

**PROSTAT KANSERİ HÜCRELERİNDE BOR  
BİLEŞİKLERİNİN SERİN PROTEAZLARA ETKİSİNİN  
İNCELENMESİ**

**Amina MUJALA**



T.C.  
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PROSTAT KANSERİ HÜCRELERİNDE BOR BİLEŞİKLERİNİN SERİN  
PROTEAZLARA ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Amina MUJALA  
0000-0002-7248-7255

Doç. Dr. Burcu ERBAYKENT  
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

BURSA – 2022  
**Her Hakkı Saklıdır**

## TEZ ONAYI

Amina MUJALA tarafından hazırlanan “PROSTAT KANSERİ HÜCRELERİNDE BOR BİLEŞİKLERİNİN SERİN PROTEAZLARA ETKİSİNİN İNCELENMESİ” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Bursa Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

**Danışman:** Doç. Dr. Burcu ERBAYKENT

- Başkan:** Doç. Dr. Burcu ERBAYKENT İmza  
0000-0002-9565-6349  
Bursa Uludağ Üniversitesi,  
Fen Edebiyat Fakültesi,  
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
- Üye :** Prof. Dr. Sezai TÜRKEKEL İmza  
0000-0001-7128-6948  
Bursa Uludağ Üniversitesi,  
Fen Edebiyat Fakültesi,  
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
- Üye :** Prof. Dr. Mehmet KORKMAZ İmza  
0000-0003-1058-5586  
Manisa Celal Bayar Üniversitesi,  
Tıp Fakültesi,  
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

**Yukarıdaki sonucu onaylarım**

**Prof. Dr. Hüseyin Aksel EREN**  
**Enstitü Müdürü**

.././.....

**Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;**

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

**beyan ederim.**

.../.../.....

**Amina MUJALA**

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### PROSTAT KANSERİ HÜCRELERİNDE BOR BİLEŞİKLERİNİN SERİN PROTEAZLARA ETKİSİNİN İNCELENMESİ

**Amina MUJALA**

Bursa Uludağ Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

**Danışman:** Doç. Dr. Burcu ERBAYKENT

Serin proteazlar, hücre büyümesi ve farklılaşmasında önemli rolü olan bir grup proteazdır. İnsanlarda tahmin edilen 175 üyeden oluşur. Bunların çoğu salgılanan proteazlardır. Genellikle zimojenler olarak bulunurlar ve spesifik ve sınırlı proteoliz ile aktive edilmeleri gerekir. Birkaç serin proteaz, prostat kanserinin oluşumunda yer alan önemli faktörler olarak bilinir. Prostat kanserinde PSA, MMP'ler ve diğer proteazların rolü, hücre dışı matriksin bozulması ve kanser hücrelerinin kemikler, akciğerler vb. gibi başka organlara metastaz yapmasına olanak sağlaması ile ilişkilidir. Bu serin proteazları farklı terapötik ajanlarla hedeflemek, prostat kanseri tedavisinde önemli bir strateji olabilir. Bor bileşiklerinin prostat kanseri hücreleri üzerindeki etkileri hakkında ilgili literatürden elde edilen sonuçların analizi, uygun dozlarda kullanıldığında borik asit gibi farklı bor bileşiklerinin prostat kanseri için potansiyel tedavi edici ajan olabileceğini göstermiştir. Bu nedenle, çalışmamızda LNCaP hücreleri kullanılarak, farklı kimyasal yapıya sahip olan bor bileşiklerinin (D1, D3 ve D6) prostat kanseri gelişimi ve ilerlemesinde anahtar faktörlerden biri olan serin proteazların gen ve protein düzeyleri üzerine olan etkileri sorgulanmaya çalışıldı. Bu amaçla farklı sürelerde ve farklı konsantrasyon değerlerinde bor bileşikleri hücrelere uygulanarak AR, PSA, MMP 2 ve MMP 9 gibi hedef genlerin ve proteinlerin ekspresyon seviyeleri sırasıyla QRT-PCR ve western-blot metodolojileri ile incelendi. Bor bileşiklerinin prostat kanseri hücrelerinin proliferasyonunu azalttığı, prostat kanseri gelişiminde kritik rol oynayan AR sinyalini inhibe ettiği ve MMP'ler ile serin proteazlar üzerinde gösterdiği transkripsiyonel ve translasyonel regülasyonlar aracılığıyla da hücrelerin metastatik potansiyelini azaltabileceği sonucuna varıldı. Bu bağlamda, özellikle sentetik androjen varlığında daha güçlü regülasyon gösteren bor bileşiklerinin ileri evre metastatik prostat kanseri hastalarının tedavisinde potansiyel adaylar olabileceği düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** prostat kanseri, bor birleşikleri, androjen reseptörü, serin proteazlar

**2022, x + 82 sayfa.**

## **ABSTRACT**

MSc Thesis

### **INVESTIGATING THE EFFECT OF BORON COMPOUNDS ON SERIN PROTEASES IN PROSTATE CANCER CELLS**

**Amina MUJALA**

Bursa Uludag University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Molecular Biology and Genetics

**Supervisor:** Associate Prof. Burcu ERBAYKENT

Serine proteases is a group of proteases that have important role in cell growth and differentiation. Group is made up of 175 predicted members in humans. The most of them are secreted proteases. They are often present as zymogens and need to be activated by specific and limited proteolysis. Several serine proteases are known as factors included in the genesis of prostate cancer. Role of PSA, MMPs and other proteases in prostate cancer is related to degradation of extracellular matrix and allowing cancer cells to metastasize toward another organs like bones, lungs etc. Targeting these serine proteases with different therapeutical agents can be important strategy for prostate cancer treatemen. Analysis of results from literatures related to chemical element boron and its compounds and their effects on prostate cancer cells shown that when used in appropriate doses, different boron compounds such as boric acid, could be potential curing agent for prostate cancer. Therefore, in our study, we used three different concentrations of boron compounds D1, D3 and D6 to see if there is any effect on androgen receptor as well as particular serine proteases. We examined effects of these boron compounds onto two sets of LNCaP cell line. According to results we obtained from MTT, qPCR and Western blot analysis, we concluded that boron compounds could be potentially effective in decreasing levels of AR and automatically decrease abnormal proliferation of cancer cells. Therefore, examined boron compounds used in right concentrations, could be curative agents in prostate cancer therapy.

**Key words:** prostate cancer, boron compounds, androgen receptor, serine proteases

**2022, x + 82 pages.**

## TEŞEKKÜR

Öncelikle, Türkiye’de eğitim gördüğüm süreçte, bana yardım eden ve yol gösteren akademik danışmanım Doç. Dr. Burcu Erbaykent’e içten teşekkür etmek isterim.

Her zaman arkamda duran ve destek veren aileme de derin ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak, beni yalnız bırakmayan ve motive eden bütün arkadaşlarıma da teşekkürlerimi sunarım.

18/07/2022  
Amina Mujala

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	ii
TEŞEKKÜR .....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	5
2.1. Prostat bezi tanımı .....	5
2.1.1. Prostat bezinin anatomisi.....	5
2.1.2. Prostat bezinin fizyolojisi .....	5
2.2. Prostat kanseri.....	6
2.2.1. Prostat kanserinin genetiği .....	6
2.2.2. Prostat kanserinin hücre kaynağı.....	7
2.2.3. Prostat kanserinin hücre hatları .....	8
2.2.4. Androjen-bağımlı prostat kanseri .....	9
2.2.5. Androjen-bağımsız prostat kanseri .....	9
2.2.6. Prostat kanserinin tedavisi .....	11
2.3. Prostat bezinin diğer hastalıkları.....	11
2.3.1. İyi huylu prostat hiperplazisi .....	12
2.3.2. Prostatit.....	12
2.4. Androjen reseptörü .....	13
2.4.1. Prostat kanserinde AR'deki değişiklikler.....	14
2.4.2. Androjen reseptörü sinyal yolu.....	15
2.5. Serin proteazlar.....	16
2.5.1. Prostat spesifik antijen (PSA).....	16
2.5.2. PSA'nın işlevleri .....	17
2.5.3. Matriks metalloproteinazlar (MMP'ler).....	18
2.5.4. MMP'lerin işlevleri.....	19
2.5.5. Metalloproteinazın doku inhibitörü (TIMP).....	20
2.5.6. Tip II transmembran serin proteazları (TTSP'ler) .....	21
2.5.7. TTSP'lerin işlevleri .....	21
2.6. Bor ve prostat kanseri .....	23
2.6.1. Kimyasal özellikleri.....	23
2.6.2. Borun hücreler üzerine etkileri .....	23
2.6.3. Borun prostat kanserindeki etkileri.....	23
3. MATERYAL ve METOTLAR.....	26
3.1. Hücre Kültürü .....	26
3.1.1. Materyal.....	26
3.1.2. Hücrelerin bakımı ve pasajlanması.....	27
3.1.3. Hücrelerin dondurulması ve çözündürülmesi .....	28
3.1.4. Hücre sayımı.....	28
3.1.5. D1, D3 ve D6 bor bileşeklerinin özellikleri ve yapısı .....	29



3.1.6. Serum yoksunluğu ve madde (bor bileşikleri ve sentetik androjen (R1881)) uygulamaları .	30
3.1.7. Sitotoksosite analizleri (MTT) .....	31
3.2. Real-Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) .....	31
3.2.1. Materyal.....	32
3.2.2. RNA izolasyonu.....	34
3.2.3. cDNA sentezi.....	35
3.2.4. Real-Time PCR .....	35
3.3. Western Blot (İmmünoblotlama) .....	37
3.3.1. Materyal.....	37
3.3.2. Protein izolasyonu .....	41
3.3.3. Protein miktarının belirlenmesi .....	41
3.3.4. Proteinlerin SDS-PAGE ile ayrılması.....	42
3.3.5. Jel hazırlama.....	42
3.3.6. Örnek hazırlama .....	43
3.3.7. Proteinlerin jele yüklenmesi ve jelde yürütme .....	44
3.3.9. Antikor işaretlemesi.....	45
3.3.10. Bantların görüntülenmesi.....	45
4. BULGULAR .....	47
4.1. Sitotoksosite Sonuçları (MTT).....	47
4.2. qPCR sonuçları .....	48
4.3. Western Blot Sonuçlar .....	54
5. TARTIŞMA ve SONUÇ .....	61
KAYNAKLAR.....	70
ÖZGEÇMİŞ.....	82

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
mL	Mililitre
$\mu$ g	Mikrogram
$\mu$ L	Mikrolitre
$\mu$ M	Mikromolar
$^{\circ}$ C	Santigrat derece
%	Yüzde

### Açıklama

### Kısaltmalar

A1	Adenosine receptor 1
AFS	Anterior fibromuscular stroma
AP-1	Activator protein 1
APP	Amyloid precursor protein
AR	Androgen receptor
ATCC	American Type Culture Collection
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
BA	Boric acid
BPH	Benign prostatic hyperplasia
BRCA1	Breast cancer type 1
BRCA2	Breast cancer type 2
CHEK2	Checkpoint kinase 2
CRPC	Castration Resistant Prostate Cancer
CZ	Central zone
DNA	Deoxyribonucleic acid
DTD	DNA binding domain
ECM	Extracellular matrix
EGF	Epidermal growth factor
ERG	ETS-related gene
GWAS	Genome-wide association study
HOXB13	Homeobox B13
HSP	Heat shock proteins
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IGF1R	Insulin-like growth factor 1 receptor
LBD	Ligand binding domain
LNCaP	Lymph Node Carcinoma of the Prostate
MMP	Matrix metalloproteinase
MT1	Metallothionein-1

### Açıklama

NHANES	National Health and Nutrition Examination Survey
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor kappa B
NTD	N-terminal domain
PALB2	Partner And Localizer Of BRCA2
PC-3	Prostate Cancer Cell Line 3
PCa	Prostat kanseri
PIN	Prostatic intraepithelial neoplasia
PSA	Prostat specific antigen
PZ	Periferal zone
RAD51D	RAD51 Paralog
RECK	Reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs
RFX6	Regulatory Factor X6
SNP	S ingle Nucleotide Polymorphism
TGF- $\alpha$	Transforming growth factor alpha
TIMP	Tissue inhibitors of metalloproteinases
TMPRSS2	Transmembrane protease, serine 2
TZ	Terminal zone
uPA	Urokinase-type plasminogen activator
VEGF	Vascular endothelial growth factor

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
Şekil 2.1. Prostat dört anatomik bölgeden oluşur; merkezi (CZ), periferik (PZ) ve transisyon (TZ) bölgeleri ve ön fibromüsküler stroma (AFS).....	5
Şekil 2.2. İnsan prostat kanseri ilerlemesi.....	6
Şekil 2.3. Prostat Kanserinin Androjene Bağlı ve Androjenden Bağımsız İlerlemesi. Androjene bağlı ilerleme sırasında, prostat kanseri hücreleri büyüme ve hayatta kalma için öncelikle androjen reseptörüne bağlıdır. Androjen bağımsız ilerleme sırasında, tümör hücrelerin bazıları AR'yi içeren çeşitli hücresel yollara dayanır ve diğerleri ise AR'yi atlamaktadır.....	9
Şekil 2.4. Prostat bezinin kötü huylu olmayan hastalıklar.....	11
Şekil 2.5. Androjen reseptörünün (AR) şematik gösterimi, proteinin temel fonksiyonel alanlarını içermektedir.....	12
Şekil 2.6. Birkaç mekanizma, prostat kanserinin ilerlemesini destekler: (1) AR aşırı ekspresyonu (2) Alternatif ligandlarının mutant AR'nin rastgele bağlanması ve aktivasyonu (3) Ligandan bağımsız AR aktivasyonunun mekanizmaları (4) AR'den bağımsız yollar.....	14
Şekil 2.7. Kanonik Genomik AR Sinyal Yolu. (A) AR'ye androjen bağlanması üzerine, ısı şoku proteinleri ayırır ve (B) AR, NTD-CTD monomerlerini oluşturur. (C) Bu monomerler çekirdeğe yer değiştirir ve (D) NTD-LBD homodimerlerini oluşturur. (E) Her iki androjene bağlı homodimer (C,D), normal prostat fonksiyonu ile ilgili bir transkripsiyonel programı yürürlüğe koymak için ARE'lerde DNA'ya bağımlı bir DBD-DBD homodimeri oluşturur.....	15
Şekil 2.8. Serbest PSA, proPSA'yı (ve diğer çeşitli formları), BPSA'yı (iyi huylu PSA) ve etkisizleştirilmiş PSA gibi diğer serbest PSA formlarını içerir. Kompleks PSA, ACT (a1-antikimotripsin), API (a1-proteaz inhibitörü) ve A2M (a2-makroglobulin) gibi proteazlara bağlanan serbest PSA'yı içerir.....	17
Şekil 2.9. Prostat kanseri ilerlemesinin birkaç ayırt edici özelliğinde MMP'lerin rolleri.....	18
Şekil 3.1. D1 (Bor askorbat diester sodyum tuzu).....	29
Şekil 3.2. D3 (Bor laktoz diester sodyum tuzu).....	29
Şekil 3.3. D6 (Bor salisilat monoester sodyum tuzu).....	30
Şekil 4.1. LNCaP hücre hattında üç farklı bor bileşiğinin konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığına etkisi.....	47
Şekil 4.2. Bor bileşiklerinin AR, KLK 3 (PSA) ve TP53 genlerinin mRNA miktarlarına etkisi.....	48
Şekil 4.3. Bor bileşiklerinin farklı MMP genlerinin mRNA miktarlarına etkisi.....	49
Şekil 4.4. Bor bileşiklerinin farklı serin proteaz genlerinin mRNA miktarlarına etkisi.....	50
Şekil 4.5. Bor bileşiklerinin ve R1881'in AR, PSA ve TP 53 gen ekspresyonu seviyelerine etkisi.....	51
Şekil 4.6. Bor bileşiklerinin ve R1881'in farklı MMP'lerin gen ekspresyonu seviyelerine etkisi.....	53

Şekil 4.7.	Bor bileşiklerinin ve R1881'in farklı serin proteazların gen ekspresyonu seviyelerine etkisi.....	55
Şekil 4.8.	LNCaP hücrelerinin üç farklı konsantrasyonda üç farklı bor bileşiği uygulaması sonucunda prostat kanserine özgü proteinleri (PSA ve AR) ifadelerindeki değişikliklerin karşılaştırmalı analizi ( $\beta$ -Aktin yükleme kontrolü amacıyla kullanılmıştır).....	56
Şekil 4.9.	LNCaP hücrelerine farklı konsantrasyonlarda bor bileşiklerinin uygulanması sonucunda <i>Image J</i> yazılımı ile elde edilen AR ve PSA protein ekspresyonunun kat değişiklikleri.....	56
Şekil 4.10.	LNCaP hücrelerinin üç farklı konsantrasyonda üç farklı bor bileşiği uygulaması sonucunda matriks metalloproteinazların (MMP) ifadelerindeki değişikliklerin karşılaştırmalı analizi ( $\beta$ -Aktin yükleme kontrolü amacıyla kullanılmıştır)....	57
Şekil 4.11.	LNCaP hücrelerine farklı konsantrasyonlarda bor bileşiklerinin uygulanması sonucunda <i>Image J</i> yazılımı ile elde edilen MMP 2, MMP 9 ve TIMP 2 ekspresyonunun kat değişiklikleri.....	57
Şekil 4.12.	LNCaP hücrelerinin üç farklı bor bileşiği ve R1881 uygulaması sonucunda PSA ve AR protein ifadelerindeki değişikliklerin karşılaştırmalı analizi ( $\beta$ -Aktin yükleme kontrolü amacıyla kullanılmıştır).....	58
Şekil 4.13.	LNCaP hücrelerine bor bileşiklerinin ve R1881'in uygulanıp uygulanmaması sonucunda <i>Image J</i> yazılımı ile elde edilen AR ve PSA ekspresyonunun kat değişiklikleri.....	59
Şekil 4.14.	LNCaP hücrelerinin üç farklı bor bileşiği ve R1881 uygulaması sonucunda matriks metalloproteinazların (MMP) ifadelerindeki değişikliklerin karşılaştırmalı analizi ( $\beta$ -Aktin yükleme kontrolü amacıyla kullanılmıştır).....	60
Şekil 4.15.	LNCaP hücrelerine bor bileşiklerinin ve R1881'in uygulanıp uygulanmaması sonucunda <i>Image J</i> yazılımı ile elde edilen MMP2, MMP 9 ve TIMP ekspresyonunun kat değişiklikleri.....	60

## ÇİZELGELER DİZİNİ

		<b>Sayfa</b>
Çizelge 3.1.	Real-Time PCR’da ekspresyon profilleri analiz edilecek genler.....	35
Çizelge 3.1.	Real-Time PCR’da ekspresyon profilleri analiz edilecek genler (devam).....	36
Çizelge 3.2.	Protein moleküler ağırlığına göre jel konsantrasyon yüzdeleri.....	42
Çizelge 3.3.	Ayırma jeli bileşenlerinin farklı yüzde değerleri için oranları.....	43
Çizelge 3.4.	Farklı yüzde değerleri için depolama jeli bileşenlerinin oranları.....	43

## 1. GİRİŞ

Kanser, dünya çapında ölüm nedenlerinden biridir. Doku düzeyinde çeşitlilik gösteren bir hastalıktır ve bu özelliği, spesifik teşhisi ve ardından tedavi olanakları için en büyük zorluğu oluşturmaktadır (Fisher ve ark. 2013). Kanser, hücre fonksiyonlarında değişikliklere neden olan genlerdeki bir dizi ardışık mutasyonun bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Genel olarak, kanser hücreli ilişkileri bozmakta ve bu da genlerin işlev bozukluğuna neden olmaktadır (Seto ve ark. 2010). Hücre döngüsünün etkinliğinin de bozulmasına yol açan bu durum anormal çoğalma ile sonuçlanmaktadır. Tümörler bir kez oluştuğunda, uygun hormonların aşırı üretimi ile hücrelerin büyümesi ve metastazı desteklenmektedir (hormonal olarak bağımlı kanserlerde). Bu hormonların aşırı üretimi, aynı zamanda epitelyal-mezenkimal geçişi tetikleyerek ve çevredeki stromal hücrelerden sinyaller olarak anjiyogenezin desteklenmesine yardımcı olmaktadır (Feitelston ve ark. 2015).

Androjen reseptörü (AR) gen amplifikasyonu, prostat karsinomu gelişiminin ana nedenlerinden biri olarak tanımlanmaktadır. Prostat, erkeklerde ejakülat sıvısının büyük bölümünü sağlayan bir salgı bezidir. Prostat kanserlerinin yaklaşık % 70'i prostatın alt periferik bölgesinde meydana gelmektedir. Meme kanserinden farklı olarak prostat kanseri hücre büyümesi yaygındır ve büyük tümörler oluşturmaz. Prostat kanseri için güvenilir biyokimyasal belirteçler yoktur ve prostat spesifik antijeninin (PSA) yaygın olarak kullanılan ölçümünün bile sadece iyi huylu prostat hiperplazisinin bir göstergesi olduğu gösterilmiştir (Stamey ve ark. 2004). Prostat kanseri, batı ülkelerinde yaşayan erkeklerde en sık görülen deri dışı kanserdir (Hsing ve Devesa 2001). Hastalığın etiolojisinde çevrenin önemi, küresel dağılımına bakıldığında kolayca anlaşılmaktadır. Bazı çalışmalar, kanser hastalığı riskinin diyetle alınan bor alımıyla ters orantılı olduğunu göstermektedir.

Bor özellikle kayalarda, toprakta ve suda olmak üzere her yerde bulunan bir elementtir. Büyük sömürülebilir depolar, Batı Anadolu (Türkiye), Mojave Çölü (Kaliforniya, ABD) ve kuzeydoğu Çin'deki Liaoning eyaleti gibi jeotermal faaliyet geçmişi olan kurak bölgelerde bulunmaktadır. Borik asit ve tuzlarının deterjan ve ağartıcılardaki klasik uygulamalarının yanı sıra, bor bileşiklerinin üretimi ve kullanımı son on yılda istikrarlı bir şekilde artmıştır.

Bor, en düşük ve en yüksek diyet alımı arasındaki ayarlanmış olasılık oranında % 54'lük bir farkla doza bağımlı bir şekilde prostat kanseri riskini azaltmaktadır (Zhang ve ark. 2001, Cui ve ark. 2003).

Bir epidemiyolojik çalışma, tüketilen bor ve prostat kanseri arasında ters bir ilişki bulurken (Cui ve ark. 2004), Barranco ve Eckhert, borik asidin kültür prostat kanseri hücrelerinin (DU-145) büyümesini tamamen inhibe etme olasılığını gösteren çalışmalar yayınlamıştır (Barranco ve ark. 2004). Ayrıca, Carper ve arkadaşları, doza bağlı bor miktarlarının, DU-145, PC-3 ve LNCaP prostat hücre kültürleri üzerinde toksik veya sitotoksik bir etkinin aksine kontrollü apoptozu tetikleyebileceğini göstermiştir (Carper ve ark. 2007). Çalışmaları ayrıca 1 mmol/L borik asidin DU-145 hücrelerinin büyümesini önemli ölçüde inhibe ettiğini, LNCaP kültür hücrelerinin büyümesini nispeten inhibe ettiğini ve PC-3 kültür hücrelerinin büyümesi üzerinde sessiz bir etkiye sahip olduğunu ortaya koymuştur. Bor analogları olarak bilinen fenilboronik asit ve hidroksimetil fenilboronik asitin, borik asit ile yapılan çalışmalara benzer şekilde in vitro kanser hücrelerinin büyümesi üzerinde inhibitör etkilere sahip olduğu rapor edilmiştir (Gallardo-Williams ve ark. 2007).

Borun prostat kanseri dışında diğer kanser türleri ile de ilişkili olduğu yapılan çalışmalarda bildirilmiştir. Örneğin; 1 mmol/L borik asidin in vitro meme kanseri hücrelerinin büyümesini engelleyebildiği gösterilmiştir (Elegbede 2007). Bor ayrıca, rahim ağzı kanseri üzerinde de etki göstermektedir. Ortalama bor alımı yüksek olan (günde 8,41 mg) 472 ve daha düşük ortalama bor alımı (günde 1,26 mg) olan 587 kadında yapılan bir çalışmada, düşük seviyelerde bor tüketen kadınlarda 15 serviks kanseri sitopatolojik endikasyonu saptanırken, yüksek bor alımı olan kadınlarda herhangi bir patolojik bulguya rastlanmamıştır (Korkmaz ve ark. 2007). Akciğer kanserli 763 kadın ve 838 sağlıklı kontrol ile yapılan bir çalışmada ise, bor alımının kanser insidansı ile ters orantılı olduğu belirlenmiştir.

Serin proteazlar, yiyeceklerin sindirimi, diğer proteazların aktivasyonu, spesifik reseptörlerin ve büyüme faktörlerinin aktivasyonu, pıhtılaşma ve fibrinoliz, peptid hormonlarının işlenmesi, doku yeniden şekillenmesi ve hücre dışı matriks proteinlerinin bozulması gibi



hayvanlarda çeşitli biyolojik fonksiyonlara sahiptir. Ayrıca kanserin her ayırt edici özelliğinde önemli bir rol oynamakta ve faaliyetleri biyolojik belirteçler olarak kullanılabilir. kullanılabilmektedir.

Prostat kanseri gelişiminde rol oynayan en popüler serin proteazlardan biri, kallikrein-3 olarak da adlandırılan PSA'dır. Prostat bezi tarafından oluşturulan bir glikoprotein olan PSA, serumu sıvılaştırmada, sperm hareketliliğini arttırmada ve servikal mukusu çözmede rol oynamaktadır (Arneth 2009). PSA 1970'lerde Richard Ablin tarafından keşfedilirken (Ablin 2010), prostat kanserinin erken teşhisine yönelik olanakları 1991'de Catalona ve arkadaşları tarafından yapılan araştırmada rapor edilmiştir (Catalona ve ark. 1991). O zamandan beri, prostat kanserinin saptanmasında belirteç olarak PSA kullanılmaktadır. Serum prostat spesifik antijen (PSA) ile prostat kanseri taraması, kanseri tedavi etmek hala mümkünken prostat kanserini erken, müdahale edilebilir bir aşamada tespit etmeyi amaçlamaktadır. Bununla birlikte, kanıtlar prostat kanserinde PSA taramasının hayat kurtardığını göstermemekle birlikte aşırı teşhis gibi artan zararlarla ilişkilendirilebilmektedir (Djulgovic ve ark. 2010).

Kanser gelişiminde diğer popüler olan serin proteazlar, matris metalloproteinazlar (MMP'ler) ve metalloproteinazların doku inhibitörleridir (TIMP'ler). MMP'ler ve onların doğal inhibitörleri (matriks metalloproteinazların doku inhibitörleri; TIMP) arasındaki denge, hücre homeostazının korunmasında önemli bir faktör gibi görünmektedir. Bu dengeyi bozabilecek herhangi bir değişiklik kanserin gelişmesine ve ilerlemesine neden olabilmektedir (Jia ve ark. 2014). Ayrıca, hücre yüzeyine sabitlenmiş serin proteaz ekspresyonunun regülasyonunun kaybı ve bunların katalitik aktiviteleri, çeşitli kanser türlerinin etiyolojisine katkıda bulunmaktadır. Tip 2 transmembran serin proteaz (TTSP) ailesi insanlarda 17 üye içermektedir. Bunlardan bazıları Tip II transmembran serin proteazlar, hepsin, TMPRSS2, TMPRSS3, TMPRSS4, vb. üyelerdir (Martin ve List 2019).

Bu bilgiler ışığında bu çalışmada hormon (androjen) bağımlı prostat kanseri hücre hattı LNCaP kullanılarak, farklı kimyasal yapıya sahip olan bor bileşiklerinin (D1, D3 ve D6)

prostat kanseri gelişimi ve ilerlemede anahtar faktörlerden biri olan serin proteazların gen ve protein düzeyleri üzerine olan etkileri sorgulanmaya çalışıldı. Bu amaçla farklı sürelerde ve farklı konsantrasyon değerlerinde bor bileşikleri hücrelere uygulanarak AR, PSA, MMP2 ve MMP9 gibi hedef genlerin ve proteinlerin ekspresyon seviyeleri sırasıyla QRT-PCR ve western-blot metodolojileri ile incelendi. Aynı zamanda normal (starvasyonsuz) ve starvasyon koşullarında hücrelere uygulamalar yapılarak bor bileşiklerinin serin proteazlar üzerinde gösterdikleri etkilerde farklılık olup olmadığı da araştırıldı.

## **2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI**

### **2.1. Prostat bezi tanımı**

#### **2.1.1. Prostat bezinin anatomisi**

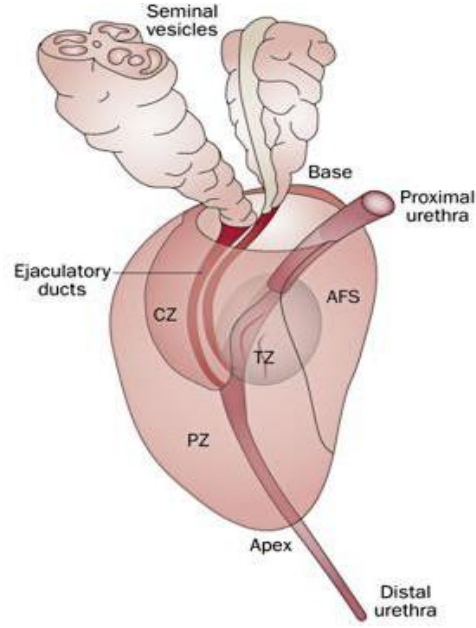
Prostat bezi, mesanenin tabanında bulunan ve üretrayı çevreleyen yardımcı bir erkek üreme organıdır. Çinko, sitrik asit, kalsiyum, fosfatlar ve sperm sağlığı ve hareketliliği için gerekli olan diğer enzimleri içeren prostat salgıları üretir. Boşalma sırasında meni, boşalma kanallarından geçer ve prostat bezinde salgılarla karışır (Risbridger 2018).

