2023

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DENİZ ATAKOL



T.C.
ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PROSTAT KANSERİNDE YAĞ DAMLACIĞI OLUŞUMU İLE İLİŞKİLİ PLA2G7, UCP2 VE NEDD4L GENLERİNİN EKSPRESYONLARININ ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Deniz ATAKOL

KANSER BİYOLOJİSİ PROGRAMI

Ankara, 2023

T.C.
ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PROSTAT KANSERİNDE YAĞ DAMLACIĞI OLUŞUMU İLE İLİŞKİLİ PLA2G7, UCP2 VE NEDD4L GENLERİNİN EKSPRESYONLARININ ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Deniz ATAKOL

KANSER BİYOLOJİSİ PROGRAMI

Bu araştırma; Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2307 nolu proje ile desteklenmiştir.

Ankara, 2023

T.C.

ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Deniz ATAKOL

Yüksek Lisans Tezi

Tez Savunma Sınav Tarihi

16.01.2023

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Ender ŞİMŞEK

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Özen ÖZENSOY GÜLER

Doç. Dr. Ender ŞİMŞEK

Doç. Dr. İlker ATEŞ

Okuduğumuz ve Savunmasını dinlediğimiz bu tezin bir Yüksek Lisans derecesi için gereken tüm kapsam ve kalite şartlarını sağladığını beyan ederiz.

Doç. Dr. Fatma Elif KILINÇ

Enstitü Müdürü

Bu tezin Yüksek Lisans derecesi için gereken tüm şartları sağladığını tasdik ederim.

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tezde kullanılmış olan tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

16-01-2023

Deniz ATAKOL

TEŞEKKÜR

Bu çalışmayı planlarken ve hazırlarken her daim yanımda olan bilgi ve tecrübesiyle en önemli destekçilerimden olan tez danışman hocam sayın Doç. Dr. Ender ŞİMŞEK'e,

Eğitimim boyunca desteklerini hiçbir konuda esirgemeyen anabilim dalı başkanımız sayın Prof. Dr. Ahmet ÇARHAN ve engin bilgilerinden her zaman faydalandığım kıymetli hocam sayın Prof. Dr. Özen Özensoy GÜLER'e, tez konusunun belirlenmesi sürecinde bize yardımcı olan hocam sayın Doç. Dr. Mustafa Emre ERCİN'e,

Bu tez çalışması sırasında hücre temini için bize yardımcı olan Doç. Dr. Fatih KOCABAŞ ve Öğr.Gör.Dr. Merve Sezer Kürkçü hocalarıma,

Bu tezin ortaya çıkmasındaki tüm çalışmalarda ve ayrıca tezimin istatistik hesaplamalarında bana yardımcı olan, Dr. Öğr. üyesi Emine TERZİ ve Dr. Öğr. Üyesi Beyza Ecem ÖZ BEDİR'e ayrıca laboratuvar çalışmalarının her aşamasında yardımcı olan uzman biyolog sevgili arkadaşım Hümeyra Yılmaz'a

Tüm eğitim hayatım boyunca yanımda olan, beni her koşulda destekleyen canım aileme

Sonsuz teşekkürlerimle…

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **ix**

ABSTRACT ..... **x**

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ ..... **xi**

ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **xiii**

TABLOLAR DİZİNİ ..... **xiv**

1. GİRİŞ **1**

2. GENEL BİLGİLER **3**

2.1. Kanser 3

2.2. Prostat Kanseri 4

2.2.1. Prostat Kanseri Epidemiyolojisi 6

2.2.2. Prostat Kanseri Evreleri 7

2.2.3. Prostat Kanseri Tanı Yöntemleri 10

2.2.4. Prostat Kanseri Tedavi Yöntemleri 12

2.3. Kanser Enerji Metabolizması 14

2.3.1. Lipid Metabolizması 18

2.4. Lipid Damlacıkları 23

2.4.1. Lipid Damlacıklarının Biyogenezi 24

2.4.2. Lipid Damlacıklarının Katabolizması 26

2.4.3. Lipit Damlacığının Kanser Hücreleri Üzerine Etkileri 26

2.5. Lipid Damlacığı Oluşumu ile İlgili Genler 29

2.5.1. Fosfolipaz A2 Grup 7 (PLA2G7) 29

2.5.2. Uncoupling Protein 2 (UCP2) 31

2.5.3.Nöral Öncü Hücre Gelişimsel Olarak Aşağı Regüle Edilmiş 4 Benzeri (NEDD4L) 36

3. MATERYAL VE YÖNTEM **39**

3.1. Materyal 39
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar 39
3.1.2. Prostat Kanseri Hücre Hatlarının Özellikleri 40
3.1.3. Kullanılan Aletler ve Cihazlar 40
3.2. Yöntem 41
3.2.1. Hücre Kültürü 41
3.2.2. ELISA Testi 43
3.2.3. İstatistiksel Analiz 45
4. BULGULAR 46
4.1. PC3 ve DU145 Prostat Kanseri Hücre Hatlarında PLA2G7 Düzeyinin Karşılaştırılması 46
4.2. PC3 ve DU145 Prostat Kanseri Hücre Hatlarında UCP2 Düzeyinin Karşılaştırılması 47
4.3. PC3 ve DU145 Prostat Kanseri Hücre Hatlarında NEDD4-L Düzeyinin Karşılaştırılması 48
5. TARTIŞMA 50
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 54
7. KAYNAKÇA 56
8. EKLER 69
Ek-1. Özgeçmiş 69

ÖZET

Prostat Kanserinde Yağ Damlacığı Oluşumu ile İlişkili Pla2g7, Ucp2 ve Nedd4l Genlerinin Ekspresyonlarının Araştırılması

Prostat kanseri (PCa), tüm dünyada erkek nüfusunu etkileyen en yaygın ikinci kanser türüdür. Ayrıca kısmen düzensiz lipid metabolizması ile karakterize edilen bir kanserdir. PCa hücrelerinin; lipidleri lipid damlacıkları şeklinde depoladığı gözlemlenmiştir. PCa'da kullanılan kemoterapötik veya endokrin ajanların lipid damlacıklarında birikmesi ve terapi direncini desteklemesi çok olasıdır.

Lipid metabolizmasında ve lipid damlacığı oluşumunda yer alan bazı genler bulunmaktadır. Çalışmamızda, bunlardan PLA2G7, UCP2 ve NEDD4L genlerinin protein ekspresyon seviyeleri incelenmiştir. Fosfolipaz A2 Grup 7 (PLA2G7) geni; fosfolipaz A2'yi kodlar ve fosfolipitleri yağ asitlerine hidrolize eder. PLA2'ler, lipid damlacık sentezi için ihtiyaç duyulan serbest yağ asitleri havuzunun oluşturulmasına katkıda bulunur. Mitokondriyal ayrışma proteini 2 (UCP2)'nin ise, glukoz kullanımı yerine yağ asidi metabolizmasının teşvik edilmesini sağlayan bir metabolik anahtar olarak işlev görebileceği belirtilmektedir. Nöral öncü hücre gelişimsel olarak aşağı regüle edilmiş 4 benzeri (NEDD4L), substrat ubikitinasyonu ve protein degredasyonunu düzenleyerek çoklu hücresel prosedürlere katıldığı bildirilen bir E3 ubikitin ligazdır. Bugüne kadar, NEDD4L dahil olmak üzere birçok E3 ubikitin ligazı lipid mekanizmasının düzenleyicileri olarak tanımlanmıştır.

Bu çalışmada; orta seviye metastatik olan DU145 ve ileri metastatik olan PC3 prostat kanseri hücre hatları arasında PLA2G7, UCP2 ve NEDD4L genlerinin protein ekspresyonu seviyelerine bakılarak artan metastaz potansiyeli ile ilişkisini göstermek amaçlanmıştır.

İlk olarak DU145 ve PC3 hücre hatları kültüre edilmiştir. Daha sonra ELISA testi ile bu genlerin protein ekspresyonları incelenmiştir. Çalışmamızda, iki hücre hattı arasında PLA2G7 protein seviyesinde anlamlı bir fark olmadığı, UCP2 proteininin prostat kanserinde artan metastaz potansiyeli ile seviyesinin arttığı ve NEDD4L proteininin ise artan metastaz potansiyeli ile seviyesinin azaldığı gösterilmiştir. Sonuç olarak UCP2'nin prostat kanserinin ilerlemesini destekleyebileceği, NEDD4L'nin hücre proliferasyonu kontrolü ile arasında bir ilişki olduğu düşünülebilir.

Anahtar Kelimeler: Lipid damlacığı, NEDD4L, Prostat kanseri, PLA2G7, UCP2

ABSTRACT

Investigation of Expressions of Pla2g7, Ucp2 and Nedd4l Genes Associated with Fat Droplet Formation in Prostate Cancer

Prostate cancer (PCa) is the second most common type of cancer affecting the male population worldwide and it is characterized by partially dysregulated lipid metabolism. PCa cells stores lipids in the form of lipid droplets and uses it as a building block for membrane synthesis to facilitate proliferation and growth. It is also very likely that chemotherapeutic or endocrine agents used in PCa treatment accumulating in lipid droplets which leads to therapy resistance.

There are some genes involved in lipid metabolism and lipid droplet formation. In our study, we examined the protein levels of PLA2G7, UCP2 and NEDD4L genes, proteins Phospholipase A2 Group 7 (PLA2G7) genes; encodes phospholipase A2 and hydrolyzes phospholipids to fatty acids. PLA2s contribute to the generation free fatty acids needed for lipid droplet synthesis. Moreover, mitochondrial uncoupling protein 2 (UCP2) gene may function as a metabolic switch that promotes fatty acid metabolism instead of glucose utilization. Finally, Neural precursor cell expressed developmentally down-regulated 4-like (NEDD4L), an E3 ubiquitin ligase, is reported to participate in multiple cellular procedures by regulating substrate ubiquitination and protein degradation. Many E3 ubacting as regulaters lipid metabolism mechanism.

The main objective of our study is identifying the levels of PLA2G7, UCP2 and NEDD4L proteins in DU145 and PC3 prostate cancer cell lines, which will point out at the correlation with different metastasis potential of both cell lines.

Indeed, it was demonstrated that there was no significant difference in protein the level of PLA2G7 between the two cell lines, while the protein level of UCP2 increased with increasing metastasis potential in prostate cancer. Finally, the protein level of NEDD4L, on the contrary, decreased with increasing metastasis potential. As a result, it can be thought that UCP2 may support the progression of prostate cancer and there is a relationship between NEDD4L and cell proliferation control.

Keywords: Lipid droplet, NEDD4L, Prostate cancer, PLA2G7, UCP2

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ADT	: Androjen baskılama tedavisi
ATP	: Adenozin trifosfat
CO_2	: Karbondioksit
CoA	: Koenzim A
CRT	: Kalretikülin
DAG	: Diaçilgliserol
DMEM	: Dulbecco tarafından modifiye edilen Eagle Besiyeri
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DRE	: Dijital rektal muayene
ELISA	: Enzim Bağlı İmmunosorbent Analizi
ER	: Endoplazmik retikulum
ETC	: Elektron taşıma sistemi
FA	: Yağ asiti
FADH	: Flavin adenin dinükleotit
FAO	: Yağ asiti oksidasyonu
FBS	: Fetal bovin serum
FFA	: Serbest yağ asiti
LD	: Lipit damlacığı
MRI	: Manyetik rezonans görüntüleme
NAD	: Nikotinamid adenin dinükleotit
NADH	: Nikotinamid adenin dinükleotit hidrit
NEDD4L	: Nöral Öncü Hücre Gelişimsel Olarak Aşağı Regüle Edilmiş 4 Benzeri
PBS	: Fosfat tamponlu salin
PCa	: Prostat kanseri
PLA2G7	: Fosfolipaz A2 grup 7
PPP	: Pentoz fosfat yolağı
PSA	: Prostat spesifik antijen
ROS	: Reaktif oksijen türleri
RT-PCR	: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
SPG	: Spartin
TAG	: Triaçilgliserol

TCA : Trikarboksilik asit

TG : Trigliserit

TNM : Tümör/node/metastaz

TRUS : Transrektal ultrasonografi

UCP2 : Mitokondrial ayrıştırma protein 2

UV : Ultraviyole

μg : Mikrogram

μL : Mikrolitre

mL : Mililitre

C˚ : Santigrat Derece

Rpm : Dakikadaki Devir Sayısı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Kanser hücrelerinin ayırt edici özellikleri 4
Şekil 2.2. Prostat bezinin anatomisi 5
Şekil 2.3. Prostat kanserinin ülkelere ve yaşa göre insidans ve mortalite oranları 6
Şekil 2.4. Prostat kanseri I. ve II. evreleri 8
Şekil 2.5. Prostat kanseri I. ve II. evreleri 10
Şekil 2.6. Prostat kanserinde gleason skoru 12
Şekil 2.7. Kanser hücrelerinde metabolik yeniden programlama 14
Şekil 2.8. Warburg etkisi 15
Şekil 2.9. Normal hücrelerde glikoz ve lipid metabolizması 19
Şekil 2.10. Kanser hücrelerinde glikoz ve lipid metabolizması 20
Şekil 2.11. Tümör hücrelerinde lipid metabolizmasının şematik gösterimi 21
Şekil 2.12. Lipid damlacık yapısı 24
Şekil 2.13. Lipid damlacığı oluşumu ve büyümesi 25
Şekil 2.14. Lipoliz ve lipofaji 26
Şekil 2.15. Fosfolipidler üzerindeki fosfolipaz enzimatik bölgelerinin gösterimi 29
Şekil 2.16. Mitokondriyal oksidatif fosforilasyon sistemi ve Uncoupling protein 32
Şekil 2.17. UCP'lerin yapısının şematik olarak gösterimi 33
Şekil 2.18. Ubikitinasyon kaskadı.....37
Şekil 2.19. NEDD4L yapısı 38
Şekil 2.20. Spartin, lipid damlacıkları ile birleşimi ve bir Hect E3 enzimi olan AIP4 aracılığıyla ubikitin ligaz 38
Şekil 3.1. PC3 ve DU145 hücre hatlarının ışık mikroskobundaki görüntüleri 40
Şekil 3.2. Sandviç ELISA çalışma prosedürü.....44
Şekil 3.3. ELISA plate düzeni.....45
Şekil 4.1. PLA2G7 Standart Absorbans-Konsantrasyon Grafiği.....46
Şekil 4.2. DU145 ve PC3 prostat kanseri hücrelerinde PLA2G7 düzeyinin gösterimi 47
Şekil 4.3. UCP2 standart absorbans-konsantrasyon grafiği.....47
Şekil 4.4. DU145 ve PC3 prostat kanseri hücrelerinde UCP2 düzeyinin gösterim. ..48
Şekil 4.5. NEDD4L standart absorbans-konsantrasyon grafiği 49
Şekil 4.6. DU145 ve PC3 prostat kanseri hücrelerinde NEDD4L düzeyinin gösterimi 49

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. Amerikan Ortak Kanser Komitesi (AJCC) prostat tümörünün klinik TNM sınıflandırması 7
Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan alet ve cihazlar 41
Tablo 3.2. ELISA kit içeriği 44

1. GİRİŞ

Kanser, kontrolsüz çoğalan ve diğer dokulara yayılan hücrelerin neden olduğu bir hastalık olarak tanımlanır (1). Kanser, tüm dünyada önde gelen bir hastalıktır. Dünya çapında görülme sıklığı ve ölüm oranı her geçen gün artmaya devam etmektedir (2). Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı tarafından yayınlanan kanser insidansı ve mortalite tahminlerine göre; 2020'de dünya çapında tahmini 19,3 milyon yeni kanser vakası ve yaklaşık 10 milyon kanser ölümü görülmüştür (3).

Prostat kanseri (PCa), tüm dünyada erkek nüfusunu etkileyen en yaygın ikinci kanser türüdür (4). Ayrıca kısmen düzensiz lipid metabolizması ile karakterize edilen yüksek insidanslı bir kanserdir (5). Çoğu kanser esas olarak glikolizi metabolize etse de, PCa'nın lipid metabolizmasını kullanmayı tercih ettiği gösterilmiştir (6). PCa hücrelerinin; lipidleri lipid damlacıkları şeklinde depoladığı ayrıca proliferasyon ve büyümeyi kolaylaştırmak amacıyla membran sentezi için yapıtaşı olarak kullandığı gözlemlenmiştir (7).

İlerlemiş PCa için, ilk tedavi aşaması androjen adı verilen erkeklik hormonun bakılanması tedavisine (ADT) dayanır. Çoğu hasta ADT'ye olumlu yanıt verir; ancak ADT'ye direnç zamanla gelişir ve hastalar androjen baskılanmasın veya androjen reseptör (AR) inhibisyonuna karşı duyarsız hale gelir. Ek olarak, ADT toplam kolesterol, trigliseritler ve yüksek yoğunluklu lipoproteinlerde artışa neden olur. Bu nedenle, ADT, PCa hastalarında metabolik ve lipide özgü değişikliklerle önemli ölçüde ilişkilidir. Ayrıca PCa'da kullanılan kemoterapötik veya endokrin ajanların lipid damlacıklarında birikmesi ve terapi direncini desteklemesi çok olasıdır (6).

Lipid damlacıkları; lipidlerin alınımı, dağıtımı ve tüketiminde çok önemli bir rol oynayan dinamik organellerdir. Bunlar hücrede enerji üretimi, oksidatif strese karşı koruma veya hızlı hücre büyümesi sırasında membran biyogenezi gibi farklı işlevler görür (8).

Lipid metabolizmasında ve lipid damlacığı oluşumunda yer alan bazı önemli proteinler bulunmaktadır. Örneğin; PLA2G7 geni; Fosfolipaz A2'yi kodlar ve fosfolipitleri yağ asitlerine hidrolize eder. PLA2G7 proteininin prostat kanserinin değişen fosfolipid metabolizması ile önemli ölçüde bağlantılı olduğu belirtilmektedir (9). Mitokondriyal ayrışma proteini 2 (UCP2) ise, glukoz ve lipid metabolizması ile ilgili fizyolojik ve patolojik süreçlerde yer almaktadır. UCP2'nin, glukoz kullanımı yerine yağ asidi metabolizmasının teşvik edilmesini sağlayan bir metabolik anahtar olarak işlev görebileceği belirtilmektedir (10). Lipid damlacık metabolizmasında görev alan bir diğer protein NEDD4L'dir. Nedd4 ailesine ait E3 ubikuitin ligazların lipid damlacıkları devrinde görev alan spartin ile etkileşime girdiği gösterilmiştir (11).

Lipid damlacıkları biyolojisinin moleküler araştırmaları, prostat kanserinin fizyolojisi hakkında yeni bilgiler ve uygulamalı bilimler için yeni ipuçları sağlayacaktır. Bu çalışmada, prostat kanseri hücre hatları olan PC3 ve DU145 hücrelerinde lipid damlacık oluşumunda, depolanmasında ve parçalanmasında yer alan PLA2G7, UCP2 ve NEDD4L proteinlerinin ekspresyon düzeyleri gösterilerek; prostat kanserinde yeni tedavi seçeneklerine katkı sağlamak, kanser hücrelerinin proliferasyonuna ve tedavi dirençliliğine sebep olan lipid damlacıkları hakkında daha fazla bilgi edinmek, literatüre katkıda bulunmak ve PLA2G7, UCP2 ve NEDD4L proteinlerinin artan metastaz potansiyeli ile ilişkisini göstermek amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser, vücuttaki bazı hücrelerin kontrolsüz bir şekilde büyüdüğü ve vücudun diğer bölgelerine yayıldığı bir hastalıktır (12). Kanser, 2018'de tahmini 9,6 milyon ölüm ile dünya genelinde ikinci önde gelen ölüm nedenidir. Akciğer, prostat, kolorektal, mide ve karaciğer kanseri erkeklerde en sık görülen kanser türleri iken meme, kolorektal, akciğer, rahim ağzı ve tiroid kanseri kadınlarda en sık görülen kanserlerdir (13).

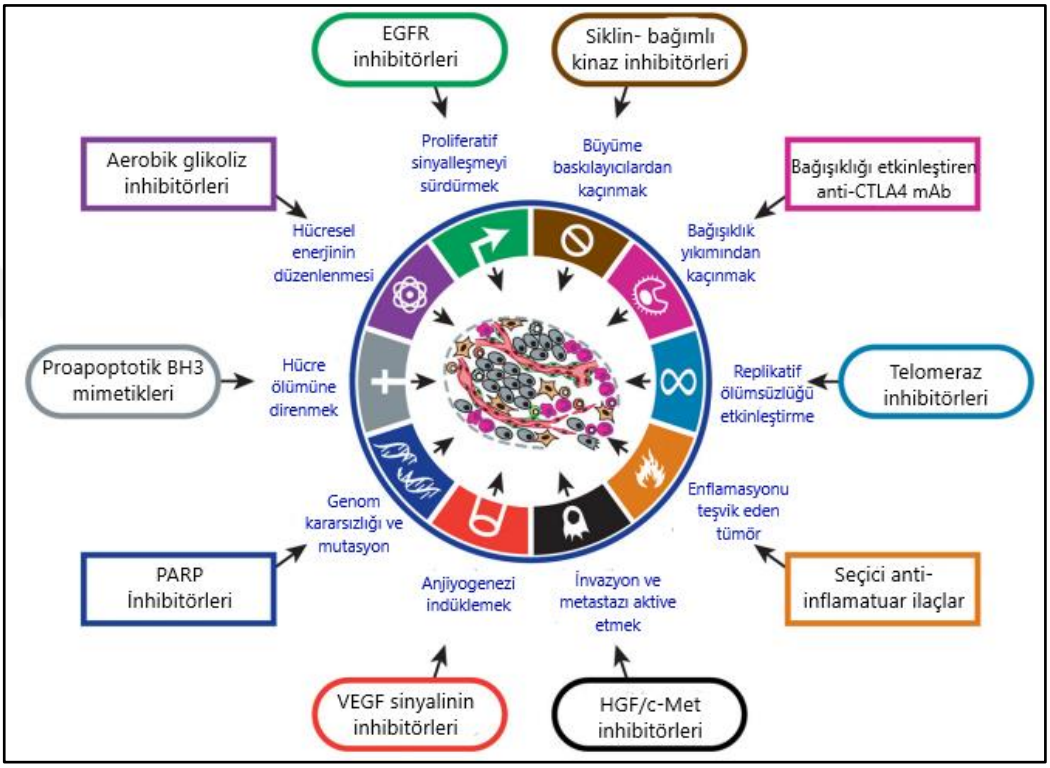
2020 yılında ülkemizde en sık görülen ilk 5 kanser türü sırasıyla, akciğer, meme, kolorektal (kalın bağırsak), prostat ve tiroid kanseridir. Bu 5 kanser türü, tüm kanserlerin %50'den fazlasını oluşturmaktadır (14).

Kanser hücreleri kendilerini normal hücrelerden ayırılan birtakım özelliklere sahiptir. Bunlara ‘kanserin karakteristik özellikleri’ adı verilir (2). Bu özellikler;

1- Proliferatif (çoğalma) sinyalleri sürdürmek
2- Sınırsız bölünebilme
3- Apoptozdan kaçış
4- Büyüme baskılayan sinyallerden kaçma
5- İnvazyon ve metastazın aktive edilmesi
6- Anjiyogenezi indüklemek
7- Vaskülarizasyonu indüklemek
8- Bağışıklık sisteminden kaçma
9- Kanser oluşumunu destekleyen inflamasyonlar
10- Tümörü teşvik edici yönde değişen mikroçevre
11- Genetik mutasyonlar
12- Enerji metabolizmasını değiştirmedir (15, 16).

Mutasyon yoluyla kazanılan bu yeni özellikler; hücrelerin ortaya çıktıkları dokuya lokalize olmalarına, o bölgeyi istila etmelerine ve vücudun diğer bölgelerine giderek orada çoğalmalarına sebep olur (2).

