümlerin üçüncü önde gelen nedeni olarak tanımlanmaktadır (Globocan)[15]. Ortalama yaşam süresinin ve Batı benzeri yaşamın artmasıyla birlikte, epidemiyolojik tahminler ışığında prostat kanseri sıklığı artmakta ve metastatik hasta sayısında pozitif korelasyonda artış göstermektedir. Dünya Sağlık Örgütü'nün (Globocan) 2040 için tahminlerine göre, PCa'nın neden olduğu ölüm sayısının neredeyse iki katına çıkması beklenirken, dünyada yeni teşhis konulan erkeklerin sayısı yılda 2.300.000'e ulaşacağı öngörülmektedir[15]. Prostat kanserini etkileyen faktörler incelendiğinde; aile öyküsü, genetik faktörler, ırk ve yaşam tarzı, beslenme alışkanlıkları önemli etkenler olarak listelenmektedir [29][30].

Aile öyküsü ile prostat kanseri ile ilişkili genetik etkenlerin aile bireyleri arasındaki dağılımı ifade edilmektedir. Örneğin, prostat kanseri olan bir yakın akrabasının olan erkeklerin hastalığa yakalanma olasılığı yaklaşık iki kat, 2 veya daha fazla akrabası olanların teşhis edilme olasılığı yaklaşık 4 kat daha fazladır [30].

İrk konusunda Afrika kökenli erkeklerin prostat kanserine yakalanma olasılığı beyaz erkeklere göre % 79 ve hasta olma riskleri ise 2,2 kat daha fazla olarak tanımlanmıştır. Prostat kanseri teşhisi konan çok sayıda Afrikalı-Amerikalı erkek olmasına rağmen, prostat kanserinden artan ölüm oranının kısmen erişimi zor olan sağlık hizmetlerine, ve düşük sıklıkta PSA taramasına, uygun tedaviye ve takipte görülen eşitsizliğe bağlı olduğu bilinmektedir [30].

Yaşam tarzı ve beslenme alışkanlıkları ise prostat kanseri için diğer risk faktörleri olarak listelenmektedir. Özellikle sosyal ve çevresel faktörler içerisinde yüksek yağlı, yüksek işlenmiş karbonhidrat beslenme tipi ve hareketsiz yaşam tarzı risk faktörü olarak kabul edilmektedir. Aşırı kilolu veya obez erkekler, nihayetinde agresif bir prostat kanseri geliştirme riski daha yüksektir. Araştırmalar, obez erkeklerde ameliyattan iyileşmenin daha uzun ve daha zor olduğunu ve prostat kanserinden ölme riskinin daha yüksek olabileceğini göstermiştir [30][31][32].

Klinikte PCa taraması, prostat spesifik antijen (PSA) testini ve dijital rektal muayeneyi (DRE) içerirken, tanı prostat biyopsi örneklerinin histopatolojik analiz sonuçları da tanıyı desteklemektedir. İyi huylu prostat hiperplazisi (BPH) için prostatın transüretal rezeksiyonundan veya prostatektomiden alınan biyopsi numuneleri tanı amaçlı kullanılır. Biyopsiler, tümör dokusunun glandüler yapının farklılaşmasına bağlı olarak ikiden ona kadar bir Gleason skoru (GS) aldığı Gleason derecelendirme sistemi kullanılarak histolojik agresiflik açısından analiz edilir. Uluslararası Ürolojik Patoloji Derneği (ISUP), birkaç yıl önce GS'yi beş gruba, başka bir deyişle ISUP dereceleri 1-5'e dönüştüren yeni bir derecelendirme sistemini kullanmaya başladı. Bu sayede klinik tanıda daha doğru evrelemeye yönelik bir iyileşme sözkonusu olmuştur [30][29].

PCa ile ilişkili olarak sürecin yönetimi çeşitli faktörlere bağlıdır: Tümör evreleme, PSA seviyeleri, GS, ISUP derecesi ve erkeğin yaşı. Ancak tüm bu klinik gözlem yetkinliğine rağmen her kanser tipinde olduğu üzere hastalık heterojenliği nedeniyle, bir tümörün seyrini tahmin etmek bir zorluktur. En büyük zorluk, bir tür tedaviden (ameliyat, hormon tedavisi, radyoterapi ve kemoterapi) fayda görebilecek bir hasta ile hastalığın ilerlemesi belirginleşene kadar hastalığı izlemekten fayda görebilecek bir hasta arasında ayırım yapma konusundaki belirsizliktir. PCa kayda değer bir erkek popülasyonunda sessiz ve yavaş büyüyen bir hastalık olduğundan, izleme prosedürleri (aktif izleme ve gözetim altında bekleme) genellikle birinci basamak tedavi olarak yeterlidir. Bununla birlikte, izleme prosedürleri genellikle sağlık bakımı maliyetini artıran ve ciddi komplikasyon riskini artıran tekrar biyopsileri içerir [29][33][34].

Klinikte yüksek kabul gören PSA hala altın standart bir biyobelirteç olmasına rağmen, agresif hastalığı agresif olmayan hastalıklardan ayırt etmede çok yardımcı olmadığından tedavi öncesi kararlarda sınırlı değere sahiptir. PSA kansere özgü olmadığından, sınırlı özgüllüğü yüksek oranda yanlış pozitif sonuç verir. Yüksek seviyeler, iyi huylu prostat hiperplazisi veya prostatit gibi habis olmayan prostat patolojisinde bulunur ve DRE, döngü veya boşalma gibi prostat manipülasyonlarından kaynaklanabilir. PSA testi ayrıca, teşhis edilen ve aşırı tedavi edilen artan sayıda düşük riskli PCa üretmektedir. Geleneksel 4.0 ng / ml sınır değeri ciddi bir şekilde sorgulanmaktadır. Çünkü PCa'lı erkeklerin % 15'ine kadar PSA seviyeleri sınırın altındadır ve 4-10 ng / ml aralığında PSA'lı erkeklerin% 70'ine kadar negatif prostat

biyopsisi vardır [35],[36],[37]. Bu durum klinik gözlem açısından bir zorluk oluşturmaktadır. Tedavi öncesi karar vermeye yardımcı olacak, özellikle kötü huylu ve malin olmayan durumların yanı sıra agresif ve agresif olmayan tümörleri daha iyi ayırt etmeye yardımcı olacak daha spesifik, hassas ve güvenilir biyobelirteçlere büyük bir klinik ihtiyaç vardır. Kanseri taramak ve varsayımsal olarak teşhis etmek için birçok test olmasına rağmen, kesin tanı, şüpheli kanser dokusunun bir biyopsi örneğinin incelenmesiyle yapılır. Kanser evrelemesi genellikle biyopsi sonuçlarıyla belirlenir ve kanser türünü ve kanser yayılma derecesini belirlemeye yardımcı olur; evreleme ayrıca bakıcıların tedavi protokollerini belirlemesine yardımcı olur. Genel olarak, çoğu evreleme yönteminde, atanan sayı ne kadar yüksekse (genellikle 0 ila 4 arasında), kanser türü o kadar agresiftir veya vücuttaki kanser daha yaygındır. Tedavi protokolleri kanserin türüne ve evresine göre değişir[38],[39].

Bu nedenle biyobelirteçler ile tanılamada kesinlik sağlamaya çalışmak uygulanacak olan terapinin sonuçlarının olumlu olması açısından önemlidir. Prostat kanseri tedavisinde farklı yaklaşımlar bu biyobelirteçler nedeni ile yer bulmaktadır. Örneğin lokal prostat kanseri için birinci basamak tedavi seçenekleri farklı yaklaşımları içermektedir: cerrahi prostatektomi, neoadjuvan tedavi ve radyasyon tedavisi. Şu anda, PCa'da tek avantajlı tedavi cerrahi prostatektomidir, ancak yan etkiler mevcuttur. Bu nedenle, literatür çalışmalarına göre hayatta kalma oranını iyileştirmek için neoadjuvan tedavi önermektedir[40],[41].

Androjen yoksunluk terapisi (ADT) olarak bilinen bahsedilen terapi, ilerlemiş asemptomatik hastalığı olan hastaların prostat kanseri hücrelerinde androjenlerin azalmasına yol açar. Luteinize edici hormon salgılayan hormon (LHRH) agonistleri, LHRH antagonistleri, antiandrojenler, maksimum androjen blokajı ve aralıklı androjen yoksunluğu gibi ilaçların kullanımını içerir. Radyasyon tedavisi, cerrahi yaklaşımdan sonra ana lokal hastalık tedavisidir. Bu durumun tersine ilerlemiş prostat kanserinin tercih edilen tedavisi kemoterapiye dayanır: dosetaksel, prednizon, abirateron asetat (AA), prednizon, enzalutamid ve kabazitaksel ile kombinasyon halinde sıklıkla kullanılan ilaçlardır. Bununla birlikte, ilerlemiş prostat kanseri tedavisi olmayan bir hastalık olmaya devam etmektedir ve yeni alternatif tedavilere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu tedavilerde özellikle moleküler hedeflerdeki değişimlerin tanımlanması yüksek önem arz etmektedir. Bu kapsamda gerçekleştirilen tüm araştırmalarda vücut sıvıları

ve dokusundaki yeni potansiyel biyobelirteçlerin bulunması önem arz etmektedir. Hali hazırda yeni geliştirilen hedef moleküllerin ve bu moleküllere yönelik analizlerin bir özeti Tablo 1'de sunulmuştur[42].



Tablo 1. Önerilen prostat kanseri biyobelirteçlerine genel bakış. Prostat kanseri biyobelirteçlerinin klinik değeri literatürde değişiklik gösterir. ABD FDA bugüne kadar sadece Prostat Sağlık Endeksini ve prostat kanseri antijen-3'ü klinik kullanım için onayladı [43].

Test / tahlil	Bileşenler	Örnek tip	Endikasyon / klinik kullanım
PCA3 (progenesa)	PCA3ncRNA	İdrar	Tanı, yeniden biyopsi (negatif biyopsi öyküsü)
PCA3 puanı	PCA3 / PSA mRNA oranı $\times 1000$	İdrar	Rebiyopsi
Mi-prostat skoru	Serum PSA, idrar PCA3 ve T2-ERG Mrna	Kan (serum), idrar	Tanı, prognoz, ilk biyopsi
4K puanı	fPSA, tPSA, sağlam PSA, kallikrein benzeri peptidaz 2 (hk2)	Kan (plazma)	Tanı, ilk biyopsi veya yeniden biyopsi (negatif biyopsi öyküsü)

PHI	proPSA, fPSA, Tpsa	Kan serumu)	Tanı, prognoz, ilk biyopsi
ExoDx prostat intelliscore	Ekzozomal mRNA (T2-ERG, PCA3, SPDEF)	İdrar	Tanı, ilk biyopsi
MDx'i onaylayın	RASSF1 , GSTP1 ve A PC genlerinin metilasy onu	Doku (biyopsi)	Tanı, yeniden biyopsi (negatif biyopsi öyküsü)
SelectMDx	HOXC6, DLX1, KLK3 mRNA seviyeleri	İdrar	Tanı, prognoz, ilk biyopsi
GC (GenomeDx) deşifre etme	22 gen paneli	Doku (RP)	Radikal prostatektomi, tedavi alan hastalar için kanser risk sınıflandırması

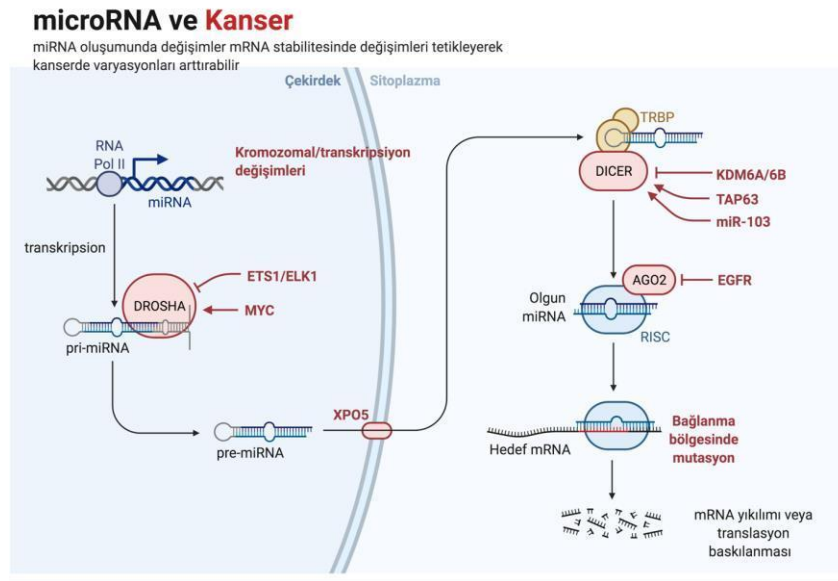
Oncotype Dx GPS	12 kanserle ilgili gen + beş referans gen	Doku (biyopsi)	Kanser risk sınıflandırması, aktif sürveyansdaki erkekler
Prolaris CCP puanı	Hücre döngüsünde (CCP) yer alan 31 kanserle ilgili gen + 15 referans gen	Doku (biyopsi veya RP)	Kanser risk sınıflandırması, aktif sürveyansdaki erkekler
Prostarix risk skoru	PCa ile ilişkili metabolitler: sarkozin, alanin, glisin, glutamat	İdrar	Gri bölgede' kanser riski sınıflandırması- şüpheli DRE ve PSA 2,5–10 ng / ml

ProMark	12 biyobelirteçten oluşan proteomik platformu	Doku (RP)	Radikal prostatektomi, kanser risk sınıflandırması.
TMPRSS2: ERG füzyon geni	TMPRSS2: PSA mRNA ile ilişkili olarak ERG Mrna	İdrar	Rebiyopsi

2.2. MİKRORNA'LARIN BİYOLOJİK MEKANİZMASI

MikroRNA (miRNA), 19-25 nükleotidlik tek sarmallı bir RNA olan küçük kodlamayan bir RNA türüdür [44]. İlk miRNA hedefi olarak tanımlanan lin-4, *Caenorhabditis elegans*'ta 1993 yılında gösterilmiştir [45]. O zamandan beri, çok sayıda miRNA tanımlandı ve günümüzde miRbase veri tabanında açıklanmış 38589 miRNA bulunmaktadır. Bu miRNA'lar, hücre çoğalması, göç, farklılaşma ve apoptoz gibi önemli hücresel süreçlerde yer almaktadır. Enzimler, tümör baskılayıcılar ve transkripsiyon faktörleri gibi anahtar protein ifadeleri açısından etki göstermeleri nedeni ile önemli hedefler olarak güncel önemlerini korumaktadırlar [46]. Bu nedenle, proteinleri doğrudan kodlamamakla birlikte, miRNA'lar bu hücresel süreçleri anahtar protein hedefleri aracılığıyla düzenlemede hala önemli bir rol oynamaktadır. Bu durum kanser hücrelerinde çok önemlidir. Bozulan mRNA ifadelerindeki değişimler çoğunlukla miRNA hedeflerindeki bağlanma ve miktar ile ilgili değişimlerle korelasyon göstermektedir. Bu nedenle miRNAların kanser hücrelerinde biyobelirteç olarak gösterilmelerine neden olmaktadır (Şekil 1).

Diğer protein kodlayan genlere benzer şekilde, miRNA'nın biyogenezisi çok aşamalı bir süreçtir ve gen transkripsiyonundan başlar. Bir miRNA, kendi promotörünü içeren tek bir mikroRNA geninden veya bir protein kodlama geninin birleştirilmiş bir oranından kopyalanabilir; bireysel bir miRNA geninin transkripsiyonu, RNA polimeraz II tarafından gerçekleştirilir ve ilk miRNA formu, 3 'ucunda çoklu-A kuyruğu ve 5' de bir 7-metilguanosa başlığı içeren birincil miRNA (pri-miRNA) olarak adlandırılır. Bu aşamadan sonra pri-miRNA, Drosha ribonükleaz ve çift sarmallı bir RNA bağlayıcı protein olan protein ortağı DGCR8 (DiGeorge sendromu kritik bölge 8) tarafından tanınır ve pri-miRNA'nın kök-döngü (stem loop) yapısı ile etkileşime yol açar. Daha sonra pri- miRNA, Drosha tarafından pre-miRNA'ya işlenir [47].



Şekil 1. miRNA ve kanser ilişkisi. miRNA'lar mRNA düzeyinde düzensizlikle kanserli hücrelerde karakterize edilebilir. Tasarım BioRender.com'da gerçekleştirildi.

miRNA, yaklaşık 70 nükleotidlik firkete yapılı bir RNA'dır; bazı pre-miRNA'lar, doğrudan mRNA ekleme ile işlenen diğer mRNA'nın intron oranından elde edilirler (MacFarlane LA, 2010). Daha sonra, pre-miRNA, GTP bağlayıcı nükleer ile etkileşime girer. Protein Ran (RanGTP) / exportin-5 (XPO5) kompleksi ve daha sonra çekirdekten sitoplazmaya aktarılır; bu aşamada pre-miRNA, RNase III enzimi Dicer, transaktivasyona duyarlı RNA bağlayıcı protein 2 (TARBP2) tarafından oluşturulan Dicer kompleksi tarafından daha da bölünür.

Argonaute proteini (AGO) [44]. Pre-miRNA'nın bölünmüş ürünü, çift sarmallı bir miRNA-miRNA dupleksidir ve daha sonra çift sarmallı dupleks, iki tek sarmallı miRNA'yı ayırır ve üretir: olgun miRNA ve yolcu miRNA; olgun miRNA'ların çoğunluğu, sitoplazmada RNA indüklü sessizlik kompleksi (RISC) oluşturmak için AGO ile işbirliği yapar ve protein kodlayıcı mRNA veya dairesel RNA'lar ve psödojen mRNA'lar içeren rekabetçi endojen RNA (ceRNA) ile bağlanma yoluyla bir düzenleyici olarak işlev görür; bazı miRNA'lar sitoplazmadan eksozomlar aracılığıyla dışa aktarılır ve miRNA'ların hücre içi hedeflerine bağlandığı veya dolaşım sistemine girdiği (dolaşımdaki miRNA'lar) komşu hücrelere girerler [44].

mikroRNA'lar (miRNA'lar), mRNA'ların hem stabilitesini hem de translasyonunu etkileyerek çok hücreli organizmalarda gen ifadesinin miktarını transkripsiyon sonrası biyolojik etkileri ile kontrol altında tutmaktadır. Bu aşamada miRNA dizi, miRNA çeşitliliğinde bir neden olarak miRNA düzenleme, miRNA alternatif bölünmesi ve şablonsuz nükleotid ilavesi dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalarla modifiye edilebilmektedir. miRNA düzenlemesi terim anlamı ile pri-miRNA dizisi üzerindeki nükleotid değişikliği ifade edilmektedir. Adenozinden inosine nükleotid değişimi, çift sarmallı RNA'ya özgü adenosin deaminaz aracılı olarak ortaya çıkar. miRNA öncüsü üzerindeki alternatif ayrılma ayrıca olgun miRNA'nın dizisini değiştirebilir ve farklı miRNA izoformları (izomiR'ler) üretebilmektedir [48].

Aynı miRNA geninden kopyalanmasına rağmen, dizileri üzerinde hafif değişiklikler sergileyen farklı olgun miRNA izoformları genellikle dikkati çekmektedir. Çekirdekte, pri-miRNA'nın bu miRNA modifikasyonları olarak alternatif bölünmesi, Drosha ve DGCR8 kompleksi tarafından gerçekleştirilir. Böylece pre-miRNA izoformları oluşturulmaktadır. miRNA'nın 3' ucundaki adenilasyon, miRNA stabilitesini etkilemektedir. Bu durum modifikasyon mekanizmasında etkili olmaktadır. Örneğin onkojenik miR21, poli (A) RNA polimeraz PAPD5 ile adenilatlandığında ve bozunmasının kolaylaştığı gösterilmiştir [49]. miRNA'nın üridilasyonu benzer şekilde miRNA stabilitesini düşürmektedir. Bu durum yine birçok sinyal kaskadı üzerinde etkili sonuçları ortaya çıkarmaktadır. Bu noktadan anlaşılabileceği üzere miRNA çeşitliliği genom çıktılarının farklılaşmasındaki en kompleks biyolojik yapılardan birisidir[50].

miRNA'lar, temelde gen ifadesini düzenlemede önemli roller oynayan hedefler olup birçok organizmada transkripsiyon ürünlerinin stabilitesi üzerinde etkilidirler. miRNA'ların çoğu, DNA dizilerinden birincil miRNA'lara kopyalanır ve öncü miRNA'lara ve son olarak olgun miRNA'lara işlenir. Çoğu durumda miRNA'lar, mRNA bozunmasını ve dönüşümsel baskılamayı indüklemek için hedef mRNA'ların 3' çevrilmemiş bölgesi (3' UTR) ile etkileşime girer. Bununla birlikte, miRNA'ların 5' UTR, kodlama dizisi ve gen promoterleri dahil olmak üzere diğer bölgelerle etkileşimi de bildirilmiştir[51],[52].

Belirli koşullar altında miRNA'lar ayrıca çeviriyi etkinleştirebilir veya transkripsiyonu düzenleyebilir. miRNA'ların hedef genleri ile etkileşimi dinamik bir süreçtir. Hücrelerde biyolojik etki, miRNA'ların ve hedef mRNA'ların bolluğu ve miRNA-mRNA etkileşimlerinin afinitesi gibi birçok faktöre bağlıdır. miRNA'lar hücre dışı sıvılara salgılanabilir ve eksozomlar gibi veziküller yoluyla veya Argonautes dahil proteinlere bağlanarak hedef hücrelere taşınabilir. Hücre dışı miRNA'lar, hücre-hücre iletişimine aracılık etmek için kimyasal haberciler olarak işlev görür[51],[53].

Birçok organizmada ifade düzeylerinin biyolojik sinyal yolları ile etkileşimi tanımlanmakta olup, derin RNA dizi okumaları ile yeni miRNA'lar isimlendirilmektedir. Solucanlar, sinekler ve memelilerdeki tüm genlerin % 1-2'sini oluşturdukları gösterilmiştir. Her miRNA'nın yüzlerce hedefi düzenleyeceği tahmin edildiğinden, protein kodlayan genlerin çoğunluğunun kontrolleri altında olduğu düşünülmektedir. Pratikte bu, hemen hemen her biyolojik sürecin miRNA'ya bağlı düzenlemeye tabi olduğu anlamına gelir. İşlevsel ilişkilerinin ek kanıtı olarak, miRNA'lar ve hedefleri genellikle çarpıcı evrimsel koruma sergiler. Son olarak, miRNA işlenmesini bozan mutasyon taşıyan organizmalarda yüksek düzeyde patojenite gözlenmektedir[54].

Bu durum, miRNA aktivitesinin tamamen kaybının yaşamla uyumsuz olduğunu göstermektedir. Her ne kadar birçok kanıt çoklu sinyal kaskadları üzerinde etkili miRNA'ların etkisini göstermekte olsa da münferit miRNA'ların biyolojik ilişkisini belirlemek zor bir süreçtir. Çoğunlukla, spesifik miRNA'ların fizyolojik fonksiyonları, hayvanlarda ve kültürlenmiş hücrelerde aşırı ekspresyon çalışmalarından veya antisens moleküllerini hedeflerle eşleşmelerini bozmanın bir yolu olarak kullanan çalışmalardan çıkarılmıştır. Bu deneyler, hücre çoğalması, farklılaşması ve hayatta kalma gibi süreçlerde miRNA'lara kritik roller atfetmiş ve bunları normal gelişim, homeostaz ve hastalık sırasında önemli oyuncular olarak ima etmiştir[55].