Prostat sıvıları, kanallarda biriken epitel hücrelerinin son ürünüdür. Çevreleyen stromadan bir bazal membran ile ayrılırlar. Epitel, bazal, nöroendokrin ve salgı (lümen) hücrelerini içerir ve polarizedir, böylece salgılar, PSA (prostatik spesifik antijen) dahil olmak üzere, epitelin luminal kısmında ortaya çıkar. Çevreleyen fibromusküler stroma düz kas hücreleri, fibroblastlar, sinirler, bağışıklık hücreleri, endotel hücreleri ve kan damarlarından oluşur. Bezlerden proteinlerin dışarı atılması için düz kaslar gereklidir (Risbridger 2018).

Anatomik olarak, prostat bezinin insanda 4 ayrılabilir anatomik bölgesi vardır: merkezi (CZ), geçiş (TZ), perifetal (PZ) ve anterior fibromusküler bölgeler, her biri benzersiz bir morfoloji ve fizyolojiye sahiptir. Farklı bölgelerden farklı prostat hastalıkları ortaya çıktığı için prostatın anatomik bölgeleri özellikle önemlidir (Risbridger 2018).

#### **2.1.2. Prostat bezinin fizyolojisi**

Prostat ekzokrin bir bezdir. Prostatın ekzokrin salgıları ejakülat hacminin %15'ini oluşturur, ancak bu sıvı doğurganlık için gerekli değildir. Mesane boynu ve üretra ile birlikte prostat, boşalma sırasında koordineli antegrad sperm iletiminde kritik bir rol oynar. Boşalma sırasında prostat, mesane boynu ve vas deferens düz kaslarındaki  $\alpha_1$  reseptörlerini içeren sempatik sinir lifleri, seminal sıvının ve spermın prostat üretrasına salınmasına ve mesane boynu ile prostat üretrasının kapanmasına neden olur. Bu kapatma, boşalma sırasında sperm ve seminal sıvınının mesaneye girmesini engeller ve normal boşalma için gereklidir (Aronson ve deKernion 2007).



**Şekil 2.1.** Prostat dört anatomik bölgeden oluşur; merkezi (CZ), periferik (PZ) ve transisyon (TZ) bölgeleri ve ön fibromusküler stroma (AFS) (Risbridger 2018).

## 2.2. Prostat kanseri

Prostat kanseri (PCa), dünya çapında erkeklerde en sık görülen malignitelerden biridir ve gelişmiş ülkelerde kansere bağlı ölümlerin ikinci önde gelen nedenidir (Fan ve ark. 2018). PCa yaş, diyet ve gen anormalliklerinin neden olduğu bir hastalık olarak kabul edilmektedir (Shen ve Abate-Shen 2010). Biriken kanıtlar, bir dizi gen ve sinyal yolağın PCa'nın oluşumu, ilerlemesi ve metastazında rol oynadığını göstermiştir (Liu ve ark. 2018).

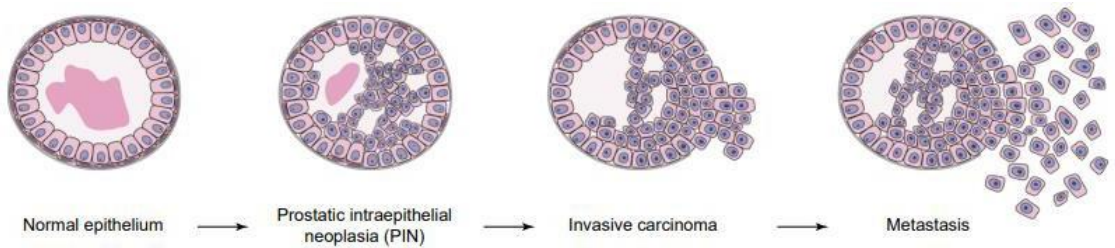
### 2.2.1. Prostat kanserinin genetiği

Çoklu çalışmalardan özellikle epidemiyolojik çalışmalar, ikiz çalışmalar ve büyük ölçekli genom çapında ilişkilendirme çalışmaları (*ing.* GWAS), prostat kanserinin genetik bir bileşeni olduğunu göstermiştir. Epidemiyolojik çalışmalar, ailede prostat kanseri geçmişinin riski önemli ölçüde artırdığını ortaya koyarken (Lange 2010), ikiz çalışmalar prostat kanserinin kalıtsal kanserler arasında en yüksekte olduğunu göstermektedir (Lichtenstein ve ark. 2000).

Yapılan genomik çalışmalar ise HOXB13'teki ailesel mutasyonları (Breyer ve ark. 2012) ve BRCA2, ATM, CHEK2, BRCA1, RAD51D ve PALB2 gibi DNA onarım genlerinin mutasyonlarını tanımlamıştır (Pritchard ve ark. 2016). Ayrıca, farklı ırk/etnik gruplardan erkeklerde prostat kanseri insidansları ve sonuçlarında farklılıklar olduğu ve özellikle Afrika kökenli erkeklerin en yüksek insidans ve mortalite oranlarına sahip olduğu gözlemlenmiştir (Shenoy ve ark. 2016). Bu durum kısmen genetik faktörlere bağlanmaktadır (Huang ve ark. 2017).

### 2.2.2. Prostat kanserinin hücre kaynağı

Prostat kanserinin başlamasının yaşamın erken dönemlerinde gerçekleştiğine dair birçok kanıt vardır. Genellikle, tümör oluşumu ve kanser başlangıcı, yaşamın erken dönemlerinde lokalize, hareketsiz bir biçimde ortaya çıkar. Bu, histolojik olarak saptanabilen adenokarsinomun asemptomatik bir öncüsü olan prostatik intraepitelyal neoplazinin (*ing.* PIN) oluşumuna yol açar (Şekil 2.3). Farklı bazal ve sekretuar hücre tabakalarının kaybı ile epitel tabakasının kalınlaşması meydana gelir. Yüksek dereceli PIN, adenokarsinomun doğrudan bir öncüsüdür. Tüm PIN'in adenokarsinoma dönüşmediğini bilmek önemlidir. Bununla birlikte, yaşam boyunca somatik genomik değişiklikler sırasında PIN, metastaz yapma olasılığı olan bir lokal prostat tümörüne dönüşmektedir (Gandhi ve ark. 2018).



Şekil 2.2. İnsan prostat kanseri ilerlemesi (Abate-Shen ve Shen 2002).

### 2.2.3. Prostat kanserinin hücre hatları

İnsan kanserlerinden türetilen hücre hatları, kanser biyolojisini incelemek ve kanser tedavisinin etkinliğini artırmak için hipotezleri test etmek amacıyla en yaygın kullanılan modellerdir (Gillet ve ark. 2013).

Yararları öncelikle deneysel amaçlar için sınırsız bir biyolojik materyal kaynağı sağlama yetenekleriyle bağlantılıdır. Doğru koşullar altında ve uygun kontrollerle, kimliği doğrulanmış kanser hücre dizileri, kanserin genetik özelliklerinin çoğunu korur (Mirabelli ve ark. 2019).

- **LNCaP**

LNCaP hücreleri ilk önce bir lenf düğümünde bulunan insan metastatik prostat adenokarsinomundan izole edildi. Orijinal LNCaP hücre çizgisi, AR ve PSA mRNA/protein ekspresyonu ile androjene duyarlıdır. Bu hücre dizisinin AR kodlama dizisinde bir dizi steroid bileşiğine rastgele bağlanma afinitesi veren bir T877A mutasyonu içermesi özellikle not edilmelidir (Horoszewicz ve ark. 1980). Bu yavaş büyüyen hücre dizisi, her 60-72 saatte bir (serum konsantrasyonuna bağlı olarak) ikiye katlanır ve 33 ila 91 kromozomlu bir karyotipe sahiptir. TGF- $\alpha$ , EGF ve IGF-1 hormonlarına yanıt verirler ve EGF/TGF- $\alpha$ -R, FGF-R ve IGF-1-R'yi ifade ederler (Connolly ve ark. 1990).

Birçok LNCaP alt dizisi, steroid içermeyen ortamda LNCaP hücrelerinin uzun süreli kültürü veya artık androjene duyarlı büyüme göstermeyen hücreler oluşturmak için hadım edilmiş konakçılarda seri geçiş yoluyla türetilmiştir (Culig ve ark. 1999, Gao ve ark. 1999, Kokontis ve ark. 1998). Diğerleri, LNCaP hücrelerinin sürekli geçiş (>80) üzerine androjene duyarlı büyüme özelliklerini kademeli olarak kaybettiğini gözlemlemiştir (Denmead ve ark. 2003, Igawa ve ark. 2002). LNCaP hücrelerinin bu basit geçişinin, androjene bağımlı bir durumdan androjen bağımsız bir duruma doğru ilerleyen doğal prostat kanseri ilerlemesinin önemli bir modelini oluşturabileceği düşünülmektedir (Castanares ve ark. 2016).

#### **2.2.4. Androjen-bağımlı prostat kanseri**

Androjenler, normal prostatın yanı sıra prostat kanseri hücre büyümesi ve çoğalmasının birincil düzenleyicileridir. Androjene bağımlı ilerleme sırasında, prostat kanseri hücreleri, büyüme ve hayatta kalmanın birincil aracısı olarak androjen reseptörüne bağımlıdır (Feldman ve Feldman 2001).

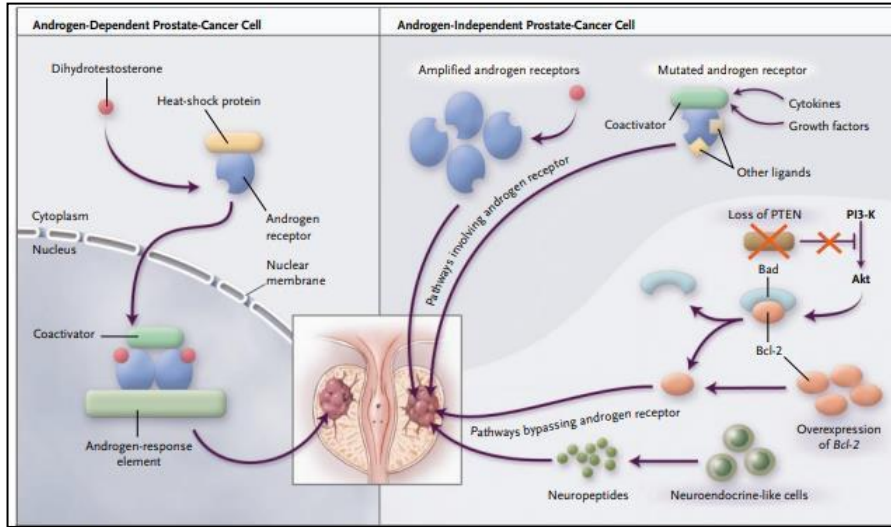
Testosteron hücreye girdiğinde, 5 $\alpha$ -redüktaz enzimi tarafından aktif metaboliti olan dihidrotestosterona, androjen reseptörüne daha yüksek afiniteye sahip daha aktif bir hormona dönüştürülür. Dihidrotestosteron sitoplazmadaki androjen reseptörlerine bağlanarak fosforilasyona, dimerizasyona ve ardından çekirdeğe translokasyona neden olur, böylece DNA içindeki androjen yanıt elementlerine bağlanır ve bunun sonucunda hücre büyümesi ve hayatta kalmasıyla ilgili genlerin aktivasyonu gerçekleşir (Pienta ve Bradley 2006).

Prostat kanserinin başlangıç evrelerinde, kötü huylu prostat kanseri hücreleri genellikle androjene bağımlıdır. Bu nedenle, bu tümörlerin büyümesini engelleyecek olan azalmış hormon seviyelerine androjen yoksunluk tedavisi ile ulaşılır. Ancak eninde sonunda kanser kastrasyona dirençli bir form haline dönüşür ve artık ek hormonal manipülasyonlara yanıt vermeyecek duruma gelir (Veltri ve Rodriguez, 2007).

#### **2.2.5. Androjen-bağımsız prostat kanseri**

Hemen hemen tüm prostat kanserleri androjene bağımlı bir durumda başlar, bu nedenle androjen yoksunluğu tedavisi uygulanır ve iyileştirilmiş klinik sonuçlarla sonuçlanır. Bununla birlikte, zamanla, bazı kanserli hücreler bu tedavi sırasında hayatta kalabilir ve büyüyebilir, bu da androjenden bağımsız prostat kanseri ile sonuçlanır. Bu noktada, etkili hedefe yönelik tedaviler bulunmadığından hastalık ölümcüldür.

Çoğu prostat kanseri tümörü, hayatta kalmak için androjen reseptörü (AR) sinyali gerektirir. Androjen bağımsızlığına ilerleme sırasında, bu sinyal zincirinin prostat kanserlerinde birçok düzeyde değiştiği bulunmuştur. Androjen yoksunluğu sırasında AR sinyalini artıran mekanizmalar şunları içerir: AR gen amplifikasyonları, AR gen mutasyonları, AR ortak düzenleyici proteinlerin ekspresyonundaki değişiklikler, steroid üreten enzimlerin ekspresyonundaki değişiklikler, 'yasadışı' yollar yoluyla AR'nin liganddan bağımsız aktivasyonu ve aktif hale gelen 'bypass' yolları olarak adlandırılan AR'den bağımsız yollar. Bu yukarıda bahsedilen değişikliklerden bir veya daha fazlası, prostat kanseri hücrelerinin androjenden bağımsız özellikler kazanmasına yol açabilir (Saraon ve ark. 2014).



**Şekil 2.3.** Prostat Kanserinin Androjene Bağlı ve Androjenden Bağımsız İlerlemesi. Androjene bağlı ilerleme sırasında, prostat kanseri hücreleri büyüme ve hayatta kalma için öncelikle androjen reseptörüne (AR) bağlıdır. Androjenden bağımsız ilerleme sırasında, tümör hücrelerinin bazıları AR'yi içeren çeşitli hücresel yollara dayanır ve diğerleri ise AR'yi atlamaktadır (Debes ve Tindall 2004).



### **2.2.6. Prostat kanserinin tedavisi**

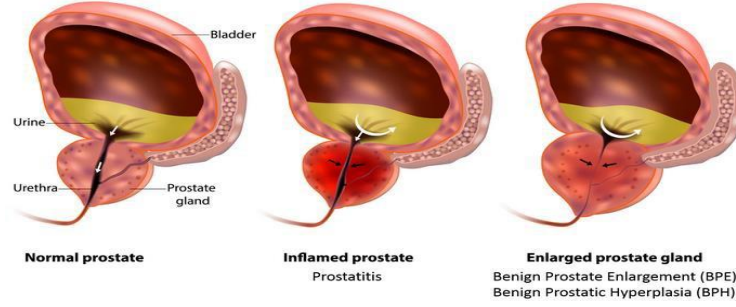
Bugüne kadar, bilgisayarlı tomografi (BT), ultrason, manyetik rezonans görüntüleme (MRI), tek foton emisyonlu bilgisayarlı tomografi (SPECT) ve pozitron emisyon tomografisi (PET) gibi geleneksel anatomik görüntüleme teknikleri yaygın klinik uygulamalarda kullanılmaktadır (Fass 2008).

Pca olan erkeklerin izlenmesinde oldukça sınırlı bir rol oynamalarına rağmen, tüm bu tanı araçlarının kendine özgü avantajları ve dezavantajları vardır (Fass 2008). Bu sınırlamalar, malign ve çevredeki malign olmayan dokuyu ayırt etme yetersizliğine bağlanabilir. Moleküler biyoloji ve klinik görüntüleme arasındaki yakın entegrasyon, birkaç yıl öncesine kadar geleneksel moleküler testler tarafından incelenen bir dizi biyolojik olayın izlenmesinde yararlı olan yeni moleküler görüntüleme ajanlarının geliştirilmesini kolaylaştırmıştır (Fass 2008).

Pca ile ilgili olarak, in vivo biyolojik olayların düşük seviyeli sinyallerinin amplifikasyonu, yeterince yüksek uzamsal ve zamansal çözünürlüğe sahip entegre görüntüleme platformlarının geliştirilmesi ile ilgili sorunların üstesinden gelinerek biyolojik süreçlerin nicelenmesi, karakterizasyonu ve zamanlaması konusunda ilerleme elde edilebileceği düşünülmektedir (Livi ve ark. 2014).

### **2.3. Prostat bezinin diğer hastalıkları**

Prostat kanserinin yanı sıra, erkekler arasında oldukça yaygın olan iki tip prostat bezi hastalığı daha vardır. Bu hastalıklar, iyi huylu prostat hiperplazisi (BPH) ve prostatitdir. Kötü huylu olmayan bu hastalıklar arasındaki temel farklılıklar Şekil 2.4'te sunulmuştur.



**Şekil 2.4.** Prostat bezinin kötü huylu olmayan hastalıkları (“Prostate Conditions”, Erişim tarihi 7.6.2022).

### 2.3.1. İyi huylu prostat hiperplazisi

Prostat büyümesi olarak bilinen iyi huylu prostat hiperplazisi (BPH), yaşlı erkeklerde sıklıkla görülen prostat hastalık durumlarından birisidir. Bu hastalık nedeniyle prostat üretraya baskı yapmakta ve ağrılı idrara çıkma gibi sorunlar ortaya çıkmaktadır. Ayrıca böbrek, idrar yolu veya mesanede komplikasyonlara neden olabilmektedir.

### 2.3.2. Prostatit

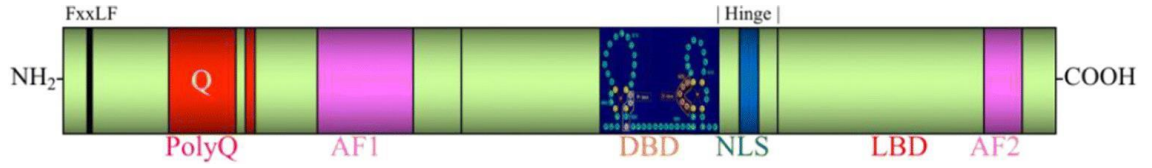
Erkekleri etkileyen yaygın ürogenital hastalıklardan bir diğeri ise prostatittir. Ayrıca hastaların yaşam kalitesini de olumsuz etkileyebilir. Alt karın, rektum ve perine ağrısı yaygın semptomlardan bazılarıdır. Ayrıca mesane tahrişine neden olabilir (Brede ve Shoskes 2011). İstatistiksel olarak, erkeklerin neredeyse yarısında farklı seviyelerde prostatit bulunmaktadır. Prostat kanseri ve benign prostat hiperplazisi daha çok yaşlı erkeklerle ilişkiliyken prostatit başta genç ve orta yaşlı erkekler olmak üzere her yaştaki erkekte ortaya çıkabilir (Drake ve ark. 2021). Erkeklerde en sık görülen üçüncü üriner hastalık olarak da bilinmektedir (Khan ve ark. 2017).

Prostatit esas olarak sınıf I akut bakteriyel prostatit, sınıf II kronik bakteriyel prostatit, sınıf III kronik prostatit/kronik pelvik ağrı sendromu ve sınıf IV asemptomatik inflamatuvar prostatite ayrılır (Krieger ve ark. 1999). Ayrıca kronik prostatit/kronik pelvik ağrı sendromu prostatit vakalarının %90-95'ini oluşturur (Sharma ve Kumar 2021).

## 2.4. Androjen reseptörü

Androjen reseptörü (AR), prostat gelişimi ve normal prostat fonksiyonu için gereklidir. Androjen reseptörü, nükleer reseptör süper ailesinin bir üyesidir ve östrojen reseptörü, progesteron reseptörü vb. gibi diğer hormonal reseptörlerle aynı yapıya sahiptir.

AR, X kromozomu üzerinde bulunur ve 110 kDa proteini kodlayan 8 ekzona sahiptir. AR'ü yapısal ve fonksiyonel olarak farklı dört bölgeden oluşmaktadır; düşük oranda korunmuş N-terminal bölgesi (NTD), yüksek oranda korunmuş DNA-bağlanma bölgesi (DBD), kısmen korunmuş olan Ligand-bağlanma bölgesi (LBD) ve *Hinge* Bölgesi . “*Hinge Bölgesi*” olarak adlandırılan kısa amino asit sekansı LBD ile DBD'ni birbirinden ayırmakta ve AR'nün nükleer transportu için gerekli nükleer lokalizasyon sinyalinin (NLS) içermektedir (Tan ve ark. 2015).



**Şekil 2.5.** Androjen reseptörünün (AR) şematik gösterimi, reseptör proteinin temel fonksiyonel alanlarını içermektedir (Arnold ve Merry 2019)

NTD'de glutamin tekrarları (CAG tekrarları) vardır ve bu glutamin tekrarları değişkenlik gösterir (çoğu erkekte 19-25 tekrar vardır), bu da AR'deki tüm amino asitlerin varyasyonu ile sonuçlanır. Daha kısa glutamin tekrarları olan erkeklerin prostat kanseri riski ise daha yüksektir (Giovannucci ve ark. 1997).

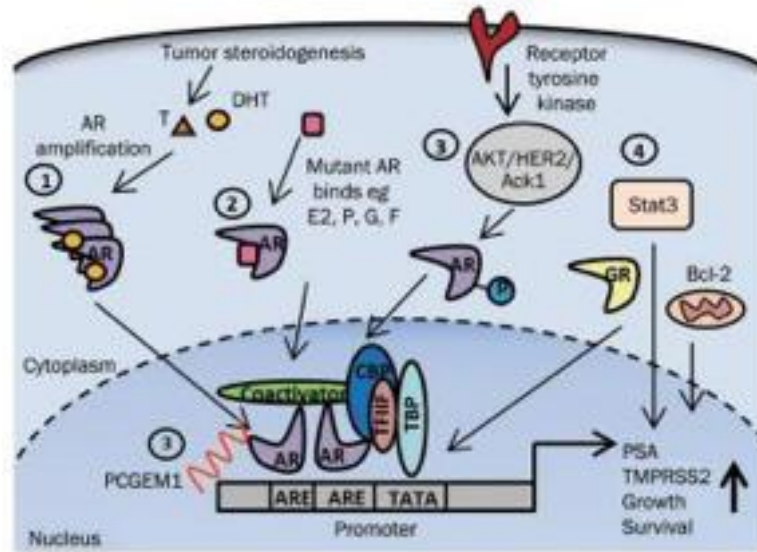
Testosteron ve dihidrotestosteron (DHT), LBD'ye bağlanır, ardından AR'de konformasyonel bir değişiklik meydana gelir. Sitoplazmada ligand bağlanmasından sonra AR, nükleusa yer değiştirir, bir dimer oluşturur ve hedef genlerin promotörlerinde bulunan androjen yanıt elemanlarına bağlanır (Fujita ve Nonomura, 2019). Bu bağlanma aracılığıyla AR; salgılanan proteinler (PSA), füzyon genleri (TMPRSS2-ERG), büyüme uyarıcıları (IGF1R, APP) ve benzeri dahil olmak üzere farklı işlevleri olan gen ifadelerini düzenler. Prostat

kanserinde genel olarak AR'nin fonksiyonları PSA sentezi, lipid metabolizmasının düzenlenmesi, büyümenin teşvik edilmesi ve çok çeşitli işlevleri içermektedir (Takayama ve Inoue 2013).

Normal prostatta, epitelyal AR, prostat spesifik antijen (PSA) gibi salgı proteinleri üretmek için fonksiyon gösterirken; stromal AR, prostat büyümesinde rol oynar. Farelerde, stromal AR'nin (fibroblastlar ve düz kas hücreleri) seçici olarak devre dışı bırakılması, prostatın normal gelişimini engellemektedir (Lai ve ark. 2012).

#### 2.4.1. Prostat kanserinde AR'deki değişiklikler

AR genindeki nokta mutasyonları, PCa hastalarının %15'i ile %30'unda (Waltering ve ark. 2012) ve en sık olarak LBD'de ile ardından NTD'de görülmektedir (Gottlieb ve ark. 2012). Bu nokta mutasyonları, ligand özgüllüğünün kaybedilerek AR'nin sürekli aktivasyonuna neden olabilmektedir. AR aşırı ekspresyonu, prostat kanserinin androjen bağımsız seviyeye ilerlemesine yol açar. Bu koşullarda AR amplifikasyonuna sahip prostat kanseri hücreleri, androjen yoksunluğu tedavisi altında hayatta kalabilir ve kastrasyon dirençli prostat kanserine (CRPC) ilerleyebilir (Azad ve ark. 2015).



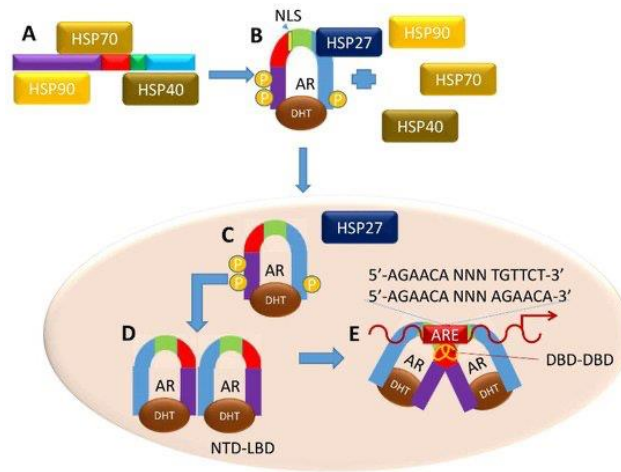
Şekil 2.6. Birkaç mekanizma, prostat kanserinin ilerlemesini destekler: (1) AR aşırı ekspresyonu

(2) Alternatif ligandlarının mutant AR'nin rastgele bağlanması ve aktivasyonu (3) Ligandan bağımsız AR aktivasyonunun mekanizmaları (4) AR'den bağımsız yollar (Tan ve ark. 2015).

#### 2.4.2. Androjen reseptörü sinyal yolu

AR sinyal yolu, prostat bezinin normal işleyişinde ve spermatogenezin başlatılması ve düzenlenmesinde önemli bir role sahiptir. İnsan AR geni nükleer bir transkripsiyon faktörüdür ve steroid hormon reseptör bileşenlerinden biridir.

Ligand yokluğunda, AR öncelikle ısı şoku proteinleri (HSP'ler), hücre iskeleti proteinleri ve diğer şaperonlarla birlikte sitoplazmada bulunur. Ligandın AR'ye bağlanması, LBD'de konformasyonel değişiklikleri indükler ve NTD ile CTD arasındaki molekül içi ve moleküller arası etkileşimi kolaylaştırır. Bu daha sonra AR homo-dimerizasyonu, fosforilasyonu ve nükleer translokasyonu ile sonuçlanır. Çekirdekte, liganda bağlı AR, hedef genlerin promotör ve güçlendirici bölgelerindeki “androjen yanıt elemanları (ARE)” olarak adlandırılan belirli tanıma dizilerine ve koregülatörlerine bağlanır ve böylece gen ekspresyonunu modüle eder (Green ve ark. 2012).



**Şekil 2.7.** Kanonik Genomik AR Sinyal Yolu. (A) AR'ye androjen bağlanması üzerine, ısı şoku proteinleri ayrışır ve (B) AR, NTD-CTD monomerlerini oluşturur. (C) Bu monomerler çekirdeğe yer değiştirir ve (D) NTD-LBD homodimerlerini oluşturur. (E) Her iki androjene bağlı homodimer (C, D), normal prostat fonksiyonu ile ilgili bir transkripsiyonel programı yürürlüğe koymak için ARE'lerde DNA'ya bağımlı bir DBD-DBD homodimeri oluşturur. (Messner ve ark. 2020).

PCa ilerlemesi sırasında, vakaların çoğunda AR sinyal yolu düzensizdir. Amplifikasyon / mutasyonlar, ko-aktivatör ve ko-baskılayıcı modifikasyonlar, anormal aktivasyon / post-translasyonel modifikasyon, değiştirilmiş steroidogenez ve AR splice varyantlarının oluşması nedeniyle ortaya çıkan aşırı AR ekspresyonu, düzensiz AR sinyallemesinin nedenlerinden bazılarıdır (Ramalingam ve ark. 2016). AR'deki mutasyonlar, PCa'nın ilk aşamalarında nadir olmasına rağmen CRPC sırasında yaygındır. Bu mutasyonlar, prostat mikro ortamında düşük seviyelerde androjen varlığında bile devam eden androjen aktivasyonuna izin verir (Taylor ve ark. 2010).

## **2.5. Serin proteazlar**

C-onkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin, kanser oluşumunda rol oynayan ana genleri temsil ettiği iyi bilinmektedir. Son çalışmalar, ekstrasellüler matriksi (ECM) parçalayan spesifik proteazların da prostat kanserinde önemli bir role sahip olabileceğini ortaya çıkarmıştır.

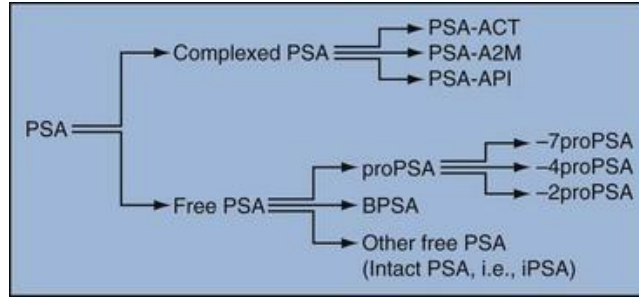
Proteazlar, ECM degradasyonu, adhezyonu, hücre büyümesi ve migrasyona katılarak kanserin ilerlemesinde kritik rol oynar. Bu nedenle, anormal bir ekspresyona sahip olan herhangi bir proteaz, kanserin olası bir biyobelirteci olabilir (Dudani ve ark. 2018). Kanser ilerlemesinin bir parçası olmak için, proteazların damar sistemine ve lenfatiklere girip çıkması gerekir (Ganguly ve ark. 2014). Artmış peritümöral proteolitik aktivite, proteaz aşırı ekspresyonunun, yanlış lokalizasyonun ve endojen proteaz inhibitörlerinin eksikliğinin bir sonucudur (LeBeau ve ark. 2015).