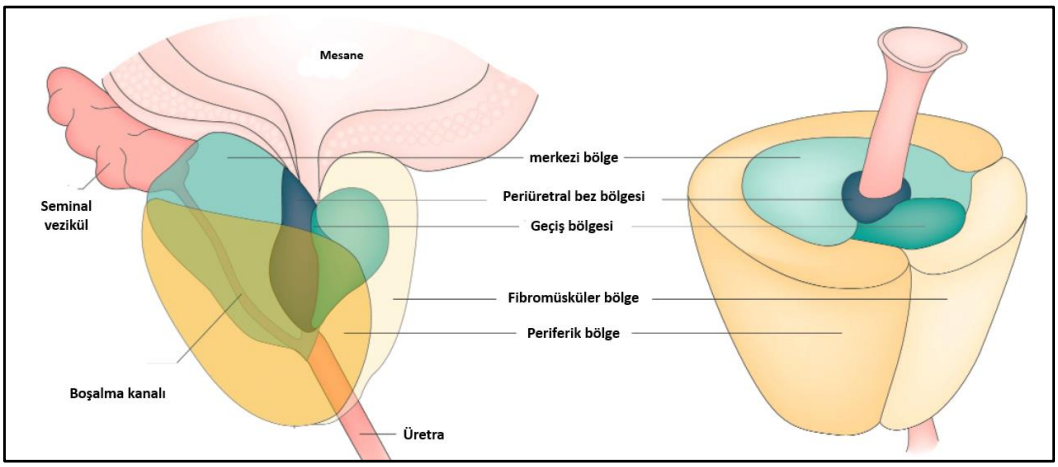
Bu özellikler tümör hücreleri arasındaki ortak noktalardır. Bu ortak yollara olan bağımlılık farklı tümör tipleri arasında değişkenlik gösterir. Sonuç olarak farklı kanser tümörleri farklı derecelerde ayırt edici özelliklerden yararlanır. Örneğin, vaskülarizasyon kanserin önemli bir özelliğidir, ancak bazı tümörler zayıf vaskülerdir ve böyle bu ayırt edici özelliğe daha az bağlı olabilir (16).



Şekil 2.1. Kanser hücrelerinin ayırt edici özellikleri (15).

2.2. Prostat Kanseri

Prostat, erkek üreme sisteminde bulunan bir bezdir. Mesanenin (idrar toplayan ve boşaltan organ) hemen altında ve rektumun (bağırsağın alt kısmı) önünde yer alır. Prostat bezi ceviz büyüklüğündedir ve üretranın (idrar kesesinden idrarı boşaltan tüp) bir kısmını çevreler (17). Yetişkin insan prostatı; merkez bölgesi, geçiş (transition) bölgesi, periferik bölge, fibromüsküler bölge ve periüretral bölge olmak üzere 5 anatomik bölgeye ayrılır. Prostatın ana işlevi, meniyi formüle eden ve sperm canlılığını koruyan temel salgılara katkıda bulunmaktır (18).



Şekil 2.2. Prostat bezinin anatomisi (18).

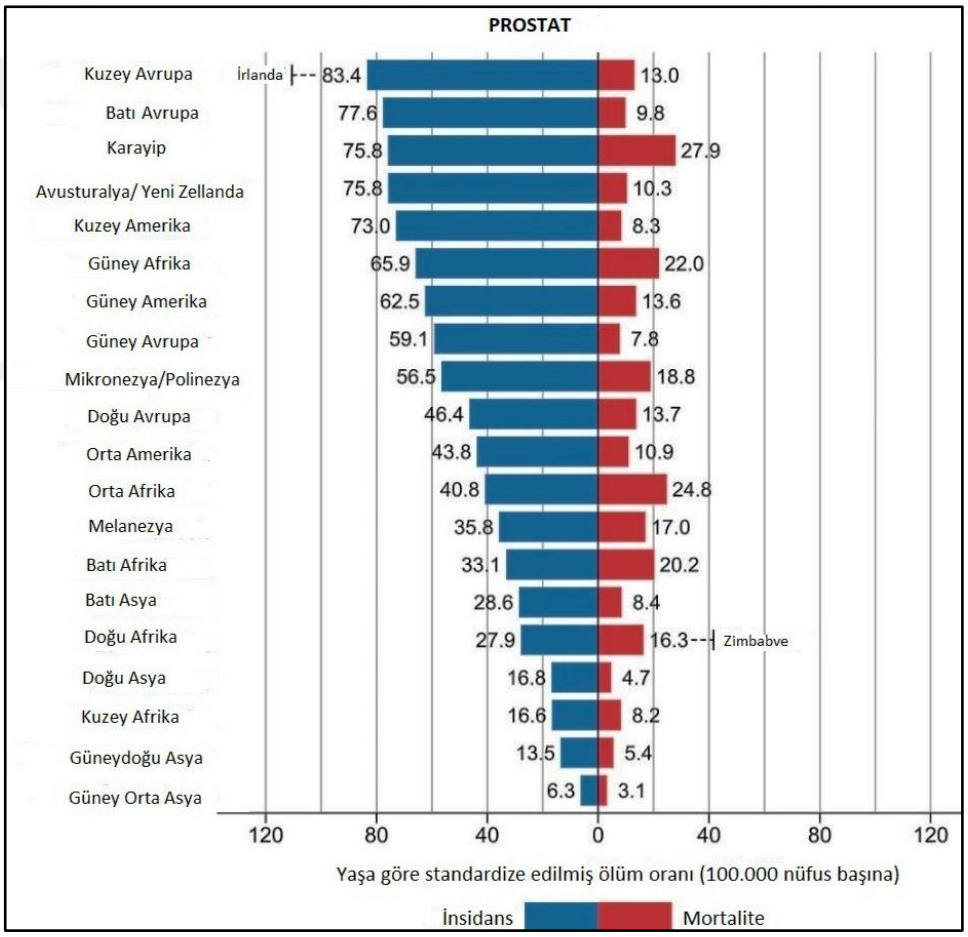
Prostat kanseri, prostat bezindeki hücrelerin kontrolden çıkmasıyla başlar (19). Genellikle yavaş ilerleyen bir hastalıktır. Periferik bölgede küçük odaklar halinde meydana gelmesi nedeniyle erken evre prostat kanserlerinin çoğu asemptomatiktir (20). Prostat kanserinde belirtilerin bazıları şu şekildedir;

- Zayıf veya kesintili ("dur-ve-kalk") idrar akışı
- Ani idrar yapma isteği
- Sık idrara çıkma (özellikle geceleri)
- İdrar akışını başlatmada sorun
- Mesaneyi tamamen boşaltmada sorun
- İdrar yaparken ağrı veya yanma
- İdrarda veya menide kan
- Sırtta, kalçada veya pelviste geçmeyen bir ağrı (17).

Erkeklerde yaş ilerledikçe prostat büyüyebilir ve üretrayı veya mesaneyi tıkayabilir. Bu duruma benign prostat hiperplazisi (BPH) denir (17). Benign prostat hiperplazisinin veya prostattaki diğer problemlerin semptomları, prostat kanseri semptomlarına benzer olabilir (19).

2.2.1. Prostat Kanseri Epidemiyolojisi

Prostat kanseri dünya çapında yaklaşık 1,4 milyon yeni vaka ve 375.000 ölümle erkekler arasında en sık görülen ikinci kanser ve kansere bağlı ölümlerin beşinci önde gelen nedenidir. En yüksek insidans oranları; Kuzey ve Batı Avrupa, Karayipler, Avustralya/Yeni Zelanda, Kuzey Amerika ve Güney Afrika'da görülürken en düşük oranlar ise Asya ve Kuzey Afrika'da görülmektedir. (İnsidans oranları bölgeler arasında 100.000 erkekte 6,3 ile 83,4 arasında değişmektedir). En yüksek mortalite oranları Karayipler, Sahra altı Afrika (Kuzey Afrika dışındaki Afrika bölgeleri) ve Mikronezya/Polinezya'da görülmektedir (3).



Şekil 2.3. Prostat kanserinin ülkelere ve yaşa göre insidans ve mortalite oranları (3).

Prostat kanseri dünyada olduğu gibi Türkiyede'de akciğer kanserinden sonra erkeklerde en fazla görülen kanserdir. 2020 yılında Türkiye'de yeni teşhis edilen 19.444 prostat kanseri vakasından 5.464'ü ölüm ile sonuçlanmıştır (14).

2.2.2. Prostat Kanseri Evreleri

Prostat kanserinde evreleme tedaviyi planlamak açısından önemlidir. Prostat kanserini teşhis etmek için kullanılan testlerin sonuçları genellikle hastalığı evrelemek için de kullanılır. Evreleme sürecinde elde edilen bilgiler tedaviyi planlamak için önemlidir. Prostat kanserinde, hastada kemik ağrısı, yüksek PSA seviyesi veya yüksek Gleason skoru gibi kanserin yayıldığına dair semptomlar olmadıkça evreleme testleri yapılmayabilir (17). Prostat kanseri hücreleri vücudun en çok kemiklere ve lenf düğümlerine yayılırlar. En sık kullanılan evreleme sistemi üç aşamalı TNM (tümör/node/metastaz) sınıflandırmasıdır. (21).

Tablo 2.1. Amerikan Ortak Kanser Komitesi (AJCC) prostat tümörünün klinik TNM sınıflandırılması (21).

T	**PRİMER TÜMÖR**
TX	Primer tümör değerlendirilemez.
T0	Primer tümör kanıtı yok.
T1	Klinik olarak görünmez tümör; elle hissedilmez veya görüntüleme ile görünmez. • **T1a:** Parça alınan dokunun %5'ine eşit veya daha azında tümör tesadüfi histolojik bulgu. • **T1b:** Tümör, parça alınan dokunun %5'inden fazlasında rastlantısal bir histolojik bulgudur • **T1c:** Yüksek PSA seviyesi nedeniyle iğne biyopsisi ile tanımlanan tümörler.
T2	Prostat içinde sınırlı tümör. • **T2a:** Tümör, tek bir prostat lobunun yarısını veya daha azını kaplar. • **T2b:** Tümör bir lobun yarısından fazlasını kaplar, ancak her iki lobu da kaplamaz. • **T2c:** Tümör prostatın her iki lobunu da kaplar.
T3	Tümör prostat kapsülü boyunca uzanır. • **T3a:** Ekstrakapsüler genişleme (tek taraflı veya iki taraflı). • **T3b:** Tümör seminal vezikülleri invaze ediyor.
T4	Tümör sabit veya seminal veziküller dışındaki komşu yapıları invaze ediyor.
N	**BÖLGESEL LENF NODLARI**
NX	Bölgesel lenf düğümleri değerlendirilemez.
N0	Bölgesel lenf nodu metastazı yok.
N1	Bölgesel lenf nodlarında metastazlar var.
M	**UZAK METASTAZ**
MX	Uzak metastaz değerlendirilemez.
M0	Uzak metastaz yok.
M1	Uzak metastaz var. • **M1a:** Bölgesel olmayan lenf nodlarına metastaz. • **M1b:** Kemiklere metastaz. • **M1c:** Kemiklere metastaz olsun veya olmasın başka bölgelerde metastaz var.

Not: TNM (tümör/node/metastaz)

Evre I prostat karsinomu

Evre I prostat karsinomu sadece prostatta bulunur. Bazen tümör, dijital rektal muayene sırasında hissedilmeyebilir. Yüksek PSA seviyesi için yapılan iğne biyopsisi veya başka nedenlerle ameliyat sırasında alınan bir doku örneğinde gözlenir. Bazen de muayene sırasında hissedilir ancak tümör prostatın bir tarafının yarısında veya daha azında bulunur (cT1a-T2a, N0,M0,PSA<10, grade grup 1) (cT: klinik T) (17, 21).

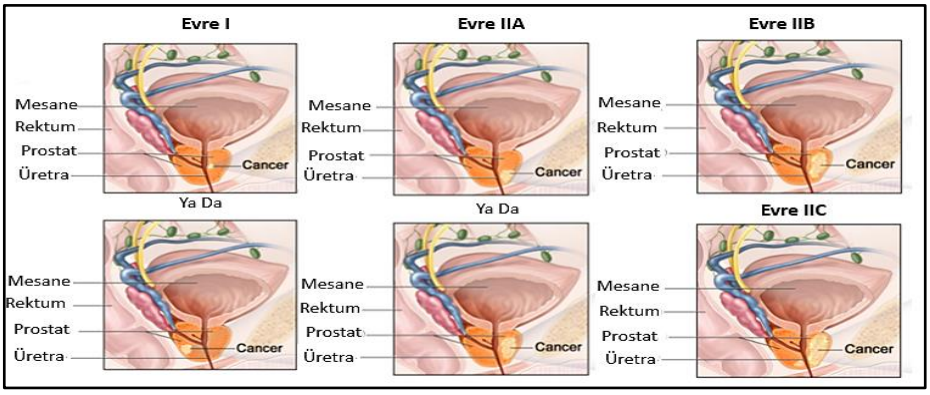
Evre II prostat karsinomu

Evre II'de kanser, evre I'e göre daha fazla ilerlemiştir ancak prostatın dışına yayılmamıştır. Aşama II; IIA, IIB ve IIC olmak üzere 3 aşamaya ayrılmıştır.

- Evre IIA; kanser sadece prostatta bulunur. Prostatın bir tarafının yarısında veya daha azında bulunabilir. PSA seviyesi en az 10'dur ancak 20'nin altında kalır (cT2b-c, N0, M0, PSA<20, grade grup 1) ya da prostatın bir tarafının yarısından fazlasında veya prostatın her iki tarafında bulunabilir (cT1a-T2a, N0, M0, PSA 10–20, grade grup 1).

- Evre IIB; kanser sadece prostatta bulunur. Prostatın bir veya iki tarafında bulunabilir (T1-2, N0, M0, PSA<20, grade grup 2).

- Evre IIC; kanser sadece prostatta bulunur. Prostatın bir veya iki tarafında bulunabilir (T1-2, N0, M0, PSA<20, grade grup 3,4) (17, 21).



Şekil 2.4. Prostat kanseri I. ve II. evreleri (17).

Evre III prostat karsinomu

IIIA, IIIB ve IIIC olmak üzere 3 aşamaya ayrılmıştır.

- Evre IIIA; kanser sadece prostatta bulunur. Prostatın bir veya iki tarafında bulunabilir (T1-2, N0, M0, PSA ≥20, grade grup 1–4)

- Evre IIIB; kanser prostattan seminal veziküller, rektum, mesane veya pelvik duvar gibi yakındaki doku veya organlara yayılmıştır (T3-4, N0, M0, herhangi bir PSA, grade grup 1–4).

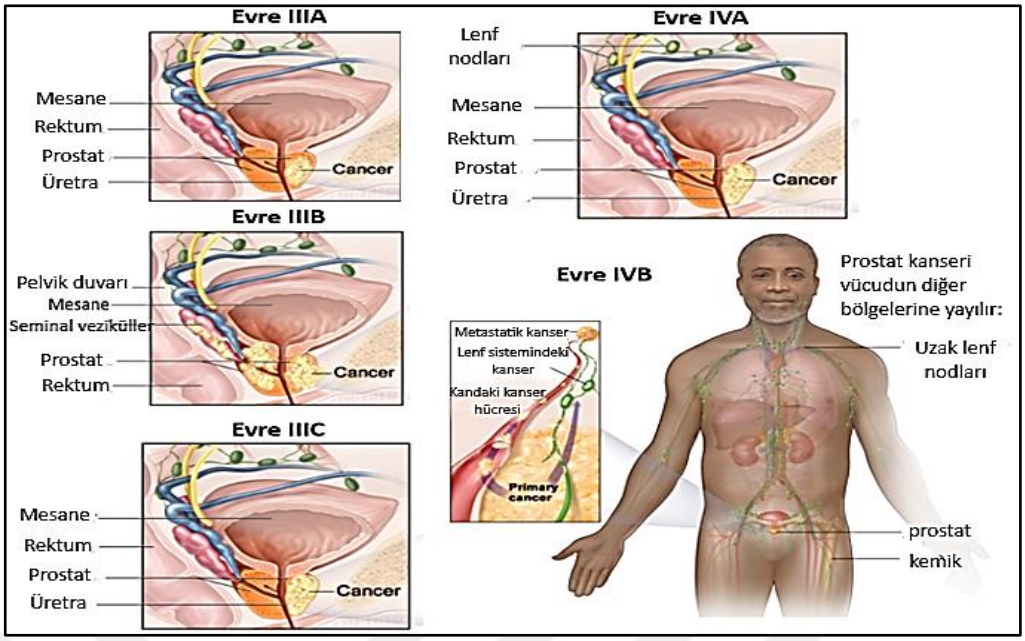
- Evre IIIC; kanser prostatın bir veya her iki tarafında bulunur ve seminal veziküller, rektum, mesane veya pelvik duvar gibi yakındaki doku veya organlara yayılmış olabilir (Herhangi bir T, N0,M0, Herhangi bir PSA, grade grubu 5) (17, 21).

Evre IV prostat karsinomu

IVA ve IVB olmak üzere 2 aşamaya ayrılmıştır.

- Evre IVA; kanser prostatın bir veya her iki tarafında bulunur ve seminal veziküllere, rektum, mesane veya pelvik duvar gibi yakındaki doku veya organlara yayılmış olabilir. Ayrıca kanser yakındaki lenf nodlarına yayılmıştır (Herhangi bir T, N1, M0, Herhangi bir PSA, grade grubu 1-5).

- Evre IVB; kanser, kemikler veya uzak lenf nodları gibi vücudun diğer bölgelerine yayılmıştır (Herhangi bir T, N0, M1, Herhangi bir PSA, grade grubu 1-5) (17, 21).



Şekil 2.5. Prostat kanseri I. ve II. evreleri (17).

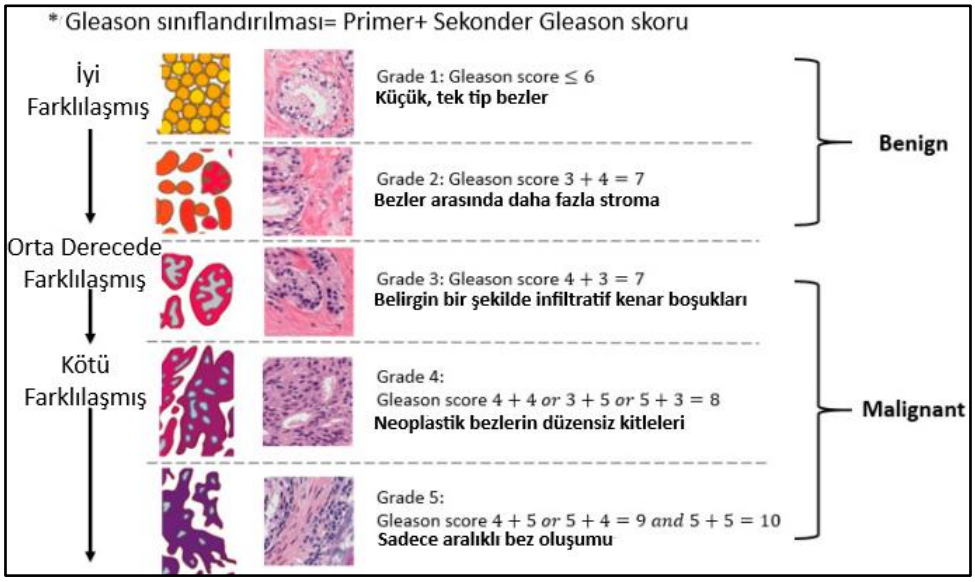
2.2.3. Prostat Kanseri Tanı Yöntemleri

Prostat kanseri için mevcut olan klinik tanı yöntemleri; biyokimyasal tahlil, biyopsi, dijital rektal muayene (DRE) ve transrektal ultrasonografisidir. İlk tarama için bu yöntemler arasından, biyokimyasal tahlil kullanılır. Biyokimyasal tahlil kandaki prostat spesifik antijen (PSA) seviyesini ölçer (22). Kallikrein-3 olarak da adlandırılan PSA, prostat bezi tarafından oluşturulan bir glikoproteindir. Serumu sıvılaştırma, sperm hareketliliğini arttırma ve servikal mukusu çözme işlevi görür (23). PSA kanda düşük konsantrasyonlarda bulunur ancak prostat tahrişi, prostat enfeksiyonu, prostat kanseri ve iyi huylu prostat hiperplazisi (BPH) durumlarında konsantrasyonu artar. PSA kanda serum proteinlerine bağlı ve serbest olmak üzere iki formda bulunabilir. Total PSA, hem bağlı hem de serbest PSA'nın toplanması ile elde edilir. Ancak prostat karsinomunda serbest PSA oranı azalır. Bunun neden meydana geldiği hala belirsizdir. Öne sürülen bir teoriye göre prostat karsinomunun sadece PSA'yı değil, aynı zamanda PSA'nın bağlandığı proteinleri de ürettiğini varsaymaktadır. Serum PSA için referans aralığı 0-4 µg/L'dir. Ancak, çalışmalar 4-10 µg/L arasında PSA değerlerine sahip erkeklerin yaklaşık %70'inin prostat kanseri olmadığını gösterdiğinden, artan değer her zaman bir karsinom olduğu anlamına gelmez. Öte yandan, prostat kanseri olan erkeklerin önemli bir yüzdesinin serum PSA seviyeleri 4 µg/L'nin altındadır bu yüzden

normal bir değer de kesinlikle karsinomun bulunmadığını göstermez. Ayrıca kilolu erkeklerin daha düşük PSA değerlerine sahip olduğu gösterilmiştir. Bu testin doğruluğunu artırmak için, PSA yoğunluğu (PSA konsantrasyonunun ultrasonla ölçülen prostat bezinin hacmine bölünmesiyle hesaplanır), PSA üretim hızı ve özellikle PSA bölümü (serbest PSA'nın toplam PSA'ya bölünmesiyle bulunur) gibi kriterlere bakılmaktadır. (24).

PSA testi ile eşzamanlı olarak, DRE taraması gerçekleştirilir. DRE, prostat bezinin durumunu, dokusunu ve boyutunu belirlemek için yapılır (22). Bu taramada rektum duvarından prostatta topaklar veya anormal alanlar olup olmadığı belirlenir (17). Ancak, prostat bezindeki tümörün ventral veya diğer dokunulmaz alanlarda bulunabilmesi nedeniyle DRE tümörünün erken tespiti için yararlı değildir. DRE sonrası hastalara transrektal ultrasonografi (TRUS) uygulanır (22). TRUS, prostatı kontrol etmek için yaklaşık bir parmak büyüklüğünde bir probun rektuma yerleştirildiği bir prosedürdür. Prob, yüksek enerjili ses dalgalarını (ultrason) iç dokulara veya organlara çarptırarak bir yankı oluşturulmasını sağlar. Yankılar, sonogram adı verilen vücut dokularının bir resmini oluşturur. Kanserin prostatın dışına yakın dokulara yayılıp yayılmadığını öğrenmek için ise transrektal MRI yapılabilir. Transrektal MRI ve TRUS prostatın görüntülenmesini sağlaması nedeniyle biyopsilere rehberlik etmekte kullanılırlar (17).

