



T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KSENOGRAFT KOLOREKTAL KANSERDE NOTCH,
IL-1 VE LEPTİN (NILCO) İNHİBİSYONUNUN ETKİSİ**

DOKTORA TEZİ
Rumeysa ÖZYURT

DANIŞMAN
Prof. Dr. Nilüfer ERKASAP

2019



T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KSENOGRAFT KOLOREKTAL KANSERDE NOTCH,
IL-1 VE LEPTİN (NILCO) İNHİBİSYONUNUN ETKİSİ**

DOKTORA TEZİ
Rumeysa ÖZYURT

DANIŞMAN
Prof. Dr. Nilüfer ERKASAP

2019

KABUL VE ONAY SAYFASI

Rumeysa ÖZYURT'un doktora tezi olarak hazırladığı "KSENOGRAFT KOLOREKTAL KANSERDE NOTCH, IL-1 VE LEPTIN (NILCO) İNHİBİSYONUNUN ETKİSİ" başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirilerek "KABUL" edilmiştir.

Tarih

22.11.18

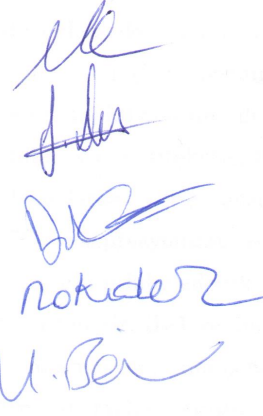
Üye: Prof. Dr. Nilüfer ERKASAP

Üye: Prof. Dr. Selda KABADERE

Üye: Prof. Dr. Didem TURGUT COŞAN

Üye: Prof. Dr. Nilşel OKUDAN

Üye: Prof. Dr. Muaz BELVİRANLI



Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun .../.../... tarih ve .../... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Özkan ALATAŞ

Enstitü Müdürü

ÖZET

Kolorektal kanser (KRK), tüm dünyada kansere bağlı morbidite ve mortalitenin önemli bir kısmını oluşturmaktadır. KRK tedavisinde cerrahinin yanı sıra hücre içinde kanser oluşumu ve/veya tedavisi üzerine etkili olabilecek yöntemlerin geliştirilmesi amacıyla pek çok moleküler çalışma yapılmaktadır. Bunun için öncelikle kolorektal kanser gelişimine neden olan hücre içi sinyal yollarının araştırılması gereklidir. KRK' da rol oynayan önemli hücre içi yollardan biri de Notch sinyalizasyon yolağıdır. Notch; proliferasyon, farklılaşma ve apoptosis arasındaki dengeyi düzenlemede önemli bir role sahiptir. Notch sinyalizasyonu tarafından düzenlenen bu süreçlerin bozulması ile kolon kanseri geliştiğı ancak Notch sinyalizasyonunun inaktivasyonu ile tümör büyümesinin inhibe edildiğı bilinmektedir. Proinflamatuvar sitokinlerden biri olan IL-1 ailesi KRK gelişiminin olduğu bölgelerde artış göstererek, karsinogenezis sürecini, tümör büyümesini ve VEGF ekspresyonunu artırarak tümör angiogenezisini uyarmaktadır. IL-1 sinyalizasyonu inhibe ederek yapılan çalışmalarda tümör angiogenezisinin gerilediğı gösterilmiştir. IL-1 ve önemli bir adipokin olan leptin arasındaki ilişki; obezite, inflamasyon, anjiojenezis ve kanser gelişiminde önemlidir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, leptinin sadece enerji metabolizması ile değil aynı zamanda angiogenezis, proliferasyon ve inflamasyonla da ilişkili olduğunu göstermiştir. Kolon hücrelerinde, adipokinlerin mitojen gibi davrandığı ve apoptozisi inhibe ederek tümör gelişimini uyardığı bilinmektedir. Meme kanser dokusunda yapılan çalışmalarda, proliferasyon, göç ve proanjiojenik moleküllerin ekspresyonu üzerine Notch, IL-1 ve leptin etkileşiminin (NILCO) rol oynadığı gösterilmiştir. NILCO aracılığıyla, anjiojenezisde rol oynayan VEGF / VEGFR2 gen ekspresyonunun artabileceğı ve tümör gelişimine katkıda bulunabileceğı öne sürülmektedir. Aynı zamanda çeşitli kanser türlerinde VEGF' in, Notch ligand ve reseptörlerinin ekspresyonlarını değiştirdiğı bildirilmiştir. Meme kanserinde yapılan çalışmalarda leptin ile indüklenen proliferasyonun inhibe edilmesi, VEGF / VEGFR-2, IL-1 ve Notch düzeylerini önemli oranda azaltarak tümör büyümesini baskılamıştır. Ancak NILCO etkileşimi ile kanser gelişimi arasındaki ilişkiye yönelik kolon

dokusunda yapılmış kapsamlı moleküler bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bizde bu çalışmada, NILCO ve bununla ilişkili anjiojenik / proinflamatuvar moleküllerin kolon kanseri üzerine etkisini araştırdık. Bu amaçla, in vivo kolon kanseri oluşturulmuş zenograft nude fare modelinde, KRK oluşumu üzerine Notch, IL-1 ve leptin (NILCO) inhibisyonunun etkilerini, bu yolaktaki hedef gen ve ilişkili protein ekspresyonlarını analiz ettik. Sonuçlarımıza göre; Notch yolağı inhibitörü olan DAPT, NILCO ilişkili tüm gen ekspresyonlarını, VEGFA ve VEGFR1 mRNA düzeylerini azaltmıştır. IL-1 yolağının inhibitörü olan Anakinra ise VEGFR2 gen ekspresyonunu ve NILCO yolağının tüm protein ekspresyonlarını azaltmıştır. Leptin reseptör antagonisti Allo-aca, leptin, leptin ObR ve VEGFR2 ekspresyonunu azaltmıştır. Bu sonuçlar, DAPT ve Anakinra' nın zenograft KRK modelinde antianjiojenik ve antiinflamatuvar gibi davranarak NILCO yolağı inhibisyonu ile tümör gelişimini baskılayabileceğini düşündürmüştür. Elde ettiğimiz bu sonuçlar, kolorektal kanser oluşum mekanizmasında rol oynayan NILCO ilişkili hücre içi yolaklar hakkında fikir verebileceği gibi bu hedef yolakların inhibisyonu ile yeni tedavi yöntemlerini de literatüre kazandırabilecektir.

Anahtar Kelimeler: Kolorektal Kanser, Notch, IL-1, Leptin, NILCO

SUMMARY

Colorectal Cancer (CRC) is an important part of cancer related morbidity and mortality in all the world. To have more success in treatment of CRC, besides surgical treatments many molecular studies are performed for understanding the progression of cancer. It is necessary to investigate the intracellular signaling pathways in the development of CRC. One of the important intracellular signaling pathways playing role in CRC is Notch pathway. Notch has an important role in regulation of the balance of proliferation, differentiation and apoptosis. More, it is necessary for continuity and homeostasis if intestinal epithelium. It is known that distortion of Notch signaling regulation causes CRC development and inactivation of Notch signaling inhibits tumor progression. IL-1, one of the proinflammatory cytokines, shows an increase in CRC progression regions and triggers carcinogenesis, tumor progression and tumor angiogenesis via increasing VEGF expression. The studies that inhibited the IL-1 signaling showed the decrease in tumor angiogenesis. The relation between IL-1 family and adipokine leptin is important in obesity, inflammation, angiogenesis and cancer progression. Novel studies showed that leptin is not only related with energy metabolism but also related with angiogenesis, proliferation and inflammation. It is known that in colon cells adipokines act like a mitogen and triggers tumor progression by inhibiting apoptosis. It is shown that in breast cancer interaction of Notch, IL-1 and leptin (NILCO) plays a role in proliferation, migration and expression of proangiogenic molecules. It is projected that through NILCO, gene expression of VEGF/VEGR2, that plays a role in angiogenesis, may increase and may contribute to tumor progression. However VEGF regulates Notch and its receptor expression, the expression of this ligand and its receptor found to be increased in many types of cancer in different tissues. The studies performed in breast cancer showed that the inhibition of proliferation induced by leptin, decreased the tumor progression by increasing VEGF/VEGFR-2, IL-1 and Notch levels. Although there is no comprehensive molecular study in colon tissue about the correlation between tumor progression and NILCO contribution. For this purpose we planned to study the effect of NILCO and

angiogenic/proinflammatory molecules related to NILCO on CRC. In this study, we will analyze the effect of NILCO inhibition on CRC progression and expression of genes and proteins related to this pathway in CRC model of xenograft nude mice. According to our results; The notch pathway inhibitor, DAPT, NILCO, was reduced all the gene expression, VEGFA and VEGFR1 reduction. Anakinra, an inhibitor of the IL-1 pathway, reduced VEGFR2 gene expression and all protein expression of the NILCO pathway. Allo-aca, the leptin receptor antagonist; leptin reduced leptin ObR and VEGFR2 expressions. This suggests that DAPT and Anakinra may suppress tumor growth by inhibition of NILCO pathway by acting as antiangiogenic and anti-inflammatory in CRC. The results of this study will give information about the NILCO related intracellular pathways involved in the formation of colorectal cancer and the new treatment methods with the inhibition of these target pathways.

Key Words: Colorectal Cancer, Notch, IL-1, Leptin, NILCO

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Kanser Nedir ?	2
2.2. Hücre Döngüsü	4
2.2.1. Hücre bölünmesi açısından normal hücrelerle kanser hücreleri arasında 4 fark vardır:	5
2.3. Kanser Neden Oluşur ?	6
2.3.1. Tümör Biyolojisi	6
2.4. Anjiyojenez	7
2.5. Kolorektal Kanser	8
2.5.1. Kolorektal Kanser Nedir ?	8
2.5.3. Tarama Testleri	11
2.6. NILCO (Notch, IL-1 ve Leptin Etkileşimi)	11
2.7. NOTCH	12
2.7.1. Notch Sinyalizasyonu'nun Özellikleri	13
2.7.2. Notch Sinyalizasyonu'nun Temel Bileşenleri	14
2.7.3. Reseptörleri ve Ligantları	15
2.7.4. Nükleer Kompleks	16
2.7.5. Fizyolojik gelişim süreci ve Hastalıkta Notch Sinyalizasyonu	17
2.7.6. Notch Sinyalizasyonu ve Kolorektal Kanser	18
2.8. İnterlökin (IL)-1	19
2.8.1. Hastalıklarda IL-1 Blokajı İçin Tedavi Seçenekleri	21
2.8.2. IL-1 ve Kolorektal Kanser	21
2.9. Leptin	22
2.9.1. Leptin Reseptörleri	22
2.9.2. Leptin Sinyalizasyonu	23
2.9.3. Enerji Homeostazisinde Leptin'in Rolü	24
2.9.4. Metabolizmada Leptinin Rolü	25
2.9.5. Bağışıklık Fonksiyonunda Leptinin Rolü	26
2.9.6. Kanser Patogenezinde Leptinin Rolü	26
2.9.7. Leptin ve Kolorektal Kanser	27
2.10. NILCO ve Kanser	28
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	30

3.1. Çalışmada Kullanılan Malzeme ve Solüsyonlar	30
3.1.1. Cihazlar	30
3.2. Deney Protokolü	31
3.3. Zenograft (scid (NOD / SCID) Fare Üretimi	31
3.4. İn-vivo Kanser Oluşturulması	32
3.5. Tedavi	32
3.6. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) Tekniği ile Hedef Genlerin Tayini	33
3.6.1. RNA izolasyonu	33
3.6.2. cDNA sentezi	34
3.6.3. qRT-PCR	34
3.7. Western Blotting Metodu İle Protein Ekspresyon Tayini	35
3.7.1. Protein izolasyonu ve Total Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi	35
3.7.2. Western Blotting	36
3.8. Hematoksilen Eozin Boyama	36
3.9. İstatistiksel Analiz	37
4. BULGULAR	38
4.1. Tümör bulguları	38
4.1.1. Tümör volüm değişiklikleri	39
4.2. Hematoksilen Eozin Bulguları	39
4.3. qRT-PCR Bulguları	41
4.4. Western Blotting Bulguları	46
5. TARTIŞMA	47
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	52

Şekiller Dizini

Sayfa

Şekil 2. 1. NILCO, VEGF / VEGFR-2'yi yükseltir ve meme kanserinde leptin kaynaklı hücre çoğalmasına/göçüne aracılık eder (Guo & Gonzalez-Perez,2011).....	12
Şekil 2. 2. Notch sinyal yolağının basit bir diyagramı (Pintar vd., 2007).....	14
Şekil 2. 3. Notch reseptör yapısının şematik diyagramı (Yamamoto, Schulze & Bellen,2014)	16
Şekil 2. 4. IL-1 ailesi üyelerinin hücrel kaynakları ve immün sistemdeki rolleri (Yun, Man & Yong-ming, 2019) (DC'ler, dendritik hücreler; IL-18BP, IL-18-bağlayıcı protein.....	19
Şekil 2. 5. Leptin reseptörleri (Marroqui, Gonzalez & Neco, 2012).....	23
Şekil 2. 6. Leptin, Notch ve İnterlökin etkileşimi (NILCO) (Lipsey, Harbuzariu, Daley-Brown & Gonzalez-Perez, 2016)	29
Şekil 4. 1. HCT-15 kolon kanser hücreleri enjekte edilmiş scid (NOD/SCID) farelerdeki tümör görüntüsü.....	38
Şekil 4. 2. scid (NOD/SCID) farelerden çıkarılmış tümörlerin makroskopik görüntüsü.....	38
Şekil 4. 3. HCT-15 kolon kanser hücreleri enjekte edilmiş scid (NOD/SCID) farelerde tedavi süresi boyunca tümör volüm değişiklikleri.....	39
Şekil 4. 4. Solvent 1 grubunun H&E görüntüleri. Tümör dokusunun panoramik görünümü.....	40
Şekil 4. 5. Solvent 2 grubunun H&E görüntüleri. Tümör dokusunun panoramik görünümü.....	40
Şekil 4. 6. Allo-Aca grubunun H&E görüntüleri. Tümör dokusunun panoramik görünümü.....	40

Şekil 4. 7. DAPT grubunun H&E görüntüleri. Tümör dokusunun panoramik görünümü.....	41
Şekil 4. 8. Anakinra grubunun H&E görüntüleri. Tümör dokusunun panoramik görünümü.....	41
Şekil 4.9. Leptin geninin DAPT (A), Allo-aca (B) ve IL-1 inhibitörü (C) verilen tedavi gruplarındaki mRNA ekspresyonu.....	42
Şekil 4.10. Ob-R geninin DAPT (A), Allo-aca (B) ve IL-1 inhibitörü (C) verilen tedavi gruplarındaki mRNA ekspresyonu	42
Şekil 4.11. Notch geninin DAPT (A), Allo-aca (B) ve IL-1 inhibitörü (C) verilen tedavi gruplarındaki mRNA ekspresyonu.....	43
Şekil 4.12. JAGGED1 geninin DAPT (A), Allo-aca (B), IL-1 inhibitörü (C) verilen tedavi gruplarındaki mRNA ekspresyonu.....	43
Şekil 4.13. IL-1 β geninin DAPT (A), Allo-aca (B), IL-1 inhibitörü (C) verilen tedavi gruplarındaki mRNA ekspresyonu.....	44
Şekil 4.14. IL-1R geninin DAPT (A), Allo-aca (B) ve IL-1 inhibitörü (C) verilen tedavi gruplarındaki mRNA ekspresyonu	44
Şekil 4.15. VEGF-A geninin DAPT (A), Allo-aca (B) ve IL-1 inhibitörü (C) verilen tedavi gruplarındaki mRNA ekspresyonu	45
Şekil 4.16. VEGF-R1 geninin DAPT (A), Allo-aca (B) ve IL-1 inhibitörü (C) verilen tedavi gruplarındaki mRNA ekspresyonu.....	45
Şekil 4.17. VEGF-R2 geninin DAPT (A), Allo-aca (B), IL-1 inhibitörü (C) verilen tedavi gruplarındaki mRNA ekspresyonu.....	46
Şekil 4.18. DAPT , Allo-aca , IL-1 inhibitörü verilen tedavi gruplarındaki protein ekspresyonları	46

Simge ve Kısaltmalar Dizini

KRK	: Kolorektal Kanser
VEGF	: Vasküler Endoteliyal Growth Faktör
VEGFR1	: Vasküler Endoteliyal Growth Faktör Reseptör 1
VEGFR2	: Vasküler Endoteliyal Growth Faktör Reseptör 2
IL-1	: İnterlökin 1
IL-1α	: İnterlökin 1 alfa
IL-1β	: İnterlökin 1 beta
IL-1R1	: İnterlökin 1 tip 1 reseptör
JAK2 / STAT3	: Janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription3
LR	: Leptin Reseptörü
TNBC	: Triple-negative breast cancer
TNF-α	: Tümör nekroz faktörü-alfa
IL-6	: İnterlökin-6
IL-12	: İnterlökin-12
PBS	: Phosphate Buffered Saline
qRT-PCR	: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
H&E	: Hematoksilen Eozin

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Çeşitli kanser türlerinde yapılan çalışmalarda, proliferasyon, göç ve proanjiojenik moleküllerin ekspresyonu üzerine Notch, IL-1 ve leptin etkileşiminin (NILCO) rol oynadığı gösterilmiştir. Buna ilaveten, NILCO aracılığı ile anjiojenezisde rol oynayan VEGF / VEGFR2 gen ekspresyonunun artarak tümör gelişimine önemli katkıda bulunabileceği öne sürülmektedir. Ayrıca çeşitli kanser türlerinde VEGF' in, Notch ligand ve reseptörlerinin ekspresyonunu değiştirdiği bildirilmiştir. Meme kanserinde yapılan çalışmalar da leptin ile indüklenen proliferasyonun inhibe edilmesi, VEGF / VEGFR-2, IL-1 ve Notch düzeylerini önemli oranda azaltarak tümör büyümesini baskılamıştır. Ancak yapmış olduğumuz literatür araştırmalarında, NILCO yolağı ve kanser gelişimi arasındaki ilişkiye yönelik kolon dokusunda yapılmış moleküler bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu amaçla; NILCO ve bununla ilişkili anjiojenik / proinflamatuvar moleküllerin kolorektal kanser üzerine etkisini çalışmayı planladık. 40 adet zenograft nude fare kullanılarak yaptığımız bu çalışmada, KRK oluşumu üzerine NILCO inhibisyonun etkileri, bu yolaktaki hedef genler ve ilişkili protein ekspresyonları analiz edilmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlar, KRK oluşum mekanizmasında rol oynayan NILCO ilişkili hücre içi yolaklar hakkında bilgi vereceği gibi bu hedef yolakların inhibisyonu ile yeni tedavi yöntemlerini de literatüre kazandıracaktır.

2. GENEL BİLGİLER

Çok hücreli organizmalarda hücreler, hücre döngüsündeki kurallara uygun olarak işlev gördüğü zaman gelişebilir. Bazı durumlarda hücreler bu kurallara aykırı olarak kontrolsüz bir biçimde bölünür ve çoğalırlar. Son yıllarda hücre biyolojisi, moleküler biyoloji ve biyokimya alanında yapılan çalışmalar, hücrelerin temel işlevlerini yerine getirmesine izin veren moleküler süreçler hakkında detaylı bilgiler sağlamıştır. Temel hücre biyolojisi üzerine yapılan araştırmalar kanser mekanizmaları hakkında da önemli gelişmelere yol açmıştır. Hücre döngüsü boyunca ilerlemeyi kontrol eden bazı özel moleküller, hücre büyümesini düzenler. Normal hücre döngü sürecinin ve bunun nasıl değiştiğinin anlaşılması kanseri tetikleyen mekanizmalar hakkında önemli bilgiler sağlar.

Bütün kanser türlerinde hücreler, normal hücre bölünmesini düzenleyen süreçlerin değişikliğine bağlı olarak gelişen anormal hücrelerdir. Bu değişiklikler genellikle kalıtsal mutasyonların sonucudur veya UV ışığı, X-ışınları, kimyasallar, tütün ürünleri ve virüsler gibi çeşitli çevresel faktörler tarafından tetiklenirler. Bütün bu bilgiler kanser gelişiminin tek bir nedene bağlı olmadığını göstermektedir. Aksine, normal bir hücrenin invaziv bir kansere dönüşebilmesi için bir dizi değişik olayların olması gereklidir. Çoğu zaman bu değişikliklerin başlaması ile kanser gelişimi arasında bir kaç yıl vardır. Bu nedenle moleküler biyolojik tekniklerin gelişimi, tümörlerin erken dönemlerde tanısına yardımcı olabilecektir.

2.1. Kanser Nedir?

Kanser, normal hücrelerin özelliklerini değiştiren bir dizi moleküler olaylardan kaynaklanır. Kanser hücrelerinde, hücrenin aşırı büyümesini ve diğer dokulara yayılmasını önleyen kontrol sistemleri devre dışıdır. Bu hücreler büyüdükçe, hücre yapısında değişiklikler, hücre adezyonunda azalma ve yeni enzimlerin üretimi de dahil olmak üzere pek çok farklı özellikler geliştirebilir. Bu tür özellikler kanser hücrelerinin diğer dokulara yayılmasına izin verir. Kanser hücrelerinde genellikle hücre bölünmesini düzenleyen protein kodlayıcı genlerde mutasyonlar gelişir. DNA hasarını onaran

proteinleri yapan genler kendileri de mutasyona uğradıkları için zamanla daha fazla gen mutasyonu ortaya çıkar. Sonuç olarak, mutasyonlar artmaya başlar ve hücreden hücreye aktarılarak anormalliklere neden olur. Mutasyona uğramış hücrelerden bazıları ölürken bazıları normal hücrelerden çok daha hızlı çoğalma yeteneğine sahip olurlar. Bu hücreler orijinal konumlarında kaldıkları sürece iyi huylu olarak kabul edilirler, eğer yayılma özelliğine sahipse malign (kötü huylu) olarak kabul edilirler. Malign tümörlerde, kanser hücrelerinin metastaz yetenekleri vardır ve kanser hücreleri yeni tümörlerin gelişebileceği diğer dokulara yayılabilir (Schneider, 2001).

2.1.1. Kanser Genetiği

İnsan genomunda yaklaşık 35.000 genin sadece az bir kısmı kanserle ilişkilendirilmiştir. Aynı gendeki değişiklikler sıklıkla farklı kanser formlarıyla ilişkilidir. Bu anormal fonksiyonlu genler genel olarak üç gruba ayrılabilir. Proto-onkogenler olarak adlandırılan *ilk grup*, normal hücre bölünmesini artıran veya normal hücre ölümünü engelleyen protein ürünlerini üretir. Eğer bu genler mutasyona uğrarsa onkogenler olarak adlandırılır. Tümör süpresörleri (baskılayıcıları) olarak adlandırılan *ikinci grup*, hücre bölünmesini normal olarak önleyen veya hücre ölümüne neden olan proteinleri üretir. *Üçüncü grup* ise kansere yol açan mutasyonları önlemeye yardımcı olan DNA onarım genlerini içerir. Onkogenler ve tümör süpresörleri etkileyen mutasyonlar anormal büyümeyi hızlandırır. Böylece kontrolsüz hücre büyümesi gerçekleşir ve bu da kanser gelişimine neden olabilir (Chae vd., 2016).

2.1.2. Onkogenler ve Sinyal İletimi

Normal hücrelerde, proto-onkogenler, hücre bölünmesini uyarmak için çekirdeğe sinyal gönderen proteinleri kodlarlar. Bu sinyali ileten proteinler, sinyal molekülü için bir zar reseptörü, sitoplazma yoluyla sinyali taşıyan ara proteinler ve hücre bölünmesi için genleri aktive eden nükleus içindeki transkripsiyon faktörlerini içerirler. Onkogenler; bu sinyal moleküllerini kodlayan proto-onkogenlerin mutasyona uğramış tipleridir. Onkogenler, sinyalizasyon kaskadını sürekli olarak harekete geçirerek, büyümeyi uyaran

faktörlerin artışına neden olur. Bir proto-onkogenin bir onkogene dönüşümü proto-onkogenin mutasyonu ile meydana gelir. Bazen bir virüs kendi DNA'sını proto-onkogenin içine veya yakınına ekleyerek onkogene dönüşmesine neden olur. Bu olayların sonucunda, kanser gelişimine katkıda bulunan değişmiş bir gen oluşur. Çoğu onkogenler dominant mutasyonlardır; bu genin tek bir kopyası, büyüme özelliğinin ortaya çıkabilmesi için yeterlidir. Bir üreme hücresinde (yumurta veya sperm) bir onkogenin varlığı, yavrularda kalıtsal tümör oluşumu için yatkınlık sebebidir ancak tek bir onkogen kanser oluşumu için yeterli değildir (Harvey Lodish, 2000).

2.1.3. Tümör Süpressör Genleri

Tümör baskılayıcı genler tarafından üretilen proteinler; normalde tümör oluşumunu önleyerek hücre büyümesini inhibe eder. Tümör baskılayıcı genlerin ürünleri, hücre zarında, sitoplazmada veya nükleusta etkili olabilir. Bu genlerdeki mutasyonlar; hücre büyümesi ve bölünmesinin inhibisyonunu önlerler aynı zamanda genellikle çekiniktirler. Bu durumun ortaya çıkması için normal genin her iki kopyasının mutasyona uğraması gerekir (Harvey Lodish, 2000).