Bilinen serin proteazların listesi oldukça uzundur, ancak burada yalnızca tez çalışmasında kullanılmış olan serin proteazlardan bahsedilmiştir.

### **2.5.1. Prostat spesifik antijen (PSA)**

Prostat spesifik antijenin (PSA), ilk olarak 1979 yılında Wang ve ark. tarafından sadece normal, iyi huylu hiperplastik ve kötü huylu prostat dokusunda bulunduğu ve başka

herhangi bir insan dokusunda bulunmadığı bildirilmiştir (Wang ve ark. 1979). PSA, molekül ağırlığı 33 kDa ve karbonhidrat içeriği yaklaşık %7 olan bir glikoproteindir (Lilja 1993). PCa'lı hastaların prognozuna ve yönetimine yardımcı olmak için PSA seviyesinin belirlenmesi 1986'da Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylandı (Rittenhouse ve ark. 1998). Seminal plazmada PSA enzimatik olarak aktif serbest form olarak bulunurken, PSA serumda proteaz inhibitörleri ile bağlanarak inaktive edilmiş bir form olarak bulunur. Serum PSA'sı, ağırlıklı olarak  $\alpha$ -1-antikimotripsin ve  $\alpha$ -2-makroglobulin ile kompleks halinde bulunur (LeBeau ve Denmeade 2015). PSA'nın küçük bir fraksiyonu, PSA (proPSA), iyi huylu PSA (BPSA) ve olgun inaktif PSA'nın (iPSA) öncül izoformlarını içeren serbest PSA (fPSA) olarak sirküle edilir (Gilgunn ve ark. 2013).



**Şekil 2.8.** Serbest PSA, proPSA'yı (ve diğer çeşitli formları), BPSA'yı (iyi huylu PSA) ve etkisizleştirilmiş PSA gibi diğer serbest PSA formlarını içerir. Kompleks PSA, ACT ( $\alpha$ 1-antikimotripsin), API ( $\alpha$ 1-proteaz inhibitörü) ve A2M ( $\alpha$ 2-makroglobulin) gibi proteazlara bağlanan serbest PSA'yı içerir (Getzenberg ve Partin 2014).

### 2.5.2. PSA'nın işlevleri

PSA'nın birincil işlevi, yeni boşalmış spermde bulunan sperm yakalayan jelin çözülmesidir. PSA aslında jel oluşturan proteinler semenogelin I ve II ile fibronektini ayırır. Proteoliz daha sonra boşalmış spermin sıvılaşmasına ve giderek hareketli spermelerin salınmasına yol açar. Çinkoya ( $Zn^{2+}$ ) güçlü bir şekilde bağlanabilen semenogelinlerin varlığıyla PSA aktivitesi güçlü bir şekilde inhibe edilebilir. Ayrıca çinko, PSA'nın fizyolojik aktivitelerinin kontrolünde önemli bir rol oynar (Ménez ve ark. 2008).

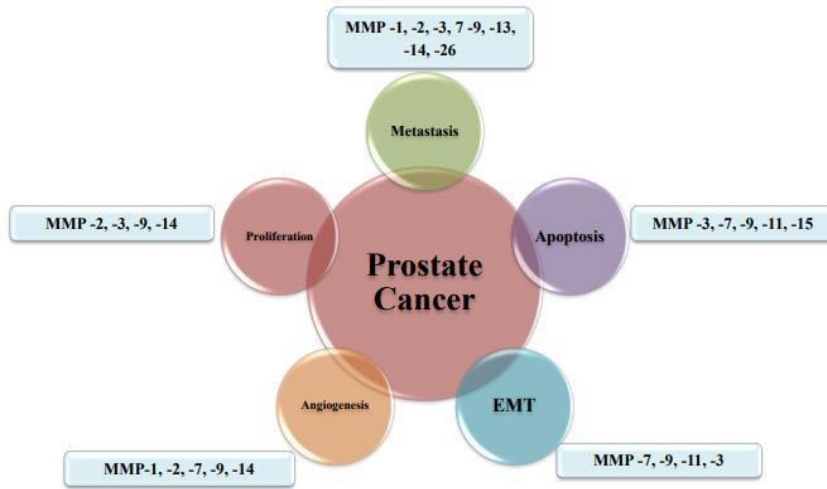
PSA'nın serum seviyelerinin ölçülmesi, prostat kanserinin taranması için kullanılan en önemli yöntemlerden biridir. Bununla birlikte, PSA sadece PCa için değil, zamanda diğer kanser dışı komorbiditeler için de karakteristiktir (Dudani ve ark. 2018). Normalde PSA

sadece seminal plazmada bulunabilir, çünkü prostat epitelyumu tarafından prostat kanalları yoluyla salgılanır ve oraya minimal sızıntı vardır. Yine prostat kanserinde, tümör dokusu içindeki glandüler yapının kaybı ve bazal membranın bozulması nedeniyle PSA kana karışabilir (Lawrence ve ark. 2010).

Ayrıca, PSA, tek zincirli pro-uPA'yı bölerek uPA'yı aktive edebilir ve böylece kanser hücresi istilasını kolaylaştırabilir. PSA, kanser için değil, prostat için spesifik bir belirteçtir (Lawrence ve ark. 2010). Enfeksiyon ve iyi huylu prostat hiperplazisi, yüksek PSA seviyelerine yol açar (Dudani ve ark. 2018). PSA testinin prostat kanseri ile ilgili tüm belirsizliği çözmesi ise beklenemez; bunun yerine, en iyi şekilde, diğer faktörlerle birlikte belirlenmesi gereken riskin bir göstergesi olarak düşünülebilir (Lilja, 1993).

### 2.5.3. Matriks metalloproteinazlar (MMP'ler)

Matriks metalloproteinazlar, çinkoya bağımlı olan ve hücre dışı matriksin yıkımında rol oynayan endopeptidaz tipi proteinlerdir. Morfogenez, anjiyogenez ve doku onarımı gibi çeşitli fizyolojik süreçlerle ilişkili doku yeniden şekillenmesinde ve ayrıca siroz, artrit ve kanser gibi patolojik süreçlerde önemli bir rol oynarlar. Ayrıca bağ dokusu bariyerlerini yıkarak tümör invazyonu ve metastaz araçları olarak da tanınırlar (Gong ve ark. 2014).



**Şekil 2.9.** Prostat kanseri ilerlemesinin birkaç ayırt edici özelliğinde MMP'lerin rolleri (Gong ve ark. 2014)



Prostat kanseri dokusunda, daha yüksek MMP aktivitesi, metastazı kolaylaştırarak ve hücre proliferasyonu, apoptoz, anjiyogenez ve epitelyalden mezenkimal geçişe (EMT) ilişkin çok sayıda adımı derinden etkileyerek kanserin ilerlemesine neden olur. Genellikle MMP'lerin prostat kanserinin ileri evrelerinde daha aktif olduğu düşünülmektedir. Prostat kanseri hastalarından alınan serum ve doku numunelerindeki MMP mRNA ve protein seviyelerinin analizi, artan MMP-2, -3, -7, -9 ekspresyonunun ilerlemiş veya metastatik hastalık ile ilişkili olduğunu göstermiştir. (Still ve ark. 2000, Levi ve ark. 1996, Incorvaia ve ark. 2007).

Homolog MMP ailesinin çeşitli üyeleri arasında, MMP-2, -7, -9 ve MT1-MMP, prostat kanseri ilerlemesindeki rolleri için en iyi çalışılanlardır. Hem MMP-2 (jelatinaz A) hem de MMP-9 (jelatinaz B), fibronektin benzeri jelatin bağlama alanları ile ayırt edilen bir proteolitik enzim grubu olan jelatinaz alt ailesinin üyeleridir. MMP-2'nin artan ekspresyonu, prostat kanserinde kapsamlı bir şekilde rapor edilmiştir ve daha yüksek MMP-2 ekspresyonu, daha büyük tümör boyutu ile ilişkilendirilmiştir (Still ve ark. 2000). Bir diğer çalışmada MMP-2 ekspresyonunun mikrometastazda ve düşük dereceli tümörlerin çevreleyen stromal hücrelerinde mevcut olmadığını, ancak metastatik hastalıkta mevcut olduğunu gösterilmiş, böylece artan MMP-2 ekspresyonunun prostat kanseri ilerlemesi ve metastazı ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Murray ve ark. 2012).

#### **2.5.4. MMPler'in işlevleri**

MMP-2'nin çeşitli kanser hücrelerinin yayılmasında ve invazyonunda ve anjiyogenezin aktivasyonunda önemli bir rol oynadığı yaygın olarak kabul edilmektedir. MMP-2, malign hücrelerden veya çevreleyen stromal bileşenlerden salınabildiğinden dolayı her bölmeden MMP-2 salgılanmasının tümör ilerlemesine nispi katkısı incelenmiştir. (Fang ve ark. 2000). Ayrıca hormona duyarlı prostat kanserinde birikmiş kanıtlar, MMP-2 ekspresyonunun R1881'den (sentetik androjen) etkilenebileceğini göstermiştir (Liao ve ark. 2003).

Hücre yüzeyinde ve salgılanmış formlarında değiştirilmiş MMP-9 ekspresyonunun prostat kanseri büyümesi, metastaz ve anjiyogenezin artmasına katkıda bulunduğu düşünülmektedir. PC-3 hücreleri, LNCaP ve DU-145 ile karşılaştırıldığında, hücre hatları arasında en yüksek

invaziv aktivite ile ilişkili olan MMP-9 ekspresyonunun arttığını göstermektedir (Aalinkeel ve ark. 2004). MMP-9'un zayıf metastatik LNCaP hücrelerinde sürekli ekspresyonu, MMP-9 aktivitesini ve ayrıca kanserin invazivliğini de iki katına çıkarır. (Aalinkeel ve ark. 2011). MMP-9 ayrıca anjiyogenezin düzenlenmesinde rol oynamaktadır. MMP-9 yıkımının hücrelerde, anjiyogenez baskılayan ve en güçlü anjiyojenik faktör olan VEGF'nin salgılanmasını azaltan önemli bir protein olan anjiyostatinin salınımını arttırdığı gösterilmiştir (Gupta ve ark. 2013).

Makrofaj metalloelastaz olarak da bilinen MMP-12, birçok kanser türünde aşırı eksprese edilir. Yüksek düzeyde MMP12 ekspresyonu, kanser hastalarında kötü prognoz ve artmış metastaz riski ile ilişkilendirilmiştir. Kanser hücrelerde, tümör mikro ortamının, NF- $\kappa$ B ve AP-1'in aktivasyonu yoluyla MMP-12 ekspresyonunu pozitif olarak düzenlediği bulunmuştur. MMP12'nin ayrıca hücre invazyonu, proliferasyonu ve anjiyogenez ile ilgili olduğu gösterilmiştir (Chung ve ark. 2014). *In vivo* olarak, MMP-12'nin öncelikle kemikte büyüyen prostat kanseri hücreleri tarafından eksprese edildiği bulunmuştur. Bir araştırmada kemik iliği stromal hücrelerinin, prostat kanseri hücrelerinde MMP-12 ekspresyonunu indüklediği ve bunun da tip I kollajeni parçalayabilen invaziv hücrelerle sonuçlandığı öne sürülmüştür (Nabha ve ark. 2008).

### **2.5.5. Metalloproteinazın doku inhibitörü (TIMP)**

Prostat dahil neoplastik hastalıklarda, MMP'ler ve inhibitörleri arasındaki, aşırı yıkım aktivitesine yol açan bir dengesizliğin, tümör hücrelerinin istila kapasitesi ile ilişkili olduğu varsayılmaktadır (Henriet ve ark. 1999). Salgılanan MMP'ler ve bunların spesifik düzenleyicileri arasındaki denge, normal ve patolojik dokularda bağ dokusu homeostazının korunmasında önemli bir rol oynar (Chen 1992).

MMP-9 esas olarak TIMP-1 tarafından düzenlenir ve Kazal motifli (RECK) reversiyon indükleyici sistein açısından zengin proteinin hem MMP-2 hem de MMP-9'u inhibe ettiği bildirilmiştir (Reis ve ark. 2011). Daha önceki çalışmalar, TIMP-1'i de içeren diğer TIMP'lerin kanser önleyici faaliyetler gösterdiğini rapor etmiştir (Zhang ve ark. 2007).

Bununla birlikte, son çalışmalar TIMP-1'in paradoksal bir pro-tümör etkisi olabileceğini de ifade etmektedir (Stetler-Stevenson, 2008). Sonuç olarak TIMP'ler, MMP'ye bağımlı ve MMP'den bağımsız bir şekilde kanser ilerlemesini etkileyebilir, ancak ikincisinin altında yatan mekanizma henüz iyi anlaşılamamıştır (Hoegy ve ark. 2001).

### **2.5.6. Tip II transmembran serin proteazları (TTSP'ler)**

Hücre zarına bağlı en büyük serin proteaz ailesi, Tip-II transmembran serin proteazlarıdır (TTSP) (Bugge ve ark. 2009). Hücre zarına, zar lokalizasyonu için sinyal veren tek bir amino terminal hidrofobik bölge ile bağlanırlar. Yaklaşık 17 bilinen üyeye sahip olan Tip II transmembran serin proteazları (TTSP'ler), kanser ilerlemesi üzerinde olası bir etki göstermektedir. TTSP'lerin ekspresyonundaki değişiklikler, birkaç tümör tipi için bir belirteç olarak ortaya çıkmaktadır (Uhlend 2006).

TTSP'lerin yapısı, amino terminaline yakın tek geçişli bir hidrofobik transmembran alanı, değişken bir gövde bölgesi içeren büyük hücre dışı kısım ve bir C-terminal serin proteaz alanı içerir. Bu alan, katalitik aktivite için önemli olan histidin, aspartat ve serin kalıntıları içerir. Omurgalılarda bu ailenin dört alt familyası vardır: 1) matriptaz, 2) hepsin/transmembran proteaz/serin (TMPRSS), 3) insan solunum yolu tripsin benzeri (HAT)/skuamöz hücreli karsinomda (DESC) farklı şekilde eksprese edilir ve 4) corin. Tüm TTSP'ler, zimojenler olarak sentezlenir ve proteolitik bölünme ile aktive edilirler. Matriptaz, matriptaz-2, hepsin, TMPRSS2, TMPRSS3 ve TMPRSS4 dahil olmak üzere birçok TTSP otoaktivasyon yeteneğine sahiptir (Bugge ve ark. 2009).

### **2.5.7. TTSP'lerin işlevleri**

Bu proteinlerin hücre yüzeyinde merkezileştirilmesi, onlara hücre ve çevresindeki ortam arasında sinyal iletimini kontrol etmek için benzersiz bir konum sağlar. TTSP'lerin çoğu, doğum sonrası gelişim, doku homeostazı ve tümör progresyonu gibi süreçlerde anahtar faktörler olarak kabul edilmiştir (Szabo ve Bugge 2008).

Hepsinin aşırı ekspresyonu kanserin ilerlemesi ile ilişkilidir. Hepsinin mRNA seviyeleri,

incelenen prostat kanserinin yaklaşık %90'ında yükselmiştir; vakaların çoğunda, kanserli olmayan kontrollerdekilere kıyasla 10 kattan fazla benzerlik vardır. Bu, hepsini PCa'yı tedavi etmede uygun terapötik hedeflerden biri yapar. Prostat epitelinde hepsin aşırı ekspresyonu, bazal membranın degradasyonuna yol açar ve prostat kanseri hücrelerinde aşırı ekspresyonu, lenf nodu metastazını teşvik eder (Gong ve ark. 2014). Dahası, in vitro anti-hepsin antikolları, insan PCa istilasını inhibe edebilir (Wu ve Parry, 2007).

TMPRSS2, prostat dokusunun epitelinde yüksek oranda eksprese edilir (Jacquinet ve ark. 2001). TMPRSS2 gen ekspresyonu, insan örneklerinin iyi huylu hücrelerine kıyasla kanser hücrelerinde daha yüksektir (Soller ve ark. 2006). Ayrıca, prostat kanseri hastalarında TMPRSS2 geninin kromozomal yeniden düzenlemeleri tanımlanmıştır. Yeniden düzenleme, androjene duyarlı elementler içeren genin 5' çevrilmemiş bölgesini içerir. Bu bölge, E26 transformasyonuna özgü ETS ailesi ile ERG, ETV1 veya ETV4'ten gelen transkripsiyon faktörlerinin kodlama dizileriyle kaynaşır. Bu şekilde ekspresyonları androjen ile indüklenebilir hale gelir (Vaarala ve ark. 2001). Aslında, ERG ve ETV1, prostat kanseri vakalarının yaklaşık %50-79'unda TMPRSS2 ile kaynaşmıştır (Antonarakis ve ark. 2016). TMPRSS2 ve ETS genlerinin füzyonu, lokalize prostat kanserinde zayıf prognozla ilişkilidir (Demichelis ve ark. 2006).

Epitelyal hücrelerde eksprese edilen tripsin benzeri bir serin peptidaz olan PRSS8, yeni bir tümör baskılayıcı olarak sınıflandırılmıştır. PRSS8'in anormal ekspresyonu, prostat, mesane, mide ve kolorektal kanserler dahil olmak üzere birçok kanserde bulunmuştur (Zhang ve ark. 2016). Bir çalışma, PRSS8 mRNA ve protein ekspresyon seviyelerinin, histolojik farklılaşma ile ters orantılı olduğunu, ancak insan prostat kanserinin klinik aşaması ile ilişkili olmadığını göstermiştir (Takahashi ve ark. 2003).

## **2.6. Bor ve prostat kanseri**

### **2.6.1. Kimyasal özellikleri**

Bor (B), atom kütlesi 10.81 olan periyodik tablodaki beşinci elementtir. Grup III'ün en elektronegatif elementidir ve borun kimyasal özellikleri metal olmayanlara, özellikle silikona çok benzerdir. Saf elemental bor ilk olarak 1808'de İngiltere'de H. Davy ve Fransa'da J. L. Gay-Lussac ve L. J. Thénard tarafından aynı zamanda izole edilmiştir. Davy, borat çözeltisine elektrik akımı gönderildiğinde elektrotlardan birinde kahverengi bir çökelti oluşturduğunu rapor etmiştir. (Davy 1809). Aynı zamanda Gay-Lussac ve Thenard, borik asidi yüksek sıcaklıklarda demir ile indirgeyerek bor elde etmişlerdir (Gay Lussac ve Thenard 1808).

Elemental bor, oda sıcaklığında katı halde, siyah monoklinik kristaller olarak veya saf olmadığında sarı veya kahverengi amorf bir toz halinde bulunur. Amorf bor, bor oksitin sodyum ile indirgenmesi veya floratin potasyum ile indirgenmesi ile elde edilebilir. Oksijen için yüksek afinite, borun diğer bir baskın özelliğidir ve boratlar ve ilgili okso komplekslerinin kapsamlı kimyasının temelini oluşturur. Bor elementinin kimyasal özellikleri aynı zamanda morfolojisine ve partikül boyutuna da bağlıdır. Mikron boyutunda amorf bor, kolayca ve bazen yoğun şekilde reaksiyona girer. Öte yandan, kristalin bor kimyasal olarak çok statiktir ve kaynayan hidroflorik veya hidroklorik aside karşı oldukça dayanıklıdır.

### **2.6.2. Borun hücreler üzerine etkileri**

Bor, bazı hayvanların hücre replikasyonu ve gelişimi için ana faktördür, ancak temel mekanizmalar henüz tam olarak bilinmemektedir. Borik asit, alabalıkta (Eckhert 1998) embriyonun büyümesi için iyi bir uyarıcıdır ve zebra balıklarının (Rowe ve Eckhert 1999) blastula öncesi aşaması sırasında esastır. Kurbağalarda, normal oosit olgunlaşması, embriyonik büyüme ve morfogenezde yer alan ana faktörlerden biridir (Fort ve ark. 1998).

### **2.6.3. Borun prostat kanserindeki etkileri**

Borik asidin anti-kanserojenik olabileceği hipotezinin kanıtı, prostat kanseri riskinin doza

duyarlı bir şekilde diyetle bor alımıyla ters orantılı olduğu gözlemlenen epidemiyolojik çalışmalar sayesinde açığa çıkarılmıştır (Barranco ve ark. 2005).

Ulusal Sağlık ve Beslenme İnceleme Anketi (NHANES) III'ten elde edilen veriler, diyetlerinde 1,8 mg/d'den fazla bor verilen erkeklerde prostat kanseri riskinin, diyetlerinde 0,9 mg/d günlük bor alımına eşit veya daha az olanlara göre %52 daha düşük olduğunu göstermiştir (Barranco ve ark. 2007). NHANES III verilerinin analizi ayrıca, diyetle bor alımının artmasının, bir doz-yanıt modeli ile prostat kanseri riskinin azalmasıyla ilişkili olduğunu göstermiştir (Cui ve ark. 2005). Bor tüketimi 1,17 mg/gün'den az olduğunda prostat kanseri sıklığı ile herhangi bir ilişki gözlenmemiştir (Gonzalez ve ark. 2007).

Bir başka çalışmada, borik asidin insan prostat kanseri hücre çoğalmasını *in vitro* olarak engelleyebildiği bulundu (Gallardo-Williams ve ark. 2003). Ayrıca borik asit uygulaması ile farelerde prostat tümörlerinin boyutu küçüldü ve kanser dokusunda prostat spesifik antijen (PSA) ile insülin benzeri büyüme faktörü 1 (IGF1) seviyeleri yüksek miktarda azaldığı rapor edildi. Borik asit solüsyonları (1.7 mgB ve 9.0 mgB/kg/gün) sonda ile iki gruba uygulandı. Kontrol grubuna sadece su verildi. Bu çalışma ile düşük ve yüksek dozlarda borik aside maruz bırakılan farelerde tümör boyutunun sırasıyla %38 ve %25 oranında azaldığı gösterildi. Yine kontrol grubu ile karşılaştırıldığında serumdaki PSA seviyeleri %88,6 ve %86,4 oranında azaldığı rapor edildi. Bor verilen hayvanlarda, hücresel patolojide mitoz geçiren bir hücrenin mikroskopik görünümünü tanımlamak için kullanılan terim olan mitotik figürlerin görülme sıklığı önemli ölçüde daha düşük olduğu gözlemlendi. Son olarak serum IGF 1 açısından gruplar arasında anlamlı bir fark tespit edilemezken, IGF 1 geninin ekspresyonunun bor tarafından önemli ölçüde azaltıldığı rapor edildi (Gallardo-Williams ve ark. 2004).

PSA hem normal hem de tümöral prostat epitel hücreleri tarafından üretilir. Aynı zamanda androjen tarafından düzenlenen bir serin proteazdır. PSA, prostat kanserinin saptanmasında serum belirteci olarak önemli bir role sahiptir (Rubinstein ve ark. 2012).

Borun anti-prostat kanseri etkilerinin altında yatan hücresel mekanizmalara ilişkin bir başka

fikir, borik asidin hem A-E siklin ekspresyonunu azaltarak hem de borunun östrojen ve testosteron üzerindeki etkisiyle prostat kanseri hücrelerinin büyümesini engellediğini ortaya koyan Barranco ve arkadaşları tarafından sağlanmıştır. BA'ya uzun süre maruz kalmanın, DU-145 hücrelerinin sitoplazmada görünen çok sayıda vezikül ile düzleştirilmiş, açısız bir fenotip geliştirmesine neden olduğu bulunmuştur. Bu değişiklikler, siklin proteinleri, p21 ve P-MEK1/2'nin ekspresyonunda azalmanın yanı sıra hücre hareketliliği ve istila kapasitesinde bir azalma ile aynı zamanda meydana geldiği belirlenmiştir. Artan beta-galaktosidaz aktivitesi ise, bor varlığında DU-145 hücrelerinin senesens sürecine girebileceğine dair bir kanıt oluşturmaktadır (Barranco ve Eckhert 2006, Barranco ve ark. 2009).

Ayrıca Müezzinoğlu ve arkadaşları, Türkiye'de toplum temelli bir çalışmada bor maruziyeti ile prostat kanseri arasındaki olası ilişkiyi araştırmışlardır. PCa ve bor maruziyeti arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki elde edilmemesine rağmen, sonuçları bora yüksek maruziyetin hiperplazi ve karsinogenez ile ilgili prostatik hücresel süreçleri etkileyebileceğini göstermiştir (Müezzinoğlu ve ark. 2011).

### **3. MATERYAL ve METOTLAR**

#### **3.1. Hücre Kültürü**

- Denemeler ATCC'den temin edilen, yüzeye bağımlı androjene bağımlı prostat kanseri hücre hattı olan LNCaP (insan prostat karsinomu lenf nodu metastazı hücre hattı; CRL-1740TM) hücreleri kullanılarak gerçekleştirildi.

##### **3.1.1. Materyal**

- Soğutmalı santrifüj (Sigma- B6916)
- pH metre (Hanna- HI221)
- Manyetik karıştırıcı (Wisd-MSH20A)
- Steril pastör pipetleri
- 15 mL ve 50 mL falkon tüpleri (Jet Biofil)
- 1-10, 20-200 ve 100-1000 µL otomatik pipetler (Brand-TransferpetteS)
- Eppendorf tüpler (Greiner)
- Sınıf II güvenlik kabini (Esco)
- CO<sub>2</sub>'li inkübatör (Sanyo-MCO-18AIC)
- İnvörted ışık mikroskobu (floresan ekli) (Leica DMIL)
- 100x20 mm kültür kapları (Greiner Bio-One CELLSTAR)
- 60x15 mm hücre kültür kapları (Greiner Bio-One CELLSTAR)
- 6-kuyucuk olan kültür kapları (Greiner Bio-One CELLSTAR)
- 2.5-5-10 ve 25 mL hacimli steril pipetler (Orange)
- RPMI 1640 (Gibco- 52400)
- Föetal dana serumu (FBS) (Gibco- 10270)
- Aktif karbon (Merck, K34348983520)
- Penisilin/Streptomisin (Gibco- 15140)
- L-glutamin (Gibco- 25030)



- Tripsin-EDTA (Gibco- 3103382)
- Sentetik androjen methyltrienolone (R1881, 17beta-hydroxy-17alphamethyl-estra-4,9,11-trien-3-one, Sigma, R0908)
- DMSO (Merck- K33960212-504, ABD)
- Hemositometre (Neubauer)
- % 0,4 Tripan mavisi solüsyonu (Sigma- T6146),
- Fosfatlı olan tamponu (Phosphate Buffered Saline / PBS)
  - 8 g NaCl (Sigma- S3014)
  - 0,2 g KCl (Merck-1049360250)
  - 1,57 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O (Merck- K22287176) ile dH<sub>2</sub>O içerisinde hazırlanarak 1M HCl ile pH 7,4'e ayar edildi.

### **3.1.2. Hücrelerin bakımı ve pasajlanması**

Hücrelerin besin ihtiyaçlarını karşılamak için bir ortam olarak %5-10 FBS, % 1 L-glutamin, %1 penisilin/streptomisin içeren RPMI 1640 kullanıldı. Hücreler, yüzeyi tamamen kaplayana kadar rutin olarak beslendi. Bu işlem için yüzeye bağlı hücrelerin besiyeri pastör pipet yardımı ile uzaklaştırıldı ve hücrelere taze besiyeri eklendi ve ortam 2 günde bir değiştirildi. Hücreler, 100 x 20 mm'lik veya 60 x 15 mm'lik hücre kültür kaplarında 37 °C'de % 5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde büyütüldü. Hücreler, tüm yüzeyi kaplayacak kadar büyüdüğünde pasajlandı. Steril cam pastör pipetleri kullanarak vakum yardımıyla ortam uzaklaştırıldı. Pasaj işlemi uygulamak için adımlar aşağıda listelenmiştir;

- Kültür yüzeyi, tripsin işleminin etkisini arttırmak için içerisinde Ca<sup>2+</sup> ve Mg<sup>2+</sup> bulunmayan steril PBS ile bir kez yıkandı.
- PBS uzaklaştırıldı ve üzerine 1 mL tripsin-EDTA solüsyonu eklendi ve 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> inkübatöründe hücreler yüzeyden ayrılana kadar 1-2 dakika inkübe edildi.
- Hücrelere hücre yoğunluğuna uygun hacimde taze besiyeri eklendi ve hücreler pipet yardımı ile homojenize edildi.
- Homojenize edilen hücreler yeni kültür kabındaki besiyer üzerine oldukça yavaş bir şekilde ilave edildi ve büyümeleri için 37 °C'de %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatöre yerleşmiş olundu.

### **3.1.3. Hücrelerin dondurulması ve çözündürülmesi**

In vitro kültürlerde değerli hücre hatlarını korumak, geçiş sayısının ilerlemesine bağlı fenotipik ve genotipik değişiklikleri engellemek ve ayrıca yapılan çalışmaları güvenli bir şekilde tekrarlayabilmek için hücre hatlarının stoklanması gereklidir. Hücreleri korumak için en uygun yöntem -86 °C derin dondurucuda ya da -196 °C'de sıvı azot tanklarında dondurmaktır. Dondurulmuş hücreler, özelliklerini değiştirmeden bu şekilde uzun süre stoklanabilir.

Kriyoprotektan olarak kullanılan Dimetilsülfoksit (DMSO) ya da gliserol gibi ajanlar, dondurma işlemi esnasında hücrenin organelerini korumak amacıyla kullanılır. Dondurularak stoklanan hücrelerden araştırma veya çoğaltmak için yeni hücre kültürleri hazırlanabilir, ancak çözündürme işleminin olabildiğince hızlı ve çabuk yapılması gereklidir.