Prostat bezinde şüpheli bir yer tespit edildiğinde biyopsi ile numuneler alınır. Gleason skorlama sistemine göre değerlendirilir ve sonunda en güvenilir, doğru teşhis yapılmış olur (22). Gleason derecelendirme sistemi, Dr Donald Gleason tarafından geliştirilmiş ve doğrulanmış beş aşamalı bir sistemdir ve neoplastik bezlerin yapısal özelliklerini temel alır. Kanserli bezlerin farklılaşma derecesini ve bunlarla ilişkili prognozunu yansıtan 1 ile 5 arasında değişen puanlar verilir (25). Değerlendirilen dokudaki tümörü oluşturan en sık (birincil) patern ve ikinci en yaygın (ikincil) patern matematiksel olarak toplanır. Sonuçta 2-10 arasında değişen bir rakam bulunur, bu değer Gleason skoru olarak isimlendirilir (26). Örneğin, Gleason skoru 3+4=7 olarak belirtilmişse, tümörde görülen en yaygın derecenin 3 ve daha az yaygın olanın 4 olduğu anlamına gelir (19). Artan Gleason derecesi, tümör boyutu, daha ileri klinik evre, metastatik hastalık ve azalmış sağkalım ile güçlü bir şekilde ilişkilidir (25).



Şekil 2.6. Prostat kanserinde gleason skoru (27).

2.2.4. Prostat Kanseri Tedavi Yöntemleri

Prostat kanserinin tedavisi yaş, sağlık faktörleri, kanserin evresi vb. nedenlerle her birey için farklılık göstermektedir. Cerrahi, radikal prostatektomi, radyasyon tedavisi, hormon tedavisi, kriyocerrahi, kemoterapi, endokrinoterapi, brakiterapi, aşı tedavisi, kemiğe yönelik tedavi vb. gibi çeşitli terapötik seçenekler mevcuttur. Bu tedaviler tek başına kullanılabileceği gibi, PCa'nın evresi, hastanın yaşı vb. etkenlere göre kombine olarak kullanılabilir (28).

Prostat kanseri çoğu hastada çok yavaş ilerler. Bu nedenle bazı hastalara tanı konulmuş olmasına rağmen tedavi uygulanmasına gerek görülmemektedir. Genellikle tümörü vücudun farklı yerlerine yayılmamış, başka ciddi sağlık problemleri olan ve özellikle de ileri yaştaki hastalara prostat kanserine yönelik tedavi önerilmeyebilir. Hekim bu hastalara aktif izlem uygulamasını önerebilir. Bu uygulamada hastaya herhangi bir tedavi yöntemi uygulanmaz, sadece belirli aralıklarla yapılan tetkiklerle takip edilir. Bulgulara göre gerekirse tedavi başlatılabilir (29).

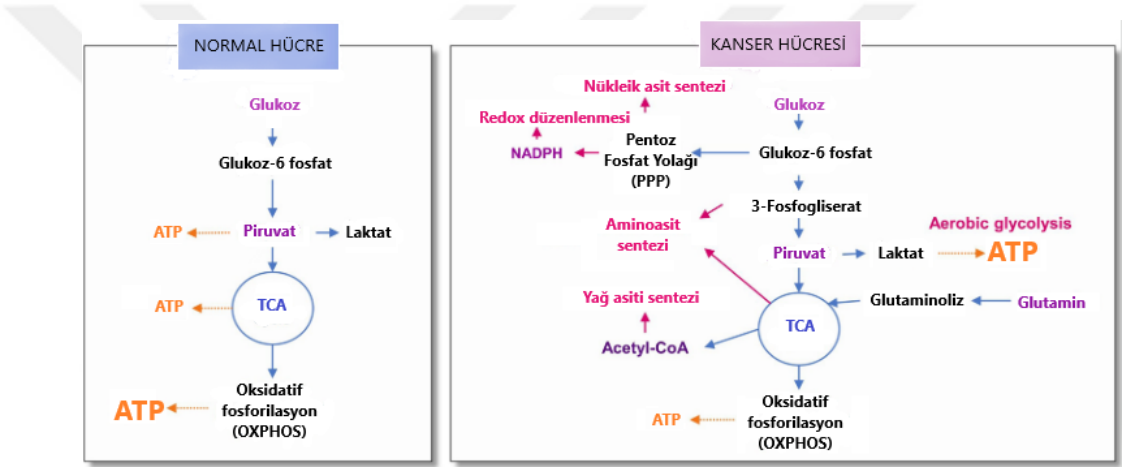
Tümörün sadece prostat bezinde bulunduğu hastalar, tümörü çıkarmak için ameliyatla tedavi edilebilir (17). Prostat kanseri için ana ameliyat tipi radikal prostatektomidir (30). Radikal prostatektomi; prostatı, çevreleyen dokuyu ve seminal vezikülleri çıkarmak için kullanılan bir cerrahi yöntemdir. Yakındaki lenf düğümlerinin çıkarılması da aynı anda yapılabilir (17).

Prostat kanseri tedavisinde kullanılan bir diğer yöntem radyoterapidir. Radyasyon tedavisi, kanser hücrelerini öldürmek veya büyümelerini önlemek için yüksek enerjili x-ışınlarının veya diğer radyasyon türlerinin kullanılmasıyla gerçekleştirilir. Uygulanma şekli, tedavi edilen kanserin tipine ve evresine bağlıdır (17). Erken evre prostat kanserinde radyasyon tedavisi cerrahi uygulama yerine ya da cerrahiden sonra o bölgede kalmış olabilecek kanser hücrelerini yok etmek için uygulanabilir. Prostat kanseri diğer organlara yayıldıysa radyoterapi bu alanlara da uygulanabilir. Radyasyon vücuda dışarıdan bir makineyle (eksternal dıştan radyasyon) verilebilir veya radyoaktif bir çekirdeğin prostata yerleştirilmesiyle (içten radyasyon brakiterapi) doğrudan kanserli dokuya verilebilir. Bazı hastalarda bu iki radyasyon tedavi şekli birlikte uygulanabilir (29).

Prostat kanserinde androjen olarak bilinen erkek cinsiyet hormonları kanser hücrelerinin proliferasyonuna neden olabilir. Vücuttaki ana androjenler testosteron ve dihidrotestosterondur (DHT). Çoğu androjen testislerde üretilmektedir ancak prostat kanserinin kendisi ve adrenal bezler tarafından da bir miktar androjen üretilebilir (30). Hormonal tedavinin birincil stratejisi, testisler tarafından testosteron üretimini azaltmak veya testosteronun adrenal bez ve testis hücrelerinin büyümesi üzerindeki etkisini engellemektir (31). Erkeklik hormonlarının miktarını azaltmak veya çalışmasını engellemek amacıyla yapılan tedaviye androjen yoksunluğu tedavisi (ADT) denir (17). Hormon tedavisi prostat kanserini tedavi edemez ancak prostat kanserinin büyümesini yavaşlatmayı ve genel boyutunu küçültmeyi sağlar (31). Ayrıca prostat kanserinin tedavisin de kemoterapi, immünoterapi ve hedefe yönelik tedavilerde kullanılmaktadır (17).

2.3. Kanser Enerji Metabolizması

Kanser hücreleri, tümör oluşumunu, tümör ilerlemesini, metastazı ve ayrıca kemoterapiye direnci kolaylaştırmak için metabolik yolları yeniden düzenleyebilir (32). Kanser hücresi metabolizmasının ortak bir özelliği, sıklıkla besin açısından fakir bir ortamdan gerekli besinleri alma ve bu besinleri hem canlılığı sürdürmek hem de yeni biyokütle oluşturmak için kullanma yeteneğidir (33). Kanser hücrelerinde metabolik yeniden programlama, glikoz metabolizmasının düzensizliğinin yanı sıra, anormal lipid ve amino asit metabolizması, anormal mitokondriyal biyogenez ve diğer biyoenerjetik metabolizma yollarındaki düzensizlikler ile karakterize edilmiştir (34).

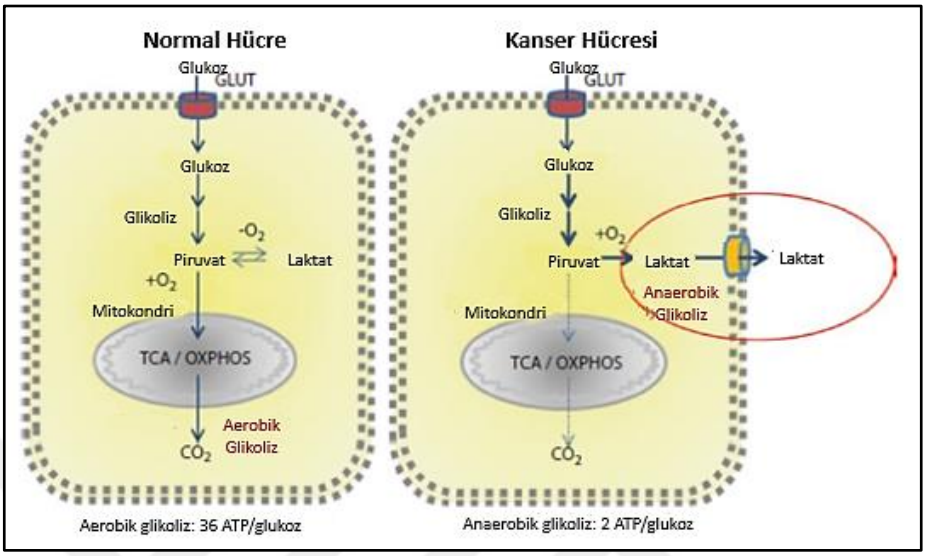


Şekil 2.7. Kanser hücrelerinde metabolik yeniden programlama (35).

Glukoz metabolizması

Normal hücrelerin, aerobik koşullar altında sitozolde ilk glikoliz yoluyla enerji aldıkları takiben mitokondriyal oksidatif fosforilasyonu kullandıkları iyi bilinmektedir. Ortamda oksijen az olduğunda, hücreler enerji temini için oksijen tüketen mitokondriyal metabolizma yerine glikolize güvenirler. Bununla birlikte, kanser hücreleri oksijen varlığında bile sitozolde glikoliz gerçekleştirmeyi tercih eder; bu, ilk olarak Otto Warburg tarafından gözlemlenen bir fenomendir ve bu yüzden "Warburg etkisi" veya "aerobik glikoliz" olarak bilinir. Glikoliz yoluyla glikoz molekülü başına ATP üretimindeki verimin çok daha düşük olmasına rağmen, enerji üretiminin oksidatif fosforilasyondakinden çok daha hızlı olduğu ve dolayısıyla kanser

hücrelerinin hızlı büyüme ve çoğalma talebini karşıladığı ileri sürülmektedir. Glikoz metabolizmasının bu şekilde yeniden programlanması birçok tümörde doğrulanmıştır (34).



Şekil 2.8. Warburg etkisi (2).

Öte yandan, tümör hücrelerinin glikolizin son ürünü olan piruvatı işleme şekli de normal hücrelerden farklıdır. Normal hücrelerde, piruvatın çoğu, TCA döngüsünü beslemek için Asetil-CoA'ya dönüştürülür. Piruvatın bir kısmı ise alanin veya laktat üretmek için kullanılır. Buna karşılık tümör hücrelerinde, piruvattan laktata dönüşüm (laktat dehidrojenaz A'nın (LDHA) yukarı düzenlemesiyle) tercih edilen bir reaksiyondur. Bu reaksiyon, glikoliz için gerekli olan NADH'ın yenilenmesine yardımcı olduğu için kanser hücreleri için faydalıdır. Ayrıca, piruvatı laktata dönüştürmek hem reaktif oksijen türlerinin seviyelerini düşürerek kanser hücrelerinde hücre içi oksidatif stresi azaltır ve tümörlerin sağkalımını destekler hem de hücre dışı mikro ortamın pH'ını düşürerek hücre dışı matrisi parçalamak için metalloproteazların aktivitesi kolaylaştırmış olur. Böylece laktat, kanser invazyon ve metastazını indüklenmiş olur (36).

Aminoasit metabolizması (Glutaminoliz)

Büyük ölçüde karbon, hidrojen, oksijen, fosfor, azot ve kükürt içeren bir kanser hücresi, yalnızca aerobik glikoliz ile üretilen ve laktata dönüştürülen glukozu değil, aynı zamanda ana substrat olarak bir protein olan glutamini de kullanır (37). Plazmada, en yüksek konsantrasyonda bulunan aminoasit glutamindir. Kanser hücrelerinde glukoz temel karbon kaynağı iken glutamin temel azot kaynağıdır (38). Glutaminoliz; glutamin, glutamat, α-ketoglutarat gibi metabolitler katabolize eden ve kanser hücrelerine sağkalım avantajı sağlayan bir dizi biyokimyasal reaksiyondur. Glutaminoliz ürünleri, tümörlerin TCA döngüsünü beslemek için çok önemlidir. TCA döngülerinin ara ürünleri lipid, kolesterol, amino asitler ve diğer temel metabolitlerin sentezi için kullanılabilir. Ayrıca, TCA döngüsünden NADH ve $FADH_2$, mitokondrinin elektron taşıma zincirinin ATP üretmesi için elektronlar sağlar. Böylece, glikolize benzer şekilde, glutaminoliz kanser hücrelerine yalnızca ATP sağlamakla kalmaz, aynı zamanda sürekli biyosentez ve hızlandırılmış proliferasyon için önemli öncülleri de sağlar (36). Ayrıca glutamin, hem pürinlerin hem de pirimidinlerin de novo sentezi için gerekli bir nitrojen donörüdür ve bu nedenle hücre proliferasyonu sırasında net nükleotid üretimi için gereklidir (39).

Pentoz fosfat yolu

Heksoz monofosfat şantı veya fosfoglukonat yolu olarak da bilinen pentoz fosfat yolu (PPP), heksokinaz tarafından katalize edilen ve birincil substrat olarak glikoz-6-fosfat tüketen bir yoldur (40).

Pentoz fosfat yolu (PPP), iki daldan oluşan bir metabolik yoldur. Oksidatif dalda, nükleotid sentez için gerekli olan ribuloz-5-fosfat ve NADPH üretilir. NADPH glutatyon üretimi, detoksifikasyon reaksiyonları ve lipidlerin yanı sıra diğer makromoleküllerin biyosentezi için kullanılır. Oksidatif olmayan dalında, fruktoz-6-fosfat ve gliseraldehit-3-fosfat gibi ürünlerle tersinir karbon değişim reaksiyonlarını gerçekleşir. Bu metabolitler, glikolize ve downstream metabolik yollara katılabilir. PPP'nin proliferasyon, apoptoz, invazyon, ilaç direnci ve metastaz dahil olmak üzere kanserin çeşitli yönleri üzerinde önemli etkisinin olduğu gösterilmiştir. Normal

hücreler, riboz-5-fosfat üretimi için sıklıkla PPP'nin oksidatif dalına güvenirken; kanser hücreleri, nükleik asit sentezi için riboz-5-fosfat üretmek üzere PPP'nin oksidatif ve oksidatif olmayan her iki kolunu da kullanır (36).

Mitokondriyal biyogenez

Mitokondri, oksidatif fosforilasyon yoluyla ATP üretimi ile hücresel ana enerji kaynağıdır. Hücre içi sinyal yolaklarının çalışmasını düzenler, reaktif oksijen türlerini (ROS) üretir, yağ asitlerinin β-oksidasyonunu gerçekleştirir, aminoasit metabolizmasına, pirimidin sentezine, fosfolipid modifikasyonlarına, kalsiyum düzenlemesine ve hücrelerin sağ kalımı ve yaşlanması gibi olaylara katılır (41).

Her hücre çok sayıda mitokondri içerir ve her mitokondrinin birden fazla kopya halinde kendi DNA'sı (mtDNA) vardır. Mitokondriyal DNA'daki mutasyonlar özellikle ROS üretimine katkıda bulunur ve bu nedenle tümörogenezde önemli bir faktör olarak düşünülmektedir (42).

Birçok tümör, mitokondriyal solunum yoluyla tam oksidasyonun tersine, glikolitik ara maddeleri pentoz fosfat yoluna, serin biyosentezine ve lipid biyosentezine yönlendirir. Bazı tümörlerde ise piruvatın kullanımı mitokondri tarafından sınırlandırılır. Mitokondriyal oksidasyon için piruvatın mevcudiyeti, piruvat kinaz (PKM) tarafından düzenlenir. PKM, piruvat üretmek için glikolizin son adımını katalize eder. Kanserler, düşük aktiviteye sahip olan PKM2 izoformunu spesifik olarak yukarı düzenler böylece glikolitik ara maddelerin birikmesine ve anabolik işlemler için kullanılmasına izin verir. Ek olarak, mitokondriyal piruvat taşıyıcısı (MPC1 ve MPC2) bir dizi kanserde ya kaybolur ya da aşağı düzenlenir. Ayrıca, MPC kaybı, glutaminolizin upregülasyonu ve yağ asitlerinin ve dallı zincirli amino asitlerin kullanımı dahil olmak üzere, TCA döngüsü tarafından yakıt oksidasyonunu koruyan telafi edici yolları uyarır (43).

2.3.1. Lipid Metabolizması

Lipidler

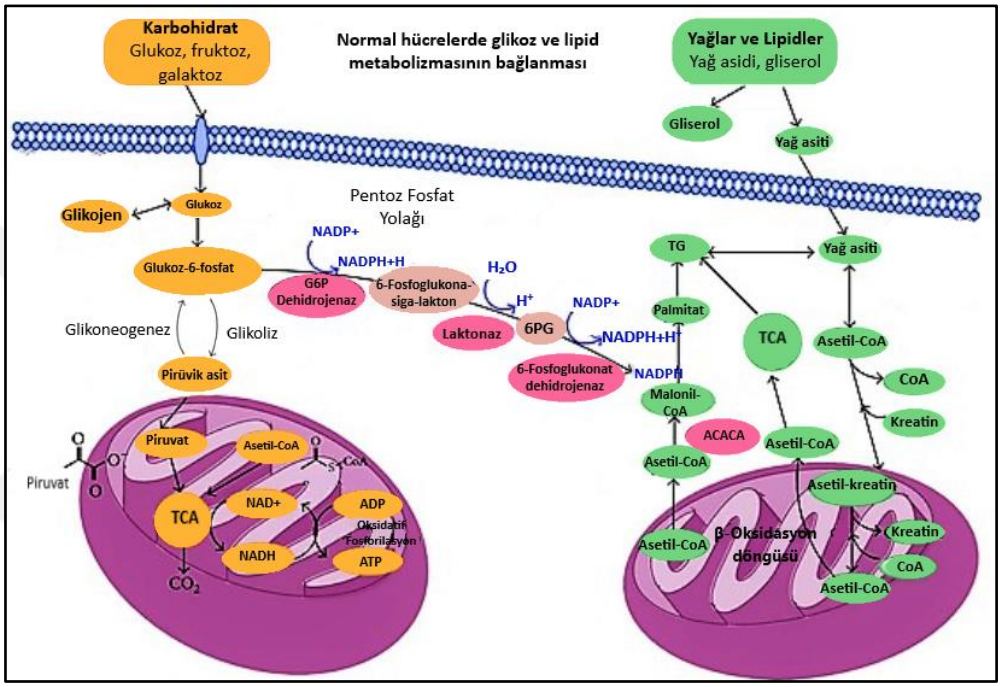
Lipitler, yağ (trigliserit, TG) ve lipoidden (fosfolipid, kolesterol ve kolesterol ester) oluşur. Hücre zarının ana bileşenini oluşturan lipidler ise, sfingolipidler, lizofosfolipidler ve steroller dışında fosfolipidlerdir (örn. fosfatidilkolin ve fosfatidiletanolamin) (44). Bu lipidlerin tümü, kısmen asetil CoA'dan türetilir ve çoğu, yağ asitlerini (FA) içerir. FA yapıtaşları ya eksojen kaynaklardan (gıda kaynaklı) ya da de novo (kendiliğinden) sentezlenir (45). Lipid metabolizması; lipid sentezi, oksidasyonu ve depolanması süreçlerini içerir (44).

Lipid sentezi

Lipid sentezi, besin kaynaklı karbonları FA'lara dönüştüren süreçtir (46). Normal insan dokularının çoğu, lipidlerin sentezi için diyetten elde edilen ekzojen lipidleri kullanırken de *novo* yağ asidi sentezi genellikle baskılar (47). Ekzojen lipitlerin içeriği esas olarak trigliserittir ancak az miktarda fosfolipid ve kolesterol de vardır. İnce bağırsaktaki enzimler, safradaki safra asitleri ve pankreas enzimleri (pankreatik lipaz, fosfolipaz A2, kolesterol esteraz vb. dahil) sayesinde lipidler serbest yağ asitleri (FFA), gliserol ve serbest kolesterole hidrolize edilir. Daha sonra bu moleküller, ince bağırsağın (esas olarak jejunum) epitel hücreleri tarafından emilir ve ayrıca bağırsak epitel hücrelerinde trigliseritlere, kolesterol esterlerine vb. esterleştirilir ya da hepatositlerde oksidasyon yoluyla enerjiye dönüştürülebilir (48).

De *novo* yağ asidi sentezinde üç anahtar enzim görev alır. Bunlar; ATP'ye bağlı sitrat liyaz (ACLY), asetil-CoA karboksilaz (ACC) ve yağ asidi sentaz (FASN) (46). FA biyosentezinde yer alan ilk adım, iki karbonlu asetil-CoA'nın üretilmesidir. Asetil-CoA, ATP-sitrat liyaz (ACLY) enzimi tarafından sitrattan üretilir ve daha sonra asetil-CoA karboksilaz (ACC) enzimi tarafından malonil-CoA'ya dönüştürülür. Asetil-CoA ve malonil-CoA daha sonra yağ asidi sentazın (FASN) açil-taşıyıcı protein alanına bağlanır ve doymuş 16 karbonlu bir FA olan palmitik asit oluşumuna yol açar. Stearoil-CoA desatüraz (SCD) tarafından açil zincirinin Δ9 pozisyonuna bir çift bağın

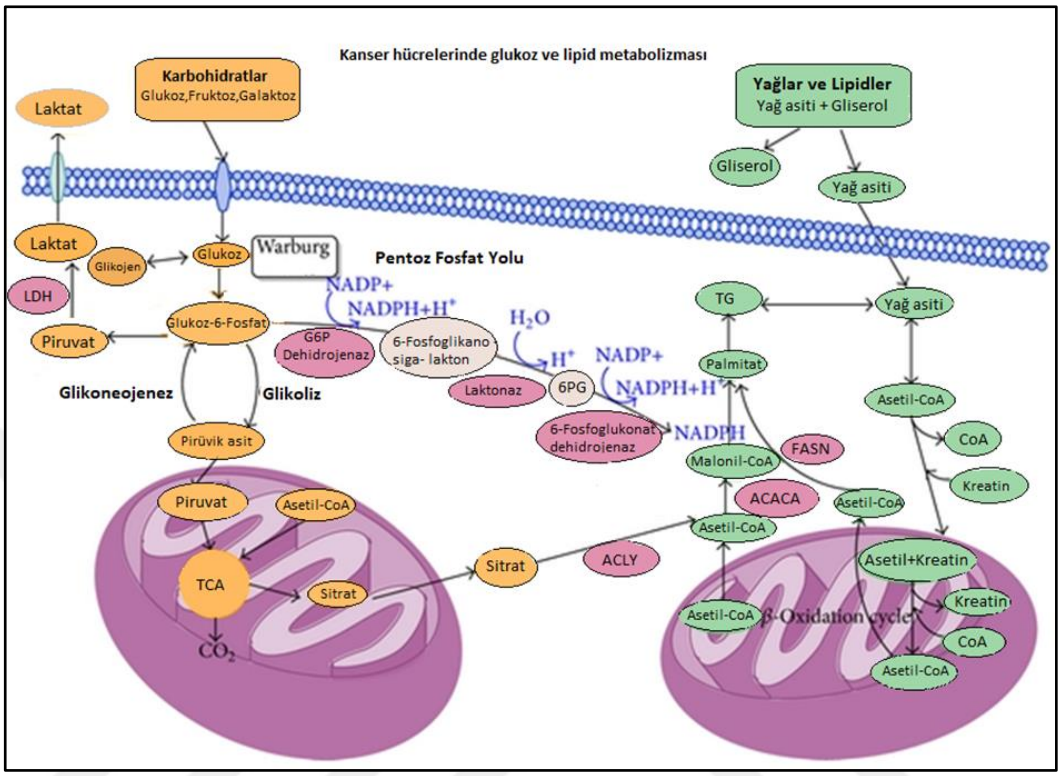
eklenmesiyle tekli doymamış FA'ler üretilir. FA'ler birçok farklı lipit türü üretmek için kullanılabilir. Bu lipidler gliserol fosfat yoluyla diaçilgliseritlere (DAG'ler) ve triaçilgliseritlere (TAG'lar) dönüştürülürler. TAG'lar esas olarak lipit damlacıkları şeklinde depolanarak enerji için kullanılır. Bununla birlikte, bu yolun ara maddeleri, biyolojik zarların ana yapısal bileşenlerini oluşturan (fosfatidilkolin (PC), fosfatidiletanolamin (PE), fosfatidilgliserol (PG) ve fosfatidilserin (PS)) fosfogliseritlere dönüştürülebilir (46).