2.1.4. DNA Tamir Genleri

Kanserle ilişkili genlerin üçüncü tipi DNA tamirine ve kromozom yapısının korunmasına dahil olan genlerdir. Radyasyon, UV ışığı ve kimyasallar gibi çevresel faktörler DNA'da hasara neden olabilir ve böylece mutasyona yol açabilir. Belirli gen ürünleri kromozom hasarını tamir eder ve hücredeki mutasyonlar en aza indirilir (Chae vd., 2016).

2.2. Hücre Döngüsü

Normal hücreler hücre döngüsü ile uyumlu bir şekilde büyür ve bölünür. Proto-onkogenler veya tümör süpressör genlerdeki mutasyonlar kanser hücresinin kontrolsüz bir şekilde büyümesine ve bölünmesine neden olur. Birkaç protein, hücrelerin sadece gerekli olduğunda bölünmesini sağlayarak hücre döngüsündeki olayların zamanlamasını kontrol eder. Bu düzenleme mekanizmasının kaybı kanser oluşumu için en önemli faktördür.

Hücre döngüsünün majör kontrol molekülleri siklin-bağımlı kinazlardır. Her siklin-bağımlı kinaz belirli bir siklin proteini ile kompleks oluşturur ve böylece siklin-bağımlı kinaz aktifleşir. Kompleksin kinaz kısmı döngü boyunca hücrenin ilerleyebilmesi için gerekli olan çeşitli proteinlere fosfat ekler. Eklenen fosfatlar proteinin yapısını değiştirerek fonksiyonuna bağılı olarak proteini aktifleştirir ya da inaktifleştirir. Hücre döngüsünün G1,S ve M fazlarına giriş noktalarında önemli olan spesifik siklin-bağımlı kinaz/siklin kompleksleri vardır.

Hücre döngüsünde önemli bir diğerk protein de p21 olarak adlandırılan proteinin transkripsiyonunu aktive eden p53'dür. p21, G1 fazı boyunca ilerlemek için gerekli olan siklin bağımlı bir kinazın aktivitesini bloke eder. Bu blok, replikasyon gerçekleşmeden önce DNA'nın tamir edilmesi için hücreye zaman kazandırır. Eğer DNA hasarı tamir edilemeyecek kadar fazla ise p53 hücreyi ölüme götürür. Kansere yol açan en yaygın mutasyon p53 proteinini üreten gendedir. Siklin-bağımlı kinazları inhibe ederek hücre döngüsünü durduran diğerk proteinler p16 ve retinoblastoma (RB)'dir. p53'ü de içeren bu proteinlerin tamamına tümör süpressörler denir.

2.2.1. Hücre bölünmesi açısından normal hücrelerle kanser hücreleri arasında 4 fark vardır:

1. Normal hücreler bölünmek için büyüme faktörlerine gereksinim duyarlar. Bu büyüme faktörlerinin sentezi hücre döngüsündeki kontrol mekanizmaları ile inhibe edildiğinde hücreler bölünmeyi durdururlar. Oysa kanser hücreleri bu büyüme faktörlerinden bağımsız olarak bölünebilirler.
2. Normal hücreler kontakt inhibisyon gösterir. Yani komşu hücreler ile iletişime geçerek hücre bölünmesini durdururlar. Bu özellik kanser hücrelerinde yoktur. Diğerk hücreler ile temas halinde olsalar bile büyümeye devam ederler ve büyük kitleler oluştururlar.
3. Normal hücreler kontrollü bir şekilde büyür ve ölürler. Bunlarda apoptozis normaldir yani hücrelerin programlı ölümü söz konusudur. Normal hücreler ölmeden önce yaklaşık 50 defa bölünebilirler. Bu onların DNA'larını sınırlı

sayıda replike etme kabiliyetinden dolayıdır. Kromozomlar replike oldukça telomeraz kısalır. Ancak, kanser hücrelerinde telomeraz her zaman aktiftir ve sınırsız hücre bölünmesine izin verir.

4. Normal hücreler, DNA hasarı olduğunda veya hücre bölünmesi anormal olduğunda bölünmeyi durdurur. Ancak kanser hücreleri, DNA'da büyük miktarda hasar olsa bile bölünmeye devam ederler ve böylece zarar görmüş DNA miktarı gittikçe artar (Harvey Lodish, 2000).

2.3. Kanser Neden Oluşur?

Kanser gelişimi için geçerli olan model tümör süpressör genler ve onkogenlerdeki mutasyonlar veya hücre bölünmesini kontrol eden ana genlerdeki mutasyonlardır. Bir ana gende mutasyon oluşursa kromozomlar eksik veya fazla kopyalanır bu da anormal replikasyon ile sonuçlanır. Bu anormal replikasyon, gen transkripsiyonunda değişikliğe yol açarak hücrenin spesifik bir proteini çok az veya çok fazla üretmesine neden olur. Bu durum, büyüme faktörleri veya tümör baskılayıcılar gibi hücre döngüsünü kontrol eden bir veya daha fazla protein miktarını değiştirerek kansere yol açabilir (Gibbs, 2003).

2.3.1. Tümör Biyolojisi

Kanser hücreleri, tümör oluşturmak için kontrolsüz büyüyen, bağımsız hücreler gibi davranır. Tümörler bir kaç aşamada büyür. *İlk aşama* hiperplazidir, yani kontrolsüz hücre bölünmesinden kaynaklanan çok fazla hücre olduğu anlamına gelir. Bu hücreler normal görünür ancak büyüme kontrolünün kaybına neden olan değişiklikler gösterir. *İkinci aşama*, hücrelerde anormal değişikliklerle birlikte daha fazla büyümeden kaynaklanan displazilerdir. *Üçüncü aşama* ise daha da anormal olan ve gittikçe daha geniş bir doku alanına yayılabilen hücreleri oluşturan ek değişiklikler içerir. Bu hücreler orijinal işlevlerini de kaybetmeye başlarlar ve anaplastik hücreler olarak adlandırılır. Bu aşamada, tümör hala orijinal yerindedir ve invaziv olmadığı için sadece potansiyel olarak maligndir. *Dördüncü aşama*, metastaz dönemidir yani tümör hücrelerinin başka yerlere

yayılabilecekleri anlamına gelir. Bu en ciddi tümör tipidir ancak tüm tümörler bu noktaya kadar gelmeyebilir ("Cell Biology and Cancer," ; Schneider, 2001).

2.4. Anjiyojenez

Tümör hücreleri büyümek için besin ve oksijene ihtiyaç duyarlar. Tümörler büyüdükçe, hücrelere kanlanma ile besin ve oksijen sağlamak için yeni kan damarları oluşturur. Anjiyojenez denilen bu işlemde, tümör hücreleri, yeni kılcal kan damarların oluşumunu indükleyen büyüme faktörleri ve anjiyojenik faktörleri üretirler. Anjiyojenez olmaksızın tümör hücreleri büyümez, yeni dokulara yayılamaz veya metastaz yapamazlar. Bir tümörde hem anjiyojenik hem de anjiyojenik olmayan hücreler bulunur ve her ikisinde kan damarları aracılığıyla yayılırlar. Anjiyojenik hücreler, hızla yeni yerleşimler ve yeni kan damarlarını oluşturarak tümörün hızlı bir şekilde büyümesini sağlar. Ancak anjiyojenik olmayan hücreler, kan yoluyla başka dokulara gidip büyüyerek dormant (uyuyan) tümörlere yol açmaktadır. Bilinen en az on beş anjiyojenik faktör vardır ve bunların çoğunun üretimi çeşitli onkogenlerle arttırılır. Bu nedenle bazı tümör hücrelerinde onkogenler, bu hücrelerin anjiyojenik faktörler üretmesine neden olurlar.

Son yıllarda, VEGF-VEGF reseptörleri, ephrin-Eph reseptörleri, anjiyopoyetin-Tie ve Delta-Notch sistemi gibi çeşitli sinyal moleküllerinin anjiyojenezde önemli rol oynadıkları belirlenmiştir. Bunlar arasında vasküler endotel büyüme faktörleri (VEGF) ve reseptörleri (VEGFR); vaskülojenezi, kan damarlarının gelişimini ve yeni kan damarlarının oluşumunu yani anjiogenezi düzenlerler (Ferrara & Kerbel, 2005).

VEGF gen ailesi en az 7 üye içerirken, VEGFR gen ailesinin 3 üyesi vardır (Shibuya, 1995); (Shibuya & Claesson-Welsh, 2006). VEGF-A ve onun reseptörleri olan VEGFR-1 ve VEGFR-2, tümör anjiyojenezi de dahil olmak üzere patolojik anjiyojenezde olduğu gibi aynı zamanda fizyolojik süreçlerde de önemli rol oynarlar (Alitalo & Carmeliet, 2002). VEGF-A, pro-anjiyojenik aktivite, vasküler geçirgenlik aktivitesi ile makrofaj ve endotel hücrelerinde hücre göçünün uyarılmasını içeren çeşitli fonksiyonlara sahiptir. Aynı zamanda, VEGF' ler fizyolojik seviyelerde çeşitli dokuların bakımı ve

iskemisini önlemek için yeni kan damarlarının oluşumunu sağlayan proanjiyogenik potansiyele de sahiptir (Shibuya, 2011). Ancak kanser gibi patolojik durumlarda yeni damar oluşumu kötü prognoz ve metastazla sonuçlanabilir.

2.5. Kolorektal Kanser

Kolorektal kanser kadınlarda ve erkeklerde en sık görülen kanser türlerinden biridir (Jemal vd., 2008). Kolorektal kanserin neden olduğu ölümlerin sayısını azaltmaya yardımcı olabilecek her yıl yapılan tarama teknikleri vardır. Ancak bu tarama teknikleri risk altındaki nüfus tarafından bilinçli bir şekilde yaptırılmamaktadır. 2000 yılında yapılan bir çalışmada, 50 yaş ve üstü yetişkinlerin sadece % 40'nın, son 5 yıl içinde bir kolonoskopi veya dışkı kan testi (FOBT) yaptırdıkları bildirilmiştir (Swan, Breen, Coates, Rimer, & Lee, 2003).

2.5.1. Kolorektal Kanser Nedir ?

Kolon ve rektum, vücudun sindirim sisteminin önemli bir parçası olan kalın bağırsağı oluşturur. Kolon veya rektum dokusu duvarlarında polip adı verilen tümöre yol açabilen bir yapı gelişebilir. Bu tümöral polipler, malign (kanser) veya iyi huylu olabilir. İyi huylu polipler zaman içinde adenomatoz poliplere dönüşebilir. Ancak tüm kolorektal kanserlerin yaklaşık % 85' i adenomatoz poliplerden gelişir. Kolon kanseri ve rektal kanser birlikte kolorektal kanser olarak adlandırılır. Bu kolorektal kanserler oldukça malign ve kötü prognozla beraber seyredebilir (Cooper, Yuan, Landefeld, & Rimm, 1996)

2.5.2. Risk Faktörleri

Epidemiyolojik çalışmalarda, kolorektal kanser için yaş, ailede kolon kanser öyküsü, inflamatuvar barsak hastalığı, sigara, alkol tüketimi, obezite ve yanlış diyet gibi risk faktörleri bildirilmiştir.

2.5.2.1. Yaş

Kolorektal kanser en sık 50 yaş ve üstü kişilerde görülür. SEER (Surveillance Epidemiology and End Results) Kanser İstatistikleri İnceleme

verilerine göre, 1998 ve 2002 arasında kolorektal kanser vakalarının % 15' inden daha azının 54 yaş altındakilerde, % 17' sinin 55-64 yaş arasında, % 26,3' ünün 65 ila 74 yaşları arasında, % 29.2' sinin 75 ve 84 yaşları arasında ve % 12,6' sının 85 yaş üstü kişilerde gözlendiği bildirilmiştir (Edwards vd., 2005).

2.5.2.2. Cinsiyet

Erkeklerde kolorektal kanser görülme riski kadınlardan daha fazladır. 2000-2004 yılları arasında Amerika' da yapılan taramalarda kolorektal kanser görülme oranı erkekler arasında her 100.000 kişide 69.2 ve kadınlar arasında her 100.000 kişide 45.8 olarak bildirilmiştir (Jemal vd., 2008).

2.5.2.3. Irk

Afrika kökenli Amerikalılarda kolorektal kanser riski en yüksek oranlara sahiptir. 2000-2004 yılları arasında Amerika' da yapılan taramalarda erkekler arasında her 100.000 kişide kolorektal kanser vakalarının sayısı beyazlar arasında 60.4, Afrika kökenli Amerikalılar arasında 72.6, Asyalı Amerikalılar ve Pasifik Ada kökenliler arasında 49.7, Amerika yerlileri ve Alaska yerlileri arasında 42.1 ve Hispanikler ve Latinler arasında 47.5 olarak bildirilmiştir (Jemal vd., 2008).

2.5.2.4. Aile Hikayesi

Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (CDC)' ne göre, ailesinde kolorektal kanser öyküsü bulunanlarda, kolorektal kanser gelişme riski daha yüksektir. Kolon kanseri gelişiminde aktive olan belirli genetik yollara ilaveten, kalıtsal olabilen ve tüm kolorektal kanser vakalarının yaklaşık % 10' unu oluşturan genetik mutasyonlar da rol oynar. Bu genetik mutasyonlardan biri, kolonda çok genç yaşlardan itibaren yüzlerce veya binlerce polip gelişmesine neden olan ailesel adenomatoz polipozis (FAP) dir (Heavey, McKenna, & Rowland, 2004). Bu poliplerin tedavi edilmemesi durumunda kansere dönüşme riski çok yüksektir. Kolorektal kansere neden olan bir başka genetik mutasyon ise kolorektal kanserlerin % 5-8' ini oluşturan kalıtsal polipoz olmayan kolorektal kanserdir (HNPCC). FAP' dan farklı olarak HNPCC, fazla sayıda polip içermez. Heavey ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada,

HNCPP kromozomun mikrosatellit bölgelerindeki mutasyonu artırarak karsinogenez sürecini hızlandırdığını bildirmişlerdir. HNPCC'li bir kişide yaşamı boyunca kolorektal kanser gelişme riski % 80'dir (Heavey vd., 2004). Diğer genetik mutasyonlar artmış kolon kanseri riski ile ilişkilendirilmiş olsa da, bu ikisi (FAP ve HNPCC) en yaygın olanlarıdır.

2.5.2.5. Sigara İçmek

Tütün kullanımı, insanlarda kolon kanseri de dahil olmak üzere pek çok çeşitli kanser riski ile karşı karşıya bırakır (Sinha vd., 1999). Botteri ve arkadaşları 42 adet denekte yapılan gözlem çalışmasına göre sigara içenlerin adenomatoz polip geliştirme riskinin hiç sigara içmemiş olanlardan çok daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir (Botteri, Iodice, Raimondi, Maisonneuve, & Lowenfels, 2008). İlâveten, sigara içenlerin sigara içmeyenlere göre daha fazla tekrarlayan adenom riskine sahip olduklarını göstermişlerdir (Heavey vd., 2004).

2.5.2.6. Diyet

Fazla kırmızı et daha az meyve ve sebze tüketimi, lif bakımından düşük diyetle beslenme kolorektal kanser riskini artırır (Heavey vd., 2004). Sinha ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada yüksek oranda kırmızı et ile beslenen kişilerde adenomatoz polip riskinde artış olduğu bildirilmiştir (Sinha vd., 1999). Avrupa prospektif kanser ve nütrisyon araştırma kurulu (EPIC) tarafından yapılan çalışmalardan elde edilen son bulgular, daha yüksek sebze tüketiminin, kolorektal kanser riskinin azalması ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Heavey vd., 2004).

2.5.2.7. Obezite

Son 30 yılda obezitenin önemli oranda arttığı bildirilmiştir (Hedley vd., 2004). Dünya Sağlık Örgütü, vücut kitle indeksine (body mass index, BMI) dayanarak her ağırlık sınıfının standart bir tanımını belirlemiştir. Çalışmanın sonuçları, yetişkin kadınların % 61,8' inin aşırı kilolu veya obez olarak kabul edildiğini göstermiştir (Ogden vd., 2006). Çok sayıda çalışma, fazla kilonun kolorektal kanser risk artışı ile ilişkili olduğunu bildirmiştir. Caan ve arkadaşları tarafından yapılan bir vaka kontrol çalışmasında, BMI'si yüksek

olan erkeklerin BMI'si düşük olanlara göre kolon kanseri gelişme ihtimalinin yaklaşık 2 katı olduğu gösterilmiştir (Caan vd., 1998). BMI ve kolon kanser riski arasındaki ilişkiyi inceleyen bir başka çalışmada da, BMI ≥ 30.0 kg / m² olanların normal BMI' ye kıyasla kolon kanseri gelişme riskinin arttığı bildirilmiştir (Nock, Thompson, Tucker, Berger, & Li, 2008).

2.5.2.8. Fiziksel Aktivite

Araştırmalar artmış fiziksel aktivitenin kolorektal kanser riskini azalttığını ortaya çıkarmıştır. Cinsiyete bakılmaksızın, fiziksel olarak aktif yetişkinlerin, aktif olmayan yetişkinlere kıyasla kolon kanser için düşük bir risk altında olduğunu göstermiştir (Friedenreich vd., 2006).

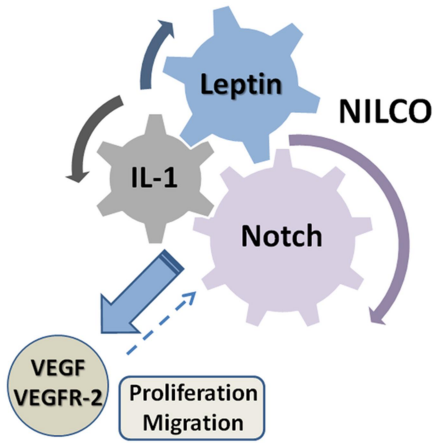
2.5.3. Tarama Testleri

Günümüzde kolon kanseri için birkaç farklı tarama testi türü bulunmaktadır. Bunlardan biri gaitada gizli kan testidir (GGT). GGT, dışkıda kan varlığını test eder ve kan görülmesi durumunda kolonda poliplerin bulunduğu işaret edebilir. Gaitada kan görülmesi durumunda kişiye kolonoskopi önerilir. Ailenin kolon kanseri öyküsü olanlar için daha erken yaşta, 50 yaş ve üstü olanlar için yıllık olarak kolonoskopi yapılması önerilmektedir. Bir diğer tarama testi ise sigmoidoskopidir. Kolonun alt kısmındaki kanserler için, esnek sigmoidoskopi testi, kolorektal kanserden ölüm riskini yaklaşık % 60 oranında azaltabilir. Ulusal Polip Çalışmasına göre, kişileri düzenli olarak kolonoskopiye tabi tutmak tüm kolon kanserlerinin % 76 ile % 90' ını erken teşhis ile önleyebilir (Rex vd., 2017). Eğer iyi huylu polipler erken yakalanır ve çıkarılırsa, malign tümöre dönüşme olasılığı daha da düşük olacaktır.

2.6. NILCO (Notch, IL-1 ve Leptin Etkileşimi)

Yapılan çalışmalarda, Notch, IL-1, leptin ve VEGF' in artmış seviyelerinin meme kanserinde düşük sağ kalım ve metastazla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca leptinin, meme kanserinde büyümeyi, VEGF / VEGFR-2 ve IL-1 ekspresyonunu artırdığı bildirilmiştir (Guo & Gonzalez-Perez, 2011). Bu sonuçlar, ilk olarak meme kanserinde Notch, IL-1 ve leptin arasındaki yeni bir etkileşimi (NILCO) ortaya çıkarmıştır. NILCO, özellikle leptin aracılığıyla,

proliferasyon, göç ve pro-anjiyojenik moleküllerin ekspresyonlarının indüklenmesinde önemli bir rol oynar (Şekil 2.1). Ancak yaptığımız literatür taramalarında, çeşitli kanser türlerinde NILCO etkisini ortaya çıkaran çalışmaların az sayıda olduğu ve özellikle de in vivo kolon kanser dokusunda yapılmış bir çalışma olmadığını gözlemledik. Bu bağlamda; kolon kanseri oluşturulmuş zenograft nude fare modelinde, KRK oluşumu üzerine Notch, IL-1 ve leptin (NILCO) inhibisyonunun etkilerini ortaya koyabilmek için bu yolaktaki hedef genler ve ilişkili proteinlerin ekspresyon düzeylerini ölçtük.



Şekil 2.1. NILCO, VEGF / VEGFR-2'yi yükseltir ve meme kanserinde leptin kaynaklı hücre çoğalmasına/göçüne aracılık eder (Guo & Gonzalez-Perez, 2011).

2.7. NOTCH

Notch, 1913 yılında Thomas Hunt Morgan'ın laboratuvarında keşfedildi (Morgan TH, 1916). Drosophilanın kanat distal ucunda doku kaybına neden olan “notch” ile ilgili en eski bilgi John S. Dexter tarafından 1914’de yayınlanmıştır (Dexter, 1914). Notch’un ilk alleli 1917’de kayda geçmiştir (Mohr, 1919). Notch ve hücre gelişiminde rol oynayan faktörler arasındaki ilk bağlantı ise 1930’larda Donald F. Poulson tarafından homozigot Notch mutant embriyoları üzerindeki çalışmasıyla kurulmuştur (Poulson, 1937). O dönemlerde elde edilen bir diğer önemli bulgu da Notch geninin klonlanması (Artavanis-Tsakonas, Muskavitch, & Yedvobnick, 1983) ve sekanslanmasıdır (Wharton, Johansen, Xu, & Artavanis-Tsakonas, 1985). Notch, hücre dışı ve hücre içi domainleri olan büyük transmembran protein olarak gösterilmiştir (Priess, Schnabel, & Schnabel, 1987). Notch’un yeni bir hücre içi sinyal yolağı reseptörü olarak işlev gördüğüne dair ilk bulgular 1990’ların başlarında kayda

geçmiştir (Greenwald & Rubin, 1992). *C. elegans*' da yapılan ilk çalışmalarda, Notch aktivasyonu ile γ -sekretaz aktivitesi arasında bağlantı kurulmuştur (Francis vd., 2002) daha sonra ise Notch reseptörünün hücre içi kısmının çekirdeğe transloke olduğu ve doğrudan transkripsiyonu düzenlediği bildirilmiştir (Coffman, Skoglund, Harris, & Kintner, 1993). Biyokimyasal yaklaşımlar Notch sinyal düzenlemelerinin kimyasal, fiziksel ve mekanik özelliklerinin anlaşılmasına büyük katkı sağlamıştır (Kovall & Blacklow, 2010). Hücre kültürü çalışmaları, Notch sinyal yolağını düzenleyen genleri ve mekanizmaları ortaya koyarak, Notch ile hastalıklar arasında bağlantı olduğunu göstermiştir (Artavanis-Tsakonas & Muskavitch, 2010). Reseptör ve ligandlardaki mutasyonların, gelişimsel bozukluklara neden olduğu ve yolağın yanlış düzenlenmesi ile çeşitli dokularda tümörlerin gelişimine sebep olduğu bildirilmiştir (Louvi & Artavanis-Tsakonas, 2012). Notch sinyal yolağının ana bileşenleri, antikanser tedavi için önemli ilaç hedefleri olarak ortaya konmuştur (Koch, Lehal, & Radtke, 2013).