Pasajlama işleminin ardından, santrifüj yapılarak elde edilen hücre peleti %90 FBS ve %10 DMSO ile hazırlanan hücre stok ortamında süspanse edildi ve 1 mL hacimde kriyotüplere aktarıldı ve -86 °C'de derin dondurucuya yerleştirildi.

Çözülecek hücreler -86 °C'lik dondurucudan çıkar çıkmaz 37 °C'lik su banyosunda çözülene kadar (yaklaşık 1-2 dakika) bekletildi. Daha sonra hücre kültürü kabında 37 °C'ye ısıtılmış 6 mL ortam üzerine dikkatle pipetlendikten sonra ilave edildi.

### **3.1.4. Hücre sayımı**

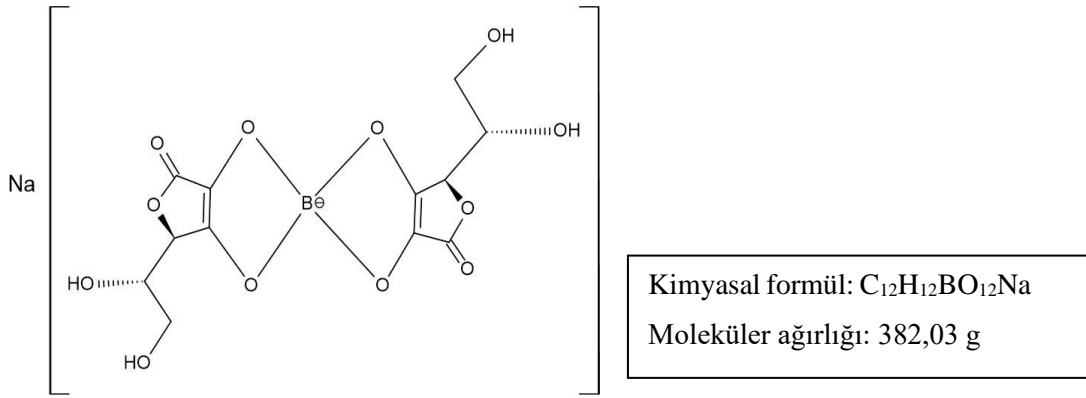
Hücre süspanسیونunun yoğunluğunu belirlemek için hücre sayımı yapıldı. Hücreler pasajlanırken, yeni kültür için istenen hücre miktarını elde etmek için bir hemositometrede sayım yapıldı. Sayım için 10 µl hücre süspanسیونu alındı ve tripan mavisi ile 100 µl'ye tamamlandı. Karışım pipetle homojenize edildi. Hemositometrenin üzerine bir lamel yerleştirildi ve sayılacak hücre süspanسیونu yandan pipetle bu ikisi arasına yayıldı. Hemositometrede 9 büyük karedeki hücre sayısı sayıldı. Mililitre başına hücre sayısını

(hücre/mL) belirlemek için aşağıdaki formül kullanıldı:

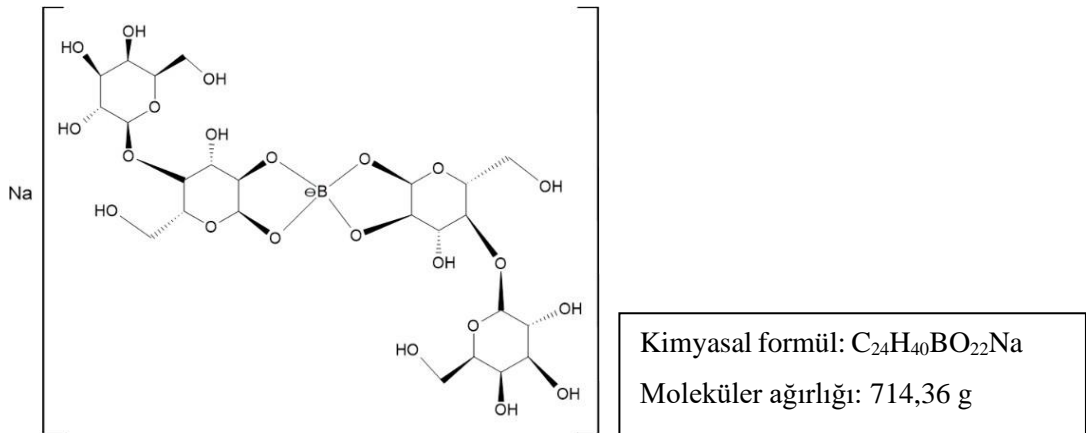
$$\text{Hücre sayısı/mL} = \text{Hücre miktarı} \times \text{Dilüsyon oran} (10) \times 10^4 / 9$$

### 3.1.5. D1, D3 ve D6 bor bileşiklerinin özellikleri ve yapısı

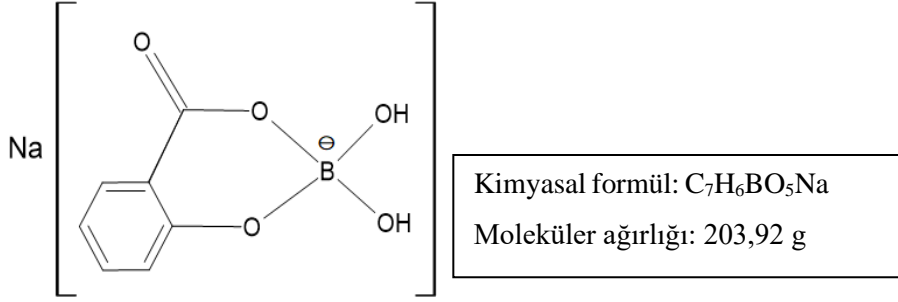
Bu tez çalışması kapsamında prostat kanseri hücreleri üzerinde herhangi bir etkisinin olup olmadığını kontrol etmek için aşağıda kimyasal formülleri ve moleküler ağırlıkları verilen bor bileşikleri kullanılmıştır. Aşağıdaki şekillerde kullanılan bor bileşiklerinin kimyasal isimleri ve temel özellikleri gösterilmiştir. Bor bileşikleri askorbik asit, laktik asit ve salisilik asitin mono- ve di-ester sodyum tuzları olarak sentez edilmiştir. Bu yeni sentez bor bileşikleri Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Prof. Dr. Mehmet Korkmaz'dan temin edilmiştir.



Şekil 3.1. D1 (Bor askorbat diester sodyum tuzu)



Şekil 3.2. D3 (Bor laktöz diester sodyum tuzu)



**Şekil 3.3.** D6 (Bor salisilat monoester sodyum tuzu)

### 3.1.6. Serum yoksunluğu ve madde (bor bileşikleri ve sentetik androjen (R1881)) uygulamaları

LNCaP hücrelerini serum yoksunluğuna bırakmak amacıyla ilk olarak aktif karbon ile muamele edilmiş fetal dana serumu (CT-FBS; aktif karbonla (charcol treated) muamele edilmiş-FBS) hazırlandı. Bu amaçla fetal dana serumuna %3 oranında aktif karbon ilave edildi. Daha sonra +4 °C'de karıştırılarak bir gece inkübasyona bırakıldı. Elde edilen süpernatant, 4 °C'de 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant tamamen berrak olana kadar santrifüjleme birkaç kez tekrarlandı. Daha sonra süpernatant iki kez süzüldü ve -20 °C'de saklandı.

Starvasyonlu örneklerinin hazırlanması ve hücreleri büyüme faktörlerinden yoksun bırakmak için LNCaP hücreleri ilk olarak aktif karbonla muamele edilmiş FBS içeren RPMI ortamında büyütüldü. Pasajlamadan 48 saat sonra hücreler bir kez PBS ile yıkandı ve %2 CT-FBS ortamına alındı. Daha sonra hücreler %0,5 CT-FBS ortamına alınarak %5 CO<sub>2</sub> inkübatöründe 37 °C'de 24 saat inkübe edildi. Son olarak hücrelere 2,5 mM konsantrasyonda 48 saat süreyle bor bileşikleri uygulandı. 48 saatlik bu uygulama süresinin 24. saatinde 10 nM sentetik androjen R1881 uygulaması yapıldı. Böylece starvasyon yapılan LNCaP hücrelerinde 48 saat süreyle bor bileşikleri ve 24 saat süreyle androjen uygulaması yapılmış oldu.

Starvasyonsuz örnekleri hazırlamak için LNCaP hücreleri, %60 yoğunlukta 10 cm'lik hücre kültürü kaplarına aktarıldı. Hücrelerin ortamı pasajlamadan 48 saat sonra değiştirildi ve 2saat sonrasında 0,5-1-2,5 mM konsantrasyonlarda 48 saat süreyle bor bileşikleri uygulandı ve 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> inkübatöründe 48 saat inkübe edildi.

### **3.1.7. Sitotoksisite analizleri (MTT)**

Sitotoksisite analizleri için kolorimetrik bir yöntem olan MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolyum bromür) oluşumu ölçüldü. Steril PBS tamponunda hazırlanan 5 mg/mL MTT stok solüsyonu, büyüme ortamı ile kullanımdan hemen önce 1:10 oranında seyreltildi ve hücrelere 0,5 mg/mL eklenerek belirlendi. %5 CO<sub>2</sub> inkübatöründe 37 °C'de 4 saatlik inkübasyonda bırakıldı. Ardından MTT içeren ortam uzaklaştırıldı ve oluşan formazan kristalleri 200 uL %100 DMSO içinde çözündürüldü. DMSO içerisinde çözülen renkli formazan kristalleri 570-690 referans değerlerinde bir mikropilaya okuyucu ile ölçüldü. % hücre canlılığı, madde ile muamele edilmiş hücrelerin absorbansı / kontrol hücrelerinin absorbansı olarak hesaplandı. Sonuçlar Microsoft Excel (XP) ve GraphPad yazılımı vasıtasıyla grafiksel olarak değerlendirildi, her bir maddenin IC<sub>50</sub> değeri (hücre proliferasyonunu %50 inhibe eden konsantrasyon) hesaplandı.

### **3.2. Real-Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)**

Gerçek zamanlı PCR, RNA'nın ters transkripsiyon yoluyla cDNA'ya dönüşümünü, ardından ilgili genleri çoğaltmak ve saptamak için birkaç PCR döngüsünü içerir. Sonuçlar, SYBR-green veya Taqman problemleri kullanılarak 'gerçek zamanlı' olarak elde edilebilir. qPCR analizi, rölatif kantitasyona dayanır, bu nedenle deney bir kontrol örneği de içermelidir. Normalizasyon için, analiz edilecek gen ile birlikte bir housekeeping geninin de amplifiye edilmesi gerekir.

### 3.2.1. Materyal

- 1,5 mL'lik Eppendorf tüpler (RNase içermeyen)
- Otomatik pipetler (1-10, 20-200 ve 100-1000 µL)
- Pipet uçları
- Santrifüj (Eppendorf, centrifuge, 5415 D)
- SYBR Green
- dH<sub>2</sub>O
- cDNA
- Primerler
  - *HPN (TMPRSS1)*
  - *PRSS8*
  - *TMPRSS2*
  - *TP 53*
  - *MMP 9*
  - *MMP 2*
  - *MMP 12*
  - *AR*
  - *KLK 3 (PSA)*
  - *GAPDH*
  - *TBP*
- RT-PCR Cihazı (CFX-Connect, Bio-Rad)
- TriPure™ RNA Isolation Kiti
  - TriPure Isolation Reagent (Trizol)

- Kloroform
- Izopropanol
- %75 Etanol
- RNase-free water
- Soğutmalı santrifüj
- Mikrosantrifüj
- Vortex mixer
- Santrifüj tüpler

- BioRad's iScript™ Revers Transcription Supermix
  - dH<sub>2</sub>O
  - Master Mix

- Örnek Setleri

- 1.Set (Starvasyonsuz)

1. Kontrol
2. 2,5 mM D1
3. 2,5 mM D3
4. 2,5 mM D6

- 2. Set (Starvasyonlu)

- |            |             |
|------------|-------------|
| 1. Kontrol | 5. R1881    |
| 2. D1      | 6. D1+R1881 |
| 3. D3      | 7. D3+R1881 |
| 4. D6      | 8. D6+R1881 |

### 3.2.2. RNA izolasyonu

LNCaP hücrelerinden RNA izolasyonu, TRIPURE izolasyon reaktifi ile RNA izolasyonu protokolü kullanılarak yapıldı.

- Hücreler enjektörler kullanılarak parçalandı (fiziksel parçalama);
- Örnek tüplerine 1 ml tripure reaktifi eklendi;
- İnsülin enjektörleri yardımıyla örnekler homojen hale getirildi. Her örnek tüpü 10 saniye vortekslendi;
- Tüplere kloroform eklenerek 5 dakika beklendi;
- 20000 rpm'de, 4 °C'de 20 dakika santrifüjlendi;
- Santrifüjden sonra 3 faz oluştu:
  - 1.FAZ (Sulu faz): RNA içerir (renksizdir);
  - 2.FAZ: DNA içerir (beyaz renklidir);
  - 3.FAZ (Organik faz): Protein içerir (kırmızı renktedir);
- RNA izolasyonu için 1. fazdan oluşan süpernatant yeni tüplere aktarıldı;
- Yeni tüplere 500 µl izopropanol eklendi ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi;
- 12000 rpm'de, 4 °C'de 10 dakika santrifüjlendi. Süpernatant atıldı;
- Oluşan çökeltilerin üzerine 1 ml %75 EtOH eklendi;
- 7500 x g'de 4 °C'de 5 dakika santrifüjlendi;
- Santrifüj sonrası oluşan süpernatant atıldı;
- 57 °C'de 5 dakikalık inkübe edilerek EtOH uçuruldu;
- Kalan çökeltiye RNase free su ilave edildi ve pipetaj yapıldı;
- Nanodropta 260/280 nm'de ölçüm yapıldı.



### 3.2.3. cDNA sentezi

LNCaP hücrelerinden izole edilen RNA'lar, BioRad iScript Reverse Transkripsiyon Supermix Kit protokolüne göre cDNA'ya çevrildi. Elüsyon Tamponu kör olarak kullanıldı.

Konsantrasyon = nanogram /  $\mu$ l

1 nanogram =  $10^{-3}$   $\mu$ g

- Her örnek için örnek hacmi 2  $\mu$ g RNA olarak alındıktan sonra, son hacim 15  $\mu$ l'ye elde etmek için gerekli miktarda dH<sub>2</sub>O ilave edildi.
- Daha sonra tüm örnekler 4  $\mu$ l reaksiyon karışımı ve 1  $\mu$ l revers transkriptaz enzimi ilave ederek toplam reaksiyon hacmi 20  $\mu$ l'ye tamamlandı.
- Kısa bir santrifüjden sonra örnekler, gerekli reaksiyon koşullarını sağlamak için bir PCR cihazına konuldu.
- RNA örneklerinden cDNA sentezi için örnekler 25 °C'de 5 dakika, 42 °C'de 30 dakika ve 85 °C'de 5 dakika inkübe edildi.
- cDNA'lar -20°C'ye konuldu.

### 3.2.4. Real-Time PCR

Çizelge 3.1'de belirtilen 11 genin ekspresyon profilleri, şablon olarak LNCaP hücrelerine uygulamalardan sonra elde edilen cDNA'lar kullanılarak RT-PCR amplifikasyonu ile analiz edildi.

**Çizelge 3.1.** Real-Time PCR'da ekspresyon profilleri analiz edilecek genler.

	GEN	GEN İSMİ	KODLADIĞI PROTEİN
P1	HPN (TMPRSS1)	Hepsin	Serine protease hepsin
P2	PRSS8	Serine Protease 8	Prostasin
P3	TMPRSS2	Transmembrane protease serine 2	Transmembrane protease serine 2

**Çizelge 3.2.** Real-Time PCR’da ekspresyon profilleri analiz edilecek genler (devam)

P4	TP 53	Tumor protein 53	Cellular tumor antigen p53
P5	MMP9	Matrix metalloproteinase-9	Matrix metalloproteinase-9
P6	MMP2	Matrix metalloproteinase-2	Matrix metalloproteinase-2
P7	MMP12	Matrix metalloproteinase-12	Matrix metalloproteinase-12
P8	AR	Androgen receptor gene	Androgen receptor
P9	KLK3 (PSA)	(Kallikrein Related Peptidase 3) Prostate specific antigen	Prostate-specific antigen
P10	GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
P11	TBP	TATA-Box Binding Protein	TATA-Box Binding Protein

- Bir reaksiyona 10 µl hacim uygulandı.
- Reaksiyon başına 5 µl SYBR-Green master mix (2X) ve 1 µl cDNA kullanıldı.
- F+R primerler için ; 1 µl primer ve 3 µl dH<sub>2</sub>O kullanıldı.
- PCR amplifikasyonu
- 1. Denatürasyon;  
95 °C’de 3’, 1 döngü
- 2. Amplifikasyon;
  - 95 °C’de 3 dk, 95 °C’de 10 sn, 58 °C’de 10 sn, 72 °C’de 10 sn; 45 döngü
- 3. Çift zincirin açılması

- Amplifikasyon basamağındaki her döngüden sonra 95 °C'de 30 sn.
- Soğutma;
  - 37 °C 'de 10 sn
- Amplifikasyon sonunda gen ekspresyonundaki değişikliklerin miktarını (katlar halinde) belirlemek için erime eğrisi ve relatif kantitasyon analizleri, referans genler (housekeeping gens) olarak TATA-Binding Protein (TBP) ve Gliseraldehit-3-Fosfat Dehidrojenaz (GAPDH) kullanılarak yapıldı.

### 3.3. Western Blot (İmmünooblama)

Western blot, bir protein karışımı arasından spesifik protein moleküllerini saptamak için kullanılan bir moleküler biyoloji yöntemidir. Bu karışım aynı zamanda hedef proteinlerin belirlenmesine yardımcı olan sentetik veya hayvan kökenli antikorları da içerir.

#### 3.3.1. Materyal

- Modifiye RIPA tamponu:
  - 10 mM'lık trizma baz, pH değeri = 8.0 (Sigma- T5941)
  - %0,1 konsantrasyonlu SDS (Sigma- L4390)
  - %1 konsantrasyonlu triton x-100 (Sigma- T8787)
  - %0,1 konsantrasyonlu sodyum deoksikolat (Sigma- D6750)
  - 1 mM'lık EDTA (Sigma- K5134)
  - 1 mM'lık EGTA (Sigma- E3889)
  - 140 mM'lık NaCl (Sigma- S3014)
- Proteaz inhibitörleri;
  - PIC (14X; roche cocktail);
  - NaF (Final konsantrasyon 1mM, stok 30X),
  - NaVO<sub>3</sub> (Final konsantrasyon 1mM, stok 100X),
  - PMSF (100 X hazır stok, Final konsantrasyon 1mM)

- Fosfataz inhibitörü (Roche cocktail, hazır stok, 20X)
- NaF 100X (100mM), (Merck- B815549 606)
- NaVO<sub>3</sub> 100X (200mM) (Fluka- 72060)
- PMSF 100X (100 mM) (Fluka- 93482)
- BCA kit (Sigma- 088K6138)
- Kuvars küvet (Hellma- 105.202QS)
- İzopropanol (İzopropil alkol) (Merck- K35707095 607)
- Metanol (saf) (Merck, K34212908503)
- %30 akrilamid karışımı için gereken kimyasal malzemeler:

- %29 akrilamid (Sigma- A9099)
- %1 N, N- metilenbisakrilamid (Sigma- M2022)

karışımı hazırlanırken filtre edildi ve gazı alınarak kullanıldı.

- 4X SDS-PAGE ayırma jel tamponu için gereken kimyasal malzemeler:
  - 1.5 M trizma baz (pH değeri = 8,8) (Sigma- T5941)
  - %0,4 konsantrasyonlu SDS (Sigma- L4390), pH 8,8
- 4X SDS-PAGE depolama jel tamponu için gereken kimyasal malzemeler:
  - 0,5 M trizma baz (pH değeri = 6,8) (Sigma- T5941)
  - %0,4 konsantrasyonlu SDS (Sigma- L4390), pH 6,8
- %10 konsantrasyonlu amonyum persülfat solüsyonu (Sigma- A9164)
- TEMED (Sigma- T9281)
- 1L hacim için SDS-PAGE jel 10X yürütme tamponu (1X olarak kullanılır) için gereken kimyasal malzemeler:
  - 30 gram trizma baz (Sigma- T6066)
  - 144 gram glisin (Biochemika/FLUKA- 50046)
  - 10 gram SDS (Sigma- L4390)
- 4X yükleme tamponu için gereken kimyasal malzemeler:
  - 40 mM'lık trizma baz (pH 8.0) (Sigma- T6066)
  - 0.4 mM'lık EDTA (Sigma- K5134)
  - %4 konsantrasyonlu SDS (Sigma- L4390)

- %20 konsantrasyonlu gliserol (Sigma- G5150)
- Brom fenol mavisi (Merck- L54971322525)
- 1L hacim için SDS-PAGE jel 10X transfer tamponu için gereken kimyasal malzemeler:
  - %20 konsantrasyonlu metanol (Merck- K34212908503)
  - 30 gram trizma baz (Sigma- T6066)
  - 144 gram glisin (Biochemika/FLUKA- 50046)
- Beta-merkaptotanol (Sigma, M3148)
- 10 X TBS (pH değeri = 7.6), toplam hacim 1L
  - 12,1 gram trizma baz (Sigma, T6066)
  - 80 gram NaCl (Sigma, S3014) TBS-T için

1X TBS içine %0,1 konsantrasyonlu Tween 20 (Sigma, E1383) eklenmiştir.

- Yağlı olmayan süt tozu
- BSA (Bovine serum albumin) (USB- 10857)
- Anti-rabbit IgG horse-radish peroksidaz (HRP) (Biorad)
- Anti-mouse IgG horse radish peroksidaz (HRP) (Biorad)
- $\beta$  -Aktin antikoru (Cell signaling, 4967)
- PSA antikoru (Proteintech, 10679-1-AP)
- GAPDH antikoru (Ambion, AM4300)
- AR antikoru (Proteintech, 22089)
- MMP-2 antikoru (Proteitech, 10373)
- MMP-9 antikoru (Proteintech, 10375)
- TIMP antikoru (ABBIOTEC, 250884)
- Clarity Western ECL Substrat Kit (Biorad, 1705061)
- Hücre kazıyıcılar (Cell Scraper- TPP 9903, İsviçre)
- Soğutmalı santrifüj cihazı, +4 °C (Sigma- B6916)
- Santrifüj cihazı (Eppendorf, 5415D ve 5415R)
- Blok ısıtıcı (Grant- QBA2)
- Spektrofotometer cihazı (Amersham- Ultraspec 1100 pro.)
- WB Yürütme aparatı (C.B.S. Scientific- MGV202)

- WB Transfer aparatı (BioRad)
- Whatman kağıtlar
- PVDF (Polyvinylidene fluoride) transfer membranları (Roche- 03010040001)
- Shaker (Heidolph- ROTAMAX 120)
- 1-10, 20-200 ve 100-1000 µl' lik otomatik pipetler (Brand- TransferpetteS)
- Otoklavlanmış pipet uçları (VWR)
- Eppendorf tüpler (Grainer)
- Örnek Setleri

– 1.Set (Starvasyonsuz)

- |              |               |
|--------------|---------------|
| 1. Kontrol   | 7. 1 mM D3    |
| 2. R1881     | 8. 2,5 mM D3  |
| 3. 0,5 mM D1 | 9. 0,5 mM D6  |
| 4. 1 mM D1   | 10. 1 mM D6   |
| 5. 2,5 mM D1 | 11. 2,5 mM D6 |
| 6. 0,5 mM D3 |               |

– 2. Set (Starvasyonlu)

1. Kontrol
2. D1
3. D3
4. D6
5. R1881
6. D1+R1881
7. D3+R1881
8. D6+R1881

### 3.3.2. Protein izolasyonu

Protein izolasyonu, immüno blot deneylerinde kullanılmak üzere hücrelerden RIPA ile modifiye edilmiş tampon kullanılarak yapıldı. Bu amaçla;

- Besiyeri çıkardıktan sonra hücreler bir kez soğuk PBS ile yıkandı.
- Hücreler üzerine RIPA Modified Lysis Buffer ilave edilerek (0,5 mL → 10<sup>7</sup> cells/100mm petri/ 150 cm<sup>2</sup> flask; 0,25 mL → 10<sup>6</sup> cells/ 60 mm petri/ 75 cm<sup>2</sup> flask) hücreler bir kazıyıcı yardımıyla kazındı ve pipetleme yapıp ependorf tüplerine aktarıldı (tüm bu işlemler buz üzerinde gerçekleştirildi).
- Örnekler ara sıra karıştırılarak 45 dakika buz üzerinde inkübe edildi.
- Tamamen hücre parçalanması/homojenizasyonu için 10 dk' da bir 10 saniye vorteks işlemi yapıldı.
- Örnekler +4° C'de 12000 rcf'de 10 dk santrifüj edildi ve süpernatant toplam hücresel protein olarak yeni ependorf tüplerine aktarıldı (protein lizatı örneği).
- BCA tayini ile protein ölçümü yapıldı.

### 3.3.3. Protein miktarının belirlenmesi

Elde edilen lizatlardaki protein miktarı, aşağıdaki protokole göre BCA protein miktarı ölçüm kiti kullanılarak belirlendi.

- 1 µl protein lizat örneği, Eppendorf tüplerinde dağıtılan 149 µl RIPA tamponu üzerine ilave edildi.
- Tüm örnekler için toplam BCA çalışma reaktif karışımı hazırlandı, örnek başına 75 µl QA, 75 µl QB ve 3 µl QC vortekslendi ve örnek başına 150 µl Eppendorf tüplerine dağıtıldı.
- Kör olarak protein lizatı içermeyen RIPA tamponu kullanıldı.
- Vorteksleme ve kısa santrifüjlemeden sonra tüpler 60 °C'de ısıtma bloğunda 1 saat inkübe edildi.
- İnkübasyon sonunda kısa bir santrifüjden sonra örneklerin oda sıcaklığına gelmesi

sağlandı ve spektrofotometrede 562 nm'de absorbans ölçümleri yapıldı.

- Elde edilen absorbans değerleri referans değer ile normalize edilerek protein miktarları  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  olarak belirlendi.

### 3.3.4. Proteinlerin SDS-PAGE ile ayrılması

SDS-PAGE, proteinleri moleküler ağırlıklarına göre ayırmak için kullanılan analitik bir tekniktir. SDS-PAGE'de, sodyum dodesil sülfat (SDS, sodyum lauril sülfat olarak da bilinir) ve poliakrilamid jel kullanımı, yapı ve yükün etkisini büyük miktarda ortadan kaldırır ve proteinler sadece polipeptit zincir uzunluğuna göre ayrılır.

### 3.3.5. Jel hazırlama

- SDS-PAGE cihazının camları sırasıyla dH<sub>2</sub>O-etanol-izopropanol ile silinir ve cam ve ayırıcılardan oluşan cihaz jelin dökülmesine hazır hale getirilir.
- Jel konsantrasyonu, proteinin moleküler ağırlığına göre seçildikten sonra, bir ayırma jeli hazırlanır ve aparata dökülür (hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilir).
- Üst yüzey izopropanol ile kapanır ve donması için 30-40 dakika beklenir.

**Çizelge 3.3.** Protein moleküler ağırlığına göre jel konsantrasyon yüzdeleri.

Protein Büyüklüğü (kDa)	Jel Yüzdesi (%)
4-40	20
12-45	15
10-70	12
15-100	10
25-200	8

- İzopropanol, donmuş ayırma jelinden uzaklaştırılır.
- Depolama jeli (stacking) hazırlanır ve aparata dökülür, tarak yerleştirilir ve donması için 30-40 dakika beklenir.
- Camlar yürütme aparatı üzerine yerleştirilerek alt ve üst hazneler yürütme tamponu



(1X SDS-PAGE Running Buffer) ile doldurulur.

- Yürüme aparatının üzerine camlar yerleştirilir ve üst ve alt hazneler yürütme tamponu (1X SDS-PAGE Running Buffer) ile doldurulur.
- Tarak, donmuş jelden nazikçe çıkarılır ve kuyularda kalan jel parçaları, yüklemmeden önce tamponla temizlenir.

**Çizelge 3.4.** Ayırma jeli bileşenlerinin farklı yüzde değerleri için oranları.

Ayırma Jeli (10 mL)	%6	%8	%10	%12	%15
dH <sub>2</sub> O	5,4 mL	4,7 mL	4,1 mL	3,4 mL	2,4 mL
%30 akrilamid mix	2,0	2,7	3,3	4	5
4x ayırma jeli tamponu	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
%10 APS	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
TEMED	0,008	0,006	0,004	0,004	0,004

**Çizelge 3.5.** Farklı yüzde değerleri için depolama jeli bileşenlerinin oranları.

Ayırma Jeli (10 mL)	10 mL	5 mL	2,5 mL
dH <sub>2</sub> O (mL)	5,7	2,85	1,425
%30 akrilamid mix (mL)	1,7	0,85	0,425
4x depolama jeli tamponu (mL)	2,5	1,25	0,625
%10 APS (mL)	0,1	0,05	0,025
TEMED (mL)	0,010	0,005	0,005

### 3.3.6. Örnek hazırlama

- Protein örneklerinden 100 µg proteine eşit hacim alınır ve dH<sub>2</sub>O ile 20 µl'ye tamamlanır.
- Bir anyonik denatürasyon deterjanı olan Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) içeren 7.5 µl 4X Yükleme Tamponu (4X Loading Buffer) 20µl örnek solüsyonuna eklendi (kullanımdan önce gerekli hacimdeki 4X yükleme tamponuna %10 beta-

merkaptotanol eklenir ve kısa bir santrifüj yapılır).

- Hazır olan örnekler 95-100 °C'de 5 dakika inkübe edilir.
- İnkübasyondan sonra numuneler hemen buz üzerine yerleştirilir.