Şekil 2.9. Normal hücrelerde glikoz ve lipid metabolizması (49).

Normal hücreler diyet kaynaklı eksojen yağ asitlerini kullanmayı tercih ederken, kanser hücreleri yüksek oranda *de novo* yağ asidi sentezini kullanır. Yüksek oranda de novo sentez, hücre zarının oluşumu için kritik olan esansiyel lipidleri üretir ve kanser proliferasyonu ve ilerlemesi için ekstra enerji üretir (49). Normal hücreler genellikle FASN ekspresyonunu düşük seviyelerde tutar. Buna karşılık, akciğer, prostat, yumurtalık, meme, endometriyum ve kolon kanseri dahil olmak üzere birçok kanser türünde sıklıkla FASN aşırı eksprese edilmiştir. Bu aşırı ekspresyonun erken tümör oluşumuna, tümörün sağ kalımı ve büyümesine katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Ayrıca tümör hücreleri *de novo* lipid sentezi için gerekli olan enzimler olan ACLY ve ACC'yi yüksek seviyelerde ifade eder. ACLY, yağ asidi sentezindeki

görevine ek olarak, glikoliz inhibitörü olan sitozolik sitrat birikimini önleyerek Warburg etkisini güçlendirir (47).



Şekil 2.10. Kanser hücrelerinde glikoz ve lipid metabolizması (49).

Lipid oksidasyonu

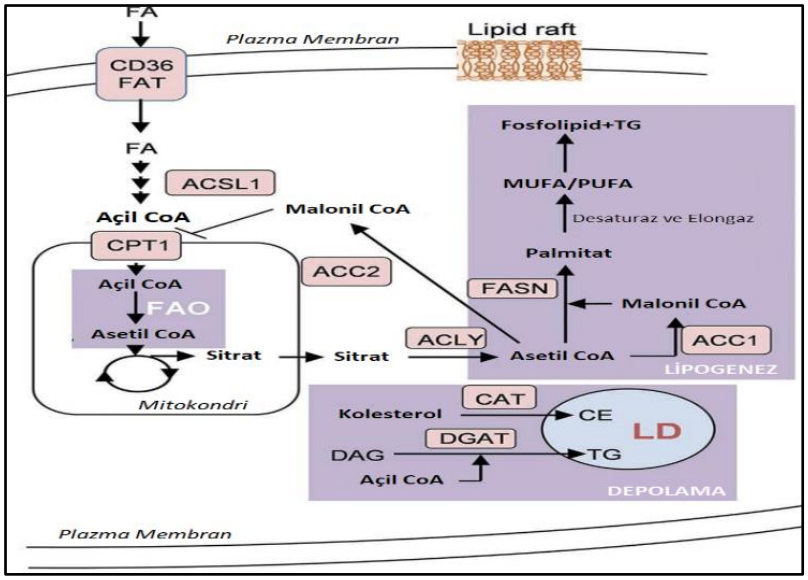
Yağ asitleri (FA), yağ asidi oksidasyonu (FAO; β-oksidasyon olarak da bilinir) yolu ile katabolize edilir. Kuru kütlelerine göre, karbonhidratlardan iki kat daha fazla ATP sağlar (depolanmış yağ asitleri ile depolanmış glikojen karşılaştırıldığında altı kat daha fazla) ve besin bolluğu koşulları altında (yağ dokusunda trigliseritler şeklinde) depolama için tercih edilen bir besindir (50). Yağ asitleri öncelikle hücre yüzeyindeki yağ asidi protein taşıyıcıları yoluyla hücreye girer. Bu eksojen alım, CD36 (cluster of differentiation 36), FATP'ler (fatty acid transport proteins) ve FABPpm (plasma membrane associated fatty acid binding protein) dahil olmak üzere özel taşıyıcılar tarafından gerçekleştirilir (51). Karnitin palmitoiltransferaz I (CPT1), yağ asitlerinin mitokondri içine alınıp β-oksidasyona uğramalarını sağlamak için açil karnitinlere dönüştürür (52). Daha sonra, yağ asitlerinin (döngü başına iki karbon) kısalmasıyla

sonuçlanan ve her bir döngüde NADH, $FADH_2$ ve asetil CoA üreten döngüsel bir dizi reaksiyon gerçekleşir. FAO tarafından üretilen NADH ve $FADH_2$, ATP üretmek için elektron taşıma zincirine (ETC) girer. Asetil CoA ise, sitratı üretmek için Krebs döngüsüne girer (50).

Kanser hücrelerinde FA'ların alımından sorumlu CD36, FATP ve FABPpm'lerin gen ve protein ekspresyonlarında artış gözlenmiştir. Özellikle, yüksek CD36 ekspresyonu, meme, yumurtalık, mide ve prostat dahil olmak üzere çeşitli tümör tiplerinde kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir. Bu sonuçlar; CD36'nın tümör hücrelerini de novo lipid sentezi yerine ekzojen lipid alımına doğru kaydırdığını göstermektedir. Eksojen FA'ların yüksek alımı, bunların TAG'lar ve sterol esterler formunda lipid damlacıklarında depolanmasına sebep olmaktadır (51). Ayrıca yağ asitlerinin mitokondri içine alınmasını sağlayan CPT1 enzimi inhibitörlerinin çeşitli hayvan modellerinde anti-kanser etki gösterdiği tespit edilmiştir (52).

Lipidlerin depolanması

Hücresel lipidler ortamda fazla bulunduğunda, ER'de trigliseritlere ve kolesterol esterlere dönüştürülerek lipid damlacıkları halinde depolanabilirler (52). LD'lerde depolanan lipidler açlık durumunda hücrenin enerji ihtiyacını karşılamak amacıyla yıkılır (53).



Şekil 2.11. Tümör hücrelerinde lipid metabolizmasının şematik gösterimi (53).

2.3.1.1. Prostat Kanserinde Lipid Metabolizması

PCa, yavaş büyüyen ve esas olarak enerji için lipid oksidasyonunu kullanan hormona bağımlı bir kanserdir (54). Lipid ve glukoz metabolizmasının prostat kanserindeki (PCa) rolü ve göreceli katkısı diğer kanserlerden farklıdır. Çoğu kanser esas olarak glikoliz metabolizmasını kullanırken, son çalışmalar PCa'nın lipid metabolizmasını kullanmayı tercih ettiğini göstermektedir (6). PCa hücreleri, de novo lipogenez, yağ asidi alımı ve β-oksidasyon ile ilişkili çeşitli enzimleri daha yüksek eksprese etmesi gibi metabolik özelliklere sahiptir. Bu anormal lipid metabolizmasının kanserin büyümesine sebep olduğu ve hücreleri hormona dirençli hale getirerek tedavi direncine yol açtığı bildirilmiştir. Ayrıca, PCa hücreleri olumsuz çevresel koşullar altında hayatta kalmak için lipid metabolizmasını etkin bir şekilde kullanır. Spesifik olarak, hipoksik kanser hücreleri, yüksek glutamin ve yağ asidi alımı dahil olmak üzere metabolik değişikliklerin bir kombinasyonu yoluyla daha yüksek miktarda lipid biriktirir, aynı zamanda yağ asidi oksidasyonunu azaltır (54). Bu lipitler lipid damlacıklarında depolanır veya hücre zarlarının temel bileşenleri olan daha karmaşık fosfolipidlere dönüştürülür. Sonuç olarak, geliştirilmiş lipogenez, yalnızca hızlı hücre proliferasyonunu desteklemek için tümör hücrelerinin artan enerji ihtiyacını karşılamakla kalmaz, aynı zamanda kanser hücresi biyolojisinin birçok yönünü önemli ölçüde etkileyen membran fosfolipid doygunluğunu da arttırır (55).

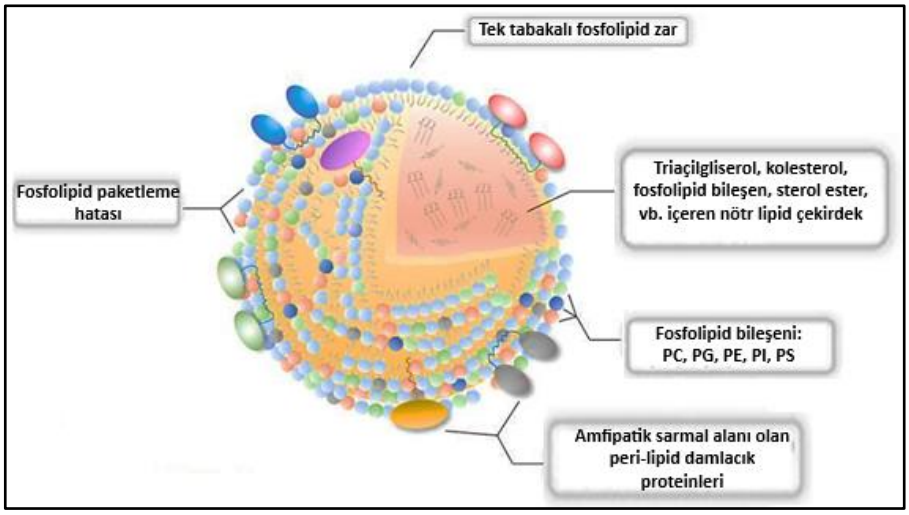
Yapılan çalışmalarda, nükleer manyetik rezonans spektroskopisi ile klinik prostat tümörlerinin, özellikle daha ileri ve agresif vakaların, sıklıkla 'mobil lipidler' olarak adlandırılan yoğun lipid sinyalleri gösterdikleri tespit edilmiştir. Bu mobil lipidler büyük ölçüde fosfatidilkolin ve özellikle de lipid damlacıkları olarak bilinen hücresel birikintilerde bulunan trigliseridler ve kolesterol esterlerine karşılık gelir. Lipid damlacıklarının birikmesi, daha agresif klinik prostat tümörlerinde ve metastatik tortularda ve dolaşımdaki prostat tümör hücrelerinde (CTC'ler) histolojik boyama ve Raman spektromikroskopisi dahil olmak üzere başka yöntemlerle de gösterilmiştir (55).

PCa hücrelerinde lipidlerin sentezi ve kullanımı androjenler tarafından düzenlenir. PCa'daki androjen reseptör sinyalinin, FASN ve ACACA (asetil-CoA karboksilaz alfa) gibi lipid biyosentetik enzimleri upregüle ettiği bilinmektedir. Ayrıca

androjenlerir lipid damlacıklarının birikmesini de indüklediği bilinmetedir. PCa'da kullanılan kemoterapötik veya endokrin ajanların lipid damlacıklarında birikmesi ve terapi direncini desteklemesi çok olasıdır. Aslında androjenler, PCa hücrelerinde çoklu lipid taşıyıcılarının ekspresyonunu da modüle eder. Bu lipid taşıyıcıların ekspresyonu, kemik metastazlı kanserlerde lokalize PCa hastalığına kıyasla artar. Yapılan bir çalışmada, PCa'da yüksek miktarda yağ içeren bir diyetle beslenmenin, muhtemelen SREBP (sterol düzenleyici element bağlayıcı protein) transkripsiyon faktörü tarafından yönetilen, anormal bir lipojenik programın aracılık ettiği metastatik prostat kanserini desteklediği gösterilmiştir. Bu sonuçlar, kanser hücrelerinin içerisindeki lipidlerin, agresif PCa alt tiplerini destekleyen içsel bir sinyal sağlayabildiğini işaret etmektedir (6).

2.4. Lipid Damlacıkları

Lipid depolama organelleri olan lipid damlacıklarının (LD'ler) çoğu ökaryotik hücrelerde ve bazıları prokaryotlarda bulunur. LD'ler esas olarak sitoplazmada bulunur, ancak bazı hücre tiplerinde çekirdekte de bulunabilir. Bu organeller, esas olarak, triaçilgliserolleri (TG'ler) ve sterol esterleri (SE'ler) depolar (56). Tipik fosfolipid çift tabakası yerine, lipit damlacıkları, nötr lipitlerle dolu bir çekirdeği çevreleyen tek bir fosfolipit tabakası ile çevrilidir (57). Fosfolipid bileşenleri; fosfatidilkolin, fosfatidiletanolaminler, fosfatidilgliserol, fosfatidilinositol ve fosfatidilserin dahil olmak üzere birden fazla çeşite sahiptir. Farklı hücre türleri ve hatta aynı türden farklı hücreler, farklı metabolik durumlar altında farklı lipid damlacık boyutlarına, içeriğine, lipid bileşenlerine ve ilişkili protein türlerine sahiptir (58). Ayrıca, lipit damlacıklarının, sayısı, lokalizasyonu ve hücredeki hareketliliği, hücresel durumlara ve besin mevcudiyetine yanıt olarak hızla değişir. Örneğin, bir yağ asiti (FA) artışı, çoğu hücrede TAG sentezinin ve lipid damlacık biyogenezinin hızlı bir şekilde aktivasyonuna yol açar. Aksine, FA ve glukoz tükenmesi hücrede lipid damlacıklarının hızla yıkımına yol açar (59).



Şekil 2.12. Lipid damlacık yapısı (58).

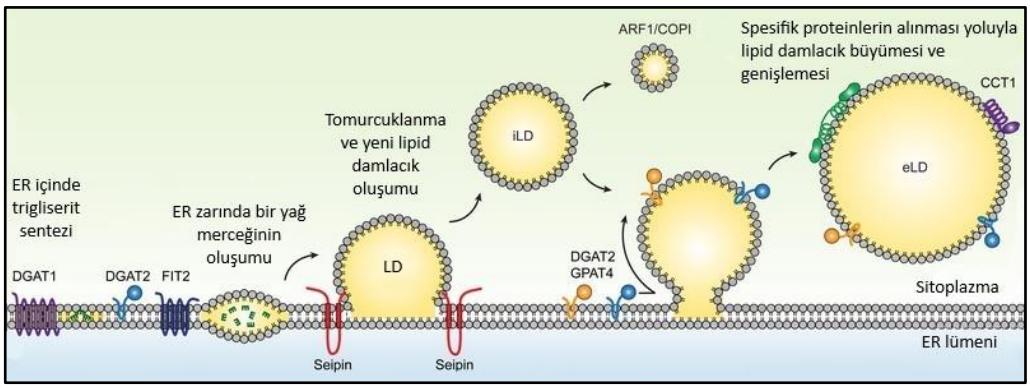
2.4.1. Lipid Damlacıklarının Biyogenezi

LD'lerin endoplazmik retikulumdan (ER) oluştuğuna dair güçlü kanıtlar vardır, bunun nasıl meydana geldiği ise net değildir (60). Ancak elektron mikroskobu ve hücre içi lipid damlacıklarının floresan görüntüleri, lipid damlacıklarının en sık endoplazmik retikulum (ER) ve mitokondri ile temas halinde olduğunu ortaya koymuştur. Şu anda ise hücre içi lipid damlacıklarının ER'de üretildiği kabul edilmektedir (58).

Lipid damlacıkları oluşumu, birden fazla adımı içerir. Lipid damlacık biyogenezindeki ilk adım, en yaygın olarak triaçilgliseroller ve sterol esterler olan nötr lipidlerin sentezidir. Bunlar, aktifleştirilmiş bir yağ asidinin sırasıyla diaçilgliserole veya bir sterole esterleştirilmesinden elde edilir. Sterol esterleri, açil-CoA:kolesterol O-açiltransferazlar (ACAT1 ve ACAT2; mayada Are1p ve Are2p) tarafından, triaçilgliseroller ise diaçilgliserol açiltransferazlar tarafından yapılır (DGAT1 ve DGAT2; mayada Dga1 ve Lro1). Nötr lipidler düşük konsantrasyonlarda, ER çift tabakasındaki lipidler arasında dağılır. Yeterince nötr lipid biriktiğinde, nötr lipitler birleşerek bir yağ merceği oluşturur. Lipid merceğin genişlemesi, ER zarından lipid damlacığının tomurcuklanmasına neden olur. Hücrelerde, lipid damlacık tomurcuklanması, evrimsel olarak korunmuş bir integral ER membran proteinleri

ailesi olan yağ depolamayı indükleyen transmembran (FIT) proteinleri tarafından kolaylaştırılır. Ayrıca perilipin proteinleri de damlacık oluşumunu kolaylaştırılır. Memelilerde, bu protein sınıfı, lipoliz yoluyla lipit damlacık tüketiminin düzenlenmesinde köklü işlevlere sahiptir (57).

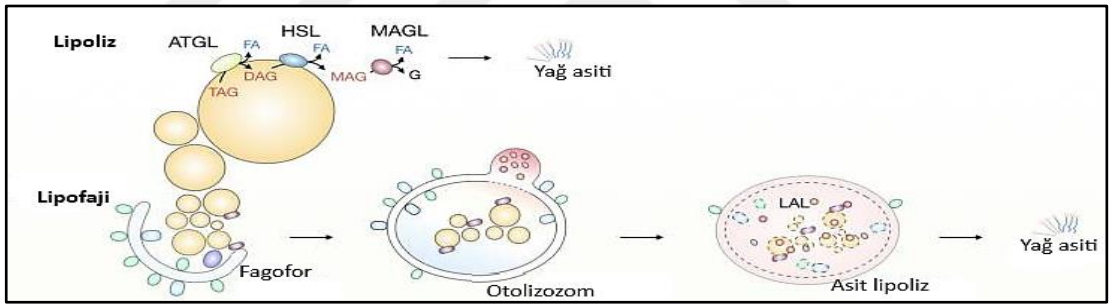
Tomurcuklanmadan sonra, lipid damlacıkları genişler, bu da triaçilgliserolün ER membran köprüleri yoluyla lipid damlacıklarına aktarılması veya doğrudan lipid damlacık yüzeyindeki triaçilgliserol sentezi yoluyla gerçekleşir (57). Genişleme sonucunda damlacık ve ER çift tabakası arasındaki temas açısında kademeli bir artış meydana gelir. Yeterli açı elde edildiğinde, damlacık ER zarından ayrılır. ER'den LD'lerin kesilmesinde proteinlerin yer alıp almadığı henüz belirlenmemiştir. İlk LD'ler (iLD'ler) oluşumundan dakikalar veya saatler sonra genişleyen LD'ler (eLD'ler) olarak adlandırılan bir LD alt popülasyonuna dönüştürülebilir. iLD'ler, ER'den oluşturulan 400-800 nm çapındaki LD'lerdir. eLD'ler, özel bir LD'ye dönüştürülen iLD'lerdir ve eLD'ler, lokalize TG sentezi ile karakterize edilir. Bu TG sentezi, ER'den LD'lerin yüzeylerine geçerek yer değiştiren GPAT4 ve DGAT2 gibi TG sentez yolunun spesifik izoformları tarafından katalize edilir. Bu yer değiştirme, LD yüzeyinin ER zarı arasındaki bağlantısını sağlayan zar köprüleri aracılığıyla gerçekleşir. Bir iLD'nin bir eLD'ye dönüşümünü neyin tetiklediği bilinmemektedir (56).



Şekil 2.13. Lipid damlacığı oluşumu ve büyümesi (56).

2.4.2. Lipid Damlacıklarının Katabolizması

Hücreler, lipid eksikliğine yol açan besin dengesizliklerine maruz kaldığında, temel işlemler için lipid sağlamak üzere lipid damlacık yıkımı aktive olur (59). LD'lerde depolanan nötr lipidler, lipoliz veya lipofaji olmak üzere iki yoldan biri ile parçalanır (61). Lipoliz, adipoz trigliserit lipazın (ATGL), hormona duyarlı lipazın (HSL) ve monoasilgliserol lipazın (MAGL) sıralı etkisiyle triaçilgliserollerden yağ asitlerini salınımını sağlar. Lipofaji ise, son zamanlarda keşfedilen seçici bir otofaji şeklidir. Bu yöntem ile, bütün lipid damlacıkları veya parçaları otofagosomal membranlar içinde yutulur ve hidrolitik enzimler tarafından bozunmak üzere lizozomlarla kaynaştırılır. Lizozomal TAG lipolizi, lizozomal asit lipaz (LAL) tarafından katalize edilir (62). Prensipte, lipoliz genellikle lipid damlacıklarının büzülmesine yol açarken, lipofaji, damlacık içindeki tüm lipidlerin ve proteinlerin temel yapı taşlarına tam olarak parçalanması için bir araç sağlar (59).



Şekil 2.14. Lipoliz ve lipofaji (62).

2.4.3. Lipit Damlacığının Kanser Hücreleri Üzerine Etkileri

İnsan tümörlerinde LD'lerin ilk raporları 1960'larda yazılmıştır. Ancak son on yılda, kanserde LD'lerin oluşumunu ve işlevlerini düzenleyen mekanizmaların aydınlatılmasında önemli gelişmeler olmuştur. LD'ler; başlama, çoğalma ve ilerleme dahil olmak üzere kanser gelişiminde yer alan tüm süreçlerde tanımlanmıştır (63). Bununla birlikte, artan lipid damlacık içeriğinin tümör agresifliği ve kemoterapi direnci ile ilişkili olduğunu gösteren kanıtlar vardır (8).

Çoğu hücre, lipitlerin aşırı sentezlenmesi sonucu meydana gelebilecek zararları önlemek amacıyla lipit damlacıklarının sentezini indükler. Lipid damlacık üretimini destekleyen hücresel durumların ortak bir özelliğinin, enerji metabolizması ve redoks homeostazında meydana gelen dengesizliklerdir. Bunlar, tam veya kısmi besin yoksunluğu, aşırı besin yükü, oksijen yoksunluğu, pro-oksidanlarla tedaviler, seramidler, kemoterapötik ajanlar ve endoplazmik retikulum (ER) stres indükleyicileri, asidik pH, otofaji gibi farklı stres faktörleri tarafından tetiklenir (8). LD'lerdeki bir artış, hücre büyümesi, çoğalma, metabolizma, göç, iltihaplanma ve bağışıklık gibi başlıca kanser özelliklerini etkileyebilir (64).

Lipid damlacıkları, kanser hücrelerinin metabolizmalarını yeniden programlamasında görev alabilirler. Çoğu normal hücre, yeni yapısal lipidlerin sentezi için tercihen hücre dışı lipidleri kullanırken, kanser hücreleri, lipid gereksinimlerini karşılamak veya lipitten fakir bir mikroçevrede proliferasyonu sürdürmek için hücre dışı lipidlerin seviyelerinden bağımsız olarak de novo FA sentezini yükseltebilir. Yani kanser hücreleri, FA sentezinin inhibisyonuna karşı dirençlidir (8). Hipoksiye ve besin yoksunluğuna maruz kalan kanser hücrelerinde lipogenez bloke edilir ve hücreler, hemen mikroçevrelerinden lipid alımına geçerler. Kanser hücreleri tümörle ilişkili adipositler dahil olmak üzere komşu hücrelerle simbiyotik ilişkilere girerek enerji üretimi için gerekli FA'ları sağlar. Ayrıca, son araştırmalar, membran fosfolipid hidrolizi (örneğin, fosfolipazlar A2 ile), organellerin otofajik bozunması ve sitozolik lipid damlacıkları içinde depolanan nötr lipidlerin parçalanması dahil olmak üzere çeşitli olası yollarla kendi yapısal ve depolama havuzlarından lipidlerin elde edilebileceğini göstermiştir. Lipid edinmedeki bu yolların tümü olmasa da çoğu lipid damlacığında birleşir. Lipid damlacıkları hem lipidlerin alınmasını hem de bunların hücresel ihtiyaçlara bağlı olarak kullanımını kontrol eder (59).