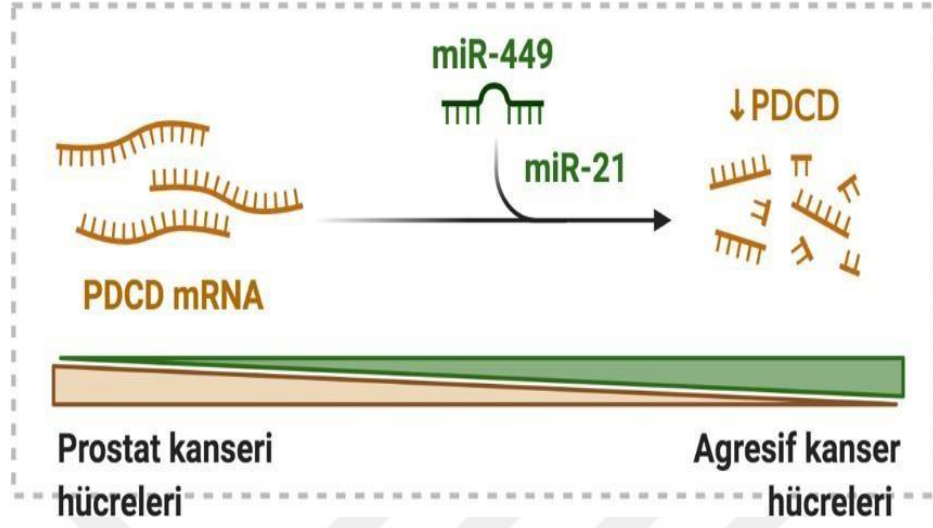
Kanserli hücrelerde miRNA biyogenezi ve etkileri oldukça kompleks bir süreci yansıtmaktadır. Öncelikle anormal miRNA ifade düzeyleri çoğu kanserde sıklıkla gözlenen bir durumdur ve bu karmaşa, kanserde miRNA ifade düzeylerindeki düzensizliğine işaret etmektedir. Çok sayıda tümörle ilişkili genin miRNA'ların hedefi olduğu düşünüldüğünde, miRNA'nın düzensizliğinin kanser üzerinde önemli bir etkisi vardır; oncomiR'nin aşırı ekspresyonu, tümör baskılayıcı ekspresyonunu azaltabilir ve

tümör oluşumunu kolaylaştıran hücre metastazını ve hücre proliferasyonunu inhibe etme işlevini bozabilir [44]. Örneğin, onkojenik miR21, çeşitli kanserlerde aşırı eksprese edilir ve tümör oluşumunda önemli bir rol oynamaktadır [56],[57],[58]. miR21'in yüksek ekspresyonu, tümör baskılayıcı PDCD4'ü inhibe eder ve hızlandırılmış hücre döngüsüne neden olmaktadır[59].

2.3. PROSTAT KANSERİNDE MİRNA'LARIN ÖNEMİ

Kanser tanısında çabuk, kesin ve ucuz testlerin gerçekleştirilebilmesi amacı ile miRNAlar önemli hedeflerdir. Doku bazlı testlerle karşılaştırıldığında, hasta hayat kalitesini yükseltmek ve olası risk faktörlerini indirmek üzere invazif olmayan ya da minimal invazif yöntemler üzerinden tanı sağlayan hedef moleküler biyobelirteçlerin tanımlanması önemlidir. Sıvı (likit) biyobelirteçler olarak ifade edilen bu grup, daha etkili ve spesifik tarama, teşhis, prognoz ve izleme sağlama potansiyeli nedir. Bu kategoride miRNA'lar da yüksek öneme sahip moleküler hedeflerdir. Transkripsiyon sonrası gen ekspresyonunu düzenleyen endojen, küçük kodlamayan RNA'lar olarak bilinen bu hedefler genomun kodlama yapmayan bölgelerinin en iyi tanımlanmış fonksiyonel özelliklerini karakterize etmektedir. miRNA veri tabanı MiRBase'e göre, insan genomunda yaklaşık 2654 olgun miRNA dizisi tanımlanmıştır [60]. miRNA'lar, tümör baskılayıcıların ve onkojenik faktörlerin düzenlenmesi yoluyla farklı tümörlerin patogeneğinde rol oynarlar. PCa gibi solid tümör dokularının miRNA profili, yukarı regüle ve aşağı regüle edilmiş miRNA'ların spesifik modellerinin hastalık konusunda birçok bilgi sağlayabileceğini göstermektedir. Bu öneri ile birlikte, miRNAlar mevcut stabilite özellikleri ve farklı gösterim teknikleri ile (mikroarray, gerçek zamanlı kantitatif ters transkripsiyon PCR [RT-qPCR], yeni nesil sekanslama[NGS]), kanser hastalarında yeni nesil tanı yöntemi olma potansiyeline sahiptirler. Özellikle hastalardan elde edilen biyoakışkanlarında bulunan miRNA biyobelirteçleri bu kapsamda en önemli araştırma hedeflerinden birisidir. Biyolojik sıvılardaki miRNA'lar, ekzozomlar veya mikroveziküller gibi hücresel benzeri hücre dışı yapılarda demetlenmiş veya proteinler ve lipoproteinlerle ilişkili hücresiz moleküller olarak var olabilir. Mitchell vd. 2008 yılında PCa hastalarının plazmasında miRNA varlığını ilk kez göstermiştir[61]. O zamandan beri hem sıvı biyopsilerde hem de prostat dokusunda PCa'da potansiyel biyobelirteçler

olarak miRNA'lar üzerinde çok sayıda çalışma yayınlanmıştır. Bununla birlikte, bazı grup araştırmacılar büyük veri setlerinde istatistiksel olarak önemsiz miRNA hedeflerinin olabileceğini ifade etmekle birlikte bazı araştırma sonuçları miRNA hedeflerinin kişiselleşmiş tıp uygulamalarında önemli ayırt edici hedeflerden birisi olduğunu göstermektedir. PCa'da farklı miRNA'ların önemli olabileceğine dair öncül sonuçlar Tablo 2'de modellenmiştir. Bu miRNA'ların eşliğinde yeni tanısal panellerin geliştirilmesi önemli çalışmalardan birisidir. Ancak bu panellerde gösterilen bazı miRNA hedeflerinin farklı bilimsel gruplar tarafından çelişkili bir şekilde ifade düzeylerine yönelik verilerin sunulması dikkat çekicidir. Bu sorun teknik problemler, deneysel kalite parametreleri, tekrarlanabilirlik eksikliği, çeşitli hasta gruplarına, örnek işlemedeki farklılıklara, ölçümlere ve veri analizi gibi nedenler sebebi ile meydana gelebilmektedir [62]. Literatürde ifade bulunduğu üzere işaret edildiği gibi dokuya özgü ve dolaşımdaki miRNA'lar arasındaki karışık korelasyonlarla birlikte uyum eksikliği miRNA araştırmalarının preanalitik ve postanalitik zorluklarını vurgulamaktadır [62]. PCa yönetiminde yararlı olabilecek spesifik miRNA'ları veya miRNA panellerini tanımlamak için yayınlanmış çalışmaları analiz ederken, herhangi bir şeyi makul bir güven düzeyinde sonuçlandırmak oldukça zordur. Bu kapsamda yapılan derleme çalışmalarında görüldüğü üzere (Song ve ark.) PCa'da miRNA ile ilgili çalışmaların meta-analizinde, yetersiz veri ve anahtar bilginin bulunmaması nedeniyle yayınlanmış çalışmaların üçte birini dışlamak zorunda kalmıştır [62]. Bu nedenle teknik ve biyolojik değişkenleri doğru bir şekilde analiz edebilecek kalite parametreleri miRNA analiz sonuçlarında önemlidir. Örneğin PDCD hem miR449 hem de miR21 için bir hedeftir. Prostat kanseri hücrelerinde her iki miRNA'nın varlığı PDCD ifadesini negatif yönde etkileyerek hücrelerin agresif fenotipinde rol oynamaktadırlar (Şekil 2).



Şekil 2. miRNA ve mRNA etkileşiminin prostat kanseri hücrelerinde agresif hücre fenotipine olan etkileri.

Tablo 2 miRNA ve prostat kanseri hedeflerine yönelik literatür [63]

MiRNA	Doku	Serum	Plazma	İdrar
miR-21	↓ (Szczyrba, 2010; Wach, 2012) ↑ (Zedan, 2018; Kumar, 2018)	↑ (Porzycki, 2018; Kotb, 2014; Egidi, 2013) Fark yok. PCa ve kontroller (Sanders, 2012)	↑ (Zedan, 2018; Ağaoğlu, 2011; Mello-Grand, 2018; Gao, 2016), (Endzelinš, 2017) - EVs Fark yok. PCa ve kontroller (Osipov, 2016)	↑ (Ghorbanmehr, 2019; Foj, 2017)
miR-30c	↓ (Zhu, 2018; Huang, 2016) ↑ (Walter, 2013)	↓ (Moltzahn, 2011) ↑ (Mihelich, 2015) Fark yok. PCa vs BPH (Cochetti, 2016)	↓ (Kachakova, 2014; Chen, 2012)	↑ (Fredsoe, 2018)
miR-125b	↓ (Zedan, 2018; Schaefer, 2010) ↑ (Walter, 2013; Şarkı, 2015)	↑ (Mitchell, 2008)	↑ (Zedan, 2018)	↑ (Fredsoe, 2018)

miR-141	↑ (Szczyrba, 2010; Kumar, 2018; Nguyen, 2013; Brase, 2014; Kelly, 2015)	↑ (Mitchell, 2008; Porzycki, 2018; Cheng, 2013; Guo, 2018), (Hao, 2016) - EVs Fark yok. konum v s neg. biyopsi (Westermann, 2014)	↑ (Osipov, 2016), (Bryant, 2012) - EV'ler ↓ (Kachakova, 2014) Fark yok. PCa vs kontroller (Ağaoğlu, 2011)	↑ (Ghorbanmehr, 2019; Foj, 2017) ↓ (Fredso e, 2018) Fark yok. PCa ve kontroller (Bryant, 2012)
miR-143	↓ (Szczyrba, 2010; Wach, 2012; Zedan, 2018; Kumar, 2018; Martens-Uzunova, 2012)	↑ (Mitchel, 2008)	↑ (Zedan, 2018) Fark yok PCa ve kontroller (De Souza, 2017)	↓ (Stuopelyte, 2016), (Rodriguez, 2017) - EV'ler
miR-145	↓ (Szczyrba, 2010; Wach, 2012; Porkka, 2007; Ozen, 2008; Kang, 2012; Zedan, 2018; Kurul, 2019; Schaefer,	Veri bulunamadı	Veri bulunamadı	↑ (Xu, 2017) - EV'ler

	2010; Kelly, 2015; Martens- Uzunova, 2012;			
--	--	--	--	--

	Yfantis, 2008; Avgeris, 2013; Larne, 2013)			
miR-148a	↑ (Szczyrba, 2010; Martens-Uzunova, 2012; Stuopelyte, 2016; Lichner, 2015; Hart, 2013) Fark yok. PCa vs BPH (Dybos, 2018)	↑ (Dybos, 2018)	↑ (El-Katati, 2017)	↓ (Stuopelyte, 2016) Fark yok. PCa vs BPH (Fredsoe, 2018)
miR-182	↑ (Wach, 2012; Schaefer, 2010; Yfantis, 2008; Tsuchiyama, 2013; Costa-Pinheiro, 2015; Casanova-Salas, 2014)	Veri bulunamadı	Veri bulunamadı	Fark yok. konum vs neg. biyopsi (Casanova-Salas, 2014)
miR-200c	↑ (Szczyrba, 2010; Wach, 2012; Yfantis, 2008)	↑ (Cheng, 2013)	↑ (De Souza, 2017), (Endzelinš, 2017) - EV'ler	↓ (Fredsoe, 2018)

miR-205	↓ (Scahefer, 2010; Martens-Uzunova, 2012; Yfantis, 2008; Tsuchiyama, 2013; Verdoodt, 2013; Kalogirou, 2013) ↑ (Walter, 2013)	↓ (Guo, 2018)	↑ (Osipov, 2016)	↓ (Fredsoe, 2018) Fark yok. konum vs neg. biyopsi (Stephan, 2015)
miR-221	↓ (Szczyrba, 2010; Wach, 2012; Zedan, 2018; Kurul, 2019; Schaefer, 2010; Yfantis, 2008; Porkka, 2007; Tsuchiyama, 2013; Casanova-Salas, 2014; Kneitzm, 2014) ↑ (Song, 2015)	↑ (Kotb, 2014)	↑ (Ağaoğlu, 2011)	↓ (Fredsoe, 2018)
miR-222	↓ (Wach, 2012; Schaefer, 2010; Martens-Uzunova, 2012;	Veri bulunamadı	Veri bulunamadı	↓ (Fredose, 2018)

	Porkka 2007; Tsuchiyama, 2013)			
miR-375	↑ (Szczyrb a, 2010; Wach, 2012; Schaefer, 2010; Nguyen , 2013; Brase , 2011; Stuopelyte, 2016; Yfantis, 2008; Costa- Pinheiro, 2015; Haldrup, 2014; Nam, 2018)	↑ (Porzycki, 2018; Nguyen, 2013; Brase, 2011; Cheng, 2013; Haldrup, 2014; Wach, 2015), (Bryant, 2012) - EV'ler	↑ (Zedan, 2018; Gao, 2016; Endzelinš, 2017; McDonald, 2018), (Huang, 2015) - EV'ler ↓ (Kachakova, 2014) Fark yok. PCa ve kontroller (De Souza, 2017)	↑ (Foj, 2017; Stuopelyte, 2016) Fark yok. PCa ve kontroller (Bryant, 2012) Fark yok. PCa vs BPH (Fredsoe, 2018)
let-7a	↓ (Szczyrba, 2010; Wach, 2012; Kelly, 2015; Porkka, 2007; Tian, 2015) Fark yok. PCa vs BPH (Pesta, 2010)	↑ (Haldrup, 2014)	↑ (Mello-Grand, 2018) ↓ (Endzelinš, 2017) - EV'ler	↓ (Fredsoe, 2018)

let-7c	↓ (Szczyrba, 2010; Kurul, 2019)	↓ (Cochetti, 2016)	↓ (Kachakova, 2014; Chen, 2012)	↑ (Fredsoe, 2018), (Foj, 2017) - EV'ler
--------	---------------------------------	--------------------	---------------------------------	---



2.4. MİKORNA-499A-5P

Proje kapsamında ele alınan mikroRNA449a (miR449a), miRNA-34 ailesi (miR34a, miR34b) ile aynı köken dizilerini içeren mikroRNA449 ailesinin (miR449b ve miR449c) en iyi karakterize edilmiş üyesidir. miR34c bu grupta yine dikkati çeken önemli bir hedeftir. Köken alınan dizideki yüksek benzerlik nedeniyle, bu altı miRNA, işlevsel olarak ilişkili bir miRNA ailesini oluşturmaktadır. miR449a, prostat kanseri dahil çeşitli kanser türlerinde düzensiz miktarlarda tespit edilmiştir. miR449a'nın aşırı ifadesi, önemli düzeyde hücre yaşlanmasına neden olabilir ve onkojenleri doğrudan hedefleyerek kanser hücresi büyümesini, göçünü ve istilasını önleyebilir.

mirBase veri tabanında miR499a dizisi ile ilgili karakteristik özellikler Şekil 3'de görülmektedir.

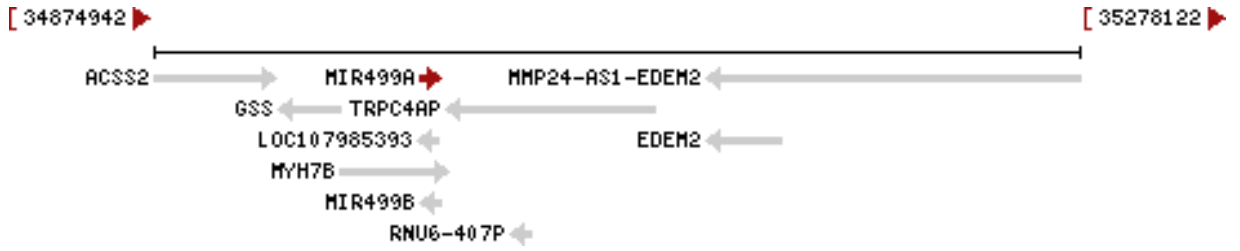
Bu verilere göre miR-499a-5p 142 deneysel çalışma sonucunda, 75878 okumada tanımlanmıştır. miR-499a-3p 51 deney sonucunda 2825 okumada tanımlanmıştır.

hsa-mir-499a	MI0003183:
GCCUGUCCCCUGUGCCUUGGGCGGGCGGCUGUUAAGACUUGCAGUGAUG	
UUUAAACUCCUCUCCACGUGAACAUACAGCAAGUCUGUGCUGCUUCCCGUC	
CCUACGCUGCCUGGGCAGGGU	
hsa-mir-499a-5p: 3 - uuaagacuugcagugauguu - 53	
hsa-mir-499a-3p: 70 - acaucacagcaagucugugcu - 91	

Şekil 3. miRBase veri tabanında hsa-miR-499a için verilen karakteristik özellikler

Genomik lokasyonu 20q11.22 belirlenen miR499a Şekil 4 de görülmektedir. 20.

Kromozomda yer alan miR-499a ve miR-499b benzer bir lokasyonda bulunmaktadır.



Şekil 4. Genomik miR-499a lokasyonu [64].

miR-34c'nin DNA hasarına yanıt olarak hücre sağkalımı ile ilgili önemli bir hedef olan c-Myc'yi negatif olarak düzenlediği gösterilmiş olsa da, miR-449a ve diğer beş üyenin farklı veya örtüşen hedefleri olup olmadığı henüz açıklığa kavuşturulmamıştır. Ayrıca fonksiyonel olarak miR449a, hücre çoğalmasını destekleyen veya onkojenik potansiyele sahip bileşenleri hedefleyerek kanser hücrelerinin proliferasyonunu, istilasını ve göçünü inhibe eden anahtar bir miRNA olduğuna dair görüşler mevcuttur. Bugüne kadar, MET, GMNN, CCNE2, SIRT142, HDAC134, CKD6, CDC25A37 ve E2F43 dahil olmak üzere birkaç miR449a hedefi tanımlanmıştır[65],[66].

Bu çalışmaların sonuçları, miR449a'nın tümör tedavisinde potansiyel bir uygulamaya sahip olabileceğini öne sürdü. Bu çalışmada, miR449a'nın prostat kanseri (LNCaP) hücrelerinde c-Myc'i hedefleyerek *in vitro* ve *in vivo* olarak prostat kanserinin radyosensitiviteyi artırma özelliğine sahiptir. miR449a, LNCaP hücrelerinde radyasyona yanıt olarak ifadesi arttığı ve c-Myc'in bu durumda ifadesinin arttığı gösterilmiştir. Bu durum hücre siklusunda önemli bir etki göstermiştir. C-Myc'i miR-449a'nın doğrudan hedefi olduğu hipotezini destekleyen bu bulgular prostat kanseri hücrelerinde ilgi çekmektedir, miR449a'nın LNCaP hücrelerinde c-Myc ekspresyonunu baskılayarak radyosensitiviteyi artırması nedeni ile kanser terapisinde hedef miRNA'nın etkisinin modellenmesine yardımcı olmuştur.

miR499a birçok patolojik durumda incelenen önemli bir biyolojik hedeftir. Çok yakın zamanda yapılan bir çalışmada pankreas kanseri olan 124 hasta (kanser grubu), 100 iyi huylu pankreas hastalığı olan hasta (iyi huylu kontrol grubu) ve 100 sağlıklı kişi (sağlıklı kontrol grubu) de açlık venöz kan örnekleri, CA199 seviyelerini ve serumda miR499a-5p'nin göreceli ifadesini göstermişlerdir. İyi huylu kontrol grubunda ve kanser grubunda CA199 ekspresyonu, sağlıklı kontrol grubundakinden önemli ölçüde daha yüksekti. Bununla birlikte, kanser grubundaki miR499a-5p ekspresyonu, iyi huylu kontrol grubu ve sağlıklı kontrol grubundakinden önemli ölçüde daha yüksekti.

Ancak malin olmayan kontrol grubu ile sağlıklı kontrol grubunda serum miR499a-5p düzeyinde bir fark tanımlanmamıştır[67],[68].

Bu örneklemede, miR499a-5p'nin pankreas kanseri tanısında tek başına kullanıldığında duyarlılık ve özgüllüğünün CA199'dan daha iyi olduğunu ifade edilmiştir (p <0.05). Ayrıca serum miR499a-5p, CA199 ile birleştirildiğinde, pankreas kanseri için tanısal değer önemli ölçüde arttırmıştır (p <0.05). İkili lusiferaz raportör analizi, PTEN'nin miR499a-5p'nin bir hedef geni olduğunu ayrıca gösterilmiştir [69]. Bir başka çalışmada ise, miR499a-5p hem yüksek derecede metastatik akciğer kanseri hücre hatlarında hem de besiyerinden izole edilen eksozomlarında yüksek düzeyde ifade bulunduğu gösterilmiştir. miR499a-5p aşırı ekspresyonu hücre proliferasyonunu, göçünü ve EMT'yi teşvik ederken, miR499a-5p ifadesinin baskılanması bu biyolojik hedefleri in vitro baskılamıştır. miR499a-5p'nin antagomir uygulamasıyla inhibisyonu, in vivo tümör büyümesini kısıtlamaktadır[70].

Sonuç olarak, yüksek derecede metastatik hücre hattından türetilen miR499a-yeterli eksozomlar, artmış hücre proliferasyonu, migrasyon ve mTOR yolu ile EMT, ve etki miR-499a-5p inhibitörü ile inhibe edilebilir. Çalışma, kanser kaynaklı ekzozomal miR-499a-5p'nin potansiyel tanısal ve terapötik değerini ortaya koymakta ve metastazı modüle eden yeni bir moleküler mekanizma hakkında yeni bir fikir vermektedir [71].

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ

PC3 dt ve PC3 p53+ prostat kanseri hücre hatları American Type Culture Collection (ATCC® CRL-2547™ ve ATCC® CRL-1469™) katalog numarasıyla alınmıştır. Hücreler % 10 fetal sığır serum (FBS), %1 penisilin/streptomisin içeren RPMI-1640 besiyerinde, %5 CO₂ ve 37 °C'lik nemli etüvde büyütülmüştür. Hücreler yoğunlaştığında eski besiyeri atılarak 1X fosfat tamponlu tuz (PBS) ile yıkanmıştır. Daha sonra % 0,25'lik tripsin-EDTA eklenerek hücreler 37 °C'de 5 dk bekletilmiştir. Eşit miktarda besiyeri kullanılarak enzim inaktivasyonu sağlandıktan sonra hücreler 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Pellet 1 ml besiyerinde çözöldükten sonra hücre sayımı gerçekleştirilmiş ve ana stok hücreleri ile yapılacak deneyler doğrultusunda gerekli olan hücrelerin uygun petrilere ekimi gerçekleştirilmiştir.

3.2. HÜCRELERİN DONDURULMASI

Petri kabında yapışmış halde duran hücreler tripsin-EDTA ile muamele edilerek kaldırılmıştır. Kullanılan tripsin-EDTA ile eşit miktarda besiyeri kullanılarak enzim aktivitesi inhibe edilmiş ve 15 ml'lik tüp içerisinde toplanan hücreler 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Pellet 1 ml PBS içerisinde çözölerek hücre sayımı yapılmıştır. Yaklaşık 1x10⁶ hücre üzerine 1 ml dondurma medyası eklenerek hücreler kriyo tüplerine aktanmış sıvı azot tankında saklanmıştır.

3.3. HÜCRELERİN ÇÖZÜLMESİ

Sıvı azottan çıkarılan hücreler hızlı bir şekilde çözülerek dondurma medyası üzerine besiyeri eklenmiştir. Hücreler 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve medya atılmıştır. Hücreler 1 ml besiyerinde çözülerek 25 veya 75 cm² 'lik petrilere ekilmiştir. Seçili cisplatin ve paklitaksel uygulamaları sonucunda 10 µL MTT boyası (3-(4,5Dimethylthiazol-2-yl)-2,5Diphenyltetrazolium Bromide) uygulanmıştır. MTT boyası uygulanan hücreler 4 saat boyunca 37°C ve %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edilmiştir. 4 saat sonunda oluşan formazan kristalleri üzerine 100 µL DMSO uygulanmıştır. Petri 5 dakika karanlıkta inkübe edilmiştir. Spektrofotometrik tayin için 570nm ve 655 nm dalgaboyunda absorbans ölçümü gerçekleştirilmiştir. Canlı hücrelerde mor renkli formazon tuzu oluşturması sonucu kolorimetrik yöntemle hücre canlılığı belirlenmiştir.

3.4. HÜCRE CANLILIĞIN MTT TESTİ İLE BELİRLENMESİ

PC3 ve PC3 p53+ prostat kanseri hücre hatları hücre sayma cihazı (EVE™ Automated Cell Counter, NanoEnTek) ile total hücre sayılarak 96 kuyulu petri kabına her kuyuda 1×10⁴ hücre olacak şekilde ekilmiştir.

3.5. KOLONİ FORMASYON DENEYİ

Prostat kanseri hücre hatları PC3 ve PC3 p53+ hücreleri tripsinizasyonla kaldırılarak sayımı gerçekleştirilmiştir. 6 kuyulu petriye her kuyuda 3×10³ hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Ekim yapıldıktan 24 saat sonra control grubu ve farklı dozlarda palbociclib ve abemaciclib ile muamele edilmiş gruplar oluşturulmuştur. İlaç uygulamasından 24 saat sonra hücrelerde bulunan mevcut medya uzaklaştırılıp yerine yeni medya eklenmiş ve 10 gün boyunca besiyerleri 2 gün arayla değiştirilerek hücreler 37°C ve %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edilmiştir. 10.gün hücreler Metanol/Asetik Asit karışımı (3:1) ile 10 dakika fiks edilmiş ve %0,5 Kristal Viyole ile 15 dakika inkübe edilmiştir. Görüntüler Chemidoc cihazında ve her bir koloni ışık mikroskopunda görüntülenmiştir.

3.6. FLORESAN MİKROSKOBU

Hücrelerin canlılığı için kullanılan yöntemlerden biri de floresan boyalarla hücre canlılığını göstermektir. Bu nedenle pankreas kanseri hücre hatları PC3 ve PC3 p53+ 100.000/kuyu olacak şekilde 12'lik hücre petrilere ekimleri gerçekleştirildikten bir gün sonra farklı kondüsyonlara tabi tutulmuştur. Bu uygulamadan 24 saat sonrasında farklı floresan boyaları uygulanmıştır.

Ekimden 24 saat sonra petri belirlenmiş dozlarda Palbociclib ve Abemaciclib ile muamele edilmiştir. İlaçlama yaptıktan 24 saat sonra 3,3' diheksiloksakarbosiyanin iyodür (DİOC6) boyası son konsantrasyon 4mM olacak şekilde PBS ile hazırlanmış ve direkt hücrelerin üzerine 1µL uygulanmıştır. 37°C'de ve %5 CO₂ içeren etüvde 15 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası hücreler floresan mikroskobu ile 10X büyütmede incelenmiştir.

3.7. TOTAL PROTEİN İZOLASYONU

Her bir pankreas hücresi 1x10⁶ hücre olacak şekilde 100 mm çaplı hücre kültürü petrilere ekilmiştir ve uygun miktarda besi ortamında bekletilmiştir. Belirlenen doz ve zamanda ilaç uygulaması gerçekleştirilmiştir. İlaç uygulamasından 24 saat sonra hücrelerin üzerindeki besiyeri atılarak, hücrelerin üzerine soğuk 1X PBS eklenmiştir. Hücreler kazıyıcılar ve 1X PBS yardımı ile petri yüzeyinden kaldırılmıştır.

Ardından hücreler mikrofüj tüpünde toplanmıştır ve 2 dakika 13200 rpm' de santrifüj edilerek, süpernatant uzaklaştırılmıştır. Üzerine hücre özütleme tamponu (PhosSTOP, Roche® fosfataz inhibitör koktail ve cOmplete EDTA-free, Roche® proteaz inhibitör koktail tabletleri çözündürülmüş Complete Lysis-M, Thermo Fischer) yaklaşık 50 µl olarak eklenmiştir (pellet yoğunluğuna göre daha az olabilir). Örnekler oda sıcaklığında, 15 dakika sallayıcının üstünde bekletildikten sonra 16400 rpm' de, 15 dakika +4°C' de santrifüjlenerek ayrıştırılmıştır. Santrifüjden sonra süpernatant yeni bir mikrofüj tüpüne alınarak ve -80°C' de saklanmıştır.

3.8. PROTEİN MİKTARININ BRADFORD ANALİZİ İLE BELİRLENMESİ

Total proteinlerin kantifikasyonu için Bradford yöntemi kullanılmıştır. Bradford yöntemi Coomassie Brilliant Blue G-250 ile farklı konsantrasyonlardaki protein çözeltilerine bağlanan konsantrasyonu bilinen standart bir proteinden (BSA) konsantrasyonu bilinmeyen proteinin tayini için kullanılır. 1,5 µg/µL BSA (Bovine Serum Albumin) solüsyonu standart eğri çizmek için 96 kuyucuklu plaklara 2 tekrar olmak üzere 1,5,3, 4,5 6 ve 7,5µL konmuştur. Total proteinden iki tekrar olmak üzere 1 µL konmuştur. Her kuyu üzerine 200 µL Bradford solüsyonu eklenir ve 5 dakika oda ısında karanlıkta inkübe edilmiştir. 96 kuyulu plak Microplate Reader cihazında 595nm dalga boyunda ölçüm yapılır (OD 595 nm.) Aleti sıfırlamak için sadece Bradford solüsyonu konan (blank) kuyucuğu alete tanıtılarak sıfırlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Farklı konsantrasyonlardaki BSA'nın 595 nm dalga boyunda verdikleri absorbans değerlerine göre standart bir eğri çizilir. R2 değerinin hesaplanması ve standart eğrinin analizi gerçekleştirilmiştir. İzole edilen ve absorbansı belirlenen örneklerin konsantrasyonu standart eğri grafiği kullanılarak belirlenmiştir.

3.9. SDS-PAGE JEL HAZIRLANMASI

İzole edilen ve kantifikasyonu yapılan proteinlerin ifadesinin incelenmesi için SDS-PAGE (sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi) yöntemi kullanılmıştır.

SDS-PAGE elektroforez sisteminde kullanılacak tüm kaset ve cam malzemeler distile su ile yıkandı. Jel dökmek için kaset sistemleri hazırlandı. SDS-PAGE elektroforezinde kullanılacak çözeltiler ve tampon solüsyonlar hazırlandı. %10 ve %12'lik ayırma jeli içeriği hazırlandı.

Yükleme jeli için belirlenen oranlarda jel içeriği hazırlanır %10 APS ve TEMED aynı anda jel içeriğine eklenerek alt jel üzerine üst jel karışımı mikropipet yardımıyla eklenir. Daha sonra 1X SDS-PAGE yürütme tamponu yürütmenin yapılacağı elektroforez tankına eklenir. Jel elektroforezin gerçekleşeceği kasete yerleştirilir.

3.10. PROTEİN ÖRNEKLERİNİN HAZIRLANMASI

İzole edilen proteinlerin immunoblot yöntemi ile gösterimi için her bir örnek 4X Laemli (Protein indirgeme tamponu) ile muamele edilir. Protein indirgeme tamponu

içerisinde bulunan gliserol yoğunluğa bağlı olarak proteinlerin jelde kuyu boyunca yürümesini sağlar, β -mercaptoetanol proteinlerin üç boyutlu yapısını bozar, SDS proteinleri negatif yükleyerek elektroforetik ortamda proteinlerin molekül ağırlıklarına göre ayrışmasını sağlar. Tris-HCL tampon çözelti olarak ortam pH'sını dengeler. Bromofenol mavisi proteinleri boyayarak jel kuyucuğunda görünür kılmaktadır. Bradford yöntemi ile oluşan standart eğri profili sonucunda 4:1 oranında 4X Laemli ile karıştırılarak kuyucuk başına

35 μ g olarak hesap edilen örnekler 95°C'de 5 dakika denatürasyona tabi tutulur. Denatürasyon sonrası soğutmalı santfirüjde 30 sn santrifüj işlemi gerçekleştirilir. Hazırlanan protein örnekleri buza alınır. Jel kuyularından bir tanesine protein marker yüklenir. Daha sonra protein örnekleri yüklenir. Protein marker ve hazırlanan örnekler 85V'da 2,5 saat SDS içeren yürütme tamponu içerisinde yürütülmüştür.

3.11. PROTEİNLERİN MEMBRANA TRANSFERİ

SDS-PAGE ile molekül ağırlıklarına göre ayrılan proteinler jelden daha stabil bir yapı olan poliviniliden diflorür (PVDF) membrana aktarılma işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu süreçte membran por çapı 0,45 μ M olan membran metanol içerisinde 2 dakika aktif hale getirilmiştir. Tank içerisi 1X Western blotlama tamponu ile dolduruldu ve ısınmayı önlemek adına tank etrafına buz yerleştirildi.

Transfer işlemi 300mA'de 60 dakika gerçekleştirildi. Transfer sonrası %5 yağsız süt ile 1 saat oda sıcaklığında çalkalandı.

3.12. BLOKLAMA İŞLEMİ VE PRİMER-SEKONDER ANTİKORLA İŞARETLEME

Membrana transfer edilmiş ve süt ile bloklama işlemi gerçekleştirilmiş olan protein örnekleri hedef birincil antikörlerle 1 gece +4°C’de inkübe edildi. Hedef anti-rabbit/mouse antikörler Cell Signalling Technology ‘den temin edilmiştir .

1 gece primer antikör ile muamelelenin ardından sekonder antikora alınmadan önce yıkama işlemi gerçekleştirilir. 1X TBS yıkama tamponu ile membran 2 kez 15 dakika çalkalayıcıda düşük devirde (rpm) çalkalanır. Ardından HRP ile konjuge edilmiş sekonder anti-rabbit/mouse antikoru ile 1 gece +4°C’de inkübe edilir.

3.13. PROTEİN BANTLARIN GÖRÜNTÜLENMESİ

Sekonder antikörle muamele edilen membranın kemilüminisans çekimi için ECL solüsyonu hazırlanmıştır. Membranın çekimi için sekonder sonrası yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Membran yıkaması 2 kez 15 dakika 1X-TBS-T yıkama tamponu ile ve 1 kez 1X-TBS yıkama tamponu ile 15 dakika çalkalayıcıda düşük devirde (rpm) çalkalanır. Ardından çekim için karanlık ortamda membran ECL solüsyonu ile 3 dakika inkübe edilmiş ve membran görüntüleme cihazına yerleştirilmiştir. Membrandan elde edilen bant görüntülerinin ImageJ programı ile analizi gerçekleştirilmiştir.

3.14. MİKORNA İN SİLİCO ANALİZLERİ:

Tez kapsamında miR-499 hedefi miRBase ve Diana path veri tabanlarında etkileşimleri açısından modellendi. Bu etkileşimlerde algoritmanın normal değerleri kabul edilerek KEGG ve GO etkileşim modelleri çalışıldı. GEO veri tabanında elde edilen açık veriler PC3 miR499 ve PC3 M miR499 transfeksiyonu sonucunda hücrelerde değişen gen hedeflerinin karşılaştırması için değerlendirildi.

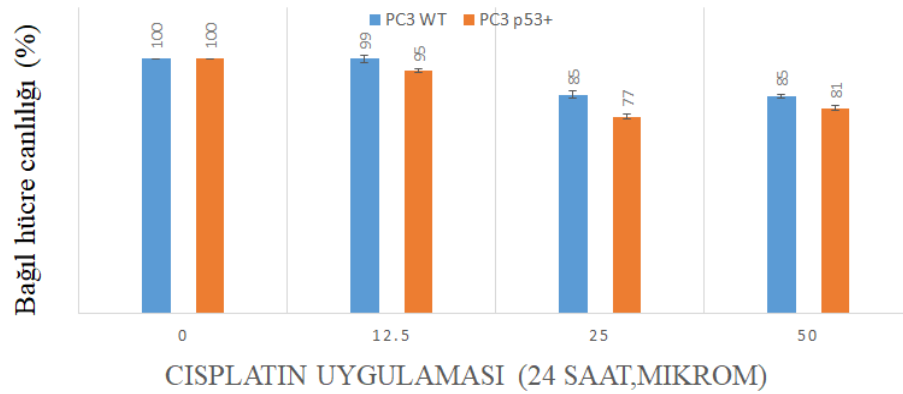
4. SONUÇLAR

Tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmalar iki ayrı kategoride tamamlanmıştır:

1. PC3 dt ve p53 ifadesi bulunan hücrelerde cisplatin ve paklitaksele verilen hücresel cevapların hücre sağkalımı ve ölümü açısından incelenmesi
2. miR499'un prostat kanseri hücrelerinde temel rolünün araştırılması

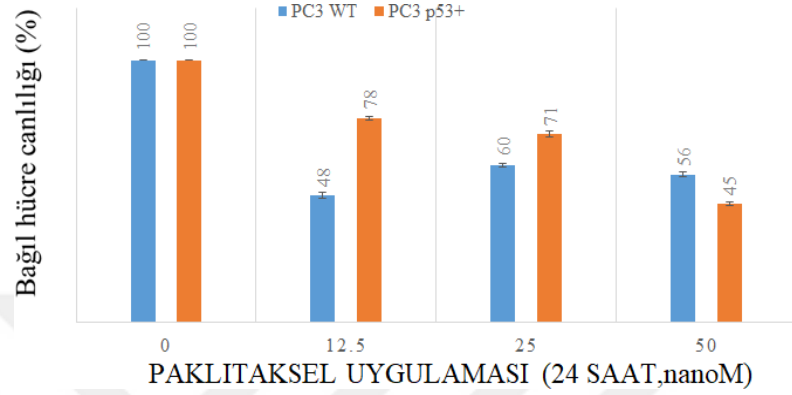
4.1. CİSPLATİN VE PAKLİTAKSEL SİTOTOKSİK AJANLAR OLARAK PC3 DT VE P53 HÜCRELERDE APOPTOZA NEDEN OLMAKTADIR.

PC3 dt ve p53 + hücreleri 24 saat boyunca seçili dozlarda cisplatin veya paklitaksele maruz bırakıldı. Bu işlemin ana amacı apoptotic etki gösterdiği bilinen konvansiyonel kemoterapötik ajanların hücre canlılığı üzerindeki etkisinin gösterilmesi idi. Bağlı hücre canlılığı sonuçlarına göre kontrol hücrelere oranla 25 μ M ve 50 μ M cisplatin hücre canlılığında ılımlı düzeyde azalmaya neden olmuştur. Ancak PC3 dt ve p53 + arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir (herbir doz kontrole karşın $p>0,05$) (Şekil 5).



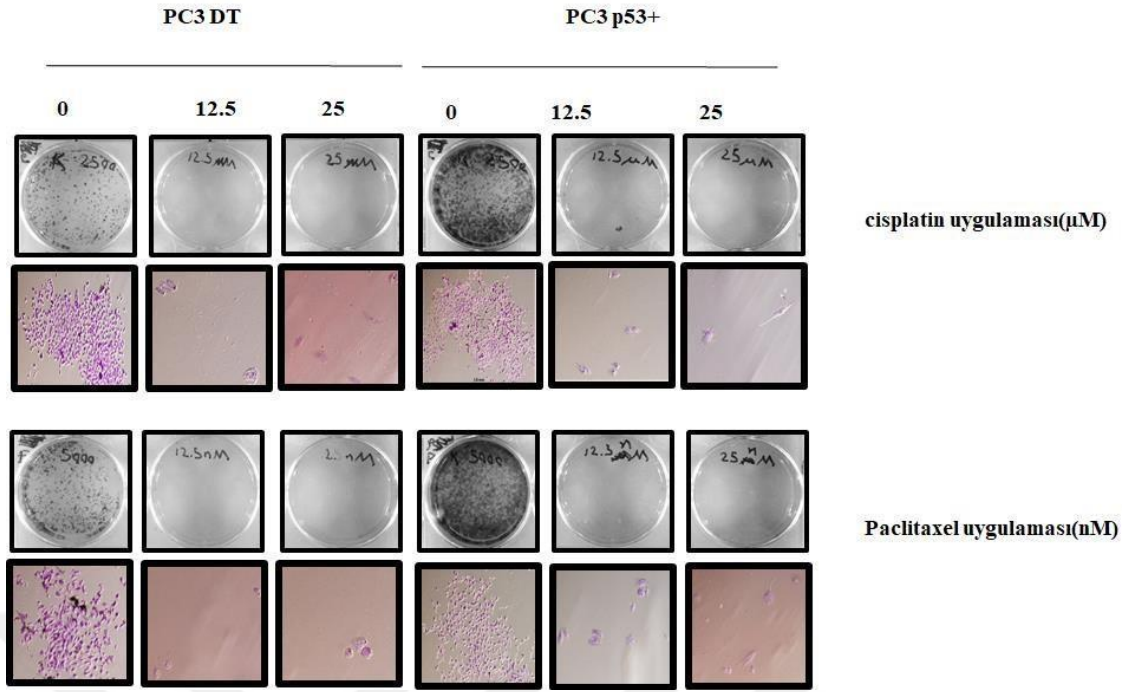
Şekil 5. Cisplatine 24 saat boyunca maruz bırakılan PC3 ve p53+ prostat kanseri hücrelerinde bağlı hücre canlılığı MTT testi ile belirlenmiştir.

Benzeri şekilde paklitaksel uygulaması sonucunda 12,5 nM paklitaksel PC3 dt hücrelerde en çok sitotoksik etkiye neden olurken, 25 ve 50 nM %50 civarında PC3 dt hücrelerde hücre canlılığını azaltmıştır. p53 ifadesine sahip hücrelerde ise 50 nM uygulama etkili olmuş ve dt hücrelere göre daha fazla hücre canlılığına ket vurmuştur.



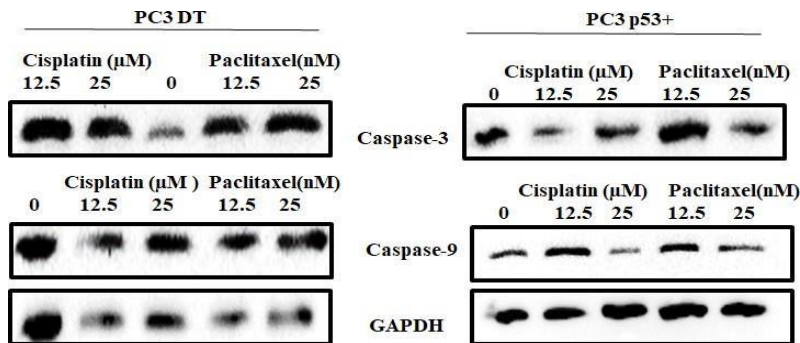
Şekil 6. Paklitaksele 24 saat boyunca maruz bırakılan PC3 ve p53+ prostat kanseri hücrelerinde bağıl hücre canlılığı MTT testi ile belirlenmiştir.

Bu kapsamda ayrıca koloni oluşturma yetkinliği her bir hücre grubu ve ilaç uygulaması için Şekil 7’de incelenmiştir. İlaç uygulamasına maruz bırakılan hücreler 24 saat sonra yeni besiyeri ile 10-14 gün boyunca bekletildiler. Bu süreçte koloni oluşturma potansiyelleri incelendi. Kristal viyole boyama sonrasında tüm ilaç tiplerinin hem dt hem de p53 ifadesi olan PC3 prostat kanseri hücrelerinde etkili bir şekilde koloni oluşumunu engelledikleri gösterildi. Böylece seçilen ilaçların hücre sağ kalımına ketvurucu etkileri gösterilmiştir.



Şekil 7. Koloni oluşum deneyi, doza bağımlı cisplatin ve paklitakselin, PC3 WT ve PC3 p53 + hücrelerinin koloni oluşturma potansiyelini azalttığını gösterdi.

Cisplatin veya paklitaksel uygulamasının apoptotik markırlar üzerindeki etkisi incelendiğinde, PC3 dt hücrelerde caspase 3 ifadesinin her iki ilaç uygulaması sonucunda artış göstermesi anlamlı bir sonuç olarak kaydedilmiştir. Ancak p53 ifadesine sahip PC3 prostat kanseri hücrelerinde bu artış özellikle cisplatin 12,5 μM ve paklitaksel 25 nM uygulaması sonucunda caspase 3 ifadesi için gösterilememiştir. Caspase 9 ifadesinde de benzeri şekilde 25 μM cisplatin ve 25 nM paklitaksel için bu etki tanımlanamamıştır. Bu durum yükleme kontrollerindeki düzensizlik nedeni ile deneylerin tekrar edilmesi gerekliliğini göstermektedir (Şekil 8).



Şekil 8. p53'ün aşırı ekspresyonu, cisplatin ve paklitaksel ile tedaviyi takiben bir apoptoz markörü olarak Kaspaz-3 ve Kaspaz-9'un ekspresyon seviyelerini modüle etti.

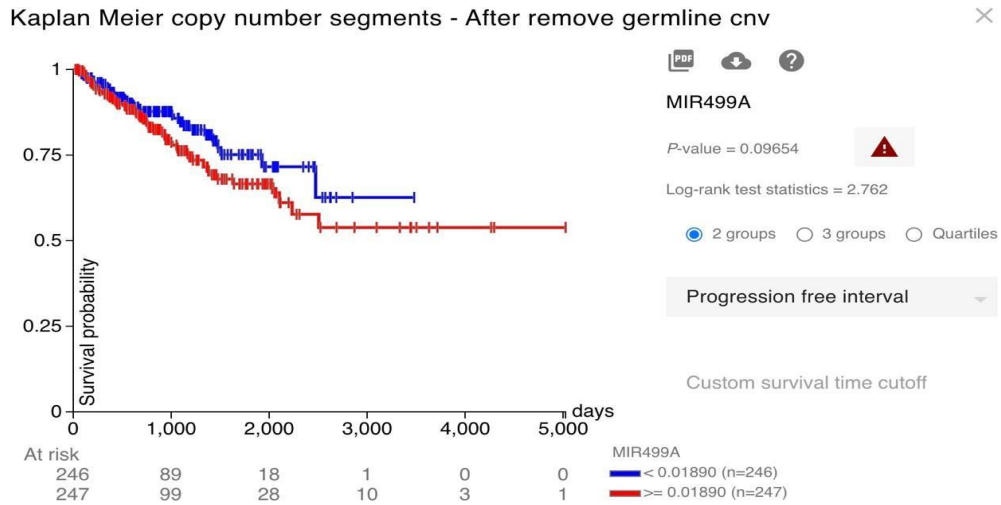
4.2. MİR-499'UN PROSTAT KANSERİNDE ÖNEMİNİN GÖSTERİLMESİ

miR499a birçok dokuda ifade bulan bir hedef olduğu DNA veritabanlarında (Şekil 9) kopya sayısı ve ifade düzeyi açısından farklı RNA seq sonuçları ile analiz edilmiştir. Şekil 9'da TCGA veritabanındaki 568 prostat kanseri hastası TCGA prostat kanseri veritabanından çekilmiş ve analiz edilmiştir. Üstüste gelen ve hata payı oluşturan hasta profillerine rağmen Kaplan Meier grafiklerine göre miR499a ifadesi hastaların yarısında yığılmı görülen cut-off değerine prognoz ile ilişkilidir.

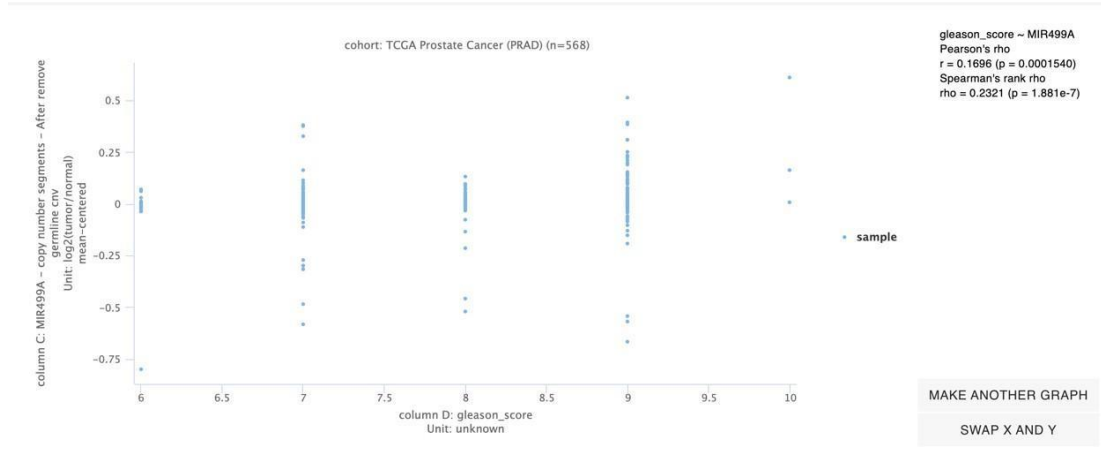
Ayrıca Gleason skora göre miR499a kopya sayısı incelenmiş ve dağılım grafiği Şekil 10'da gösterilmiştir. Veri dağılımı istatistiğine göre Gleason 7 ve üstü miR499a kopya sayısı artış göstermektedir (Şekil 10).

Bu kapsamda çalışılan veri setlerine göre karsinojenik dokularda miR499a ifadesi ilgi çeken miRNA hedeflerinden birisidir (Şekil 11).