### 3.3.7. Proteinlerin jele yüklenmesi ve jelde yürütme

- Buz üzerinde bekleyen örnekler kısa bir santrifüj işleminden sonra 25 µl hacimde jele yüklenir.
- Protein boyutunu belirlemek ve elektroforetik yürüyüşü izlemek için 5 µl moleküler ağırlık markörü bir kuyucuğa yüklenir.
- Üst hazne elektrotu katot (-) ve alt hazne elektrotu anot (+) olacak şekilde bağlantılar yapılarak jel yürütme işlemi başlatılır (80V'de ~3-4 saat)

### 3.3.8. Jelden membrana transfer

- Transfer için jel boyutundan daha büyük 4 adet whatman kağıdı ve bir jel boyutunda PVDF membran kesilir.
- İlk olarak 1X transfer tamponuna batırılmış süngerlerden biri Western-blot sandviç aparatının (-) kutbuna (siyah kapak üzerine) yerleştirilir.
- 1x transfer buffer ile nemlendirilmiş 2 adet whatman kağıdı süngerin üzerine yerleştirilir.
- Jel, whatman kağıtları üzerine uygulama şeklinin tersi yönünde yerleştirilir.
- Metanol ile nemlendirilmiş PVDF membran jel üzerine dikkatlice yerleştirilir (jel ile membran arasında hava kabarcığı kalmayacak şekildedir).
- 2 transfer tamponu ile nemlendirilmiş whatman kağıdı tekrar membran üzerine yerleştirilir.
- Son olarak whatman kağıtlarının üzerine ıslak sünger konularak aparat hazır hale getirilir.
- Sandviç aparatı, jeldeki proteinlerin membrana (negatif kutuptan pozitif kutba) aktarılabilmesi için transfer aparatına yerleştirilir.
- 1X transfer tamponu transfer aparatına dökülür ve aparatın kenarlarına soğutma blokları yerleştirilir. Gece boyunca +4'te 90-120 mA'da transfer gerçekleştirilir.

### 3.3.9. Antikor işaretleme

- Western blot aparatından çıkarılan membran, nazikçe çalkalanarak 2 kez TBS-T ile kısaca yıkanır.
- Bloklama solüsyonu (TBS-T içinde %5 süt tozu) ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi.
- Bloklamadan sonra membran TBS-T ile kısaca 2 kez yıkanır.
- Primer antikor çözeltisi, %0,5 süt tozu içeren TBS-T (10 mL) içinde uygun dilüsyonda hazırlanır ve hafifçe karıştırılarak gece boyunca +4 °C'de membran primer antikor ile inkübe edilir. Primer antikorlar işlemde sonra saklanabilir.
- Membran TBS-T ile 2 defa kısaca, 1 defa 15 dakika ve 3 defa 5 dakika olacak şekilde yıkanır.
- Ardından sekonder antikor solüsyonu %0,5 süt tozu içeren TBS-T içerisinde (10 mL) uygun dilüsyonda hazırlanır ve membran sekonder antikor ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilir.
- Membran TBS-T ile 2 defa kısaca, 1 defa 15 dakika ve 3 defa 5 dakika olacak şekilde yıkanır.

### 3.3.10. Bantların görüntülenmesi

- HRP enzim etiketli sekonder antikor ile tedavi edilen zarların kemilüminesansı, The Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad) Kiti kullanılarak yapıldı. Substrat olarak kullanılan Luminol, uyarılmış ürün 3-aminoflatat oluşturmak için HRP ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> varlığında oksitlenir. Bu ürün 425 nm'de yayır. Bu parlıltı sadece enzim-substrat reaksiyonu sırasında meydana gelir. Başka bir deyişle, geçici ve sınırlı bir süre içinde gözlemlenebilir. Substratın son derece yoğun sinyal çıkışı, antijeni pikogram seviyesinde tespit etmeyi mümkün kılar. Sinyalin hassasiyeti, yoğunluğu ve süresi fotoğraflanarak kolayca belirlenir.
- Clarity Western ECL Substrate çalışma solüsyonları, membran başına 3 ml'de 1:1 oranında karıştırılır ve görüntülemeye hemen önce taze olarak hazırlanır. Görüntüleme sırasında membran hazırlanan substrat solüsyonu ile direkt ışıktan

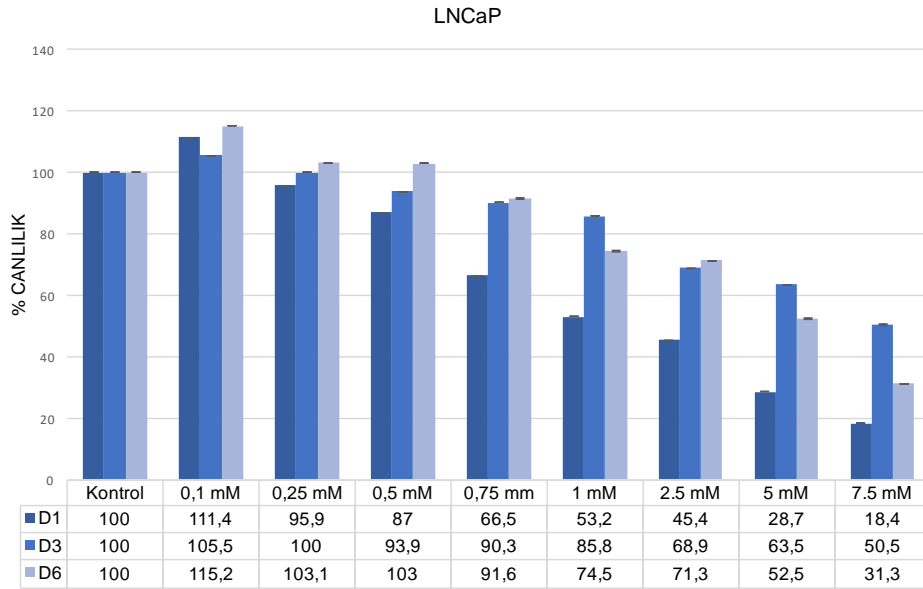
kaçınarak 1 dakika inkübe edilir.

- Kemilüminesans görüntüleme için Vilber Lourmat FX-7 cihazı (Thermo) kullanıldı.
- Cihaz ve cihaza bağlı bilgisayar çalıştırılarak FX-7 yazılımı kullanıldı.
- Kamera sisteminin soğutma işlemini tamamlaması beklendikten sonra cihazın odak ayarı yapılarak kemilüminesans görüntülemeye başlandı.
- Tüm ayarlamalar yapıldıktan sonra membran cihazın masasına yerleştirildi ve görüntüleme süreleri saniye ve dakika olarak seçilerek fotoğraflandı.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Sitotoksite Sonuçları (MTT)

Bu tez çalışmasında, sentezlenen bor bileşiklerinin sitotoksik veya antiproliferatif etkilerini doza bağlı olarak incelemek için MTT ile sitotoksisite denemeleri yapılmıştır. Ayrıca etkinliklerinin optimum konsantrasyon değerleri (IC<sub>50</sub> değerleri) incelenmiştir. Optimum LNCaP hücre sayısı (10x10<sup>3</sup> hücre/kuyu) belirlenerek 96-kuyucuklu kültür kaplarına ekildi ve bor bileşikleri 0,1-0,25-0,5-0,75-1-2,5-5-7,5 mM konsantrasyon değerlerinde 48 saat süreyle uygulandı. Sonuçlar, 570-690 nm dalga boylarında spektrofotometrik ölçümle elde edildi. Denemeler en az 3 kez tekrarlandı.

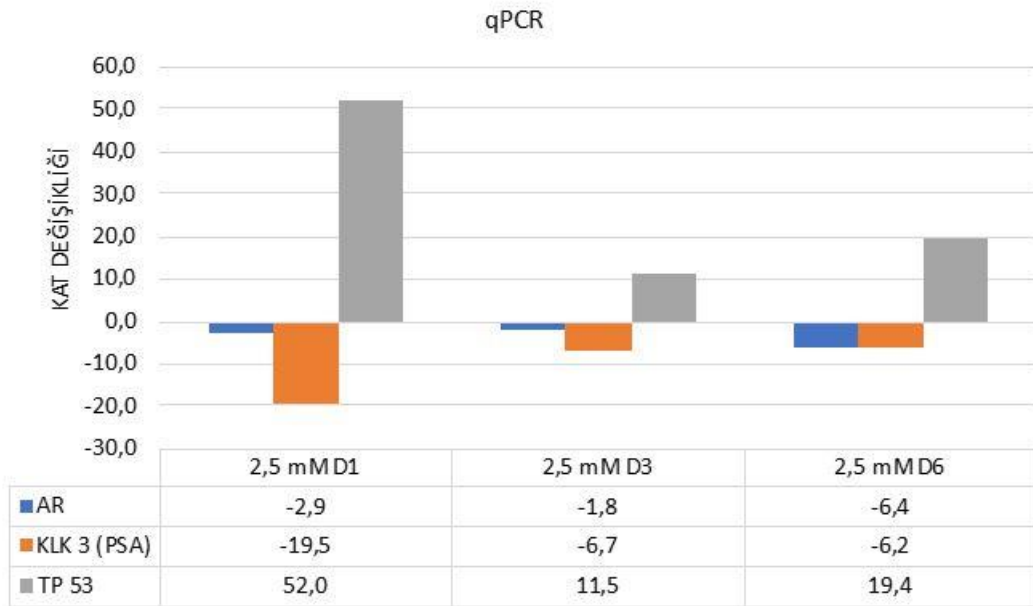


**Şekil 4.1.** LNCaP hücre hattında üç farklı bor bileşiğinin konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığına etkisi.

Şekil 4.1'den de görüleceği gibi, MTT deneyinden elde edilen sonuçlar incelendiğinde, sırasıyla D1, D3 ve D6 olmak üzere üç bor bileşiğinin hepsinin konsantrasyona bağlı olarak LNCaP hücrelerinde hücre canlılığını azalttığı belirlendi. Hücre canlılığı üzerindeki en yüksek anti-proliferatif etki D1 bileşiği için kaydedildi. 48 saat süre için D1, D3 ve D6 bileşikleri için sırasıyla IC<sub>50</sub> değerleri 1,1, 7,5 ve 5,2 mM olarak belirlendi. Farklı konsantrasyonlarda hücre canlılığı üzerindeki etkililik farklılıklarına rağmen, üç bileşiğin hepsi birden hücre canlılığını ve proliferasyonunu azaltma potansiyeli gösterdi.

## 4.2. qPCR sonuçları

Prostat kanseri gelişimi ve ilerlemesinde yer alan moleküler yolların önemli bir parçası olan PSA ve AR gibi genlerin ekspresyonlarının ölçümü, Quantitative Real Time PCR reaksiyonu olarak da bilinen qPCR yöntemi ile tamamlandı. Bu amaçla LNCaP hücrelerine 2,5 mM konsantrasyonda 48 saat süreyle D1-D3-D6 bor bileşiği uygulaması yapıldı. Daha sonra RNA izolasyonu ve cDNA sentezi gerçekleştirildi. qPCR için Çizelge 3.1’ de bahsedilen primerler kullanıldı. Amplifikasyondan sonra elde edilen  $C_t$  değerleri, gen ekspresyonundaki değişikliklerin (kat değişiklikleri) ölçümü için kullanıldı. Ayrıca referans genler olarak TBP ve GAPDH kullanıldı. Analizden elde edilen sonuçlar grafiksel olarak gösterildi. Öncelikle starvasyonsuz setin analizi yapıldı. Farklı bor bileşiklerinin ve konsantrasyonlarının dokuz farklı gen ifadesi üzerindeki etkileri aşağıdaki grafiklerde gösterildi.

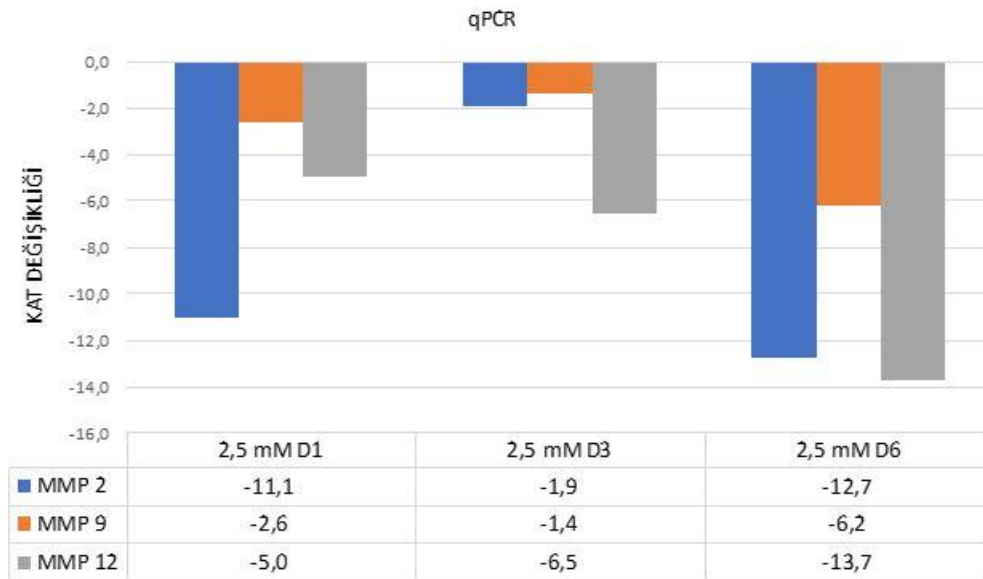


**Şekil 4.2.** Bor bileşiklerinin AR, KLK 3 (PSA) ve TP53 genlerinin mRNA miktarlarına etkisi.

Şekil 4.2'den genel olarak AR ve PSA genlerinin gen ekspresyonunun farklı bor bileşikleri varlığında belirgin bir biçimde azaldığı sonucuna varılabilir. Öte yandan, TP53 seviyelerinin ise arttığı belirlenmiştir.

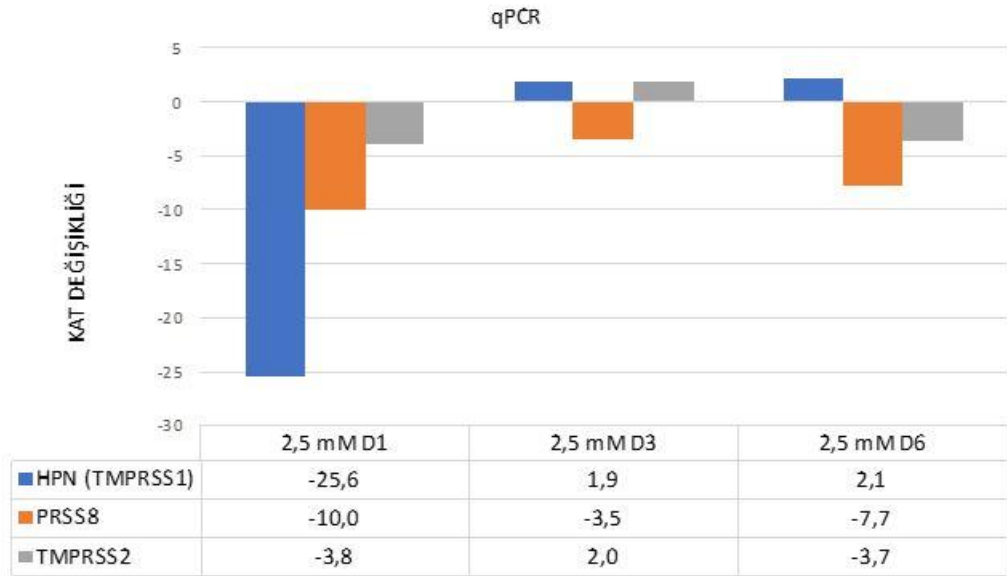
Bor bileşikleri arasındaki farklılıklar incelendiğinde AR seviyesini yaklaşık 6,4 katlık bir azalış ile en etkili biçimde düşüren bileşiğin D6 olduğu gözlenirken, D1 ve D3 bileşiklerinin sırasıyla 2,9 ve 1,8 katlık bir azalmaya yol açtığı saptandı. Borun bir serin proteaz inhibitörü olarak fonksiyon göstermesi ile uyumlu olarak uygulanan tüm bor bileşikleri varlığında PSA mRNA seviyelerinin de azaldığı belirlendi. AR genindeki azalışın aksine PSA geninde en yüksek aşağı regülasyon etkisi D1 bileşiği varlığında 19,5 kat olarak gözlemlendi. Bununla birlikte D3 ve D6 bileşikleri için de sırasıyla 6,7 ve 6,2 katlık azalışlar olduğu gözlemlendi. Sonuç olarak starvasyonsuz koşullarda tek başlarına uygulanan tüm bor bileşiklerinin AR mRNA seviyelerini ve buna bağlı olarak da hedef genlerinden biri olan PSA mRNA seviyelerini etkili bir şekilde azalttığı belirlendi.

Bor bileşikleri varlığında AR ve PSA genlerinde gözlenen azalışların aksine, TP53 geninin mRNA seviyesini arttığı belirlendi. Özellikle D1 bileşiği ile yaklaşık olarak 52 katlık artış gösteren TP53 mRNA seviyesinin, D3 ile 11,5 kat ve D6 ile de 19,4 kat arttığı saptandı. Tüm kat değişiklikleri göz önüne alındığında D1 ve D6 bor bileşiklerinin benzer etkiler gösterirken, D3 bileşiğinin 2,5 mM konsantrasyonda etkinliğinin daha az olabileceği sonucuna varıldı.



**Şekil 4.3.** Bor bileşiklerinin farklı MMP genlerinin mRNA miktarlarına etkisi

AR ve PSA mRNA seviyelerinin incelenmesinin ardından MMP2, MMP9 ve MMP 12 olmak üzere farklı MMP genlerinin mRNA seviyeleri yine 2,5 mM konsantrasyonda 48 saat süreyle uygulanan bor bileşikleri varlığında incelendi. Şekil 4.3'te görüldüğü gibi, bor bileşikleri varlığında incelenen tüm MMP genlerinin mRNA seviyelerinde azalışlar olduğu gözlemlendi. MMP2 mRNA seviyesinde D1 bileşiğinin 11,1 kat, D3 bileşiğinin 1,9 kat ve D6 bileşiğinin ise 12,7 kat bir azalışa yol açtığı saptandı. MMP9 mRNA seviyesinde D1 bileşiğinin 2,6 kat, D3 bileşiğinin 1,4 kat ve D6 bileşiğinin ise 6,2 kat bir azalışa yol açtığı belirlendi. Son olarak MMP12 mRNA seviyesinde D1 bileşiğinin 5 kat, D3 bileşiğinin 6,5 kat ve D6 bileşiğinin ise 13,7 kat bir azalışa yol açtığı gözlemlendi. D3 bileşiği varlığında MMP2 ve MMP9 seviyelerinde 2 katın üzerinde bir değişiklik gözlenmezken, MMP12 seviyesinin 6,5 kat olmak üzere belirgin bir biçimde azaldığı belirlendi. AR ve PSA seviyelerindeki etkilerine benzer şekilde D1 ve D6 bileşiklerinin D3'e oranla MMP seviyelerinin regüle edilmesinde daha etkili oldukları gözlemlendi. Her üç bor bileşiğinin gösterdiği etkiler göz önüne alındığında ise MMP mRNA seviyelerinin baskılanmasında en etkili bileşiğin D6 olduğu sonucuna varıldı.

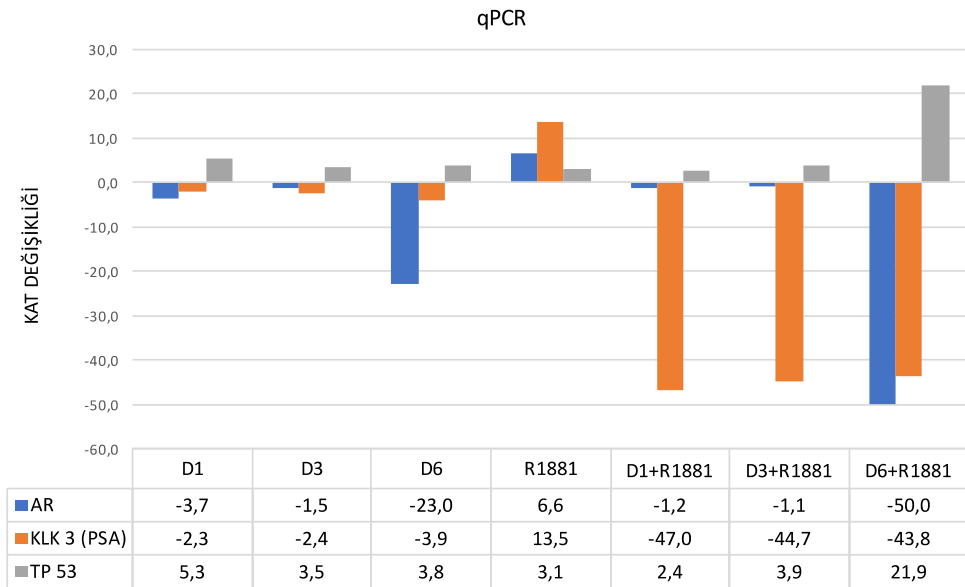


**Şekil 4.4.** Bor bileşiklerinin farklı serin proteaz genlerinin mRNA miktarlarına etkisi



Son olarak starvasyonsuz normal koşullarda farklı serin proteaz genlerinin mRNA seviyeleri qPCR metodolojisi ile incelendi. Şekil 4.4'te elde edilen grafik göz önüne alındığında, beklenildiği şekilde bor bileşikleri varlığında serin proteaz gen ekspresyon seviyelerinde azalışlar olduğu gözlemlendi. Özellikle D1 bor bileşiğinin oldukça etkili olduğu ve HPN, PRSS8 ve TMPRSS2 proteazlarının mRNA seviyelerini sırasıyla 25,6, 10 ve 3,8 kat azalttığı saptandı. D3 bor bileşiği varlığında HPN ve TMPRSS2 genleri için 2 katın üzerinde anlamlı değişiklikler gözlenmemesine rağmen, PRSS8 mRNA seviyesinde yaklaşık 3,5 katlık bir azalmaya yol açtığı belirlendi. D6 bileşiği varlığında sadece HPN mRNA seviyesinde 2,1 katlık artış olduğu gözlemlendi ancak yüksek bir kat seviyesi olmadığından dolayı bu değişiklik anlamlı olarak kabul edilmedi. Bununla birlikte D6 varlığında PRSS8 ve TMPRSS2'nin 7,7 ve 3,7 kat azaldığı saptandı. Şekil 4.4'te belirlenen kat değişiklikleri dikkate alındığında ise serin proteazların gen ekspresyon seviyesinin azaltılmasında en etkili rol oynayabilecek bileşiğin D1 olduğu sonucuna varıldı.

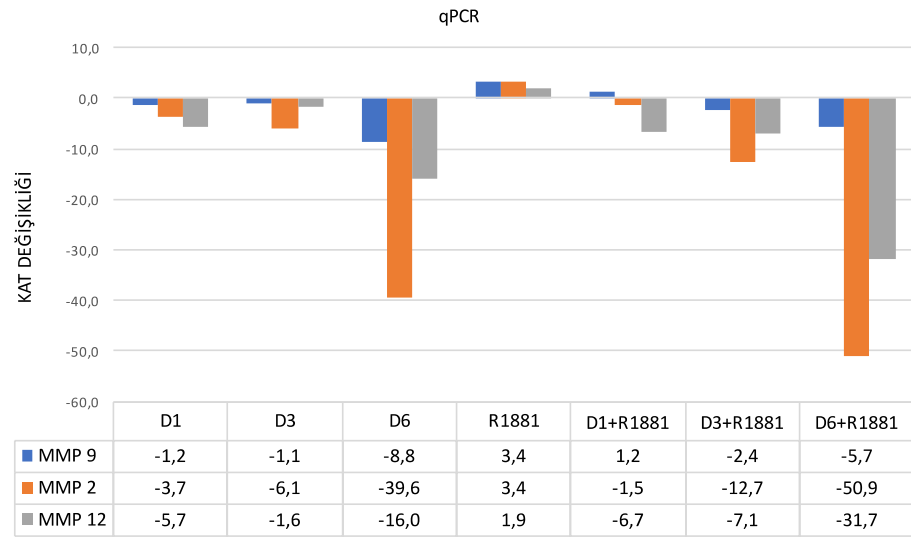
Starvasyonsuz set için bor bileşiklerin etkilerinin incelenmesinden sonra, starvasyonlu sette ve androjen varlığında bor bileşiklerinin etkisiyle gen ekspresyonunda meydana gelen değişiklikler sorgulanmaya çalışılmıştır.



**Şekil 4.5.** Bor bileşiklerinin ve R1881'in AR, PSA ve TP 53 gen ekspresyonu seviyelerine etkisi.

Şekil 4.5'te gösterildiği gibi, starvasyonlu koşullarda tek başlarına bor bileşiklerinin etkisi incelendiğinde starvasyonsuz koşullara benzer olarak tüm bor bileşiklerinin AR ve PSA seviyelerinin azalttığı bununla birlikte TP53 mRNA seviyesinde ise artışa yol açtığı gözlemlendi. Özellikle AR ve PSA seviyelerinin azalmasında sırasıyla 23,6 ve 3,9 kat olmak üzere en etkili bileşiğin D6 olduğu belirlendi. TP53 seviyesinin artırılmasında ise 5,3 katlık bir artış ile en etkin rolü D1 bileşiğinin oynadığı saptandı. R1881 varlığında, AR ve PSA genleri için sırasıyla 50 ve 43,8 katlık azalışlar olmak üzere en yüksek antagonistik etkiyi D6 bileşiğinin gösterdiği belirlendi. D1 bileşiği varlığında ise AR için 1,2 ve PSA için 47 kat azalma olduğu gözlemlendi. Bununla birlikte starvasyonsuz koşullarda etkinliği diğer bor bileşiklerine göre daha az olan D3 bileşiğinin, starvasyonlu koşullarda ve R1881 varlığında özellikle PSA seviyesinin azalmasında etkin olduğu ve 44,7 katlık bir azalmaya neden olduğu belirlendi.

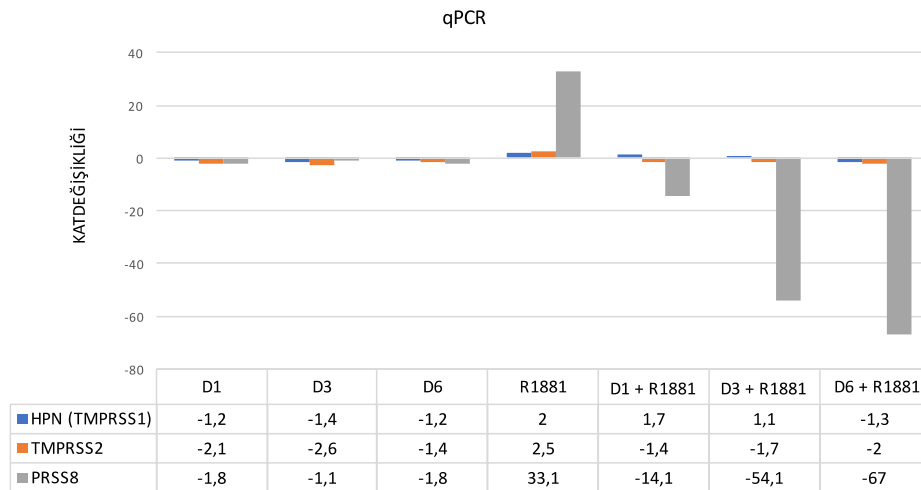
TP 53 geninin ekspresyon seviyesindeki değişiklikler incelendiğinde ise R1881 ile birlikte gözlenen 3,1 katlık artışın D1 ve D3 bileşikleriyle çok fazla değişiklik göstermediği bununla birlikte D6 bileşiği varlığında bu artışın 21,9 kata yükseldiği gözlemlendi. Starvasyonsuz koşullarda elde edilen kat değişiklikleri sonucunda AR, PSA ve TP53 genlerinin mRNA seviyelerinin düzenlenmesinde en etkin rol oynayan bileşiğin D6 olabileceği sonucu varıldı.



**Şekil 4.6.** Bor bileşiklerinin ve R1881'in farklı MMP'lerin gen ekspresyonu seviyelerine etkisi.

MMP 9, MMP 2 ve MMP 12 olmak üzere üç farklı MMP geninin starvasyonlu koşullarda mRNA seviyelerindeki değişiklikleri gösteren grafikten (Şekil 4.6), starvasyonsuz koşullarda olduğu gibi, tek başına bor bileşiklerinin bahsedilen genler üzerinde azaltıcı bir etkiye sahip olduğu sonucuna varıldı. Bununla birlikte starvasyonlu koşullarda MMP12 seviyesininin belirgin bir biçimde azalmasına yol açan D3 bileşiğinin starvasyonlu koşullarda ise sadece MMP2 mRNA seviyesini anlamlı bir şekilde 6,1 kat oranında azalttığı gözlemlendi. D1 ve D6 bor bileşikleri için yaklaşık olarak starvasyonlu ve starvasyonsuz koşullarda benzer azalışlar olduğu ve özellikle D6 bileşiğinin MMP genlerinin mRNA seviyesinin azaltmada tek başına oldukça etkin olduğu belirlendi. D6 bor bileşiği varlığında MMP 2, MMP 9 ve MMP 12 mRNA seviyeleri için sırasıyla 39,6, 8,8 ve 16 katlık azalışlar olduğu saptandı.