Ayrıca adipoz olmayan dokularda LD üretimindeki ortak nokta, aşırı serbest yağ asitleri, besin yoksunluğu veya redoks dengesizlikleri gibi hücresel stresler tarafından tetiklenmesidir. Bu yüzden damlacıklar genellikle stres azaltma işlevi görür (61). Örneğin, yağ asitleri veya steroller gibi basit lipitler ER'de aşırı biriktiğinde, daha durağan nötr lipitlere dönüştürülerek LD'lerde depolanır. Böylece lipid damlacıklarının üretimi, aşırı lipidlerin neden olduğu hücresel lipid toksisitesini azaltarak hücre homeostazının korunmasını sağlamış olur. Bazı araştırmalar lipid

damlacıklarının hücreleri ROS kaynaklı hücre hasarından koruyabildiğini göstermiştir. (ROS, moleküler oksijen ve serbest radikallerden türetilen bir molekül sınıfını ifade eder.) ROS eşleşmemiş bir elektron içerdiğinden, diğer elektron çiftleriyle hızla reaksiyona girerek güçlü bir oksitleyici görevi görürler. Hücrelerdeki ROS esas olarak yağ asidi oksidasyonunun bir yan ürünü olarak mitokondriden üretilir, esas olarak sitoplazmada hidrojen peroksit formundadır. Ayrıca ROS hücre zarı üzerindeki fosfolipid zarları oksitleyerek 4-hidroksinonenal (HNE) (protein hasarına neden olan bir lipit oksidasyon ürünü) içeriğini artırabilir. 4-HNE hücre hasarına neden olur. Bu süreçte, lipid damlacıkları, membranların oksitlenmiş lipidlerini yeniden dağıtabilir, böylece hücre zarının oksitlenmiş lipid içeriğini azaltır ve 4-HNE seviyesini azaltarak hücrenin sağ kalımını uzatır (58).

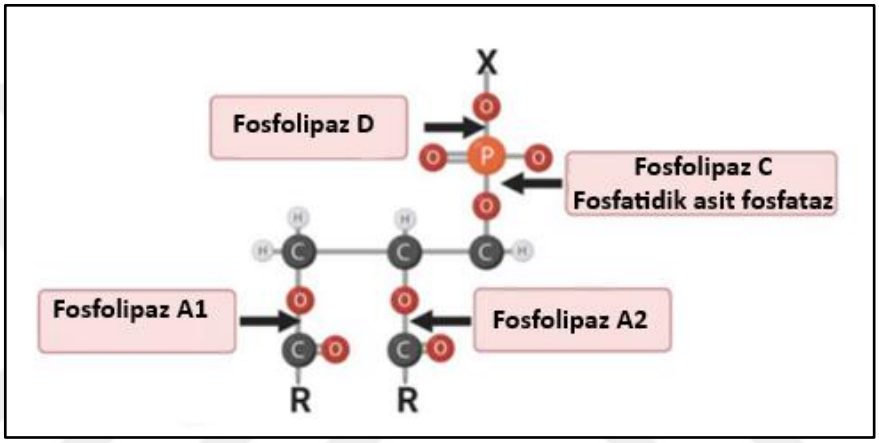
İnflamasyon ve kanserde, LD'ler, eikosanoid ve diğer lipid aracı oluşumunda büyük rollere sahip özel sinyalleşme merkezleri olarak hareket ederek bağışıklık ve iltihaplanma tepkilerinin düzenlenmesinde görev alır. Tümör hücrelerinde, LD'ler, önemli bir bağışıklık baskılayıcı eikosanoid olan PGE2 (prostaglandin E2) sentezi bölgeleridir (63). Lipid damlacıklarında siklooksijenaz (COX)-2'nin (PGE2 sentezinde anahtar bir enzim) toplandığı ve bunun da PGE2 sentezine yol açtığı bulunmuştur. PGE2, tümör hücresi çoğalmasını ve göçünü destekleyebildiği için tümör büyümesini teşvik etmede önemli rol oynar. Ek olarak, lipid damlacıkları hücrelerde kalretikülinleri (CRT'ler) izole edebilir. CRT, olgunlaşmamış dendritik hücrelerin olgunlaşması için önemlidir. Lipid damlacıkları CRT'leri yüzeyinde toplayarak tümör hücrelerinin CRT'ye maruz kalmayı engeller. Böylece tümör hücrelerinin immünojenisitesini azaltabilir, kemoterapi ilaçlarının terapötik etkilerini bozabilir (58).

Lipid damlacıkları mitokondri ile temas halinde olabilir ve BAX, BCL-2 ve BCL-Xl gibi apoptozla ilişkili proteinleri mitokondri yüzeyinden damlacık yüzeyine aktarabilir. Bu süreç mitokondriyal hasarı önleyebilir ve apoptozu engelleyebilir. Özetle, kanser hücrelerinde lipit metabolizmasının yeniden düzenlenmesi, ilaca bağlı apoptozu inhibe ederek ilaçların terapötik etkisini bozabilecek lipit damlacık birikimini indükler. Lipid damlacıkları, kanser hücrelerinin çoğalması için lipit substratlarını ve enerji sağlar; bu nedenle lipit damlacık birikimi kanser tedavisi için bir dezavantaj oluşturmaktadır (58).

2.5. Lipid Damlacığı Oluşumu ile İlgili Genler

2.5.1. Fosfolipaz A2 Grup 7 (PLA2G7)

Fosfolipazlar, fosfolipitleri parçalayan enzim grubudur. Her bir fosfolipaz ailesi, bir fosfolipid veya fosfolipid ailesi üzerindeki bir bölgeyi parçalar. Fosfolipaz A (PLA), gliserol omurgalarının sn-1 (PLA1) veya sn-2 (PLA2) konumunda ki yağ asidi esterlerini hidrolize ederek serbest yağ asitlerini oluşturur. (65).



Şekil 2.15. Fosfolipidler üzerindeki fosfolipaz enzimatik bölgelerinin gösterimi (65).

Fosfolipaz A2 (PLA2), fosfolipidlerin gliserol omurgasının sn-2 pozisyonundaki ester bağını hidrolize ederek yağ asitleri ve lizofosfolipidler üreten enzimdir (66). PLA2'ler; salgılanan sPLA2'ler, sitozolik cPLA2'ler, kalsiyumdan bağımsız iPLA2'ler ve trombosit aktive edici faktör (PAF) asetil hidrolaz/oksitlenmiş lipoprotein ile ilişkili (Lp)PLA2'ler olmak üzere dört ana kategoride toplanırlar (67).

PLA2'nin lipid damlacıkları ile ilişkisi

Çeşitli PLA2 formları LD'lerin biyogenezinin kritik düzenleyicileri olarak görev yapmaktadır. PLA2'ler;

1- Nötr lipidlerin sentezi için membran fosfolipidlerinden serbest yağ asitleri sağlayıcıları olarak hareket edebilir.

2- Fosfolipid içeren parçacıkları değiştirerek hücreler tarafından alımını kolaylaştırabilir.

3- LD oluşumunu kontrol edebilen metabolit üreticileri olarak görev yapabilir.

4- Organel oluşumunun doğrudan düzenleyicileri olarak görev yapabilirler (68).

Çeşitli hücresel PLA2'ler, LD sentezi için ihtiyaç duyulan serbest yağ asitleri havuzunun oluşturulmasına katkıda bulunur. Ayrıca deasilasyon/reasilasyon reaksiyonları yoluyla LD genişleme süreçlerinde görev alan PLA2 formlarının olduğuna dair çalışmalar bulunmaktadır. Son çalışmalar, fosforilasyon yoluyla cPLA 2 α aktivasyonunun LD oluşumu için gerekli olduğunu öne sürmektedir (68).

PLA2G7; lipoprotein ile ilişkili fosfolipaz A2 (LpPLA2) veya trombosit aktive edici faktör (PAF) asetilhidrolaz (PAF-AH) olarak isimlendirilen 45 kDa'lık monomerik bir proteindir (65-69). Bu enzim, trombosit aktive edici faktörünü (PAF) hidrolize ve inaktive etme yeteneğinin olmasını nedeniyle trombosit aktive edici faktör asetil hidrolaz olarak adlandırılmıştır (65). Ayrıca enzimin üçte ikisinin LDL'lere bağlı olarak plazmada dolaşması, kalan kısmının ise HDL'ler ve diğer lipoproteinlerle ilişkili olması nedeniyle lipoproteinlerle ilişkili fosfalipaz A2 (LpPLA2) olarak adlandırılmıştır (70). Bu enzimi diğer fosfalipaz A2 üyelerinden ayıran özellikler; enzimatik aktivitesi için kalsiyum gerektirmemesi ve suda çözünür fosfolipidlerin oksidatif olarak kesilmiş sn-2 asil zincirini tercihen hidrolize etmesidir (69).

Lp-PLA2, özellikle serbest yağ asitleri tarafından üretilen hidrolitik ürünlerin, arter duvarında oksitlenmiş LDL tarafından lipid damlacık oluşumu için bir itici güç sağladığı öne sürülmektedir (71). Lp-PLA2'nin, LDL'de oksitlenmiş fosfolipidleri hidrolize etme aktivitesi ve aterogenezi indükleyen PAF'ı parçalama işlevi nedeniyle başlangıçta ateroprotektif rol oynadığı öne sürülmüştür. Lp-PLA2'de işlev kaybı, kardiyovasküler hastalıkta bir artış ile ilişkilendirilmiştir. Şu anda, Lp-PLA2, kardiyovasküler hastalığın bir belirteci olarak kabul edilmektedir (65). (Ateroskleroz, makrofajların arter duvarında tutulması ve lipoprotein türevli nötr lipidlerin LD'ler şeklinde hücre içi birikimi nedeniyle köpük hücrelere dönüşmesi ile karakterize edilir) (68).

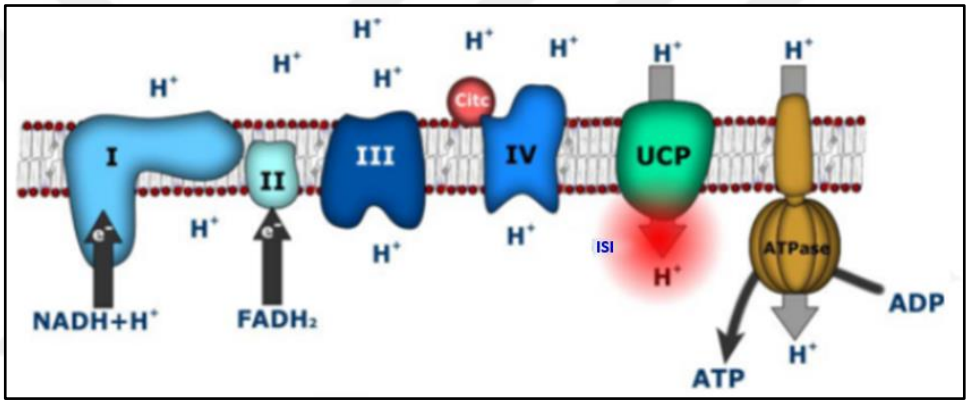
PLA2G7'nin son zamanlarda özellikle yüksek ERG ekspresyonu olan tümörlerde yüksek oranda eksprese edildiği bulunmuştur. Ayrıca PLA2G7 susturma işleminin prostat kanseri hücrelerini oksidatif strese karşı duyarlı hale getirdiği, tümörijenik potansiyeli ve proliferasyonu azalttığı, apoptozu indüklediği ve ayrıca kanser hücresi göçünü engellediği gösterilmiştir. Bu enzimin deneysel modellerde anti-inflamatuar etkiler gösterdiği belirtilmiş olmasına rağmen, aynı zamanda apoptozu indükleyen okside fosfolipidleri degrade ettiği ve eş zamanlı olarak aterojenik inflamatuar ürünler ürettiği de gösterilmiştir. Ek olarak, lipid düşürücü statinlerin, plazma ve aterosklerotik plaklardaki PLA2G7 kütlesini ve aktivitesini azalttığı bilinmektedir (72).

PLA2G7 ekspresyonunu özellikle metastatik meme kanserinde hormon reseptör negatifliği ve kötü prognoz ile ilişkilendirmektedir. Meme kanserinde epitel-mezenkimal geçiş (EMT) düzenlenmesindeki rolünün yanı sıra metastaz ve invazyonu desteklediğini gösterilmiştir. Ayrıca PLA2G7 ekspresyonunun inhibisyonu, vimentin ekspresyonunun azalmasına, E-cadherin ekspresyonunun artmasına ve hücre istilasının azalmasına neden olmuştur (73).

2.5.2. Uncoupling Protein 2 (UCP2)

Uncoupling proteinler (UCPs), mitokondriyal iç membranda bulunan SLC25 (The solute carrier family 25) taşıyıcı ailesine ait proteinlerdir (74). Mitokondrinin birincil işlevi, elektron taşıma zinciri (ETC) tarafından yapılan iç mitokondriyal zar boyunca elektron-proton gradyanını kullanarak ATP üretmektir (75). Kısaca, karbonhidratlar, lipidler ve proteinler gibi indirgenmiş besin moleküllerinin hücresel metabolizma yoluyla oksidasyonu sonucu, indirgenmiş hidrojen taşıyıcıları NADH+ ve FADH2 formunda elektronlar verir. Bu indirgenmiş kofaktörler, ETC'de iç mitokondriyal membrana gömülü bir dizi protein kompleksine elektronlarını aktarır. Elektron taşıma zinciri (ETC), ATP sentaz ile birlikte iç mitokondriyal membrana gömülü dört büyük çok alt birimli enzim kompleksine sahiptir (76). Elektronlar, moleküler oksijenin kompleks IV'te (sitokrom c oksidaz) suya indirgenebilmesi için kompleksler boyunca geçirilir. Bu kompleksler, elektron taşınmasından salınan enerjiyi kullanarak bir elektrokimyasal gradyan oluşturur. Mitchell'in teorisine göre,

bu yüksek düzeyde ekzergonik reaksiyonlar dizisi, iç zar boyunca bir elektrokimyasal gradyan oluşturmak için protonların mitokondriyal matristen zarlar arası boşluğa doğru yer değiştirmesi için enerji sağlar. Proton-hareket kuvveti olarak da adlandırılan bu mitokondriyal membran potansiyeli (ΔΨm), F0F1 ATP sentaz tarafından, protonların mitokondriyal matrise dönüşü yoluyla ADP'yi fosforile etmek için kullanılır (77). Bu nedenle mitokondriler, farklı enerji biçimleri arasındaki dönüşümleri düzenleyen, aerobik solunumu fosforilasyona bağlayan son derece özel makinelerdir (76). Uncoupling proteinleri, ATP üretiminden oksidatif fosforilasyonu ayırma işlevi gören mitokondriyal iç zar proteinleridir (75). Böylece oksidasyon enerjisini ısı şeklinde yayarlar (76).

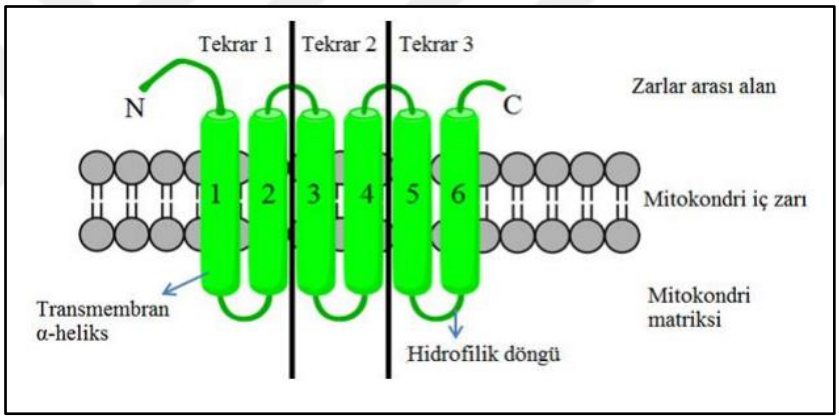


Şekil 2.16. Mitokondriyal oksidatif fosforilasyon sistemi ve Uncoupling protein (76).

UCP ailesinin beş üyesi (UCP1-5) vardır. Bunlardan UCP1, kahverengi yağ dokusunda tanımlandı ve keşfedildi. Genel olarak kış uykusuna yatanlarda, küçük memelilerde ve bebeklerde doğumda mevcut olduğu kanıtlanmıştır, ancak son kanıtlar yetişkin insanlarda da varlığını ve aktivitesini önermiştir (76). UCP1, mitokondriyal membran potansiyelinin ısıya dönüştürülmesine izin veren bir proton taşıyıcıdır. UCP1'in bir homologu olan UCP2 cilt, beyin, karaciğer ve böbrek dahil olmak üzere vücuttaki birçok organ ve dokuda eksprese edilir. UCP2, mitokondride reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu baskıladığı için bir antioksidan olarak da kabul edilir. UCP3 iskelet kası ve kalpte dağılır, iskelet kası solunumunun düzenlenmesine katılır. UCP4 ve UCP5 esas olarak beyinde bulunur ve enerji homeostazında ve nöroproteksiyonda (nöron korunması) önemli roller oynar. UCP1 vücutta büyük

miktarlarda bulunurken diğer UCP'ler ise çok daha küçük miktarlarda bulunur. UCP'ler yağ asitleri tarafından aktive edildiğinde net proton iletkenliğini katalize edebilir. UCP2 ve UCP3 protonların yanı sıra anyonları da mitokondriyal iç zar boyunca taşıyabilir (74).

Genel olarak UCP'lerin kristal yapıya sahip olduğu ve mitokondri iç zarında bulunan ADP/ATP taşıyıcı proteinler ile benzer bir yapıya sahip olduğu düşünülmektedir. UCP'lerin her biri yaklaşık olarak 100 aminoasitten oluşan üç tekrarlı bir yapıya sahiptir. Her bir tekrar transmembran α-heliksi oluşturan iki hidrofobik bölge içerir. Tekrarları oluşturan α-heliksler, mitokondrinin iç zarından matriks tarafına doğru yönlendirilmiş uzun bir hidrofilik döngü ile birbirine bağlanır (Şekil 2.25) (78).



Şekil 2.17. UCP'lerin yapısının şematik olarak gösterimi (78).

Uncoupling protein 2 (UCP2) geni sıçanlarda 1. kromozomda, farelerde 7. kromozomda ve insanlarda 11. kromozomda bulunur (74). UCP2, hücre proliferasyonundaki değişikliklerle sıkı bir şekilde ilişkili olan bir mitokondriyal taşıyıcıdır ve bu nedenle karsinojenez ile ilişkili mitokondriyal olayların kaskadında çok önemli bir oyuncudur (79). UCP2, UCP1 ile %59 özdeşliğe sahiptir. UCP1 ile homolojileri ve çeşitli memeli dokularındaki dağılımları nedeniyle, başlangıçta UCP2'nin de termojenik olduğu varsayılmıştır (76). Ek olarak, UCP2 çok kararsızdır ve alışılmadık derecede kısa bir yarı ömre (30 dakika) sahiptir. UCP2'nin birincil fizyolojik işlevi redoks düzenlemesi, ROS işleme ve bağışıklıktır. Ayrıca UCP2'nin lipid ve yağ asidi metabolizmasında, glukoz metabolizmasında ve TCA döngüsü

metabolitlerinin taşınmasında rolü vardır (80). Yaygın olarak ifade edilen UCP2'nin, bir dizi agresif insan kanserinde upregüle olduğu ve kanserin başlaması, ilerlemesi ve metabolik yeniden programlamasında önemli roller aldığı da gösterilmiştir (81).

UCP sistemi, mitokondride ROS üretimini azaltmak için akut ve enerjik olarak maliyetli bir mekanizmayı temsil eder. Hücresel antioksidan sistemler, aşırı üretilen ROS'u sekestre eden veya aerobik solunum yoluyla üretimini önleyen geniş bir enzim seti ve düşük moleküler ağırlıklı bileşikleri içerir. Bazı antioksidan sistemler hem ATP hem de NADPH kullanımına bağımlı olduklarından enerji açısından pahalı olabilmektedir. UCP'ler sayesinde oksidatif fosforilasyonun ayrılması, protonların zarlar arası boşluktan matrise taşınmasının ATP sentazı atlayarak aşağıdakilerin azalmasına neden olduğu bir kısa devreyi oluşturur: (a) mitokondriyal iç zar potansiyeli; (b) ETC'den elektron sızıntısı; (c) ROS üretimi. Membran potansiyelindeki küçük artışlar ROS oluşumunu indüklerken, hafif düşüşler oksidatif fosforilasyonun etkinliğini büyük ölçüde düşürmeden üretimlerini önemli ölçüde azaltabilir. Bu nedenle, mitokondriyal oksidatif fosforilasyonun hafif ayrışması, oksidatif strese karşı ilk savunma hattını temsil edebilir. Bu modele göre, UCP2 proton hareket kuvvetinin aşırı olmasını önlemek için proton gradyanını dağıtabilir, böylece elektron taşınması tarafından üretilen ROS'u azaltabilir. Bu nedenle, UCP2 mitokondriyal oksidatif stresin bir sensörü olarak görev yapar ve genellikle mitokondriyal ROS üretimini kontrol eden ve redoksa duyarlı sitozolik sinyal yollarını düzenleyen sito-koruyucu faaliyetlerde yer alan yerel geri bildirim mekanizmalarının önemli bir bileşenini oluşturur (82).

UCP2, Warburg fenotipine katkıda bulunarak doğrudan bir metabolik düzenleyici olarak görev yapar. UCP2'nin, mitokondriden piruvat akışını destekleyen, mitokondriyal solunumu kısıtlayan ve kanser hücrelerinde glikoliz oranını artıran piruvat için bir uniporter olarak işlev gördüğü öne sürülmüştür. Ayrıca, UCP2, solunum yapan hücrelerin iç mitokondriyal membranında bulunan hem elektriksel potansiyel (içeride negatif) hem de pH gradyanı (dışarıda asidik) tarafından uyarılan H^+ destekli bir mekanizma ile sitozolik fosfat için intramitokondriyal C4 metabolitlerinin değişimini katalize eder. Özellikle, oksaloasetat ve ilgili C4 bileşiklerini mitokondriden alarak, asetil-CoA üreten substratların oksidasyonunu Krebs döngüsü yoluyla negatif olarak kontrol eder. Böylece mitokondriyal solunum

zinciri üzerindeki redoks basıncını, ATP:ADP oranını ve ROS üretimini düşürür (82). Yani UCP2'nin aşırı ekspresyonu, glikolitik ve oksidatif enzimlerin ekspresyonunu değiştiren ve artan oksidatif fosforilasyona yol açan bir mitokondriyal retrograd (geriye giden) sinyali üretir. Esteves ve arkadaşlarının yaptığı çalışmarlarda, UCP2 yoluyla mitokondriyal fonksiyonu hedeflemenin, yeniden programlamayı tersine çevirebileceğini ve daha az glikolize, daha yüksek oksidatif fosforilasyon kapasitesine ve daha da önemlisi, daha düşük hücre proliferasyon hızına ve tümörijeniteye dönüşe yol açabileceği gösterilmiştir (83).