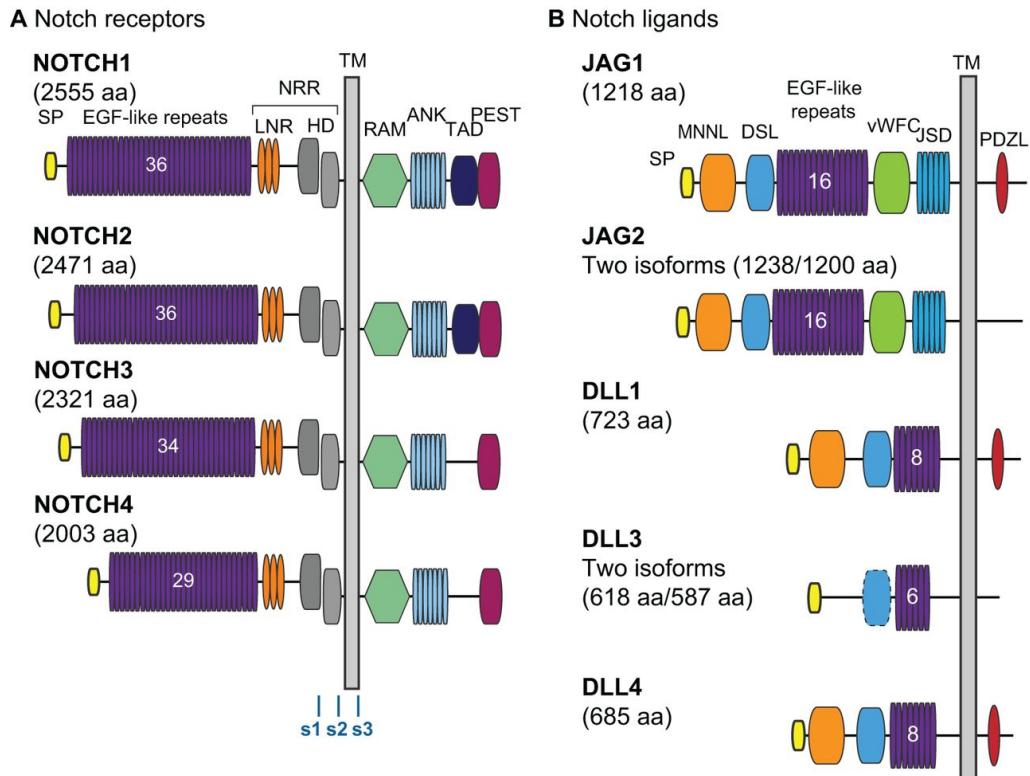
2.7.1. Notch Sinyalizasyonu'nun Özellikleri

Notch sinyal yolu, Wnt, Hedgehog ve TGF- β /BMP gibi diğer hücreler arası sinyal yolları ile karşılaştırıldığında birçok açıdan farklıdır. *İlk* olarak; kanonik Notch sinyali, yan yana komşu hücreler arasında meydana gelir ve doğrudan hücre-hücre temasını gerektirir, diğer çoğu sinyal yolağı ise difüzyon ve / veya aktif taşıma mekanizmaları aracılığıyla salgılanan ve uzak hücrelere ulaşan ligantlar sayesinde başlatılan parakrin sinyallemeyle dayanır. Bunun nedeni, Notch sinyal yolağının hem ligandlarının ve hem de reseptörlerinin, hücre zarına gömülü transmembran proteinleri olmasıdır (Kopan & Ilagan, 2009). *İkinci* olarak; Notch sinyalleri, sinyali çoğaltma özelliğinin olmaması nedeniyle doza duyarlıdır. Notch sinyalizasyonu, Notch'in hücre içi alanının (NICD) çekirdeğe translokasyonu yoluyla ortaya çıkar ve NICD doğrudan bir transkripsiyonel koaktivatör olarak işlev görür (Vassin & Campos-Ortega, 1987). Notch yolağındaki gen ve proteinlerde meydana gelen ekspresyon değişiklikleri farklı kanser türleriyle ilişkilidir (Nicolas vd., 2003). *Üçüncü* olarak; gelişimsel ve hücresel süreçlerin düzenlenmesinde Notch yolağı çok etkilidir. Örneğin, Notch sinyali, nöronal lateral inhibisyonda görev alır ve

spesifik hücre tiplerinin çoğalmasını ve gelişimini indüklemek için kullanılır (Artavanis-Tsakonas, Rand, & Lake, 1999). İlâveten, yolağın aktivasyonu veya inhibisyonu, hücre tipine bağlı olarak proliferasyon, farklılaşma veya hücre ölümü gibi çok çeşitli hücrel tepkilere yol açabilir. Son dönemlerde, yolun aktivasyonu sinaptik plastisite, öğrenme ve hafıza ile ilişkilendirilmektedir (de Bivort, Guo, & Zhong, 2009).

2.7.2. Notch Sinyalizasyonu'nun Temel Bileşenleri

Notch yolağının temel bileşenleri aşağıdaki şekilde gösterilmektedir (Şekil 2.2). Ligand komşu hücrede bulunan transmembran reseptörüne bağlanır. Daha sonra, reseptörün hücre içi bölümü (NICD) ayrılır çekirdeğe taşınır ve transkripsiyonu aktive etmek için bir transkripsiyon faktörü ve ko-aktivatörlerle etkileşime girer. Farklı doku ve hücre tiplerinde Notch sinyal yolunun çeşitli özellikleri değişikliğe uğramıştır (Andersson, Sandberg, & Lendahl, 2011). Bu özelliklerin bazıları genel düzenleyicidir ve Notch sinyal yolunun ana bileşenlerini etkiler, bazıları ise fonksiyon ve dokuya özel düzenleyicilerdir.



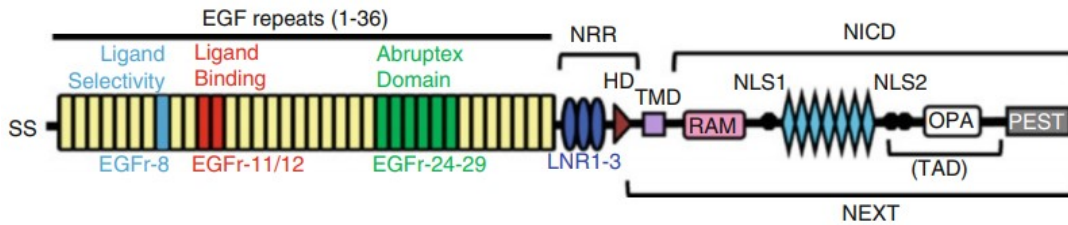
Şekil 2.2. Notch sinyal yolağının basit bir diyagramı (Pintar vd., 2007)

2.7.3. Reseptörleri ve Ligantları

Notch reseptörleri çok domainli tip I transmembran proteinleridir (Şekil 2.2.). İnsan dahil tüm memelilerde dört Notch reseptörü (Notch 1-4) bulunmaktadır. Notch reseptörleri endoplazmik retikulumda işlendikten sonra çeşitli post-translasyonel modifikasyonlar geçirerek plazma membranına yerleşir. ER' da, Notch'un N-terminalindeki sinyal sekansı ayrılır ve hücre dışı bölgesi protein glikosiltransferazların aracılık ettiği şeker modifikasyonlarına tabi tutulur (Rana & Haltiwanger, 2011). Örneğin, O-fut1 ile O-fukosilasyon (memelilerde Pofut1) ve bu şeker zincirinin Golgi kompleksi içinde O-GlcNAc ile uzatılması, Notch reseptörünün ligand seçiciliğini modüle eder (Munro & Freeman, 2000). Ek olarak, ER'da Rumi (memelilerde Poglut) ile O-glukosilasyon reseptör aktivasyonu için gereklidir (Acar vd., 2008). Bu zincirin O-ksiloz ile daha da uzatılması Notch sinyalini negatif olarak düzenler (Lee vd., 2013). Notch hücre dışı domaini, Furin benzeri proteazlarla Golgi kompleksindeki ilk proteolitik bölünmesine (S1) maruz kalır (Logeat vd., 1998). Bu işlemin Notch'in ekzositozunu kolaylaştırarak net sinyal aktivitesine katkıda bulunduğu düşünülmektedir (Lake, Grimm, Veraksa, Banos, & Artavanis-Tsakonas, 2009).

Her iki ligand, Delta ve Serrate (DSL ailesi ligandları olarak gruplandırılmış), büyük hücre dışı domaine ve nispeten kısa hücre içi domaine sahip tip I transmembran proteinlerdir (Kopan & Ilagan, 2009). Memelilerde, üç Delta ailesi ligandı (Dll1, Dll3 ve Dll4) ve iki Serrate ailesi ligandı (Jagged1 ve Jagged2) mevcuttur. Ligandlar aynı zamanda ER' da sentezlenir, golgi kompleksi aracılığıyla işleminden geçirilir ve zardan ekzositoza uğrar (Charng vd., 2014). Ayrıca, ligand-reseptör etkileşimlerinde, ligand-reseptör kompleksi, sinyal gönderen hücreye endositoz ile alınır (trans-endositoz), reseptör aktivasyonunu destekleyen konformasyonel bir değişikliğe yol açar. Ligand endositozu için E3 ligaz enzimi tarafından bu ligandların hücre içi kısımlarının ubiquitinasyonu gereklidir. Ligand ubiquitinasyonu yokluğunda, ligand-reseptör etkileşimi olabilir ancak sinyali aktive edemez. Ligand-reseptör kompleksinin endositozu üzerine, Notch reseptörü, ADAM (bir disintegrin ve metalloproteinaz) proteazları ile proteolitik bir bölünmeye uğrar

ve konformasyonel bir değişim geçirir. Bu, Notch reseptörünün ikinci defa (S2) bölünmesine ve hücre dışı domaininin salınmasına yol açar (Weinmaster & Fischer, 2011). Bu S2 bölünmüş Notch hala membrana gömülüdür ve genellikle Notch hücre dışı kesilmiş form (NEXT) olarak adlandırılır. NEXT, hücre içi bir proteaz olan γ -secretaz kompleksinin substratıdır (Jorissen & De Strooper, 2010). Bu nedenle, Notch, NEXT aracılığıyla, NICD'yi membrandan serbest bırakan üçüncü (S3) bölünmeye maruz kalır. Bölünmenin hücre içinde gerçekleştiği yer hala tartışma konusudur (Yamamoto, Charng, & Bellen, 2010). Zardan serbest kalan NICD, transkripsiyon düzenlemesine dahil olmak üzere çekirdeğe transloke olur ve çeşitli genlerin aktivitesini düzenler (Huenniger vd., 2010).



Şekil 2.3. Notch reseptör yapısının şematik diyagramı (Yamamoto, Schulze & Bellen, 2014)

2.7.4. Nükleer Kompleks

NICD, tek bir RAM (RBP-jk ilişkili molekül) domaini, yedi ankirin tekrarı (ANK), transaktivasyon domaini (TAD) ve karboksi terminalinde bir PEST (prolin (P) / glutamik asit (E) / serin (S) / treonin (T)) sekansı içerir (Şekil 2.3). Ek olarak, NICD, fosforilasyon (Ramain vd., 2001) ve ubiquitinasyon (Fryer, White, & Jones, 2004) gibi çoklu post-translasyonel modifikasyonlar için hedef bölgeler olarak çoklu nükleer lokalizasyon sekansları (NLS) içerir (Kopan, Nye, & Weintraub, 1994). Nükleusta NICD, DNA bağlayıcı bir transkripsiyon faktörü CSL [Drosophila'da Su (H) olarak da bilinir, memelilerde RBP-jk], RAM ve ANK bölgeleri aracılığıyla bir koaktivatör olan Mastermind (Drosophila'da Mam, memelilerde MAML1, MAML2, MAML3) ile etkileşime girer (Borggreffe & Liefke, 2012). NICD' in yokluğunda, CSL, DNA üzerindeki konsensüs sekansına bağlanır ve Notch hedef genlerinin ekspresyonu negatif olarak düzenlenir (Furriols & Bray, 2001). Notch

sinyalizasyonunun aktivasyonu ve NICD' in, CSL ve Mam'a bağlanması üzerine, korepressor kompleksi aktive edilerek gen hedeflerinin baskılanmasına neden olur (Morel & Schweisguth, 2000). Notch sinyalizasyonu, sürekli sinyal aktivasyonunu önlemek için NICD' in siklin-bağlı kinaz-8 (CDK8) gibi kinazlar tarafından fosforilasyonu (Fryer vd., 2004) ve ardından da SEL10 / FBXW7 gibi E3 ubiquitin ligazları ile poliübikasyonu yoluyla kapatılır (Hubbard, Wu, Kitajewski, & Greenwald, 1997). NICD' in poli-ubikütinasyonu, proteazom aracılı degradasyona ve sinyalin sonlandırılmasına yol açar (Oberg vd., 2001).

2.7.5. Fizyolojik gelişim süreci ve Hastalıkta Notch Sinyalizasyonu

Notch sinyalizasyonunun ligand aracılı aktivasyonunun çoğunun fizyolojik olaydan sorumlu olduğu düşünülse de, Notch reseptörlerinin ligandtan bağımsız aktivasyonunun in vitro ve in vivo olarak meydana gelebildiği ve kanser gibi patojenik olaylarla bağlantılı olduğu görülmüştür. Kültüre edilmiş hücrelerde Notch, hücre dışı kalsiyumu artırarak ligand bağımsız bir şekilde aktive edilebilir. Notch' un ligandan bağımsız aktivasyonu, in vivo olarak, lizozomal endositozun bozulduğu bazı mutantlarda da görülebilir. Ayrıca, Notch' un ligand bağımsız aktivasyonu, Notch ekstraselüler domaininin spesifik bir alanının mutasyona uğraması durumunda da gerçekleşebilir. T-ALL (T hücreli-akut lenfoblastik lösemi) hastalarında Notch1 mutasyonları Notch reseptörünün intraselüler bölümündeki PEST alanının kaybına neden olur (Weng vd., 2004). Bu, ubiquitin-proteazom sisteminin NICD' ye bağlı degradasyonunu önleyerek Notch sinyalizasyonunun uzun süreli aktivasyona yol açar.

Notch reseptörleri, ligandları, proteazları (örneğin γ -sekretaz kompleksi) ve nükleer kompleksleri (örneğin, CSL, Mastermind) birkaç klinik uygulama için temel ilaç hedefleri olarak kabul edilmektedir. Yeni geliştirilen ilaçlar, sadece kliniklerde değil, Notch sinyalleri ile düzenlenen farklı biyolojik ve patolojik olayları incelemek için laboratuvarlarda da yararlı olacaktır. γ -sekretaz kompleksine karşı küçük moleküller ve Notch reseptör ve ligandlarına karşı monoklonal antikolar mevcut olmakla birlikte Notch

aktivitesi in vivo ve in vitro çalışmalarda farmakolojik olarak manipüle edilebilir.

2.7.6. Notch Sinyalizasyonu ve Kolorektal Kanser

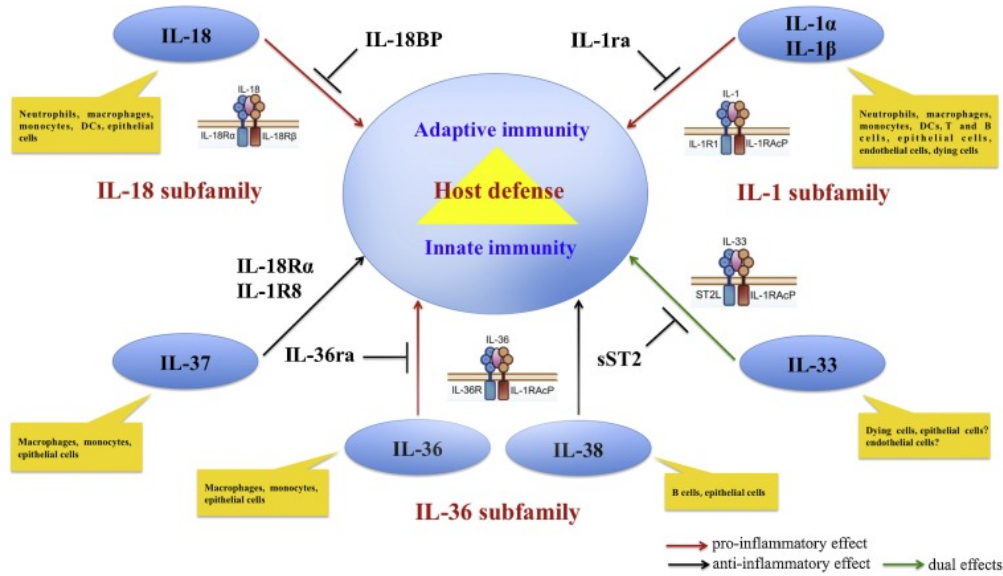
Yapılan çalışmalarda, notch sinyalizasyon yolağının kolorektal kanserde bozulduğu bildirilmiştir. β -catenin yolağı aracılığı ile Notch ligantı olan Jagged-1' in artması kolorektal kanserde Notch1 reseptör seviyesini de artırmıştır (Rodilla vd., 2009). Artmış Notch-1 reseptör seviyeleri, tümör evresi ve metastaz ile paraleldir. KRK' de Notch1 ve Notch2 reseptör seviyelerinin artışı tümör gelişim ve ilerlemesinde etkilidir. Hem Notch reseptörleri ve hem de Notch ligandlarının KRK' de değiştiği bildirilmiştir. Jagged1 ve Dll4 ile birlikte Notch3 reseptör seviyelerinin değişimi zenograflarda daha agresif bir fenotip ile ilişkilendirilmiştir (Wu vd., 2013).

Yeni tanı konmuş KRK hastalarının % 40-50' sinde metastaz gelişme olasılığı yüksektir. Notch' un tümör oluşum ve metastazını desteklediğine dair kanıtlara dayanarak, Notch sinyalizasyonunu hedef alan tedaviler belirlenmiştir. Notch1, Notch2 ve Notch3 reseptörlerine karşı geliştirilen monoklonal antikörlerin klinik uygulamaları halen test aşamasındadır (Aste-Amezaga vd., 2010). Anti-Dll4 antikoru olan OMP-21M18' in, zenograflarda tümör aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir (Ridgway vd., 2006).

Notch sinyali, önemli ölçüde γ -secretase aktivitesi ile düzenlenir. γ -secretase (GSI)' ın inhibitörleri Notch sinyalizasyonuna bağlı kanserlerin tedavisinde faydalı olabilir. GSI' ların belirli kanser hücrelerindeki sitotoksik aktivitesini gösteren klinik çalışmalar devam etmektedir (Pandya vd., 2011). Pre-klinik yapılan araştırmalar da ise GSI' lerin tümör gelişimini inhibe ettiği gösterilmiştir. Bununla birlikte, epitelyal kök hücrelerde yapılan çalışmalarda Notch inhibisyonu için GSI kullanımına bağlı olarak toksisite geliştiği bildirilmiştir. Bu nedenle, tümör büyümesini baskılayabilen ve aynı zamanda yan etkileri az olan GSI'lerin klinikte tedavi amaçlı geliştirilmesi önemlidir (Espinoza & Miele, 2013).

2.8. İnterlökin (IL)-1

1987 yılında bir çalışmada rapor edilen interlökin, interlökin-1 (IL-1) olarak tanımlanmıştır (C. A. Dinarello vd., 1987) ancak daha önce hematopoietin 1, endojen pirojen ve lökosit endojen mediatörü dahil olmak üzere başka isimler altında da tanımlanmıştır (C. A. Dinarello, Renfer, & Wolff, 1977). IL-1, aynı reseptörü (IL-1R1) paylaşan IL-1 α ve IL-1 β ligantlarından oluşur (Alheim vd., 1997). Daha sonraki yıllarda, IL-1 yolunu aktive etmeden onunla yarışmalı bir şekilde IL-1R1'e bağlanan IL-1 reseptör antagonisti (IL-1ra) keşfedilmiştir (Dower & Urdal, 1987). 2000' lerde ise, IL-33, IL-36, IL-37 ve IL-38 ligandları ile IL-36 reseptör antagonisti (IL-36ra) dahil olmak üzere, IL-1 ailesinin birkaç yeni üyesi daha tanımlanmıştır (C. Dinarello vd., 2010). Şekil 2.4. de IL-1 ailesinin tanımlanmış 11 farklı üyesi görülmektedir.



Şekil 2.4. IL-1 ailesi üyelerinin hücresel kaynakları ve immün sistemdeki rolleri (Yun, Man & Yong-ming, 2019) (DC'ler, dendritik hücreler; IL-18BP, IL-18-bağlayıcı protein; sST2L, çözünür ST2L)

Bu aile üyelerinin bazıları, aktif olabilmek için inflamasyona ihtiyaç duyarken diğerleri hücre hasarı veya nekroz sonucu serbest bırakılır. IL-1 ailesi sitokinleri genel olarak patojenlere karşı ilk savunma hattı olarak görev görmekle birlikte doğuştan ve adaptif immün yanıtları güçlendirerek pro-inflamatuar etkiler de gösterir (van de Veerdonk & Netea, 2013). Böylelikle

IL-1 ailesi sitokinleri, hücrel homeostazda önemli rol oynayarak, patojenlere, hasara ve çevresel streslere karşı savunmada rol oynar.

IL-1 α ve IL-1 β aynı reseptöre (IL-1R1) bağlanır ve benzer biyolojik özelliklere sahiptir ancak farklı genlerle kodlanır. İmmünite, inflamasyon ve kanser üzerinde etkilerinde de farklılıklar vardır. IL-1 α 'nın prekürsör proteini, tüm gastrointestinal sistemin epitel tabakalarında, akciğerde, karaciğerde, böbreklerde, endotel hücrelerinde ve astrositlerde bulunur (Rider vd., 2011). IL-1 α , inflamasyonun erken aşamalarına aracılık eder. Nekrotik hücrelerden salgılanan IL-1 α öncülüne ilaveten, aktive edilmiş monositler üzerinde de IL-1 α vardır. Bununla birlikte, dolaşımdaki IL-1 α , ciddi enfeksiyonlarda nadiren saptanır ve sadece endotel hücrelerinden salınan apoptotik cisimciklerde bulunur (Berda-Haddad vd., 2011). Aksine IL-1 β , monositler, doku makrofajları, deri dentritik hücreleri gibi hematopoietik hücreler ve beyin mikrogliya hücreleri tarafından üretilir (C. A. Dinarello, 2011). Yüksek IL-1 β salgılanması otoinflamatuvar hastalığı olan kişilerde inflamasyon ile bağlantılıdır. IL-1 α ve IL-1 β arasındaki bir başka fark ise karsinogenezde gözlenir; IL-1 β geni susturulmuş fareler, IL-1 α eksikliği veya wild type farelere kıyasla daha az tümör gelişimine neden olur (Krelin vd., 2007). IL-1 β , tümör anjiyojenезini ve tümörlerin metastatik yayılımını indükler (Carmi vd., 2013). IL-1 β tümör inflamasyonunda gerçekten de önemli bir bileşendir (Mantovani, Allavena, Sica, & Balkwill, 2008). IL-1 α , kansere neden olan genetik olaylarla (Ras mutasyonu) bağlantılı olan intrinsik yolun bileşenidir. Ayrıca IL-1 α , pankreas, cilt ve karaciğer kanserinde kanser insidansını artıran inflamatuvar koşullarda kritik bir rol oynar (Salcedo, Cataisson, Hasan, Yuspa, & Trinchieri, 2013). Anti-IL-1 ajanlarının etkileri kanser türüne göre farklılık göstermektedir. IL-1 α 'yı nötralize edici antikolar, terminal kolon kanserli hastalarda, umut vadeci sonuçlar nedeniyle klinik çalışmaya girmiştir (Hong vd., 2014). IL-1 ligand ailesinin bilinen iki reseptör antagonisti IL-1Ra ve IL-36Ra'dır (C. A. Dinarello, 2010). IL-1Ra, IL-1 α ve IL-1 β 'ya kıyasla IL-1R1'e daha yüksek afinite ile bağlanır. Farelerde IL-1Ra'nın eksikliğinde artrit ve psoriasis benzeri cilt lezyonları geliştiği ve kansere daha duyarlı hale geldiği gözlenmiştir (Horai vd., 2000).

2.8.1. Hastalıklarda IL-1 Blokağı İçin Tedavi Seçenekleri

Anakinra, doğal olarak oluşan IL-1Ra' nın rekombinant formunun genel adıdır ve romatoid artrit tedavisinde kullanılmak üzere 2001 yılında onaylanmıştır. Aynı zamanda romatoid artrite ilaveten pek çok hastalıkta da etkili olduğu kanıtlamış ve halen bu konuda yapılan klinik denemeler faz çalışmaları olarak devam etmektedir (C. A. Dinarello, Simon, & van der Meer, 2012). Anakinra'ya verilen yanıtlar hızlı ve sürdürülebilir ve özellikle sistemik juvenil idiyopatik artritli çocuklarda steroid kullanımında azalma sağlamıştır. Nötralize edici antikorlarla özellikle IL-1β' i hedef alan çok sayıda pre-klinik çalışma vardır. Otoinflamatuvar hastalıklarda, kaspaz-1' in ekspresyonunda meydana gelen değişiklikden dolayı aktive olmuş monositlerden IL-1β salınır. Canakinumab, sistemik başlangıçlı jüvenil idiyopatik artrit ve refrakter gut tedavisi için onaylanan IL-1β' yi özel olarak hedef alan insan monoklonal antikordur (Garlanda, Dinarello, & Mantovani, 2013). Nötralize edici monoklonal antikoru olan anti- IL-1α ise, Tip 2 diyabet, kanser, akne ve vasküler hastalıklarda test edilmiştir ve bütün bu durumlarda hastalığın kötü seyrini azaltmıştır (Hong vd., 2014).

2.8.2. IL-1 ve Kolorektal Kanser

TNF-α ve IL-1 gibi pro-inflamatuvar sitokinlerin, tümör mikro-ortamında aşırı salgılanması, kolon epitelinde mutasyonları indükleyen ve kanser gelişimine neden olan reaktif oksijen türleri (ROS) ile beraber nitrik oksit gibi DNA-hasar moleküllerinin üretimini hızlandırdığı tespit edilmiştir (Grivennikov, 2013). IL-1β geninin polimorfizmi, artmış IL-1β seviyeleri ile birlikte kolon kanser gelişim riskinin artmasıyla ilişkilendirilmiştir (Gunter vd., 2006). Buna karşılık, IL-1Ra' nın aşırı ekspresyonu ile ilişkili tek-nükleotid polimorfizmleri (SNP'ler), ilerlemiş KKK' lı hastaların daha uzun süre hayatta kalmasına yol açar (Graziano vd., 2009). Bu çalışmalarla, kolon IL-1β seviyeleri ile artmış KKK invazyonu arasındaki ilişki gösterilmiştir. Kolon epitel hücreleri tarafından salgılanan IL-1α ise malign hücrelerde artmış tümör invazyonu ile ilişkilendirilmiştir (Apte & Voronov, 2008). Bununla birlikte, IL-1α ve IL-1β' nın kronik kolon inflamasyonu, karsinogenez

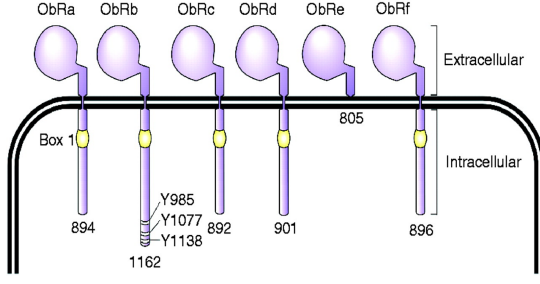
ve ayrıca KRK ' nın invazyonu üzerindeki etkileri henüz tam olarak bilinmemektedir.