R1881 uygulamasıyla birlikte literatürdeki bilgiler ile uyumlu bir şekilde MMP 2 ve MMP 9 ekspresyon seviyelerinin 3,4 kat artarken, MMP 12 seviyesinde anlamlı bir değişiklik gözlenmedi. Bununla birlikte bor bileşiklerinin R1881'in etkisinin inhibe ederek incelenen hedef MMP'lerin seviyelerinin çok daha yüksek oranda azalmalarına yol açtığı belirlendi. MMP 2, MMP 9 ve MMP 12 mRNA seviyeleri için sırasıyla 50,9, 5,7 ve 31,7 olmak üzere en yüksek kat değişikliği D6 bileşiği varlığında gözlemlendi.



**Şekil 4.7.** Bor bileşiklerinin ve R1881'in farklı TMRSS'lerin gen ekspresyonu seviyelerine etkisi.

Son olarak starvasyonlu koşullarda serin proteaz genlerinin mRNA seviyeleri incelendiğinde (Şekil 4.7), incelenen tüm hedef genler için tek başına bor bileşikleri varlığında 2 katın üzerinde anlamlı değişiklikler olmadığı belirlendi. Özellikle starvasyonsuz koşullarda D1 bileşiği varlığında gözlenen yüksek orandaki kat değişikliklerinin (25,6 ve 10 kat gibi), starvasyonlu koşullarda gerçekleşmediği gözlendi.

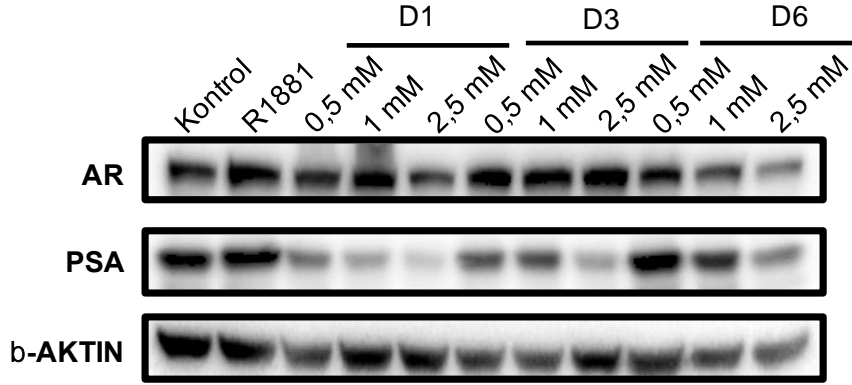
R1881 uygulaması ile birlikte araştırılan hedef genlerin tümünde belirli oranlar artışlar olduğu belirlendi ve özellikle PRSS8 mRNA seviyesin de 33,1 katlık bir artış saptandı. İncelenen serin proteaz genleri için de önceki sonuçlar ile uyumlu olarak R1881 varlığında bor bileşiklerinin etkinliğinin arttığı ve hedef genlerin mRNA seviyelerinde yüksek oranlarda azalışlara yol açtığı belirlendi. HPN ve TMPRSS2 genlerinde R1881 ile birlikte gözlenen artışların bor bileşikleri ile birlikte aşağı regüle edildikleri gözlendi. Özellikle PRSS8 geni için gözlenen 33,1 katlık artışın; D1, D3 ve D6 bileşikleri varlığında 14,1, 54,1 ve 67 kat azaldığı saptandı. Bununla birlikte incelenen tüm hedef serin proteaz genleri için özellikle R1881 ile birlikte yine D6 bileşiğinin en etkin rolü oynadığı sonucuna varıldı.

### **4.3. Western Blot Sonuçlar**

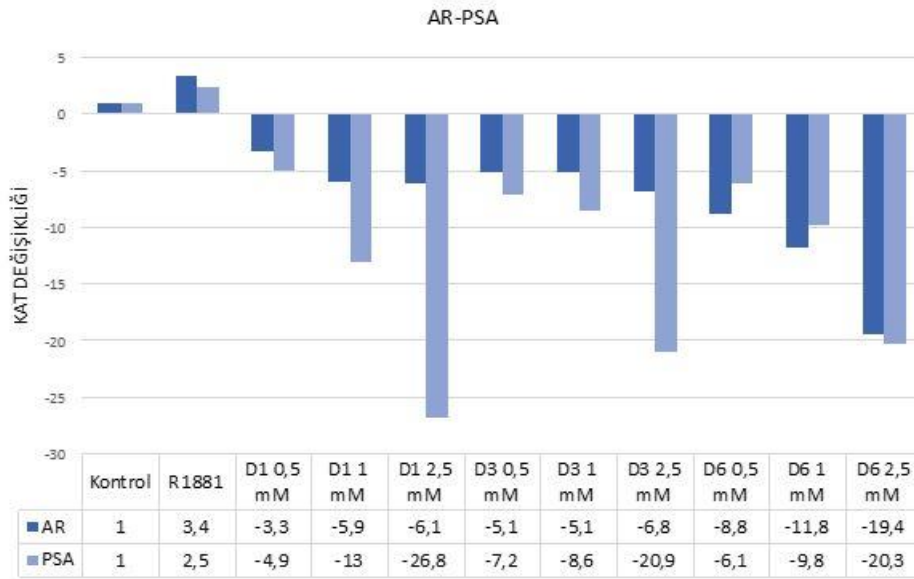
Bu tez kapsamında qPCR analizlerine ek olarak farklı bor bileşikleri olan D1, D3 ve D6'nın LNCaP hücrelerindeki AR ve serin proteaz proteinleri üzerindeki etkisi de araştırılmaya çalışılmıştır. Proteinler zerindeki etkilerini test etmek için, benzer Şekilde starvasyonsuz ve starvasyonlu hücre setleri kullanıldı. Starvasyonsuz sete bor bileşenlerinin her birinden 500 mM, 1 mM ve 2,5 MM olmak üzere farklı konsantrasyonlarda 48 saat süreyle uygulama yapıldı. Starvasyonlu set için R1881 varlığında ve yokluğunda 2,5 mM konsantrasyonda 48 saat süreyle bor bileşikleri uygulandı. Uygulamalardan sonra protein izolasyonu ve SDS-PAGE elektroforezi yapıldı. Farklı bor bileşiklerinin doz ve süre bağımlı etkinlikleri Western blot tekniği kullanılarak ölçüldü. Serin proteaz proteinlerinin ekspresyonundaki değişiklikler, "Image J" programı kullanılarak analiz edildi.  $\beta$ -Aktin kullanılarak normalizasyon yapıldı ve veriler grafiksel olarak gösterildi.

Öncelikle bor bileşikleri varlığında prostat kanseri gelişimine katkısı olduğu bilinen AR

ve PSA protein düzeylerindeki değişimler, starvasyonsuz hücre setinden elde edilen veriler kullanılarak araştırıldı.

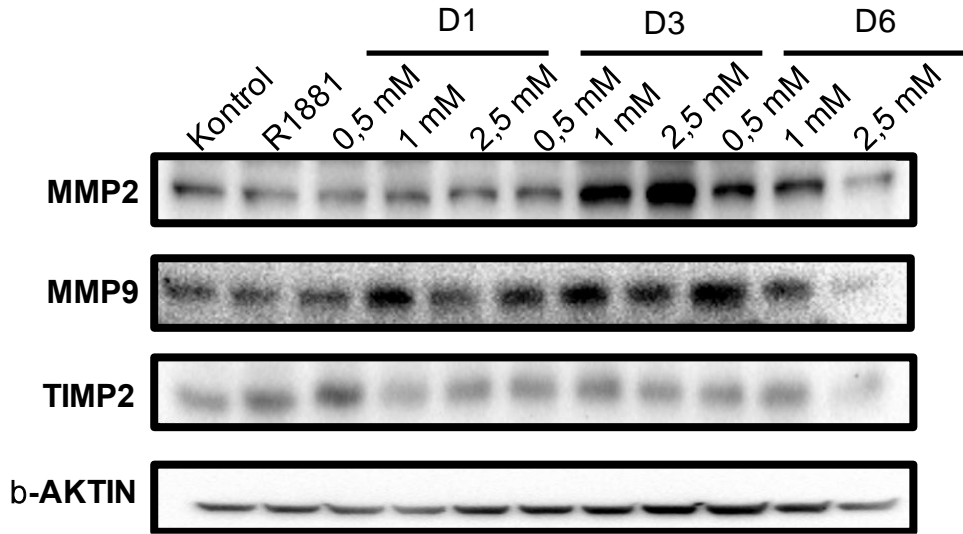


**Şekil 4.8.** LNCaP hücrelerine üç farklı konsantrasyonda üç farklı bor bileşiği uygulaması sonucunda prostat kanserine özgü proteinlerin (PSA ve AR) ifadelerindeki değişikliklerin karşılaştırmalı analizi ( $\beta$ -Aktin yükleme kontrolü amacıyla kullanılmıştır).

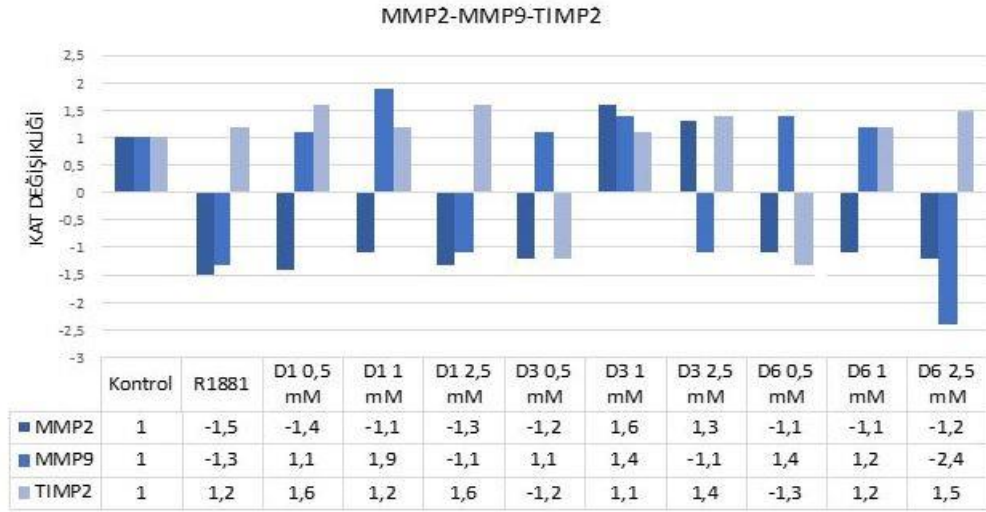


**Şekil 4.9.** LNCaP hücrelerine farklı konsantrasyonlarda bor bileşiklerinin uygulanması sonucunda Image J yazılımı ile elde edilen AR ve PSA protein ekspresyonunun kat değişiklikleri.

Şekil 4.8' deki western-blot görüntüleri ve Şekil 4.9'daki kat değişiklikleri incelendiğinde, pozitif kontrol olarak kullanılan R1881 ile birlikte beklenildiği şekilde AR proteininde 3,4 katlık ve PSA proteininde ise 2,5 katlık bir artış olduğu belirlendi. Bor bileşiklerinin ise qPCR sonuçları ile uyumlu olacak şekilde doz bağımlı olarak hem AR hem de PSA protein seviyelerinde azalmaya yol açtığı gözlemlendi. 2,5 mM dozda uygulanan D1, D3 ve D6 bileşiklerinin AR protein seviyesini sırasıyla 6,1, 6,8 ve 19,4 kat azalttığı saptandı. 2,5 mM dozda uygulanan D1, D3 ve D6 bileşiklerinin PSA protein seviyesini ise sırasıyla 26,8, 20,9 ve 20,3 kat azalttığı saptandı. qPCR sonuçlarından farklı olarak protein seviyesinde regülasyonda D3 bileşiğinin daha etkin olduğu ve hem AR hem de PSA protein seviyesini etkili bir biçimde azalttığı gözlemlendi. qPCR sonuçlarına benzer olarak da AR protein seviyesini azaltmada en etkin bor bileşiğinin D6 olduğu, PSA protein seviyesini azaltmada ise en etkin bor bileşiğinin D1 olduğu belirlendi. Sonuç olarak tüm bor bileşiklerinin doz bağımlı olarak AR ve PSA protein seviyelerinin azalmasına yol açtığı sonucuna varıldı.



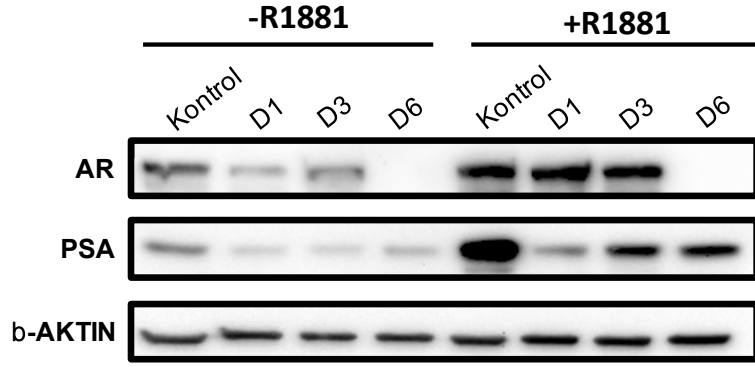
**Şekil 4.10.** LNCaP hücrelerine farklı konsantrasyonlarda bor bileşiklerinin uygulanması sonucunda matris metalloproteinazların (MMP) ifadelerindeki değişikliklerin karşılaştırmalı analizi ( $\beta$ -Aktin yükleme kontrolü amacıyla kullanılmıştır)



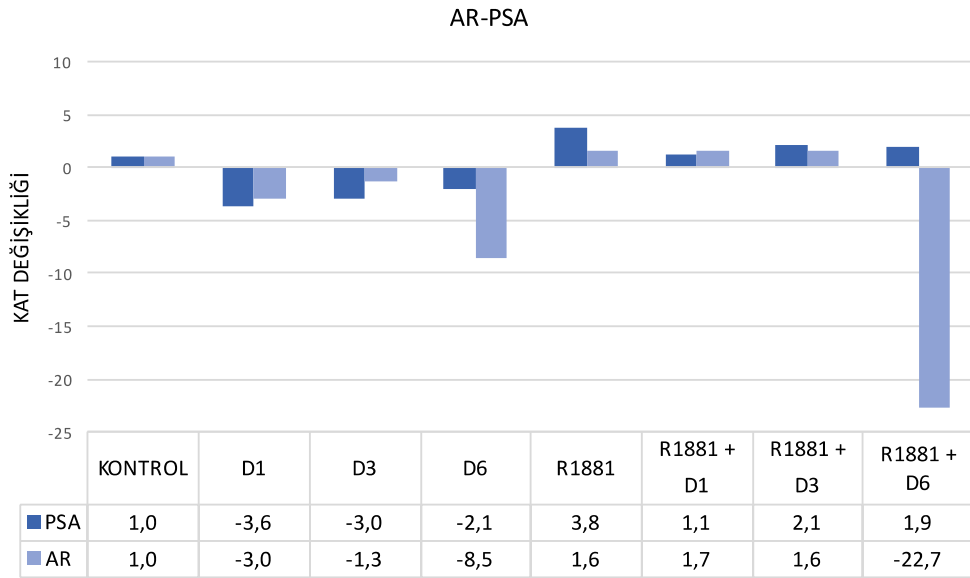
**Şekil 4.11.** LNCaP hücrelerine farklı konsantrasyonlarda bor bileşiklerinin uygulanması sonucunda *Image J* yazılımı ile elde edilen MMP 2, MMP 9 ve TIMP 2 ekspresyonunun kat değişiklikleri.

Şekil 4.10 ve Şekil 4.11'deki veriler incelendiğinde, bor bileşikleri varlığında araştırılan hedef MMP proteinlerinde ve ayrıca TIMP2 protein seviyesinde 2 katın üzerinde anlamlı değişiklikler elde edilmedi. Genel olarak bakıldığında bor bileşikleri varlığında MMP 2 ve MMP 9 protein seviyeleri azalırken, TIMP 2 inhibitör proteinin seviyesinin arttığı söylenebilir. Ancak bor bileşikleri varlığında doza bağlı olarak belirgin bir regülasyonun olmadığı saptandı. Sadece 2,5 mM konsantrasyonda uygulanan D6 bor bileşiğinin MMP 9 protein seviyesini 2,4 kat azalttığı belirlendi. Sonuç olarak starvasyonsuz koşullarda qPCR analizleri sonucunda bor bileşiklerinin matriks metalloproteinazlar üzerinde gösterdiği transkripsiyonel regülasyon, translasyonel seviyede belirlenemedi.

LNCaP starvasyonsuz hücre setinin analizinden sonra starvasyona maruz bırakılan LNCaP hücre setinde hedef proteinler incelendi. Bor bileşikleri hücrelere 2,5 mM konsantrasyonda 48 saat süreyle uygulanırken, bu uygulamanın 24. saatinde 10 nM konsantrasyonda R1881 uygulaması yapıldı. Starvasyonlu hücrelerde ilk olarak AR ve PSA protein seviyelerindeki değişikliklerin analizi yapıldı.



**Şekil 4.12.** LNCaP hücrelerinin üç farklı bor bileşiği ve R1881 uygulaması sonucunda PSA ve AR protein ifadelerindeki değişikliklerin karşılaştırmalı analizi ( $\beta$ -Aktin yükleme kontrolü amacıyla kullanılmıştır).

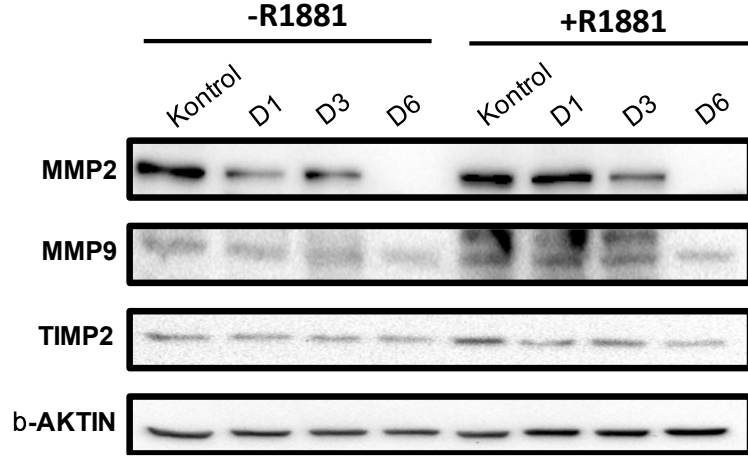


**Şekil 4.13.** LNCaP hücrelerine bor bileşikleri ve R1881 uygulanması sonucunda Image J yazılımı ile elde edilen AR ve PSA ekspresyonunun kat değişiklikleri.

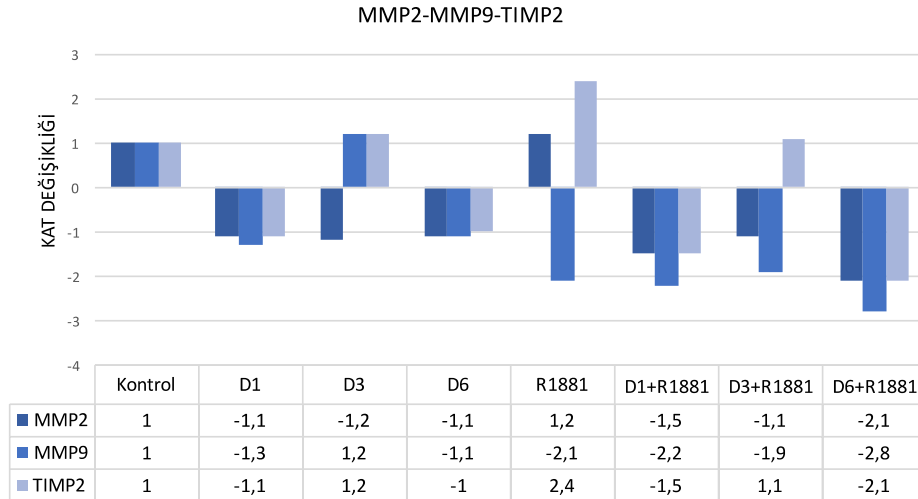
Şekil 4.12 ve Şekil 4.13'teki starvasyonlu koşullarda elde edilen sonuçlar incelendiğinde, tek başına uygulanan bor bileşiklerinin diğer sonuçlarımız ile uyumlu olarak hem AR hem de PSA protein seviyelerini belirgin bir biçimde azalttığı gözlemlendi. D1, D3 ve D6 bor bileşiklerinin PSA protein seviyesini 3,6, 3 ve 2,1 kat azaltırken, AR protein seviyesini sırasıyla 3, 1,3 ve 8,5 kat azalttığı saptandı. R1881 uygulaması ile beklenildiği şekilde PSA protein seviyesinde 3,8 kat ve AR protein seviyesinde 1,6 kat bir artış olduğu gözlemlendi. Bununla birlikte R1881 ile gözlenen bu artışların da bor bileşikleri varlığında net bir şekilde azaldığı belirlendi. Özellikle D6 bileşiği için, R1881 varlığında PSA için gözlenen 3,8 katlık artışı 1,9 kata düşürerek neredeyse % 50 oranında bir azalmaya yol açtığı gözlemlendi. Aynı zamanda D6 bileşiğinin AR protein



seviyesinde ise 22,7 katlık bir azalmaya neden olduğu saptandı. qPCR sonuçlarına ve starvasyonsuz koşullarda elde edilen western-blot sonuçlarına benzer olarak starvasyonlu koşullarda da AR protein seviyesini azaltmada en etkin bor bileşiğinin D6 olduğu, PSA protein seviyesini azaltmada ise en etkin bor bileşiğinin D1 olduğu belirlendi.



**Şekil 4.14.** LNCaP hücrelerinde üç farklı bor bileşiği ve R1881 uygulaması sonucunda matris metalloproteinazların (MMP) ifadelerindeki değişikliklerin karşılaştırmalı analizi ( $\beta$ -Aktin yükleme kontrolü amacıyla kullanılmıştır).



**Şekil 4.15.** LNCaP hücrelerine bor bileşikleri ve R1881 uygulanması sonucunda *Image J* yazılımı ile elde edilen MMP 2, MMP 9 ve TIMP 2 ekspresyonunun kat değişiklikleri.

Şekil 4.14 ve Şekil 4.15'teki sonuçlar incelendiğinde, starvasyonsuz koşullara benzer olarak tek başlarına bor bileşikleri varlığında araştırılan hedef MMP proteinlerinde ve ayrıca TIMP2 protein seviyesinde 2 katın üzerinde anlamlı değişiklikler elde edilmedi.

Bununla birlikte beklenilenin aksine R1881 uygulamasının MMP9 protein seviyesini 2,1 kat azalttığı, TIMP2 protein seviyesini ise 2,4 kat artırdığı gözlemlendi. Ek olarak R1881 ile birlikte 1,2 kat artan MMP 2 protein seviyesinin D1, D3 ve D6 bileşiklerinin varlığında sırasıyla 1,5, 1,1 ve 2,1 kat azaldığı saptandı. MMP 9 protein seviyesinin de R1881 varlığında özellikle D1 ve D6 bileşikleriyle birlikte 2,2 ve 2,8 kat olmak üzere daha da yüksek oranlarda azalma gösterdiği belirlendi. Ancak bor bileşiklerinin varlığında TIMP2 protein seviyesinde elde edilmesi beklenen artışlar olmadığı gözlemlendi. Sonuç olarak starvasyonlu koşullarda R1881 varlığında özellikle D6 bor bileşiğinin MMP 2 ve MMP 9 proteinlerinin translasyonel regülasyonlarında rol oynayabileceği sonucuna varıldı.

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Tümör mikro ortamı, farklı kanser hücreleri popülasyonundan ve ilişkili stromal hücrelerden ve hücre dışı matrinden (ECM) oluşan bileşik bir sistemdir. İlk önce serin proteazların rolünün ECM'nin parçalanmasıyla sınırlı olduğu düşünülmüştü, ancak şimdi PCa'daki rollerinin önemli ölçüde daha karmaşık ve kritik olduğu anlaşıldı. Serin proteazları, fibroblastlar, endotelyal hücreler ve infiltre edici immün hücreler dahil olmak üzere stromal hücrelerin ürünüdür. Serin proteazlar, PCa benzeri proteolitik ağları, ECM'nin yeniden modellenmesini, büyüme faktörü ve sitokin sinyalleme sinin düzenlenmesini ve inflamatuvar yanıtların ve immüno supresif etkilerin modülasyonunu etkileyen tüm süreçlere dahil edilir. Bu proteazların aktivitesi ve etkileşimi hem tümör teşvik edici hem de baskılayıcı etkilere sahip olabilir. Genel olarak stromal hücrenin serin proteazlarının ekspresyonu ve aktivitesindeki değişiklikler, tümör gelişimi ve ilerlemesi ile ilişkilendirilmiştir (Tagirasa ve Yoo 2022).

MMP 2, MMP 9 ve MMP 12 gibi matriks metalloproteinazlar, hücre dışı matriksin yıkımında rol oynayan endopeptidaz tipi proteinlerdir. Morfogenez, anjiyogenez ve doku onarımı gibi çeşitli fizyolojik süreçlerle ilişkili doku yeniden şekillenmesinde rol oynayarak özellikle gibi patolojik süreçlere katkıda bulunmaktadır (Gong ve ark. 2014). Bununla birlikte yapılan bir çalışmada AR, MMP-9 ve EGFR'nin PCa ilerlemesini destekleyebilecek ara bağlantı faktörleri olduğu gösterilmiştir (Mandel ve ark. 2018). Prostat kanserinde yüksek MMP aktivitesinin varlığı ise metastazi kolaylaştırarak ve hücre proliferasyonu, apoptoz, anjiyogenez ve epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) gibi birçok farklı süreci etkileyerek kanserin ilerlemesine yol açmaktadır. Genellikle MMP'lerin prostat kanserinin ileri evrelerinde daha aktif olduğu düşünülmektedir (Still ve ark. 2000, Levi ve ark. 1996, Incorvaia ve ark. 2007).

Son birkaç yılda bor bileşikleri, yüksek maligniteye sahip bazı kanser türlerinin kemoterapisinde yararlı bir bileşen haline gelmiştir. Daha fazla bor bazlı terapi kimyasalları geliştirildikçe, bor ile farklı kanser türlerinin insidansı, bordan etkilenen biyokimyasal ve moleküler mekanizmalar arasındaki ilişkiyi araştırmak ve kanserin kemoprevansiyonunda borun ilişkisini araştırmak daha da önem kazanmaktadır. Bu bağlamda tez çalışmasında LNCaP hücreleri (androjen-bağımlı prostat kanseri hücre hattı) kullanılarak farklı kimyasal yapıya sahip olan bor bileşiklerinin (D1, D3 ve D6)

prostat kanseri gelişimi ve ilerlemesinde anahtar faktörlerden biri olan serin proteazların gen ve protein düzeyleri üzerine olan etkileri sorgulanmaya çalışıldı.

Bu tez çalışması kapsamında kullanılan bor bileşikleri literatürde var olmayan ve kanser hücreleri üzerindeki etkileri ilk kez araştırılan bor bileşikleridir. Bu nedenle çalışmalarımıza ilk olarak bor bileşiklerinin kanser hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkileri olup olmadığını sorgulamak amacıyla MTT sitotoksite analizleri ile başlandı. MTT analizinde elde edilen sonuçlara bakıldığında D1, D3 ve D6 olmak üzere üç bor bileşiğinin hepsinin konsantrasyona bağlı olarak LNCaP hücrelerinde hücre canlılığını azalttığı gözlemlendi. 2,5 mM konsantrasyonda D1, D3 ve D6 için hücre canlılıklarının sırasıyla %45,4, %68,9 ve %71,3 olduğu ve 48 saat süre için IC<sub>50</sub> değerlerinin ise sırasıyla 1,1, 7,5 ve 5,2 mM olduğu belirlendi (Şekil 4.1). Elde edilen veriler doğrultusunda en yüksek anti-proliferatif etkiye sahip olan bileşiğin D1 bileşiği olduğu ve konsantrasyona bağımlı olarak en düşük etkiyi de D3 bileşiğinin gösterdiği belirlendi. Sonuç olarak D1, D3 ve D6 bileşiklerinin prostat kanserinde potansiyel anti-proliferatif ajanlar olarak kullanılabilirliği düşünüldü. Bu sonuçlar göz önüne alınarak tez çalışması kapsamında yapılacak olan qPCR ve western-blot analizlerinde her üç bor bileşiği için ortak olarak kullanılacak 3 doz aralığı (0,5-1-2,5 mM) seçilerek starvasyonsuz ve starvasyonlu koşullarda deneyler gerçekleştirildi. Bu koşullar altında, bor bileşiklerinin matriks metalloproteinaz, serin proteaz ve AR ile PSA gibi farklı gen ve proteinlerin seviyeleri üzerine olan etkileri sorgulandı.

Androjen reseptörü (AR), androjenlerin hücresel hareketlerini düzenleyen bir nükleer reseptör transkripsiyon faktörüdür. Erkek cinsiyet steroidleri olarak, erkek cinsel farklılaşması ve gelişiminde, ayrıca erişkinlerde cinsel dokuların korunmasında ve desteklenmesinde rol oynarlar. Ayrıca androjenler, erkeklerde benign prostat hiperplazisi ve prostat kanseri gibi patolojilerin gelişimi ve ilerlemesi için kritik öneme sahiptir (Scott ve Tindall 2007). AR geninde gözlenen mutasyonlar, prostat kanserinin ilerlemesine katkıda bulunmaktadır. AR normal prostat bezinin büyümesi ve gelişimi için önemli olduğu kadar prostat kanseri ve özellikle androjen-bağımsız hastalığa geçişte de oldukça önemlidir. AR ile düzenlenen genlerin ürünleri (PSA, NKX3.1, TMPRSS2, KLK2, TSC22 ve B2M gibi) androjenlerin etkisine aracılık ederek prostat kanserinin ilerlemesinde rol oynamaktadırlar (Bennett ve ark. 2010). PSA normal prostatta, meni

pıhtılaşmasını önlemek için seminal veziküllerde sentezlenen yüksek moleküler ağırlıklı proteinleri parçaladığı glandüler kanallarda bulunur. PSA, prostat tümörlerinde ise normal işlevinin ötesine geçmekte ve muhtemelen kanser ilerlemesini etkilemektedir (Kim ve Coetzee 2004). Saxena ve arkadaşları araştırmalarında AR'nin bilinen bir hedef geni olan ve hastalık başlangıcı ve ilerlemesinin önemli bir biyobelirteçi olan PSA'nın AR mRNA ve protein ekspresyonu için gerekli olduğunu göstermişlerdir (Saxena ve ark. 2012). Çalışmamızda hem starvasyonsuz hem de starvasyonlu koşullarda bor bileşikleri varlığında AR ve PSA genlerinin transkripsiyonel regülasyonlarını incelemek amacıyla qPCR gerçekleştirildi. Şekil 4.2 ve Şekil 4.5'te elde edilen sonuçlar incelendiğinde ise tek başlarına uygulanan tüm bor bileşiklerinin starvasyonsuz ve starvasyonlu koşullarda AR ve PSA seviyelerini azalttığı gözlemlendi. AR mRNA seviyesinde starvasyonsuz koşullarda 6,4 kat ve starvasyonlu koşullarda 23,6 katlık bir azalış ile en etkili bileşiğin D6 olduğu saptandı. PSA'nın hem AR'nin aşağı akış hedef geni olmasından hem de borun bir serin proteaz inhibitörü olarak fonksiyon göstermesinden dolayı bor bileşikleri varlığında PSA mRNA seviyelerinde de etkili azalışlar olduğu belirlendi. Bununla birlikte starvasyonsuz koşullarda en yüksek etkiyi 19,5 katlık bir azalış ile D1 bileşiği gösterirken, starvasyonlu koşullarda bu etki 3,9 katlık bir azalış ile D6 bileşiği tarafından gözlemlendi. Ek olarak starvasyonlu koşullarda sentetik androjen R1881 uygulaması ile birlikte artan AR ve PSA seviyelerinin de bor bileşikleri ile daha yüksek oranlarda azaldıkları gözlemlendi. AR ve PSA genleri için sırasıyla 50 ve 43,8 katlık azalışlar olmak üzere R1881'e karşı en yüksek antagonistik etkiyi D6 bileşiğinin gösterdiği belirlendi. Bununla birlikte starvasyonsuz koşullarda etkinliği diğer bor bileşiklerine göre daha az olan D3 bileşiğinin, starvasyonlu koşullarda ve R1881 varlığında özellikle PSA seviyesinin azalmasında etkin olduğu gözlemlendi. Sonuç olarak bor bileşiklerinin AR ve PSA mRNA seviyelerini etkili bir şekilde azalmasına yol açtığı ve bu inhibisyon etkisinin özellikle R1881 varlığında daha yüksek oranda gözlemlendiği düşünüldü.

Çalışmamızda qPCR analizlerine ek olarak bor bileşikleri varlığında AR ve PSA proteinlerinin translasyonel regülasyonlarını incelemek amacıyla western-blot analizleri gerçekleştirildi. Denemelerde pozitif kontrol olarak kullanılan R1881 ile birlikte beklenildiği şekilde AR ve PSA protein seviyelerinde artışlar olduğu gözlemlendi. Hem starvasyonsuz (Şekil 4.9) hem de starvasyonlu (Şekil 4.13) koşullarda tek başına uygulanan bor bileşiklerinin qPCR sonuçları ile uyumlu olacak şekilde doz bağımlı

olarak hem AR hem de PSA protein seviyelerinde azalmaya yol açtığı belirlendi. R1881 ile gözlenen artışların da bor bileşikleri varlığında net bir şekilde azaldığı gözlemlendi (Şekil 4.13). Bor bileşikleri arasındaki farklılıklar incelendiğinde ise qPCR sonuçları ile uyumlu olacak şekilde AR protein seviyesini azaltmada en etkin bor bileşiğinin D6 olduğu, PSA protein seviyesini azaltmada ise en etkin bor bileşiğinin D1 olduğu belirlendi. Sonuç olarak bor bileşiklerinin AR ve PSA'nın translasyonel regülasyonlarında da rol oynayabileceği düşünüldü.

İleri prostat kanserlerinde ve özellikle metastaz durumunda %50 oranında TP53 (p53) lokusunu içeren kromozom 17p13'de allelik kayıp gerçekleşmektedir (Jiang ve ark. 2006, Simmons 2006). p53, G1/G2 ve G2/M geçişlerini düzenleyerek büyümenin durdurulmasını ve DNA onarımını uyarmakta veya stresin uzunluğuna bağlı olarak apoptozun başlamasına yol açmaktadır. p53 inaktivasyonu ise DNA onarım mekanizmasının azalması ile sonuçlanmaktadır (Abate-Shen ve Shen 2000, Hallstrom 2007). Tez çalışması kapsamında AR ve PSA genleri ile birlikte TP53 geninin de ekspresyon seviyeleri incelendi. Hem starvasyonsuz hem de starvasyonlu koşullarda bor bileşikleri varlığında AR ve PSA genlerinde gözlenen azalışların aksine, TP53 geninin mRNA seviyesinin arttığı belirlendi. Starvasyonsuz koşullarda özellikle D1 bileşiği ile yaklaşık olarak 52 katlık artış gösteren TP53 mRNA seviyesinin, D3 ile 11,5 kat ve D6 ile de 19,4 kat arttığı saptandı (Şekil 4.2). Starvasyonlu koşullarda ise sadece bor bileşikleri varlığında TP53 seviyesinin artırılmasında 5,3 katlık bir artış ile en etkin rolü D1 bileşiğinin oynadığı saptandı (Şekil 4.5). Bununla birlikte R1881 ile birlikte TP53 seviyesinde gözlenen 3,1 katlık artışın D1 ve D3 bileşikleriyle çok fazla değişiklik göstermediği, D6 bileşiği varlığında ise bu artışın 21,9 kata yükseldiği gözlemlendi. Sonuç olarak TP53 mRNA seviyesinin düzenlenmesinde D1 ve D6 bileşiklerinin benzer etkiler gösterdiği kanısına varıldı.

Bor bileşikleri; peptidaz, proteaz, proteazom, arginaz, nitrik oksit sentaz ve transpeptidaz gibi enzimlerin etkili bir inhibitörü olarak fonksiyon göstermektedir (Mcauley ve ark. 2011, Bradke ve ark. 2008, Gallardo-Williams ve ark. 2003). PSA ise benign ve malign prostat epitel hücreleri tarafından yüksek seviyelerde üretilen bir serin proteazdır (Kostova ve ark. 2013). Yapılan bir çalışmada borik asit ve 3-nitrofenil boronik asitin PSA'nın proteolitik aktivitesini inhibe ettiği ve böylece hücre proliferasyonunu azaltarak prostat kanseri gelişimini engelleyebilecekleri bulunmuştur

(Gallardo-Williams ve ark. 2003). Ek olarak 26S proteazom inhibitörü ve bir boronik asit dipeptid olan bortezomibin, LNCaP hücrelerinde p21 ve p53 seviyelerini artırdığı, PSA seviyesini azalttığı ve apoptozu indüklediği rapor edilmiştir (Ikezoe ve ark. 2004). Ayrıca yapılan çalışmalarda borik asidin DNA hasarına ve oksidatif strese karşı koruyucu bir element olabileceği öne sürülmüştür (Yılmaz ve ark. 2016, Ince ve ark. 2010). Bu çalışmalarda bor alımının artması ile birlikte kanser riskinin ve DNA hasarının azalması ve antioksidan seviyelerinin artmasının ilişkili olduğu rapor edilmektedir (Tepedelen ve ark. 2016, Yamada ve Eckhert 2019). Bu tez çalışmasında yapılan analizler sonucunda hem starvasyonsuz hem de starvasyonlu koşullarda bor bileşiklerinin AR ve PSA mRNA ve protein seviyelerinin azalmasına, TP53 mRNA seviyesinin ise artmasına yol açtığına dair veriler elde edildi. Gözlenen bu etkilerin ise özellikle sentetik androjen R1881 varlığında daha etkin bir biçimde gerçekleştiği gözlemlendi. Sonuç olarak bor bileşiklerinin prostat kanserinin ilerlemesini engelleyebilecek etkili anti-proliferatif ajanlar olarak umut vaat ettiği, AR aracılığıyla gerçekleşen androjenlerin etkisini ve p53 aracılığıyla gerçekleşen DNA onarım yanıtını düzenleyerek hücre homeostazını sağlayabileceği kanısına varıldı.

Matriks metalloproteinazlar (MMP'ler), yapısal ve işlevsel olarak ilişkili çinko bağımlı enzimlerin bir ailesidir. Bu proteinlerin ekspresyon seviyeleri; transkripsiyonel olarak, hücresel lokalizasyon ile, zimojen aktivasyonu ve endojen inhibisyon tarafından güçlü bir şekilde düzenlenir. MMP'ler, embriyo implantasyonu, kemik yeniden şekillenmesi, hücre çoğalması, apoptoz vb. gibi çok çeşitli fizyolojik süreçleri doğrudan etkiler. Matriks bileşenlerinin proteolizini ve ilişkili doku yeniden şekillenmesini etkileyebildiklerinden, kanser, inflamasyon ve vasküler hastalıklar gibi çoklu patolojik durumlarda rolleri önemli olabilir (Amălinei ve ark. 2010). Prostat kanseri dokusunda, MMP'lerin ve TIMP'lerin ekspresyonunda, genel bir TIMP kaybı ve MMP'lerin yukarı regülasyonu olarak ortaya çıkan bir farklılık vardır. Daha yüksek MMP aktivitesi, metastazı kolaylaştırarak ve ayrıca apoptoz, anjiyogenez ve epitelyalden mezenkimal geçişe (EMT) dahil olmak üzere hücre proliferasyonunun birçok adımını etkileyerek prostat kanserinin ilerlemesine yardımcı olur (Gong ve ark. 2014). Prostat kanseri gelişiminde rol oynadığı bilinen iki protein olan PSA ve AR'nin yanı sıra, bor bileşiklerinin MMP 2, MMP 9 ve MMP 12 olmak üzere matriks metalloproteinazlara ve onların inhibitörü olan TIMP 2 üzerindeki etkilerini de tez çalışması kapsamında araştırıldı. Starvasyonsuz koşullarda 48 saat süreyle 2,5 mM konsantrasyonda uygulana

bor bileşiklerinin MMP 2, MMP 9 ve MMP 12 genlerinin mRNA seviyelerinde azalışlara yol açtığı gözlemlendi (Şekil 4.3). AR ve PSA seviyelerindeki etkilerine benzer şekilde D1 ve D6 bileşiklerinin D3'e oranla MMP seviyelerinin regüle edilmesinde daha etkili oldukları gözlemlendi. Her üç bor bileşiğinin gösterdiği etkiler göz önüne alındığında MMP mRNA seviyelerinin baskılanmasında en etkili bileşiğin D6 olduğu sonucuna varıldı (Şekil 4.3). Starvasyonlu koşullarda ise yine en etkin bileşiğin D6 olduğu ve MMP 2, MMP 9 ve MMP 12 mRNA seviyeleri için sırasıyla 39,6, 8,8 ve 16 katlık azalışlara yol açtığı saptandı (Şekil 4.6). Ben-Yi Li ve arkadaşlarının yanı sıra Xinbo Liao ve arkadaşlarının çalışmalarında sentetik androjen R1881'in MMP 2 ve MMP 9 dahil olmak üzere MMP seviyelerini arttırdığı bulgulanmıştır (Liao ve ark. 2003 ve Li ve ark. 2007). Çalışmamızda da bu bilgiler ile uyumlu olarak R1881 uygulamasıyla birlikte MMP 2 ve MMP 9 ekspresyon seviyeleri 3,4 kat artarken, MMP 12 seviyesinde anlamlı bir değişiklik gözlemlenmedi. Bununla birlikte bor bileşiklerinin R1881'in etkisini inhibe ederek incelenen hedef MMP'lerin seviyelerinin çok daha yüksek oranda azalmalarına yol açtığı belirlendi (Şekil 4.6). Hedef MMP proteinlerinin ve ayrıca inhibitör protein TIMP2'nin tek başına bor bileşikleri varlığında translasyonel regülasyonları incelendiğinde 2 katın üzerinde anlamlı değişiklikler elde edilmedi (Şekil 4.11 ve Şekil 4.15). Bratland ve arkadaşları, çalışmalarında sentetik androjen analogu R1881'in, prostat kansinomu hücre dizisi LNCaP'de metaloproteinaz inhibitörü TIMP-2'nin ekspresyonunu zamana bağlı bir şekilde inhibe ettiğini gösterdi (Bartland ve ark. 2003). Bu bilginin aksine çalışmamızda R1881 uygulamasının MMP 9 protein seviyesini 2,1 kat azalttığı, TIMP 2 protein seviyesini ise 2,4 kat artırdığı gözlemlendi. R1881 ile birlikte bor bileşikleri uygulandığında MMP 2 ve MMP 9 protein seviyelerinde daha yüksek oranlarda azalmalar olduğu belirlendi (Şekil 4.15). Ancak bor bileşikleri varlığında TIMP2 protein seviyesinde elde edilmesi beklenen artışlar olmadığı gözlemlendi. Sonuç olarak starvasyonsuz koşullarda bor bileşiklerinin matriks metalloproteinazlar üzerinde gösterdiği transkripsiyonel regülasyon, translasyonel seviyede belirlenemezken; starvasyonlu koşullarda R1881 varlığında özellikle D6 bor bileşiğinin MMP 2 ve MMP 9 proteinlerinin translasyonel regülasyonlarında rol oynayabileceği sonucuna varıldı. Bu sonuçlar doğrultusunda D6 bor bileşiğinin MMP'lerin regülasyonunda fonksiyon göstererek prostat kanseri hücrelerinin metastazını azaltabileceği düşünüldü.

Tip II transmembran proteazlar (TTSP'ler), serin proteazların yeni bir alt ailesi olarak



kabul edilmekte ve hepsi hücre dışı bir proteolitik alan, bir transmembran alanı ve bir kısa sitoplazmik alandan oluşmaktadır (Buge ve ark. 2009). Çoğu TTSP, normal dokulara kıyasla çeşitli tümörlerde aşırı oranda eksprese edilir ve işlevlerini tümör gelişimi ve ilerlemesinde gösterirler. Çalışmalar, tümör ilerlemesi sırasında bireysel TTSP'lerin ekspresyonunu analiz etmekte ve bu proteazların tümör hücresi gelişimi ve ilerlemesinde gösterirler. Çalışmalar, tümör ilerlemesi sırasında bireysel TTSP'lerin ekspresyonunu analiz etmekte ve bu proteazların tümör hücresi gelişimi ve ilerlemesindeki potansiyel rollerini araştırmaktadır (Szabo ve Bugge 2008). Hepsinin (TMPRSS1 olarak da bilinir) mRNA seviyelerinin prostat kanseri vakalarının yaklaşık %90'ında yüksek olduğu rapor edilmiştir. Hepsinin aşırı ekspresyonu ise bazal membranın degradasyonuna ve lenf nodu metastazına neden olmaktadır (Wu ve Parry, 2007). TMPRSS2'nin prostat dokusu epitelinde yüksek oranda ifade edildiği bildirilmiş ve ayrıca, prostat kanseri hastalarında TMPRSS2 geninin kromozomal yeniden düzenlemeleri tanımlanmıştır (Jacquinet ve ark. 2001; Soller ve ark. 2006). Bir diğer çalışmada TMPRSS2'nin, prostat kanseri dokusunda aşırı eksprese edilen ve özellikle kanser hücresi istilası ve metastazında yer alan androjenle düzenlenen bir gen olduğu sonucuna varılmıştır (Lucas ve ark. 2014). Bu duruma benzer şekilde androjenlerin, hepsin ve prss8 gibi diğer serin proteazların ekspresyonunu da tetikleyebileceği öne sürülmektedir (Khemlina ve ark. 2015). Ayrıca PRSS8'in anormal ekspresyonu ise prostat, mesane, mide ve kolorektal kanserler dahil olmak üzere birçok kanser türünde belirlenmiştir (Takahashi ve ark. 2003). Çalışmamızda da son olarak serin proteaz genlerinin mRNA seviyeleri qPCR metodolojisi ile incelendi. Starvasyonsuz koşullarda bor bileşikleri varlığında serin proteaz gen ekspresyon seviyelerinde azalışlar olduğu gözlemlendi. Özellikle D1 bor bileşiğinin oldukça etkili olduğu ve HPN, PRSS8 ve TMPRSS2 proteazlarının mRNA seviyelerini sırasıyla 25,6, 10 ve 3,8 kat azalttığı saptandı (Şekil 4.4). Starvasyonlu koşullarda serin proteaz genlerinin mRNA seviyeleri incelendiğinde, incelenen tüm hedef genler için tek başına bor bileşikleri varlığında 2 katın üzerinde anlamlı değişiklikler olmadığı belirlendi (Şekil 4.7). R1881 uygulaması ile birlikte araştırılan hedef genlerin tümünde belirli oranlar artışlar olduğu belirlendi ve özellikle PRSS8 mRNA seviyesinde de 33,1 katlık bir artış saptandı. İncelenen serin proteaz genleri için de önceki sonuçlar ile uyumlu olarak R1881 varlığında bor bileşiklerinin etkinliğinin arttığı ve hedef genlerin mRNA seviyelerinde yüksek oranlarda azalışlar olduğu gözlemlendi (Şekil 4.7). Serin proteazların transkripsiyonel regülasyonlarında starvasyonsuz koşullarda en etkili bor bileşiği D1 olurken,

starvasyonlu koşullarda D6 bor bileşiğinin en etkin rolü oynadığı belirlendi.

Tez alıřması kapsamında kullanılan bor bileřiklerinin tümü di- ve mono-ester sodyum tuzları olarak sentez edilmiřtir. Bununla birlikte D1 bor bileřiđi askorbat (askorbik asit/ C vitamini), D3 bor bileřiđi laktoz (laktik asit) ve D6 bor bileřiđi ise salisilat (salisilik asit / aspirin) içermektedir. Yapılan analizler sonucunda ise D1 ve D6 bileřiklerinin genel olarak benzer etkinliklere sahip olduđu, D3 bileřiđinin daha dűřük seviyelerde etki gűsterdiđi ve D6 bileřiđinin etkililiđinin diđer bileřiklere kıyasla en yűksek olduđu sonucuna varıldı. Literatűr bilgisi ıřıđında bu durumun D6 bor bileřiđinin yapısında bir nonsteroidal anti-inflamatuvar ilaç (NSAID) olan aspirini barındırmasından kaynaklı olduđu dűřűnűlmektedir. Askorbik asit / C vitamini, plazma membranlarında ve hűcrelerde antioksidan gűrevi gűren indirgeyici bir ajan ve serbest radikal eliminatűrűdűr. Yapılan bir çalıřmada askorbik asidin PC-3 ve LNCaP prostat kanseri hűcre dizileri için doza bađlı bir řekilde toksik etki gűsterdiđi bulgulanmıřtır (Mangır ve MacNeil 2020). Bir bařka çalıřmada C vitamini açısından zengin meyve ve sebzelerin diyetle alınmasının prostat kanserinin bařlamasını űnleyebileceđi űne sűrűlműřtir (Bai ve ark. 2015). Ters olarak Parent ve arkadařları, diyetle C vitamini alımı veya takviyesi ile prostat kanseri insidansı veya prostat kanseri derecesi arasında bir iliřki olmadıđını bulgulanmıřlardır (Parent ve ark. 2018). Sonuç olarak kanser insidansında C vitamininin rolű henűz tam olarak netlik kazanmamıřtır. Bunun yanı sıra, prostat kanserini űnlemek için kullanılan kemoprentif yaklařımlar arasında NSAID'lerin dűzenli kullanımını yer almaktadır. NSAID'lerin etki mekanizmaları arasında apoptoz indűksiyonu, anjiyogenez inhibisyonu ve hűresel bűyűmenin dođrudan inhibisyonu bulunmaktadır ve bu etkiler prostaglandin sentezinde yer alan siklooksijenaz (COX) enzimlerinin inhibisyonu yoluyla meydana gelmektedir (Mahmud ve ark. 2004). İnsan prostat kanseri hűcrelerinde de COX-2'nin ařırı ekspresyonu olduđu bildirilmiřtir (Gupta ve ark. 2000). Yapılan bir çalıřmada aspirinin IKK-β aracılı NF-KB aktivasyonunu azaltarak MMP-9 aktivitesini azalttıđı ve bűylece prostat kanseri hűcre invazyonu baskıladıđı belirlenmiř ve bu űzelliđinden dolayı aspirinin metastatik prostat kanserinin kemoprevensiyonunda faydalı olabileceđi rapor edilmiřtir (Shi ve ark. 2017). Bu bilgiler nedeniyle prostat kanseri hűcrelerinin proliferasyonunu űnlemede ve metastaz yeteneklerini azaltmada en etkili bileřiđin aspirin içeren D6 bor bileřiđi olduđu dűřűnűlmektedir.

Bu tez çalıřması kapsamında elde edilen tüm sonuçlar gűz űnűne alındıđında, farklı

kimyasal yapılara sahip olan bor bileşiklerinin prostat kanseri hücrelerinin proliferasyonunu azalttığı, prostat kanseri gelişiminde kritik rol oynayan AR sinyalini inhibe ettiği ve MMP'ler ile serin proteazlar üzerinde gösterdiği transkripsiyonel ve translasyonel regülasyonlar aracılığıyla da hücrelerin metastatik potansiyelini azaltabileceği sonucuna varıldı. Elde edilen bu kanıtlar borun sebzeler, kabuklu yemişler, meyveler ve içecekler gibi insan beslenmesinde bulunan bir doğal antikanser ajanı olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla özellikle sentetik androjen varlığında daha güçlü regülasyon gösteren bor bileşiklerinin ileri evre metastatik prostat kanseri hastalarının tedavisinde potansiyel adaylar olabileceği düşünülmektedir. Özellikle AR aracılığıyla MMP'lerin ve serin proteazların seviyesinin artırılabilmesi göz önüne alındığında ve ayrıca bor bileşiklerinin sentetik androjen varlığında AR sinyalini ve dolayısıyla serin proteazları baskılamada daha güçlü regülasyon göstermeleri nedeniyle bor bileşiklerinin ileri evre metastatik prostat kanseri hastalarının tedavisinde potansiyel adaylar olabileceği düşünülmektedir. Bor ve bor bileşiklerinin etki mekanizmasının ve ayrıca prostat kanserinin önlenmesi ve kontrolünde borun göreceli önemini aydınlatmak için gelecekte daha ileri düzeyde çalışmalar yapılmasına gerek duyulmaktadır.

## KAYNAKLAR

- Aalinkeel, R., Nair, M. P., Sufrin, G., Mahajan, S. D., Chadha, K. C., Chawda, R. P., Schwartz, S. A. (2004). Gene expression of angiogenic factors correlates with metastatic potential of prostate cancer cells. *Cancer research*, 64(15), 5311-5321.
- Aalinkeel, R., Nair, B. B., Reynolds, J. L., Sykes, D. E., Mahajan, S. D., Chadha, K. C., Schwartz, S. A. (2011). Overexpression of MMP-9 contributes to invasiveness of prostate cancer cell line LNCaP. *Immunological investigations*, 40(5), 447-464.
- Abate-Shen, C., Shen, M.M. (2000). Molecular genetics of prostate cancer. *Genes & development*, 14, 2410-2434.
- Abate-Shen, C., Shen, M. M. (2002). Mouse models of prostate carcinogenesis. *Trends in genetics*, 18(5), S1-S5.
- Ablin, R. J. (2010). The great prostate mistake. *New York Times*, 9.
- Amălinei, C., Căruntu, I. D., Giușcă, S. E., Bălan, R. A. (2010). Matrix metalloproteinases involvement in pathologic conditions. *Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie*, 51(2), 215–228.
- Antonarakis, E. S., Armstrong, A. J., Dehm, S. M., Luo, J. (2016). Androgen receptor variant-driven prostate cancer: clinical implications and therapeutic targeting. *Prostate cancer and prostatic diseases*, 19(3), 231–241.
- Arneth, B. M. (2009). Clinical significance of measuring prostate-specific antigen. *Laboratory Medicine*, 40(8), 487-491.
- Arnold, F. J., Merry, D. E. (2019). Molecular mechanisms and therapeutics for SBMA/Kennedy's disease. *Neurotherapeutics*, 16(4), 928-947.
- Azad, A. A., Volik, S. V., Wyatt, A. W., Haegert, A., Le Bihan, S., Bell, R. H., Chi, K. N. (2015). Androgen receptor gene aberrations in circulating cell-free DNA: biomarkers of therapeutic resistance in castration-resistant prostate cancer. *Clinical cancer research*, 21(10), 2315-2324.
- Bai, X. Y., Qu, X., Jiang, X., Xu, Z., Yang, Y., Su, Q., Wang, M., & Wu, H. (2015). Association between Dietary Vitamin C Intake and Risk of Prostate Cancer: A Meta-analysis Involving 103,658 Subjects. *Journal of Cancer*, 6(9), 913–921.
- Barranco, W. T., Hudak, P. F., Eckhert, C. D. (2007). Evaluation of ecological and in vitro effects of boron on prostate cancer risk (United States). *Cancer Causes & Control*, 18(1), 71-77.
- Barranco, W. T., Eckhert, C. D. (2004). Boric acid inhibits human prostate cancer cell proliferation. *Cancer letters*, 216(1), 21-29.

- Barranco, W. T., Eckhert, C. D. (2006). Cellular changes in boric acid-treated DU-145 prostate cancer cells. *British journal of cancer*, 94(6), 884-890.
- Barranco, W. T., Kim, D. H., Stella Jr, S. L., Eckhert, C. D. (2009). Boric acid inhibits stored Ca<sup>2+</sup> release in DU-145 prostate cancer cells. *Cell biology and toxicology*, 25(4), 309-320.
- Bennett, N.C., Gardiner, R.A., Hooper, J.D., Johnson, D.W., Gobe, G.C. (2010). Molecular cell biology of androgen receptor signalling. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 42, 813-827.
- Bradke, T.M., Hall, C., Carper, S.W., Plopper, G.E. (2008). Phenylboronic acid selectively inhibits human prostate and breast cancer cell migration and decreases viability. *Cell Adhesion & Migration*, 2(3), 153-160.
- Bratland, A., Ragnhildstveit, E., Bjørnland, K., Andersen, K., Maelandsmo, G. M., Fodstad, O., Saatcioglu, F., Ree, A. H. (2003). The metalloproteinase inhibitor TIMP-2 is down-regulated by androgens in LNCaP prostate carcinoma cells. *Clinical & experimental metastasis*, 20(6), 541–547.
- Brede, C. M., Shoskes, D. A. (2011). The etiology and management of acute prostatitis. *Nature Reviews Urology*, 8(4), 207-212.
- Breyer, J. P., Avritt, T. G., McReynolds, K. M., Dupont, W. D., Smith, J. R. (2012). Confirmation of the HOXB13 G84E germline mutation in familial prostate cancer. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 21(8), 1348-1353.
- Bruni-Cardoso, A., Johnson, L. C., Vessella, R. L., Peterson, T. E., Lynch, C. C. (2010). Osteoclast-derived matrix metalloproteinase-9 directly affects angiogenesis in the prostate tumor–bone microenvironment. *Molecular Cancer Research*, 8(4), 459-470.
- Bugge, T. H., Antalis, T. M., Wu, Q. (2009). Type II transmembrane serine proteases. *Journal of Biological Chemistry*, 284(35), 23177-23181
- Carper, S. W., Hall, C., Meacham, S. L. (2007). Boric acid and phenyl boric acid induce apoptosis in prostate cancer cell lines. *Cell Biol Toxicol*, 24, S30.
- Castanares, M. A., Copeland, B. T., Chowdhury, W. H., Liu, M. M., Rodriguez, R., Pomper, M. G., Foss, C. A. (2016). Characterization of a novel metastatic prostate cancer cell line of LNCaP origin. *The Prostate*, 76(2), 215-225.
- Catalona, W. J., Smith, D. S., Ratliff, T. L., Dodds, K. M., Coplen, D. E., Yuan, J. J., Andriole, G. L. (1991). Measurement of prostate-specific antigen in serum as a screening test for prostate cancer. *New England journal of medicine*, 324(17), 1156-1161.
- Chen, W. T. (1992). Membrane proteases: roles in tissue remodeling and tumour invasion. *Current opinion in cell biology*, 4(5), 802-809.

Chung, I. C., Chen, L. C., Chung, A. K., Chao, M., Huang, H. Y., Hsueh, C., Tsang, N. M., Chang, K. P., Liang, Y., Li, H. P., Chang, Y. S. (2014). Matrix metalloproteinase 12 is induced by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K and promotes migration and invasion in nasopharyngeal carcinoma. *BMC cancer*, 14, 348.

Clegg, N. J., Couto, S. S., Wongvipat, J., Hieronymus, H., Carver, B. S., Taylor, B. S., Sawyers, C. L. (2011). MYC cooperates with AKT in prostate tumorigenesis and alters sensitivity to mTOR inhibitors. *PloS one*, 6(3), e17449.

Connolly, J. M., Rose, D. P. (1990). Production of epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha by the androgen-responsive LNCaP human prostate cancer cell line. *The Prostate*, 16(3), 209–218.

Cui, Y., Winton, M. I., Zhang, Z. F., Rainey, C., Marshall, J., De Kernion, J. B., Eckhert, C. D. (2004). Dietary boron intake and prostate cancer risk. *Oncology reports*, 11(4), 887-892.

Culig, Z., Hoffmann, J., Erdel, M., Eder, I. E., Hobisch, A., Hittmair, A., Klocker, H. (1999). Switch from antagonist to agonist of the androgen receptor blocker bicalutamide is associated with prostate tumour progression in a new model system. *British journal of cancer*, 81(2), 242-251.

Davy, H. (1809). XXVI. The Bakerian lecture. An account of some new analytical researches on the nature of certain bodies, particularly the alkalis, phosphorus, sulphur, carbonaceous matter, and the acids hitherto undecomposed; with some general observations on chemical theory. *The Philosophical Magazine*, 34(137), 181-190.

Debes, J. D., Tindall, D. J. (2004). Mechanisms of androgen-refractory prostate cancer. *New England Journal of Medicine*, 351(15), 1488-1490.

Dehm, S.M., Tindall, D.J. (2007). Androgen receptor structural and functional elements: role and regulation in prostate cancer. *Molecular endocrinology*, 21 12, 2855-63.

Demichelis, F., Fall, K., Perner, S., Andrén, O., Schmidt, F., Setlur, S. R., Hoshida, Y., Mosquera, J. M., Pawitan, Y., Lee, C., Adami, H. O., Mucci, L. A., Kantoff, P. W., Andersson, S. O., Chinnaiyan, A. M., Johansson, J. E., Rubin, M. A. (2007). TMPRSS2:ERG gene fusion associated with lethal prostate cancer in a watchful waiting cohort. *Oncogene*, 26(31), 4596–4599.

Denmeade, S. R., Sokoll, L. J., Dalrymple, S., Rosen, D. M., Gady, A. M., Bruzek, D., Isaacs, J. T. (2003). Dissociation between androgen responsiveness for malignant growth vs. expression of prostate specific differentiation markers PSA, hK2, and PSMA in human prostate cancer models. *The Prostate*, 54(4), 249-257.

Djulgovic, M., Beyth, R. J., Neuberger, M. M., Stoffs, T. L., Vieweg, J., Djulgovic, B., Dahm, P. (2010). Screening for prostate cancer: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *Bmj*, 341.

Drake, M., Dodwad, S. J., Davis, J., Kao, L. S. (2021). Sex-Related Differences of Acute and Chronic Pancreatitis in Adults. *Journal of clinical medicine*, 10(2), 300.

Dudani, J. S., Ibrahim, M., Kirkpatrick, J., Warren, A. D., Bhatia, S. N. (2018). Classification of prostate cancer using a protease activity nanosensor library. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(36), 8954-8959.

Eckhert, C. D. (1998). Boron stimulates embryonic trout growth. *The Journal of nutrition*, 128(12), 2488-2493.

Eeles, R. A., Al Olama, A. A., Benlloch, S., Saunders, E. J., Leongamornlert, D. A., Tymrakiewicz, M., Easton, D. F. (2013). Identification of 23 new prostate cancer susceptibility loci using the iCOGS custom genotyping array. *Nature genetics*, 45(4), 385-391.

Elegbede, AF. (2007). Boric Acid Inhibits Cell Growth and Induces Apoptosis in Breast Cancer Cells (Yüksek lisans tezi, Las Vegas Üniversitesi, Nevada). Erişim adresi: <https://digitalscholarship.unlv.edu/rtds/2161/>

Fan, S., Liang, Z., Gao, Z., Pan, Z., Han, S., Liu, X., Feng, W. (2018). Identification of the key genes and pathways in prostate cancer. *Oncology letters*, 16(5), 6663-6669.

Fang, J., Shing, Y., Wiederschain, D., Yan, L., Butterfield, C., Jackson, G., ... & Moses, M. A. (2000). Matrix metalloproteinase-2 is required for the switch to the angiogenic phenotype in a tumor model. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(8), 3884-3889.

Fass, L. (2008). Imaging and cancer: a review. *Molecular oncology*, 2(2), 115-152.

Feitelson, M. A., Arzumanyan, A., Kulathinal, R. J., Blain, S. W., Holcombe, R. F., Mahajna, J., Marino, M., Martinez-Chantar, M. L., Nawroth, R., Sanchez-Garcia, I., Sharma, D., Saxena, N. K., Singh, N., Vlachostergios, P. J., Guo, S., Honoki, K., Fujii, H., Georgakilas, A. G., Bilsland, A., Amedei, A., Nowsheen, S. (2015). Sustained proliferation in cancer: Mechanisms and novel therapeutic targets. *Seminars in cancer biology*, 35 Suppl(Suppl), S25-S54.

Feldman, B. J., Feldman, D. (2001). The development of androgen-independent prostate cancer. *Nature Reviews Cancer*, 1(1), 34-45.

Fisher, R., Pusztai, L., Swanton, C. (2013). Cancer heterogeneity: implications for targeted therapeutics. *British journal of cancer*, 108(3), 479-485.

Fort, D. J., Propst, T. L., Stover, E. L., Strong, P. L., Murray, F. J. (1998). Adverse reproductive and developmental effects in *Xenopus* from insufficient boron. *Biological trace element research*, 66(1), 237-259.

Fujita, K., Nonomura, N. (2019). Role of androgen receptor in prostate cancer: a review. *The world journal of men's health*, 37(3), 288-295.

Risbridger, G. P. (2018). Prostate disease overview. In M. K. Skinner (Ed.), *Encyclopedia of Reproduction* (2nd ed., pp. 334-340). Elsevier.

- Gallardo-Williams, M. T., Maronpot, R. R., Wine, R. N., Brunssen, S. H., Chapin, R. E. (2003). Inhibition of the enzymatic activity of prostate-specific antigen by boric acid and 3-nitrophenyl boronic acid. *The Prostate*, 54(1), 44–49.
- Gallardo-Williams, M. T., Chapin, R. E., King, P. E., Moser, G. J., Goldsworthy, T. L., Morrison, J. P., Maronpot, R. R. (2004). Boron supplementation inhibits the growth and local expression of IGF-1 in human prostate adenocarcinoma (LNCaP) tumors in nude mice. *Toxicologic pathology*, 32(1), 73–78.
- Gandhi, J., Afridi, A., Vatsia, S., Joshi, G., Joshi, G., Kaplan, S. A., Khan, S. A. (2018). The molecular biology of prostate cancer: current understanding and clinical implications. *Prostate cancer and prostatic diseases*, 21(1), 22-36.
- Ganguly, S. S., Li, X., Miranti, C. K. (2014). The host microenvironment influences prostate cancer invasion, systemic spread, bone colonization, and osteoblastic metastasis. *Frontiers in oncology*, 4, 364.
- Gao, M., Ossowski, L., Ferrari, A. C. (1999). Activation of Rb and decline in androgen receptor protein precede retinoic acid-induced apoptosis in androgen-dependent LNCaP cells and their androgen-independent derivative. *Journal of cellular physiology*, 179(3), 336–346.
- Gay-Lussac, J. L., Thénard, L. J. (1808). Sur la décomposition et la recomposition de l'acide boracique. *Ann. Chim. Phys*, 68, 169-174.
- Gillet, J. P., Varma, S., Gottesman, M. M. (2013). The clinical relevance of cancer cell lines. *Journal of the National Cancer Institute*, 105(7), 452-458.
- Gilgunn, S., Conroy, P. J., Saldova, R., Rudd, P. M., O'kenney, R. J. (2013). Aberrant PSA glycosylation—a sweet predictor of prostate cancer. *Nature Reviews Urology*, 10(2), 99-107.
- Giovannucci, E., Stampfer, M. J., Krithivas, K., Brown, M., Dahl, D., Brufsky, A., Talcott, J., Hennekens, C. H., Kantoff, P. W. (1997). The CAG repeat within the androgen receptor gene and its relationship to prostate cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(7), 3320–3323.
- Gong, Y., Chippada-Venkata, U. D., Oh, W. K. (2014). Roles of matrix metalloproteinases and their natural inhibitors in prostate cancer progression. *Cancers*, 6(3), 1298-1327.
- Gonzalez, A., Peters, U., Lampe, J. W., White, E. (2007). Boron intake and prostate cancer risk. *Cancer Causes & Control*, 18(10), 1131-1140.
- Gottlieb, B., Beitel, L. K., Nadarajah, A., Palioura, M., Trifiro, M. (2012). The Androgen Receptor Gene Mutations Database (ARDB). *Human Mutation*, 33, 887-894.
- Green, S. M., Mostaghel, E. A., Nelson, P. S. (2012). Androgen action and metabolism in prostate cancer. *Molecular and cellular endocrinology*, 360(1-2), 3-13.
- Gupta, S., Srivastava, M., Ahmad, N., Bostwick, D. G., Mukhtar, H. (2000). Over-



expression of cyclooxygenase-2 in human prostate adenocarcinoma. *The Prostate*, 42(1), 73–78.

Gupta, A., Zhou, C. Q., Chellaiah, M. A. (2013). Osteopontin and MMP9: associations with VEGF expression/secretion and angiogenesis in PC3 prostate cancer cells. *Cancers*, 5(2), 617-638.

Hallstrom, T.A. (2007). p53 and DNA damage checkpoint responses in the human prostate, Molecular and Cancer Biology Program, Biomedicum Helsinki, Department of Virology, Haartman Institute. University of Helsinki, Finland.

Hayes, J. H., Barry, M. J. (2014). Screening for prostate cancer with the prostate-specific antigen test: a review of current evidence. *Jama*, 311(11), 1143-1149.

Henriet, P., Blavier, L., Declerck, Y. A. (1999). Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP) in invasion and proliferation. *APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, 107(1), 111–119.

Hoegy, S. E., Oh, H. R., Corcoran, M. L., Stetler-Stevenson, W. G. (2001). Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2) suppresses TKR-growth factor signaling independent of metalloproteinase inhibition. *Journal of biological chemistry*, 276(5), 3203-3214.

Horoszewicz, J. S. (1980). The LNCaP cell line-a new model for studies on human prostatic carcinoma. *Prog Clin Biol Res*, 37, 115-132.

Hsing, A. W., Devesa, S. S. (2001). Trends and patterns of prostate cancer: what do they suggest?. *Epidemiologic reviews*, 23(1), 3-13.

Huang, F. W., Mosquera, J. M., Garofalo, A., Oh, C., Baco, M., Amin-Mansour, A., Garraway, L. A. (2017). Exome sequencing of African-American prostate cancer reveals loss-of-function ERF mutations. *Cancer discovery*, 7(9), 973-983.

Igawa, T., Lin, F. F., Lee, M. S., Karan, D., Batra, S. K., Lin, M. F. (2002). Establishment and characterization of androgen-independent human prostate cancer LNCaP cell model. *The Prostate*, 50(4), 222-235.

Ince, S., Kucukkurt, I., Cigerci, I. H., Fatih Fidan, A., Eryavuz, A. (2010). The effects of dietary boric acid and borax supplementation on lipid peroxidation, antioxidant activity, and DNA damage in rats. *Journal of trace elements in medicine and biology : organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)*, 24(3), 161–164.

Incorvaia, L., Badalamenti, G., Rini, G., Arcara, C., Fricano, S., Sferrazza, C., Leto, G. (2007). MMP-2, MMP-9 and activin A blood levels in patients with breast cancer or prostate cancer metastatic to the bone. *Anticancer research*, 27(3B), 1519-1525.

Jacquinet, E., Rao, N. V., Rao, G. V., Zhengming, W., Albertine, K. H., Hoidal, J. R. (2001). Cloning and characterization of the cDNA and gene for human epitheliasin. *European journal of biochemistry*, 268(9), 2687–2699.

Jia, Y., Hu, D. N., Zhu, D., Zhang, L., Gu, P., Fan, X., Zhou, J. (2014). MMP-2, MMP-3, TIMP-1, TIMP-2, and TIMP-3 protein levels in human aqueous humor: relationship with axial length. *Investigative ophthalmology & visual science*, 55(6), 3922–3928.

Jiang, A., Yu, C., Zhang, P., Chen, W., Liu, W., Hu, X., Zhang, J. (2006). p53 overexpression represses androgen-mediated induction of NKX3.1 in a prostate cancer cell line. *Exp. Mol. Med.*, 38, 625-633.

Khemlina, G., Ikeda, S., Kurzrock, R. (2015). Molecular landscape of prostate cancer: implications for current clinical trials. *Cancer treatment reviews*, 41(9), 761–766.

Kim, J., Coetzee, G. A. (2004). Prostate specific antigen gene regulation by androgen receptor. *Journal of cellular biochemistry*, 93(2), 233–241.

Kral, M., Rosinska, V., Student, V., Grepl, M., Hrabec, M., Bouchal, J. (2011). Genetic determinants of prostate cancer: a review. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia*, 155(1), 3–9.

Krieger, J. N., Lee, S. W. H., Jeon, J., Cheah, P. Y., Liong, M. L., Riley, D. E. (2008). Epidemiology of prostatitis. *International journal of antimicrobial agents*, 31, 85-90.

Kokontis, J. M., Hay, N., Liao, S. (1998). Progression of LNCaP prostate tumor cells during androgen deprivation: hormone-independent growth, repression of proliferation by androgen, and role for p27Kip1 in androgen-induced cell cycle arrest. *Molecular endocrinology*, 12(7), 941-953.

Korkmaz, M., Uzgören, E., Bakirdere, S., Aydin, F., Ataman, O. Y. (2007). Effects of dietary boron on cervical cytopathology and on micronucleus frequency in exfoliated buccal cells. *Environmental toxicology*, 22(1), 17–25.

Lai, K. P., Yamashita, S., Huang, C. K., Yeh, S., Chang, C. (2012). Loss of stromal androgen receptor leads to suppressed prostate tumorigenesis via modulation of pro-inflammatory cytokines/chemokines. *EMBO molecular medicine*, 4(8), 791–807.

Lange, E. M. (2010). Identification of genetic risk factors for prostate cancer: analytic approaches using hereditary prostate cancer families. In *Male Reproductive Cancers* (pp. 203-228). Springer, New York, NY.

Lawrence, M. G., Lai, J., Clements, J. A. (2010). Kallikreins on steroids: structure, function, and hormonal regulation of prostate-specific antigen and the extended kallikrein locus. *Endocrine reviews*, 31(4), 407-446.

LeBeau, A. M., Denmeade, S. R. (2015). Protease-activated pore-forming peptides for the treatment and imaging of prostate cancer. *Molecular cancer therapeutics*, 14(3), 659-668.

Levi, D. M., Polat, U. (1996). Neural plasticity in adults with amblyopia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(13), 6830-6834.

Li, B. Y., Liao, X. B., Fujito, A., Thrasher, J. B., Shen, F. Y., Xu, P. Y. (2007). Dual

androgen-response elements mediate androgen regulation of MMP-2 expression in prostate cancer cells. *Asian journal of andrology*, 9(1), 41–50.

Liao, X., Thrasher, J. B., Pelling, J., Holzbeierlein, J., Sang, Q. X. A., Li, B. (2003). Androgen stimulates matrix metalloproteinase-2 expression in human prostate cancer. *Endocrinology*, 144(5), 1656-1663.

Lichtenstein, P., Holm, N. V., Verkasalo, P. K., Iliadou, A., Kaprio, J., Koskenvuo, M., Hemminki, K. (2000). Environmental and heritable factors in the causation of cancer—analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *New England journal of medicine*, 343(2), 78-85.

Lilja, H. (1993). Structure, function, and regulation of the enzyme activity of prostate-specific antigen. *World journal of urology*, 11(4), 188-191.

Liu, L., Guo, K., Liang, Z., Li, F., Wang, H. (2018). Identification of candidate genes that may contribute to the metastasis of prostate cancer by bioinformatics analysis. *Oncology letters*, 15(1), 1220-1228.

Livi, L., Isidori, A. M., Sherris, D., Gravina, G. L. (2014). Advances in prostate cancer research and treatment. *BioMed research international*, 2014, 708383

Lonergan, P. E., Tindall, D. J. (2011). Androgen receptor signaling in prostate cancer development and progression. *Journal of carcinogenesis*, 10, 20.

Lucas, J. M., Heinlein, C., Kim, T., Hernandez, S. A., Malik, M. S., True, L. D., Morrissey, C., Corey, E., Montgomery, B., Mostaghel, E., Clegg, N., Coleman, I., Brown, C. M., Schneider, E. L., Craik, C., Simon, J. A., Bedalov, A., Nelson, P. S. (2014). The androgen-regulated protease TMPRSS2 activates a proteolytic cascade involving components of the tumor microenvironment and promotes prostate cancer metastasis. *Cancer discovery*, 4(11), 1310–1325.

Magee, J. A., Araki, T., Patil, S., Ehrig, T., True, L., Humphrey, P. A., Milbrandt, J. (2001). Expression profiling reveals hepsin overexpression in prostate cancer. *Cancer research*, 61(15), 5692-5696.

Mahmud, S., Franco, E., & Aprikian, A. (2004). Prostate cancer and use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: systematic review and meta-analysis. *British journal of cancer*, 90(1), 93–99.

Mandel, A., Larsson, P., Sarwar, M., Semenas, J., Syed Khaja, A. S., Persson, J. L. (2018). The interplay between AR, EGF receptor and MMP-9 signaling pathways in invasive prostate cancer. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, 24(1), 34.

Mangır, N., ve MacNeil, S. (2020). Effect of high-dose ascorbic acid on prostate cancer cells and angiogenesis. *Uroonkoloji Buelteni= Bulletin of Urooncology*, 19(3), 107.

Martin, C. E., List, K. (2019). Cell surface-anchored serine proteases in cancer progression and metastasis. *Cancer metastasis reviews*, 38(3), 357–387.

McAuley, E. M., Bradke, T. A., Plopper, G. E. (2011). Phenylboronic acid is a more potent inhibitor than boric acid of key signaling networks involved in cancer cell migration. *Cell adhesion & migration*, 5(5), 382–386.

Messner, E. A., Steele, T. M., Tsamouri, M. M., Hejazi, N., Gao, A. C., Mudryj, M., Ghosh, P. M. (2020). The Androgen Receptor in Prostate Cancer: Effect of Structure, Ligands and Spliced Variants on Therapy. *Biomedicines*, 8(10), 422.

Ménez, R., Michel, S., Muller, B. H., Bossus, M., Ducancel, F., Jolivet-Reynaud, C., Stura, E. A. (2008). Crystal structure of a ternary complex between human prostate-specific antigen, its substrate acyl intermediate and an activating antibody. *Journal of molecular biology*, 376(4), 1021-1033.

Mirabelli, P., Coppola, L., Salvatore, M. (2019). Cancer Cell Lines Are Useful Model Systems for Medical Research. *Cancers*, 11(8), 1098.

Murray, N. P., Reyes, E., Tapia, P., Badínez, L., Orellana, N. (2012). Differential expression of matrix metalloproteinase-2 expression in disseminated tumor cells and micrometastasis in bone marrow of patients with nonmetastatic and metastatic prostate cancer: theoretical considerations and clinical implications-an immunocytochemical study. *Bone marrow research*, 2012, 259351

Müezzinoğlu, T., Korkmaz, M., Neşe, N., Bakırdere, S., Arslan, Y., Ataman, O. Y., Lekili, M. (2011). Prevalence of prostate cancer in high boron-exposed population: a community-based study. *Biological trace element research*, 144(1), 49-57.

Nabha, S. M., dos Santos, E. B., Yamamoto, H. A., Belizi, A., Dong, Z., Meng, H., Saliganan, A., Sabbota, A., Bonfil, R. D., Cher, M. L. (2008). Bone marrow stromal cells enhance prostate cancer cell invasion through type I collagen in an MMP-12 dependent manner. *International journal of cancer*, 122(11), 2482–2490.

Parent, M. E., Richard, H., Rousseau, M. C., Trudeau, K. (2018). Vitamin C Intake and Risk of Prostate Cancer: The Montreal PROtEuS Study. *Frontiers in physiology*, 9, 1218.

Pienta, K. J., Bradley, D. (2006). Mechanisms underlying the development of androgen-independent prostate cancer. *Clinical cancer research*, 12(6), 1665-1671.

Pritchard, C. C., Mateo, J., Walsh, M. F., De Sarkar, N., Abida, W., Beltran, H., Nelson, P. S. (2016). Inherited DNA-repair gene mutations in men with metastatic prostate cancer. *N Engl J Med*, 375, 443-453.

Prostate conditions, <https://www.betamarketing.co.za/post/prostate-conditions> (Erişim tarihi: 07.06.2022)

Ramalingam, S., Ramamurthy, V. P., Njar, V. C. (2017). Dissecting major signaling pathways in prostate cancer development and progression: Mechanisms and novel therapeutic targets. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 166, 16-27.

Reis, S. T., Pontes-Junior, J., Antunes, A. A., de Sousa-Canavez, J. M., Dall'Oglio, M. F., Passerotti, C. C., Leite, K. R. (2011). MMP-9 overexpression due to TIMP-1 and RECK underexpression is associated with prognosis in prostate cancer. *The International journal of biological markers*, 26(4), 255-261.

Rittenhouse, H. G., Finlay, J. A., Mikolajczyk, S. D., Partin, A. W. (1998). Human kallikrein 2 (hK2) and prostate-specific antigen (PSA): two closely related, but distinct, kallikreins in the prostate. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, 35(4).

Rowe, R. I., Eckhert, C. D. (1999). Boron is required for zebrafish embryogenesis. *Journal of experimental biology*, 202(12), 1649-1654.

Saraon, P., Drabovich, A. P., Jarvi, K. A., Diamandis, E. P. (2014). Mechanisms of Androgen-Independent Prostate Cancer. *EJIFCC*, 25(1), 42–54.

Sato, H., Takino, T., Kinoshita, T., Imai, K., Okada, Y., Stetler Stevenson, W. G., Seiki, M. (1996). Cell surface binding and activation of gelatinase A induced by expression of membrane-type-1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP). *FEBS letters*, 385(3), 238-240.

Saxena, P., Trerotola, M., Wang, T., Li, J., Sayeed, A., Vanoudenhove, J., Adams, D. S., Fitzgerald, T. J., Altieri, D. C., Languino, L. R. (2012). PSA regulates androgen receptor expression in prostate cancer cells. *The Prostate*, 72(7), 769–776.

Schulz, R. (2006). *The encyclopedia of aging*. Springer Publishing Company.

Seto, M., Honma, K., Nakagawa, M. (2010). Diversity of genome profiles in malignant lymphoma. *Cancer science*, 101(3), 573-578.

Sharma, A., Kumar, A. (2021). Role of antioxidant therapy for pain relief in chronic pancreatitis: Finding the signal in the noise. *JGH Open: An Open Access Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 5(3), 327.

Shen, M. M., Abate-Shen, C. (2010). Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges. *Genes & development*, 24(18), 1967-2000.

Shenoy, D., Packianathan, S., Chen, A. M., Vijayakumar, S. (2016). Do African-American men need separate prostate cancer screening guidelines?. *BMC urology*, 16(1), 1-6.

Shi, C., Zhang, N., Feng, Y., Cao, J., Chen, X., Liu, B. (2017). Aspirin Inhibits IKK- $\beta$ -mediated Prostate Cancer Cell Invasion by Targeting Matrix Metalloproteinase-9 and Urokinase-Type Plasminogen Activator. *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 41(4), 1313–1324.

Simmons, S.O.N. (2006). *Biochemical and functional analysis of Homeoprotein Nkx3.1*. Toxicology. North Carolina State University.

- Smoum, R., Rubinstein, A., Dembitsky, V. M., Srebnik, M. (2012). Boron containing compounds as protease inhibitors. *Chemical reviews*, 112(7), 4156-4220.
- Soller, M. J., Isaksson, M., Elfving, P., Soller, W., Lundgren, R., Panagopoulos, I. (2006). Confirmation of the high frequency of the TMPRSS2/ERG fusion gene in prostate cancer. *Genes, chromosomes & cancer*, 45(7), 717–719.
- Stamey, T. A., Caldwell, M., McNeal, J. E., Nolley, R., Hemenez, M., Downs, J. (2004). The prostate specific antigen era in the United States is over for prostate cancer: what happened in the last 20 years?. *The Journal of urology*, 172(4 Pt 1), 1297–1301.
- Stetler-Stevenson, W. G. (2008). Tissue inhibitors of metalloproteinases in cell signaling: metalloproteinase-independent biological activities. *Science signaling*, 1(27), re6-re6.
- Still, K., Robson, C. N., Autzen, P., Robinson, M. C., Hamdy, F. C. (2000). Localization and quantification of mRNA for matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 (TIMP-2) in human benign and malignant prostatic tissue. *The Prostate*, 42(1), 18-25.
- Szabo, R., Bugge, T. H. (2008). Type II transmembrane serine proteases in development and disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 40(6-7), 1297-1316.
- Szwarc, M. M., Kommagani, R., Lessey, B. A., & Lydon, J. P. (2014). The p160/steroid receptor coactivator family: potent arbiters of uterine physiology and dysfunction. *Biology of reproduction*, 91(5), 122-1.
- Tagirasa, R., Yoo, E. (2022). Role of Serine Proteases at the Tumor-Stroma Interface. *Frontiers in immunology*, 13, 832418.
- Takahashi, S., Suzuki, S., Inaguma, S., Ikeda, Y., Cho, Y. M., Hayashi, N., Inoue, T., Sugimura, Y., Nishiyama, N., Fujita, T., Chao, J., Ushijima, T., Shirai, T. (2003). Down-regulated expression of prostasin in high-grade or hormone-refractory human prostate cancers. *The Prostate*, 54(3), 187–193.
- Takayama, K. I., Inoue, S. (2013). Transcriptional network of androgen receptor in prostate cancer progression. *International Journal of Urology*, 20(8), 756-768.
- Tan, M. E., Li, J., Xu, H. E., Melcher, K., Yong, E. L. (2015). Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. *Acta Pharmacologica Sinica*, 36(1), 3-23.
- Taylor, B. S., Schultz, N., Hieronymus, H., Gopalan, A., Xiao, Y., Carver, B. S., Gerald, W. L. (2010). Integrative genomic profiling of human prostate cancer. *Cancer cell*, 18(1), 11-22.
- Tepedelen, B. E., Soya, E., Korkmaz, M. (2016). Boric acid reduces the formation of DNA double strand breaks and accelerates wound healing process. *Biological Trace Element Research*, 174, 309-318.

- Vaarala, M. H., Porvari, K., Kyllönen, A., Lukkarinen, O., Vihko, P. (2001). The TMPRSS2 gene encoding transmembrane serine protease is overexpressed in a majority of prostate cancer patients: detection of mutated TMPRSS2 form in a case of aggressive disease. *International journal of cancer*, 94(5), 705–710.
- Veltri, R. (2007). Molecular biology, endocrinology, and physiology of the prostate and seminal vesicles. *Cambell-Walsh Urology*, 2677-2726.
- Waltering, K. K., Urbanucci, A., Visakorpi, T. (2012). Androgen receptor (AR) aberrations in castration-resistant prostate cancer. *Molecular and cellular endocrinology*, 360(1-2), 38-43.
- Wang, M. C., Valenzuela, L. A., Murphy, G. P., Chu, T. M. (2017). Purification of a human prostate specific antigen. *The Journal of urology*, 197(2S), S148-S152.
- Wilkinson, D. J., Desilets, A., Lin, H., Charlton, S., del Carmen Arques, M., Falconer, A., Rowan, A. D. (2017). The serine proteinase hepsin is an activator of pro-matrix metalloproteinases: molecular mechanisms and implications for extracellular matrix turnover. *Scientific reports*, 7(1), 1-13.
- Wu, Q., Parry, G. (2007). Hepsin and prostate cancer. *Front Biosci*, 12(12), 5052-5059.
- Yamada, K. E., Eckhert, C. D. (2019). Boric Acid Activation of eIF2 $\alpha$  and Nrf2 Is PERK Dependent: a Mechanism that Explains How Boron Prevents DNA Damage and Enhances Antioxidant Status. *Biological Trace Element Research*, 188, 2-10.
- Yılmaz, S., Ustundag, A., Cemiloglu Ulker, O., Duydu, Y. (2016). Protective Effect of Boric Acid on Oxidative DNA Damage In Chinese Hamster Lung Fibroblast V79 Cell Lines. *Cell journal*, 17(4), 748–754.
- Zhang, H., Wang, Y. S., Han, G., Shi, Y. (2007). TIMP-3 gene transfection suppresses invasive and metastatic capacity of human hepatocarcinoma cell line HCC-7721. *Hepatobiliary & pancreatic diseases international: HBPD INT*, 6(5), 487-491.
- Zhang, L., Jia, G., Shi, B., Ge, G., Duan, H., Yang, Y. (2016). PRSS8 is Downregulated and Suppresses Tumour Growth and Metastases in Hepatocellular Carcinoma. *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 40(3-4), 757–769.
- Zhang, Z. F., Winton, M. I., Rainey, C., Eckhert, C. D. (2001). Boron is associated with decreased risk of human prostate cancer. In *Faseb Journal*, Vol. 15, No. 5, pp. A1089-A1089.

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Amina MUJALA  
Doğum Yeri ve Tarihi : Konjic/ BOSNA HERSEK, 07/09/1994  
Yabancı Dil : Boşnakça (Ana dili)  
İngilizce (İleri)

Eğitim Durumu  
Lise : Gazi Husrev-bey Lisesi (2013)  
Lisans : Saraybosna Üniversitesi/ FEN Fakültesi/ Biyoloji-  
Genetik Bölümü  
Yüksek Lisans : Uludağ Üniversitesi / Moleküler Biyoloji ve Genetik  
Bölümü (2018)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar : -

İletişim (e-posta) : amina.mujaalaa@gmail.com

Yayımları : Tomic, N., Osmanbegovic, A., Mujala, A., Prtvar, D.,  
Hadzic, M., Ramic, J., Lojo-Kadric, N., Pojskic, N., Pojskic, L. (2020). ACE DD  
Genotype Is Associated with High Visceral Sensitivity Index Score in Healthy Student  
Population in Bosnia and Herzegovina. *Research Square*.  
<https://www.researchsquare.com/article/rs-23103/v1> (Erişim tarih: 08/06/2022.)