Ayrıca UCP2 işlevinin, mitokondri içinde çok fazla yağ asidi olduğunda, yağ asidi anyonlarını mitokondriyal matrisin dışına ihraç etmek olduğu öne sürülmüştür. Yağ asitlerinin mitokondriden bu şekilde taşınması, bir yandan mitokondriyi aşırı miktardaki yağ asidi anyonlarının toksik etkisinden korurken, diğer yandan bu yağ asitlerinin sitozolik açil-CoA sentetazları tarafından yeniden etkinleştirilmesini sağlar, devam eden hızlı yağ asidi oksidasyonuna izin vererek mitokondriyal hasarı önler (76). Daha yeni veriler, UCP2'nin glikoz kullanımı yerine yağ asidi metabolizmasını teşvik edilmesini sağlayan bir metabolik anahtar olarak işlev gördüğünü ileri sürmektedir. UCP2'nin genetik ablasyonunun, mitokondriyal yağ asidi oksidasyonunun azalmasına ve glikoz metabolizmasının artmasına neden olduğu gösterilmiştir. Bu, UCP2'nin açlık sırasında karbonhidrattan lipid bazlı metabolizmaya geçişi teşvik ederek lipid metabolizmasında rol oynadığını gösteren verilerle uyumludur (10).

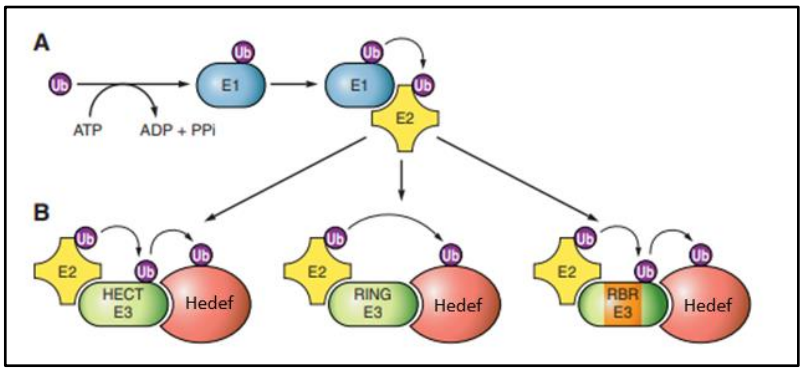
UCP2, enerji metabolizmasını düzenlemek için gıdalardaki doymamış yağ asitlerine duyarlıdır. Kısaca, anyon taşıyıcı UCP2'nin aktivasyonu için serbest yağ asitleri gereklidir. Ek olarak, UCP2'nin aktivitesi; ROS, serbest yağ asitleri, pürin nükleotidleri, koenzim Q, vb. dahil olmak üzere çeşitli faktörler tarafından da düzenlenebilir (74). Çeşitli fizyolojik ve patolojik durumların da (yüksek yağlı diyet, stres, egzersiz, obezite ve diyabet gibi) UCP2 ekspresyonunu ve aktivitesini düzenlediği bilinmektedir (80).

Normal hücreler, lipid alımını, sentezini ve parçalanmasını düzenleyerek hücre içi lipid seviyelerini düzenleyebilirken, kanser hücreleri artan enerji ihtiyacına bağlı olarak daha fazla lipid alabilir ve lipid sentezini artırabilir. Ek olarak, normal hücreler

FASN (yağ asidi sentazın) ekspresyonunu düşük seviyelerde tutmak için tercihen ekzojen yağ asitlerini alırken, kanser hücrelerinde FASN ekspresyon seviyeleri yüksektir ve aşırı aktiftir, bu da lipit sentezini arttırır ve lipit damlacıklarının birikmesine yol açar (58). Yapılan çalışmalarda UCP2 eksikliği olan makrofajlarda, lipid sentezinin inhibisyonu, yağ asidi sentezinin ana düzenleyicisi olan FASN aşağı regülasyonundan kaynaklandığı gösterilmiştir (84).

2.5.3. Nöral Öncü Hücre Gelişimsel Olarak Aşağı Regüle Edilmiş 4 Benzeri (NEDD4L)

NEDD4L; gelişimsel olarak aşağı regüle edilmiş 4 benzeri ifade edilen nöral öncü hücredir. NEDD4–2 olarak da bilinir (85). Substrat ubikitinasyonunu ve protein bozulmasını düzenleyerek çoklu hücresel prosedürlere katıldığı bildirilen bir E3 ubikitin ligazdır. Ubikitinasyon, translasyon sonrası proteinleri spesifik olarak değiştiren ve substrat degradasyonu, stabilizasyonu veya yer değiştirmesi ile sonuçlanan biyolojik bir süreçtir (86). Protein ubikitinasyonu genellikle üç enzimin sıralı aktivitesi ile katalize edilir: ubikitin aktivasyon enzimi (E1), ubikitin konjugasyon enzimleri (E2s) ve ubikitin ligazları (E3s) (87). Ubikitinasyon, ubikitin aktive edici enzim (E1) tarafından enerjiye bağlı bir şekilde ubikitinin aktivasyonu ile başlar. Aktive edilmiş ubikitin daha sonra ubikitin konjuge enzime (E2) aktarılır. Son adımda ise, ubikitin ligazı (E3), ubikitinin hedef substrata transferini katalize eder (88). E3'lerin bu süreçte substrat özgüllüğünü kontrol ettiği iyi bilinmektedir. E3 ubikitin ligazları, hücresel düzenlemede önemlidir, çünkü E3'ler, modifikasyon için bir substratı spesifik olarak tanır (87). Bugüne kadar, insan genomunda sadece bir E1 proteini, 36 adet E2 proteini ve esas olarak üç kategoriye ayrılan 600'den fazla E3 bulunmuştur (85-86). E3 kategorileri şu şekildedir; gerçekten ilginç yeni gen (RING) parmak ailesi E3'ler, RING-arasında-RING (RBR) ailesi E3'ler ve E6-AP C-terminali (HECT) ailesi E3'lerdir. HECT ailesi E3'lerin en tanıdık ve incelenen grubu ise NEDD4 ailesidir (86). HECT E3'ler, ubikitini önce bir katalitik sistein kalıntısı üzerine aktarır daha sonra substrata aktarır. RING E3'ler ubikitinin doğrudan E2'den substrata transferini sağlar. RBR E3'ler ise bir RING alanı yoluyla E2'leri bağlamaları bakımından RING/HECT hibritleri gibi işlev görür ve ubikitini substrata aktarmadan önce RING2 alanlarındaki bir katalitik sisteine aktarırlar (88).

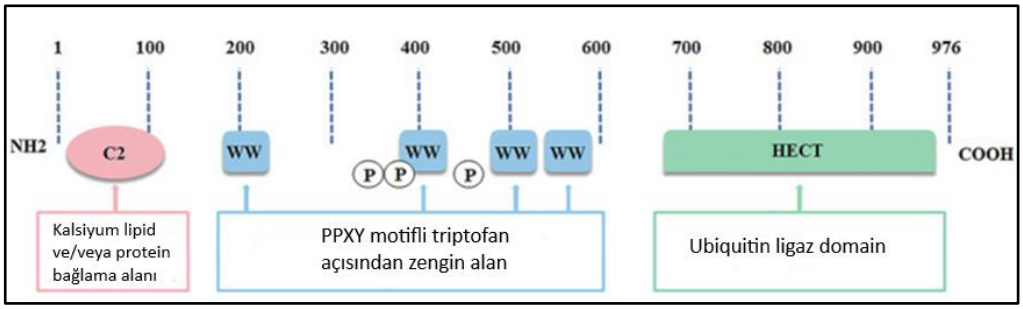


Şekil 2.18. Ubikitinasyon kaskadı (88).

İnsan NEDD4L'si 18q21.31 kromozomunda bulunur ve 41 ekzona sahiptir (86). Üç fonksiyonel alana sahiptir;

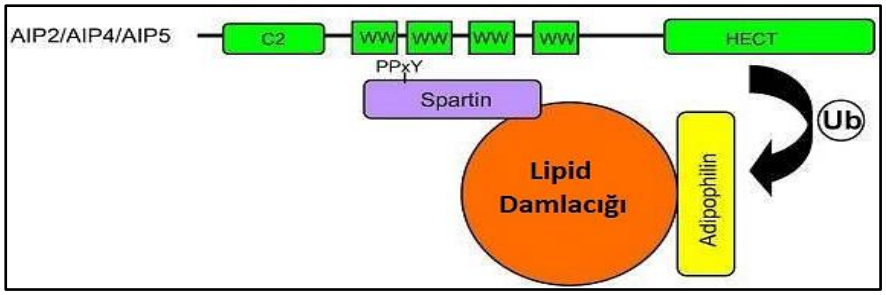
1. N-terminal C2 alanı,
2. WW alanlarını içeren bir merkezi bölge
3. C terminal HECT alanı (87).

C2 alanının, uzunluğu yaklaşık 120 aminosittir. Başlıca işlevi, Ca^{2+} bağlanmasıdır. WW alanları, 21 aminoasit aralıklı, iki korunmuş triptofan (W) kalıntısı içeren, 35-40 amino asit uzunluğundaki alanlardır. Substrat proteinlerindeki PY(PPXY) motifleri veya fosfo-serin/treonin kalıntıları ile etkileşime girer. Başlıca işlevi ise, NEDD4L'nin belirli substratlarını ayırt etmektir. HECT alanı -350 kalıntıdan oluşur ve korunmuş bir sistein kalıntısından bir substrat proteinindeki bir lizin kalıntısına ubikitin transferinden sorumludur (Şekil 2.27) (86-87). C2 alanı ve HECT alanı, normal koşullarda kendi etkinliklerini kontrol etmek için birbirlerini sınırlar. Bu denge durumu, hücre içi Ca^{2+} C2 alanına bağlandığında bozulur, böylece NEDD4L'nin ubikitin ligaz aktivitesini uyarır ve ardından onu plazma zarına alır (86).



Şekil 2.19. NEDD4L yapısı (86).

HECT ubikitin ligazların WWP1'ine bağlanan proteinler içinde yapılan taramalarda, SPG20 olarak da bilinen Spartin proteini tanımlanmıştır. SPG20'deki bir PPxY alanı ve HECT ligazlarındaki WW alanlarına bağlanır. WWP1'in SPG20'ye bağlanmasıyla, ubikitin SPG20'ye transfer olmaktadır. Ek olarak, WWP1 aşırı ekspresyonunun hücrelerde birlikte eksprese edilen SPG20 seviyelerini azalttığını gösterilmiştir. HECT ubikitin ligazlarının, ubikitination yoluyla SPG20 lokalizasyonunu ve/veya protein seviyelerini kontrol etmesi ve bu nedenle LD protein bileşimini ve devrini etkilemesi muhtemeldir. Özellikle, HeLa, 293T ve SH-SY5Y nöroblastom hücreleri dahil olmak üzere çeşitli hücre dizilerinde LD'ler üzerinde bir lokalizasyona sahiptir (89).



Şekil 2.20. Spartin, lipid damlacıkları ile birleşimi ve bir HECT E3 enzimi olan AIP4 aracılığıyla ubikitin ligazı (11).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

Çalışmada kullanılan İnsan Prostat Karsinom Hücre hatları Pc-3 hücre hattı Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesinden ve DU145 hücre hattı Yeditepe Üniversitesin'den temin edilmiştir.

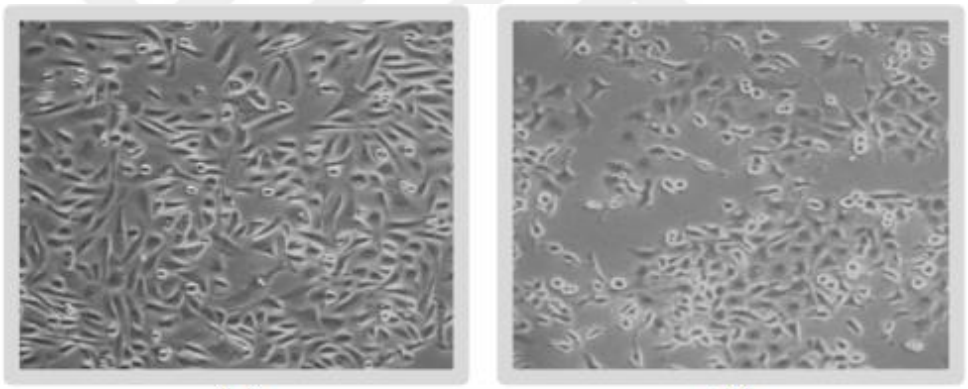
Prostat karsinom hücre hatlarının (PC-3, DU-145) besi ortamı; High Glucose Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM, Diagnovum, D823), Fetal Bovin Serum (FBS, sıcaklık inaktif, Capricorn, CP17-1756), penisilin-streptomisin (Capricorn, CP17- 1828) ve non-esansiyel aminoasit (L-glutamin)(Biowest, MS00LD2019) kullanılarak hazırlanmıştır.

Hücrelerin pasajlanma ve dondurma işlemleri için Fosfat Tamponlu Tuz (PBS) (Gibco, 1720774), Tripsin-EDTA (Gibco, 25200-056) ve dimetil sülfoksit (DMSO, Fisher Chemical, 1414511) kullanılmıştır.

Bu çalışmada lipid damlacık oluşumu ile ilişkili genler olan NEDD4L, UCP2 ve PLA2G7 genlerinin ekspresyon seviyelerine bakmak için Human NEDD4L ELISA kit (ShanghaiCoon Koon Biotech Co., Ltd., 20522), Human UCP2 ELISA kit (ShanghaiCoon Koon Biotech Co., Ltd., 13901) ve Human Lipoprotein-associated phospholipase A2 (Lp-PLA2) ELISA kiti (ShanghaiCoon Koon Biotech Co., Ltd., 12314) kullanılmıştır.

3.1.2. Prostat Kanseri Hücre Hatlarının Özellikleri

Bu çalışmada kullanılan PC3, 62 yaşında bir erkekten alınan 4. derece prostat adenokarsinomunun kemik metastazından elde edilen bir hücre dizisidir (90). PC3, normal prostat epitel hücreleri ile karşılaştırıldığında androjenlere, glukokortikoidlere veya epidermal veya fibroblast büyüme faktörlerine yanıt vermez. Genel olarak, Pc-3'ün fonksiyonel ve morfolojik özellikleri, kötü diferansiye sahip adenokarsinomun özellikleridir (91). DU145 ise, prostat kanserli 69 yaşındaki bir erkeğin beyin metastazından elde edilmiş epitel morfolojisine sahip bir hücre dizisidir (92). Her iki hücre hattı da kültür kabının tabanına yapışan özelliktedir. Transfeksiyon için uygun olup tümörjenik bir özellik gösterirler (91-92). İki hücre hattı da buhar fazındaki sıvı azotta dondurularak saklanmaktadır PC3 hücreleri yüksek oranda metastatik özelliğe sahipken, DU145 orta seviyede metastatik özelliğe sahiptir (93).



Şekil 3.1. (a) PC3 ve **(b)** DU145 hücre hatlarının ışık mikroskobundaki görüntüleri (20X) (90, 92).

3.1.3. Kullanılan Aletler ve Cihazlar

Çalışmada kullanılan alet ve cihazlar Tablo 3.1'de gösterilmektedir.

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan alet ve cihazlar

Cihaz Adı	Marka
Buzdolabı (+4 C˚)	Klimasan
Dondurucu (-20 C˚)	Uğur
Dondurucu (-80 C˚)	Haier
Azot Tankı	Thermo
Otomatik Pipetler	Eppendorf
Inverted Mikroskop	Euromex
Laminar Flow Kabin	TelStar
İnkübatör	Panasonic
Su Banyosu	Memmert
Santrifüj	Hettich
Spektrofotometre-Elisa Okuyucu	BioTek

3.2. Yöntem

3.2.1. Hücre Kültürü

Hücre Besiyeri Hazırlama

İnsan prostat kanseri hücre hatları olan PC3, DU145; %10 FBS, %1 Penicillin-Streptomycin, %1 nonesansiyel aminoasit (L-Glutamin) içeren yüksek glukozlu DMEM besiyeri (medium) kullanılarak hazırlanan besi ortamında çoğaltılmıştır. Hazırlanmış olan besiyeri +4°C sıcaklıkta muhafaza edilmiştir.

Hücre Ekimi

Hücreler ekim işlemleri öncesinde azot tankından çıkarılıp su banyosunda 37 C°'de çözdürülmüştür. Çözülmüş olan hücreler 50 mL'lik steril falkonda toplanarak üzerine 7 mL medium eklenip 200 g'de 7 dakika (dk) santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılmıştır. Peletin üzerine, pipetle dikkatli bir şekilde 9 mL

besiyeri eklenip hücrelerin homojenize olmaları sağlanmıştır. Hücre sayısına bağlı olarak 75 cm^2 (T75) boyutundaki flasklara ekilip son hacim besiyeri ile 10 mL'ye tamamlanmıştır. 37 C° ve % 5 CO_2 koşullarında inkübe edilmiştir.

Besiyeri Değişimi

Flasklara ekilmiş hücrelerin Invert mikroskop ile hücre yoğunluğu kontrol edilmiştir. Hücrelerin canlılıklarını koruyabilmesi için her 2 günde bir besiyeri değişimi yapılmıştır. Hücreler tüm flaskın yüzeyine yayıldığında (% 80-90 yoğunluğa ulaştıklarında) pasajlama işlemi yapılmıştır.

Hücrelerin Pasajlanması

Hücre pasajının ilk aşamasında, hücrelerin besiyeri uzaklaştırılmıştır. Ardından flaskın içindeki istenmeyen artıkların uzaklaştırılması için 4 mL PBS ile yıkama işlemi yapılmıştır. Yıkama işleminden sonra PBS çekilerek flask duvarına yapışmış olan hücrelerin kaldırılması için 2 mL Tripsin eklenmiş ve hücreler etüvde 3 dk inkübasyona maruz bırakılmıştır. Hücrelerin flask tabanından ayrılıp ayrılmadığını kontrol etmek için etüvden çıkarıldıktan sonra mikroskopta bakılmıştır. Tripsinin etkisini nötralize etmek için 4 mL besiyeri eklenmiştir. Pipetle dikkatli bir şekilde, hücreler 15 ml'lik falkon tüplerine toplanmıştır. 22 C°'de 200 g'de 7 dk santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılmıştır. Pelletin üzerine besiyeri eklenip ve flasklara bölünmüştür. Her bir flaskın son hacimi 8 mL olacak şekilde besiyeri eklenmiştir. Hücreler 37 C° ve % 5 CO_2 koşullarında inkübasyona bırakılmıştır.

Hücrelerin Dondurulması

Dondurma işlemi için öncelikle flask içerisindeki besiyeri çekilip PBS ile yıkama yapılmıştır. Daha sonra flask tabanından hücrelerin kalkması için 2 mL Tripsin eklenmiştir. 37°C'de %5 CO_2 içeren inkübatörde 3 dk bekletilmiştir. Invert mikroskopta hücrelerin tabandan kalkıp kalkmadığı kontrol edilmiştir. Tripsini nötralize etmek için 4 mL besiyeri eklenerek pipetaj yapılmıştır. Pipetaj sonrasında homejenize haldeki hücreler steril falkonda toplanıp, 200 g'de 7 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant atılmıştır. Falkonda kalan pellet üzerine 500 µL besiyeri

eklenerek hücreler vial içerisine alınmıştır. Vial buz üzerine konularak % 20 FBS, % 10 DMSO içeren dondurma solüsyonu eklenerek homojenize edilmiştir. En sonunda tüpler önce -20 C°'de 1 saat, daha sonra -80 C°'de bir gece bekletilip, ardından azot tankına kaldırılmıştır.

Hücre Lizatı Hazırlama

Dondur-çöz metodu uygulanarak hücre lizatı hazırlanmıştır. Flask içerisindeki hücrelerin besiyeri uzaklaştırılıp PBS ile yıkama yapılmıştır. Daha sonra flask tabanından hücrelerin kalkması için 2 mL Tripsin eklenmiştir. 37°C'de %5 CO_2 içeren inkübatörde 3 dk bekletilmiştir. Invert mikroskopta hücrelerin tabandan kalkıp kalkmadığı kontrol edilmiştir. Tripsini nötralize etmek için 4 mL besiyeri eklenerek pipetaj yapılmıştır. Pipetaj sonrasında homejenize haldeki hücreler steril ependorfta toplanıp, +4 C°'de 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılarak soğuk PBS ile 3 defa yıkama yapılmıştır. Her yıkama sırasında +4 C°'de 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edilip süpernatant uzaklaştırılmıştır. Son yıkamadan sonra 600 µL PBS eklenip -80 C°'de 5 dk bekletilip ardından 37 C°'de 5 dk inkübe edilmiştir. Bu işlem 3 defa tekrar edilmiştir. En sonunda +4 C°'de 1500 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant bir ependorfta toplanarak ELISA protokolü uygulanmıştır.

3.2.2. ELISA Testi

DU145 ve PC3 hücre hatlarında NEDD4L, UCP2 ve PLA2G7 proteinlerinin ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi için ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) yöntemi ile ölçüm yapılmıştır. Ölçümler iki hücre hattında da 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

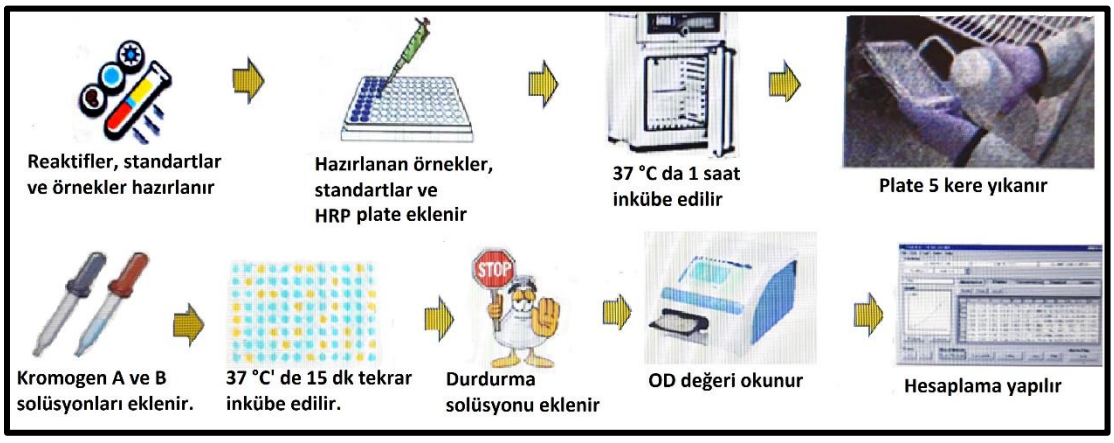
ELISA deneyleri için Sandviç ELISA temeline dayanan NEDD4L ELISA kit, (ShanghaiCoon Koon Biotech Co., Ltd., 20522), UCP2 ELISA kit (ShanghaiCoon Koon Biotech Co., Ltd., 13901) ve Lipoprotein ilişkili fosfolipaz A2 (Lp-PLA2) ELISA kitleri (ShanghaiCoon Koon Biotech Co., Ltd., 12314) kullanılmıştır (Tablo 3.2).