2.9. Leptin

Leptin, 1994 yılında Jeffrey M. Friedman ve Douglas L. Coleman tarafından keşfedilmiştir. Adipoz dokudan türetilmiş hormon olan leptin, yağ depolarıyla orantılı olarak üretilir. Dolaşımdaki leptin, gıda alımını baskılamak ve enerji harcamasına izin vermek için vücuttaki enerji tüketiminin merkezi sinir sistemine iletilmesine yardımcı olur (Friedman & Halaas, 1998). Açlık sırasında leptin seviyeleri düşmekte iken beslenme ile yağ dokusundan salınan leptin seviyeleri yükselmektedir. Yeterli leptin seviyeleri üreme ve büyüme süreçlerinde enerji harcamasına izin verir ve benzer şekilde otonom sinir sistemini, endokrin sistemin diğer elementlerini ve bağışıklık sistemini düzenler (Bates & Myers, 2003). Leptinin veya leptin reseptörünün (LR) mutasyonuna bağlı olarak leptin sinyalleme eksikliği, azalan enerji harcaması ile birlikte artan gıda alımına yol açar (Montague vd., 1997).

2.9.1. Leptin Reseptörleri

Leptin, merkezi sinir sistemi ve bazı perifer dokularda bulunan leptin reseptörlerine (ObR) bağlanır (Fei vd., 1997). Leptin reseptörünün 6 izoformu tanımlanmıştır (ObRa, ObRb, ObRc, ObRd, ObRe, and ObRf) (Lee vd., 1996). Kısa izoformlar olan ObRa ve ObRc'nin, leptinin kan-beyin bariyeri boyunca taşınmasında önemli rol oynadığı düşünülmektedir (Bjorbaek vd., 1998). Leptin sinyalizasyonundan başlıca sorumlusu olan reseptör ObRb'dir. Birkaç organda eksprese edilen bu fonksiyonel leptin reseptörü, merkezi sinir sistemi boyunca, özellikle enerji homeostazını ve nöroendokrin fonksiyonu düzenleyen hipotalamusta yoğun bir şekilde eksprese edilir (Fei vd., 1997). Leptin ve reseptörlerinin yapısı şematik olarak aşağıda gösterilmiştir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Leptin reseptörleri (Marroqui, Gonzalez & Neco, 2012)

2.9.2. Leptin Sinyalizasyonu

2.9.2.1. Leptin ve STAT 3 Sinyalizasyonu

ObRb aktivasyonu birkaç sinyalizasyon yolağı ile ilişkili olmasına rağmen en iyi bilinen ve en önemli olan Janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3 (JAK2 / STAT3)' dür (Gao & Horvath, 2008). STAT3' ün bir dizi hücrel işlemi etkileyen birkaç gen transkripsiyonuna aracılık ettiği gösterilmiştir (Leininger & Myers, 2008). JAK2 / STAT3 yolağı, enerji homeostazında ve nöroendokrin fonksiyonda önemli rol oynar. STAT3' ün leptin ile aktivasyonu, hipotalamusun arkuat nükleusundaki (ARC) anoreksijenik bir nöropeptid olan proopiomelanocortin (POMC) transkripsiyonunu indükler (Ernst vd., 2009). Gao ve arkadaşları nöral-spesifik STAT3 delesyonu olan fareler üzerinde yaptıkları çalışmalarda bu farelerin ARC' sinde POMC ekspresyonun azalmış olduğunu, hiperfaji, obezite ve diyabet geliştiğini gözlemlemişlerdir (Gao vd., 2004). JAK / STAT3 yolu, POMC nöronlarını aktive etmenin yanı sıra arkuat nükleusdaki oreksijenik nöropeptidleri üreten AgRP / PY nöronlarını da baskılar. AgRP / NPY nöronlarında STAT3 delesyonu olan farelerde hiperleptinemi, hiperfaji, kilo alımı ve yüksek yağlı diyetle bağlı hiperinsülinemi geliştiğini bildirilmiştir (Bates vd., 2003). Bu farelerde, AgRP mRNA seviyeleri etkilenmezken NPY mRNA ekspresyonunun arttırdığı bulunmuştur. Farelerde yapılan bu deneyler, leptinin ObRb reseptörüne bağlanmasının STAT3 fosforilasyon ve aktivasyonuna yol açtığını, POMC' yi upregüle ettiğini ve enerji homeostazi ile nöroendokrin fonksiyon üzerindeki etkisine aracılık eden NPY ve AgRP' yi downregüle ettiğini göstermiştir. Ayrıca in vitro ve in vivo leptin uygulamasının, STAT3' ü fosforile ettiği de gösterilmiştir (Kim, Uotani,

Pierroz, Flier, & Kahn, 2000). Buna ilaveten leptinin, sadece sıçan hipotalamik dokuda değil, aynı zamanda sıçan adipoz doku ve karaciğerde de STAT3' ü aktive ettiği gösterilmiştir (Levin, Dunn-Meynell, & Banks, 2004).

2.9.3. Enerji Homeostazisinde Leptin'in Rolü

Leptin, iştah / gıda alımı ve enerji harcamasını dengeleyerek enerji homeostazını sürdürür. Leptin, oreksijenik ve anoreksijenik nöropeptitler yoluyla enerji alımını düzenlemek için hipotalamusun içinde ve dışında birkaç nöronal yolla etkileşime girer. Hipotalamusun arkuat nükleusu leptin etkisi için kritik bir bölgedir (Arora & Anubhuti, 2006) ve burada iki nöron üzerinde etki gösterir. Leptin ARC' de ObRb reseptörüne bağlanarak, α -melanosit uyarıcı hormonun (α -MSH) öncü proteini olan POMC salgılaması için nöronları doğrudan uyarır (Morrison, 2009). α -MSH ise melanokortin-4 (MC4R) ve melanokortin-3 (MC3R) reseptörlerini aktive ederek yiyecek alımını azaltan anoreksijenik bir nöropeptittir (Ste Marie, Miura, Marsh, Yagaloff, & Palmiter, 2000). Leptin ayrıca iştahı bastıran kokain ve amfetaminle düzenlenen transkript (CART) salgılaması için POMC nöronlarını uyarır (Rogge, Jones, Hubert, Lin, & Kuhar, 2008). Hem POMC hem de CART ekspresyonu, leptin eksikliği durumlarında azalır (Duan vd., 2007). Santral POMC reseptörlerinin yokluğu derin obezite ile sonuçlansa da, ObRb' nin POMC nöronlarında delesyonu sadece farelerde hafif hiperfaji ve obezite ile sonuçlanır (Balthasar vd., 2004). Benzer şekilde, ObRb' deki STAT3 bağlanma bölgesinin mutasyonu obeziteye yol açmasına rağmen, STAT3' ün spesifik olarak ARC' deki POMC nöronlarında delesyonu, vücut ağırlığını çok etkilememiştir (Xu, Ste-Marie, Kaelin, & Barsh, 2007). ARC' deki POMC nöronlarının uyarılması ile birlikte leptinin, oreksijenik nöropeptid AgRP ve NPY' yi eksprese eden AgRP / NPY nöronlarını da inhibe ettiği bildirilmiştir (Cowley vd., 2001). Leptin tarafından enerji homeostazının düzenlenmesinde rol oynayan hipotalamusun tek alanı ARC değildir. ObRb, merkezi sinir sistemi boyunca yayılmıştır ve ARC, ObRb ifade eden nöronların sadece % 15-20' sini oluşturur (Leshan, Bjornholm, Munzberg, & Myers, 2006). Ventromedial hipotalamus (VMH), leptin etkisinin bir başka anahtar bölgesidir. Sternson ve arkadaşları VMH' da ObRb eksprese eden nöronların

ARC' deki POMC nöronlarına uyarıcı impulslar gönderdiğini rapor etmişlerdir (Sternson, Shepherd, & Friedman, 2005). Ayrıca leptinin, VMH' de eksprese edilen iki anoreksijenik nöropeptid olan steroidojenik faktör-1 (SF-1) ve beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) salgılanmasını da uyardığı gösterilmiştir. SF-1, VMH' nin gelişimi için gerekli bir transkripsiyon faktörüdür. Dhillon ve arkadaşları, SF-1 nöronlarında ObRb bulunmayan farelerin belirgin şekilde hiperfajik ve obez olduğu ve hem SF-1 nöronlarında hem de POMC nöronlarında ObRb bulunmayan farelerin tek başına mutantlardan daha obez olduklarını bildirmişlerdir (Dhillon vd., 2006). BDNF, beyin gelişimini destekleyen bir nörotrofindir ve ayrıca gıda alımını düzenler (Abizaid, Gao & Horvath, 2006). Ayrıca paraventriküler çekirdek (PVN) de ObRb' yi eksprese eden nöronları içerir ve ARC' de yiyecek alımının ve kilo kontrolünün düzenlenmesine katkıda bulunur (Abizaid, Gao, & Horvath, 2006). Açlık merkezi olarak bilinen lateral hipotalamus (LHA) leptinden etkilenen oreksijenik nöropeptitler olan melanin-konsantre edici hormon (MCH) ve oreksin salgılayan nöronları içerir (Abizaid vd., 2006). İntraserebroventriküler MCH uygulaması, sıçanlarda gıda alımının artmasına neden olmuştur (Qu vd., 1996).

Leptinin, sıçanlarda MCH gen ekspresyonunu azaltarak (Bayer, Jacquemard, Fellmann, & Griffond, 1999) gıda alım ve tüketimini önlediği gösterilmiştir (Sahu, 1998).

2.9.4. Metabolizmada Leptinin Rolü

Leptin eksikliği, insülin direnci ve diyabet ile ilişkilidir ve leptin uygulaması yapılan çalışmalarda, yağın enerji harcanmasını sağlayıp glikoz metabolizmasını geliştirebileceği gösterilmiştir (Brennan & Mantzoros, 2006). Konjenital leptin eksikliği olan insanlar obez olmalarına ilaveten hiperinsulinemi ve dislipidemi gösterebilirler. Leptin replasmanı, bu kişilerde insülin, kolesterol, trigliserit ve LDL kolesterol seviyelerini artırabilir (Farooqi vd., 2002). Leptin, sadece vücut ağırlığını ve yağ kütlesini azaltmakla kalmayıp, aynı zamanda yağ dokusu ve karaciğer dokusu da dahil olmak üzere insüline duyarlı dokuları aktive ederek insülin direncini artırmaktadır. Leptin

bu etkileri, STAT3, MAPK ve PI3K dahil olmak üzere insülin ilişkili sinyal yollarını aktive ederek gösterir (Kim vd., 2000).

2.9.5. Bağışıklık Fonksiyonunda Leptinin Rolü

Leptinin azaldığı durumlarda enfeksiyon riski artmış göstermektedir (Brennan & Mantzoros, 2006). Çeşitli immün hücreler ObRb' yi eksprese ettiği için leptin immün fonksiyonunu doğrudan etkiler (Lord vd., 1998). İn vitro çalışılan doku ve kan örneklerinde, leptinin makrofajlardaki fagositik etkinliği, tümör nekroz faktörü- α (TNF- α), interlökin-6 (IL-6) ve interlökin-12 (IL-12) gibi proinflamatuvar sitokinlerin üretimini ve polimorfonükleer hücrelerde kemotaksiyi artırdığı gösterilmiştir (Caldefie-Chezet, Poulin, & Vasson, 2003). Leptin genel olarak, T helper1 (Th1) hücre farklılaşmasını ve sitokin üretimini artırır (Matarese, Moschos, & Mantzoros, 2005). ob/ob farelerde yapılan in vivo bir çalışmada, leptin uygulamasının immün fonksiyon bozukluğu geliştirdiği ancak akut olarak aç bırakılan wild tip farelerde immün fonksiyon bozukluğuna karşı koruduğu bildirilmiştir (Howard vd., 1999).

2.9.6. Kanser Patogenezinde Leptinin Rolü

Kanser, proinflamatuvar sitokinlerin neden olduğu sistemik bir inflamasyondur. Sistemik inflamasyonun yanı sıra, özellikle akciğer ve gastrointestinal sistemlerde gelişen kanserlerde kilo kaybı da gözlenir. Bu hipoteze dayanarak, proinflamatuvar bir sitokin olan leptinin kanser üzerindeki potansiyel etkileri incelenmiştir. Aleman ve arkadaşları küçük hücreli olmayan akciğer kanser (KHDAK) hastalarında leptin serum konsantrasyonunu incelemiş ve sağlıklı kontrollerden daha düşük olduğunu tespit etmişlerdir. Bu durum, serum proinflamatuvar sitokin düzeyleri (CRP, ferritin, TNF-a, IL-6 ve diğerleri) ile ters orantılı olarak bulunmuştur (Aleman vd., 2002).

Epidemiyolojik çalışmalara göre aşırı kilo kansere bağlı ölümlerde önemli bir faktördür. ABD' de yapılan çalışmalarda 50 yaş ve üstü yetişkinlerinde aşırı kilo ve şişmanlığa bağlı olan kanser ölümlerinin oranı erkeklerde % 14 iken kadınlarda % 20' dir (Calle, Rodriguez, Walker-Thurmond, & Thun,

2003). Obezite ile endometriyum, böbrek, safra kesesi (kadınlarda), meme kanseri (menopoz sonrası kadınlarda) ve kolon (özellikle erkeklerde) kanser riski arasındaki ilişki gösterilmiştir (Carroll, 1998). Leptin normal koşullarda olduğu kadar patolojik koşullarda da doku büyüme faktörü gibi görev yaparken, in vitro ve in vivo çalışmalar leptin ile kanser hücresi büyümesi arasındaki ilişkiyi desteklemektedir (Somasundar, McFadden, Hileman, & Vona-Davis, 2004). Hem in vitro hem de in vivo modeller de leptinin anjiyogenezi uyardığı ve anjiyojenetik bir faktör olduğu bildirilmiştir. Buna ilaveten, leptin VEGF'ye benzer bir şekilde in vitro vasküler endotel hücre proliferasyonunu da arttırır (Bouloumie, Drexler, Lafontan, & Busse, 1998). Leptinin, anjiyogenezi teşvik etmek için VEGF ve fibroblast büyüme faktörü 2 (FGF-2) ile *sinerjistik* olarak etki ettiği gösterilmiştir (Cao, Brakenhielm, Wahlestedt, Thyberg, & Cao, 2001). Ayrıca leptin, anjiyogenezde yer alan diğer genlerin, örneğin MMP-2 ve MMP-9 gibi genlerin ekspresyonunu da arttırır (Park vd., 2001).

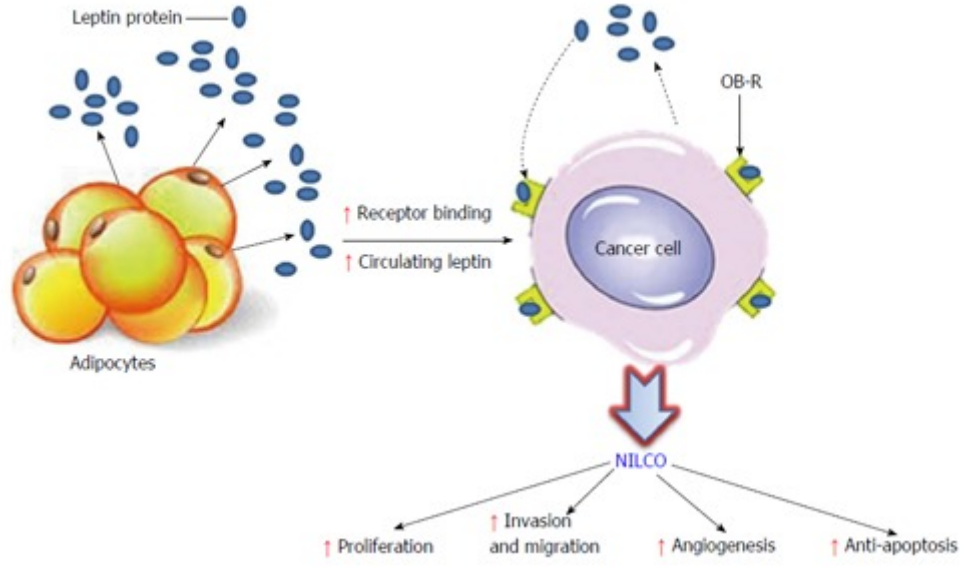
2.9.7. Leptin ve Kolorektal Kanser

Leptin sinyalizasyonunun kolon kanserinde rol oynayabileceğine dair pek çok kanıt vardır. Kolon kanseri hücre hatlarında, insan kolon tümörlerinde ve poliplerde ObRb mRNA ekspresyonu RT-PCR kullanılarak gösterilmiştir (Attoub vd., 2000). ObRb'nin kolon kanseri dokularında ve hücre hatlarında eksprese edildiği, ObR'nin hücre içi alanına karşı geliştirilen antikolar kullanılarak immünohistokimyasal analizlerle doğrulanmıştır (Hardwick, Van Den Brink, Offerhaus, Van Deventer, & Peppelenbosch, 2001). Kandaki leptin düzeyleri ve kolorektal kanser ilişkisi hakkındaki bilgiler henüz kesin değildir. Stattin ve arkadaşları dolaşımdaki leptin düzeylerinin yükselmesinin, erkeklerde kolorektal kanser riskinde yaklaşık iki kat artış ile ilişkili olduğunu, ancak kadınlarda böyle bir riskin olmadığını gözlemlemişlerdir (Stattin vd., 2003). Tessitore ve arkadaşları ise kanser hastaları ve sağlıklı bireylerin serum leptin düzeyleri arasında bir fark tespit edememişlerdir (Tessitore vd., 2000). Arpacı ve arkadaşları kolon kanserli hastaların serum leptin düzeylerinin azaldığını (Arpacı vd., 2002), Erkasap ve arkadaşları ise arttığını bildirmişlerdir (Erkasap vd., 2013). Dolaşımdaki leptin, aynı

zamanda kolon hücre proliferasyonunu stimüle eden yüksek yağlı diyetlerle beslenenlerde de artar (Lin vd., 1998). Hayvan modellerinde yapılan çalışmalarda diyet yağı, serum leptin ve kolonik epitel hücre proliferasyonu arasında pozitif bir ilişki olduğu bildirilmiştir (Hardwick vd., 2001). Sonuç olarak bu bilgiler, kolon kanserojenine artmış serum leptin seviyelerinin aracılık ettiğini göstermektedir.

2.10. NILCO ve Kanser

NILCO; Notch ailesi proteinleri, IL-1 inflamatuvar sistemleri ve leptin sinyalizasyonu arasındaki etkileşimin sonucu olarak ortaya çıkan ve ilk olarak meme kanserinde bulunan, karsinogenez sürecini açıklamaya çalışan gelişmiş bir modeldir. Leptin tarafından indüklenen NILCO etkileşiminin meme kanseri hücrelerinde hücre proliferasyonu ve tümör gelişimi üzerine etkili olduğu bilinmektedir (Şekil 2.1), (Guo & Gonzalez-Perez, 2011; Lipsey, Harbuzariu, Daley-Brown, & Gonzalez-Perez, 2016). NILCO meme kanserinde, leptin tarafından indüklenen hücre proliferasyonu, hücre göçü ve VEGF / VEGFR-2 ile ilişkili pro-anjiyojenik ve pro-inflamatuvar sinyallerin oluşmasında da etkilidir (Guo & Gonzalez-Perez, 2011). Triple-negative breast cancer (TNBC)' de yapılan çalışmalarda, NILCO' nun farklı lokalizasyon modelleri gösterilmiştir. TNBC'de, NILCO üyelerinden Notch4 reseptör ve JAG1 ligandın, çekirdek ve sitoplazmada daha az leptinin ise daha fazla eksprese olduğu tespit edilmiştir. Aynı çalışmada NILCO ve hedeflerinin ayrıntılı analizi NILCO' nun meme kanserinde potansiyel prognostik biyobelirteç değerine sahip olduğu gösterilmiştir (Colbert vd., 2014). Başka bir çalışmada ise, leptin tarafından indüklenen Notch ve IL-1' in meme kanser hücrelerinin yaşam süreleri ve proliferasyonunun düzenlenmesinde rol oynadıkları gösterilmiştir (Gillespie C, 2012).



Şekil 2.6. Leptin, Notch ve İnterlökin etkileşimi (NILCO) (Lipseş, Harbuzariu, Daleş-Brown & Gonzalez-Perez, 2016)

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Çalışmada Kullanılan Malzeme ve Solüsyonlar

3.1.1. Cihazlar

- İnkübatör (Nüve FN500, Nüve Sanayi Malzemeleri İmalat ve Tic. A.Ş., Türkiye)
- Real-time PCR cihazı (Thermo, USA)
- Mikrosantrifüj (Hermle, Wehingen, Germany)
- Thermal cycler (Corbett Palm Cycler, Mortlake, Australia)
- Vorteks (Heidolph, Germany)
- Doku homojenizatörü (Tissue-Lyser II-Qiagen VX350 Series 2 WPS 3601C12, Hilden, Germany)
- Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, USA)
- -80° C Dondurucu (Telstar Life Science Solutions, Spain)
- Buzdolabı (Arçelik, Türkiye)
- Mikro pipet takımı
- Pipet uçları (10'luk, 100'lük ve 1000'lik)

3.1.2. Kimyasal malzemeler

- Lizis Buffer (Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA)
- β-merkaptoetanol (Biorad, California, USA)
- Proteinaz K (Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA)
- TE Buffer (Invitrogen, California, USA)
- Wash Buffer 1 (Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA)
- Wash Buffer 2 (Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA)
- %70'lik etanol (Sigma, USA)
- Nükleaz Free Water (Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA)
- RNase Free Water (Qiagen, Hilden, Germany)
- RNA Later (Invitrogen, California, USA)
- Buffer 5X (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)
- dNTP Miks (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)
- DTT (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)

- Random Primer (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)
- Oligo-dT Primer (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)
- Protektor RNAase inhibitör (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)
- Omniscript Reverse Transcriptase (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)
- Reconstituted primer /probe miks (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)
- 2X qPCR Mastermiks (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)
- Leptin primer antikor (Abcam, Cambridge, İngiltere)
- Notch primer antikor (Abcam, Cambridge, İngiltere)
- IL-1B primer antikor (Abcam, Cambridge, İngiltere)
- Hrp- conjugated sekonder antikor (Abcam, Cambridge, İngiltere)
- Bradford protein assay kit (Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA)
- Fetal bovine serum (Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA)
- RPMI besiyeri (Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA)
- Penisilin / streptomisin antibiyotik (Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA)
- PBS (Phosphate Buffered Saline)
- Running solution
- Blotting solution

3.2. Deney Protokolü

Bu deneysel çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Moleküler Araştırma laboratuvarında ve Thessaly Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı laboratuvarında yapıldı.

3.3. Zenograft (scid (NOD / SCID) Fare Üretimi

40 adet NOD/SCID türü fare için etik onay Thessaly Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden alınmıştır (onay numarası: 5542/228006). Tez çalışmamızda scid (NOD / SCID) fare modelinde, insan kolon tümör hücresinin (HCT-15) cilt altına enjekte edilerek farede kolorektal kanser oluşturulup tedavisi çalışıldı. Bu amaçla, projemizde kullandığımız fareler Thessaly Üniversitesi Tıp

Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı in vivo laboratuvarında üretildi. scid (NOD/SCID) türü farelerin üretimi ve bakımı steril koşullarda yapıldı. Fareler 6-8 haftalık iken kolon kanseri hücre enjeksiyonuna başlandı.

3.4. İn-vivo Kanser Oluşturulması

6-8 haftalık 40 adet fare, her grupta n:8 olacak şekilde 5 grupta çalışıldı. Deneye başlamadan önceki 7 gün boyunca farelerin laboratuvar koşullarına adapte olması sağlandı. Tümör oluşumu için farelerin dorsal flanklarının içine 1×10^7 insan kolon kanser hücresi HCT-15 subkutan olarak enjekte edildi.

3.5. Tedavi

Grup 1: Tümör oluşturulan, tedavi uygulanmayan sadece çözücü olarak % 4 DMSO/Saf flower Oil (solvent 1)* verilen grup (n:8).

Grup 2: Tümör oluşturulan, tedavi uygulanmayan sadece çözücü olarak 10% DMSO % 0.9 NaCl (solvent 2)** verilen grup (n:8).

Grup 3: tümör oluşturulan ve leptin reseptör antagonisti ALLO-aca verilen grup. Tümör oluşumundan sonra (tümör boyutu 100-250 mm³ olunca) 15 gün boyunca leptin reseptör antagonisti olan ALLO-aca 3 mg/kg/gün olacak şekilde subkutan (s.c) enjekte edildi (n:8).