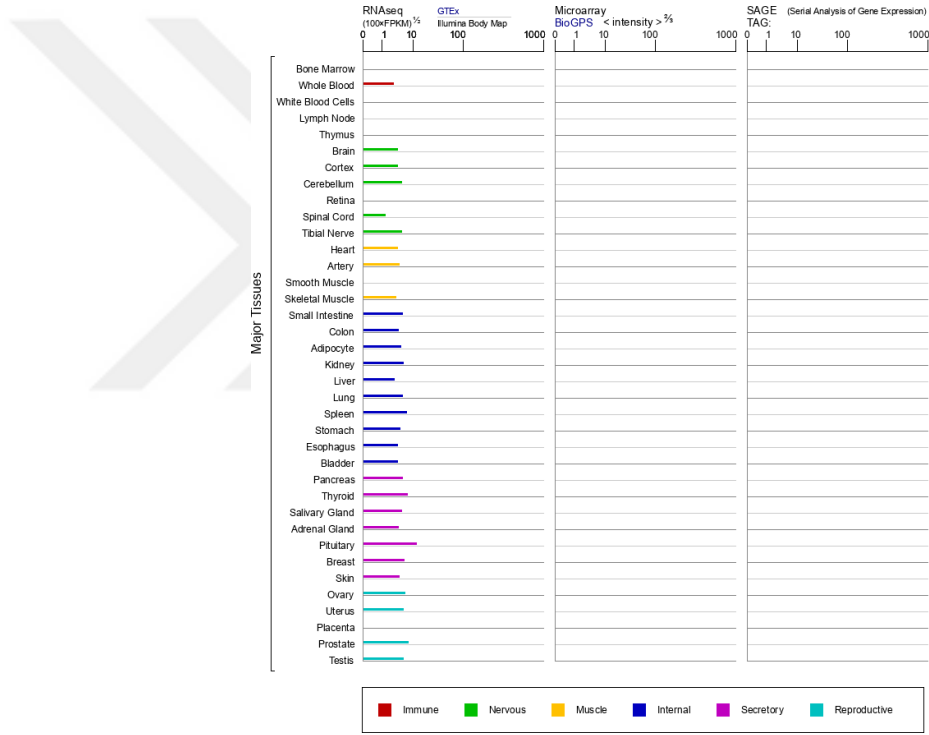
Bu amaçla inceleme yaptığımız GEO veri seti temelde PC3 ve metastatik özelliklerde PC3 hücrelerinde miR499a transfeksiyonu sonrasında değişen gen hedeflerini tanımlayan büyük ölçekli bir RNA dizileme çalışması olarak bu çalışmada detaylı bir şekilde analiz edildi. Agilent iki renkli Düşük RNA Girişli Doğrusal Amplifikasyon Kiti etiketleme protokolü ile PC3 dt toplam RNA örnekleri PC3 M miR499 transfekte edilmiş örneklerin toplam RNA içeriği ile karşılaştırılmıştır (GEO GSM2450432).



Şekil 9. Xena Browser TCGA Prostate Cancer veri tabanına göre miR499 ifadesi prognozda önemlidir.

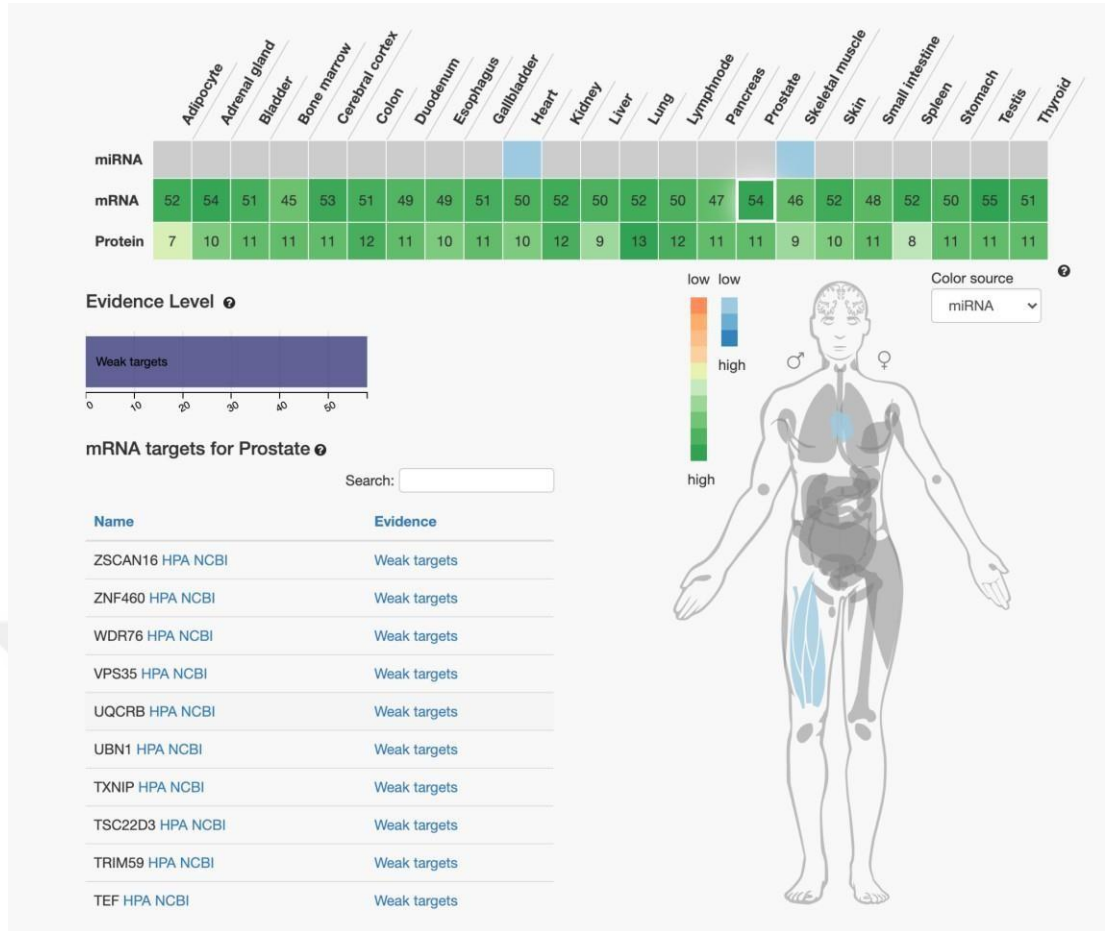


Şekil 10. Gleason skora göre miR499a ifadesinin dağılım grafiği Pearson korelasyon faktörüne göre Xena Browser veritabanında incelenmiştir.



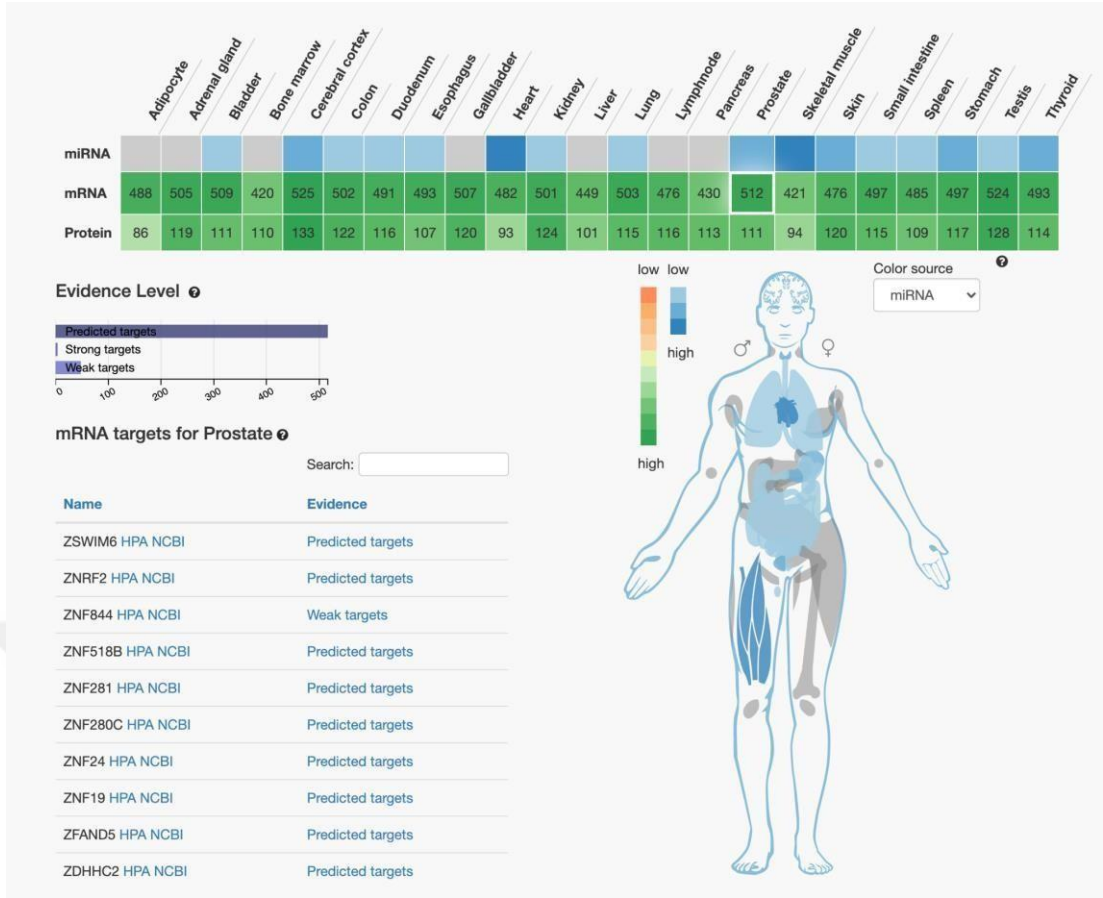
Şekil 11. miR499a ifade edildiği dokular ve biyolojik özellikleri

miR499a-5p ve miR-499-a-3p prostat dokusunda hedefleri olduğu bilinen ve diğer dokulara oranla daha fazla ifade bulunduğu gösterilen hedeflerdir. miR-499a-5p sıklıkla kalp ve iskelet dokusunda ifade bulmakla beraber, prostat dokusunda etkileşimi bilinen 54 farklı hedefe sahiptir.



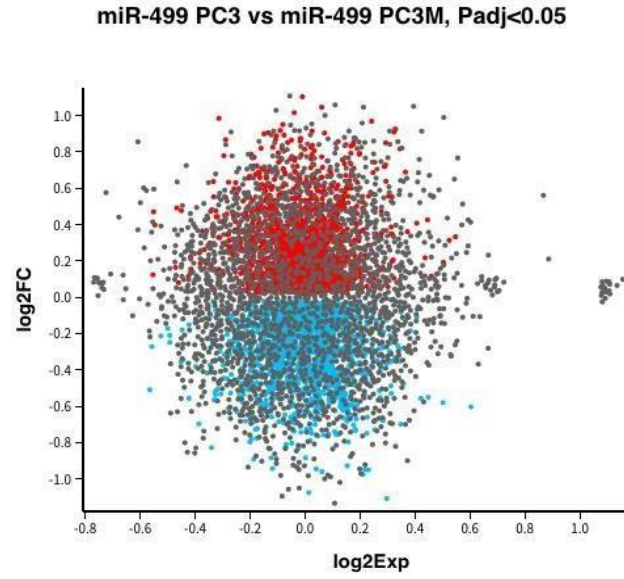
Şekil 12. IMOGA atlas uygulamasına göre dokularda miR-499-5p bulunurluğu ve etkileşimde olduğu gen hedefleri

Bununla beraber miR-499a-3p hedefi ise 512 öngörülen ve etkileşimi modellenen prostat dokusunda hedefe sahiptir. Prostat dokusunda miR-499a-3p hedefi oldukça yüksek oranda ifade edilmektedir. Kalp ve iskelet sistemindeki etkisi yüksektir. Deri, mide, serebral korteks ve tiroid dokusu prostat dokusu gibi yüksek etkileşim düzeyine sahiptir.

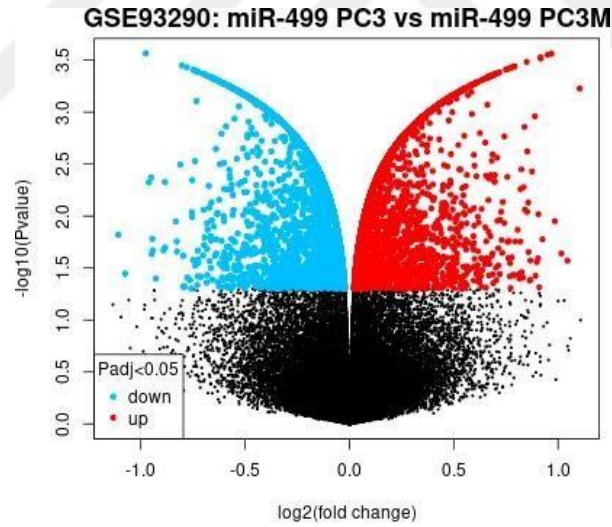


Şekil 13. IMOGA atlas uygulamasına göre dokularda miR-499-3p bulunurluğu ve etkileşimde olduğu gen hedefleri

Yapılan analizlerde miR499 transfeksiyonu yapılan PC3 hücrelerindeki değişen genler ortalama değişime uğrayan gen hedefleri için Şekil 12’de log 2 tabanında hesapsal gösterimle $p < 0,05$ için çizilmiştir. Aynı gen grubu miR499 transfeksiyonunun etkilediği gen gruplarının daha iyi ayrımı için log2 ve log10 tabanında yeniden değerlendirilmiş ve değişen gen ifadeleri azalan ve artan gen ifadeleri açısından modellenmiştir (Şekil 13).



Şekil 14. Log 2 tabanında farklı ifadesi görülen genlerin (artan kırmızı, azalan mavi) PC3 mir499 transfekte edilen hücrelerle PC3 metastatik (PC3 M) miR499 arasında ortalama ifade düzeylerinden her bir gen hedefi için karşılaştırılma yapılmıştır.

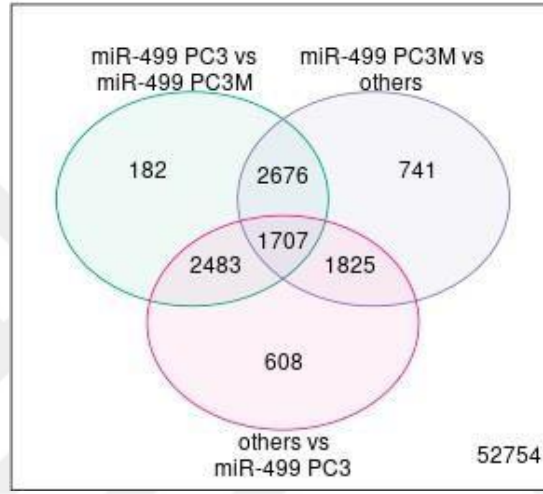


Şekil 15. Log 2 ve log 10 anlamlılık düzeyinde farklı ifadesi görülen genlerin (artan kırmızı, azalan mavi) PC3 dt ve miR499 arasında ortalama ifade düzeylerinden her bir gen için karşılaştırılmıştır.

Bu sonuçlara istinaden tüm anlamlı düzeyde değişim gösteren gen hedefleri için venn diagramı ile ortak değişim gösteren ve farklılık arz eden hedeflerin sayısı

tanımlanmıştır. İstatistiksel anlamlılık sınırında elde edilen venn şemasına göre 1707 hedef miR499 transfeksiyonundan bağımsız tüm değişimlerde ve doğal tip örneklerde değişim gösterirken, miR499 PC3 hücrelerinin metastatik PC3 hücrelerine nazaran miR499 transfeksiyonunda değişime uğrayan sadece 182 hedefi olduğu belirlenmiştir (Şekil 14).

Venn Diagram
GSE93290: limma, Padj<0.05



Şekil 16. miR499 etkisi ile değişen mRNA ifadelerinin PC3 dt ve PC3 metastatik hücrelerdeki etkisinin diğer hedeflere göre değişime uğrayan hedeflerin gösterimi.

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasının ilk kısmında PC3 prostat kanseri hücrelerinde temel olarak hücre sağkalımı ve ölümü kapsamında bir hücresel model oluşturulmuş ve bu kapsamda sağ kalım ve ölüm analizleri gerçekleştirilmiştir. Tezin ikinci kısmında ise mir499 hedefli olarak aynı hücre hattında gerçekleştirilen RNA sekanslama BioProject verisi incelenmiştir.

Kanser, dünya çapında tüm coğrafi bölgelerde insanların yaşamlarını ve halk sağlığını ciddi şekilde etkileyen kronik bir hastalıktır. Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı kısa bir süre önce kanser istatistiklerini yayınladı. Bu rapora göre 2012'de dünya çapında 14,1 milyon yeni kanser vakası, 8,4 milyon ölüm meydana geldi [72].

Kanserojen etkilere nedeni henüz tam olarak açıklığa kavuşturulmamış olmasına rağmen, kanserojen etkilere çoklu çevresel ve genetik faktörleri içeren karmaşık süreçler olduğunu gösteren giderek artan sayıda kanıt vardır. COVID-19 pandemisinin ardından kanser vakalarındaki değişim sayıları ise halen mevcut hesapsal yöntemlerle tam olarak ön görülemezle beraber, kanser görülme sıklığında pandemi nedeni ile artış beklenmektedir.

miRNA'lar, ökaryotlarda diğer genlerin ekspresyonunu düzenleyebilen ~ 19 ila 24 nükleotid RNA molekülleri olarak [44], çeşitli hücresel fonksiyonların düzenlenmesinde önemli bir rol oynayan moleküler hedeflerdir. Hücrelerde miRNA ifade düzeyi ile ilgili düzenin bozulması genellikle çeşitli hastalıklarla ilişkilidir. miRNA'lar bu nedenle kansere bağlı hedef gen ekspresyonunun ve yollarının düzenlenmesi yoluyla tümörjenezde önemli bir düzenleyici rol oynar. Çeşitli kanıtlar, miRNA'ların bağışıklık tepkilerine katılabileceğini göstermektedir; inflamatuvar tepkiler; enfeksiyonlar; ve hücresel metabolizma, büyüme ve göç [73].

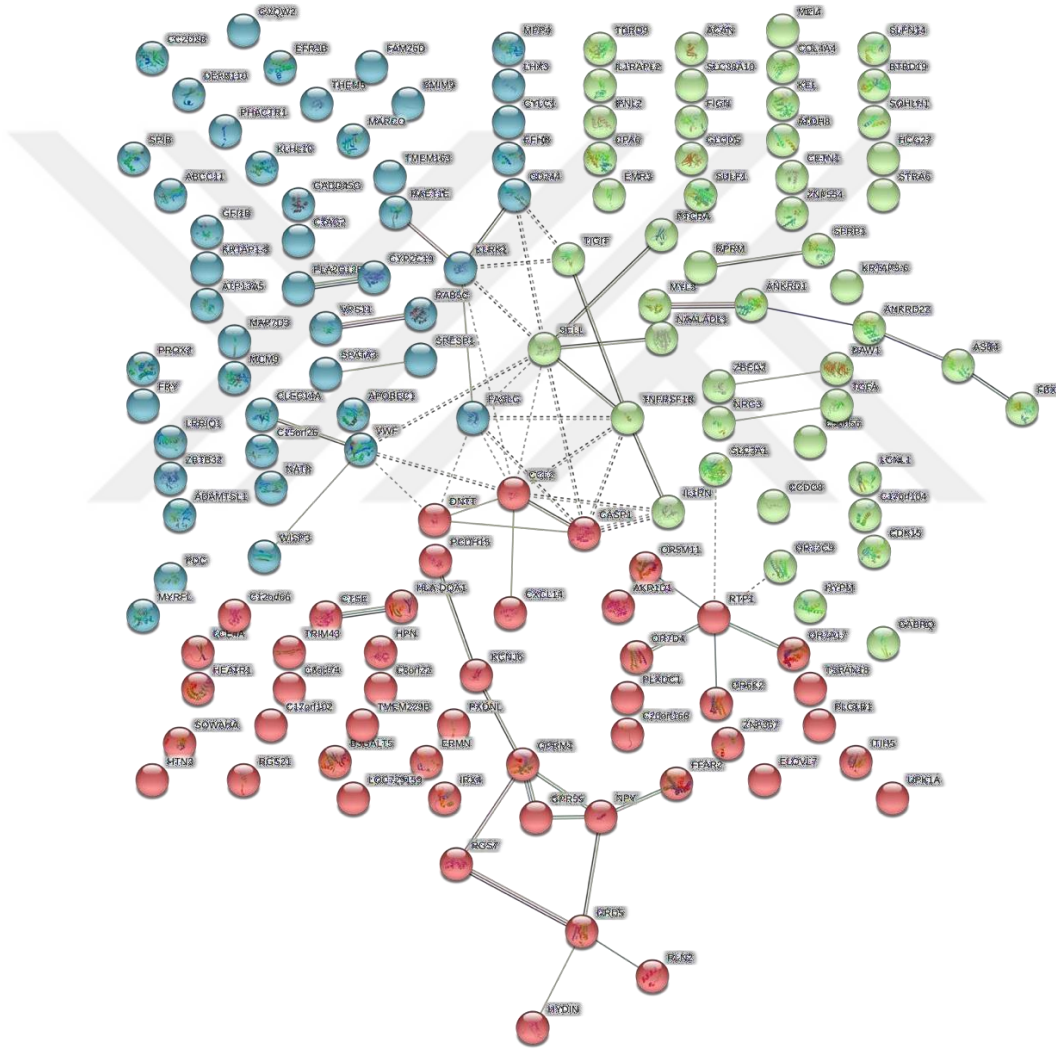
miR-499, özellikle kanser ve miyokard enfarktüsü gibi hipoksik-iskemik koşullar altında, birden fazla gen ve sinyal yollarını modüle ederek önemli transkripsiyon sonrası düzenleyici roller oynayan mikroRNA'lardan biridir[74][75] .[76] , miR-499'un FOXO4 ve PDCD4'ü hedefleyerek kolorektal kanser hücrelerinin metastazını teşvik edebileceğini ve miR-499'un kolorektal kanser için yeni bir potansiyel terapötik hedef olarak kabul edilebileceğini ifade etmiştir. Li vd. ayrıca miR-499'un VAV3'ü hedefleyerek küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde bir tümör baskılayıcı olarak işlev gördüğünü bulmuştur [77]. miR-499, WNT/ β -katenin sinyal yolu gibi çeşitli sinyal yollarıyla ilişkili bir moleküler hedef olarak hücre farklılaşması ve değişiminde önemli rollere sahiptir [78]. Wang ve ark.(2015), miR-499-5p seviyesinin aşağı düzenlenmesinin PTEN'i hedefleyerek PI3K / AKT / GSK sinyal yolunu ve glikojen sentezini bozduğunu ifade etmişlerdir.[79] Bu duruma paralel olarak Ando ve ark. (2014), miR-499'un tümör hedefli terapötik bir hedef olarak etkili olabileceğini ifade etmiştir.[75]

Eksosomal miR499 bu nedenle VAV etkileşimi ile endometrial kanserlerde terapötik özellikleri ile çalışılmıştır [80]. Ekzozomal miR-499'un endometriyal kanser hücrelerinin proliferasyonunu ve endotel hücre oluşumunu *in vitro* çalışmalar sonucunda inhibe ettiği gösterilmiştir. [80]Tümör hücresi çoğalması ve tümör anjiyogenezi, tümör büyümesi sürecindeki ana olaylardır. Bu bulgular, miR-499'un endometriyal kanserde anti-kanser fonksiyonunu daha da netleştirmektedir. miRNA'nın hedef mRNA'ların 3'UTR'lerine bağlanarak bir gen düzenleme etkisi uyguladığı iyi bilinmektedir. Böylece miR-499'un VAV3'ün 3'UTR dizisini hedefleyerek hücre proliferasyonunu baskılamaktadır[80]

Bu çalışma kapsamında miR433'ün prostat dokusundan ifade düzeyi tanımlanmış ve var olan GEO veri tabanı verilerinden türevlenen (GSM2450432) hedef genler üzerine araştırma yapılmıştır. Erişime açık olan bu veri setinde PC3 hücrelerine lipofektamin ile miR499 aktarılmış ve toplam RNA izole edilmiştir [81].Bu çalışmada birden fazla hücre hattı ele alınmış. Biz çalışmanın sadece PC3 dt ve PC3M hücre hatlarından elde edilen RNA sekans verisini filtreledik ve ardından miRNA hedefleri açısından miR499 transfeksiyonu sonrasındaki değişimleri istatistiksel sınırlılık değerinde ($p < 0,05$) tez içerisinde analiz ettik. Bu kapsamda COVID-19 dönemi öncesi hedefimiz p53 ifadesi

geriye kazandırılan PC3 hücrelerinde miR499'ün rolünü incelemektir. Ancak laboratuvarların kapatılması nedeni ile proje sadece in silico verilerin eldesi ile tamamlandı. 346 protein hedefine ait mRNA'nın miR499 transfeksiyonu sonrasında PC3 dt ve PC3M hücreleri arasında $p < 0,0001$ istatistiksel anlamlılık düzeyinde değiştiğini tespit ettik.

Bu kapsamda gerçekleştirilen çok protein hedefli STRING karşılaştırmasında 3 farklı düğüm halinde hedefler arasındaki potansiyel etkileşimlerden etkilenen yolları inceledik.



Şekil 17. STRING veri tabanında miR499 transfeksiyonu sonrasında PC3 dt ve PC3M hücreleri arasında değişim gösteren protein hedefleri ve etkileşim öngörülleri.

Bu etkileşim ağına göre merkezi rol oynama potansiyeli olan ve birden fazla etkileşime sahip bazı proteinler ilerdeki çalışmalarda miR499'un moleküler hedefleri açısından yeni bilgileri sağlama potansiyelindedir:

SELL L-selektin Hücre yüzeyi yapışma proteini. Periferik lenf düğümlerinde lenfositlerin yüksek endotelial venüllerin endotel hücrelerine yapışmasına aracılık eder. Endotelde lökositlerin ilk bağlanmasını ve yuvarlanmasını teşvik eder.

KLRK1 Katil hücre lektin benzeri reseptör alt ailesi K, üye 1; Otolog tümör hücrelerinin ve virüs bulaşmış hücrelerin yüzeyinde görüntülenen çeşitli hücrel stresle indüklenebilir ligandlara bağlanma üzerine immüno-gözetimde yer alan aktive edici ve kostimulatör bir reseptör olarak işlev görür. Aktive edilmiş öldürücü (NK) hücrelerde hem uyarıcı hem de uyarıcı doğuştan gelen bağışıklık tepkileri sağlayarak sitotoksik aktiviteye yol açar. CD8 (+) T hücresi aracılı adaptif bağışıklık yanıtlarında T hücresi aktivasyonunu güçlendirerek T hücre reseptörü (TCR) için bir kostimulatör reseptör görevi görür.

CD244 Katil hücre lektini Doğal öldürücü hücre reseptörü 2B4; Sinyal veren lenfositik aktivasyon molekülü (SLAM) ailesinin heterofilik reseptörü; ligandı CD48'dir. Homo-veya heterotipik hücre-hücre etkileşimleri tarafından tetiklenen SLAM reseptörleri, çok çeşitli immün hücrelerin aktivasyonunu ve farklılaşmasını modüle eder ve bu nedenle hem doğuştan hem de adaptif immün tepkisinin düzenlenmesinde ve birbirine bağlanmasında rol oynar. Aktiviteler, küçük sitoplazmik adaptör proteinleri, SH2D1A / SAP ve / veya SH2D1B / EAT-2'nin varlığı veya yokluğu ile kontrol edilir. Aktive edici doğal öldürücü (NK) hücre reseptörü görevi görür.

MYL3 Miyozin hafif zinciri 3; Düzenleyici hafif miyozin zinciri. Kalsiyum bağlamaz; EF-el alanı içerir

RTP1 Reseptör taşıyan protein 1; Spesifik olarak koku alma reseptörlerinin işlevsel hücre yüzeyi ekspresyonunu teşvik eder, ancak diğer GPCR'lerin değil; TMEM7 ailesine aittir.

OPRM1 Mu-tipi opioid reseptörü; Beta-endorfin ve endomorfın gibi endojen opioidler için reseptör. Morfin, eroin, DAMGO, fentanil, etorfin, buprenorfin ve metadonu içeren doğal ve sentetik opioidler için reseptör. Reseptöre agonist bağlanması, aktif olmayan bir GDP'ye bağlı heterotrimerik G-protein kompleksine

bağlanmayı ve ardından G-protein alfa alt biriminde GTP için GDP değişimini indükler ve bu da G-protein kompleksinin serbest GTP'ye bağlı G proteini ile ayrılmasına yol açar alfa ve G-protein beta-gama dimer, aşağı akış hücresel efektörleri aktive eder.

GPR55 G-protein bağlı reseptör 55; Enflamatuar ve nöropatik ağrı ile ilişkili hiperaljezide rol oynayabilir (benzerlik ile). L-alfa-lizofosfatidilinositol (LPI) için reseptör. LPI, heterotrimerik G proteini GNA13 ve RHOA yoluyla hücre içi depolardan Ca (2+) salımını indükler. Varsayılan kanabinoid reseptörü. Osteoklast sayısını ve fonksiyonunu düzenleyerek kemik fizyolojisinde rol oynayabilir.

DRD5 D (1B) dopamin reseptörü; Aktivitesi adenilil siklazı aktive eden G proteinlerinin aracılık ettiği dopamin reseptörü; G-protein bağlı reseptör 1 ailesine aittir.

NPY Pro-nöropeptid Y; NPY, beslenmenin kontrolünde ve gonadotrofin salgılama hormonunun salgılanmasında rol oynar; NPY ailesine aittir.

CASP1 Kaspaz-1; IL-1 beta'yı bir Asp ve bir Ala arasında bölen tiyol proteaz, çeşitli enflamatuar süreçlerde yer alan uygun sitokini serbest bırakır. Patojenlere karşı savunma için önemlidir. Sterol düzenleyici eleman bağlayıcı proteinleri (SREBP'ler) böler ve aktive eder. Apoptozu da teşvik edebilir. Enflamasom aktivasyonu üzerine, DNA virüsü enfeksiyonu sırasında, ancak RNA virüsü yüklemesi sırasında, MB21D1 / cGAS'ın bölünmesi yoluyla antiviral bağışıklığı kontrol ederek onu inaktif hale getirir; Peptidaz C14A ailesine aittir.

FASL Tumor nekroz faktörü ligand üst aile üyesi 6; Apoptotik sinyali hücrelere dönüştüren bir reseptör olan TNFRSF6 / FAS'a bağlanan sitokin. Sitotoksik T hücresi aracılı apoptoz, doğal öldürücü hücre aracılı apoptoz ve T hücresi gelişiminde rol oynar. Bağışıklık tepkilerinin sonlandırılmasına katkıda bulunan antijenle aktive olan T hücrelerinde kardeş öldürücü / intihar aktivasyonunun neden olduğu hücre ölümünü (AICD) başlatır (benzerlik ile). TNFRSF6 / FAS aracılı apoptoz, periferik toleransın indüksiyonunda da rol oynar (benzerlikle).

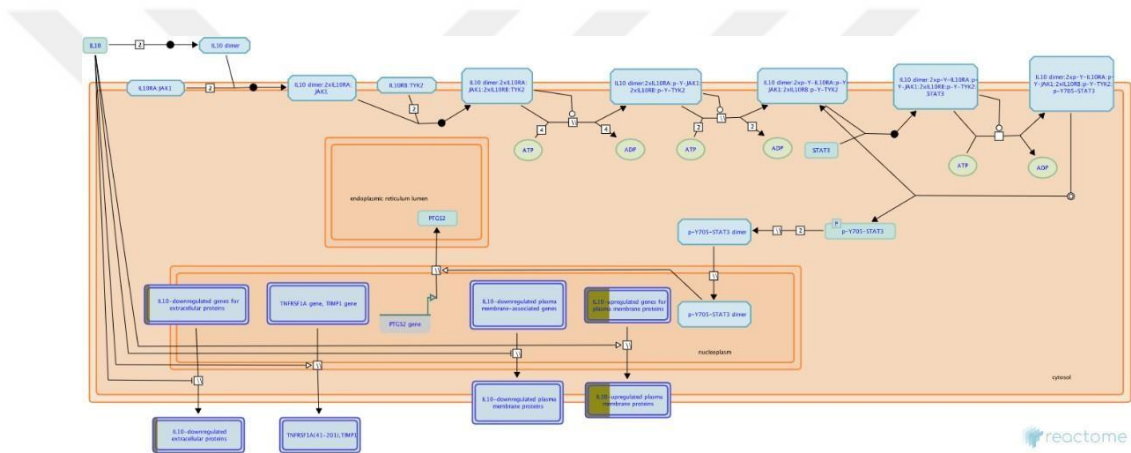
TNFRSF1B Tümör nekroz faktörü reseptörü üst aile üyesi 1B; TNFSF2 / TNF-alfa için yüksek afiniteye ve homotrimerik TNFSF1 / lenfotoksin-alfa için yaklaşık 5 kat daha düşük afiniteye sahip reseptör. TRAF1 / TRAF2 kompleksi apoptotik

baskılayıcılar BIRC2 ve BIRC3'ü TNFRSF1B / TNFR2'ye dahil eder. Bu reseptör, TNF-alfa'nın metabolik etkilerinin çoğuna aracılık eder. İzofrom 2, TNF-alfa ile indüklenen apoptozu bloke eder; bu, biyolojik aktivitesini antagonize ederek TNF-alfa fonksiyonunu düzenlediğini gösterir;

Tüm bu hedefler STRING veri tabanında tüm genom, ilaç hedefleri ve kinaz hedefleri olarak kümelenme sonucunda merkezi rol oynayan hedefler olarak miR499 ifadesindeki değişimin metastatik ve normal PC3 hücrelerindeki rolüne yeni bir yaklaşım sağlamaktadır. EK1. de etkilenen tüm reactome hedefleri gösterilmektedir.

Buna göre en çok etkilenen sinyal yolları sırası ile incelenmiştir.

Interlökin 10 sinyal yolağı:



Interleukin-10 (IL10), orijinal olarak T-yardımcı (Th) 1 aktivasyonunu ve Th1 sitokin üretimini inhibe eden sitokin sentezi inhibe edici faktör olarak adlandırılan bir faktör olarak tanımlanmıştır [82]. Makrofajlar, dendritik hücre alt kümeleri, B hücreleri, Th2 ve T düzenleyici hücreler (Tregs) ve Natural Killer (NK) hücreleri [83]. Artık IL10'un biyolojik etkilerinin makrofajlar ve dendritik hücreler (DC'ler) gibi antijen sunan hücrelere (APC'ler) yönlendirildiği, T hücre gelişimi ve farklılaşması üzerindeki etkilerinin büyük ölçüde makrofaj / dendritik inhibisyonu yoluyla dolaylı olduğu kabul edilmektedir. hücre aktivasyonu ve olgunlaşması[84],[85]. T hücrelerinin IL10'un ana kaynağı olduğu düşünülmektedir[86]. IL10, monokin sentezi, NO üretimi ve sınıf II MHC'nin ekspresyonunu ve IL12 ve CD80 / CD86 gibi kostimülatör molekülleri içeren geniş bir aktive makro-faj / monosit fonksiyonları spektrumunu inhibe eder [87],[88]. Rekombinant sitokin ve nötralize edici antikorlarla yapılan çalışmalar, IL10'un B, T ve mast hücreleri üzerindeki pleiotropik aktivitelerini ortaya çıkardı [89],

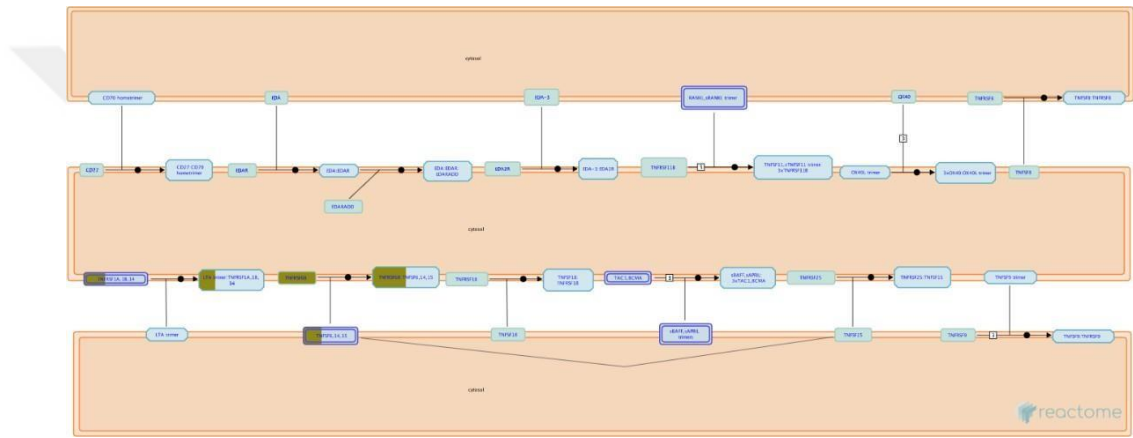
[90], [91]ve in vivo IL10 aktivitelerinin önemi[91]. IL10, MHC sınıf II ve ko-uyarıcı moleküller CD80 / CD86'nın ekspresyonunu ve ayrıca pro-inflamatuar sitokinler IL1Beta, IL6, IL8, TNFalpha ve özellikle IL12'yi antagonize eder (Fiorentino ve diğerleri 1991, D'Andrea ve diğerleri 1993) . IL10'un biyolojik rolü, APC'lerin inaktivasyonu ile sınırlı değildir, ayrıca B hücresi, granülosit, mast hücresi ve keratinosit büyümesi / farklılaşmasının yanı sıra NK hücresi ve CD8 + sitotoksik T hücresi aktivasyonunu da artırır (Moore et al. 2001, Hedrich & Bream 2010). IL10 ayrıca NK hücre proliferasyonunu ve / veya IFN-gama üretimini artırır (Cai ve arkadaşları 1999). IL10 eksikliği olan fareler, enflamatuar bağırsak hastalığı (IBD) ve diğer abartılı enflamatuar yanıtlar sergiledi (Kuhn ve arkadaşları 1993, Berg ve al. 1995) IL10'un yanıcı tepkilerin sınırlandırılmasında kritik bir rolü olduğunu gösterir. IL10'un düzensizliği, insanlarda ve fare modellerinde çok sayıda bulaşıcı ve otoimmün hastalığa duyarlılıkla bağlantılıdır [86].

IL10'dan yoksun fareler, iltihaplı bağırsak hastalığı (IBD) ve diğer abartılı iltihap tepkileri sergiledi (Kuhn ve diğerleri, 1993, Berg ve diğerleri, 1995), bu da IL10'un iltihaplı tepkileri sınırlamada kritik bir rol oynadığını göstermektedir. IL10'un düzensizliği, insanlarda ve fare modellerinde çok sayıda bulaşıcı ve otoimmün hastalığa duyarlılıkla bağlantılıdır[86].

IL10 sinyali, homodimerik IL10'un, iki IL10RA molekülüne bağlanan hücre dışı alanlarına bağlanmasıyla başlatılır. Bu tetramer daha sonra iki IL10RB zincirine bağlanır. IL10RB, IL10RA'ya bağlanmadıkça IL10'a bağlanamaz (Ding ve diğerleri 2001, Yoon ve diğerleri 2006)[88]; IL10RB'nin birlikte mevcudiyeti olmaksızın IL10'un IL10RA'ya bağlanması sinyal transdüksiyonunu başlatmada başarısız olur [92]. IL10 bağlanması, sırasıyla IL10R1 ve IL10R2'ye yapısal olarak bağlanan reseptörle ilişkili Janus tirozin kinazları, JAK1 ve TYK2'yi aktive eder. Reseptör kompleksinin reseptör aktivasyon düzeneğinin klasik modelinde, JAK1 / TYK2'nin birbirini fosforile etmesini ve aktive etmesini sağladığına inanılmaktadır. Alternatif olarak, IL10'un bağlanması, bir JAK kinazın psödokinaz inhibe edici alanının, reseptör dimer-JAK kompleksi içindeki diğer JAK'ın kinaz alanından uzaklaşmasına izin veren konformasyonel değişikliklere neden olabilir, bu da iki kinaz alanının etkileşime girmesine ve trans-aktif olmasına izin verir [93]. Aktive edilmiş JAK kinazlar, IL10R1 zincirlerinin hücre içi alanlarını spesifik tirozin kalıntıları üzerinde fosforile

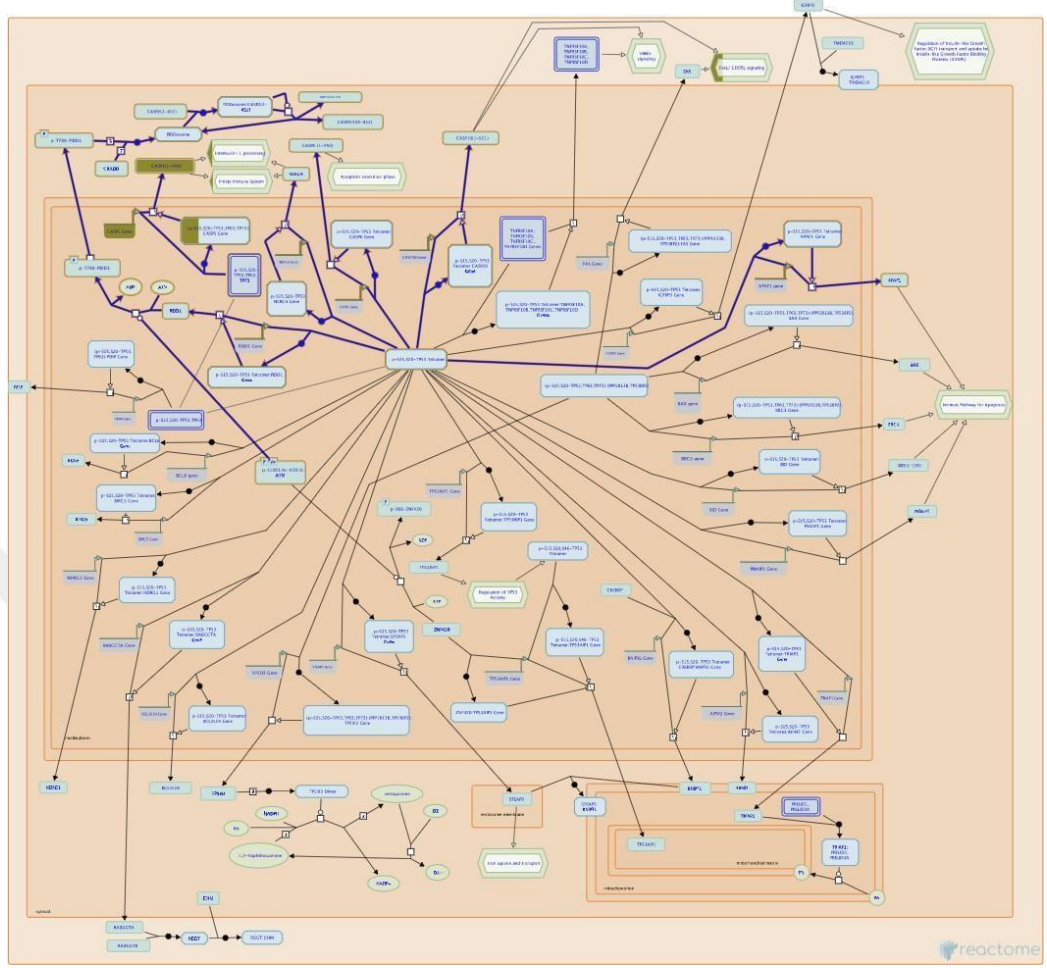
eder. Bu fosforile tirozin tortuları ve bunların komşu peptit sekansları, gizli, sitozolik, transkripsiyon faktörü, STAT3 için geçici yerleştirme yerleri olarak hizmet eder. STAT3, IL10R1 zincirine SH2 alanı yoluyla geçici olarak kenetlenir ve karşılığında reseptörle ilişkili JAK'lar tarafından tirozin fosforile edilir. Aktive edildikten sonra reseptörden ayrışır, diğer STAT3 molekülleri ile dimerize olur ve IL-10 ile indüklenabilir genlerin promoterlerinde STAT bağlayıcı elementlere (SBE'ler) yüksek afinite ile bağlandığı çekirdeğe yer değiştirir [88].

TNF'ler fizyolojik reseptörlerini bağlar



Tümör nekroz faktörü süper ailesinin (TNFSF) ve TNF reseptör süper ailesinin (TNFRSF) üyeleri, hem doğuştan gelen hem de adaptif bağışıklıkta önemli rollere sahiptir. Bu üyeler, septik şoktan otoimmün bozukluklara, allogreft reddine ve kansere kadar çeşitli kazanılmış veya genetik insan hastalıklarında rol oynamaktadır[94] .

TP53, Kaspaz Aktivatörlerinin ve Kaspazlarının Transkripsiyonunu Düzenler



TP53 (p53), APAF1, PIDD1 gibi sitozolik kaspaz aktivatörlerini transkripsiyonel olarak düzenler ve NLRC4 ve CASP1, CASP6 ve CASP10 gibi kaspazların kendileri. Bu kaspazlar ve ac-tivatörler, intrinsik apoptoz yolunda veya ekstrinsik apoptoz yolunda yer alır. ölüm reseptörleri veya iltihapla hücre ölümü piroptozuyla tetiklenen[95],[96],[97],[98],[99],[100],[101],[102],[103].

Reactome verilerinde sınırlı protein hedefi için hedef değişime uğrayabilecek sinyal kaskadları değerlendirilmiştir (Ek 1.). Analizlerde yer almayan uzun kodlama yapmayan RNA lar (lnc-RNA) miR499 etkileşimde olabilecek diğer kodlama yapmayan hedeflerin önemli olabileceğini göstermektedir (Ek 2).

Tez kapsamında hem *in vitro* hücre modeli üzerinde çalışma deneyimi edinilmiştir. Ayrıca *in silico* verilerin farklı sinyal yolları açısından çalışılabilmesine yönelik kapsamlı bir inceleme yapılmıştır. Bu durumda tez kapsamında elde edilen tüm veriler p53'ün miR499 için önemli bir hedef olduğu yönünde *in silico* kanıtlar sağlamıştır. PC3 hücrelerinin p53'den yoksun olmasının miR499 biyogenezindeki öneminin araştırılması önemlidir.



6. KAYNAKÇA

- [1] D. J. Riordan, “Early history of cancer,” *Ir. J. Med. Sci.*, vol. 24, no. 2, pp. 79–84, 1949, doi: 10.1007/BF02950469.
- [2] N. G. Zaorsky *et al.*, “Causes of death among cancer patients,” *Ann. Oncol.*, vol. 28, no. 2, pp. 400–407, 2017, doi: 10.1093/annonc/mdw604.
- [3] S. M. Zingde, “Cancer genes,” *Curr. Sci.*, vol. 81, no. 5, pp. 508–514, 2001, doi: 10.1007/978-1-59259-125-1_3.
- [4] S. W. Lowe, E. Cepero, and G. Evan, “Intrinsic tumour suppression,” *Nature*, vol. 432, no. 7015, pp. 307–315, 2004, doi: 10.1038/nature03098.
- [5] K. Macleod, “Tumor suppressor genes,” *Curr. Opin. Genet. Dev.*, vol. 10, no. 1, pp. 81–93, 2000, doi: 10.1016/S0959-437X(99)00041-6.
- [6] G. Lamberti, E. Andrini, M. Sisi, A. Di Federico, and B. Ricciuti, “Targeting DNA damage response and repair genes to enhance anticancer immunotherapy: Rationale and clinical implication,” *Futur. Oncol.*, vol. 16, no. 23, pp. 1751–1766, 2020, doi: 10.2217/fon-2020-0215.
- [7] T. Lindahl, “Instability and decay of the primary structure of DNA,” *Nature*, vol. 362, no. 6422, pp. 709–715, Apr. 1993, doi: 10.1038/362709a0.
- [8] A. Ronen and B. W. Glickman, “Human DNA repair genes,” *Environ. Mol. Mutagen.*, vol. 37, no. 3, pp. 241–283, 2001, doi: 10.1002/em.1033.
- [9] A. Norman, “On the origin of cancer foci,” *Cancer*, vol. 5, no. 3, pp. 581–582, 1952, doi: 10.1002/1097-0142(195205)5:3<581::AID-CNCR2820050319>3.0.CO;2-Q.
- [10] D. Hanahan and R. A. Weinberg, “Hallmarks of cancer: The next generation,” *Cell*, vol. 144, no. 5, pp. 646–674, 2011, doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- [11] C. B. Blackadar, “Historical review of the causes of cancer,” *World J. Clin.*

- Oncol.*, vol. 7, no. 1, pp. 54–86, 2016, doi: 10.5306/wjco.v7.i1.54.
- [12] C. Mattiuzzi and G. Lippi, “Current Cancer Epidemiology glossary,” *J. Epidemiol. Glob. Health*, vol. 9, no. 4, pp. 217–222, 2019.
- [13] NIH, “Cancer Statistics,” 2020. <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/statistics>.
- [14] S. J. Henley *et al.*, “Annual report to the nation on the status of cancer, part I: National cancer statistics,” *Cancer*, vol. 126, no. 10, pp. 2225–2249, 2020, doi: 10.1002/cncr.32802.
- [15] E. A. Golemis *et al.*, “Molecular mechanisms of the preventable causes of cancer in the United States,” *Genes Dev.*, vol. 32, no. 13–14, pp. 868–902, 2018, doi: 10.1101/gad.314849.118.
- [16] B. N. Ames, L. S. Gold, and W. C. Willett, “The causes and prevention of cancer,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 92, no. 12, pp. 5258–5265, 1995, doi: 10.1073/pnas.92.12.5258.
- [17] A. Adjiri, “Identifying and Targeting the Cause of Cancer is Needed to Cure Cancer,” *Oncol. Ther.*, vol. 4, no. 1, pp. 17–33, 2016, doi: 10.1007/s40487-015-0015-6.
- [18] national cancer institute(NCI) &national institute of environmental health science (NIEHS), “What You Need to Know What You Can Do,” p. 46, 2004.
- [19] G. A. Colditz, K. Y. Wolin, and S. Gehlert, “Applying What We Know to Accelerate Cancer Prevention,” *Sci. Transl. Med.*, vol. 4, no. 127, pp. 127rv4–127rv4, Mar. 2012, doi: 10.1126/scitranslmed.3003218.
- [20] N. Parsa, “Environmental factors inducing human cancers,” *Iran. J. Public Health*, vol. 41, no. 11, pp. 1–9, 2012.
- [21] A. Sbtox *et al.*, Exposure to carcinogens and work-related cancer: A review of assessment methods European Risk Observatory Report European Agency for Safety and Health at Work European Agency for Safety and Health at Work Exposure to carcinogens and work-related cancer: A, vol. 388, no. 10053. 2016.
- [22] S. Bingham, *Carcinogens and Anticarcinogens in the Human Diet*, vol. 313, no. 7050. 1996.

- [23] E. S. Gilbert, “Ionising radiation and cancer risks: What have we learned from epidemiology?,” *Int. J. Radiat. Biol.*, vol. 85, no. 6, pp. 467–482, 2009, doi: 10.1080/09553000902883836.
- [24] N. Vandeven and P. Nghiem, “Pathogen-driven cancers and emerging immune therapeutic strategies,” *Cancer Immunol. Res.*, vol. 2, no. 1, pp. 9–14, 2014, doi: 10.1158/2326-6066.CIR-13-0179.
- [25] L. Dalton-Griffin and P. Kellam, “Infectious causes of cancer and their detection,” *J. Biol.*, vol. 8, no. 7, pp. 1–5, 2009, doi: 10.1186/jbiol168.
- [26] S. W. D. Merriel, G. Funston, and W. Hamilton, “Prostate Cancer in Primary Care,” *Adv. Ther.*, vol. 35, no. 9, pp. 1285–1294, 2018, doi: 10.1007/s12325-018-0766-1.
- [27] G. Wang, D. Zhao, D. J. Spring, and R. A. Depinho, “Genetics and biology of prostate cancer,” *Genes Dev.*, vol. 32, no. 17–18, pp. 1105–1140, 2018, doi: 10.1101/gad.315739.118.
- [28] W. You and M. Henneberg, “Prostate cancer incidence is correlated to total meat intake- A cross-national ecologic analysis of 172 countries,” *Asian Pacific J. Cancer Prev.*, vol. 19, no. 8, pp. 2229–2239, 2018, doi: 10.22034/APJCP.2018.19.8.2229.
- [29] R. Sinha *et al.*, “Meat and meat-related compounds and risk of prostate cancer in a large prospective cohort study in the United States,” *Am. J. Epidemiol.*, vol. 170, no. 9, pp. 1165–1177, 2009, doi: 10.1093/aje/kwp280.
- [30] R. Montironi *et al.*, “Narrative review of prostate cancer grading systems: Will the Gleason scores be replaced by the grade groups?,” *Transl. Androl. Urol.*, vol. 10, no. 3, pp. 1530–1540, 2021, doi: 10.21037/tau-20-853.
- [31] M. Al Qadire, M. Alkhalaileh, and M. ALBashtawy, “Lifestyle and Dietary Factors and Prostate Cancer Risk: A Multicentre Case-Control Study,” *Clin. Nurs. Res.*, vol. 28, no. 8, pp. 992–1008, 2019, doi: 10.1177/1054773818757311.
- [32] M. Adela Hruby, PhD and M. Frank B. Hu, MD, PhD, “The Epidemiology of Obesity: A Big Picture,” *Pharmacoeconomics.*, vol. 33, no. 7, pp. 673–689,

2015, doi: 10.1007/s40273-014-0243-x.The.

- [33] P. Sharma, K. Zargar-Shoshtari, and J. M. Pow-Sang, “Biomarkers for prostate cancer: Present challenges and future opportunities,” *Futur. Sci. OA*, vol. 2, no. 1, 2016, doi: 10.4155/fso.15.72.
- [34] A. Atan and Ö. Güzel, “How should prostate specific antigen be interpreted?,” *Turk Urol. Derg.*, vol. 39, no. 3, pp. 188–193, 2013, doi: 10.5152/tud.2013.038.
- [35] M. Langlois and V. Blaton, “Psa and Other Biomarkers for Early Detection, Diagnosis and Monitoring of Prost a Te Cancer.,” *Ejifcc*, vol. 16, no. 2, pp. 48–56, 2005.
- [36] J. L. Descotes, “Diagnosis of prostate cancer,” *Asian J. Urol.*, vol. 6, no. 2, pp. 129–136, 2019, doi: 10.1016/j.ajur.2018.11.007.
- [37] J. Tkac *et al.*, “Prostate-specific antigen glycoprofiling as diagnostic and prognostic biomarker of prostate cancer,” *Interface Focus*, vol. 9, no. 2, 2019, doi: 10.1098/rsfs.2018.0077.
- [38] D. Karley, D. Gupta, and A. Tiwari, “Biomarker for Cancer: A great Promise for Future,” *World J. Oncol.*, vol. 2, no. 4, pp. 151–157, 2011, doi: 10.4021/wjon352w.
- [39] S. Mehta *et al.*, “Predictive and prognostic molecular markers for cancer medicine,” *Ther. Adv. Med. Oncol.*, vol. 2, no. 2, pp. 125–148, 2010, doi: 10.1177/1758834009360519.
- [40] A. V Alford, J. M. Brito, K. K. Yadav, S. S. Yadav, A. K. Tewari, and J. Renzulli, “The Use of Biomarkers in Prostate Cancer Screening and Treatment.,” *Rev. Urol.*, vol. 19, no. 4, pp. 221–234, 2017, doi: 10.3909/riu0772.
- [41] C. O. Madu and Y. Lu, “Novel diagnostic biomarkers for prostate cancer,” *J. Cancer*, vol. 1, no. 1, pp. 150–177, 2010, doi: 10.7150/jca.1.150.
- [42] V. Pagliarulo, “Androgen deprivation therapy for prostate cancer,” *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 1126, no. 2, pp. 1–30, 2018, doi: 10.1007/978-3-319-99286-0_1.
- [43] L. Egevad, B. Delahunt, J. R. Srigley, and H. Samaratunga, “International

- Society of Urological Pathology (ISUP) grading of prostate cancer – An ISUP consensus on contemporary grading,” *Apmis*, vol. 124, no. 6, pp. 433–435, 2016, doi: 10.1111/apm.12533.
- [44] L.-A. MacFarlane and P. R. Murphy, “MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer,” *Curr. Genomics*, vol. 11, no. 7, pp. 537–561, 2010, doi: 10.2174/138920210793175895.
 - [45] R. Feinbaum, V. Ambros, and R. Lee, “The *C. elegans* Heterochronic Gene *lin-4* Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to *lin-14*,” *Cell*, vol. 116, no. 116, pp. 843–854, 2004.
 - [46] D. M. Niu *et al.*, “A common *SCN5A* polymorphism attenuates a severe cardiac phenotype caused by a nonsense *SCN5A* mutation in a Chinese family with an inherited cardiac conduction defect,” *J. Med. Genet.*, vol. 43, no. 10, pp. 817–821, 2006, doi: 10.1136/jmg.2006.042192.
 - [47] Y. Lee *et al.*, “MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II,” *EMBO J.*, vol. 23, no. 20, pp. 4051–4060, 2004, doi: 10.1038/sj.emboj.7600385.
 - [48] J. Chahal *et al.*, “MIR-122 and Ago interactions with the HCV genome alter the structure of the viral 5′ terminus,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 47, no. 10, pp. 5307–5324, 2019, doi: 10.1093/nar/gkz194.
 - [49] J. Boele *et al.*, “PAPD5-mediated 3′ adenylation and subsequent degradation of miR-21 is disrupted in proliferative disease,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 111, no. 31, pp. 11467–11472, 2014, doi: 10.1073/pnas.1317751111.
 - [50] D. P. Bartel, “Metazoan MicroRNAs,” *Cell*, vol. 173, no. 1, pp. 20–51, 2016, doi: 10.1016/j.cell.2018.03.006.Metazoan.
 - [51] J. O’Brien, H. Hayder, Y. Zayed, and C. Peng, “Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation,” *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, vol. 9, no. AUG, pp. 1–12, 2018, doi: 10.3389/fendo.2018.00402.
 - [52] P. J. Dexheimer and L. Cochella, “MicroRNAs: From Mechanism to Organism,” *Front. Cell Dev. Biol.*, vol. 8, no. June, pp. 1–18, 2020, doi: 10.3389/fcell.2020.00409.
 - [53] J. Shu, B. V. Resende E Silva, T. Gao, Z. Xu, and J. Cui, “Dynamic and

- modularized MicroRNA regulation and its implication in human cancers,” *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–17, 2017, doi: 10.1038/s41598-017-13470-5.
- [54] H. L. Yao *et al.*, “Construction of miRNA-target networks using microRNA profiles of CVB3-infected HeLa cells,” *Sci. Rep.*, vol. 9, no. 1, pp. 2–9, 2019, doi: 10.1038/s41598-019-54188-w.
- [55] J. A. Vidigal and A. Ventura, “The biological functions of miRNAs: lessons from in vivo studies An elusive role for microRNAs,” *Trends Cell Biol.*, vol. 25, no. 3, pp. 137–147, 2014, doi: 10.1016/j.tcb.2014.11.004.The.
- [56] N. Ghorbanmehr, S. Gharbi, E. Korsching, M. Tavallaei, B. Einollahi, and S. J. Mowla, “miR-21-5p, miR-141-3p, and miR-205-5p levels in urine—promising biomarkers for the identification of prostate and bladder cancer,” *Prostate*, vol. 79, no. 1, pp. 88–95, 2019, doi: 10.1002/pros.23714.
- [57] I. A. Asangani *et al.*, “MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pdc4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer,” *Oncogene*, vol. 27, no. 15, pp. 2128–2136, 2008, doi: 10.1038/sj.onc.1210856.
- [58] N. Anastasov *et al.*, “Radiation resistance due to high expression of miR-21 and G2/M checkpoint arrest in breast cancer cells,” *Radiat. Oncol.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–12, 2012, doi: 10.1186/1748-717X-7-206.
- [59] R. Kumarswamy, I. Volkmann, and T. Thum, “Regulation and function of miRNA-21 in health and disease,” *RNA Biol.*, vol. 8, no. 5, pp. 706–713, 2011, doi: 10.4161/rna.8.5.16154.
- [60] T. Role, N. Rnas, M. Mechanism, and P. Cancer, “PROSTAT KANSERİ MOLEKÜLER MEKANİZMASINDA KODLANMAYAN RNA ’LARIN ROLÜ,” vol. 7, no. 3, pp. 299–306, 2019.
- [61] O. Balacescu, R. G. Dumitrescu, and C. Marian, “MicroRNAs role in prostate cancer,” *Methods Mol. Biol.*, vol. 1856, pp. 103–117, 2018, doi: 10.1007/978-1-4939-8751-1_6.
- [62] A. A. Moustafa, H. Kim, R. S. Albeltagy, O. H. El-Habit, and A. B. Abdel-Mageed, “MicroRNAs in prostate cancer: From function to biomarker

- discovery,” *Exp. Biol. Med.*, vol. 243, no. 10, pp. 817–825, 2018, doi: 10.1177/1535370218775657.
- [63] X. Song, Y. Li, X. Cao, and Y. Qi, “MicroRNAs and Their Regulatory Roles in Plant-Environment Interactions,” *Annu. Rev. Plant Biol.*, vol. 70, pp. 489–525, 2019, doi: 10.1146/annurev-arplant-050718-100334.
- [64] S. He *et al.*, “Exosomal miR-499a-5p promotes cell proliferation, migration and EMT via mTOR signaling pathway in lung adenocarcinoma,” *Exp. Cell Res.*, vol. 379, no. 2, pp. 203–213, 2019, doi: 10.1016/j.yexcr.2019.03.035.
- [65] A. Mao *et al.*, “MicroRNA-449a enhances radiosensitivity by downregulation of c-Myc in prostate cancer cells,” *Sci. Rep.*, vol. 6, no. June, pp. 1–13, 2016, doi: 10.1038/srep27346.
- [66] F. Navarro and J. Lieberman, “miR-34 and p53: New insights into a complex functional relationship,” *PLoS One*, vol. 10, no. 7, pp. 1–23, 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0132767.
- [67] R. Słotwiński, G. Lech, and S. M. Słotwińska, “MicroRNAs in pancreatic cancer diagnosis and therapy,” *Cent. Eur. J. Immunol.*, vol. 43, no. 3, pp. 314–324, 2018, doi: 10.5114/ceji.2018.80051.
- [68] S. Kaur, M. J. Baine, M. Jain, A. R. Sasson, and S. K. Batra, “Early diagnosis of pancreatic cancer: Challenges and new developments,” *Biomark. Med.*, vol. 6, no. 5, pp. 597–612, 2012, doi: 10.2217/bmm.12.69.
- [69] G. Bertoli, C. Cava, and I. Castiglioni, “MicroRNAs as biomarkers for diagnosis, Prognosis and theranostics in prostate cancer,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 17, no. 3, 2016, doi: 10.3390/ijms17030421.
- [70] Y. Li, Z. Yin, J. Fan, S. Zhang, and W. Yang, “The roles of exosomal mirnas and lncrnas in lung diseases,” *Signal Transduct. Target. Ther.*, vol. 4, no. 1, 2019, doi: 10.1038/s41392-019-0080-7.
- [71] C. J. Song, H. Chen, L. Z. Chen, G. M. Ru, J. J. Guo, and Q. N. Ding, “The potential of microRNAs as human prostate cancer biomarkers: A meta-analysis of related studies,” *J. Cell. Biochem.*, vol. 119, no. 3, pp. 2763–2786, 2018, doi: 10.1002/jcb.26445.

- [72] L. A. Torre, F. Bray, R. L. Siegel, J. Ferlay, J. Lortet-Tieulent, and A. Jemal, "Global cancer statistics, 2012," *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 65, no. 2, pp. 87–108, 2015, doi: 10.3322/caac.21262.
- [73] J. Liu, S. F. Jennings, W. Tong, and H. Hong, "Next generation sequencing for profiling expression of miRNAs: technical progress and applications in drug development," *J. Biomed. Sci. Eng.*, vol. 04, no. 10, pp. 666–676, 2011, doi: 10.4236/jbise.2011.410083.
- [74] K. D. Wilson *et al.*, "Dynamic MicroRNA expression programs during cardiac differentiation of human embryonic stem cells: Role for miR-499," *Circ. Cardiovasc. Genet.*, vol. 3, no. 5, pp. 426–435, 2010, doi: 10.1161/CIRCGENETICS.109.934281.
- [75] H. Ando *et al.*, "Advanced cancer therapy by integrative antitumor actions via systemic administration of miR-499," *J. Control. Release*, vol. 181, no. 1, pp. 32–39, 2014, doi: 10.1016/j.jconrel.2014.02.019.
- [76] X. Liu *et al.*, "MicroRNA-499-5p promotes cellular invasion and tumor metastasis in colorectal cancer by targeting FOXO4 and PDCD4," *Carcinogenesis*, vol. 32, no. 12, pp. 1798–1805, 2011, doi: 10.1093/carcin/bgr213.
- [77] M. Li, S. Zhang, N. Wu, L. Wu, C. Wang, and Y. Lin, "Overexpression of miR-499-5p inhibits non-small cell lung cancer proliferation and metastasis by targeting VAV3," *Sci. Rep.*, vol. 6, no. February, pp. 1–10, 2016, doi: 10.1038/srep23100.
- [78] L. lu Zhang *et al.*, "MiR-499 induces cardiac differentiation of rat mesenchymal stem cells through wnt/ β -catenin signaling pathway," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 420, no. 4, pp. 875–881, 2012, doi:10.1016/j.bbrc.2012.03.092.
- [79] L. Wang, N. Zhang, H. P. Pan, Z. Wang, and Z. Y. Cao, "MiR-499-5p contributes to hepatic insulin resistance by suppressing PTEN," *Cell. Physiol. Biochem.*, vol. 36, no. 6, pp. 2357–2365, 2015, doi: 10.1159/000430198.
- [80] L. Jing, X. Hua, D. Yuanna, Z. Rukun, and M. Junjun, "Exosomal mir-499a-5p inhibits endometrial cancer growth and metastasis via targeting vav3," *Cancer Manag. Res.*, vol. 12, pp. 13541–13552, 2020, doi: 10.2147/CMAR.S283747.

- [81] X. Yang, X. Li, and B. Zhou, "A meta-analysis of miR-499 rs3746444 polymorphism for cancer risk of different systems: Evidence from 65 case-control studies," *Front. Physiol.*, vol. 9, no. JUN, pp. 1–14, 2018, doi: 10.3389/fphys.2018.00737.
- [82] J. K. Lacki and K. E. Wiktorowicz, "Biological properties of interleukin 10," *Postpy Hig. i Med. doświadczalnej*, vol. 48, no. 4, pp. 363–370, 1994.
- [83] W. Li, D. M. Janowicz, K. R. Fortney, B. P. Katz, and S. M. Spinola, "Mechanism of human natural killer cell activation by *haemophilus ducreyi*," *J. Infect. Dis.*, vol. 200, no. 4, pp. 590–598, 2009, doi: 10.1086/600123.
- [84] S. Pestka, C. D. Krause, D. Sarkar, M. R. Walter, Y. Shi, and P. B. Fisher, "Interleukin-10 and related cytokines and receptors," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 22, pp. 929–979, 2004, doi: 10.1146/annurev.immunol.22.012703.104622.
- [85] S. Mocellin *et al.*, "IL-10 stimulatory effects on human NK cells explored by gene profile analysis," *Genes Immun.*, vol. 5, no. 8, pp. 621–630, 2004, doi: 10.1038/sj.gene.6364135.
- [86] C. M. Hedrich and J. H. Bream, "Cell type-specific regulation of IL-10 expression in inflammation and disease," *Immunol. Res.*, vol. 47, no. 1–3, pp. 185–206, 2010, doi: 10.1007/s12026-009-8150-5.
- [87] M. Yamashita *et al.*, "Involvement of IL-10 in the suppression of antibody production by in vitro immunized peripheral blood mononuclear cells," *Cytotechnology*, vol. 55, no. 2–3, pp. 71–77, 2007, doi: 10.1007/s10616-007-9088-x.
- [88] NCBI, "Interleukin-10 signaling," *pubchem*.
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/pathway/Reactome:R-HSA-6783783>.
- [89] J. E. de V. R de Waal Malefyt 1, H Yssel, "Direct effects of IL-10 on subsets of human CD4⁺ T cell clones and resting T cells. Specific inhibition of IL-2 production and proliferation," *Am. Assoc. Immunol. Inc.*, 1993, [Online]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7684412/>.
- [90] E. Lech-Maranda *et al.*, "Interleukin-10 gene promoter polymorphisms influence the clinical outcome of diffuse large B-cell lymphoma," *Blood*, vol.

- 103, no. 9, pp. 3529–3534, 2004, doi: 10.1182/blood-2003-06-1850.
- [91] L. Thompson-Snipes, V. Dhar, M. W. Bond, T. R. Mosmann, K. W. Moore, and D. M. Rennick, “Interleukin 10: A novel stimulatory factor for mast cells and their progenitors,” *J. Exp. Med.*, vol. 173, no. 2, pp. 507–510, 1991, doi: 10.1084/jem.173.2.507.
 - [92] S. V. Kotenko, C. D. Krause, L. S. Izotova, B. P. Pollack, W. Wu, and S. Pestka, “Identification and functional characterization of a second chain of the interleukin-10 receptor complex,” *EMBO J.*, vol. 16, no. 19, pp. 5894–5903, 1997, doi: 10.1093/emboj/16.19.5894.
 - [93] M. J. Waters and A. J. Brooks, “JAK2 activation by growth hormone and other cytokines,” *Biochem. J.*, vol. 466, pp. 1–11, 2015, doi: 10.1042/BJ20141293.
 - [94] T. So, S. W. Lee, and M. Croft, “Tumor necrosis factor/tumor necrosis factor receptor family members that positively regulate immunity,” *Int. J. Hematol.*, vol. 83, no. 1, pp. 1–11, 2006, doi: 10.1532/IJH97.05120.
 - [95] A. I. Robles, S. P. Linke, and C. C. Harris, “The p53 network in lung carcinogenesis,” *Oncogene*, vol. 21–45, no. 5, pp. 6898–6907, 2002, doi: 10.1038/sj.onc.1205563.
 - [96] A. I. Robles, N. A. Bemmels, A. B. Foraker, and C. C. a. Harris, “APAF-1 is a transcriptional target of p53 in DNA damage-induced apoptosis,” *Cancer Res.*, vol. 61, no. 18, pp. 6660–6664, 2001.
 - [97] G. Bradley *et al.*, “The expression of p53-induced protein with death domain (Pidd) and apoptosis in oral squamous cell carcinoma,” *Br. J. Cancer*, vol. 96, no. 9, pp. 1425–1432, 2007, doi: 10.1038/sj.bjc.6603745.
 - [98] S. Sadasivam, S. Gupta, V. Radha, K. Batta, T. K. Kundu, and G. Swarup, “Caspase-1 activator Ipaf is a p53-inducible gene involved in apoptosis,” *Oncogene*, vol. 24, no. 4, pp. 627–636, 2005, doi: 10.1038/sj.onc.1208201.
 - [99] S. Gupta, V. Radha, Y. Furukawa, and G. Swarup, “Direct Transcriptional Activation of Human Caspase-1 by Tumor Suppressor p53,” *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 14, pp. 10585–10588, 2001, doi: 10.1074/jbc.C100025200.
 - [100] T. K. MacLachlan and W. S. El-Deiry, “Apoptotic threshold is lowered by p53

- transactivation of caspase-6,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 99, no. 14, pp. 9492–9497, 2002, doi: 10.1073/pnas.132241599.
- [101] Y. Delpu *et al.*, “The Rescue of miR-148a Expression in Pancreatic Cancer: An Inappropriate Therapeutic Tool,” *PLoS One*, vol. 8, no. 1, pp. 1–10, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0055513.
- [102] T. Idichi *et al.*, “ Regulation of actin-binding protein ANLN by antitumor miR-217 inhibits cancer cell aggressiveness in pancreatic ductal adenocarcinoma ,” *Oncotarget*, vol. 8, no. 32, pp. 53180–53193, 2017, doi: 10.18632/oncotarget.18261.
- [103] X. Chen, C. C. Zhu, and J. Yin, “Ensemble of decision tree reveals potential miRNA-disease associations,” *PLoS Comput. Biol.*, vol. 15, no. 7, pp. 1–23, 2019, doi: 10.1371/journal.pcbi.1007209.

Ek tablo 1. Reactom veri tabanına göre PC3 ve PC3M hücreleri arasında hsa-miR-499 transfeksiyonu sonrasında değişen gen ifadelerinin etkili oldukları sinyal yollarının gösterimi

Sinyal yolları ismi	#Bulun an hedef sayısı	Topla m bulun an hedef sayısı	Oran	P değeri	False discovery rate (FDR)	Reaksiyon lar	Toplam reaksiyon lar	Reaksiyon oranı
Interleukin-10 signaling	6	86	0.005922049304503 512	0.02274376520041 7876	0.784850075103 1329	2	15	0.001117235215253 9848
TNFs bind their physiological receptors	3	30	0.002065831152733 7833	0.04087003108292 109	0.784850075103 1329	2	13	9.682705198867869 E-4

Defective F8 binding to von Willebrand factor	1	2	1.377220768489189 E-4	0.04902929365456 8096	0.784850075103 1329	1	1	7.448234768359899 E-5
TP53 Regulates Transcription of Caspase Activators and Caspases	2	20	0.001377220768489 189	0.09091521415904 302	0.784850075103 1329	2	17	0.001266199910621 1828
Defective F8 cleavage by thrombin	1	4	2.754441536978378 E-4	0.09566097824010 91	0.784850075103 1329	1	1	7.448234768359899 E-5
The AIM2 inflammasome	1	4	2.754441536978378 E-4	0.09566097824010 91	0.784850075103 1329	1	4	2.979293907343959 6E-4
TFAP2 (AP-2) family regulates transcription of	2	21	0.001446081806913 6482	0.09864842521988 759	0.784850075103 1329	2	18	0.001340682258304 7818

growth factors and their receptors								
FOXO-mediated transcription of cell death genes	2	23	0.0015838038837625672	0.11463164912427126	0.7848500751031329	2	15	0.0011172352152539848
FasL/ CD95L signaling	1	5	3.4430519212229723E-4	0.11811448655315326	0.7848500751031329	5	5	3.7241173841799495E-4
The IPAF inflammasome	1	5	3.4430519212229723E-4	0.11811448655315326	0.7848500751031329	1	2	1.4896469536719798E-4
Defective SLC3A1 causes cystinuria (CSNU)	1	6	4.131662305467566E-4	0.14001199425446487	0.7848500751031329	1	1	7.448234768359899E-5

Defective SLC7A9 causes cystinuria (CSNU)	1	6	4.131662305467566 E-4	0.14001199425446 487	0.784850075103 1329	1	1	7.448234768359899 E-5
Dopamine receptors	1	6	4.131662305467566 E-4	0.14001199425446 487	0.784850075103 1329	1	3	2.234470430507969 7E-4
Interleukin-4 and Interleukin-13 signaling	8	211	0.014529679107560 941	0.16545946776960 796	0.784850075103 1329	4	47	0.003500670341129 1523
Interleukin-20 family signaling	2	29	0.001996970114309 324	0.16581298105567 01	0.784850075103 1329	1	56	0.004171011470281 543
Neurodegenerative Diseases	2	30	0.002065831152733 7833	0.17469619669697 267	0.784850075103 1329	1	22	0.001638611649039 1778
Deregulated CDK5 triggers multiple	2	30	0.002065831152733 7833	0.17469619669697 267	0.784850075103 1329	1	22	0.001638611649039 1778

neurodegenerative pathways in Alzheimer's disease models								
Relaxin receptors	1	8	5.508883073956756 E-4	0.18219359350838 682	0.784850075103 1329	2	4	2.979293907343959 6E-4
Signaling by Overexpressed Wild-Type EGFR in Cancer	1	8	5.508883073956756 E-4	0.18219359350838 682	0.784850075103 1329	1	2	1.489646953671979 8E-4
Formation of the Editosome	1	8	5.508883073956756 E-4	0.18219359350838 682	0.784850075103 1329	1	2	1.489646953671979 8E-4
Inhibition of Signaling by	1	8	5.508883073956756 E-4	0.18219359350838 682	0.784850075103 1329	1	2	1.489646953671979 8E-4

Overexpressed EGFR								
Signaling by MST1	1	8	5.508883073956756 E-4	0.18219359350838 682	0.784850075103 1329	1	4	2.979293907343959 6E-4
MECP2 regulates neuronal receptors and channels	2	32	0.002203553229582 7023	0.19267537334452 49	0.784850075103 1329	2	26	0.001936541039773 5737
Defective B4GALT1 causes B4GALT1-CDG (CDG-2d)	1	9	6.19749345820135 E-4	0.20250414074044 765	0.784850075103 1329	3	3	2.234470430507969 7E-4
Defective ST3GAL3 causes MCT12 and EIEE15	1	9	6.19749345820135 E-4	0.20250414074044 765	0.784850075103 1329	1	1	7.448234768359899 E-5

Defective CHST6 causes MCDC1	1	9	6.19749345820135 E-4	0.20250414074044 765	0.784850075103 1329	1	1	7.448234768359899 E-5
Defective factor VIII causes hemophilia A	1	9	6.19749345820135 E-4	0.20250414074044 765	0.784850075103 1329	2	8	5.958587814687919 E-4
MET Receptor Activation	1	9	6.19749345820135 E-4	0.20250414074044 765	0.784850075103 1329	1	5	3.724117384179949 5E-4
ATF4 activates genes in response to endoplasmic reticulum stress	2	34	0.002341275306431 621	0.21087948337686 535	0.784850075103 1329	1	7	5.213764337851929 E-4
Pyroptosis	2	34	0.002341275306431 621	0.21087948337686 535	0.784850075103 1329	2	23	0.001713093996722 7767

mRNA Editing: C to U Conversion	1	10	6.886103842445945E-4	0.22231161513017983	0.7848500751031329	2	3	2.2344704305079697E-4
NOTCH3 Intracellular Domain Regulates Transcription	2	36	0.00247899738328054	0.22924347771287557	0.7848500751031329	3	22	0.0016386116490391778
EGFR interacts with phospholipase C-gamma	1	11	7.574714226690538E-4	0.24162844392587401	0.7848500751031329	3	3	2.2344704305079697E-4
Regulation by c-FLIP	1	11	7.574714226690538E-4	0.24162844392587401	0.7848500751031329	2	4	2.9792939073439596E-4
Dimerization of procaspase-8	1	11	7.574714226690538E-4	0.24162844392587401	0.7848500751031329	1	3	2.2344704305079697E-4

Interleukin-1 processing	1	12	8.263324610935132 E-4	0.26046674821439 95	0.784850075103 1329	4	5	3.724117384179949 5E-4
GP1b-IX-V activation signalling	1	12	8.263324610935132 E-4	0.26046674821439 95	0.784850075103 1329	5	7	5.213764337851929 E-4
mRNA Editing	1	12	8.263324610935132 E-4	0.26046674821439 95	0.784850075103 1329	2	9	6.703411291523909 E-4
PERK regulates gene expression	2	42	0.002892163613827 2964	0.28472893013595 835	0.784850075103 1329	1	11	8.193058245195889 E-4
CASP8 activity is inhibited	1	14	9.640545379424321 E-4	0.29675478175919 456	0.784850075103 1329	2	3	2.234470430507969 7E-4
FOXO-mediated transcription	4	110	0.007574714226690 5385	0.30003513735885 87	0.784850075103 1329	4	85	0.006330999553105 914

Collagen chain trimerization	2	44	0.0030298856906762154	0.3031920908982706	0.7848500751031329	2	28	0.0020855057351407717
Regulated Necrosis	3	77	0.005302299958683377	0.3057808880182671	0.7848500751031329	5	57	0.004245493817965142
PI3K events in ERBB4 signaling	1	15	0.0010329155763668916	0.31422728916553344	0.7848500751031329	2	2	1.4896469536719798E-4
Anchoring fibril formation	1	15	0.0010329155763668916	0.31422728916553344	0.7848500751031329	1	4	2.9792939073439596E-4
Negative regulation of TCF-dependent signaling by WNT ligand antagonists	1	15	0.0010329155763668916	0.31422728916553344	0.7848500751031329	1	5	3.7241173841799495E-4
GRB2 events in EGFR signaling	1	16	0.0011017766147913511	0.33126684250585625	0.7848500751031329	2	3	2.2344704305079697E-4

Platelet Adhesion to exposed collagen	1	16	0.0011017766147913511	0.33126684250585625	0.7848500751031329	2	6	4.4689408610159393E-4
FOXO-mediated transcription of oxidative stress, metabolic and neuronal genes	2	49	0.0033741908827985127	0.34889587903010066	0.7848500751031329	2	34	0.0025323998212423656
ERBB2 Activates PTK6 Signaling	1	18	0.00123949869164027	0.3640896212645993	0.7848500751031329	2	2	1.4896469536719798E-4
Integrin cell surface interactions	3	86	0.005922049304503512	0.3670871202212187	0.7848500751031329	7	55	0.004096529122597945
Transcriptional regulation by the AP-2 (TFAP2) family of	2	52	0.003580773998071891	0.37584333031981965	0.7848500751031329	2	44	0.0032772232980783555

transcription factors								
SHC1 events in EGFR signaling	1	19	0.0013083597300647294	0.3798934610435942	0.7848500751031329	4	4	2.9792939073439596E-4
ERBB2 Regulates Cell Motility	1	19	0.0013083597300647294	0.3798934610435942	0.7848500751031329	2	2	1.4896469536719798E-4
GRB2:SOS provides linkage to MAPK signaling for Integrins	1	20	0.001377220768489189	0.3953055882824832	0.7848500751031329	2	2	1.4896469536719798E-4
Caspase activation via Death Receptors in the presence of ligand	1	20	0.001377220768489189	0.3953055882824832	0.7848500751031329	4	9	6.703411291523909E-4

Synthesis of (16-20)-hydroxyeicosatetraenoic acids (HETE)	1	20	0.001377220768489189	0.3953055882824832	0.7848500751031329	1	3	2.2344704305079697E-4
Receptor-type tyrosine-protein phosphatases	1	20	0.001377220768489189	0.3953055882824832	0.7848500751031329	1	6	4.4689408610159393E-4
Peptide ligand-binding receptors	6	203	0.013978790800165267	0.4020999814849535	0.7848500751031329	6	76	0.005660658423953523
SHC1 events in ERBB4 signaling	1	21	0.0014460818069136482	0.41033568592049474	0.7848500751031329	4	4	2.9792939073439596E-4
GRB2 events in ERBB2 signaling	1	21	0.0014460818069136482	0.41033568592049474	0.7848500751031329	2	4	2.9792939073439596E-4

Defects of contact activation system (CAS) and kallikrein/kinin system (KKS)	1	21	0.0014460818069136482	0.41033568592049474	0.7848500751031329	2	18	0.0013406822583047818
Diseases of hemostasis	1	21	0.0014460818069136482	0.41033568592049474	0.7848500751031329	2	18	0.0013406822583047818
p130Cas linkage to MAPK signaling for integrins	1	22	0.0015149428453381077	0.42499319818260706	0.7848500751031329	3	3	2.2344704305079697E-4
PI3K events in ERBB2 signaling	1	22	0.0015149428453381077	0.42499319818260706	0.7848500751031329	2	7	5.213764337851929E-4
Keratan sulfate degradation	1	22	0.0015149428453381077	0.42499319818260706	0.7848500751031329	2	7	5.213764337851929E-4

GAB1 signalosome	1	23	0.001583803883762 5672	0.43928733644854 3	0.784850075103 1329	9	11	8.193058245195889 E-4
Chaperone Mediated Autophagy	1	23	0.001583803883762 5672	0.43928733644854 3	0.784850075103 1329	9	19	0.001415164605988 3808
Synthesis of epoxy (EET) and dihydroxyeicosatrie noic acids (DHET)	1	23	0.001583803883762 5672	0.43928733644854 3	0.784850075103 1329	1	3	2.234470430507969 7E-4
Crosslinking of collagen fibrils	1	24	0.001652664922187 0265	0.45322708497823 516	0.784850075103 1329	1	13	9.682705198867869 E-4
The NLRP3 inflammasome	1	24	0.001652664922187 0265	0.45322708497823 516	0.784850075103 1329	1	18	0.001340682258304 7818

Signaling by NOTCH3	2	63	0.004338245420740945	0.47012163968226395	0.7848500751031329	3	37	0.0027558468642931624
G-protein activation	1	26	0.0017903869990359455	0.48007824764124596	0.7848500751031329	4	6	4.4689408610159393E-4
Intrinsic Pathway of Fibrin Clot Formation	1	26	0.0017903869990359455	0.48007824764124596	0.7848500751031329	2	24	0.0017875763444063757
TNFR2 non-canonical NF-kB pathway	3	104	0.007161547996143782	0.48562264157895774	0.7848500751031329	9	43	0.0032027409503947563
GABA receptor activation	2	67	0.004613689574438783	0.5022625213366415	0.7848500751031329	4	12	8.937881722031879E-4

RAB geranylgeranylation	2	68	0.004682550612863 242	0.51009977253788 62	0.784850075103 1329	2	5	3.724117384179949 5E-4
Collagen degradation	2	69	0.004751411651287 701	0.51785588011194 4	0.784850075103 1329	4	34	0.002532399821242 3656
Free fatty acid receptors	1	29	0.001996970114309 324	0.51790922459686 05	0.784850075103 1329	1	5	3.724117384179949 5E-4
Estrogen- dependent nuclear events downstream of ESR-membrane signaling	1	29	0.001996970114309 324	0.51790922459686 05	0.784850075103 1329	1	12	8.937881722031879 E-4
CYP2E1 reactions	1	30	0.002065831152733 7833	0.52989927216935 16	0.784850075103 1329	6	6	4.468940861015939 3E-4

Signaling by ERBB2 TMD/JMD mutants	1	30	0.0020658311527337833	0.5298992721693516	0.7848500751031329	6	13	9.682705198867869E-4
Activation of G protein gated Potassium channels	1	31	0.0021346921911582425	0.5415919127561841	0.7848500751031329	2	3	2.2344704305079697E-4
G protein gated Potassium channels	1	31	0.0021346921911582425	0.5415919127561841	0.7848500751031329	2	3	2.2344704305079697E-4
Inhibition of voltage gated Ca ²⁺ channels via Gbeta/gamma subunits	1	31	0.0021346921911582425	0.5415919127561841	0.7848500751031329	2	3	2.2344704305079697E-4

PIWI-interacting RNA (piRNA) biogenesis	1	31	0.002134692191158 2425	0.54159191275618 41	0.784850075103 1329	4	15	0.001117235215253 9848
Laminin interactions	1	31	0.002134692191158 2425	0.54159191275618 41	0.784850075103 1329	3	15	0.001117235215253 9848
Retinoid cycle disease events	1	31	0.002134692191158 2425	0.54159191275618 41	0.784850075103 1329	1	16	0.001191717562937 5838
Diseases associated with visual transduction	1	31	0.002134692191158 2425	0.54159191275618 41	0.784850075103 1329	1	17	0.001266199910621 1828
Diseases of the neuronal system	1	31	0.002134692191158 2425	0.54159191275618 41	0.784850075103 1329	1	17	0.001266199910621 1828
Caspase activation via extrinsic	1	32	0.002203553229582 7023	0.55299450362102 89	0.784850075103 1329	4	17	0.001266199910621 1828

apoptotic signalling pathway								
Signaling by EGFR in Cancer	1	32	0.0022035532295827023	0.5529945036210289	0.7848500751031329	1	42	0.0031282586027111575
Collagen biosynthesis and modifying enzymes	2	76	0.005233438920258918	0.5698194748275496	0.7848500751031329	21	51	0.0037985997318635482
Synthesis of bile acids and bile salts via 27-hydroxycholesterol	1	34	0.002341275306431621	0.5749580621296835	0.7848500751031329	2	12	8.937881722031879E-4
Inflammasomes	1	34	0.002341275306431621	0.5749580621296835	0.7848500751031329	3	28	0.0020855057351407717

Late endosomal microautophagy	1	35	0.0024101363448560805	0.5855328544799336	0.7848500751031329	3	3	2.2344704305079697E-4
Signaling by ERBB2 Mutants KD	1	35	0.0024101363448560805	0.5855328544799336	0.7848500751031329	6	17	0.0012661999106211828
ECM proteoglycans	2	79	0.005440022035532296	0.5908175079466653	0.7848500751031329	4	23	0.0017130939967227767
SHC1 events in ERBB2 signaling	1	36	0.00247899738328054	0.5958452551273785	0.7848500751031329	4	6	4.4689408610159393E-4
DAP12 signaling	1	36	0.00247899738328054	0.5958452551273785	0.7848500751031329	10	17	0.0012661999106211828
Interleukin-37 signaling	1	36	0.00247899738328054	0.5958452551273785	0.7848500751031329	3	14	0.0010427528675703858

Signaling by ERBB2 in Cancer	1	36	0.00247899738328054	0.5958452551273785	0.7848500751031329	12	62	0.004617905556383137
Downregulation of ERBB2 signaling	1	36	0.00247899738328054	0.5958452551273785	0.7848500751031329	2	14	0.0010427528675703858
Keratan sulfate biosynthesis	1	37	0.002547858421704999	0.6059017573389772	0.7848500751031329	8	9	6.703411291523909E-4
EGFR downregulation	1	37	0.002547858421704999	0.6059017573389772	0.7848500751031329	18	22	0.0016386116490391778
Cargo concentration in the ER	1	37	0.002547858421704999	0.6059017573389772	0.7848500751031329	2	12	8.937881722031879E-4
Signaling by ERBB4	2	82	0.005646605150805674	0.6110444865272178	0.7848500751031329	13	52	0.0038730820795471474

Inwardly rectifying K ⁺ channels	1	38	0.002616719460129459	0.6157086941279368	0.7848500751031329	2	7	5.213764337851929E-4
Regulation of necroptotic cell death	1	38	0.002616719460129459	0.6157086941279368	0.7848500751031329	2	18	0.0013406822583047818
TP53 Regulates Transcription of Cell Death Genes	2	83	0.005715466189230134	0.6176155102008691	0.7848500751031329	2	68	0.005064799642484731
Defective B3GALTL causes Peters-plus syndrome (PpS)	1	39	0.002685580498553918	0.6252722421982428	0.7848500751031329	1	1	7.448234768359899E-5
Integrin signaling	1	39	0.002685580498553918	0.6252722421982428	0.7848500751031329	15	24	0.0017875763444063757

Lewis blood group biosynthesis	1	39	0.002685580498553918	0.6252722421982428	0.7848500751031329	1	13	9.682705198867869E-4
Striated Muscle Contraction	1	40	0.002754441536978378	0.6345984257921113	0.7848500751031329	4	4	2.9792939073439596E-4
Beta defensins	1	40	0.002754441536978378	0.6345984257921113	0.7848500751031329	2	5	3.7241173841799495E-4
NOD1/2 Signaling Pathway	1	40	0.002754441536978378	0.6345984257921113	0.7848500751031329	1	18	0.0013406822583047818
O-glycosylation of TSR domain-containing proteins	1	41	0.002823302575402837	0.6436931204432379	0.7848500751031329	2	2	1.4896469536719798E-4
Cooperation of PDCL (PhLP1) and	1	41	0.002823302575402837	0.6436931204432379	0.7848500751031329	2	11	8.193058245195889E-4

TRiC/CCT in G-protein beta folding								
Translocation of ZAP-70 to Immunological synapse	1	42	0.0028921636138272964	0.6525620566376615	0.7848500751031329	4	4	2.9792939073439596E-4
Diseases of programmed cell death	2	89	0.0061286324197768905	0.6552547526753365	0.7848500751031329	1	27	0.0020110233874571725
Synthesis of bile acids and bile salts via 24-hydroxycholesterol	1	43	0.002961024652251756	0.6612108233849836	0.7848500751031329	2	28	0.0020855057351407717

Formation of Fibrin Clot (Clotting Cascade)	1	43	0.002961024652251756	0.6612108233849836	0.7848500751031329	2	61	0.004543423208699538
Signaling by high-kinase activity BRAF mutants	1	44	0.0030298856906762154	0.6696448717016692	0.7848500751031329	4	6	4.4689408610159393E-4
NCAM1 interactions	1	44	0.0030298856906762154	0.6696448717016692	0.7848500751031329	1	10	7.448234768359899E-4
Phosphorylation of CD3 and TCR zeta chains	1	45	0.0030987467291006747	0.6778695180090393	0.7848500751031329	5	7	5.213764337851929E-4
PD-1 signaling	1	45	0.0030987467291006747	0.6778695180090393	0.7848500751031329	1	5	3.7241173841799495E-4

RAB GEFs exchange GTP for GDP on RABs	2	94	0.006472937611899 187	0.68431603902924 98	0.784850075103 1329	1	21	0.001564129301355 5788
RIPK1-mediated regulated necrosis	1	46	0.003167607767525 1344	0.68588994744760 06	0.784850075103 1329	3	34	0.002532399821242 3656
Aggrephagy	1	47	0.003236468805949 5937	0.69371121711019 17	0.784850075103 1329	13	15	0.001117235215253 9848
Nuclear signaling by ERBB4	1	47	0.003236468805949 5937	0.69371121711019 17	0.784850075103 1329	1	34	0.002532399821242 3656
Constitutive Signaling by Aberrant PI3K in Cancer	2	96	0.006610659688748 106	0.69536717472564 94	0.784850075103 1329	1	2	1.489646953671979 8E-4

Scavenging by Class A Receptors	1	48	0.003305329844374053	0.7013382591955151	0.7848500751031329	2	10	7.448234768359899E-4
MAP2K and MAPK activation	1	49	0.0033741908827985127	0.7087758840844137	0.7848500751031329	8	12	8.937881722031879E-4
Signaling by RAF1 mutants	1	49	0.0033741908827985127	0.7087758840844137	0.7848500751031329	4	7	5.213764337851929E-4
Activation of GABAB receptors	1	49	0.0033741908827985127	0.7087758840844137	0.7848500751031329	2	8	5.958587814687919E-4
GABA B receptor activation	1	49	0.0033741908827985127	0.7087758840844137	0.7848500751031329	2	9	6.703411291523909E-4
TBC/RABGAPs	1	49	0.0033741908827985127	0.7087758840844137	0.7848500751031329	1	14	0.0010427528675703858

PKMTs methylate histone lysines	1	49	0.0033741908827985127	0.7087758840844137	0.7848500751031329	1	22	0.0016386116490391778
Class A/1 (Rhodopsin-like receptors)	9	412	0.02837074783087729	0.7092795738806493	0.7848500751031329	9	158	0.01176821093400864
Transcriptional Regulation by MECP2	2	100	0.006886103842445944	0.7165108611411727	0.7848500751031329	2	77	0.005735140771637122
Degradation of the extracellular matrix	3	148	0.010191433686819996	0.7193913224163533	0.7848500751031329	7	105	0.007820646506777894
Synthesis of very long-chain fatty acyl-CoAs	1	51	0.0035119129596474317	0.7231015326365842	0.7848500751031329	2	12	8.937881722031879E-4

Defensins	1	51	0.003511912959647 4317	0.72310153263658 42	0.784850075103 1329	3	19	0.001415164605988 3808
Amine ligand- binding receptors	1	51	0.003511912959647 4317	0.72310153263658 42	0.784850075103 1329	1	22	0.001638611649039 1778
Neddylation	5	241	0.016595510260294 724	0.72480797693770 53	0.784850075103 1329	10	31	0.002308952778191 5684
Keratan sulfate/keratin metabolism	1	52	0.003580773998071 891	0.72999859461071 66	0.784850075103 1329	10	16	0.001191717562937 5838
Blood group systems biosynthesis	1	52	0.003580773998071 891	0.72999859461071 66	0.784850075103 1329	1	22	0.001638611649039 1778
Collagen formation	2	104	0.007161547996143 782	0.73641008511920 35	0.784850075103 1329	24	77	0.005735140771637 122

Platelet Aggregation (Plug Formation)	1	53	0.0036496350364963502	0.7367243216499929	0.7848500751031329	16	27	0.0020110233874571725
DAP12 interactions	1	53	0.0036496350364963502	0.7367243216499929	0.7848500751031329	11	33	0.0024579174735587664
Cell recruitment (pro-inflammatory response)	1	53	0.0036496350364963502	0.7367243216499929	0.7848500751031329	4	23	0.0017130939967227767
Purinergic signaling in leishmaniasis infection	1	53	0.0036496350364963502	0.7367243216499929	0.7848500751031329	4	23	0.0017130939967227767
Signaling by moderate kinase	1	54	0.00371849607492081	0.7432829586074623	0.7848500751031329	4	7	5.213764337851929E-4

activity mutants	BRAF								
Paradoxical activation of RAF signaling by kinase inactive BRAF	1	54	0.003718496074920 81	0.74328295860746 23	0.784850075103 1329	4	7	5.213764337851929 E-4	
Signaling downstream of RAS mutants	1	54	0.003718496074920 81	0.74328295860746 23	0.784850075103 1329	4	7	5.213764337851929 E-4	
Signaling by RAS mutants	1	54	0.003718496074920 81	0.74328295860746 23	0.784850075103 1329	4	9	6.703411291523909 E-4	
FBXL7 down- regulates AURKA during mitotic entry and in early mitosis	1	55	0.003787357113345 2692	0.74967864545178 02	0.784850075103 1329	6	6	4.468940861015939 3E-4	

Diseases associated with glycosaminoglycan metabolism	1	55	0.0037873571133452692	0.7496786454517802	0.7848500751031329	5	29	0.0021599880828243705
The canonical retinoid cycle in rods (twilight vision)	1	57	0.003925079190194188	0.7619972196971472	0.7848500751031329	2	25	0.0018620586920899747
Chemokine receptors bind chemokines	1	57	0.003925079190194188	0.7619972196971472	0.7848500751031329	1	19	0.0014151646059883808
Meiotic recombination	1	58	0.003993940228618648	0.7679278855583749	0.7848500751031329	2	9	6.703411291523909E-4
Clathrin-mediated endocytosis	3	161	0.01108662718633797	0.77027945436972	0.7848500751031329	16	35	0.0026068821689259644

Generation of second messenger molecules	1	59	0.004062801267043107	0.7737111630844863	0.7848500751031329	3	17	0.0012661999106211828
Signaling by EGFR	1	61	0.004200523343892026	0.7848500751031329	0.7848500751031329	40	49	0.0036496350364963502
Golgi Associated Vesicle Biogenesis	1	61	0.004200523343892026	0.7848500751031329	0.7848500751031329	4	7	5.213764337851929E-4
Amino acids regulate mTORC1	1	61	0.004200523343892026	0.7848500751031329	0.7848500751031329	5	12	8.937881722031879E-4
Non-integrin membrane-ECM interactions	1	61	0.004200523343892026	0.7848500751031329	0.7848500751031329	1	22	0.0016386116490391778
Sensory processing of sound by outer	1	64	0.0044071064591654045	0.8005414689523072	0.8005414689523072	1	8	5.958587814687919E-4

hair cells of the cochlea								
Assembly of collagen fibrils and other multimeric structures	1	67	0.004613689574438783	0.815091358157834	0.815091358157834	3	26	0.0019365410397735737
Antimicrobial peptides	2	123	0.00846990772620851	0.8153575061003783	0.8153575061003783	5	58	0.004319976165648741
PI3K/AKT Signaling in Cancer	2	124	0.00853876876463297	0.8188616301223173	0.8188616301223173	1	21	0.0015641293013555788
Signaling by ERBB2	1	68	0.004682550612863242	0.8197021467704801	0.8197021467704801	18	46	0.0034261879934455535

Amino acid transport across the plasma membrane	1	68	0.004682550612863242	0.8197021467704801	0.8197021467704801	1	36	0.0026813645166095636
Signaling by Interleukins	13	643	0.04427764770692742	0.8232951631587678	0.8232951631587678	15	493	0.0367197974080143
NCAM signaling for neurite out-growth	1	70	0.004820272689712161	0.8285825724823437	0.8285825724823437	1	23	0.0017130939967227767
Signaling by PDGF	1	70	0.004820272689712161	0.8285825724823437	0.8285825724823437	1	31	0.0023089527781915684
rRNA modification in the nucleus and cytosol	1	71	0.00488913372813662	0.8328578271442517	0.8328578271442517	1	8	5.958587814687919E-4

Nucleotide-binding domain, leucine rich repeat containing receptor (NLR) signaling pathways	1	71	0.00488913372813662	0.8328578271442517	0.8328578271442517	4	46	0.0034261879934455535
Ion transport by P-type ATPases	1	71	0.00488913372813662	0.8328578271442517	0.8328578271442517	1	15	0.0011172352152539848
Signaling by PTK6	1	71	0.00488913372813662	0.8328578271442517	0.8328578271442517	2	53	0.003947564427230746
Signaling by Non-Receptor Tyrosine Kinases	1	71	0.00488913372813662	0.8328578271442517	0.8328578271442517	2	53	0.003947564427230746
PI5P, PP2A and IER3 Regulate	2	129	0.008883073956755267	0.8355043795177028	0.8355043795177028	1	7	5.213764337851929E-4

PI3K/AKT Signaling								
Rab regulation of trafficking	2	129	0.008883073956755267	0.8355043795177028	0.8355043795177028	2	35	0.0026068821689259644
Signaling by BRAF and RAF fusions	1	73	0.005026855804985539	0.841091946753867	0.841091946753867	4	5	3.7241173841799495E-4
Xenobiotics	1	73	0.005026855804985539	0.841091946753867	0.841091946753867	15	22	0.0016386116490391778
Sensory processing of sound by inner hair cells of the cochlea	1	76	0.005233438920258918	0.8526907536471839	0.8526907536471839	1	7	5.213764337851929E-4
Synthesis of bile acids and bile salts	1	76	0.005233438920258918	0.8526907536471839	0.8526907536471839	2	39	0.0029048115596603604

via 7alpha-hydroxycholesterol								
COPII-mediated vesicle transport	1	77	0.005302299958683377	0.8563662424477394	0.8563662424477394	10	16	0.0011917175629375838
Negative regulation of the PI3K/AKT network	2	137	0.009433962264150943	0.8592780327641488	0.8592780327641488	1	10	7.448234768359899E-4
Diseases associated with O-glycosylation of proteins	1	78	0.005371160997107836	0.8599502697167056	0.8599502697167056	1	9	6.703411291523909E-4
Fatty acyl-CoA biosynthesis	1	79	0.005440022035532296	0.8634451053023531	0.8634451053023531	2	24	0.0017875763444063757

trans-Golgi Network Vesicle Budding	1	80	0.005508883073956 756	0.86685296287230 84	0.866852962872 3084	4	19	0.001415164605988 3808
SUMOylation of DNA damage response and repair proteins	1	81	0.005577744112381 2145	0.87017600130028 18	0.870176001300 2818	1	24	0.001787576344406 3757
MHC class II antigen presentation	2	148	0.010191433686819 996	0.88685605432135 85	0.886856054321 3585	25	26	0.001936541039773 5737
Sensory processing of sound	1	87	0.005990910342927 971	0.88844735675223 1	0.888447356752 231	2	13	9.682705198867869 E-4
Signaling by MET	1	88	0.006059771381352 431	0.89123278279415 82	0.891232782794 1582	1	49	0.003649635036496 3502

Selective autophagy	1	89	0.0061286324197768905	0.8939488436285276	0.8939488436285276	13	48	0.0035751526888127515
Amyloid fiber formation	1	89	0.0061286324197768905	0.8939488436285276	0.8939488436285276	1	33	0.0024579174735587664
Estrogen-dependent gene expression	2	154	0.010604599917366755	0.8997044308237659	0.8997044308237659	7	66	0.004915834947117533
Meiosis	1	92	0.006335215535050269	0.9016978502588591	0.9016978502588591	2	15	0.0011172352152539848
Unfolded Protein Response (UPR)	2	155	0.010673460955791213	0.9017091715194915	0.9017091715194915	1	94	0.0070013406822583045
Oncogenic MAPK signaling	1	93	0.006404076573474728	0.9041532564658059	0.9041532564658059	24	46	0.0034261879934455535

Protein-protein interactions at synapses	1	93	0.006404076573474728	0.9041532564658059	0.9041532564658059	1	33	0.0024579174735587664
ADORA2B mediated anti-inflammatory cytokines production	2	159	0.010948905109489052	0.9093605736625028	0.9093605736625028	1	12	8.937881722031879E-4
Chaperonin-mediated protein folding	1	96	0.006610659688748106	0.9111585101401418	0.9111585101401418	2	19	0.0014151646059883808
Costimulation by the CD28 family	1	97	0.006679520727172566	0.9133782141045537	0.9133782141045537	1	35	0.0026068821689259644
Class B/2 (Secretin family receptors)	1	99	0.006817242804021485	0.9176530631843609	0.9176530631843609	1	20	0.0014896469536719798

Interleukin-1 family signaling	2	167	0.011499793416884726	0.9230216742866718	0.9230216742866718	8	80	0.005958587814687919
Protein folding	1	102	0.007023825919294863	0.9236740521594121	0.9236740521594121	2	28	0.0020855057351407717
Keratinization	3	226	0.015562594683927834	0.9237303545884168	0.9237303545884168	4	34	0.0025323998212423656
Mitochondrial Fatty Acid Beta-Oxidation	1	105	0.007230409034568242	0.9292559200674793	0.9292559200674793	1	47	0.0035006703411291523
G alpha (s) signalling events	2	172	0.011844098609007024	0.9305507616618252	0.9305507616618252	3	18	0.0013406822583047818
Potassium Channels	1	107	0.00736813111141716	0.9327490814398638	0.9327490814398638	2	19	0.0014151646059883808

PPARA activates gene expression	2	175	0.012050681724280402	0.9347289099251378	0.9347289099251378	1	41	0.0030537762550275583
Interleukin-1 signaling	1	109	0.007505853188266079	0.9360702086437884	0.9360702086437884	1	47	0.0035006703411291523
Regulation of lipid metabolism by PPARalpha	2	177	0.012188403801129321	0.9373810991074405	0.9373810991074405	1	44	0.0032772232980783555
Extra-nuclear estrogen signaling	1	110	0.0075747142266905385	0.9376689165826547	0.9376689165826547	3	38	0.0028303292119767616
GPCR ligand binding	10	602	0.041454345131524586	0.9381956264352727	0.9381956264352727	10	185	0.013779234321465812
Programmed Cell Death	3	238	0.016388927145021347	0.9386952225430327	0.9386952225430327	9	197	0.014673022493669

Synthesis of bile acids and bile salts	1	111	0.007643575265114998	0.9392277520356037	0.9392277520356037	6	83	0.006182034857738716
Opioid Signalling	1	112	0.007712436303539457	0.9407477067762674	0.9407477067762674	6	59	0.004394458513332341
Cargo recognition for clathrin-mediated endocytosis	1	115	0.007919019418812836	0.945083839056656	0.945083839056656	1	15	0.0011172352152539848
Gene Silencing by RNA	1	120	0.008263324610935133	0.9516188073773434	0.9516188073773434	4	40	0.0029792939073439596
Bile acid and bile salt metabolism	1	121	0.008332185649359593	0.9528296001589448	0.9528296001589448	6	94	0.0070013406822583045

ABC-family proteins mediated transport	1	122	0.008401046687784052	0.9540101724551048	0.9540101724551048	1	27	0.0020110233874571725
G alpha (i) signalling events	6	421	0.028990497176697425	0.9542237908799146	0.9542237908799146	13	74	0.005511693728586325
Reproduction	1	123	0.00846990772620851	0.955161276526103	0.955161276526103	2	24	0.0017875763444063757
Downstream TCR signaling	1	124	0.00853876876463297	0.9562836459569688	0.9562836459569688	1	24	0.0017875763444063757
Antigen processing: Ubiquitination & Proteasome degradation	4	315	0.021691227103704722	0.9567948560211399	0.9567948560211399	4	9	6.703411291523909E-4

Olfactory Signaling Pathway	6	432	0.02974796859936648	0.9612743213088282	0.9612743213088282	1	2	1.4896469536719798E-4
Diseases of glycosylation	2	202	0.013909929761740807	0.962988211794008	0.962988211794008	6	77	0.005735140771637122
O-linked glycosylation	1	132	0.009089657072028646	0.9643103775972789	0.9643103775972789	2	28	0.0020855057351407717
Extracellular matrix organization	4	329	0.022655281641647155	0.966144793176846	0.966144793176846	47	319	0.02375986891106808
Platelet degranulation	1	137	0.009433962264150943	0.9685621137026271	0.9685621137026271	1	11	8.193058245195889E-4
Formation of the cornified envelope	1	138	0.009502823302575403	0.9693497996068439	0.9693497996068439	3	27	0.0020110233874571725

Response to elevated platelet cytosolic Ca ²⁺	1	144	0.00991598953312216	0.9736793202022597	0.9736793202022597	1	14	0.0010427528675703858
TCR signaling	1	147	0.010122572648395538	0.975609615695684	0.975609615695684	13	52	0.0038730820795471474
Macroautophagy	1	150	0.010329155763668916	0.9773987072491701	0.9773987072491701	13	87	0.006479964248473112
Neurotransmitter receptors and postsynaptic signal transmission	2	231	0.01590689987605013	0.9801824982338154	0.9801824982338154	4	109	0.00811857589751229
Death Receptor Signalling	1	158	0.010880044071064592	0.981555288273846	0.981555288273846	5	93	0.006926858334574706

ER to Golgi Anterograde Transport	1	164	0.011293210301611 348	0.98416407084433 34	0.984164070844 3334	11	39	0.002904811559660 3604
Transport of inorganic cations/anions and amino acids/oligopeptides	1	164	0.011293210301611 348	0.98416407084433 34	0.984164070844 3334	1	75	0.005586176076269 924
Arachidonic acid metabolism	1	165	0.011362071340035 808	0.98456158162618 86	0.984561581626 1886	2	77	0.005735140771637 122
Autophagy	1	166	0.011430932378460 268	0.98494914081230 5	0.984949140812 305	24	108	0.008044093549828 69
Binding and Uptake of Ligands by	1	167	0.011499793416884 726	0.98532699687139 76	0.985326996871 3976	2	33	0.002457917473558 7664

Scavenger Receptors								
Visual phototransduction	1	169	0.011637515493733645	0.9860545627018394	0.9860545627018394	2	92	0.006852375986891107
Immunoregulatory interactions between a Lymphoid and a non-Lymphoid cell	3	316	0.021760088142129184	0.9863322913917177	0.9863322913917177	2	44	0.0032772232980783555
Interferon gamma signaling	2	250	0.01721525960611486	0.9869330009385612	0.9869330009385612	2	16	0.0011917175629375838
RAF/MAP kinase cascade	3	322	0.02217325437267594	0.9878817278145995	0.9878817278145995	9	75	0.005586176076269924

Cellular response to starvation	1	176	0.012119542762704862	0.9883291136877028	0.9883291136877028	5	28	0.0020855057351407717
ESR-mediated signaling	2	256	0.017628425836661618	0.9885554155337121	0.9885554155337121	10	111	0.008267540592879487
Cell surface interactions at the vascular wall	2	257	0.017697286875086076	0.9888060392643799	0.9888060392643799	2	65	0.004841352599433934
Signaling by NOTCH	2	258	0.017766147913510534	0.9890513184086097	0.9890513184086097	3	154	0.011470281543274244
Cytokine Signaling in Immune system	17	1092	0.07519625395950971	0.9893818430074224	0.9893818430074224	26	708	0.05273350215998808
MAPK1/MAPK3 signaling	3	329	0.022655281641647155	0.9894767350056511	0.9894767350056511	9	82	0.006107552510055117

Glycosaminoglycan metabolism	1	182	0.012532708993251618	0.9899817376056613	0.9899817376056613	10	88	0.006554446596156711
Regulation of expression of SLITs and ROBOs	1	183	0.012601570031676078	0.9902335259843397	0.9902335259843397	2	20	0.0014896469536719798
SLC transporter disorders	1	183	0.012601570031676078	0.9902335259843397	0.9902335259843397	2	65	0.004841352599433934
SUMO E3 ligases SUMOylate target proteins	1	183	0.012601570031676078	0.9902335259843397	0.9902335259843397	1	131	0.009757187546551468
Cytochrome P450 - arranged by substrate type	1	184	0.012670431070100538	0.9904790030830243	0.9904790030830243	15	61	0.004543423208699538

Major pathway of rRNA processing in the nucleolus and cytosol	1	189	0.013014736262222834	0.991617105816851	0.991617105816851	4	7	5.213764337851929E-4
Signaling by GPCR	12	860	0.05922049304503512	0.9921360316389747	0.9921360316389747	33	353	0.026292268732310442
Apoptosis	1	192	0.013221319377496212	0.9922337447303984	0.9922337447303984	4	141	0.010502011023387457
SUMOylation	1	192	0.013221319377496212	0.9922337447303984	0.9922337447303984	1	140	0.010427528675703858
G alpha (q) signalling events	2	283	0.019487673874122022	0.9937331391618094	0.9937331391618094	7	35	0.0026068821689259644
Ion channel transport	1	206	0.014185373915438644	0.9945641318600906	0.9945641318600906	1	44	0.0032772232980783555

rRNA processing in the nucleus and cytosol	1	207	0.014254234953863 104	0.99470097733846	0.994700977338 46	5	15	0.001117235215253 9848
G2/M Transition	1	212	0.014598540145985 401	0.99533535617107 63	0.995335356171 0763	6	78	0.005809623119320 721
Leishmania parasite growth and survival	2	297	0.020451728412064 454	0.99542935996931 79	0.995429359969 3179	1	40	0.002979293907343 9596
Anti-inflammatory response favouring Leishmania parasite infection	2	297	0.020451728412064 454	0.99542935996931 79	0.995429359969 3179	1	40	0.002979293907343 9596
Muscle contraction	1	213	0.014667401184409 86	0.99545283504581 9	0.995452835045 819	4	42	0.003128258602711 1575

Mitotic G2-G2/M phases	1	214	0.01473626222283432	0.9955673631216334	0.9955673631216334	6	80	0.005958587814687919
Sensory Perception	8	681	0.04689436716705688	0.995664495514894	0.995664495514894	5	107	0.007969611202145092
TCF dependent signaling in response to WNT	1	216	0.01487398429968324	0.995787860704833	0.995787860704833	2	71	0.0052882466855355284
Transport to the Golgi and subsequent modification	1	219	0.015080567414956617	0.9960982649966984	0.9960982649966984	11	60	0.004468940861015939
MAPK family signaling cascades	3	380	0.02616719460129459	0.9963189680163216	0.9963189680163216	9	122	0.009086846417399076

PIP3 activates AKT signaling	2	319	0.02196667125740256	0.9972281267038514	0.9972281267038514	1	86	0.006405481900789513
Signaling by ROBO receptors	1	235	0.01618234402974797	0.9974068150475801	0.9974068150475801	2	60	0.004468940861015939
Class I MHC mediated antigen processing & presentation	4	473	0.032571271174769316	0.9977720431499298	0.9977720431499298	4	48	0.0035751526888127515
GPCR downstream signalling	9	781	0.053780471009502825	0.9978527736478101	0.9978527736478101	23	168	0.01251303441084463
Leishmania infection	3	406	0.027957581600330534	0.997873784571524	0.997873784571524	5	95	0.007075823029941904
rRNA processing	1	245	0.016870954413992563	0.9979916361735712	0.9979916361735712	5	21	0.0015641293013555788

Neutrophil degranulation	4	480	0.03305329844374053	0.9980636168293453	0.9980636168293453	4	10	7.448234768359899E-4
Transmission across Chemical Synapses	2	341	0.023481614102740668	0.9983267706766413	0.9983267706766413	4	163	0.012140622672426635
Chromatin organization	1	256	0.017628425836661618	0.9984841286279679	0.9984841286279679	1	85	0.006330999553105914
Chromatin modifying enzymes	1	256	0.017628425836661618	0.9984841286279679	0.9984841286279679	1	85	0.006330999553105914
Fatty acid metabolism	3	428	0.02947252444566864	0.9986719011905643	0.9986719011905643	5	217	0.01616266944734098
Intracellular signaling by second messengers	2	366	0.025203140063352156	0.9990619423240581	0.9990619423240581	1	114	0.008490987635930284

Disorders of transmembrane transporters	1	277	0.019074507643575263	0.99911458327492	0.99911458327492	2	87	0.006479964248473112
Signaling by Receptor Tyrosine Kinases	5	593	0.04083459578570445	0.9992255307418265	0.9992255307418265	74	704	0.05243557276925369
Diseases of signal transduction by growth factor receptors and second messengers	3	453	0.031194050406280125	0.9992268851792859	0.9992268851792859	38	448	0.03336809176225235
Platelet activation, signaling and aggregation	1	291	0.020038562181517696	0.9993815850580036	0.9993815850580036	22	116	0.008639952331297482

Signaling by Nuclear Receptors	2	384	0.026442638754992424	0.9993834955588773	0.9993834955588773	10	192	0.014300610755251006
Phase I Functionalization of compounds	1	297	0.020451728412064454	0.9994698087381843	0.9994698087381843	15	98	0.0072992700729927005
Interferon Signaling	2	394	0.02713124913923702	0.9995122372962163	0.9995122372962163	2	69	0.00513928199016833
Neuronal System	3	487	0.03353532571271175	0.9996332390073908	0.9996332390073908	5	216	0.01608818709965738
Diseases of metabolism	2	408	0.028095303677179453	0.9996490287697838	0.9996490287697838	6	191	0.014226128407567406
Metabolism of steroids	1	324	0.022310976449524858	0.9997349853470655	0.9997349853470655	6	237	0.01765231640101296

Signaling by WNT	1	332	0.022861864756920 536	0.99978426206956 46	0.999784262069 5646	2	157	0.011693728586325 041
Metabolism of carbohydrates	2	456	0.031400633521553 506	0.99988755323418 11	0.999887553234 1811	11	243	0.018099210487114 555
Transcriptional Regulation by TP53	2	487	0.033535325712711 75	0.99994648224307 57	0.999946482243 0757	2	259	0.019290928050052 14
Adaptive Immune System	9	1004	0.069136482578157 29	0.99995871274357 25	0.999958712743 5725	45	264	0.019663339788470 13
SLC-mediated transmembrane transport	1	415	0.028577330946150 666	0.99997464839955 45	0.999974648399 5545	1	191	0.014226128407567 406
Asparagine N-linked glycosylation	1	421	0.028990497176697 425	0.99997829447665 08	0.999978294476 6508	11	144	0.010725458066438 254

Membrane Trafficking	3	665	0.045792590552265526	0.9999936334794612	0.9999936334794612	33	219	0.016311634142708177
Axon guidance	2	584	0.040214846439884315	0.999994923867115	0.999994923867115	3	298	0.0221957396097125
Nervous system development	2	620	0.04269384382316485	0.9999979055971285	0.9999979055971285	3	324	0.02413228064948607
Vesicle-mediated transport	4	824	0.05674149566175458	0.9999988932098214	0.9999988932098214	35	252	0.018769551616266946
Biological oxidations	1	545	0.037529265941330395	0.999999136127891	0.999999136127891	15	188	0.014002681364516609
Hemostasis	3	801	0.05515769177799201	0.9999997477514678	0.9999997477514678	28	334	0.02487710412632206

Cell Cycle, Mitotic	1	596	0.041041178900977 825	0.99999977249820 76	0.999999772498 2076	6	350	0.026068821689259 645
Cell Cycle	2	734	0.050544002203553 23	0.99999987736909 49	0.999999877369 0949	8	449	0.033442574109935 945
Metabolism of RNA	2	782	0.053849332047927 28	0.99999996340338 48	0.999999963403 3848	7	187	0.013928199016833 011
Innate Immune System	8	1333	0.091791764219804 44	0.99999998829788 85	0.999999988297 8885	24	708	0.052733502159988 08
Generic Transcription Pathway	11	1555	0.107078914750034 43	0.99999999094481 71	0.999999990944 8171	11	824	0.061373454491285 57
Transport of small molecules	3	958	0.065968874810632 14	0.99999999455544 52	0.999999994555 4452	3	441	0.032846715328467 155

Immune System	29	2681	0.18461644401597577	0.99999999623516	0.99999999623516	95	1621	0.12073588559511396
Post-translational protein modification	10	1597	0.10997107836386173	0.999999991812272	0.999999991812272	26	526	0.03917771488157307
Cellular responses to stress	1	811	0.05584630216223661	0.999999992227067	0.999999992227067	5	289	0.021525398480560107
Cellular responses to external stimuli	1	829	0.05708580085387688	0.999999995187795	0.999999995187795	5	320	0.023834351258751676
RNA Polymerase II Transcription	11	1694	0.1166505990910343	0.999999995472049	0.999999995472049	11	885	0.06591687769998511
Developmental Biology	5	1262	0.08690263049166781	0.999999997391207	0.999999997391207	7	556	0.04141218531208104

Gene expression (Transcription)	12	1855	0.127737226277372 27	0.99999999994013 93	0.999999999940 1393	15	1000	0.074482347683598 99
Metabolism of lipids	6	1437	0.098953312215948 22	0.99999999997093 66	0.999999999970 9366	12	947	0.070534783256368 24
Infectious disease	3	1343	0.092480374604049 02	0.99999999999969 82	0.999999999999 6982	5	750	0.055861760762699 24
Metabolism of proteins	14	2334	0.160721663682688 34	0.99999999999997 45	0.999999999999 9745	30	892	0.066438254133770 3
Signal Transduction	23	2974	0.204792728274342 4	0.99999999999999 25	0.999999999999 9925	152	2402	0.178906599136004 76
Disease	12	2360	0.162512050681724 28	0.99999999999999 96	0.999999999999 9996	55	1591	0.118501415164606

Metabolism	8	3634	0.2502410136344856	1.0	1.0	38	2247	0.1673618352450469
------------	---	------	--------------------	-----	-----	----	------	--------------------

Ek tablo 2. Uzun kodlamaya yapmayan ve miR499 transfeksiyonu sonrasında PC3 ve PC3M hücreleri arasında değişen hedefler.

lnc-AC002472.13.1-1, lnc-AC009336.1-, lnc-ACOT9-1, lnc-AF131215.2.1-1lnc-AKAP17A-1lnc-ANP32A-1lnc-ARHGAP10-2lnc-ARMCX6-1lnc-ARSJ-1lnc-AUTS2-1lnc-AZI2-1lnc-BOD1-2lnc-C17orf80-4lnc-C6orf100-3lnc-C9orf30-1lnc-CCDC71L-1lnc-CDH5-7lnc-CDYL2-3lnc-CHN2-3lnc-CLVS1-1lnc-CNBD1-4lnc-COL20A1-3lnc-CTC-236F12.4.1-3lnc-CTSL2-2lnc-CXorf56-2lnc-DFNA5-3lnc-DHRS7-2lnc-EEF1A1-1lnc-EIF2AK3-1lnc-EIF3M-2lnc-EPHA6-2lnc-ERH-1lnc-FGFBP1-1lnc-FTH1-3lnc-GABPA-5lnc-GCNT3-1lnc-GLS-1lnc-GPR65-2lnc-HBEGF-2lnc-HIST1H1A-1lnc-HNRNPA1-2lnc-HNRNPA2B1-4lnc-ID3-2lnc-IL5RA-6lnc-ILK-4lnc-KCNMB1-3lnc-KDM6A-1lnc-KLF15-2lnc-LRRC40-1lnc-MEIS1-4lnc-MYEF2-5lnc-NDUFV2-1lnc-PCDH1-1lnc-PCMTD2-2lnc-PHLDB1-1lnc-PHLPP2-1lnc-PKMYT1-1lnc-PRNT-1lnc-PRPF18-5lnc-RBM26-3lnc-RD3-1lnc-RETNLB-2lnc-RFPL4B-4lnc-RLBP1-1lnc-RNF135-2lnc-RP11-187E13.1.1-1lnc-RP11-582J16.5.1-4lnc-RP11-688I9.2.1-3lnc-RP11-82I10.1.1-4lnc-RP11-831A10.1.1-1lnc-RPL24-1lnc-SGPL1-3lnc-SKA2-2lnc-SLC24A5-1lnc-SREK1-1lnc-STX18-1lnc-STX8-1lnc-TBX3-3lnc-TEKT5-2lnc-TERF1-2lnc-TGFB3-1lnc-THOC5-1lnc-TMEM18-12lnc-TNKS2-1lnc-TRIM62-1lnc-UCHL5-1lnc-UTP23-3, lnc-VAPA-1, lnc-WDR7-3, lnc-YBEY-3, lnc-ZC3H12D-1, lnc-ZFC3H1-2, lnc-ZNF608-4, lnc-ZNF804A-,lnc-ZPBP-1