Tablo 3.2. ELISA kit içeriği

BİLEŞENLER Mikroelisa strip plate	**PLA2G7 Konst. (ng/ml)**	**UCP2 Konst. (pg/mL)**	**NEDD4L Konst. (ng/ml)**
Standart A	0	0	0
Standart B	1,5	200	1,25
Standart C	3	400	2,5
Standart D	6	800	5
Standart E	12	1600	10
Standart F	24	3200	20
Örnek seyreltici			
HRP- Konjuge reaktif			
20X Yıkama Solüsyonu			
Kromogen A Solüsyonu			
Kromogen B Solüsyonu			
Durdurma Solüsyonu			
Kapatma Plakası Membranı			

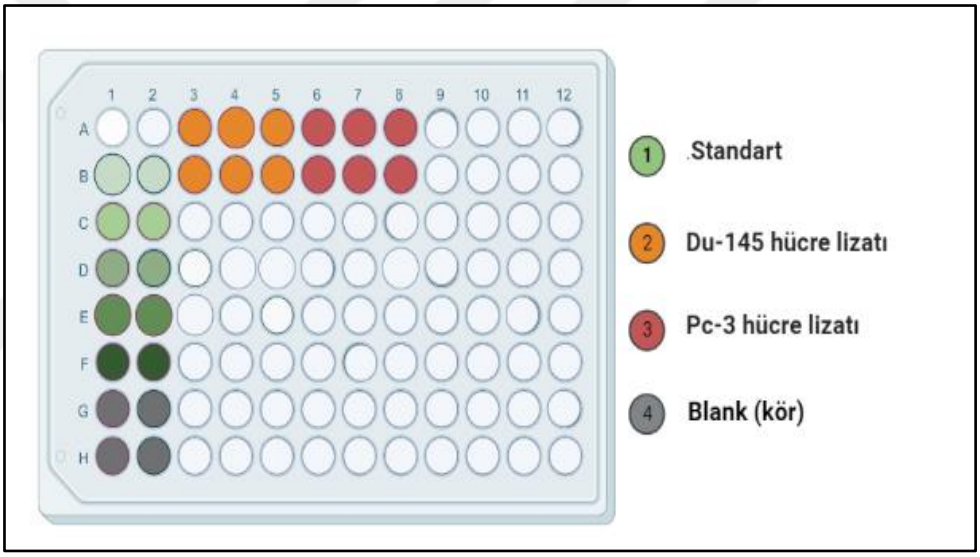
(Not: Konst = Konsantrasyon.)

Hücreler kültür kaplarına ekilip yoğunlukları %80-90 ulaşana kadar besiyeri değiştirilerek büyütülmüştür. Hücreler yeterli yoğunluğa ulaştıktan sonra dondur-çöz metodu ile hücre lizatı hazırlanmıştır. Daha sonra ELISA protokolü uygulanmıştır.



Şekil 3.2. Sandviç Elisa çalışma prosedürü

ELISA protokolü uygulanırken öncelikle her bir standart solüsyonundan 50µL olacak şekilde kuyucuklara eklenmiştir. Ardından kuyucuklara 10 µL örnek ve ve üzerlerine 40 µL örnek seyreltici eklenmiştir. Standart ve örneklerin eklendiği kuyucuklara 100 µL HRP- Konjuge reaktifi eklenmiştir. 37 C°'de 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından plate içerisindeki antikorlara tutunmayan moleküllerin ortamdan uzaklaştırılması için 5 kez yıkama solüsyonu ile yıkama yapılmıştır. Renk oluşumu için kromogen A ve B solüsyonlarından 50 µL eklenerek karanlık ortamda 37 C°'de 15 dk daha inkübasyon yapılmıştır. En sonunda 50 µL durdurma solüsyonu eklenerek Biotek Epoch Reader Spektrofotometre cihazında 450 nm'de okuma yapılmıştır.



Şekil 3.3. ELISA plate düzeni

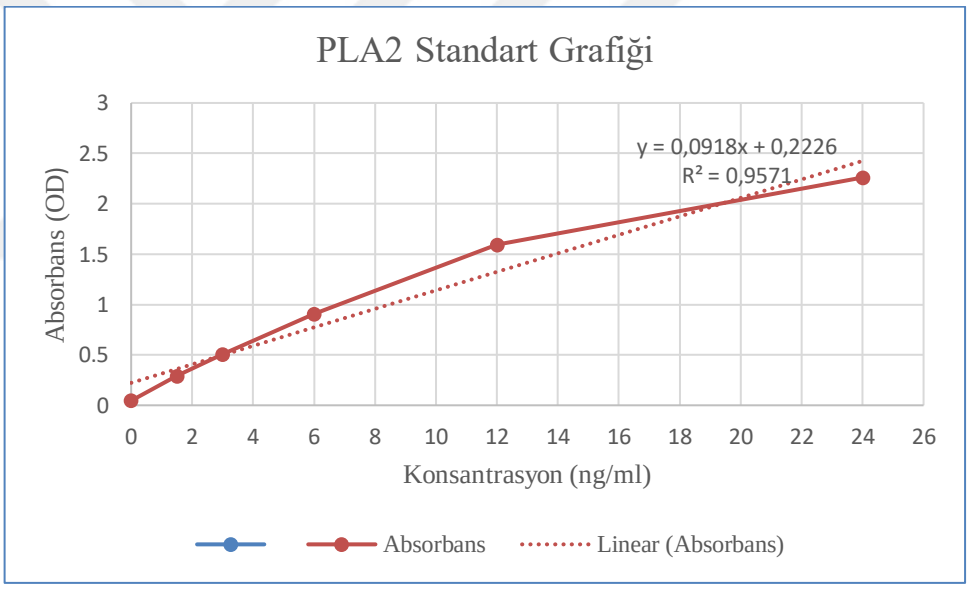
3.2.3. İstatistiksel Analiz

ELISA çalışmasının istatistiksel analizinde GraphPad Prism 9 programı kullanılmıştır. Karşılaştırmalar unpaired t testi kullanılarak yapılmıştır. Anlamlılık düzeyi $p \leq 0.05$ olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

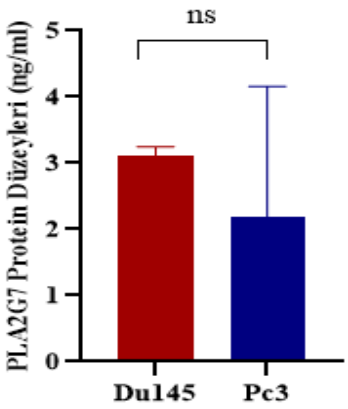
4.1. PC3 ve DU145 Prostat Kanseri Hücre Hatlarında PLA2G7 Düzeyinin Karşılaştırılması

PC3 ve DU145 prostat kanseri hücrelerinde PLA2G7 düzeyinin belirlemek için ELISA testi yapılmıştır. PLA2G7 ELISA testi için kullanılan kitin protokolüne uygun olarak ölçüm yapılmıştır. Yapılan ölçümler sonucunda standartların konsantrasyon değerleri kullanılarak absorbans/konsantrasyon grafiği çizilmiştir (Şekil 4.1). Hücre lizatlarından ölçülen absorbans değerleri standart grafiğindeki denklemde yerine yazılarak konsantrasyon değerleri bulunmuştur.



Şekil 4.1. PLA2G7 standart absorbans-konsantrasyon grafiği

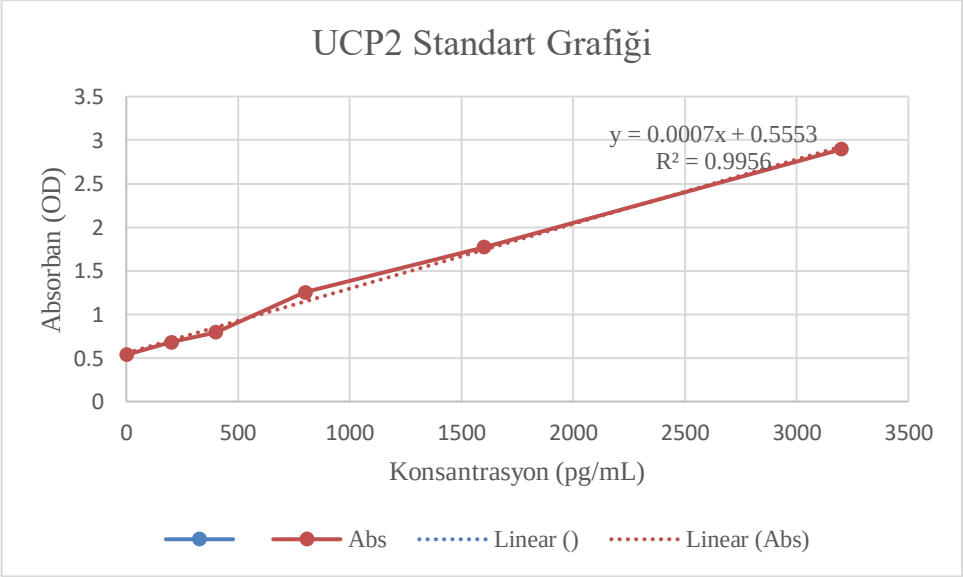
Yapılan değerlendirmeler sonucunda PLA2G7 düzeyi Şekil 4.2'de gösterilmiştir. DU145 ve PC3 prostat kanseri hücre grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farka sahip olmadığı tespit edilmiştir ($p \geq 0,05$).



Şekil 4.2. DU145 ve PC3 prostat kanseri hücrelerinde PLA2G7 düzeyinin gösterimi

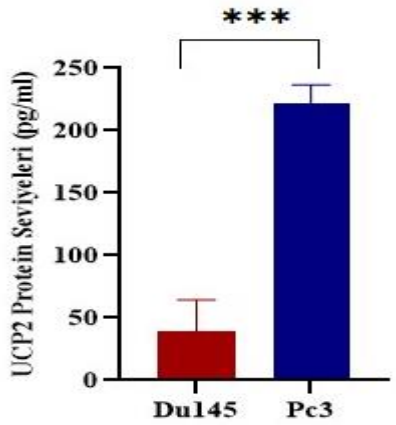
4.2. PC3 ve DU145 Prostat Kanseri Hücre Hatlarında UCP2 Düzeyinin Karşılaştırılması

PC3 ve DU145 prostat kanseri hücrelerinde UCP2 düzeyinin belirlemek için ELISA testi yapılmıştır. Yapılan ölçümler sonucunda standartların konsantrasyon değerleri kullanılarak absorbans/konsantrasyon grafiği çizilmiştir (Şekil 4.3). Hücre lizatlarından ölçülen absorbans değerleri standart grafiğindeki denklemde yerine yazılarak konsantrasyon değerleri bulunmuştur.



Şekil 4.3. UCP2 standart absorbans-konsantrasyon grafiği

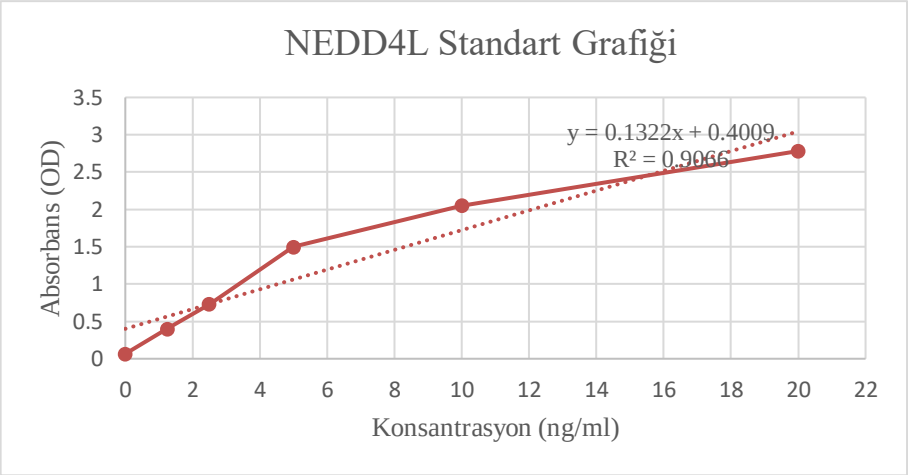
Yapılan değerlendirmeler sonucunda UCP2 düzeyi şekil 4.4' de gösterilmiştir. Pc-3 hücrelerindeki UCP2 seviyesinin DU145 hücrelerine göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir ($p \leq 0,05$).



Şekil 4.4. DU145 ve PC3 prostat kanseri hücrelerinde UCP2 düzeyinin gösterimi

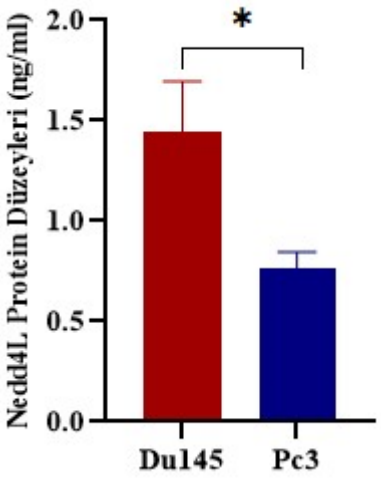
4.3. PC3 ve DU145 Prostat Kanseri Hücre Hatlarında NEDD4L Düzeyinin Karşılaştırılması

PC3 ve DU145 prostat kanseri hücrelerinde NEDD4L düzeyinin belirlemek için ELISA testi yapılmıştır. Yapılan ölçümler sonucunda standartların konsantrasyon değerleri kullanılarak absorbans/konsantrasyon grafiği çizilmiştir (Şekil 4.5). Hücre lizatlarından ölçülen absorbans değerleri standart grafiğindeki denklemde yerine yazılarak konsantrasyon değerleri bulunmuştur.



Şekil 4.5. NEDD4L standart absorbans-konsantrasyon grafiği

Yapılan değerlendirmeler sonucunda NEDD4L düzeyi şekil 4.6' da gösterilmiştir. DU145 hücrelerindeki NEDD4L seviyesinin PC3 hücrelerine göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir ($p \leq 0,05$).



Şekil 4.6. DU145 ve PC3 prostat kanseri hücrelerinde NEDD4L düzeyinin gösterimi

5. TARTIŞMA

Kanser hücreleri düzensiz büyüme ve hızlı çoğalma özelliğine sahiptir (7). Hızla bölünen bir hücre enerji ve biyokimyasal ihtiyaçlarını karşılamak için çeşitli metabolik süreçlerde adaptasyonlar gerçekleştirir (94). Lipid metabolizmasındaki düzensizlik, kanserdeki metabolik değişiklikler arasındadır (95). Bu değişiklikler; lipid damlacık birikimi, artan lipid alımı, de novo lipid sentezi ve lipolizdeki düzenlemeler de dahil olmak üzere çeşitli mekanizmaları içerir (63). LD'ler, kanser hücrelerinin çoğalmasında, büyümesinde ve strese yanıtta görev alan organellerdir. LD'lerde lipid birikimi, prostat kanseri hücreleri için belirleyici bir özelliktir (96). Lipid metabolizmasında ve lipid damlacığı oluşumunda yer alan bazı önemli genler bulunmaktadır. Bu çalışmamızda, prostat kanserinde lipid damlacık oluşumunda ve depolanmasında yer alan PLA2G7, UCP2 ve NEDD4L genlerinin protein düzeyinde ekspresyon düzeyleri araştırılmıştır.

Lipoprotein ile ilişkili fosfolipaz A2 veya trombosit aktive edici faktör (PAF) asetil hidrolaz olarak da bilinen PLA2G7, fosfolipitleri hidrolize eden bir fosfolipazdır (72). PAF (1-0-alkil-2-asetil-sn-glisero-3-fosfokolin), trombositler, nötrofiller ve makrofajlar gibi proinflamatuar (inflamasyon artırıcı) hücrelerin aktivasyonunda görev alan güçlü bir proinflamatuar aracıdır (97). Aynı zamanda tümör hücresi büyümesi, anjiyogenez ve metastaz ile ilişkilidir (98). PAF'ın proinflamatuar etkileri, PAF asetilhidrolaz (PAFAH/PLA2G7) enzimi tarafından sonlandırılır. Sonuç olarak, PLA2G7'nin karsinogeneze karşı koruyucu etkisi olduğu düşünülmektedir (97). PAF'ın tümör hücrelerinin metastazında önemli olan hücre dışı matriks ve bazal membranın yıkılmasını sağlayan enzimleri aktive etmesi bu görüşü desteklemektedir.

PLA2G7'nin fosfolipit hidrolizi ile, lizoPAF/lizofosfatidilkolin (lizoPC) ve kısa ve/veya oksitlenmiş yağ asitleri üretilir, Rosenson ve Stafforini'nin yaptığı çalışmada bunların birçoğunun pro-inflamatuar ve pro-oksidatif aktiviteleri olduğu da rapor edilmiştir (99). Ayrıca bu bileşikler, LD sentezi için ihtiyaç duyulan serbest yağ asitleri havuzunun oluşturulmasına katkıda bulunur (68). Bu konuda yapılan çalışmalar, bu bileşiklerin meme kanseri, yumurtalık kanseri ve multipl miyelom gibi tümörlerde tümör gelişimine sebep olduğunu göstermiştir (100). Vainio ve ark.larının

yaptığı çalışmada PLA2G7 primer prostat kanserlerinin %50'sinde ve metastatik prostat kanserlerinin %70'inde yeni bir biyobelirteç olarak rapor edilmiştir. Ayrıca prostat kanserinde agresif hastalık ile ilişkilendirilmiştir (72). Erdal Benli ve ark.larının yaptığı çalışmada PSA seviyesi yüksek hasta grubunda ve prostat kanserli grupta PLA2G7 aktivitesinin kontrol grubuna göre arttığı belirlenmiştir (100). Vainio ve ark.larının VCaP ve LNCaP insan prostat kanseri hücre hatları üzerinde yaptığı başka bir çalışmada PLA2G7 inaktivasyonunun apoptozu indüklediği ve hücreleri oksidatif strese karşı duyarlı hale getirdiği gösterilmiştir (101). PLA2G7'nin prostat, kolon ve bazı kanser türlerinde protümorijenik rolü için güçlü çıkarımlar olmasına rağmen, bu enzimin terapötik bir hedef olarak potansiyeli henüz kesin olarak belirlenememiştir (102). Bu konuyla ilgili Kispert ve ark.larının yaptığı çalışmada, artan PLA2G7 ekspresyonun tümör hücrelerinin hareket yeteneğini azalttığı bildirilmiştir (98).

Bu çalışmamızda; orta seviyede metastatik özelliğe sahip DU145 ve yüksek seviyede metastatik olan PC3 prostat kanseri hücre hatları arasındaki PLA2G7 seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı bir farka sahip olmadığı tespit edilmiştir. Kispert ve ark.larının yaptığı çalışmaya paralel olarak PLA2G7 seviyesinin PC3 hücre hattında daha az olduğu gözlemlenmiştir ancak anlamlı bir sonuç elde edilememiştir.

Çalışmamızda araştırdığımız diğer bir gen olan UCP2'nin protein ekspresyonu hücre proliferasyonundaki değişikliklerle sıkı bir şekilde ilişkili olan bir mitokondriyal taşıyıcıdır (78). Hücresel glikoz ve lipit metabolizması araştırmalarındaki son gelişmeler, UCP2'yi hücresel yakıt kullanımının ve tüm vücut glikozu ve lipit metabolizmasının kritik bir düzenleyicisi olarak tanımlamaktadır (10). UCP2; bir mitokondriyal anyon taşıyıcı protein ailesine aittir. Memeli hücrelerinde ATP üretimi yerine ısı şeklinde enerji salarak iç mitokondriyal membran boyunca proton gradyanını azaltmayı sağlar (103). Diano ve ark.ları UCP2'nin, glikoz kullanımı yerine yağ asidi metabolizmasının teşvik edilmesini sağlayan bir metabolik anahtar olarak işlev gördüğünü ileri sürmüştür (10). Bu hipotezin doğruluğunu araştırmak için Pecqueur ve ark.larının yaptığı çalışmada, UCP2'nin inaktive edilmesinin mitokondriyal yağ asidi oksidasyonunun azalmasına ve glukoz metabolizmasının artmasına neden olduğu gösterilmiştir (104). Ke ve ark.larının yaptığı çalışmada ise UCP2'nin *in vivo* ve *in vitro* olarak lipid birikiminin kritik bir düzenleyicisi olarak hareket ettiği ve UCP2

eksikliği olan farelerde lipid damlacıklarının birikmesinin ve sentezinin bastırıldığı gösterilmiştir (105). Prostat adenokarsinom hücrelerinden malign olmayan RC77N/E ve malign RC77T/E hücreleri üzerinde Burch TC ve ark.larının yaptığı çalışmada UCP2 ekspresyon seviyesi araştırılmış ve RT-PCR dizi analizi ve Western Blot analizi sonucunda malign olmayan RC77N/E hücrelerine kıyasla malign RC77T/E hücrelerinde UCP2 ekspresyon seviyesinin önemli ölçüde arttığı bulunmuştur (106). Ayrıca Li ve ark.larını yaptığı çalışmada insan baş, boyun, deri, prostat ve pankreas tümörü örneklerinde, normal dokulara kıyasla UCP2 protein seviyelerinin önemli ölçüde daha yüksek olduğunu gösterilmiştir (107).

Çalışmamızda; DU145 ve PC3 prostat kanseri hücre grupları arasında UCP2 seviyesi araştırılmıştır. Çalışmamızın sonucunda PC3 hücrelerindeki UCP2 seviyesinin DU145 hücrelerine göre daha fazla olduğunu tespit edilmiştir ($p \leq 0,05$). Artan protein düzeyi, prostat kanserinde tümör büyümesini ve metastazı teşvik edebileceğini düşündürmektedir. Ayrıca elde ettiğimiz sonuçlar, bu proteinin potansiyel yeni bir ilaç hedefi ve biyobelirteç olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

NEDD4L, substrat ubikitinasyon ve protein bozulmasını düzenleyerek çoklu hücresel prosedürlere katıldığı bildirilen bir E3 ubikitin ligazdır (86). Bugüne kadar, NEDD4L dahil olmak üzere birçok E3 ubikitin ligazı lipid mekanizmasının düzenleyicileri olarak tanımlanmıştır (108). Hooper ve ark.larının yaptığı çalışmada lipid damlacıklarının devrinde ve epidermal büyüme faktörü reseptörünün bozulmasında görev alan Spartin proteininin, NEDD4 ailesine ait E3 ubikitin ligazları ile etkileşime girdiği gösterilmiştir (11). Ayrıca Alberts ve ark.larının yaptığı çalışmada spartinin, adipofilin gibi lipid damlacık proteinlerinin ubikitinasyon ve degradasyonu için Nedd4 ailesi ligazlarını topladığı ve aktive ettiği belirtilmiştir (109). Hu ve ark.larının yaptığı çalışmada NEDD4L, TGF-β1(tumor growth factor) sinyalini engelleyebilen yeni bir protein olarak gösterilmiştir (110). TGF-β, kanserin erken evrelerinde hücre döngüsü ilerlemesini inhibe ederek ve apoptozu teşvik ederek tümör baskılayıcı etkiler sergilerken, ileri evrelerinde TGF-β, tümör teşvik edici etkiler uygular, tümör invazivliğini ve metastazı arttırır (111). Bugüne kadar yapılan çok sayıda çalışmada, çeşitli kanser türlerinde NEDD4L ekspresyonunun farklı olduğu ve çeşitli proteinlerin NEDD4L'ye bağlanması ile NEDD4L tarafından ubikitine edildiği

ve böylece kanser gelişimini modüle ettiğini doğrulamıştır (86). Hu ve ark.larını yaptığı çalışmada PC'si olan 56 hastadan alınan radikal prostatektomi (RP) numuneleri ve 31 hastadan alınan benign prostat hiperplazisi arasındaki NEDD4L seviyesi karşılaştırılmıştır. NEDD4L'nin PCa'da benign prostat dokusuna göre anlamlı derecede azaldığı tespit edilmiştir. Aynı çalışmada Gleason skoru ≥8 olan kanserlerde, %86'sının NEDD4L ekspresyonu negatif bulunmuştur (110).

Çalışmamızda DU145 ve PC3 prostat kanseri hücre hatları arasındaki NEDD4L seviyesi araştırılmıştır. DU145 hücrelerindeki NEDD4L seviyesinin PC3 hücrelerine göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen bu sonuçlar, NEDD4L ekspresyonunun düzenlenmesinin prostat kanserlerinin gelişiminde bir rol oynayabileceği göstermektedir.

Bu tez çalışmamız ile PLA2G7 seviyesini metastatik hücrelerde azalmış olmasına rağmen iki hücre hattı arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. UCP2'nin prostat kanserinde artan metastaz potansiyeli ile seviyesinin arttığı ve NEDD4L'nin ise artan metastaz potansiyeli ile seviyesinin azaldığı gösterilmiştir. Sonuç olarak UCP2'nin prostat kanserinde hastalığın ilerlemesini destekleyebileceği, NEDD4L protein seviyesinin azalması hücre proliferasyonu kontrolünü sağladığını düşündürmektedir. PLA2G7 proteini üzerinde daha fazla çalışma yapılmasına ihtiyaç vardır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- ✓ Bu tez çalışmasında, prostat kanserinde lipid damlacık oluşumunda ve depolanmasında yer alan PLA2G7, UCP2 ve NEDD4L genlerinin ekspresyon düzeyleri gösterilmesi amaçlanmıştır.

- ✓ Orta düzeyde metastatik potansiyele sahip DU145 ve yüksek metastatik potansiyele sahip PC3 prostat kanseri hücre hatları kullanılmıştır.

- ✓ PLA2G7, UCP2 ve NEDD4L düzeylerinin ölçümü için ELISA testi uygulanmıştır.

- ✓ PLA2G7 üzerinde daha fazla araştırma yapılmasına ihtiyaç vardır.

- ✓ ELISA testi sonucunda PLA2G7 düzeyinin DU145 ve PC3 prostat kanseri hücre grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farka sahip olmadığı tespit edilmiştir ($p \geq 0,05$).

- ✓ PC3 hücrelerindeki UCP2 seviyesinin DU145 hücrelerine göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir ($p \leq 0,05$).

- ✓ PLA2G7 proteini üzerinde daha fazla çalışma yapılmaya ihtiyaç vardır.

- ✓ UCP2 seviyesi, ilerlemiş tümör agresifliği ile ilişkili olarak arttığından serum UCP2 seviyesinin incelenmesi klinisyenlere hastalığın ilerlemesi hakkında bilgi verebilir. UCP2'nin prostat kanserinde hastalığın ilerlemesini destekleyebileceği ayrıca değişin tümör metabolizmasına karşı hedefe yönelik tedavilerde terapötik olabileceği düşünülebilir.

- ✓ DU145 hücrelerindeki NEDD4L seviyesinin PC3 hücrelerine göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir ($p \leq 0,05$).

- ✓ PCa'da ve özellikle daha agresif hücrelerde NEDD4L seviyesinin azalması, hücre proliferasyonunun kontrolü ile NEDD4L arasında bir ilişki olduğunu düşündürmektedir. NEDD4L protein ekspresyonu, prostat kanseri gelişimi için bir prognostik belirteç olabilir.

- ✓ NEDD4L'nin tümörijenezdeki işlevini ve rolünü daha iyi anlamak için ayrıntılı araştırmalar yapılmalıdır.

7. KAYNAKÇA

1. López-Lázaro M. Understanding cancer: 15 questions and answers, *ResearchGate*, 2016.

2. Compton C, Cancer initiation, promotion, and progression and the acquisition of key behavioral traits. In: Cancer: The Enemy from Within. *Springer*,2020 (2-6).

3. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of ıncidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries, *CA Cancer J Clin.*, 2021, 71(3):209-249.

4. Dłubek J, Rysz J, Jabłonowski Z, Gluba-Brzózka A, Franczyk B. The correlation between lipid metabolism disorders and prostate cancer, *Curr Med Chem.*, 2021, 28(10):2048-2061.

5. Poulose N, Amoroso F, Steele RE, Singh R, Ong CW and Mills IG. Genetics of lipid metabolism in prostate cancer, *Nature Genetics*, 2018, 50(2):169-171.

6. Stoykova GE and Schlaepfer IR. Lipid metabolism and endocrine resistance in prostate cancer, and new opportunities for therapy, *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(11): 2626.

7. Mitra R, Le TT, Gorjala P, and Jr OB. Positive regulation of prostate cancer cell growth by lipid droplet forming and processing enzymes DGAT1 and ABHD5. *BMC Cancer*, 2017, 17:631.

8. Petan T, Jarc E, and Jusovic M. Lipid droplets in cancer: guardians of fat in a stressful world. *Molecules*, 2018, 23(8):1941.

9. Ercın ME and Şimşek E. Programming of energy metabolism ın prostate carcinoma: ın silico analysis. *Gümüşhane Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 2021, 9(4): 350-356.

10. Diano S and Horvath TL. Mitochondrial uncoupling protein 2 (UCP2) in glucose and lipid metabolism. *Trends in Molecular Medicine*, 2012, 18(1): 52-8.

11. Hooper C, Puttamadappa SS, Loring Z, Shekhtman A and Bakowska JC. Spartin activates atrophin-1-interacting protein 4 (AIP4) E3 ubiquitin ligase and promotes ubiquitination of adipophilin on lipid droplets, 2010, *BMC biology*, 8, 72.

12. National Cancer Institute (NCI) – NIH. What is Cancer. https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer. 18 Kasım 2021.

13. World Health Organization. Cancer. https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1 . 18 Kasım 2021.

14. GLOBOCAN 2020 Database. https://gco.iarc.fr/ (24.12.2021).

15. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell*, 2011, 144(5): 646-674.

16. Fouad YA, Aanei C. Revisiting the hallmarks of cancer. Am J Cancer Res, 2017, 7(5):1016-1036.

17. PDQ Adult Treatment Editorial Board. Prostate Cancer Treatment (PDQ®): Patient Version. 2021 Nov 12. In: PDQ Cancer Information Summaries [Internet]. Bethesda (MD): National Cancer Institute (US); 2002.

18. Rebello RJ, Oing C, Knudsen KE. et al. Prostate cancer. *Nat Rev Dis Primers*, (2021) 7; 9.

19. American cancer society, What Is Prostate Cancer? cancer.org 1.800.227.2345 (17 aralık 2021).

20. Yencilek F, Koca O, Kuru M. Prostat Kanserinde Tanı, *Nucl Med Semin*, 2018, 4:163-173.

21. Cheng L, Montironi R, Bostwick DG, Lopez-Beltran A, Berney DM. Staging of prostate cancer. *Histopathology*. 2012, 60(1):87-117.

22. Kang BJ, Jeun M, Jang GH, et al. Diagnosis of prostate cancer via nanotechnological approach. *Int J Nanomedicine*. 2015, 10:6555-6569.

23. Pezaro C, Woo HH, Davis ID. Prostate cancer: measuring PSA, *Internal Medicine Journal*,2014, 44(5): 433-440.

24. Arneth B. Clinical Significance of Measuring Prostate-Specific Antigen, *Laboratory Medicine*, 2009;40(8):487–491.

25. Braunhut BL, Punnen S, Kryvenko ON. Updates on Grading and Staging of Prostate Cancer. *Surg Pathol Clin*. 2018, 11(4):759-774.

26. Baydar DE. Prostat kanser patolojisi, *Türk Radyoloji Derneği*, 2017, 5: 370-82.

27. Kim CH, Bhattacharjee S, Prakash D, et al. Artificial intelligence techniques for prostate cancer detection through dual-channel tissue feature engineering. *Cancers (Basel)*. 2021,13(7):1524.

28. Ramakrishnan E, Maruthanila VL, Kumar M, Kotoky J, Kabilan S, Strategy towards diagnosis and treatment for prostate cancer, *Urol Res Ther J*, 2017, 1(1):115.

29. Üroonkoloji derneği-199, Prostat kanseri, http://uroonkoloji.org/wp-content/uploads/2016/02/prostat-kanseri.pdf (03.01.2022).

30. Türk tıbbı onkoloji derneği, https://www.kanser.org/saglik/toplum/kanser-turleri-alt-kategori/prostat-kanseri-tedavisi-type1 (03.01.2022).

31. Drudge-Coates L. Prostate cancer and the principles of hormone therapy. *Br J Nurs*. 2005, 14(7):368-75.

32. Guo W, Tan HY, Chen F, Wang N, Feng Y. Targeting cancer metabolism to resensitize chemotherapy: potential development of cancer chemosensitizers from traditional Chinese medicines. *Cancers (Basel)*, 2020,12(2):404.

33. Pavlova NN, Thompson CB. The emerging hallmarks of cancer metabolism. *Cell Metab.*, 2016, 23(1):27-47.

34. Li Z, Zhang H. Reprogramming of glucose, fatty acid and amino acid metabolism for cancer progression, *Cell Mol Life Sci*. 2016, Jan;73(2):377-92.

35. Min HY, Lee HY. Oncogene-Driven Metabolic Alterations in Cancer. *Biomol Ther (Seoul)*. 2018 Jan 1;26(1):45-56.

36. Phan LM, Yeung SC, Lee MH. Cancer metabolic reprogramming: importance, main features, and potentials for precise targeted anti-cancer therapies. *Cancer Biol Med*. 2014,11(1):1-19.

37. Dang CV. Glutaminolysis: supplying carbon or nitrogen or both for cancer cells? *Cell Cycle*. 2010, 9(19):3884-6.

38. Aydın H.H. *Kanser Metabolizması*,1. Baskı. İzmir, Ege Üniversitesi Basımevi, 2015:18

39. DeBerardinis RJ, Cheng T. Q's next: the diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology and cancer. *Oncogene*. 2010, 29(3):313-324.

40. Patra KC, Hay N. The pentose phosphate pathway and cancer. *Trends Biochem Sci*. 2014, 39(8):347-354.

41. Popov LD. Mitochondrial biogenesis: An update. *J Cell Mol Med*. 2020, 24(9):4892-4899.

42. Gururaja Rao S. Mitochondrial Changes in Cancer. *Handb Exp Pharmacol*. 2017;240:211-227.

43. Vyas S, Zaganjor E, Haigis MC. Mitochondria and Cancer. *Cell*. 2016, 166(3):555-566.

44. Luo X, Cheng C, Tan Z, et al. Emerging roles of lipid metabolism in cancer metastasis. *Mol Cancer*. 2017, 16(1):76.

45. Currie E, Schulze A, Zechner R, Walther TC, Farese RV Jr. Cellular fatty acid metabolism and cancer. *Cell Metab*. 2013, 18(2):153-161.

46. Baenke F, Peck B, Miess H, Schulze A. Hooked on fat: the role of lipid synthesis in cancer metabolism and tumour development. *Dis Model Mech*. 2013 Nov;6(6):1353-63.

47. Romero-Garcia S, Lopez-Gonzalez JS, Báez-Viveros JL, Aguilar-Cazares D, Prado-Garcia H. Tumor cell metabolism: an integral view. *Cancer Biol Ther*. 2011 Dec 1;12(11):939-48.

48. Creative Diagnostic – CD. Lipid Metabolism and Enzymes. https://www.creative-diagnostics.com/lipid-metabolism-and-enzymes.htm (07.04.2022).

49. Cheng CS, Wang Z, Chen J. Targeting FASN in Breast Cancer and the Discovery of Promising Inhibitors from Natural Products Derived from Traditional Chinese Medicine. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2014;2014:232946.

50. Carracedo A, Cantley LC, Pandolfi PP. Cancer metabolism: fatty acid oxidation in the limelight. *Nat Rev Cancer.* 2013, 13(4):227-232.

51. Koundouros N, Poulogiannis G. Reprogramming of fatty acid metabolism in cancer. *Br J Cancer*. 2020, 122(1):4-22.

52. Cheng C, Geng F, Cheng X, Guo D. Lipid metabolism reprogramming and its potential targets in cancer. *Cancer Commun (Lond)*. 2018;38(1):27.

53. Maan M, Peters JM, Dutta M, Patterson AD. Lipid metabolism and lipophagy in cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;504(3):582-589.

54. Deep G, Schlaepfer IR. Aberrant Lipid Metabolism Promotes Prostate Cancer: Role in Cell Survival under Hypoxia and Extracellular Vesicles Biogenesis. *Int J Mol Sci.* 2016, 17(7):1061.

55. Butler LM, Centenera MM, Swinnen JV. Androgen control of lipid metabolism in prostate cancer: novel insights and future applications, *Endocrine-Related Cancer*, 2016, 23(5):219-227.

56. Walther TC, Chung J, Farese RV Jr. Lipid droplet biogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2017, 33:491-510.

57. Olzmann JA, Carvalho P. Dynamics and functions of lipid droplets. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019, 20(3):137-155.

58. Jin C, Yuan P. Implications of lipid droplets in lung cancer: Associations with drug resistance. *Oncol Lett*. 2020, 20(3):2091-2104.

59. Petan T. Lipid Droplets in Cancer. Rev Physiol Biochem Pharmacol. 2020 Oct 17. doi: 10.1007/112_2020_51

60. Meyers A, Weiskittel TM, Dalhaimer P. Lipid droplets: Formation to breakdown. *Lipids.* 2017, 52(6):465-475.

61. Welte MA, Gould AP. Lipid droplet functions beyond energy storage. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2017;1862(10 Pt B):1260-1272.

62. Jarc E, Petan T. Lipid droplets and the management of cellular stress. *Yale J Biol Med.* 2019, 92(3):435-452.

63. Cruz ALS, Barreto EA, Fazolini NPB, Viola JPB, Bozza PT. Lipid droplets: platforms with multiple functions in cancer hallmarks. *Cell Death Dis*. 2020, 11(2):105.

64. Kostecka LG, Pienta KJ, Amend SR. Lipid droplet evolution gives insight into polyaneuploid cancer cell lipid droplet functions. *Med Oncol.* 2021, 38(11):133.

65. Schilke RM, Blackburn CMR, Bamgbose TT, Woolard MD. Interface of phospholipase activity, ımmune cell function, and atherosclerosis. *Biomolecules*. 2020;10(10):1449.

66. Murakami M., Novel functions of phospholipase A_2s: Overview. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2019, 1864(6):763-765.

67. Burke JE, Dennis EA, Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling, *Journal of Lipid Research*, 2009, 50: S237–S242.

68. Guijas C, Rodríguez JP, Rubio JM, Balboa MA, Balsinde J. Phospholipase A2 regulation of lipid droplet formation. *Biochim Biophys Acta*. 2014, 1841(12):1661-71.

69. Stafforini DM. Biology of platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH, lipoprotein associated phospholipase A2), *Cardiovasc Drugs Ther*. 2009, 23(1):73-83.

70. Marathe GK, Pandit C, Lakshmikanth CL, Chaithra VH, Jacob SP, D'Souza CJ. To hydrolyze or not to hydrolyze: the dilemma of platelet-activating factor acetylhydrolase. *J Lipid Res.* 2014;55(9):1847-1854.

71. Jayaraman S, Gantz DL, Gursky O. Effects of phospholipase A(2) and its products on structural stability of human LDL: relevance to formation of LDL-derived lipid droplets. *J Lipid Res*. 2011;52(3):549-557.

72. Vainio P, Lehtinen L, Mirtti T, et al. Phospholipase PLA2G7, associated with aggressive prostate cancer, promotes prostate cancer cell migration and invasion and is inhibited by statins. *Oncotarget*. 2011;2(12):1176-1190.

73. Lehtinen L, Vainio P, Wikman H, et al. PLA2G7 associates with hormone receptor negativity in clinical breast cancer samples and regulates epithelial-mesenchymal transition in cultured breast cancer cells. *J Pathol Clin Res.* 2017;3(2):123-138.

74. Li J, Jiang R, Cong X, Zhao Y. UCP2 gene polymorphisms in obesity and diabetes, and the role of UCP2 in cancer. *FEBS Lett*. 2019 Sep;593(18):2525-2534.

75. Toda C, Diano S. Mitochondrial UCP2 in the central regulation of metabolism. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2014 Oct;28(5):757-64.

76. Valle A, Oliver J, Roca P. Role of Uncoupling Proteins in Cancer. *Cancers*, 2010, 2(2), 567-591.

77. Baffy G. Uncoupling protein-2 and non-alcoholic fatty liver disease. *Front Biosci.* 2005 Sep 1;10:2082-96.

78. Erden Y, Tekin S, Kirbag S, Sandal S. Mitochondrial Uncoupling Proteins in the Brain: Their Structure, Function and Physiological Roles. *Med Sci | Int Med J.* 2015;4(2):228-229.

79. Esteves P, Pecqueur C, Alves-Guerra MC. UCP2 induces metabolic reprogramming to inhibit proliferation of cancer cells. *Mol Cell Oncol.* 2014;2(1):e975024.

80. Sreedhar A, Zhao Y. Uncoupling protein 2 and metabolic diseases. *Mitochondrion.* 2017 May;34:135-140.

81. Zhong H, Yin H, Role of lipid peroxidation derived 4-hydroxynonenal (4-HNE) in cancer: Focusing on mitochondria. *Redox Biology.* 2015;(4):193-199.

82. Donadelli M, Dando I, Dalla Pozza E, Palmieri M. Mitochondrial uncoupling protein 2 and pancreatic cancer: a new potential target therapy. *World J Gastroenterol.* 2015;21(11):3232-3238.

83. Esteves P, Pecqueur C, Ransy C, Esnous C, Lenoir V, Bouillaud F, Bulteau AL, Lombès A, Prip-Buus C, Ricquier D, Alves-Guerra MC. Mitochondrial retrograde signaling mediated by UCP2 inhibits cancer cell proliferation and tumorigenesis. *Cancer Res.* 2014 Jul 15;74(14):3971-82.

84. Moon JS, Lee S, Park MA, Siempos II, Haslip M, Lee PJ, Yun M, Kim CK, Howrylak J, Ryter SW, Nakahira K, Choi AM. UCP2-induced fatty acid synthase promotes NLRP3 inflammasome activation during sepsis. J Clin Invest. 2015 Feb;125(2):665-80.

85. Goel P, Manning JA, Kumar S. NEDD4-2 (NEDD4L): the ubiquitin ligase for multiple membrane proteins. *Gene.* 2015;557(1):1-10.

86. Xie S, Xia L, Song Y, Liu H, Wang ZW, Zhu X. Insights Into the Biological Role of NEDD4L E3 Ubiquitin Ligase in Human Cancers. *Front Oncol*. 2021;11:774648.

87. Chen C, Matesic LE. The Nedd4-like family of E3 ubiquitin ligases and cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2007 Dec;26(3-4):587-604.

88. Foot N, Henshall T, Kumar S. Ubiquitination and the regulation of membrane proteins. *Physiol Rev* 97: 253–281, 2017.

89. Eastman SW, Yassaee M, Bieniasz PD. A role for ubiquitin ligases and Spartin/SPG20 in lipid droplet turnover. *J Cell Biol*. 2009;184(6):881-894.

90. ATCC Cell Lines. PC-3 (CRL-1435). https://www.atcc.org/products/crl-1435 (12.04.2022).

91. Kaighn ME, Narayan KS, Ohnuki Y, Lechner JF, Jones LW. Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest Urol.* 1979 Jul;17(1):16-23.

92. ATCC Cell Lines. DU-145 (HTB-81). https://www.atcc.org/products/htb-81 (12.04.2022).

93. Pulukuri SM, Gondi CS, Lakka SS, et al. RNA interference-directed knockdown of urokinase plasminogen activator and urokinase plasminogen activator receptor inhibits prostate cancer cell invasion, survival, and tumorigenicity in vivo. *J Biol Chem*. 2005;280(43):36529-36540.

94. Wu X, Daniels G, Lee P, Monaco ME. Lipid metabolism in prostate cancer. *Am J Clin Exp Urol.* 2014 Jul 12;2(2):111-20.

95. Bian X, Liu R, Meng Y, Xing D, Xu D, Lu Z. Lipid metabolism and cancer. *J Exp Med.* 2021 Jan 4;218(1):e20201606.

96. Roman M, Wrobel TP, Panek A, Paluszkiewicz C, Kwiatek WM. Lipid droplets in prostate cancer cells and effect of irradiation studied by Raman microspectroscopy. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2020 Sep;1865(9):158753.

97. Sankararaman S, Yanamandra K, Napper D, Caldito G, Dhanireddy R. The prevalence of platelet activating factor acetylhydrolase single nucleotide polymorphisms in relationship to necrotizing enterocolitis in Northwest Louisiana infants. *Springerplus.* 2013 Jul 2;2(1):294.

98. Kispert SE, Marentette JO, McHowat J. Enhanced breast cancer cell adherence to the lung endothelium via PAF acetylhydrolase inhibition: a potential mechanism for enhanced metastasis in smokers. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2014 Nov 15;307(10):C951-6.

99. Stafforini DM, Zimmerman GA. Unraveling the PAF-AH/Lp-PLA2 controversy. *J Lipid Res.* 2014 Sep;55(9):1811-4.

100. Benli E, Bayrak A, Cirakoglu A, Bayrak T, Noyan T. Comparison of serum acetyl hydrolase (PAF-AH) and paraoxonase 1 (PON1) values between prostate cancer patients and a control group. *Kaohsiung J Med Sci.* 2017 Nov;33(11):572-577.

101. Vainio P, Gupta S, Ketola K, Mirtti T, Mpindi JP, Kohonen P, Fey V, Perälä M, Smit F, Verhaegh G, Schalken J, Alanen KA, Kallioniemi O, Iljin K. Arachidonic acid pathway members PLA2G7, HPGD, EPHX2, and CYP4F8 identified as putative novel therapeutic targets in prostate cancer. *Am J Pathol.* 2011 Feb;178(2):525-36.

102. Stafforini DM. Diverse Functions of Plasma PAF-AH in Tumorigenesis. Enzymes. 2015;38:157-79.

103. Vallejo FA, Vanni S, Graham RM. UCP2 as a Potential Biomarker for Adjunctive Metabolic Therapies in Tumor Management. *Front Oncol*. 2021 Mar 8;11:640720.

104. Pecqueur C, Bui T, Gelly C, Hauchard J, Barbot C, Bouillaud F, Ricquier D, Miroux B, Thompson CB. Uncoupling protein-2 controls proliferation by promoting fatty acid oxidation and limiting glycolysis-derived pyruvate utilization. *FASEB J.* 2008 Jan;22(1):9-18.

105. Ke Q, Yuan Q, Qin N, Shi C, Luo J, Fang Y, Xu L, Sun Q, Zen K, Jiang L, Zhou Y, Yang J. UCP2-induced hypoxia promotes lipid accumulation and tubulointerstitial fibrosis during ischemic kidney injury. *Cell Death Dis.* 2020 Jan 13;11(1):26.

106. Burch TC, Rhim JS, Nyalwidhe JO. Mitochondria Biogenesis and Bioenergetics Gene Profiles in Isogenic Prostate Cells with Different Malignant Phenotypes. *Biomed Res Int.* 2016; 1785201.

107. Li W, Nichols K, Nathan CA, Zhao Y. Mitochondrial uncoupling protein 2 is up-regulated in human head and neck, skin, pancreatic, and prostate tumors. *Cancer Biomark*. 2013;13(5):377-83.

108. Song F, Li JZ, Wu Y, Wu WY, Wang Y, Li G. Ubiquitinated ligation protein NEDD4L participates in MiR-30a-5p attenuated atherosclerosis by regulating macrophage polarization and lipid metabolism. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2021 Nov 4;26:1303-1317.

109. Alberts P, Rotin D. Regulation of lipid droplet turnover by ubiquitin ligases. *BMC Biol*. 2010 Jul 19;8:94.

110.Hu XY, Xu YM, Fu Q, Yu JJ, Huang J. Nedd4L expression is downregulated in prostate cancer compared to benign prostatic hyperplasia. Eur J Surg Oncol. 2009 May;35(5):527-31. doi: 10.1016/j.ejso.2008.09.015.

111.Syed V. TGF-β Signaling in Cancer. *J Cell Biochem*. 2016 Jun;117(6):1279-87.