Grup 4: tümör oluşturulan ve γ -secretase inhibitor DAPT verilen grup. Tümör oluşumundan sonra (tümör boyutu 100-250 mm³ olunca) 14 gün boyunca γ -secretase inhibitör DAPT. 10 mg/kg/gün subcutan (s.c) enjekte edildi (n:8)

Grup 5: tümör oluşturulan ve IL-1 reseptör antagonisti verilen grup. Tümör oluşumundan sonra (tümör boyutu 100-250 mm³ olunca) 15 gün boyunca rekombinant human IL-1 reseptör antagonisti (IL-1Ra) anakinra 2 mg/kg/gün subkutan (s.c) olarak enjekte edildi (n:8).

(* solvent 1; DAPT çözücü, * solvent 2; Allo-aca ve Anakinra çözücü)

Tedaviyi takiben dokular çıkarılarak RNA ve protein izolasyonu çalışmaları için -80 C de saklandı.

3.6. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) Tekniği ile Hedef Genlerin Tayini

3.6.1. RNA izolasyonu

Total RNA izolasyonu çalışmasında GeneJet RNA Purification Kit kullanıldı.

3.6.1.1. Çözeltilerin hazırlanması

- 20 µl β-merkaptoetanol, 1 ml Lizis Buffer içine eklendi ve vortekslendi.
- 590 µl TE Buffer'a 10 µl Proteinaz K eklendi ve vortekslendi.

3.6.1.2. İşlem basamakları

1. Doku örnekleri, içinde metal boncuk bulunan eppendorflara alındı. Üzerine 300 µl Lizis Buffer eklendi. 30 frekansta 4 dakika homojenize edildi.
2. Homojenizasyondan sonra boncuklar alındı ve örnek başka bir tüpe aktarılarak üzerine 600 µl Proteinaz K eklendi. Vortekslendikten sonra 15-25 °C'de 10 dakika inkübasyona bırakıldı.
3. 12.000 g'de 5 dakika santrifüj edildi, süpernatant başka bir tüpe aktarıldı.
4. Süpernatantın üzerine 450 µl etanol eklenerek pipetle karıştırıldı.
5. Bu sıvının 700 µl'si GeneJet RNA Purification kolonuna aktarıldı ve 12.000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.
6. Santrifüjden sonra kolonun altındaki toplama tüpüne biriken sıvı uzaklaştırılarak, kolona 700 µl daha sıvı eklendi ve 12.000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.
7. Toplama tüpü atılarak kolon 2 ml'lik tüpe yerleştirildi.
8. Kolona 700 µl Wash Buffer 1 eklenerek 12.000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.
9. Toplama tüpünde biriken sıvı uzaklaştırıldı. Kolona 600 µl Wash Buffer 2 eklendi ve 12.000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.
10. Toplama tüpünde biriken sıvı uzaklaştırıldı, 250 µl Wash Buffer 2 eklenerek 12.000 g'de 2 dakika santrifüj edildi.
11. Kolon 1,5 ml'lik eppendorfa aktarılarak üzerine 100 µl nükleaz free water eklendi ve 12.000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.

12. Tüpte biriken sıvıdaki RNA'nın miktarı ve saflığını belirlemek için 1,5 µl RNA, 260 nm dalga boyunda optik yoğunluk ölçülerek hesaplama yapıldı.

3.6.2. cDNA sentezi

1. Total RNA (500 ng) + ddH₂O = 9.4 µl olacak şekilde karıştırıldı.

2. Üzerine 1 µl random primer, 1 µl oligo-dt primer eklendi.

Total hacim: 11.4 µl

3. 65 °C'de 10 dakika inkübe edildi.

Komponentin hazırlanması:

Buffer 5x : 4 µl

Reverse transkriptaz : 1,1 µl

Protektor RNAase inhibitör : 0,5 µl

Deoxinükleotit mix : 2 µl

DTT : 1 µl

Total hacim: 8.6 µl

4. 11,4'lük total hacim üzerine 8,6 µl komponent dağıtıldı ve vortekslendi.

5. 29 °C'de 10 dk
6. 48 °C'de 60 dk
7. 85 °C'de 5 dk

} cDNA sentezi için PCR şartları

(Çıkan örnekler (+2) – (+8) °C'de 1-2 saat; -15 ile -25 °C'de daha uzun süre saklanabilmektedir.)

3.6.3. qRT-PCR

Leptin, leptin OB-RL reseptörü, Notch1 reseptör, JAGGED1 ligand, IL-1β, IL-1R, VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2, β-aktin (referans gen) mRNA düzeyleri, Dual Label (Taqman prob) kullanılarak ölçüldü. RT-PCR için Tablo 3.2'deki karışım hazırlanarak reaksiyon gerçekleştirildi.

Tablo 3.1. RT-PCR için karışım içeriği

Karışım	Miktar (µl)
Reconstituted primer /probe miks (leptin, leptin OB-RL reseptörü, Notch1 reseptör, JAGGED1 ligand, IL-1β, IL-1R, VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2, β-aktin)	1
2X qP PCR Mastermiks	10
PCR- Grade water	4
cDNA cDNA	5
Toplam hacim	20

Toplam 20 µl RT-PCR reaksiyonu aşağıdaki koşullarda gerçekleştirildi:

95° C'de	10 dk	} 50 döngü
95° C'de	20 sn	
55° C'de	30 sn	
72° C'de	20 sn	

Çalışmanın sonuçları StepOnePlus Real-Time PCR system, Thermo ile analiz edildi.

3.7. Western Blotting Metodu İle Protein Ekspresyon Tayini

İzole edilen total protein içindeki hedef proteinler olan **Notch1 reseptör**, **VEGF-A**, **leptin** ve **IL-1 beta** ekspresyonları Western-Blotting metodu ile tayin edildi.

3.7.1. Protein izolasyonu ve Total Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Total protein izolasyonundan sonra elde edilecek olan süpernatant ayrı bir tüpe alınıp protein konsantrasyonu Bradford yöntemi ile ölçüldü.

3.7.2. Western Blotting

Proteinler denatüre edilip, indirgenerek düzgün yürütülebilecek hale getirildi. Daha sonra örnekler SDS-Poliakrilamid jelin üzerindeki kuyucuklara yüklenerek, elektroforez yöntemiyle moleküler ağırlıklarına göre bantlar halinde ayrıştırıldı. Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra jel nitroselüloz membrana aktarıldı. Protein bağlanmamış membran bölgelerinin FBS ile kapatılıp antikörlerin yanlış bağlanmasını önlemek için bloklama yapıldı. Birincil ve ikincil antikörler üretici firmanın tavsiyelerine uygun şekilde membrana yüklenerek kemüliminesans yöntemi ile protein bantları tespit edildi. Tespit edilen bantların yoğunluk analizi image J bilgisayar programı kullanılarak hesaplanmış ve elde edilen veriler kontrol proteinlerimiz olan tubulin ve beta-actin'den elde edilen veri ile normalize edilerek analiz edildi. Western-Blotting çalışmaları dublike olarak yapıldı.

3.8. Hematoksilen Eozin Boyama

Dokular alındıktan sonra %4'lük formaldehitte fikse edildi. Daha sonra ise parafin bloklara gömüldü ve 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Daha sonra, tümör dokularının histolojik değerlendirilmesi için H&E boyama yapıldı.

1. Çekirdekleri boyamak için 10 dakika boyunca hematoksilen çözeltisi ile slaytlar inkübe edildi.
2. Slaytlar akan su ile birlikte boyama haznesine aktarıldı.
3. Slaytlar 3 dakika boyunca Eosin çözeltisi ile muamele edildi.
4. Ardışık olarak slaytlar 20 saniye % 70 etanol, 20 saniye % 90 etanol, 1 dakika % 100 etanol ve 3 dakika ksilen ile muamele edildi.
5. Slaytlar ksilen'den çıkarıldı ve slaytlar kuruyana kadar bir çeker ocak içine yerleştirildi
6. Slaytları ksilen bazlı montaj ortamıyla monte edildi ve kapak slaytlarıyla kapatıldı.
7. Slaytlar oda sıcaklığında saklandı.
8. Daha sonra mikroskopta görüntülendi.

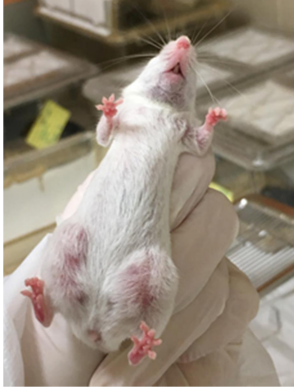
3.9. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel değerlendirme için GraphPad Prism6 programı kullanıldı. Öncelikle gruplar Shapiro-Wilk Normality Test kullanılarak normal dağılım gösterip göstermediğine göre analiz edildi. Normal dağılım gösteren veriler tek yönlü ANOVA testi ile değerlendirildikten sonra gruplar arasındaki farklar Tukey testi ile analiz edildi. Normal dağılım göstermeyen veriler ise Kruskal-Wallis testi ile değerlendirildikten sonra gruplar arasındaki farklılıklar Dunn testi ile analiz edildi. p değeri 0.05'den küçük olanlar anlamlı kabul edildi. Sonuçlar ortalama \pm SEM olarak ifade edildi.

4. BULGULAR

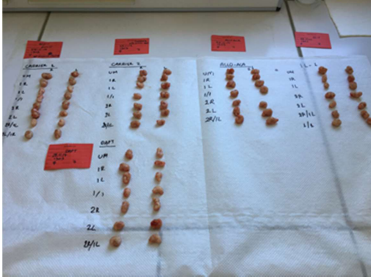
4.1. Tümör bulguları

Kolon kanseri hücre hattı HCT-15 scid (NOD/SCID) türü atimik farelerin deri altına enjekte edildikten 2 hafta sonra farelerde oluşan tümör boyutları 150-200 mm³e ulaşmıştır (Şekil 4.1.).



Şekil 4. 1. HCT-15 kolon kanser hücreleri enjekte edilmiş scid (NOD/SCID) farelerdeki in vivo tümör görüntüsü

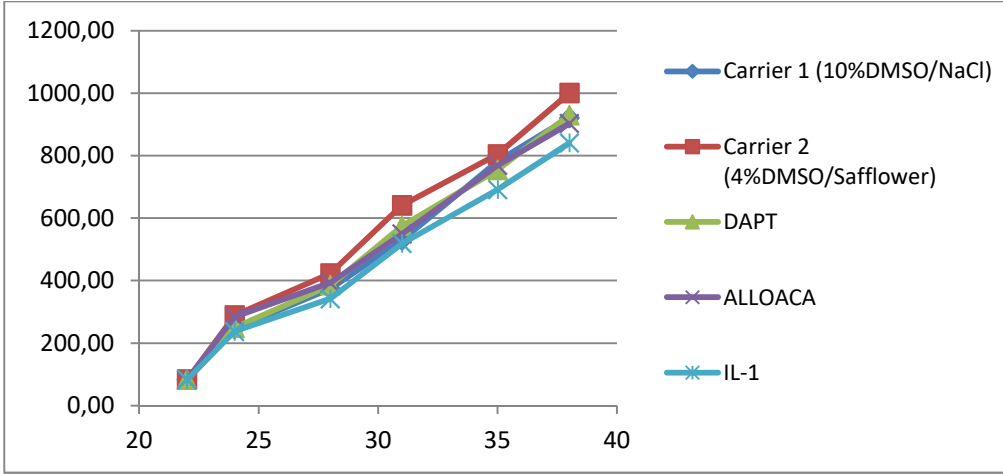
Tüm gruplardaki tedaviler bittikten sonra farelerde oluşan tümörler anestezi altında çıkarılmıştır ve moleküler analizler başlayana kadar -80 derecede saklanmıştır. (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. scid (NOD/SCID) farelerden çıkarılmış tümörlerin makroskopik görüntüsü

4.1.1. Tümör volüm değişiklikleri

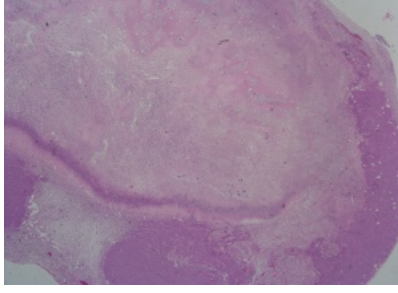
Farelerdeki tümör boyutları 150-200 mm³'e ulaştıktan sonra tedaviler başlamıştır. Tedavi süreleri boyunca gruplar arasında tümör volümleri açısından bir değişiklik gözlenmemiştir (Şekil 4.3.).



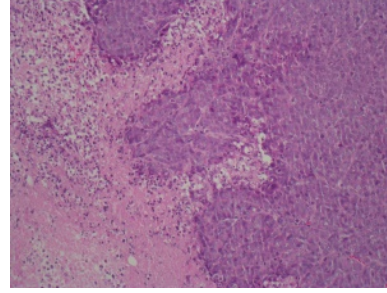
Şekil 4.3. HCT-15 kolon kanser hücreleri enjekte edilmiş scid (NOD/SCID) farelerde tedavi süresi boyunca tümör volüm değişiklikleri

4.2. Hematoksilen Eozin Bulguları

Tümör dokularının Hematoksilen-Eozin boyama ile yapılan küçük büyültmeli incelemelerinde, dokuların merkezde yoğun nekroz ve periferde solid alanlardan meydana geldiği görüldü. Tüm örneklerde ayrıca enflamasyona bağlı belirgin peritümöral lenfatik infiltrasyon izlendi. Tümör dokusunun merkezinde ise nekroz alanları çevresinde yerleşmiş normal morfolojili tümör hücrelerinin yanı sıra apoptotik cisimciklerle karakterize apoptotik tümör hücreleri ve intratümöral lenfosit infiltrasyonu ayırt edildi. Bu boyama sonucunda deney grupları arasında histopatolojik olarak belirgin bir farklılık gözlenmedi (Şekil 4.4., Şekil 4.5, Şekil 4.6., Şekil 4.7., Şekil 4.8.).

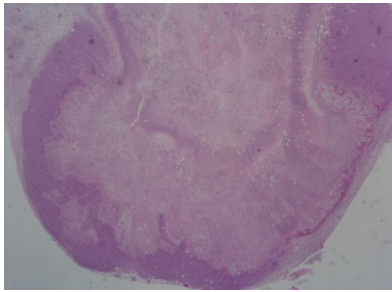


A

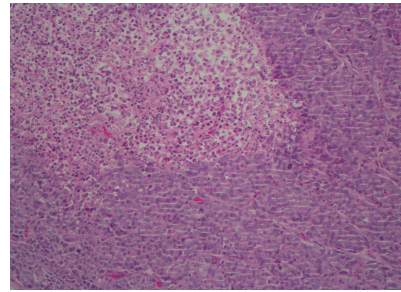


B

Şekil 4. 4. Solvent 1 grubunun H&E görüntüleri. Tümör dokusunun panoramik görünümü. Ortada nekroz ile çevresinde tümör dokusu (A) (H&Ex20). Nekroz ile komşuluğunda genellikle solid alanlar, yer yer de gland benzeri yapılar oluşturmuş atipik epitel hücrelerinden meydana gelen tümör dokusu (B) (H&Ex200).

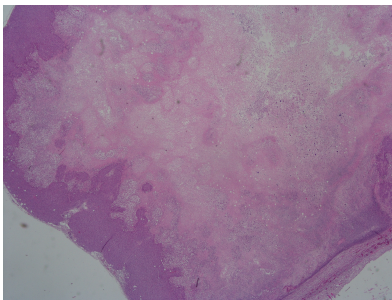


A

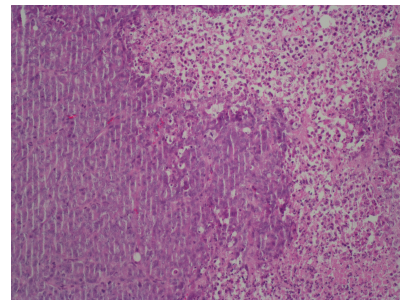


B

Şekil 4. 5. Solvent 2 grubunun H&E görüntüleri. Tümör dokusunun panoramik görünümü. Ortada nekroz ile çevresinde tümör dokusu (A) (H&Ex20). Nekroz ile komşuluğunda genellikle solid alanlar, yer yer de gland benzeri yapılar oluşturmuş atipik epitel hücrelerinden meydana gelen tümör dokusu (B) (H&Ex200)

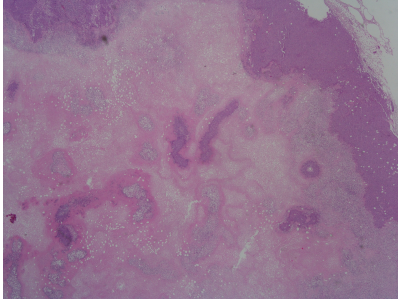


A

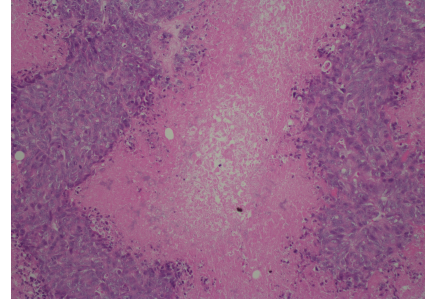


B

Şekil 4.6. Allo-Aca grubunun H&E görüntüleri. Tümör dokusunun panoramik görünümü. Ortada nekroz ile çevresinde tümör dokusu (A) (H&Ex20). Nekroz ile komşuluğunda genellikle solid alanlar, yer yer de gland benzeri yapılar oluşturmuş atipik epitel hücrelerinden meydana gelen tümör dokusu (B) (H&Ex200)

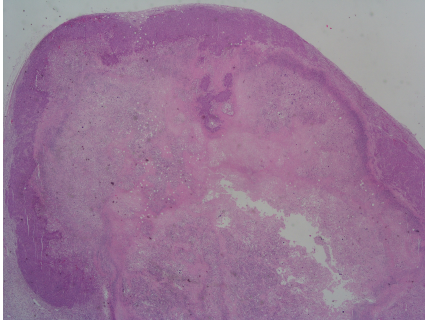


A

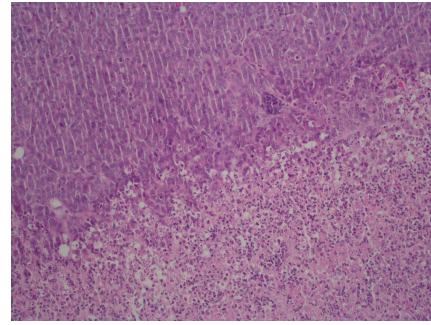


B

Şekil 4.7. DAPT grubunun H&E görüntüleri. Tümör dokusunun panoramik görünümü. Ortada nekroz ile çevresinde tümör dokusu (A) (H&Ex20). Nekroz ile komşuluğunda genellikle solid alanlar, yer yer de gland benzeri yapılar oluşturmuş atipik epitel hücrelerinden meydana gelen tümör dokusu (B) (H&Ex200)



A



B

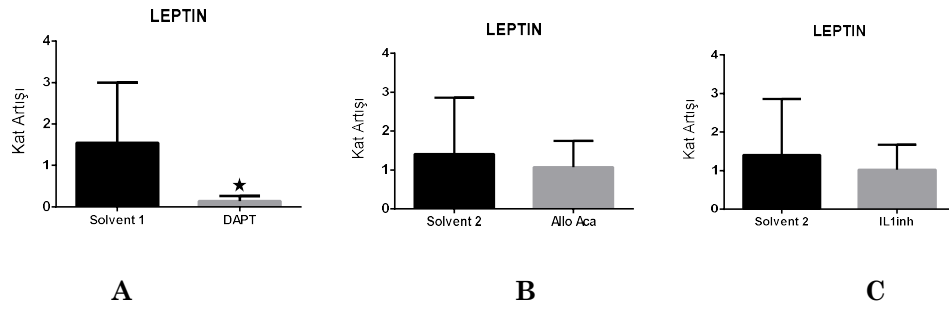
Şekil 4.8. Anakinra grubunun H&E görüntüleri. Tümör dokusunun panoramik görünümü. Ortada nekroz ile çevresinde tümör dokusu (A) (H&Ex20). Nekroz ile komşuluğunda genellikle solid alanlar, yer yer de gland benzeri yapılar oluşturmuş atipik epitel hücrelerinden meydana gelen tümör dokusu (B) (H&Ex200)

4.3. qRT-PCR Bulguları

Sonuçlarımıza göre; Notch yolağı inhibitörü olan DAPT, NILCO ilişkili tüm gen ekspresyonlarını, VEGFA ve VEGFR1 mRNA düzeylerini azaltmıştır. IL-1 yolağının inhibitörü olan Anakinra ise VEGFR2 gen ekspresyonunu ve NILCO yolağının tüm protein ekspresyonlarını azaltmıştır. Leptin reseptör antagonisti olan Allo-aca; leptin, leptin ObR ve VEGFR2 ekspresyonunu azaltmıştır ancak istatistiksel olarak anlamlı değildir. Bu da bize DAPT ve Anakinra'nın KRK 'da antianjiojenik ve antiinflamatuvar gibi davranarak

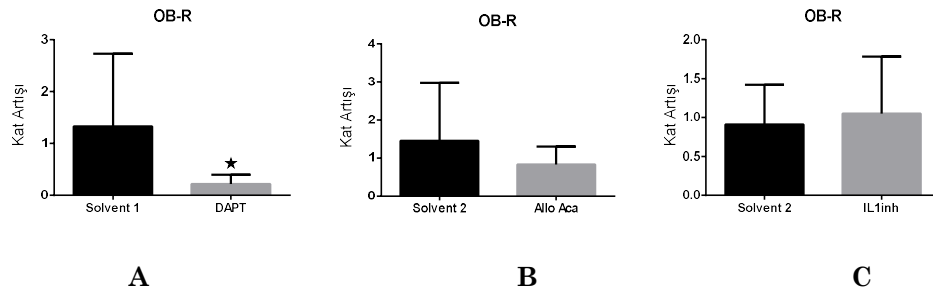
NILCO yolağı inhibisyonu ile tümör gelişimini baskılayabileceğini düşündürmektedir.

Notch yolağı inhibitörü olan DAPT kontrol grubu ile karşılaştırıldığında leptin gen ekspresyonunu istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaltmıştır ($p < 0.05$ *; Şekil 4.9-A). Leptin reseptör antagonisti olan Allo-aca ve IL-1 yolağının inhibitörü olan Anakinra ise leptin gen ekspresyonunu azaltmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p > 0.05$; Şekil 4.9-B ve C).



Şekil 4.9. Leptin geninin DAPT (A), Allo-aca (B) ve IL-1 inhibitörü (C) verilen tedavi gruplarındaki mRNA ekspresyonu (n:8, $p < 0.05$ *, $p > 0.05$, $p > 0.05$).

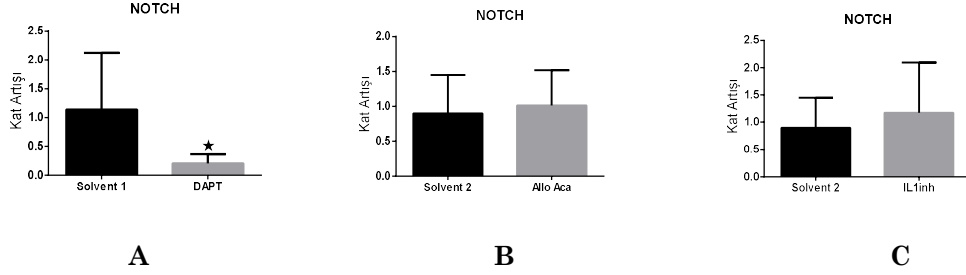
Notch yolağı inhibitörü olan DAPT kontrol grubu ile karşılaştırıldığında leptin reseptörü olan OB-Rb gen ekspresyonunu istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaltmıştır ($p < 0.05$ *; Şekil 4.10-A). Leptin reseptör antagonisti olan Allo-aca ve IL-1 yolağının inhibitörü olan Anakinra ise bir etki göstermemiştir ($p > 0.05$; Şekil 4.10-B ve C).



Şekil 4.10. Ob-R geninin DAPT (A), Allo-aca (B) ve IL-1 inhibitörü (C) verilen tedavi gruplarındaki mRNA ekspresyonu (n:8, $p < 0.05$ *, $p > 0.05$, $p > 0.05$).

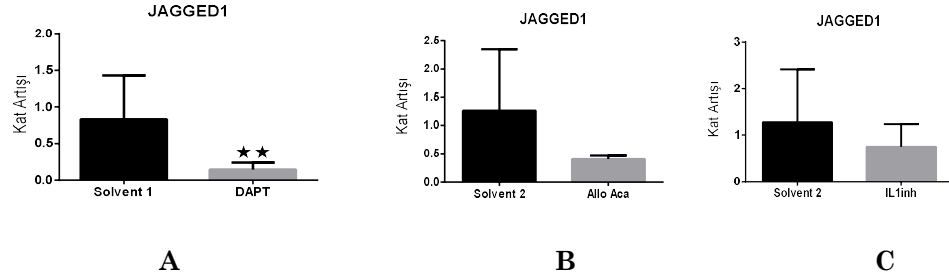
Notch yolağı inhibitörü olan DAPT kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde Notch1 gen ekspresyonunu azaltmıştır ($p < 0.05$ *; Şekil 4.11-A). Leptin reseptör antagonisti olan Allo-aca ve IL-1

yolağının inhibitörü olan Anakinra ise bir etki göstermemiştir ($p > 0.05$; Şekil 4.11-B ve C).



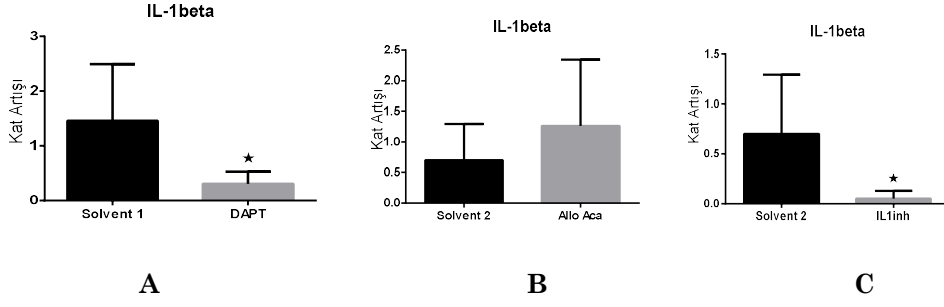
Şekil 4.11. Notch geninin DAPT (A), Allo-aca (B) ve IL-1 inhibitörü (C) verilen tedavi gruplarındaki mRNA ekspresyonu ($n:8$, $p < 0.05$ *, $p > 0.05$, $p > 0.05$).

Notch yolağı inhibitörü olan DAPT kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde Jagged1 gen ekspresyonunu azaltmıştır ($p < 0.05$ **; Şekil 4.12-A). Leptin reseptör antagonisti olan Allo-aca ve IL-1 yolağının inhibitörü olan Anakinra ise Jagged1 gen ekspresyonunu azaltmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p > 0.05$; Şekil 4.12-B ve C).



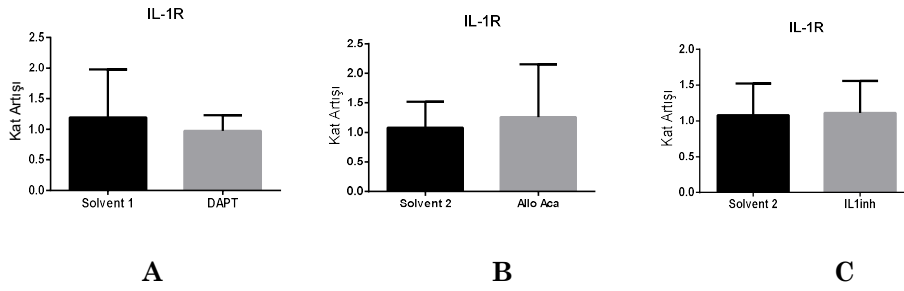
Şekil 4.12. JAGGED1 geninin DAPT (A), Allo-aca (B), IL-1 inhibitörü (C) verilen tedavi gruplarındaki mRNA ekspresyonu ($n:8$, $p < 0.005$ **, $p > 0.05$, $p > 0.05$).

Notch yolağı inhibitörü olan DAPT ve IL-1 yolağının inhibitörü olan Anakinra kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde IL-1 beta gen ekspresyonunu azaltmıştır ($p < 0.05$ *; Şekil 4.13 A ve C). Leptin reseptör antagonisti olan Allo-aca ise bir etki göstermemiştir.



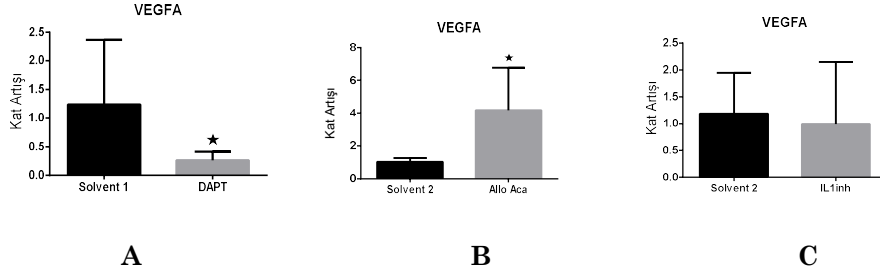
Şekil 4.13. IL-1 β geninin DAPT (A), Allo-aca (B), IL-1 inhibitörü (C) verilen tedavi gruplarındaki mRNA ekspresyonu (n:8, $p < 0.05^*$, $p > 0.05$, $p < 0.05^*$)

Notch yolağı inhibitörü olan DAPT, leptin reseptör antagonisti olan Allo-aca ve IL-1 yolağının inhibitörü olan Anakinra kontrol grubu ile karşılaştırıldığında IL-1R gen ekspresyonu üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etki göstermemiştir ($p > 0.05$; Şekil 4.14-A, B ve C).



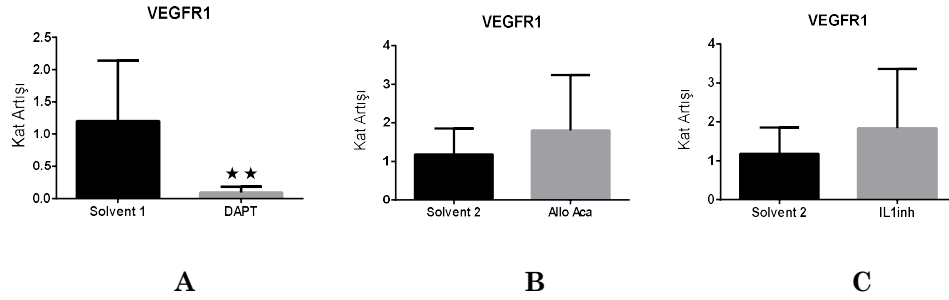
Şekil 4.14. IL-1R geninin DAPT (A), Allo-aca (B) ve IL-1 inhibitörü (C) verilen tedavi gruplarındaki mRNA ekspresyonu (n:8, $p > 0.05$, $p > 0.05$, $p > 0.05$).

Notch yolağı inhibitörü olan DAPT kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde VEGFA gen ekspresyonunu azaltmıştır ($p < 0.05^*$; Şekil 4.15-A). Leptin reseptör antagonisti olan Allo-aca VEGFA gen ekspresyonunu artırmıştır ($p < 0.05^*$; Şekil 4.15-B). IL-1 yolağının inhibitörü olan Anakinra ise VEGFA gen ekspresyonu üzerinde bir etki göstermemiştir ($p > 0.05$; Şekil 4.15-C).



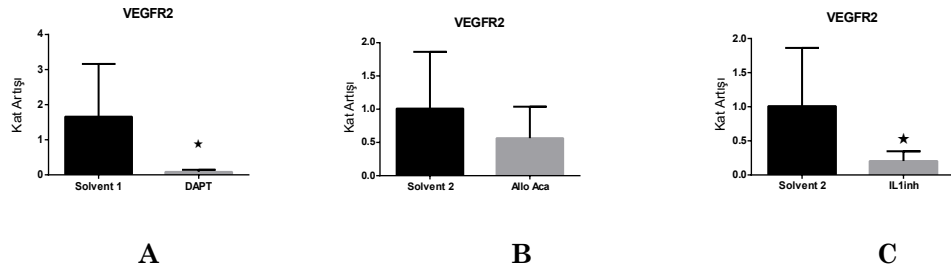
Şekil 4.15. VEGF-A geninin DAPT (A), Allo-aca (B) ve IL-1 inhibitörü (C) verilen tedavi gruplarındaki mRNA ekspresyonu (n:8, $p < 0.05^*$, $p < 0.05^*$, $p > 0.05$).

Notch yolağı inhibitörü olan DAPT kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde VEGFR1 gen ekspresyonunu azaltmıştır ($p < 0.005^{**}$; Şekil 4.16-A). Leptin reseptör antagonisti olan Allo-aca ve IL-1 yolağının inhibitörü olan Anakinra ise VEGFR1 gen ekspresyonu üzerinde bir etki göstermemiştir ($p > 0.05$; Şekil 4.16-B ve C).



Şekil 4.16. VEGF-R1 geninin DAPT (A), Allo-aca (B) ve IL-1 inhibitörü (C) verilen tedavi gruplarındaki mRNA ekspresyonu (n:8, $p < 0.005^{**}$, $p > 0.05$, $p > 0.05$).

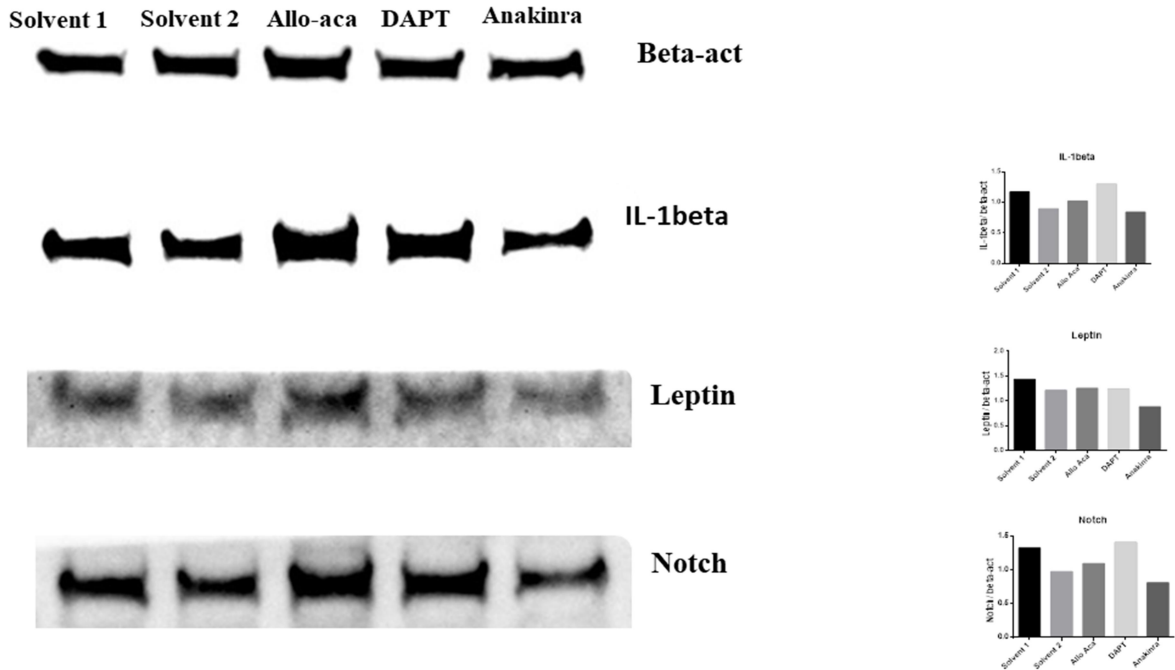
Notch yolağı inhibitörü olan DAPT ve IL-1 yolağının inhibitörü olan Anakinra kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde VEGFR2 gen ekspresyonunu azaltmıştır ($p < 0.05^*$; Şekil 4.17-B ve C). Leptin reseptör antagonisti olan Allo-aca ise VEGFR2 gen ekspresyonunu azaltmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p > 0.05$; Şekil 4.17-B).



Şekil 4.17. VEGF-R2 geninin DAPT (A), Allo-aca (B), IL-1 inhibitörü (C) verilen tedavi gruplarındaki mRNA ekspresyonu (n:8, $p < 0.05^*$, $p > 0.05$, $p < 0.05^*$).

4.4. Western Blotting Bulguları

IL-1 yolağının inhibitörü olan Anakinra, NILCO yolağında rol alan Notch, IL-1 ve leptin protein ekspresyonlarını azaltmıştır. Diğer inhibitörlerin istatistiksel olarak anlamlı bir etkileri gözlenmemiştir. Bu da Anakinra'nın KRK 'da antianjiojenik ve antiinflamatuvar gibi davranarak NILCO yolağı inhibisyonu ile tümör gelişimini baskılayabileceğini düşündürmektedir.



Şekil 4.18. DAPT , Allo-aca , IL-1 inhibitörü verilen tedavi gruplarındaki protein ekspresyonları

5. TARTIŞMA

Çalışmamızın sonuçları, zenograft KRK oluşturulmuş fare kolon dokusunda NILCO etkileşimindeki yolakların eksprese olduklarını ve NILCO etkileşiminin hastalığın gelişimi ile ilişkili olduğunu ortaya koymaktadır. Notch yolağı inhibitörü DAPT tedavisi, NILCO ile VEGFA ve VEGFR1 gen ekspresyonlarının düzeylerini azaltmıştır. IL-1 yolağının inhibitörü Anakinra tedavisi, VEGFR2 gen ekspresyonunu ve NILCO yolağının tüm protein ekspresyonlarını azaltmıştır. Leptin reseptör antagonisti Allo-aca tedavisi ise istatistiksel olarak anlamlılık göstermese de leptin, leptin ObR ve VEGFR2 ekspresyonunu azaltmıştır. HCT-15 kolon kanser hücreleri enjekte edilmiş scid (NOD/SCID) farelerde, tümör oluşumuna rağmen tümör volüm ve H&E boyama görünümleri açısından gruplar arasında bir fark gözlenmemiştir.

Her iki cinsiyette de sıklıkla gözlenen kanser türlerinden biri olan KRK hastalarına uygun tedavi yöntemlerinin geliştirilebilmesi için kanser oluşumuna dahil olan genler ve yolaklarının bir bütün olarak kapsamlı bir şekilde incelenmesi gerekmektedir (Grant vd., 2004). KRK gelişiminde pek çok risk faktörü vardır, bunlardan biri de adipokin metabolizmasındaki değişikliklerdir (van Kruijsdijk, van der Wall, & Visseren, 2009). Yapılan moleküler çalışmalar, adipokinlerin çoğu zaman hücre içi sinyal yollarını doğrudan ya da aracı moleküller ile etkileyebildiğini göstermiştir. Etkilenen bu sinyal yolları ise hücre döngüsünde önemli rol oynayan onkojen ya da tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonlarını düzenlemektedir. Kolon hücrelerinde yapılan in vitro bir çalışmada, adipokinlerin mitojen gibi davrandığı ve apoptozisi inhibe ederek tümör gelişimini artırdığı gösterilmiştir (Wei, Giovannucci, Fuchs, Willett, & Mantzoros, 2005). Önemli adipokinlerden biri olan leptinin, insan Ob geni tarafından kodlandığı ve normal koşullarda enerji algılayıcısı olarak iş gördüğü bilinmektedir. KRK' nında içinde olduğu çoğu kanser türünde, kan leptin seviyelerinde değişiklikler görülmüştür (Erkasap vd., 2013; Wei vd., 2005). Bizim yapmış olduğumuz bu çalışma sonuçlarına göre s.c olarak verilen leptin inhibitörü Allo-aca, Notch inhibitörü DAPT ve IL-1 inhibitörü Anakinra, leptin gen ekspresyonunu baskılamıştır.

Ancak bu inhibisyon, Notch inhibitörü DAPT verilen grupta diğerlerine göre istatistiksel olarak daha da anlamlı farklılık göstermiştir.

Leptinin reseptörüne bağlanması, IL-1' in de aralarında olduğu çeşitli proinflammatuar sitokinlerin üretimine neden olur (Newman & Gonzalez-Perez, 2014). Bizim çalışmamızda da literatürle uyumlu olarak, bütün tedavi gruplarında leptin gen ekspresyonu azalmıştır. Western blot sonuçlarımıza göre ise sadece IL-1 inhibitörü Anakinra verilen grupta leptin protein ekspresyonu kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde azalmıştır. Yapılan literatür taramalarında hiçbir kanser türünde IL-1 inhibitörü ve leptin arasındaki etkileşim çalışılmamıştır. Bu nedenle çalışmamızda, IL-1 inhibitörü ve leptin arasındaki olası ilişkinin KRK gelişimi üzerine etkilerinin açığa çıkarılması hedeflenmiştir.

Yapılan çalışmalarda leptin ve IL-1 indüklü sinyallerin pek çok patolojik koşullarda birbiriyle bağlantılı olduğu bildirilmiştir (Rene Gonzalez vd., 2009). Bu ilişki tümör inflamasyonu, proliferasyonu ve anjiojenezde önemli rol oynar. IL-1 ekspresyonunun, meme kanseri, akciğer kanseri, KRK ve melanom tümörlerinde tümör büyümesi ve metastazını etkilediği bildirilmiştir (Wang, Wood, & Trayhurn, 2008). Pei-Hung Chang ve arkadaşları KRK hastalarında yaptıkları bir çalışmada, IL-1 β serum seviyelerini ölçerek, proinflammatuar sitokinlerin aracılık ettiği inflamasyon sürecinin KRK gelişimine ve prognozuna katkıda bulunduğunu göstermişlerdir (Chang vd., 2016). IL-1' in leptin indüklü etkileri hücreye spesifiktir. Apte ve arkadaşlarının meme kanserinde yaptığı in vitro çalışmada, leptin ile IL-1 arasındaki ilişki direkt olarak gösterilmiştir (Apte vd., 2006). Daha da önemlisi IL-1, IL-1R TipI (tl) ile bağlanarak leptinin etkilerine aracılık eder (Rene Gonzalez vd., 2009). Bizim çalışmamızda IL-1R gen ekspresyonu DAPT verilen grupta kontrole göre azalmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlılık göstermemiştir. IL-1 β geninin DAPT ve IL-1 inhibitörü Anakinra verilen tedavi gruplarındaki mRNA ekspresyonu azalırken Allo-aca verilen grupta değişmemiştir. Western blot sonuçlarımıza göre IL-1 β protein ekspresyonu IL-1 inhibitörü olan Anakinra verilen grupta kontrol grubuna göre azalmıştır.

Leptin sinyali, JAK2 / STAT3 'ün de dahil olduğu birçok sinyal yolağı üzerinden iletilir. STAT3, hücre döngüsünün devamlılığını koruyarak ve apoptozu engelleyerek onkojeneze katkı sağlar. Leptin'in parakrin veya otokrin etkileri, tümör hücrelerinin inflamatuvar sitokinleri salgılaması için uyarıcı olabilir. Ayrıca leptin, çeşitli büyüme faktörlerinin ve sitokinlerin salgılanmasına yol açarak tümörün yayılmasını da tetikleyebilir (Guo, Liu, Wang, Torroella-Kouri, & Gonzalez-Perez, 2012). Endo ve arkadaşları, KRK gelişiminde leptinin ObRb / STAT3 yolağı aracılığıyla rol oynadığını ileri sürmüşlerdir. Yapılan bu in-vitro çalışmada normal kolonik epitelyal hücreler ile tümörlü hücreler karşılaştırıldığında tümörlü hücrelerde ObRb ekspresyonunun daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Yine aynı çalışma da leptinin, obez hastalarda KRK gelişiminde büyüme faktörü gibi rol oynadığı gösterilmiştir (Endo vd., 2011). Milosevic ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada ise KRK' de leptin reseptör ekspresyonunun, tümör hücrelerinin çoğalma ve anjiyojenezi ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Milosevic vd., 2015). Bizim çalışmamızda da kontrol ve tedavi grubu kıyaslandığında ObRb ekspresyonu, leptin inhibitörü Allo-aca ve Notch inhibitörü DAPT verilen grupta azalmıştır. Tüm bu veriler, bir adipokin olan leptinin kanser gelişiminde moleküler düzenlemeye önemli oranda katkıda bulunduğuna işaret etmektedir.

KRK gelişiminde önemli olduğu bilinen bir diğer yolak da prokarsinojenik Notch sinyalizasyon yolağıdır ve intestinal epitelyumun normal devamlılığı ve homeostazisi için gereklidir (Noah & Shroyer, 2013). Notch sinyalizasyonu; proliferasyon, farklılaşma ve apoptosis arasındaki dengeyi düzenlemede önemli bir role sahiptir (Artavanis-Tsakonas vd., 1999). Bu yolak, tümör anjiyojenezinde rol oynadığı gibi kötü prognoz ve yaşam süresi ile de bağlantılıdır. Notch ligand ve reseptörleri transmembran proteinlerdir (Gonzalez-Perez, Lanier, & Newman, 2013). Notch reseptörlerinin ligandlarıyla olan etkileşimi gamma-secretase tarafından Notch' un proteolitik yıkımına ve Notch' un intraselüler domaini olan ve nükleer translokasyonunu başlatan NICD' ın aktifleşmesine neden olur. NICD' ın nükleer translokasyonunu takiben, hedef genlerin transkripsiyonel aktivasyonu başlar

(Takebe, Nguyen, & Yang, 2014). İnsan kolon adenokarsinomları ve KRK hücre hatlarında yapılan çalışmalarda, Notch1 ve Notch2 reseptörleri ile birlikte Jagged ligandlarının da eksprese olduğu bildirilmiştir (Guilmeau, Flandez, Mariadason, & Augenlicht, 2010). Serafin ve arkadaşları yaptıkları çalışmada Notch3 düzeylerinin de primer kolorektal kanser örneklerinde önemli miktarda arttığına işaret etmişlerdir (Serafin vd., 2011). Bu araştırmacıların yaptığı çalışmadan çıkan sonuçlar, DLL4 ve Jagged1' in kolorektal kanserdeki Notch3 ekspresyonu ile uyumludur (Pasto vd., 2014). Rodilla ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise Notch ligandı olan Jagged1' in delesyonu sonucu Notch sinyalizasyonunun inaktivasyonu ile farelerde tümör büyümesi inhibe edilmiştir (Rodilla vd., 2009)

Bizim çalışmamız da daha önce yapılan çalışma sonuçları ile uyumlu olarak, Notch inhibitörü DAPT verilen grupta Notch1 ve Jagged1 gen ekspresyonları azalmıştır. IL-1 inhibitörü Anakinra verilen grupta Jagged1 gen ve Notch protein ekspresyonu da azalmıştır. Bu da bize, DAPT ve Anakinra' nın KRK' da Notch ve IL-1' i inhibe ederek tümör gelişiminde tedavi edici etkilerinin olabileceğini göstermektedir. Meme kanser çalışmalarına ilaveten bizim KRK çalışmamızın sonuçları da kanser gelişiminde Notch ve IL-1' in birlikte rol oynadığını düşündürmektedir.

Tümör hücrelerinin büyümesi için temel faktörlerin oksijen ve besin olduğu bilinmektedir. Tümör hücreleri bunu başarabilmek için çeşitli anjiojenik faktörleri salgırlar. Bu faktörler, tümör gelişiminde önemli olan proliferasyon, farklılaşma ve yeni kan damarlarının oluşumu için önemlidir. Bilinen en potent anjiojenik sitokin olan VEGF; makrofaj, mast hücreleri, fibroblast, keratinosit ve düz kas hücresi gibi pek çok hücreden salgılanır. VEGF salınımına etkili faktörler hipoksi, inflamatuvar sitokinler, reaktif oksijen radikalleri, nitrik oksit ve hormonlardır. Bu faktörlere ilaveten leptin de vasküler permabiliteyi, VEGF / VEGFR-2 ve matriks metalloproteinaz (MMPs) ekspresyonlarını artırarak anjiojenezise katkıda bulunur (Gonzalez-Perez vd., 2013). Son zamanlarda meme kanserinde yapılan çalışmalarda, leptinin Notch düzenleyicilerinden biri olduğu, VEGF sinyali aracılığıyla anjiyojenezi etkilediği, IL-1'in ise VEGF / VEGFR2 ile birlikte Notch

sinyalizasyon yolağında önemli olan Notch1-4 / JAG1 / Dll-4 gen ekspresyonlarını artırdığı bildirilmiştir (Lipsey vd., 2016). Bizim çalışmamızda da, Notch inhibitörü DAPT verilen grupta, VEGFA ve VEGFR1 gen ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmıştır. IL-1 inhibitörü Anakinra verilen grupta ise VEGFR2 azalmıştır. Leptin inhibitörü Allo-aca'nın ise Anakinra gibi etki göstererek VEGFR2' yi inhibe edip anjiojenezi baskıladığı ve böylece tümör oluşumunu geriletebileceğini düşündürmüştür. Guo ve arkadaşları, meme kanserinde VEGF / VEGFR2'nin leptin tarafından indüklenmesi nedeniyle leptin-Notch-IL-1 (NILCO) etkileşiminin tümör gelişiminde önemli olduğunu bildirmişlerdir. Bu üç molekül arasındaki etkileşimi ifade eden NILCO, kanser oluşumunda proliferasyon / migration ve pro-anjiojenik moleküllerin ekspresyonunda temel rol oynar (Guo & Gonzalez-Perez, 2011).

Çeşitli dokularda yapılan kanser çalışmaları incelendiğinde, leptin ile indüklenen hücre proliferasyonunun inhibisyonu, leptinin anjiojenik hedef genleri olan, VEGF / VEGFR-2, IL-1 ve Notch düzeylerini önemli oranda azaltarak tümör büyümesini baskıladıkları gözlenmiştir (Carino vd., 2008). Ancak, NILCO ve kanser gelişimi arasındaki ilişkiye yönelik kolon dokusunda yapılmış kapsamlı moleküler bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu bağlamda yaptığımız çalışma, NILCO ve KRK ilişkisini ve NILCO' nun farmakolojik inhibisyonu ile tedavi üzerine olası etkilerini inceleyen ilk çalışmadır. Bu çalışmadan çıkan sonuçlar, kolorektal kanser oluşum mekanizmasında rol oynayan NILCO ilişkili hücre içi yollar hakkında bilgi verdiği gibi bu hedef yolların inhibisyonu ile yeni tedavi yöntemlerini de literatüre kazandırabilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

NILCO ve kolorektal kanser gelişimi arasındaki ilişkiye yönelik olan bu çalışma ilk kez kolon dokusunda yapıldığı için önemlidir ve daha kapsamlı çalışmalara da öncü olacaktır. Aynı zamanda, NILCO inhibisyonun tedavi üzerine olası etkileri de incelenmiş olup kanser tedavisine yeni seçenekler sunabilmesi açısından önemlidir. Bu çalışmadan çıkan sonuçları temel alarak, kolorektal kanser oluşum mekanizmasında rol oynayan NILCO ilişkili hücre içi yolakları ve bunların inhibisyonu veya aktivasyonu ile olası yeni tedavi yöntemlerini ortaya koyabilecek çalışmalar yapılabilir.

7. KAYNAKLAR

Abizaid, A., Gao, Q., & Horvath, T. L. (2006). Thoughts for food: brain mechanisms and peripheral energy balance. *Neuron*, *51*(6), 691-702. doi:10.1016/j.neuron.2006.08.025

Acar, M., Jafar-Nejad, H., Takeuchi, H., Rajan, A., Ibrani, D., Rana, N. A., Bellen, H. J. (2008). Rumi is a CAP10 domain glycosyltransferase that modifies Notch and is required for Notch signaling. *Cell*, *132*(2), 247-258. doi:10.1016/j.cell.2007.12.016

Aleman, M. R., Santolaria, F., Batista, N., de La Vega, M., Gonzalez-Reimers, E., Milena, A., . . . Gomez-Sirvent, J. L. (2002). Leptin role in advanced lung cancer. A mediator of the acute phase response or a marker of the status of nutrition? *Cytokine*, *19*(1), 21-26. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12200109>

Alheim, K., Chai, Z., Fantuzzi, G., Hasanvan, H., Malinowsky, D., Di Santo, E., Bartfai, T. (1997). Hyperresponsive febrile reactions to interleukin (IL) 1alpha and IL-1beta, and altered brain cytokine mRNA and serum cytokine levels, in IL-1beta-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *94*(6), 2681-2686. doi:10.1073/pnas.94.6.2681

Alitalo, K., & Carmeliet, P. (2002). Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in health and disease. *Cancer Cell*, *1*(3), 219-227. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12086857>

Andersson, E. R., Sandberg, R., & Lendahl, U. (2011). Notch signaling: simplicity in design, versatility in function. *Development*, *138*(17), 3593-3612. doi:10.1242/dev.063610

Apte, R. N., Dotan, S., Elkabets, M., White, M. R., Reich, E., Carmi, Y., . Voronov, E. (2006). The involvement of IL-1 in tumorigenesis, tumor invasiveness, metastasis and tumor-host interactions. *Cancer Metastasis Rev*, *25*(3), 387-408. doi:10.1007/s10555-006-9004-4

Apte, R. N., & Voronov, E. (2008). Is interleukin-1 a good or bad 'guy' in tumor immunobiology and immunotherapy? *Immunol Rev*, *222*, 222-241. doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00615.x

Arora, S., & Anubhuti. (2006). Role of neuropeptides in appetite regulation and obesity--a review. *Neuropeptides*, *40*(6), 375-401. doi:10.1016/j.npep.2006.07.001

Arpaci, F., Yilmaz, M. I., Ozet, A., Ayta, H., Ozturk, B., Komurcu, S., & Ozata, M. (2002). Low serum leptin level in colon cancer patients without significant weight loss. *Tumori*, *88*(2), 147-149. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12088256>

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Artavanis-Tsakonas, S., & Muskavitch, M. A. (2010). Notch: the past, the present, and the future. *Curr Top Dev Biol*, *92*, 1-29. doi:10.1016/S0070-2153(10)92001-2

Artavanis-Tsakonas, S., Muskavitch, M. A., & Yedvobnick, B. (1983). Molecular cloning of Notch, a locus affecting neurogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *80*(7), 1977-1981. doi:10.1073/pnas.80.7.1977

Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M. D., & Lake, R. J. (1999). Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science*, *284*(5415), 770-776. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10221902>

Aste-Amezaga, M., Zhang, N., Lineberger, J. E., Arnold, B. A., Toner, T. J., Gu, M., . . . Huber, H. E. (2010). Characterization of Notch1 antibodies that inhibit signaling of both normal and mutated Notch1 receptors. *PLoS One*, *5*(2), e9094. doi:10.1371/journal.pone.0009094

Attoub, S., Noe, V., Pirola, L., Bruyneel, E., Chastre, E., Mareel, M., Gespach, C. (2000). Leptin promotes invasiveness of kidney and colonic epithelial cells via phosphoinositide 3-kinase-, rho-, and rac-dependent signaling pathways. *FASEB J*, *14*(14), 2329-2338. doi:10.1096/fj.00-0162

Balthasar, N., Coppari, R., McMinn, J., Liu, S. M., Lee, C. E., Tang, V., Lowell, B. B. (2004). Leptin receptor signaling in POMC neurons is required for normal body weight homeostasis. *Neuron*, *42*(6), 983-991. doi:10.1016/j.neuron.2004.06.004

Bates, S. H., & Myers, M. G., Jr. (2003). The role of leptin receptor signaling in feeding and neuroendocrine function. *Trends Endocrinol Metab*, *14*(10), 447-452. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14643059>

Bates, S. H., Stearns, W. H., Dundon, T. A., Schubert, M., Tso, A. W., Wang, Y., Myers, M. G., Jr. (2003). STAT3 signalling is required for leptin regulation of energy balance but not reproduction. *Nature*, *421*(6925), 856-859. doi:10.1038/nature01388

Bayer, L., Jacquemard, C., Fellmann, D., & Griffond, B. (1999). Survival of rat MCH (melanin-concentrating hormone) neurons in hypothalamus slice culture: histological, pharmacological and molecular studies. *Cell Tissue Res*, *297*(1), 23-33. doi:10.1007/s004410051330

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Berda-Haddad, Y., Robert, S., Salers, P., Zekraoui, L., Farnarier, C., Dinarello, C. A., . . . Kaplanski, G. (2011). Sterile inflammation of endothelial cell-derived apoptotic bodies is mediated by interleukin-1alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *108*(51), 20684-20689. doi:10.1073/pnas.1116848108

Bjorbaek, C., Elmquist, J. K., Michl, P., Ahima, R. S., van Bueren, A., McCall, A. L., & Flier, J. S. (1998). Expression of leptin receptor isoforms in rat brain microvessels. *Endocrinology*, *139*(8), 3485-3491. doi:10.1210/endo.139.8.6154

Borggreffe, T., & Liefke, R. (2012). Fine-tuning of the intracellular canonical Notch signaling pathway. *Cell Cycle*, *11*(2), 264-276. doi:10.4161/cc.11.2.18995

Botteri, E., Iodice, S., Raimondi, S., Maisonneuve, P., & Lowenfels, A. B. (2008). Cigarette smoking and adenomatous polyps: a meta-analysis. *Gastroenterology*, *134*(2), 388-395. doi:10.1053/j.gastro.2007.11.007

Bouloumie, A., Drexler, H. C., Lafontan, M., & Busse, R. (1998). Leptin, the product of Ob gene, promotes angiogenesis. *Circ Res*, *83*(10), 1059-1066. doi:10.1161/01.res.83.10.1059

Brennan, A. M., & Mantzoros, C. S. (2006). Drug Insight: the role of leptin in human physiology and pathophysiology--emerging clinical applications. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*, *2*(6), 318-327. doi:10.1038/ncpendmet0196

Caan, B. J., Coates, A. O., Slattery, M. L., Potter, J. D., Quesenberry, C. P., Jr., & Edwards, S. M. (1998). Body size and the risk of colon cancer in a large case-control study. *Int J Obes Relat Metab Disord*, *22*(2), 178-184. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9504326>

Caldefie-Chezet, F., Poulin, A., & Vasson, M. P. (2003). Leptin regulates functional capacities of polymorphonuclear neutrophils. *Free Radic Res*, *37*(8), 809-814. doi:10.1080/1071576031000097526

Calle, E. E., Rodriguez, C., Walker-Thurmond, K., & Thun, M. J. (2003). Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med*, *348*(17), 1625-1638. doi:10.1056/NEJMoa021423

Cao, R., Brakenhielm, E., Wahlestedt, C., Thyberg, J., & Cao, Y. (2001). Leptin induces vascular permeability and synergistically stimulates angiogenesis with FGF-2 and VEGF. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *98*(11), 6390-6395. doi:10.1073/pnas.101564798

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Carino, C., Olawaiye, A. B., Cherfils, S., Serikawa, T., Lynch, M. P., Rueda, B. R., & Gonzalez, R. R. (2008). Leptin regulation of proangiogenic molecules in benign and cancerous endometrial cells. *Int J Cancer*, *123*(12), 2782-2790. doi:10.1002/ijc.23887

Carmi, Y., Dotan, S., Rider, P., Kaplanov, I., White, M. R., Baron, R., Voronov, E. (2013). The role of IL-1beta in the early tumor cell-induced angiogenic response. *J Immunol*, *190*(7), 3500-3509. doi:10.4049/jimmunol.1202769

Carroll, K. K. (1998). Obesity as a risk factor for certain types of cancer. *Lipids*, *33*(11), 1055-1059. doi:10.1007/s11745-998-0305-8

Cell Biology and Cancer. Retrieved from (file:///C:/Users/Windows%2010/Desktop/8_cancer.pdf).

Chae, Y. K., Anker, J. F., Carneiro, B. A., Chandra, S., Kaplan, J., Kalyan, A., .Giles, F. J. (2016). Genomic landscape of DNA repair genes in cancer. *Oncotarget*, *7*(17), 23312-23321. doi:10.18632/oncotarget.8196

Chang, P. H., Pan, Y. P., Fan, C. W., Tseng, W. K., Huang, J. S., Wu, T. H., . Yeh, K. Y. (2016). Pretreatment serum interleukin-1beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha levels predict the progression of colorectal cancer. *Cancer Med*, *5*(3), 426-433. doi:10.1002/cam4.602

Charng, W. L., Yamamoto, S., Jaiswal, M., Bayat, V., Xiong, B., Zhang, K., .Bellen, H. J. (2014). Drosophila Tempura, a novel protein prenyltransferase alpha subunit, regulates notch signaling via Rab1 and Rab11. *PLoS Biol*, *12*(1), e1001777. doi:10.1371/journal.pbio.1001777

Coffman, C. R., Skoglund, P., Harris, W. A., & Kintner, C. R. (1993). Expression of an extracellular deletion of Xotch diverts cell fate in Xenopus embryos. *Cell*, *73*(4), 659-671. doi:10.1016/0092-8674(93)90247-n

Colbert, L. S., Wilson, K., Kim, S., Liu, Y., Oprea-Ilies, G., Gillespie, C., .Gonzalez-Perez, R. R. (2014). NILCO biomarkers in breast cancer from Chinese patients. *BMC Cancer*, *14*, 249. doi:10.1186/1471-2407-14-249

Cooper, G. S., Yuan, Z., Landefeld, C. S., & Rimm, A. A. (1996). Surgery for colorectal cancer: Race-related differences in rates and survival among Medicare beneficiaries. *Am J Public Health*, *86*(4), 582-586. doi:10.2105/ajph.86.4.582

Cowley, M. A., Smart, J. L., Rubinstein, M., Cerdan, M. G., Diano, S., Horvath, T. L., Low, M. J. (2001). Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature*, *411*(6836), 480-484. doi:10.1038/35078085

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

de Bivort, B. L., Guo, H. F., & Zhong, Y. (2009). Notch signaling is required for activity-dependent synaptic plasticity at the *Drosophila* neuromuscular junction. *J Neurogenet*, 23(4), 395-404. doi:10.3109/01677060902878481

Dexter, J. S. (1914). The Analysis of a Case of Continuous Variation in *Drosophila* by a Study of Its Linkage Relations. *The American Naturalist*, 48(576), 712-758. doi:10.1086/279446

Dhillon, H., Zigman, J. M., Ye, C., Lee, C. E., McGovern, R. A., Tang, V., . Lowell, B. B. (2006). Leptin directly activates SF1 neurons in the VMH, and this action by leptin is required for normal body-weight homeostasis. *Neuron*, 49(2), 191-203. doi:10.1016/j.neuron.2005.12.021

Dinarello, C., Arend, W., Sims, J., Smith, D., Blumberg, H., O'Neill, L., Gabel, C. (2010). IL-1 family nomenclature. *Nat Immunol*, 11(11), 973. doi:10.1038/ni1110-973

Dinarello, C. A. (2010). Anti-inflammatory Agents: Present and Future. *Cell*, 140(6), 935-950. doi:10.1016/j.cell.2010.02.043

Dinarello, C. A. (2011). Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood*, 117(14), 3720-3732. doi:10.1182/blood-2010-07-273417

Dinarello, C. A., Ikejima, T., Warner, S. J., Orencole, S. F., Lonnemann, G., Cannon, J. G., & Libby, P. (1987). Interleukin 1 induces interleukin 1. I. Induction of circulating interleukin 1 in rabbits in vivo and in human mononuclear cells in vitro. *J Immunol*, 139(6), 1902-1910.

Dinarello, C. A., Renfer, L., & Wolff, S. M. (1977). Human leukocytic pyrogen: purification and development of a radioimmunoassay. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74(10), 4624-4627. doi:10.1073/pnas.74.10.4624

Dinarello, C. A., Simon, A., & van der Meer, J. W. (2012). Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. *Nat Rev Drug Discov*, 11(8), 633-652. doi:10.1038/nrd3800

Dower, S. K., & Urdal, D. L. (1987). The interleukin-1 receptor. *Immunol Today*, 8(2), 46-51. doi:10.1016/0167-5699(87)90238-6

Duan, J., Choi, Y. H., Hartzell, D., Della-Fera, M. A., Hamrick, M., & Baile, C. A. (2007). Effects of subcutaneous leptin injections on hypothalamic gene profiles in lean and ob/ob mice. *Obesity (Silver Spring)*, 15(11), 2624-2633. doi:10.1038/oby.2007.314

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Edwards, B. K., Brown, M. L., Wingo, P. A., Howe, H. L., Ward, E., Ries, L. A., Pickle, L. W. (2005). Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2002, featuring population-based trends in cancer treatment. *J Natl Cancer Inst*, *97*(19), 1407-1427. doi:10.1093/jnci/dji289

Endo, H., Hosono, K., Uchiyama, T., Sakai, E., Sugiyama, M., Takahashi, H., Nakajima, A. (2011). Leptin acts as a growth factor for colorectal tumours at stages subsequent to tumour initiation in murine colon carcinogenesis. *Gut*, *60*(10), 1363-1371. doi:10.1136/gut.2010.235754

Erkasap, N., Ozkurt, M., Erkasap, S., Yasar, F., Uzuner, K., Ihtiyar, E., Bolluk, O. (2013). Leptin receptor (Ob-R) mRNA expression and serum leptin concentration in patients with colorectal and metastatic colorectal cancer. *Braz J Med Biol Res*, *46*(3), 306-310. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23558862>

Ernst, M. B., Wunderlich, C. M., Hess, S., Paehler, M., Mesaros, A., Koralov, S. B., . . . Wunderlich, F. T. (2009). Enhanced Stat3 activation in POMC neurons provokes negative feedback inhibition of leptin and insulin signaling in obesity. *J Neurosci*, *29*(37), 11582-11593. doi:10.1523/JNEUROSCI.5712-08.2009

Espinoza, I., & Miele, L. (2013). Notch inhibitors for cancer treatment. *Pharmacol Ther*, *139*(2), 95-110. doi:10.1016/j.pharmthera.2013.02.003

Farooqi, I. S., Matarese, G., Lord, G. M., Keogh, J. M., Lawrence, E., Agwu, C., O'Rahilly, S. (2002). Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. *J Clin Invest*, *110*(8), 1093-1103. doi:10.1172/JCI15693

Fei, H., Okano, H. J., Li, C., Lee, G. H., Zhao, C., Darnell, R., & Friedman, J. M. (1997). Anatomic localization of alternatively spliced leptin receptors (Ob-R) in mouse brain and other tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *94*(13), 7001-7005. doi:10.1073/pnas.94.13.7001

Ferrara, N., & Kerbel, R. S. (2005). Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature*, *438*(7070), 967-974. doi:10.1038/nature04483

Francis, R., McGrath, G., Zhang, J., Ruddy, D. A., Sym, M., Apfeld, J., Curtis, D. (2002). *aph-1* and *pen-2* are required for Notch pathway signaling, gamma-secretase cleavage of betaAPP, and presenilin protein accumulation. *Dev Cell*, *3*(1), 85-97. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12110170>

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Friedenreich, C., Norat, T., Steindorf, K., Boutron-Ruault, M. C., Pischon, T., Mazuir, M., . . . Riboli, E. (2006). Physical activity and risk of colon and rectal cancers: the European prospective investigation into cancer and nutrition. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 15(12), 2398-2407. doi:10.1158/1055-9965.EPI-06-0595

Friedman, J. M., & Halaas, J. L. (1998). Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*, 395(6704), 763-770. doi:10.1038/27376

Fryer, C. J., White, J. B., & Jones, K. A. (2004). Mastermind recruits CycC:CDK8 to phosphorylate the Notch ICD and coordinate activation with turnover. *Mol Cell*, 16(4), 509-520. doi:10.1016/j.molcel.2004.10.014

Furriols, M., & Bray, S. (2001). A model Notch response element detects Suppressor of Hairless-dependent molecular switch. *Curr Biol*, 11(1), 60-64. doi:10.1016/s0960-9822(00)00044-0

Gao, Q., & Horvath, T. L. (2008). Cross-talk between estrogen and leptin signaling in the hypothalamus. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 294(5), E817-826. doi:10.1152/ajpendo.00733.2007

Gao, Q., Wolfgang, M. J., Neschen, S., Morino, K., Horvath, T. L., Shulman, G. I., & Fu, X. Y. (2004). Disruption of neural signal transducer and activator of transcription 3 causes obesity, diabetes, infertility, and thermal dysregulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(13), 4661-4666. doi:10.1073/pnas.0303992101

Garlanda, C., Dinarello, C. A., & Mantovani, A. (2013). The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity*, 39(6), 1003-1018. doi:10.1016/j.immuni.2013.11.010

Gibbs, W. W. (2003). Untangling the roots of cancer. *Sci Am*, 289(1), 56-65. doi:10.1038/scientificamerican0703-56

Gillespie C, Q. A., Penichet M3and Gonzalez-Perez RR. (2012). Potential Role of Leptin Signaling in DMBA induced Mammary Tumors by Non-Responsive C57BL/6J Mice Fed a High-Fat Diet.

Gonzalez-Perez, R. R., Lanier, V., & Newman, G. (2013). Leptin's Pro-Angiogenic Signature in Breast Cancer. *Cancers (Basel)*, 5(3), 1140-1162. doi:10.3390/cancers5031140

Grant, G. M., Fortney, A., Gorreta, F., Estep, M., Del Giacco, L., Van Meter, A., Chandhoke, V. (2004). Microarrays in cancer research. *Anticancer Res*, 24(2A), 441-448. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15152942>

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Graziano, F., Ruzzo, A., Canestrari, E., Loupakis, F., Santini, D., Rulli, E., Magnani, M. (2009). Variations in the interleukin-1 receptor antagonist gene impact on survival of patients with advanced colorectal cancer. *Pharmacogenomics J*, 9(1), 78-84. doi:10.1038/tpj.2008.16

Greenwald, I., & Rubin, G. M. (1992). Making a difference: the role of cell-cell interactions in establishing separate identities for equivalent cells. *Cell*, 68(2), 271-281. doi:10.1016/0092-8674(92)90470-w

Grivennikov, S. I. (2013). Inflammation and colorectal cancer: colitis-associated neoplasia. *Semin Immunopathol*, 35(2), 229-244. doi:10.1007/s00281-012-0352-6

Guilmeau, S., Flandez, M., Mariadason, J. M., & Augenlicht, L. H. (2010). Heterogeneity of Jagged1 expression in human and mouse intestinal tumors: implications for targeting Notch signaling. *Oncogene*, 29(7), 992-1002. doi:10.1038/onc.2009.393

Gunter, M. J., Canzian, F., Landi, S., Chanock, S. J., Sinha, R., & Rothman, N. (2006). Inflammation-related gene polymorphisms and colorectal adenoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 15(6), 1126-1131. doi:10.1158/1055-9965.EPI-06-0042

Guo, S., & Gonzalez-Perez, R. R. (2011). Notch, IL-1 and leptin crosstalk outcome (NILCO) is critical for leptin-induced proliferation, migration and VEGF/VEGFR-2 expression in breast cancer. *PLoS One*, 6(6), e21467. doi:10.1371/journal.pone.0021467

Guo, S., Liu, M., Wang, G., Torroella-Kouri, M., & Gonzalez-Perez, R. R. (2012). Oncogenic role and therapeutic target of leptin signaling in breast cancer and cancer stem cells. *Biochim Biophys Acta*, 1825(2), 207-222. doi:10.1016/j.bbcan.2012.01.002

Hardwick, J. C., Van Den Brink, G. R., Offerhaus, G. J., Van Deventer, S. J., & Peppelenbosch, M. P. (2001). Leptin is a growth factor for colonic epithelial cells. *Gastroenterology*, 121(1), 79-90. doi:10.1053/gast.2001.25490

Harvey Lodish, A. B., S Lawrence Zipursky, Paul Matsudaira, David Baltimore, and James Darnell. (2000). *Molecular Cell Biology*, 4th edition.

Heavey, P. M., McKenna, D., & Rowland, I. R. (2004). Colorectal cancer and the relationship between genes and the environment. *Nutr Cancer*, 48(2), 124-141. doi:10.1207/s15327914nc4802_2

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Hedley, A. A., Ogden, C. L., Johnson, C. L., Carroll, M. D., Curtin, L. R., & Flegal, K. M. (2004). Prevalence of overweight and obesity among US children, adolescents, and adults, 1999-2002. *JAMA*, *291*(23), 2847-2850. doi:10.1001/jama.291.23.2847

Hong, D. S., Hui, D., Bruera, E., Janku, F., Naing, A., Falchook, G. S., . . . Kurzrock, R. (2014). MABp1, a first-in-class true human antibody targeting interleukin-1alpha in refractory cancers: an open-label, phase 1 dose-escalation and expansion study. *Lancet Oncol*, *15*(6), 656-666. doi:10.1016/S1470-2045(14)70155-X

Horai, R., Saijo, S., Tanioka, H., Nakae, S., Sudo, K., Okahara, A., Iwakura, Y. (2000). Development of chronic inflammatory arthropathy resembling rheumatoid arthritis in interleukin 1 receptor antagonist-deficient mice. *J Exp Med*, *191*(2), 313-320. doi:10.1084/jem.191.2.3

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Howard, J. K., Lord, G. M., Matarese, G., Vendetti, S., Ghatei, M. A., Ritter, M. A., . . . Bloom, S. R. (1999). Leptin protects mice from starvation-induced lymphoid atrophy and increases thymic cellularity in ob/ob mice. *J Clin Invest*, *104*(8), 1051-1059. doi:10.1172/JCI6762

Hubbard, E. J., Wu, G., Kitajewski, J., & Greenwald, I. (1997). sel-10, a negative regulator of lin-12 activity in *Caenorhabditis elegans*, encodes a member of the CDC4 family of proteins. *Genes Dev*, *11*(23), 3182-3193. doi:10.1101/gad.11.23.3182

Huenniger, K., Kramer, A., Soom, M., Chang, I., Kohler, M., Depping, R., Kaether, C. (2010). Notch1 signaling is mediated by importins alpha 3, 4, and 7. *Cell Mol Life Sci*, *67*(18), 3187-3196. doi:10.1007/s00018-010-0378-7

Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., Murray, T., & Thun, M. J. (2008). Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin*, *58*(2), 71-96. doi:10.3322/CA.2007.0010

Jorissen, E., & De Strooper, B. (2010). Gamma-secretase and the intramembrane proteolysis of Notch. *Curr Top Dev Biol*, *92*, 201-230. doi:10.1016/S0070-2153(10)92006-1

Kim, Y. B., Uotani, S., Pierroz, D. D., Flier, J. S., & Kahn, B. B. (2000). In vivo administration of leptin activates signal transduction directly in insulin-sensitive tissues: overlapping but distinct pathways from insulin. *Endocrinology*, *141*(7), 2328-2339. doi:10.1210/endo.141.7.7536

Koch, U., Lehal, R., & Radtke, F. (2013). Stem cells living with a Notch. *Development*, *140*(4), 689-704. doi:10.1242/dev.080614

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Kopan, R., & Ilagan, M. X. (2009). The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell*, *137*(2), 216-233. doi:10.1016/j.cell.2009.03.045

Kopan, R., Nye, J. S., & Weintraub, H. (1994). The intracellular domain of mouse Notch: a constitutively activated repressor of myogenesis directed at the basic helix-loop-helix region of MyoD. *Development*, *120*(9), 2385-2396. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7956819>

Kovall, R. A., & Blacklow, S. C. (2010). Mechanistic insights into Notch receptor signaling from structural and biochemical studies. *Curr Top Dev Biol*, *92*, 31-71. doi:10.1016/S0070-2153(10)92002-4

Krelin, Y., Voronov, E., Dotan, S., Elkabets, M., Reich, E., Fogel, M., Apte, R. N. (2007). Interleukin-1beta-driven inflammation promotes the development and invasiveness of chemical carcinogen-induced tumors. *Cancer Res*, *67*(3), 1062-1071. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-2956

Lake, R. J., Grimm, L. M., Veraksa, A., Banos, A., & Artavanis-Tsakonas, S. (2009). In vivo analysis of the Notch receptor S1 cleavage. *PLoS One*, *4*(8), e6728. doi:10.1371/journal.pone.0006728

Lee, T. V., Sethi, M. K., Leonardi, J., Rana, N. A., Buettner, F. F., Haltiwanger, R. S., . . . Jafar-Nejad, H. (2013). Negative regulation of notch signaling by xylose. *PLoS Genet*, *9*(6), e1003547. doi:10.1371/journal.pgen.1003547

Leininger, G. M., & Myers, M. G., Jr. (2008). LRb signals act within a distributed network of leptin-responsive neurones to mediate leptin action. *Acta Physiol (Oxf)*, *192*(1), 49-59. doi:10.1111/j.1748-1716.2007.01784.x

Leshan, R. L., Bjornholm, M., Munzberg, H., & Myers, M. G., Jr. (2006). Leptin receptor signaling and action in the central nervous system. *Obesity (Silver Spring)*, *14 Suppl 5*, 208S-212S. doi:10.1038/oby.2006.310

Levin, B. E., Dunn-Meynell, A. A., & Banks, W. A. (2004). Obesity-prone rats have normal blood-brain barrier transport but defective central leptin signaling before obesity onset. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, *286*(1), R143-150. doi:10.1152/ajpregu.00393.2003

Lin, X., Chavez, M. R., Bruch, R. C., Kilroy, G. E., Simmons, L. A., Lin, L., York, D. A. (1998). The effects of a high fat diet on leptin mRNA, serum leptin and the response to leptin are not altered in a rat strain susceptible to high fat diet-induced obesity. *J Nutr*, *128*(10), 1606-1613. doi:10.1093/jn/128.10.1606

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Lipsey, C. C., Harbuzariu, A., Daley-Brown, D., & Gonzalez-Perez, R. R. (2016). Oncogenic role of leptin and Notch interleukin-1 leptin crosstalk outcome in cancer. *World J Methodol*, 6(1), 43-55. doi:10.5662/wjm.v6.i1.43

Logeat, F., Bessia, C., Brou, C., LeBail, O., Jarriault, S., Seidah, N. G., & Israel, A. (1998). The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(14), 8108-8112. doi:10.1073/pnas.95.14.8108

Lord, G. M., Matarese, G., Howard, J. K., Baker, R. J., Bloom, S. R., & Lechler, R. I. (1998). Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature*, 394(6696), 897-901. doi:10.1038/29795

Louvi, A., & Artavanis-Tsakonas, S. (2012). Notch and disease: a growing field. *Semin Cell Dev Biol*, 23(4), 473-480. doi:10.1016/j.semcdb.2012.02.005

Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., & Balkwill, F. (2008). Cancer-related inflammation. *Nature*, 454(7203), 436-444. doi:10.1038/nature07205

Matarese, G., Moschos, S., & Mantzoros, C. S. (2005). Leptin in immunology. *J Immunol*, 174(6), 3137-3142. doi:10.4049/jimmunol.174.6.3137

Milosevic, V. S., Vukmirovic, F. C., Krstic, M. S., Zindovic, M. M., Lj Stojanovic, D., & Jancic, S. A. (2015). Involvement of leptin receptors expression in proliferation and neoangiogenesis in colorectal carcinoma. *J BUON*, 20(1), 100-108. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25778303>

Mohr, O. L. (1919). Character Changes Caused by Mutation of an Entire Region of a Chromosome in Drosophila. *Genetics*, 4(3), 275-282. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17245926>

Montague, C. T., Farooqi, I. S., Whitehead, J. P., Soos, M. A., Rau, H., Wareham, N. J., . . . O'Rahilly, S. (1997). Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature*, 387(6636), 903-908. doi:10.1038/43185

Morel, V., & Schweisguth, F. (2000). Repression by suppressor of hairless and activation by Notch are required to define a single row of single-minded expressing cells in the Drosophila embryo. *Genes Dev*, 14(3), 377-388. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10673509>

Morgan TH, B. C. (1916). *Sex-linked inheritance in Drosophila*. Carnegie Inst Wash Publ 237:1-88.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Morrison, C. D. (2009). Leptin signaling in brain: A link between nutrition and cognition? *Biochim Biophys Acta*, 1792(5), 401-408. doi:10.1016/j.bbadis.2008.12.004

Munro, S., & Freeman, M. (2000). The notch signalling regulator fringe acts in the Golgi apparatus and requires the glycosyltransferase signature motif DXD. *Curr Biol*, 10(14), 813-820. doi:10.1016/s0960-9822(00)00578-9

Newman, G., & Gonzalez-Perez, R. R. (2014). Leptin-cytokine crosstalk in breast cancer. *Mol Cell Endocrinol*, 382(1), 570-582. doi:10.1016/j.mce.2013.03.025

Nicolas, M., Wolfer, A., Raj, K., Kummer, J. A., Mill, P., van Noort, M., Radtke, F. (2003). Notch1 functions as a tumor suppressor in mouse skin. *Nat Genet*, 33(3), 416-421. doi:10.1038/ng1099

Noah, T. K., & Shroyer, N. F. (2013). Notch in the intestine: regulation of homeostasis and pathogenesis. *Annu Rev Physiol*, 75, 263-288. doi:10.1146/annurev-physiol-030212-183741

Nock, N. L., Thompson, C. L., Tucker, T. C., Berger, N. A., & Li, L. (2008). Associations between obesity and changes in adult BMI over time and colon cancer risk. *Obesity (Silver Spring)*, 16(5), 1099-1104. doi:10.1038/oby.2008.42

Oberg, C., Li, J., Pauley, A., Wolf, E., Gurney, M., & Lendahl, U. (2001). The Notch intracellular domain is ubiquitinated and negatively regulated by the mammalian Sel-10 homolog. *J Biol Chem*, 276(38), 35847-35853. doi:10.1074/jbc.M103992200

Ogden, C. L., Carroll, M. D., Curtin, L. R., McDowell, M. A., Tabak, C. J., & Flegal, K. M. (2006). Prevalence of overweight and obesity in the United States, 1999-2004. *JAMA*, 295(13), 1549-1555. doi:10.1001/jama.295.13.1549

Pandya, K., Meeke, K., Clementz, A. G., Rogowski, A., Roberts, J., Miele, L., Osipo, C. (2011). Targeting both Notch and ErbB-2 signalling pathways is required for prevention of ErbB-2-positive breast tumour recurrence. *Br J Cancer*, 105(6), 796-806. doi:10.1038/bjc.2011.321

Park, H. Y., Kwon, H. M., Lim, H. J., Hong, B. K., Lee, J. Y., Park, B. E., Kim, H. S. (2001). Potential role of leptin in angiogenesis: leptin induces endothelial cell proliferation and expression of matrix metalloproteinases in vivo and in vitro. *Exp Mol Med*, 33(2), 95-102. doi:10.1038/emm.2001.17

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Pasto, A., Serafin, V., Pilotto, G., Lago, C., Bellio, C., Trusolino, L., Indraccolo, S. (2014). NOTCH3 signaling regulates MUSASHI-1 expression in metastatic colorectal cancer cells. *Cancer Res*, 74(7), 2106-2118. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-2022

Poulson, D. F. (1937). Chromosomal Deficiencies and the Embryonic Development of *Drosophila Melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 23(3), 133-137. doi:10.1073/pnas.23.3.133

Priess, J. R., Schnabel, H., & Schnabel, R. (1987). The glp-1 locus and cellular interactions in early *C. elegans* embryos. *Cell*, 51(4), 601-611. doi:10.1016/0092-8674(87)90129-2

Qu, D., Ludwig, D. S., Gammeltoft, S., Piper, M., Pelleymounter, M. A., Cullen, M. J., Maratos-Flier, E. (1996). A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature*, 380(6571), 243-247. doi:10.1038/380243a0

Ramain, P., Khechumian, K., Seugnet, L., Arbogast, N., Ackermann, C., & Heitzler, P. (2001). Novel Notch alleles reveal a Deltex-dependent pathway repressing neural fate. *Curr Biol*, 11(22), 1729-1738. doi:10.1016/s0960-9822(01)00562-0

Rana, N. A., & Haltiwanger, R. S. (2011). Fringe benefits: functional and structural impacts of O-glycosylation on the extracellular domain of Notch receptors. *Curr Opin Struct Biol*, 21(5), 583-589. doi:10.1016/j.sbi.2011.08.008

Rene Gonzalez, R., Watters, A., Xu, Y., Singh, U. P., Mann, D. R., Rueda, B. R., & Penichet, M. L. (2009). Leptin-signaling inhibition results in efficient anti-tumor activity in estrogen receptor positive or negative breast cancer. *Breast Cancer Res*, 11(3), R36. doi:10.1186/bcr2321

Rex, D. K., Boland, C. R., Dominitz, J. A., Giardiello, F. M., Johnson, D. A., Kaltenbach, T., . . . Robertson, D. J. (2017). Colorectal Cancer Screening: Recommendations for Physicians and Patients from the U.S. Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer. *Am J Gastroenterol*, 112(7), 1016-1030. doi:10.1038/ajg.2017.174

Rider, P., Carmi, Y., Guttman, O., Braiman, A., Cohen, I., Voronov, E., Apte, R. N. (2011). IL-1alpha and IL-1beta recruit different myeloid cells and promote different stages of sterile inflammation. *J Immunol*, 187(9), 4835-4843. doi:10.4049/jimmunol.1102048

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Ridgway, J., Zhang, G., Wu, Y., Stawicki, S., Liang, W. C., Chanthery, Y., Yan, M. (2006). Inhibition of Dll4 signalling inhibits tumour growth by deregulating angiogenesis. *Nature*, 444(7122), 1083-1087. doi:10.1038/nature05313

Rodilla, V., Villanueva, A., Obrador-Hevia, A., Robert-Moreno, A., Fernandez-Majada, V., Grilli, A., . . . Espinosa, L. (2009). Jagged1 is the pathological link between Wnt and Notch pathways in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(15), 6315-6320. doi:10.1073/pnas.0813221106

Rogge, G., Jones, D., Hubert, G. W., Lin, Y., & Kuhar, M. J. (2008). CART peptides: regulators of body weight, reward and other functions. *Nat Rev Neurosci*, 9(10), 747-758. doi:10.1038/nrn2493

Sahu, A. (1998). Leptin decreases food intake induced by melanin-concentrating hormone (MCH), galanin (GAL) and neuropeptide Y (NPY) in the rat. *Endocrinology*, 139(11), 4739-4742. doi:10.1210/endo.139.11.6432

Salcedo, R., Cataisson, C., Hasan, U., Yuspa, S. H., & Trinchieri, G. (2013). MyD88 and its divergent toll in carcinogenesis. *Trends Immunol*, 34(8), 379-389. doi:10.1016/j.it.2013.03.008

Schneider, K. (2001). *Counseling about cancer: Excellent information on the causes of cancer, genetic tests for predisposition to cancer, ethics, and genetic counseling. Strategies for genetic counseling.* .

Serafin, V., Persano, L., Moserle, L., Esposito, G., Ghisi, M., Curtarello, M., Indraccolo, S. (2011). Notch3 signalling promotes tumour growth in colorectal cancer. *J Pathol*, 224(4), 448-460. doi:10.1002/path.2895

Shibuya, M. (1995). Role of VEGF-flt receptor system in normal and tumor angiogenesis. *Adv Cancer Res*, 67, 281-316. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8571818>

Shibuya, M. (2011). Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies. *Genes Cancer*, 2(12), 1097-1105. doi:10.1177/1947601911423031

Shibuya, M., & Claesson-Welsh, L. (2006). Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Exp Cell Res*, 312(5), 549-560. doi:10.1016/j.yexcr.2005.11.012

Sinha, R., Chow, W. H., Kulldorff, M., Denobile, J., Butler, J., Garcia-Closas, M., Rothman, N. (1999). Well-done, grilled red meat increases the risk of colorectal adenomas. *Cancer Res*, 59(17), 4320-4324. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10485479>

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Somasundar, P., McFadden, D. W., Hileman, S. M., & Vona-Davis, L. (2004). Leptin is a growth factor in cancer. *J Surg Res*, *116*(2), 337-349. doi:10.1016/j.jss.2003.09.004

Stattin, P., Palmqvist, R., Soderberg, S., Biessy, C., Ardnor, B., Hallmans, G., Olsson, T. (2003). Plasma leptin and colorectal cancer risk: a prospective study in Northern Sweden. *Oncol Rep*, *10*(6), 2015-2021. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14534736>

Ste Marie, L., Miura, G. I., Marsh, D. J., Yagaloff, K., & Palmiter, R. D. (2000). A metabolic defect promotes obesity in mice lacking melanocortin-4 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *97*(22), 12339-12344. doi:10.1073/pnas.220409497

Sternson, S. M., Shepherd, G. M., & Friedman, J. M. (2005). Topographic mapping of VMH --> arcuate nucleus microcircuits and their reorganization by fasting. *Nat Neurosci*, *8*(10), 1356-1363. doi:10.1038/nn1550

Swan, J., Breen, N., Coates, R. J., Rimer, B. K., & Lee, N. C. (2003). Progress in cancer screening practices in the United States: results from the 2000 National Health Interview Survey. *Cancer*, *97*(6), 1528-1540. doi:10.1002/cncr.11208

Takebe, N., Nguyen, D., & Yang, S. X. (2014). Targeting notch signaling pathway in cancer: clinical development advances and challenges. *Pharmacol Ther*, *141*(2), 140-149. doi:10.1016/j.pharmthera.2013.09.005

Tessitore, L., Vizio, B., Jenkins, O., De Stefano, I., Ritossa, C., Argiles, J. M., Mussa, A. (2000). Leptin expression in colorectal and breast cancer patients. *Int J Mol Med*, *5*(4), 421-426. doi:10.3892/ijmm.5.4.421

van de Veerdonk, F. L., & Netea, M. G. (2013). New Insights in the Immunobiology of IL-1 Family Members. *Front Immunol*, *4*, 167. doi:10.3389/fimmu.2013.00167

van Kruijsdijk, R. C., van der Wall, E., & Visseren, F. L. (2009). Obesity and cancer: the role of dysfunctional adipose tissue. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, *18*(10), 2569-2578. doi:10.1158/1055-9965.EPI-09-0372

Vassin, H., & Campos-Ortega, J. A. (1987). Genetic Analysis of Delta, a Neurogenic Gene of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, *116*(3), 433-445. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17246393>

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Wang, B., Wood, I. S., & Trayhurn, P. (2008). Hypoxia induces leptin gene expression and secretion in human preadipocytes: differential effects of hypoxia on adipokine expression by preadipocytes. *J Endocrinol*, *198*(1), 127-134. doi:10.1677/JOE-08-0156

Wei, E. K., Giovannucci, E., Fuchs, C. S., Willett, W. C., & Mantzoros, C. S. (2005). Low plasma adiponectin levels and risk of colorectal cancer in men: a prospective study. *J Natl Cancer Inst*, *97*(22), 1688-1694. doi:10.1093/jnci/dji376

Weinmaster, G., & Fischer, J. A. (2011). Notch ligand ubiquitylation: what is it good for? *Dev Cell*, *21*(1), 134-144. doi:10.1016/j.devcel.2011.06.006

Weng, A. P., Ferrando, A. A., Lee, W., Morris, J. P. t., Silverman, L. B., Sanchez-Irizarry, C., . . . Aster, J. C. (2004). Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science*, *306*(5694), 269-271. doi:10.1126/science.1102160

Wharton, K. A., Johansen, K. M., Xu, T., & Artavanis-Tsakonas, S. (1985). Nucleotide sequence from the neurogenic locus notch implies a gene product that shares homology with proteins containing EGF-like repeats. *Cell*, *43*(3 Pt 2), 567-581. doi:10.1016/0092-8674(85)90229-6

Wu, W. K., Wang, X. J., Cheng, A. S., Luo, M. X., Ng, S. S., To, K. F., Yu, J. (2013). Dysregulation and crosstalk of cellular signaling pathways in colon carcinogenesis. *Crit Rev Oncol Hematol*, *86*(3), 251-277. doi:10.1016/j.critrevonc.2012.11.009

Xu, A. W., Ste-Marie, L., Kaelin, C. B., & Barsh, G. S. (2007). Inactivation of signal transducer and activator of transcription 3 in proopiomelanocortin (Pomc) neurons causes decreased pomc expression, mild obesity, and defects in compensatory refeeding. *Endocrinology*, *148*(1), 72-80. doi:10.1210/en.2006-1119

Yamamoto, S., Charng, W. L., & Bellen, H. J. (2010). Endocytosis and intracellular trafficking of Notch and its ligands. *Curr Top Dev Biol*, *92*, 165-200. doi:10.1016/S0070-2153(10)92005-X

ÖZGEÇMİŞ

Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı : Rumeysa ÖZYURT

Doğum tarihi ve yeri : 01.09.1990 / Domaniç

Uyruğu : T.C.

Medeni durumu : Bekar

İletişim adresleri :

Tel: 0530 954 0596

Email: rumeysa.ozyurt@gmail.com

Adres: ESOGÜ Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Odunpazarı/ESKİŞEHİR

Eğitim Durumu

Pamukkale Üniversitesi/ Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü 2007-2011

Yabancı Dil: İngilizce (YDS :81.25)

Mesleki Deneyim :

Araştırma Görevlisi:

ESOGÜ Tıp Fak Fizyoloji A.D. 2013 – 2019

Yayınlar :

Uluslar arası hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

1.Erythropoietin Protects the Kidney by Regulating the Effect of TNF-alpha in L-NAME-Induced Hypertensive Rats. Ozkurt, M., Uzuner, K., Erkasap, N., Kus, G., **Ozyurt, R.**, Uysal, O., Akyazi, I., Kutlay, O. KIDNEY & BLOOD PRESSURE RESEARCH. 43; 3; 807-819. doi: 10.1159/000490134. 2018.

2.The effect of leptin and resveratrol on JAK/STAT pathways and Sirt-1 gene expression in the renal tissue of ischemia//reperfusion induced rats. Erkasap, S., Erkasap, N., Bradford, B., Mamedova, L., Uysal, O., Ozkurt, M., **Ozkurt,**

R., Kutlay, O., Bayram, B. BRATISLAVA MEDICAL JOURNAL-BRATISLAVSKE LEKARSKE LISTY. 118; 8; 443-448. doi: 10.4149/BLL_2017_086. 2017.

3.Effects of ceranib-2 on cell survival and TNF-alpha in colon cancer cell line. Baspinar, M., **Ozyurt, R.**, Kus, G., Kutlay, O., Ozkurt, M., Erkasap, N., Kabadere, S., Yasar, NF., Erkasap, S. BRATISLAVA MEDICAL JOURNAL-BRATISLAVSKE LEKARSKE LISTY. 118; 7; 391-393. Doi: 10.4149/BLL_2017_076. 2017.

4.The role of JAK/STAT signaling pathway and TNF- α crosstalk in human colorectal cancer. Erkasap, N., **Özyurt, R.**, Özkurt, M., Yaşar, F., Erkasap, S., Ihtiyar, E. GENE REPORTS, 3;1-4, Haziran 2016.

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler.

1. The Effect of Notch, IL-1 and Leptin (NILCO) Inhibition in Xenograft Colorectal Cancer. **Rumeysa Ozyurt**, Nilufer Erkasap, Mete Ozkurt, Serdar Erkasap, Engin Ulukaya, Kostantinos Dimas. Experimental Biology 2019 meeting. Orlando/USA. FASEB Journal. 33, Issue 1_supplement. 2019.

2. Is Notch -4 Associated with VEGF-A and IL-6 in the CRC Tumorigenesis? N. Erkasap, **R. ÖZYURT**, M. OZKURT, S. ERKASAP, N. YASAR, E. IHTIYAR, F. CANAZ, E. YILMAZ and E. ÇOLAK. Europhysiology 2018 Meeting London. Abstract book; 149P.14-16 September 2018.

3. Targeting Inhibition of Ceramidase Induces Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma in vitro. N. Erkasap, **R. ÖZYURT**, M. OZKURT, A. KARADAĞ and C. MERAL EVIS. Europhysiology 2018 Meeting London. Abstract book; 150P.14-16 September 2018.

4. Quercetin Prevents the Supression of Epo by TNF-alpha. M. OZKURT, **R. ÖZYURT**, A. KARADAĞ and N. ERKASAP. Europhysiology 2018 Meeting London. Abstract book; 418P.14-16 September 2018.

5. Analysis of Micro-RNAs Participating the Inhibition of Erythropoietin Synthesis by TNF-alpha via Microarray Technology. M. OZKURT, **R. ÖZYURT**, A. KARADAĞ, T. HELLWIG-BÜRCEL, S. KABADERE and N.

ERKASAP. Europhysiology 2018 Meeting London. Abstract book; 419P.14-16
September 2018.

6. The role of JAK/STAT signaling pathway and TNF-alpha crosstalk in human colorectal cancer. Erkasap, N., **Ozyurt, R.**, Ozkurt, M., Yasar, F., Erkasap, S.M., Ihtiyar, E. ACTA PHYSIOLOGICA, Volume: 216 Supplement: 707 Special Issue: SI Meeting Abstract: P08-11, Published: MAR 2016.

7. The effect of leptin and resveratrol on Jak/Stat pathways and Sirt-1 gene expression in the renal tissue of ischemia/reperfusion induced rats. Erkasap, S.M., Erkasap, N., Bradford, B., Mamedova, L.K., Uysal, O., Ozkurt, M., **Ozyurt, R.**, Kutlay, O., Bayram, B. ACTA PHYSIOLOGICA, Volume: 216 Supplement: 707 Special Issue: SI Meeting Abstract: P17-03, Published: MAR 2016.

8. Effects of seranib-2 on cell survival and tnf-alpha in colon cancer cell line. Baspinar, M., **Ozyurt, R.**, Kus, G., Kutlay, O., Ozkurt, M., Erkasap, N., Erkasap, S., Kabadere, S. ACTA PHYSIOLOGICA, Volume: 215 Pages: 127-127 Supplement: 705 Special Issue: SI Meeting Abstract: P8-18, Published: NOV 2015.

9. Investigation of Erythropoietin, Tnf-alpha and Kidney Tissue Injury Connections in L-NAME Induced Hypertensive Rats. Ozkurt, M., Uzuner, K., Erkasap, N., Jelkmann, W., **Ozyurt, R.**, Kus, G., Uysal, O., Kutlay, O. AMERICAN JOURNAL OF HEMATOLOGY, Volume: 90 Issue: 8 Pages: E158-E158, Published: AUG 2015.

10. Effects of Darbepoetin-alpha treatment and TNF-alpha blockage on cardiovascular parameters, blood cCells, and body and kidney weights in L-NAME induced hypertensive rats. Ozkurt, M., Uzuner, K., Erkasap, N., Kus, G., **Ozyurt, R.**, Kutlay, O. ACTA PHYSIOLOGICA, Volume: 211 Pages: 50-50 Supplement: 697 Special Issue: SI Meeting Abstract: S4-E3, Published: AUG 2014.

11. **R. Özyurt**, N. Erkasap, M. Özkurt, S. Erkasap, E. Ulukaya, K. Dimas, The effect of NOTCH, IL-1 and LEPTIN (NILCO) inhibition in xenograft colorectal cancer P-19. 30 September – 2 October 2019, Ulm, Germany. Acta Physiologica, 2019.

12. N . Er k a s a p, M. Ozkurt, **R. Ozyurt**, S. Erkasap, F. Yasar, E. İhtiyar, E. Çiftçi, F. Canaz, E. Colak, Is NOTCH, INTERLEUKIN-1 and LEPTIN INTERACTION (NILCO) important in development of colorectal cancer? P-24,25. 30 September – 2 October 2019, Ulm, Germany. Acta Physiologica, 2019.

13. S. K a b a d e r e, A. C. Sahin, **R. Ozyurt**, G. Kus, B. Koca, N. Erkasap. Relationships of NO with NOSIP, Gelatinases and TIMP-2 in Human Colorectal Cancer.P-23. 30 September – 2 October 2019, Ulm, Germany. Acta Physiologica, 2019.

14. M . O z k u r t, T. Hellwig-Bürgel, R. Depping, S. Kabadere, **R. Ozyurt**, A. Karadag, N. Erkasap1miR663 Prevents Epo inhibition caused by TNF-alpha in Normoxia and Hypoxia. 30 September – 2 October 2019, Ulm, Germany. Acta Physiologica, 2019.

Bilimsel Etkinlikler

Kurslar ve Eğitim Programları :

Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası