

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**APC MUTANT FARE MODELİNDE AZALTIKMIŞ BDNF EKSPRESYONUNUN
İNTESTİNAL TÜMÖR GELİŞİMİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Uzm. Vet. Hek. Ayşenur GÖK

Kök Hücre Programı

DOKTORA TEZİ

ANKARA

2023

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**APC MUTANT FARE MODELİNDE AZALTIKMIŞ BDNF EKSPRESYONUNUN
İNTESTİNAL TÜMÖR GELİŞİMİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Uzm. Vet. Hek. Ayşenur GÖK

Kök Hücre Programı

DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Aytekin Akyol

ANKARA

2023

ONAY SAYFASI**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ****APC MUTANT FARE MODELİNDE AZALTILMIŞ BDNF EKSPRESYONUNUN İNTESTİNAL
TÜMÖR GELİŞİMİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI****Ayşenur Gök****Danışman: Prof. Dr. Aytekin Akyol**

Bu tez çalışması 21.06.2023 tarihinde jürimiz tarafından “Kök Hücre Doktora Programı”nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	<i>Unvanı, Adı, Soyadı</i>	<i>(imza)</i>
	<i>(Kurumu)</i>	
Üye:	<i>Unvan, Adı, Soyadı</i>	<i>(imza)</i>
	<i>(Kurumu)</i>	
Üye:	<i>Unvanı, Adı, Soyadı</i>	<i>(imza)</i>
	<i>(Kurumu)</i>	
Üye:	<i>Unvanı, Adı, Soyadı</i>	<i>(imza)</i>
	<i>(Kurumu)</i>	

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Müge YEMİŞÇİ ÖZKAN

Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan **“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”** kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ... ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

24/07/2023

(İmza)

Ayşenur GÖK

i

Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

- (1) *Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.*
- (2) *Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internette paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.*
- (3) *Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.*
Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

*** Tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.**

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında zgn olduğunu, Tez Danışmanının nvanı, Adı SOYADI danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

(İmza)

Uzm. Vet. Hek. Ayşenur GÖK

TEŞEKKÜR

Bilim yolculuğumdaki en önemli süreçlerden biri olan doktora eğitimim boyunca desteğini esirgemeyen, çalışmalarımnda yol gösteren ve yolu öğreten, iyi bir araştırmacı bilim insanı olarak yetişmemde çok değerli emekleri olan saygıdeğer hocam Prof. Dr. Aytekin Akyol'a sonsuz teşekkür ediyorum.

Tez çalışmam süresince değerli bilgi ve tecrübelerini paylaşan sayın tez izleme komitesi hocalarım Prof. Dr. Erkan Yılmaz ve Doç. Dr. İlyas Onbaşlar'a teşekkür ediyorum.

Kök Hücre Bilimleri Anabilim Dalı'nda verdikleri eğitimle kıymetli bilgiler aktaran başta Prof. Dr. Ayşen Günel-Özcan olmak üzere tüm değerli hocalarıma çok teşekkür ediyorum.

Tez çalışmamın kilit noktası olan Bdnf +/- farelerin temininde çok değerli yardımları olan sayın hocam Prof. Dr. İsmail Abidin'e çok teşekkür ediyorum.

Değerli ekip arkadaşlarım Uzm. Biyo. Aynur Işık, Behar Bunjaku, Barış Çerçi, Dr. Sarp Uzun, Uzm. Biyo. Özge Özcan ve Uzm. Biyo. Sinem Bakır'a çok teşekkür ederim.

Kök Hücre Bilimleri Merkezi'nde tanışmış olduğum ve çok güzel anılar biriktirdiğim, bu yolculukta birbirimize destek olduğumuz, buraya isimleri sığamayacak tüm arkadaşlarıma teşekkür ediyorum.

Her zaman, her durumda yanımda olan ve büyük bir özveri ve gönülle beni destekleyen canım annem Hüsne Gök, canım babam Hüseyin Avni Gök ve canım kardeşim Cüneyt Gök'e sonsuz teşekkür ediyorum. İyiki varsınız canım ailem...

Doktora eğitimimi 100/2000 Doktora Bursu programı ile desteklemiş olan Yüksek Öğretim Kurulu (YÖK)'na ve bu tez çalışmasını, 120S967 proje numarası ile, 1001-Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı tarafından fonlayarak destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)'na teşekkür ediyorum.

ÖZET

Gök, A., *Apc* Mutant Fare Modelinde Azaltılmış Bdnf Ekspresyonunun İntestinal Tümör Gelişimi Üzerine Etkilerinin Araştırılması, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kök Hücre Programı Doktora Tezi, Ankara, 2023. Wnt sinyalini negatif yönde düzenleyen adenomatöz polipozis koli (*Apc*) tümör baskılayıcı genindeki mutasyon, kolon kanserlerinde en çok rastlanan mutasyondur. Wnt sinyal yolağının düzenlediği genlerden biri olan beyin türevli nörotrofik faktör (*Bdnf*), kolorektal kanserler gibi birçok tümör dokusunda yüksek seviyede ifade olur. Bu tez çalışmasında; *Apc* mutant farelerde *Bdnf* ekspresyonundaki azalmanın intestinal tümör gelişimine etkilerini araştırmak amaçlanmıştır. Bu kapsamda; 36 hafta boyunca *Apc*^{+/-}, *Bdnf*^{+/-}, *Apc*^{+/-}*Bdnf*^{+/-} ve yabanıl tip fare deney ve kontrol gruplarını takip ettik ve *Bdnf* mutasyonunun *Apc* mutant fareler üzerindeki etkilerini fenotipik ve moleküler düzeyde araştırdık. Deneyler sonucunda; *Apc*^{+/-} ve yabanıl tip farelere kıyasla, *Bdnf*^{+/-} dişi ve erkek fare gruplarında; grubun yarısı normal vücut ağırlığına sahipken diğer yarısında belirgin bir kilo artışı olduğu gözlemlendi. Benzer kilo alımı eğilimi *Apc*^{+/-} *Bdnf*^{+/-} farelerde de gerçekleşti. *Apc*^{+/-} *Bdnf*^{+/-} farelerde, *Apc*^{+/-} farelere kıyasla, ilk 6 ay boyunca anemi, zayıflama, kürkte bozulma, postürde bozulma gibi hastalık fenotipleri görülmedi. *Apc*^{+/-} *Bdnf*^{+/-} farelerin sağkalım süreleri, *Apc*^{+/-} farelere göre yaklaşık 2 ay kadar arttı. *Apc*^{+/-} farelerde *Bdnf* ifadesinin azaltılması; ince bağırsaktaki polip sayısını az miktarda azaltırken, kolondaki polip sayısını belirgin olarak artırdı. *Apc*^{+/-} *Bdnf*^{+/-} farelerin tümörlerinde; *Bdnf*, *Trk B*, beta katenin ve *Lgr5* gen ifadeleri ile matür ve immatür *Bdnf* ve beta katenin protein düzeyi, *Apc*^{+/-} farelere göre azaldı, böylelikle kök hücre dinamiklerinin de değişebileceği düşünüldü. Bu çalışma sonucunda; *Apc* mutasyonu ile başlayan intestinal tümörlerde tedavi için BDNF'in önemli bir aday molekül olabileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: *Bdnf*, *Apc*, intestinal tümörigenez, intestinal kök hücre, Wnt/Beta katenin sinyal yolağı.

Bu çalışma, TÜBİTAK-1001 projesi (Proje No: 120S967) kapsamında desteklenmiştir.

ABSTRACT

Gök, A., Effects of Reduced Bdnf Expression on Intestinal Tumor Development in Apc Mutant Mouse Model, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences Department of Stem Cell Sciences Doctor of Philosophy Thesis, Ankara, 2023. A mutation in adenomatous polyposis coli (Apc) tumor suppressor gene, which negatively regulates Wnt signaling, is the most common mutation in colon cancers. Brain-derived neurotrophic factor (Bdnf), one of the genes regulated by the Wnt signaling pathway, is expressed at high levels in many tumor tissues such as colorectal cancers. In this thesis study; It was aimed to investigate the effects of decreased Bdnf expression on intestinal tumor development in Apc mutant mice. In this context; we followed up Apc+/-, Bdnf+/-, Apc+/-Bdnf+/- and wild-type mouse experimental and control groups for 36 weeks and investigated the effects of Bdnf mutation on Apc mutant mice phenotypically and molecularly. When the experiments are finished; compared to Apc+/- and wild-type mice, while half of the group had normal body weight, a significant weight gain was observed in the other half in Bdnf+/- female and male mice. A similar trend of weight gain occurred in Apc+/- Bdnf+/- mice. Apc+/- Bdnf+/- mice did not show any disease phenotypes such as anemia, weight loss, discolored fur, or altered posture during the first 6 months compared to Apc+/- mice. Survival times of Apc+/- Bdnf+/- mice increased by approximately 2 months compared to Apc+/- mice. While it slightly decreased the number of polyps in the small intestine of Apc+/- Bdnf+/- mice, it significantly increased the number of polyps in the colon of Apc+/- Bdnf+/- mice. Bdnf, Trk B, beta catenin and Lgr5 gene expressions and mature and immature Bdnf and beta catenin protein levels were decreased in tumors of Apc+/- Bdnf+/- mice compared to Apc+/- mice, so it was thought that stem cell dynamics might also change. As a result of this study; we think that BDNF may be an important candidate molecule for the treatment of intestinal tumors starting with Apc mutation.

Keywords: Bdnf, Apc, intestinal tumorigenesis, intestinal stem cell, Wnt/Beta catenin signaling pathway.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xiv
TABLolar	xviii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Kolorektal Kanser (KRK) Gelişimi	4
2.1.1. İnsan ve Fare Gastrointestinal Sistem Karşılaştırması	7
2.1.2. İnsan ve Fare Kolon Kanseri Arasındaki Benzerlikler ve Farklar	9
2.2. Wnt Sinyal Yolağı	9
2.3. Adenomatöz Polipozis Coli (APC) Geni ve Proteini	11
2.3.1. <i>Apc</i> Mutant Fareler	12
2.4. İntestinal Kök Hücreler (İKH)	14
2.4.1. İnce Bağırsak ve Kolon Epitelinin Özellikleri	14
2.4.2. İntestinal Kök Hücrelerin Özellikleri	15
2.4.3. İntestinal Kök Hücre Nişi	16
2.5. Tümör Oluşumu Başlangıcında Kök Hücreler	17
2.5.1. Kanser Kök Hücreleri (KKH)	17
2.6. Nörotrofik Reseptör Tirozin Kinaz (Ntrk)'ın Yapısı, İşlevi ve Reseptörleri	19
2.7. Beyin Türevli Nörotrofik Faktör (BDNF)	20
2.7.1. BDNF'ün Fonksiyonları	22
2.7.2. BDNF Proteininin Yapısı	22
2.8. <i>Bdnf</i> /Trk B Sinyal Yolağının Kanser ile İlişkisi	24
2.8.1. <i>Bdnf</i> /Trk B Sinyal Yolağının Wnt Sinyal Yolağı ile İlişkisi	24
2.8.2. <i>Bdnf</i> /Trk B Sinyal Yolağının Tümör Oluşumu ile İlişkisi	25

2.8.3. Bdnf/Trk B Sinyal Yolağının Kök Hücreler ile İlişkisi	26
2.9. Tez Çalışmasının Amacı	27
3. GEREÇ ve YÖNTEM	28
3.1. Gereçler	28
3.1.1. Apc Mutant Fareler	28
3.1.2. Bdnf Mutant Fareler	29
3.1.3. Bdnf Mutant Farelerin Temini	29
3.1.4. Yabanıl Tip Fareler	29
3.2. Yöntemler	29
Fare Kuyruk Dokusundan Genomik DNA İzolasyonu ve Genotipleme	29
3.2.1. DNA İzolasyonu	29
3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Yöntemi ile Genotipleme	31
3.2.3. Agaroz Jelin Hazırlanması	33
Kontrol ve Deney Gruplarının Oluşturulması	34
3.2.4. Apc Mutant Fare Kolonisinin Genişletilmesi	34
3.2.5. Bdnf Mutant Fare Kolonisinin Genişletilmesi	34
3.2.6. Apc +/- Bdnf +/- Fare Kolonisinin Oluşturulması	34
3.2.7. Kontrol ve Deney Gruplarının Oluşturulması	35
3.2.8. Transgenik Fare Üretimi ve İdamesi için Standardize Yem Hazırlanması	35
Farelerin Kurban Edilmesi, Taze Doku Örneklerinin Toplanması ve Polip Sayımı	39
3.2.9. Diseksiyonlar ve Taze Doku Örneklerinin Toplanması	39
3.2.10. İntestinal ve Kolonik Poliplerin Sayımı ve Dokuların Makroskopik İncelenmesi	40
3.2.11. İmmünohistokimyasal Analiz	41
3.2.12. BrdU İşaretleme	42
3.2.13. İntestinal Tümörlerden ve Neoplastik Olmayan Mukozadan Protein İzolasyonu ve Western Blot Yöntemi ile İncelenmesi	42
3.2.14. İntestinal Tümörlerden ve Neoplastik Olmayan Mukozadan RNA İzolasyonu ve Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu	43
A) RNA İzolasyonu	43
B) cDNA Sentezi	44
C) Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu	45
3.2.15. İstatistiksel Analiz	46

4. BULGULAR	47
4.1. Bdnf +/- Farelerin Genotiplenmesi ve Koloninin Genişletilmesi	47
4.2. Dişi Apc +/- Farelerin Elde Edilmesi için Koloninin Çoğaltılması	47
4.3. Kontrol ve Deney Gruplarının Oluşturulması ve Takibi	49
4.4. Apc +/- ve Yabanıl Tip Farelere Kıyasla, Takip Sürecinde Apc/Bdnf ve Bdnf +/- Farelerin Vücut Ağırlığı Dağılımındaki Farklılıklar	51
4.5. Apc/Bdnf Çift Mutant Farelerde Hastalık Fenotipindeki Değişimler	53
4.6. Apc/Bdnf Çift Mutant Farelerin Sağkalım Sürelerindeki Değişim	55
4.7. Apc +/- Farelerde Azaltılmış Bdnf Ekspresyonunun Bağırsak ve Kolonik Polip Fenotipine Etkisi	56
4.8. İntestinal Mukoza ve Tümörlerin İmmünohistokimyasal Olarak İncelenmesi	58
4.9. Apc +/- Bdnf +/- Fareler ve Apc +/- Farelerin İntestinal Tümörleri Arasındaki Proliferasyon Farkı	59
4.10. Western Blot Analizi ile Apc +/- Bdnf +/- Fareler ve Apc +/- Farelerin İntestinal Tümörlerindeki Bdnf ve β -Katenin İfadelerinin İncelenmesi	60
4.11. Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR Analizi ile İntestinal Mukoza ve Tümör Dokusunda Bdnf, Trk B, Beta Katenin ve Lgr5 Gen Ekspresyonlarının İncelenmesi	62
4.12. Ekstragastrointestinal Sistem İncelemesi ve Diğer Bulgular	66
5. TARTIŞMA	71
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	81
7. KAYNAKLAR	83
8. EKLER	
EK-1: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzinleri	
EK-2: Tez Çalışması Orjinallik Raporu, Turnitin Ekran Görüntüsü	
EK-3: Dijital Makbuz	
EK-4: Araştırma Gruplarında Farklı Genler için Ortalama Ct ve Standart Sapma Değerleri (İBM: İnce bağırsak mukozası, İBT: İnce Bağırsak Tümörü). n= 1, teknik tekrar= 3.	
9. ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR

μl	Mikrolitre
ACF	Anormal Kript Odakları
APC	Adenomatöz polipozis koli
BIO	6-bromoindirubin-3'-oksim
BMP	Kemik Morfogenetik Protein
CK1α/ε	Kazein kinaz 1α/ε
CTNNB1	β-katenin
DNA	Deoksiribonükleik asit
EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
EMT	Epitelyal-mezenkimal geçiş
EtOH	Etil alkol
FFPE	Formalinle sabitlenmiş parafine gömülü
Frz	<i>Frizzled</i>
GİS	Gastrointestinal Sistem
GSK-3β	Glikojen sentaz kinaz 3β
H&E	Hematoksilen-Eozin
Hh-Gli	Hedgehog-Gli
İKH	İntestinal Kök Hücre
KKH	Kanser Kök Hücresi
KRK	Kolorektal Kanser
Lgr 4/5	Lösin Açısından Zengin Tekrar İçeren G-Protein Bağlı Reseptör 4/5
LoTE	Low Tris-HCl, EDTA
LRP	Lipoprotein Reseptörle İlişkili Protein
MAPK	Mitojenle Etkinleşen Protein Kinaz
MCR	Mutasyon Küme Bölgesi
MPE	Moleküler Patofizyoloji Epidemiyolojisi
MSI	Mikrosatellit İnstabilitesi
MSS	Merkezi sinir sistemi
NF-κB	Nükleer Faktör – kappa B

NKH	Nöral kök hücre
NMDA/GABA	Nmetil-D-aspartat/gama-aminobütirik asit
NPH	Nöral Progenitör Hücre
NT	Nörotrofin
Ntrk	Nörotrofik Reseptör Tirozin Kinaz
Ort.	Ortalama
pro-BDNF	Bdnf'in prokürsör formu
RNF43	Yüzük Parmağı 43
RSPO	R-spondin
SKI-1	Subtilisin/kexin-izozim-1
TCF	T hücre faktörü
TCF/LEF	T-hücre faktörü/Lenfoid güçlendirici bağlama faktörü
TNES	Tris-HCl, NaCl, EDTA, SDS
Trk	Tropomiyozin reseptör kinaz
WAGR	Wilms tümörü, aniridia, genitoüriner anomaliler ve zeka geriliği
ZNRF3	Çinko ve Yüzük Parmağı 3

ŞEKİLLER

Şekil		Sayfa
2.1.	Kolon kanseri oluşumu ve etkileyen faktörler.	6
2.2.	Wnt/ β -catenin Sinyal Yolağı.	11
2.3.	Fare Apc Protein Yapısı ve Mutasyonları. Mutasyon isimleri, belirli kanser modelini tanımlayan çalışmalarda yer alan terimleri göstermektedir. Apc Δ SAM alelinde silinen bölgenin altı çizilmiştir. Δ , silinen yerleri göstermektedir. AA, amino asit. SAM, serin–alanin–metionin.	13
2.4.	Laboratuvarımızda oluşturulan Apc $^{+/-}$ mutant farenin 16. ekzonunda meydana gelen 8 nükleotid delesyonu ve duodenumunda oluşmuş polip örneği.	14
2.5.	İnce bağırsak ve kolon epitelinin yapısı.	15
2.6	Nörotrofinler ve reseptörleri.	19
2.7.	Bdnf/Trk B Sinyal Yolağı.	21
2.8.	Bdnf'ün protein alt birimleri.	23
3.1.	Deney gruplarından terminal döneme giren Apc $^{+/-}$ dişi fare (Yaş: 157 gün).	28
3.2.	Farelerin numaralı küpeler ile kodlanması.	30
3.3.	Bdnf $^{+/-}$ Erkek Farelerin wt C57BL/6 Dişi Fareler ile Çiftleştirilmesi.	34
3.4.	Bdnf $^{+/-}$ Erkek Fareler ile Apc $^{+/-}$ C57BL/6 Dişi Farelerin Çiftleştirme Grupları.	35
3.5.	Transgenik fare diyetlerinin hazırlanması. Diyet hazırlama aşamaları: 1. Diyetlerin dengeli aminoasit profili ve yeterli protein değerini sağlayacak şekilde formüle edilmesi. 2. Sistemik ve yeterli homojenizasyon. 3. Peletleme. 4. Kurutma ve Paketleme.	36
3.6.	Diyetlerin nem ve ham kül analizleri için işlemler.	37
3.7.	Transgenik fare diyetleri besin madde bileşimleri.	38
3.8.	Makroskopik inceleme için örnek kayıt formu.	39
3.9.	Diseksiyon ve taze doku toplama alanı.	40
3.10.	FFPE blokların hazırlanması öncesi oluşturulan kaset örnekleri.	41

- 4.1.** Bdnf +/- Damızlık Erkek Farelerin (#814, 815, 816, 817, 818) Genotiplendirilmesi: PCR ürünlerinin Agaroz Jeldeki Görüntüsü. 48
- 4.2.** Apc+/- kolonisinin genişletilmesi sonucunda; 828, 830, 831, 833, 837, 839, 850, 851, 857, 858, 871, 873 küpe numaralı toplam 12 adet Apc +/-dişi fare ve 879 küpe numaralı Apc +/-erkek fare elde edildi. 48
- 4.3.** Kontrol ve deney gruplarının oluşturulması için Apc+/-ve Bdnf +/-PZR ürünü agaroz jel görüntüleri. (a, b) Apc+/- farelerinin genotiplenmesi. (c, d) Bdnf+/-farelerinin genotiplenmesi. Çerçeve içerisindeki genotipleme sonuçları, aynı farede hem Apc hem de Bdnf mutasyonları olduğunu gösterir (Apc+/-Bdnf+/-fareler). 50
- 4.4.** Aynı yaştaki (165 gün) Bdnf/-ve wt erkek fareler, soy içerisinde çoğaltılmıştır. Bdnf /-erkek farenin vücut ağırlığı: 54,82 g; wt erkek farenin vücut ağırlığı: 25-30 g. 50
- 4.5.** Grupta agresif davranış gösteren Bdnf+/-erkek fareler, yaş: 30-60 gün. Agresif davranışın ardından fareler ayrı kafeslere alındı. 51
- 4.6.** Deney gruplarının 36 haftalık vücut ağırlığı takibi. Sonuçlar ortalama \pm standart hata olarak gösterilmiştir. 52
- 4.7.** Araştırma gruplarında; 20 haftalık yaştaki dişi (A) ve erkek (B) farelerin vücut ağırlığı dağılımı, 30 haftalık yaştaki dişi (C) ve erkek (D) farelerin vücut ağırlığı dağılımı. 53
- 4.8.** (A) 217 günlük yaştaki Bdnf+/- erkek fareler; 1: 52,27 g, 2: 27,07 g. (B) 252 günlük yaştaki Bdnf+/- dişi fareler; 1: 50,42 g, 2: 24,48 g. (C) 252 günlük yaştaki Bdnf+/- erkek fareler; 1: 48,13 g, 2: 33,85 g. 54
- 4.9.** 36 haftalık takip boyunca deney gruplarının sağkalımını gösteren Kaplan-Meier eğrileri. Dişi (A), erkek (B) ve tüm (C) farelerden oluşan deney grupları için sağkalım eğrileri. *P <0.05, Kaplan Meier analizi, log-rank testi. 55
- 4.10.** Kontrol ve deney gruplarının diseksiyon sonrası gastrointestinal sistemi görüntüleri. (A) Yabanıl tip fare. (B) Bdnf+/- fare. (C) Apc+/- dişi fare. (D) Apc+/-Bdnf+/- dişi fare. (E) Apc+/- erkek fare. (F) Apc+/-Bdnf+/- erkek fare. Çerçeve içerisindeki bölge, Apc+/-Bdnf+/- mutant farelerin distal kolonundaki yoğun polip yükünü göstermektedir. 57

- 4.11.** Apc+/- ve Apc+/- Bdnf+/- farelerde polip yükü dağılımları. Pembe renk: dişi fareler, Mavi renk: erkek fareler. n= 6-10, gruplardaki fare sayıları. Mann Whitney-U testine göre Apc+/- ve Apc+/- Bdnf+/- farelerindeki kolon polip sayıları karşılaştırıldığında aradaki fark anlamlı bulunmuştur, P <0,05. 57
- 4.12.** Sırasıyla Apc+/- ve Apc+/- Bdnf+/- farelerin ince bağırsak (A ve B) ve kolon adenom (C ve D) doku kesitlerinin hematoksil-eozin (H&E) boyamaları. Ölçek çubuğu: 100 µm. 58
- 4.13.** Yabanıl tip (wt) fare beyni H&E boyaması (A) ve Bdnf immünohistokimyası (B). Sırasıyla wt ve Bdnf mutant farelerin distal kolon Bdnf immünohistokimyası (C, D). Apc mutant (E-F) ve Apc/Bdnf çift mutant (G-H) farelerin ince bağırsak adenomunda Bdnf (E, G) ve β-katenin (F, H) antikoru boyamaları. 59
- 4.14.** Apc mutant (A-B) ve Apc/Bdnf çift mutant (C-D) farelerin ince bağırsak mukozası (A, C) ve adenomunun (B, D) BrdU işaretlemesi. Ölçek çubukları: 50 µm (A, C) ve 100 µm (B, D). 60
- 4.15.** (A) Western blot analizinde, Apc+/+ Bdnf+/+ (yabanıl tip, wt), Apc+/- Bdnf+/+ (Apc mutant), Apc+/- Bdnf+/- (Apc/Bdnf çift mutant) ve Apc+/+ Bdnf+/- (Bdnf mutant) farelerin beyin ve kolon mukozasında BDNF ve β-katenin protein seviyeleri. (B) Apc mutant ve Apc/Bdnf çift mutant farelerde ince bağırsak mukozası ve polibinde Bdnf ve β-katenin protein seviyeleri. 61
- 4.16.** Kantitatif gerçek zamanlı PZR analiz sonuçları. 64
- 4.17.** Kantitatif PZR ürünlerinin agaroz jeldeki (%1) görüntüleri. 64
- 4.18.** Amplifikasyon eğrileri. 65
- 4.19.** Kantitatif gerçek zamanlı PZR analizinde tüm genlerin aynı dokuda birlikte gösterimi. 65
- 4.20.** Araştırma gruplarındaki dişi (A) ve erkek (B) farelerin fiksasyon sonrası solid beyin tartımları. 66
- 4.21.** Araştırma gruplarında beyin diseksiyonu örnekleri. Çerçeve içindeki bölge, serebral hemisferler arasında gözlenen asimetriyi gösterir. 67
- 4.22.** (A) Solid beyin tartımı yapılan dişi ve erkek farelerin beyin ağırlıklarının vücut ağırlıklarına oranlarının ortalamaları (g). (B) Aynı farelerin yaş ortalamaları (gün). 68

- 4.23.** Sırasıyla Apc mutant (a-d) ve Apc/Bdnf çift mutant (e-h) farelerinden alınan akciğer, kalp, böbrek ve karaciğer doku kesitlerinin H&E boyaması. Ölçek çubuğu: 100 µm. 69
- 4.24.** Sırasıyla wt, Bdnf, Apc ve Apc/Bdnf mutant farelerin dalak dokusu kesitlerinin H&E boyamaları (a-d). Ölçek çubuğu: 100 µm. 70
- 4.25.** Gruplarda dalaktaki her iki yüksek güçlü alan başına megakaryosit sayısı dağılımları. *Mann Whitney-U* testine göre Apc+/- ve Apc+/- Bdnf+/- farelerdeki megakaryosit sayıları karşılaştırıldığında aradaki fark anlamlı bulunmuştur, P <0,01. Pembe renk: dişi fareler, Mavi renk: erkek fareler. 70

TABLolar

Tablo		Sayfa
2.1.	Fare ve insan gastrointestinal sistem anatomisi ve histolojisindeki benzerlikler ve farklılıklar.	8
3.1.	Deney gruplarındaki farelerin genotiplendirilmesi için kullanılan primerler.	32
3.2.	Apc Mutant Fare Genotiplendirilmesinde Kullanılan PZR Bileşenleri ve PZR Koşulları.	32
3.3.	Bdnf Mutant Fare Genotiplendirilmesinde Kullanılan PZR Bileşenleri ve PZR Koşulları.	33
3.4.	Diyetlerin nem ve ham kül analizleri.	37
3.5.	cDNA sentezi reaksiyon bileşenleri ve termal döngü cihazı program koşulları.	44
3.6.	Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu bileşenleri ve termal döngü cihazı program koşulları.	45
4.1.	Kontrol ve Deney Grupları.	49
4.2.	Apc+/- ve Apc+/- Bdnf+/-farelerin ince bağırsak ve kolon polip sayısı ortalamaları.	56

1. GİRİŞ

Kolorektal kanserlerin gelişiminde ve ilerlemesinde; Wnt, Notch, kemik morfogenetik protein (BMP)/ Dönüştürücü büyüme faktörü beta (TGF- β), Hedgehog-Gli (HH-GLI), epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR)/mitojenle etkinleşen protein kinaz (MAPK), nükleer faktör – kappa B (NF- κ B) ve Akt/mTOR gibi sinyal yolları önemli rollere sahiptir ve kanser kök hücresi yenilenmesinde görevlidir. Bu yolların anormal aktivasyonu, tümör gelişimine yol açar. Kolorektal kanser oluşumunda; tümör baskılayıcı genler, onkogenler, DNA onarım genleri, CD44 molekülünü kodlayan genler ve COX-2 (cytochrome C oxidase, subunit 2) proteini farklı yönlerden görev alır ve bu genlerde gerçekleşen mutasyon tümör gelişimine sebep olur. Bu genler arasında, Wnt sinyalini negatif yönde düzenleyen adenomatöz polipozis koli (APC) tümör baskılayıcı geni, kolon kanserlerinde en çok rastlanan mutasyon olarak gösterilmiştir.

Kolorektal kanser gelişiminde en etkili olan sinyal yollarından Wnt sinyal yolağı birçok genin düzenlenmesinde görevlidir. Bu genler arasında, bir nörotrofin olan beyin türevli nörotrofik faktör (BDNF) geni yer almaktadır. BDNF, beyinde en bol miktarda bulunan büyüme faktörüdür ve beyinin fizyolojik süreçlerinin idamesinde önemli bir role sahiptir. BDNF, kök hücrelerin nöral farklılaşmasını ve MAPK/ERK ve PI3K/Akt'a bağlı sinyal yolları aracılığıyla farklılaşmış hücrelerin hayatta kalmasını uyarır. BDNF ifadesi, sinir sistemi dışında meme, akciğer, kolorektal, pankreas, prostat, karaciğer, miyelom ve lenfoid tümörlerde yüksek oranda görülmektedir. BDNF/Trk B yolağı; nöronal sağkalım, proliferasyon ve nöral kök hücrelerin nöral farklılaşmasının artmasıyla erişkin hipokampal nörogenезisin devam etmesinde ve akson büyümesinde görev almaktadır. Bu fonksiyon ve altta yatan mekanizma, BDNF'in kanserdeki rolü ile benzerdir. BDNF ekspresyonu, hücresel proliferasyonu ve sağkalımı kontrol etmektedir ve ayrıca matriks metalloproteinaz sekresyonu yoluyla hücre invazyonunda bağlantı oluşturmaktadır. BDNF, reseptör TrkB'ye bağlanır ve sırasıyla birçok sinyal yolağı zincirini harekete geçirir. Bu sinyal yolağı kaskadları; PI3K/Akt, Ras-Raf-MEK-ERK, PLC γ yolağı, EGFR transaktivasyonu, Jak/STAT, NF- κ B,

UPAR/UPA, Wnt/ β -katenin ve VEGF sinyal yollarıdır. BDNF ifadesi, Wnt sinyal yolu tarafından düzenlenmektedir ve aynı zamanda, BDNF/Trk B yolağının; kolorektal kanserin de yer aldığı diğer birçok tip solid tümörde yüksek seviyede upregüle edildiği bildirilmiştir.

Yukarıdaki bilgiler ışığında, "Apc mutasyonuna sahip farelerde Bdnf ifadesinin azaltılması intestinal polip oluşumunu azaltır mı?" sorusu akla gelmiştir. Bu sorunun cevabını aramak üzere bu tez çalışmasında, genetiği değiştirilmiş Apc mutant fare intestinal tümör modelinde Bdnf ifadesinin azaltılmasının Apc mutasyonu ile başlayan intestinal tümör gelişimine etkisini araştırmak hedeflenmiştir.

Böylece bu çalışmada; 36 hafta boyunca Apc+/-, Bdnf+/-, Apc+/-Bdnf+/- ve yabanıl tip fare deney gruplarını takip ettik ve Bdnf mutasyonunun Apc mutant farelere fenotipik ve moleküler düzeydeki etkilerini araştırdık. Takip sonucunda, Apc+/- ve yabanıl tip farelere kıyasla, Bdnf+/- farelerin vücut ağırlığında belirgin bir artış görüldü. Bdnf+/- dişi ve erkek farelerin vücut ağırlıkları incelendiğinde, grubun yarısı normal vücut ağırlığına sahipken diğer yarisında belirgin bir kilo artışı olduğu görüldü. Benzer kilo alım eğilimi Apc+/- Bdnf+/- farelerde de oldu. Apc+/- Bdnf+/- fareler, Apc+/- farelere kıyasla, yaklaşık 5 ay boyunca normal değerler üzerinde kilo aldı. Aynı zamanda, intestinal tümör gelişimine bağlı olarak meydana gelen; anemi, zayıflama, kürkte bozulma, postürde bozulma, rektal prolapsus oluşumu gibi hastalık fenotiplerini göstermedi. Bunun yanında, Apc+/- Bdnf+/- farelerin sağkalım süreleri, Apc+/- farelere kıyasla yaklaşık 2 ay kadar uzadı. Bdnf ifadesi azalmış Apc+/- farelerde polip oluşumu fenotipi, intestinal polipteki Bdnf ve beta katenin protein düzeyleri ile Bdnf, Trk B, beta katenin ve Lgr5 gen ifadeleri düzeyi ve polip bölgesindeki proliferatif hücre yoğunluğu değişti. Apc+/- farelerde Bdnf+/- mutasyonunun varlığı, intestinal tümör gelişimde polip yükü dağılımında farklılığa yol açtı. İnce bağırsaktaki polip yükü az miktarda azaltırken, kolondaki polip yükü belirgin olarak arttı. Sağkalım ve kilo alımı eğilimleri belirli bir süre için iyi yönde seyretti. Apc mutasyonuna sahip farelerde Bdnf ifadesindeki azalmanın intestinal tümörigenez üzerine etkileri dışında, sistemik başka etkileri de ortaya çıktı.

Bu çalışma ile, kolon kanseri gelişimini anlamak için yeni bir bakış açısı kazanıldığı ve tedavi stratejileri için BDNF'in aday molekül olabileceğine dair önemli katkıların sağlandığı düşünülmektedir. BDNF/Trk B sinyal yolağı, intestinal tümör gelişimi ve intestinal kök hücre dinamikleri arasındaki ilişkiyi daha detaylı anlayabilmek ve Bdnf ile ilişkili gen tedavileri gibi farklı tedavi stratejileri için daha fazla bilgi edinebilmek adına daha derin parametreler ile in vivo ve moleküler düzeyde inceleme yapılması, kolon kanseri araştırmaları için aydınlatıcı çalışmalardan biri olacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kolorektal Kanser (KRK) Gelişimi

Kolon kanseri en yaygın görülen gastrointestinal adenokarsinomlardan biridir ve en sık görülen tümör çeşitleri arasında yer alarak Batı yarım kürede en önemli ölüm nedenlerinden biri olmakta ve Amerika'da kanser kaynaklı ölüm sebepleri arasında üçüncü sırada yer almaktadır. Kuzey Amerika ve Batı Avrupa'daki insidansı gelişmekte olan ülkelere kıyasla daha yüksektir, fakat gelişmekte olan ülkelerdeki insidansı da artış eğilimi göstermektedir (1–3). GLOBOCAN 2020 tahminlerine göre, 2020'de dünya çapında 1,15 milyon yeni kolon kanseri vakası olacağı ve bu sayıların artarak 2040'ta 1,92 milyona yükseleceği tahmin edilmektedir. Önümüzdeki 20 yıl içinde ön görülen en yüksek sayıda yeni kolorektal kanser (KRK) vakasının Çin ve Amerika Birleşik Devletleri'nde meydana gelmesi beklenmektedir. Kolorektal kanser, dünya çapında tümörle ilişkili morbidite ve mortalitenin ana nedenlerindedir. KRK'in yıllar boyunca ilerlemesi ile, hastalığın erken gelişim gösteren adenomatöz öncü lezyonları giderek invaziv aşamaları takip etmektedir (4). Kolorektal kanser gelişimi, 10-15 yıl kadar sürebilen bir sürece sahip olup etkin genlerdeki mutasyonların zaman içinde giderek birikmesiyle karakterize edilir ve halihazırda mevcut sistemik tedaviler sağkalımı artırır, ancak ilerlemiş kolorektal kanseri iyileştirememektedir (5).

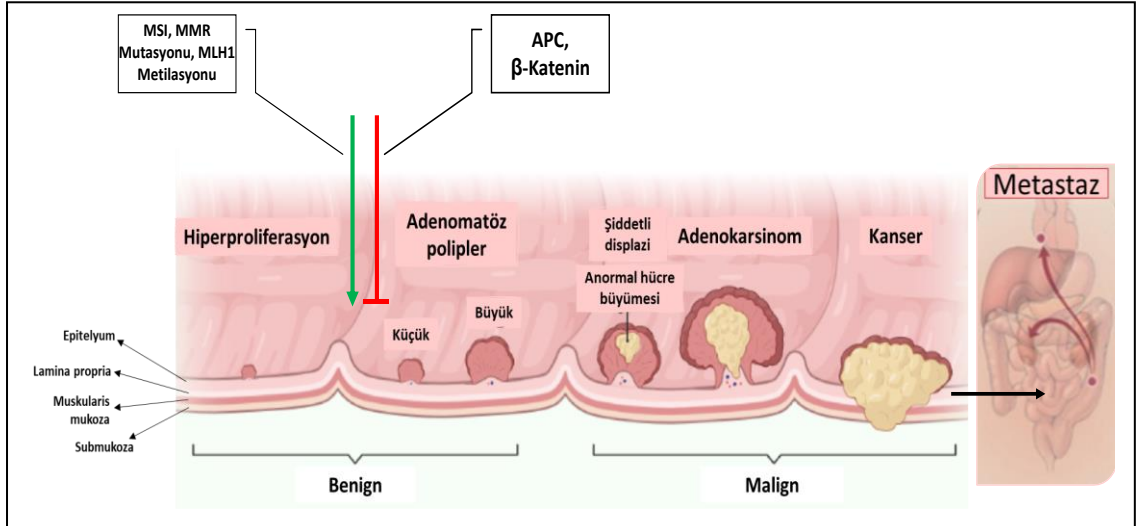
KRK; genetik faktörler, mikrobiyom, diyet modeli, yaşam tarzı ve diğer birçok faktörler sebebiyle oluşmaktadır (6). Mikrosatellit instabilitesi (MSI), BRAF mutasyonları, PIK3CA mutasyonları ve KRAS'taki genetik değişikliklerin tümü KRK ile ilişkilidir (7). Yapılan son araştırmalarda, malignitelerin çoğunun sadece kalıtsal mutasyonlardan değil, birçok gen ürününün düzensizliğinden kaynaklandığını ortaya koymuştur. Bu gen ürünleri, büyüme faktörlerini (örn. EGF, VEGF ve IGF-1), büyüme faktörü reseptörlerini (örn. EGF reseptörü), protein kinazları (örn. Src), inflamatuvar sitokinleri (örn. TNF, IL-1, IL-6), inflamatuvar enzimleri (örn. COX-2, 5-LOX, PLA-2), proapoptotik proteinleri (örn. TNF, Fas, TRAIL), antiapoptotik proteinleri (örn. Bcl-2,

Bcl-xL, cFLIP, IAP-1, IAP-2, survivin), tümör baskılayıcıları (ör. p53, Rb) ve transkripsiyon faktörlerini (ör. NF-κB, AP-1, STAT3, HIF-1, PPARγ) kapsamaktadır (8).

Kritik olan yaklaşık 140 kanser etkin geni olmasına rağmen, KRK'de en sık olarak mutasyona uğrayan genler APC, KRAS, BRAF, TP53 ve PIK3CA'dır (9). Dokular yaşla birlikte kanser gelişimi ile sonuçlanabilecek ve oluşumu devam eden somatik mutasyon birikimi yaparlar. Bağırsak epitelinin sık yenilenmesi göz önüne alındığında, intestinal kök hücreler (İKH) özellikle bu tür mutasyonel hasarlara eğilimlidir (10).

Sinyal yollarının anormal aktivasyonu, KRK'in gelişiminde ve ilerlemesinde önemli rollere sahiptir. Wnt, Notch, kemik morfojenetik protein (BMP)/TGF-β, Hedgehog-Gli (HH-GLI), epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR)/mitojenle etkinleşen protein kinaz (MAPK), NF-κB ve Akt/mTOR kanser kök hücrelerinin kendi kendini yenileme süreçlerinde yer almaktadır (11). Kolorektal kanser oluşumunda; tümör baskılayıcı genlerden APC (adenomatöz polipozis koli), DCC (*deleted in colorectal cancer*), p53 (*gene encoding tumor protein p53*) ve MCC (*mutated in colorectal cancer*), onkogenlerden K-ras (*Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*), SRC (*proto-onkogen SRC*) ve C-myc (*homologous oncogene viral myelocytomatosis*), DNA onarım genlerinden hMSH2 (*mutS 2 homologue*), hPMS1 (*BstNlproline rich protein subfamily 1*) ve bunlara ek olarak CD44 genleri (CD44 molekülünü kodlayan gen) ve COX-2 (*cytochrome C oxidase, subunit 2*) birbirinden farklı şekilde rol oynamaktadır ve bu genlerden iki veya daha fazlasında meydana gelen mutasyonlar malign tümör oluşumuyla ilişkilendirilmektedir (Şekil 2.1.). Bu genler arasında, adenomatöz polipozis koli (APC) tümör baskılayıcı geni, ailesel ve sporadik kolon kanserlerinde en sık rastlanan mutasyon olarak gösterilmiştir (12,13). APC mutasyonlarının germline taşıyıcıları, özellikle erken KRK başlangıcına duyarlıdır ve 40 yaş civarında KRK oluşmasında %100'e yakın oranda risk faktörü oluşturmaktadır (1). FAP (Familyal Adenomatöz Polipozis) ve HNPCC (Hereditör Non-Polipozis Kolorektal Kanseri) gibi alt grup kolorektal kanserlerin kaynağı küçük bir payla hereditör kökenli olmasına rağmen; ailesel olmayan kolorektal kanserlerde, düşük penetrans ve çevresel etkenlere maruz kalımdan ötürü genler arasındaki etkileşimler sonucunda yüksek

genetik yatkınlığa sahip bireylerde hastalığın meydana gelmesi daha büyük bir paya sahiptir (14).



Şekil 2.1. Kolon kanseri oluşumu ve etkileyen faktörler. İslam ve ark. (2022) ve Markowitz ve ark. (2009)'nın çalışmalarından adapte edilmiştir.

KRK'ler, gen ifadesi ve tümör oluşumu açısından farklılık gösteren heterojen hücre popülasyonlarından oluşur (15,16). Sporadik KRK ve kalıtsal KRK, kök hücre aşamasından köken almaktadır. KRK kök hücreleri (KKKH), kendi kendini yenileme ve birçok soya farklılaşma potansiyeli olan ve tümör oluşumunu sürdürebilen KRK hücre popülasyonunun küçük bir kısmını temsil etmektedir (17). Barker ve arkadaşları, APC eksikliği ile beraber içinde sadece Lösin açısından zengin tekrar içeren G proteini bağlı reseptör 5 pozitif (Lgr5+) kök hücrelerinin kolorektal adenom oluşumuna yol açabileceğini öne sürmüşlerdir (18). Adenomların tabanında bulunan kök hücre benzeri Lgr5+ tümör başlatan hücreler, normal kök hücrelere benzer özelliktedir (19).

Bu hastalıktaki moleküler ve hüresel çeşitlilik, kişiye özgü tedavinin önemine dikkat çekmektedir. Ayrıca, aile geçmişinde kolon kanseri öyküsü bulunan bireylerde kolon kanserinin meydana gelme oranı %25'in üzerindedir (20). Kolorektal kanserler için birçok tedavi yöntemi mevcut olduğu halde insidansı artmaya devam etmekte ve yeni tedavi yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır.

2.1.1. İnsan ve Fare Gastrointestinal Sistem Karşılaştırması

Fare modelleri, biyomedikal araştırmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Fare anatomisi, fizyolojisi ve genetiğindeki benzerlikler, fare deneylerinden insan biyolojisi hakkında çok sayıda çıkarımın yapılmasına imkan sağlamaktadır. İleri fare genetiğı bilgisi ve çok sayıda genetiğı değıştirilmiş fare modelinin varlığı, fonksiyonel çalışmaları büyük ölçüde kolaylaştırmaktadır. Ayrıca, diğeri memeli deneysel modelleriyle karşılaştırıldığında düşük bakım maliyetleri, yüksek üreme oranları ve kısa yaşam döngüsü, fare modelinin önemli avantajlarıdır (21).

Fare ve insanın fizyoloji ve anatomik yapılarının büyük oranda benzer olması, fare modellerinin biyomedikal çalışmalarda yaygın olarak kullanılmasını sağılayan etmenlerden biridir. Özellikle her iki türde de sindirim sistemi anatomik olarak birbirine benzeyen organlardan oluşmaktadır. Bununla birlikte, fare ve insan bağırsak sisteminin anatomisi de farklı diyetlere, beslenme modellerine, vücut boyutlarına ve metabolik gereksinimlere göre şekillenebilecek belirgin farklılıklara sahiptir (Tablo 2.1.) (22).

Tablo 2.1. Fare ve insan gastrointestinal sistem anatomisi ve histolojisindeki benzerlikler ve farklılıklar. Çıkan kolon= proksimal kolon, inen kolon= distal kolon (21).

Özellikler	Fare	İnsan
Genel anatomi: gastrointestinal sistem ağızdan oluşur, yemek borusu, mide, ince bağırsak, kalın bağırsak ve anüs	Evet	Evet
İnce bağırsağın kesit dokusunun bileşimi: mukoza, lamina propria, muskularis mukoza, submukoza, kaslı tunikler, sinir pleksi, seroza	Evet	Evet
İnce çıkışta hücre yapısı: emici enterositler, goblet hücreleri, enteroendokrin hücreleri, Paneth hücreleri, mikrokat (M) hücreleri, <i>caveolated</i> (baş) hücreleri	Evet	Evet
Kalın bağırsağın kesit dokusunun bileşimi: mukoza, lamina propria, muskularis mukoza, submukoza, kaslı tunikler, seroza	Evet	Evet
Kolondaki hücrelerin varlığı: emici kolonositler, goblet hücreleri, enteroendokrin hücreler, mikrokat (M) hücreleri	Evet	Evet
Mide	Glandüler olmayan/ön mide ve glandüler mide olarak bölünmüş, iki parça sınırlayıcı sırt ile ayrılmıştır.	Ön mide eksikliği, sınırlayıcı çıkıntı yok
İnce Bağırsak	Mukozal kıvrımları olmayan daha uzun vili	Fare villusundan daha kısa, mukozal kıvrımlar mevcut
Çekum	Büyük, fermantasyon burada olur	Küçük, fermantasyon yok
Apandis	Hayır	Evet
Kolon	Oldukça pürüzsüz ve bölünme yok	Açıkça farklı bölümlere ayrılmıştır: çıkan, enine ve inen kolon
Kalın bağırsak	İnce muskularis mukoza	Değişken kalınlık
Kolonda haustrum ve taenia coli varlığı	Hayır	Evet
Paneth hücrelerinin dağılımı	Sadece ince bağırsakta bulunur	Çekumda ve çıkan kolonda
Goblet hücrelerinin dağılımı	Proksimal kolonda bol, distal kolon ve rektumda kript tabanında sayı azalması	Çekumdan rektuma bol miktarda
Enine kıvrımların dağılımı	Çekum ve proksimal kolon ile sınırlı	Kolonik mukozanın uzunluğu boyunca

İnsan kolonu, taenia coli'nin varlığı ve fare kolonunda bulunmayan haustra'da bölümlere ayrılması ile farklı kısımlara (yani çıkan, enine ve inen kolon) bölünmüştür.

İnsan midesi, gastrik asit salgılayan glandüler bir mukoza ile kaplıdır, fare midesi ise glandüler mide ve glandüler olmayan veya ön mide olmak üzere iki bölgeye ayrılmıştır. Fare glandüler midesi, gastrik asit salgılamaktan sorumluyken, glandüler olmayan mide, gıda depolama ve sindirim için geçici bir yer olarak işlev görür. İnsan kolonu, fare kolonuna kıyasla daha kalın bir kas duvarı ve mukozaya sahiptir. Farelerde ve insanlardaki bağırsak duvarı histolojisi incelendiğinde, fare bağırsak villusları insanlardakinden daha uzundur.

2.1.2. İnsan ve Fare Kolon Kanseri Arasındaki Benzerlikler ve Farklar

Kolon tümörü histolojileri, iyi diferansiye adenomdan invaziv adenokarsinoma sıralanmaktadır. Yapılan çalışmalarda, karşılaştırılmalı olarak gösterilen fare ve insan kolon tümörü örneklerinin histolojik olarak incelenmesi sonucu, iki grup arasında kolaylıkla görünür bir farklılık olmadığı görülmüştür. Fare adenokarsinomlarının; insan kolorektal adenokarsinomlarındaki çekirdeğin sitoplazmaya oranının artmış olması, heterokromatin ve peş peşe bez oluşumunun artması ve muskularis mukozaya tümör invazyonunun gerçekleşmesi gibi en baskın özellikleri göstermiş olduğu bildirilmiştir (1).

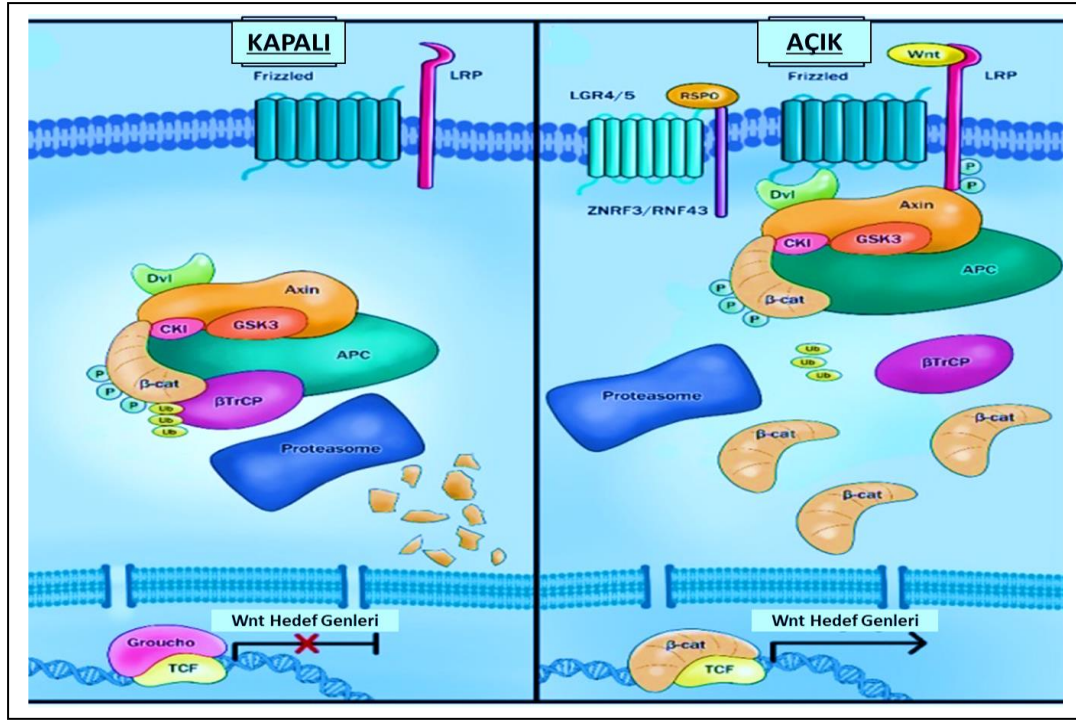
2.2. Wnt Sinyal Yolağı

Wingless geni, yaklaşık 40 yıl kadar önce, *Drosophila melanogaster*'deki çeşitli gelişimsel örüntü süreçlerini etkileyen görünür fenotipler için bir mutajenez taramasında keşfedilmiştir ve daha sonra diğer genetik taramalarda, Wnt sinyal proteinleri ailesinin birçok bileşeninin embriyonik gelişim sırasında hücre kaderinin kilit oyuncusu olduğu tanımlanmıştır (23,24). Kanonik Wnt sinyal yolağı, nöroproteksiyon, nöronal farklılaşma ve sinaps oluşumu dahil olmak üzere embriyonik ve yetişkin dokularda çok çeşitli temel süreçleri düzenlemektedir. Beyin türevli nörotrofik faktör (BDNF) ile benzer şekilde, yaralanma durumlarında glia hücrelerinde artar (25). Wnt sinyalinin biyolojik etkilerine, hedef genlerdeki belirli elementlere bağlanan TCF/LEF transkripsiyonel aktivatörleri aracılık eder. Wnt

tarafından düzenlenen TCF/LEF proteinlerinin N-terminal alanı, spesifik DNA dizi motifleri ile etkileşime izin veren β -katenin ile birleşir (26,27).

Kanonik Wnt sinyal yolağı; sporadik KRK'lerin yaklaşık %80'inde birincil olarak APC genindeki mutasyonlar (28,29) ve vakaların küçük bir oranında β -katenin geninin (CTNNB1) (29) aktive edici mutasyonları nedeniyle tetiklenir (30,31).

Wnt ligandı yokluğunda, adenomatöz polipozis koli (APC), Axin, kazein kinaz 1 (CK1₁), glikojen sentaz kinaz 3 (GSK3)'ten oluşan bir sitozolik protein kompleksi ve E3 ubiquitin protein ligazı (β TrCP) içeren beta-transdusin tekrarı, beta-kateninin (β -cat) fosforilasyonuna ve ubiquitinasyonuna aracılık eder. Fosforillenmiş beta-katenin daha sonra proteazom tarafından parçalanır. Böyle bir durumda, T-hücre faktörü/lenfoid güçlendirici bağlama faktör (TCF/LEF) ailesinden gelen transkripsiyon faktörleri, Wnt sinyalizasyonu hedef genlerinin transkripsiyonunu bloke eden transkripsiyon baskılayıcı Groucho ile etkileşim yoluyla aktif olmayan bir durumda tutulur. Wnt ligandının Frizzled ve düşük yoğunluklu yardımcı reseptörü lipoprotein reseptörle ilişkili protein (LRP) reseptörlerine bağlanması, hücre zarına Axin alımını indükleyen LRP fosforilasyonuna yol açar. Sonuç olarak, yıkım kompleksi parçalarına ayrılır ve β -katenin, TCF/LEF faktörleri ile beraber Wnt hedef genlerinin transkripsiyonunu aktive etmek için hücre çekirdeğine girer. R-spondin (RSPO) ligandı, lösin açısından zengin tekrar içeren G-protein bağlı reseptörü (Lgr) 4/5'e bağlanır, bu da transmembran E3 ubiquitin ligazları çinko ve yüzük parmağı 3 (ZNF3)'ün ve yüzük parmak 43 (RNF43)'ün internalizasyonu ve ardından proteasomal bozunmasına neden olur. Ligazlar, Frizzled Wnt reseptörünün devrine aracılık eder ve bunların inhibisyonu, Wnt sinyalini artırır (Şekil 2.2.) (32).



Şekil 2.2. Wnt/β-catenin Sinyal Yolağı. Stastna ve ark. (2019)'nın çalışmasından uyarlanmıştır.

2.3. Adenomatöz Polipozis Coli (APC) Geni ve Proteini

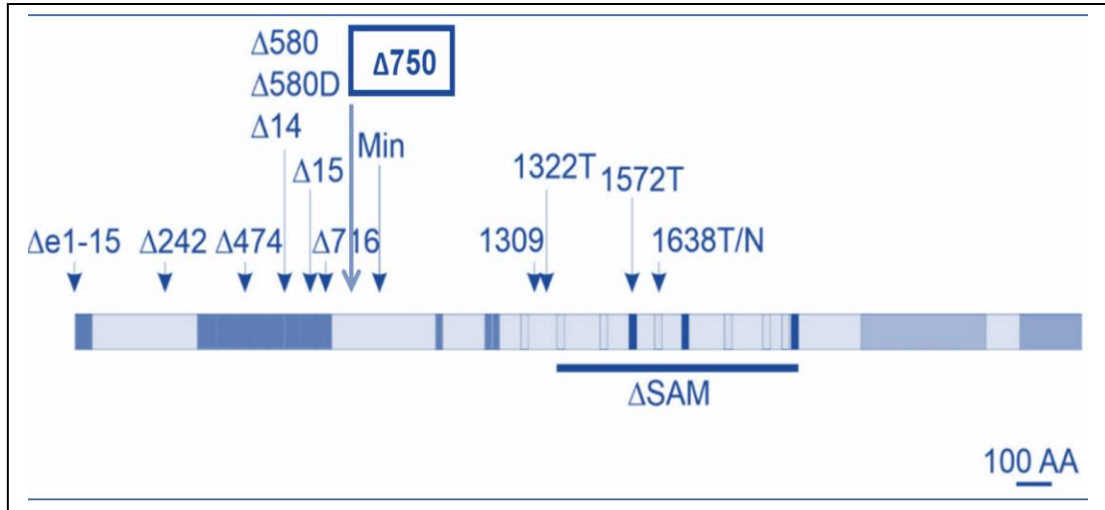
1991 yılında, ailesel adenomatöz polipozis olarak adlandırılan kalıtsal kolon kanseri sendromunun altında yatan neden olarak APC geninin mutasyonları keşfedilmiştir (33). APC transkripti bir multidomain protein kodlamakta olup, hücre adhezyonu, migrasyon, apoptozis ve mitoz bölünmedeki kromozom ayrılmasında önemli role sahiptir ve sıklıkla diğer proteinler ile ortak hareket etmektedir (12). APC öncelikle tümör baskılayıcı fonksiyona sahiptir ve aynı zamanda kanonikal Wnt sinyallerinde aşağı akışın baskılanmasına bağlı olarak da hareket eder. Bu yolak, transkripsiyonel kofaktör beta-kateninin nükleer translokasyonunu indüklemekte ve beta-kateninin aşırı nükleer birikimi ile nükleer proteinleri aktive eden ya da baskılayan diğer genlerle ortak çalışmasının önlenmesini düzenlemektedir (34). Sağlıklı bireylerde; AXIN, GSK-3 β , CK1 ve diğer proteinlerle birlikte olan sitoplazmik APC, fosforilasyonunu ve sonrasında ubiquitin aracılı proteazomal degradasyonunu arttırmak için β-katenin'e bağlanan bir kompleks oluşturmaktadır (35). APC geninde kayıp ya da mutasyon olması, nükleer β-kateninin birikmesine yol açmakta ve proto-

onkogenlerden c-Myc, Cdk-4 ve siklin D1'i kapsayan birçok transkripsiyonel hedefin *upregüle* olmasını sağlamaktadır (1).

İnsan APC proteini 2843 amino asitten oluşur ve β -katenin yıkım kompleksinin diğer proteinleri ile etkileşimlerine, proteinin merkezi kısmında bulunan birkaç bölgeye (amino asit tekrarları) aracılık eder. β -katenin'i yapısal olarak bağlayan üç 15-amino asit tekrarı (15AAR) ve β -katenin'i indüklenabilir şekilde bağlayan yedi 20-amino asit tekrarı (20AAR) vardır (20AAR'larla etkileşim, β -katenin'in fosforilasyon durumuna bağlıdır). APC'nin N-terminal kısmı, sekiz armadillo tekrarı içeren başka bir protein etkileşim alanı içerir. Son olarak proteinin C-terminali; mikrotübül düzeneği, hücre polaritesi ve kromozom ayrımında yer alan proteinlerle etkileşime girer. APC mutasyonlarının %60'ından fazlası, ekson 15'teki bir mutasyon küme bölgesinde (MCR) bulunur ve mutasyonlar çoğu durumda, APC proteininin C-terminal kısmının kaybıyla sonuçlanır. Apc proteininin amino asit dizisi ve domain bileşimi, *Drosophila*'dan insanlara kadar değişen metazoa türlerinde evrimsel olarak korunmaktadır (36–38).

2.3.1. *Apc* Mutant Fareler

Multipl intestinal neoplazi (Min) faresi, 1990 yılında Moser ve arkadaşları tarafından etil-nitrozüre ile spontan mutagenез gerçekleşmesi sonucu keşfedilmiştir (39). Bu fareler, adenomatöz polipozis koli (*Apc*) tümör baskılayıcı geninde heterozigot bir mutasyona sahiptir. *Apc* tümör baskılayıcı geni, genel olarak ince bağırsakta ve aynı zamanda kolonda da spontan tümör gelişimine yol açmaktadır (40). C57BL/6J (B6) kökenli Min fareler, intestinal yol boyunca yaklaşık 30-60 adet tümör geliştirmektedir. Bunun yanında, kolondaki birçok katmanda da prekanseröz lezyon olabileceği ön görülen anormal kript odakları (ACF) da geliştirmektedir (41). Fare *Apc* proteininin alt birim yapıları, varyantlarını oluşturan kesim noktaları ve mutasyonlarının pozisyonları Şekil 2.3'te gösterilmiştir.

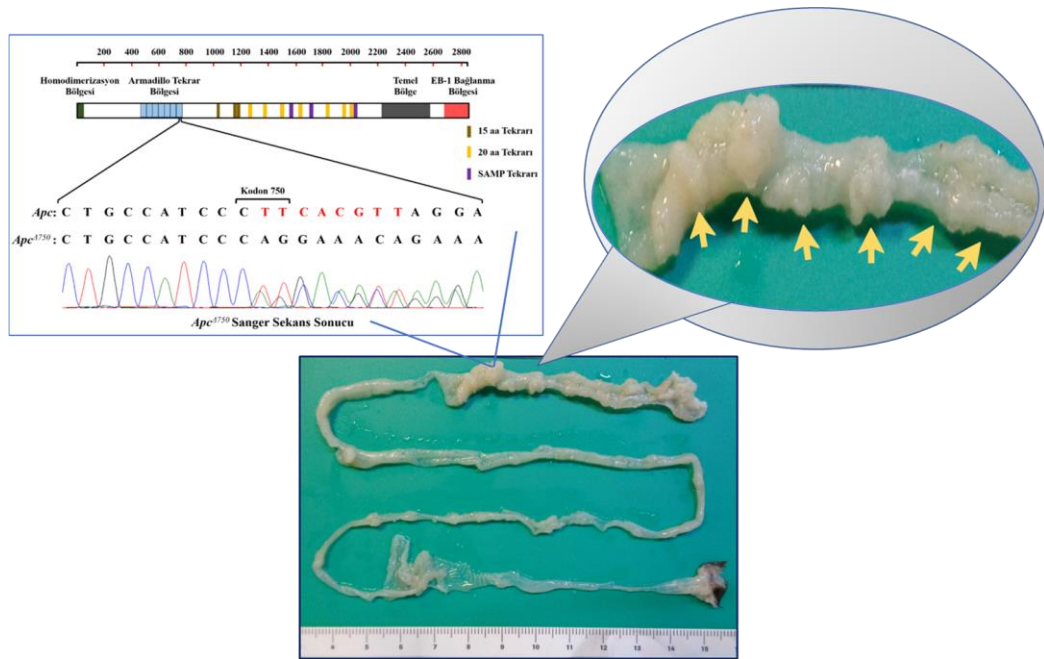


Şekil 2.3. Fare *Apc* Protein Yapısı ve Mutasyonları. Mutasyon isimleri, belirli kanser modelini tanımlayan çalışmalarda yer alan terimleri göstermektedir. *Apc* ΔSAM alelinde silinen bölgenin altı çizilmiştir. Δ, silinen yerleri göstermektedir. AA, amino asit. SAM, serin–alanin–metionin. Stastna ve ark. (2019)'nın çalışmasından uyarlanmıştır.

Svensen ve ark. (2011)'nin yaptığı çalışmada karsinojen uygulanan B6 (C57BL/6) kökenli Min fareleri arasında; kontrol Min farelerin intestinal dokusunda, diğer gruplara kıyasla, daha yüksek oranda tümör ve *ACF* katmanları olduğu gözlemlenmiştir (42). Genetik taban, Min farelerdeki tümör sayısını etkilemektedir. Yapılan çalışmalarda, B6 tabanlı Min farelerde, AKR/J, FVB/NJ (FVB) gibi birçok soyla çarpazlama yapılmıştır (41,43). Her iki durumda da bir sonraki hibrit Min F1 jenerasyonunda, saf B6 kökenli Min farelerine kıyasla daha düşük sayıda ince bağırsak tümör oluşumu gözlemlenmiştir. Moser ve arkadaşları, Min fenotipli fareleri B6 kökeninden AKR/J tabanlılara çarpazlayarak birçok jenerasyon oluşturmuşlar ve hibrit F1 farelere kıyasla sonraki jenerasyonlardakince bağırsak tümör sayısında giderek azalma gözlemlenmişlerdir (44).

Laboratuvarımızda, CRISPR/Cas9 sistemi ile intestinal polipozis oluşturulması amacıyla FVB/N ırkı farelerde, 8 nükleotitin delesyonu ile 16. ekzonda 750. kodondan itibaren çerçeve kayması mutasyonu gerçekleştirilmiş ve *Apc*^{+/-} mutant FVB/N fareler elde edilmiştir. *Apc*^{+/-} mutasyonu fenotipinin yukarıda açıklandığı gibi ırklar arasında farklılık göstermesinden dolayı, daha belirgin fenotip elde etmek üzere, FVB/N farelerdeki *Apc*^{+/-} mutasyonu geri çarpazlama ile C57BL/6 ırk farelere

aktarılmıştır. Araştırma grupları, bu farelerin sonraki jenerasyonlarının çoğaltılmasıyla oluşturulmuştur. Laboratuvarımızda oluşturulan *Apc*^{+/-} mutant farelerin silinen nükleotid dizisi ve duodenumunda oluşmuş polip örneği Şekil 2.4.'te gösterilmiştir. Delesyona bağlı oluşan çerçeve kayma mutasyonu, 758. kodonun stop kodonuna dönüşmesine neden olmuştur ve sonuç olarak, bu farelerde üretilen *Apc* proteininin yaklaşık 2000 amino asitlik bölümü kaybolmaktadır (Şekil 2.4.) (45).



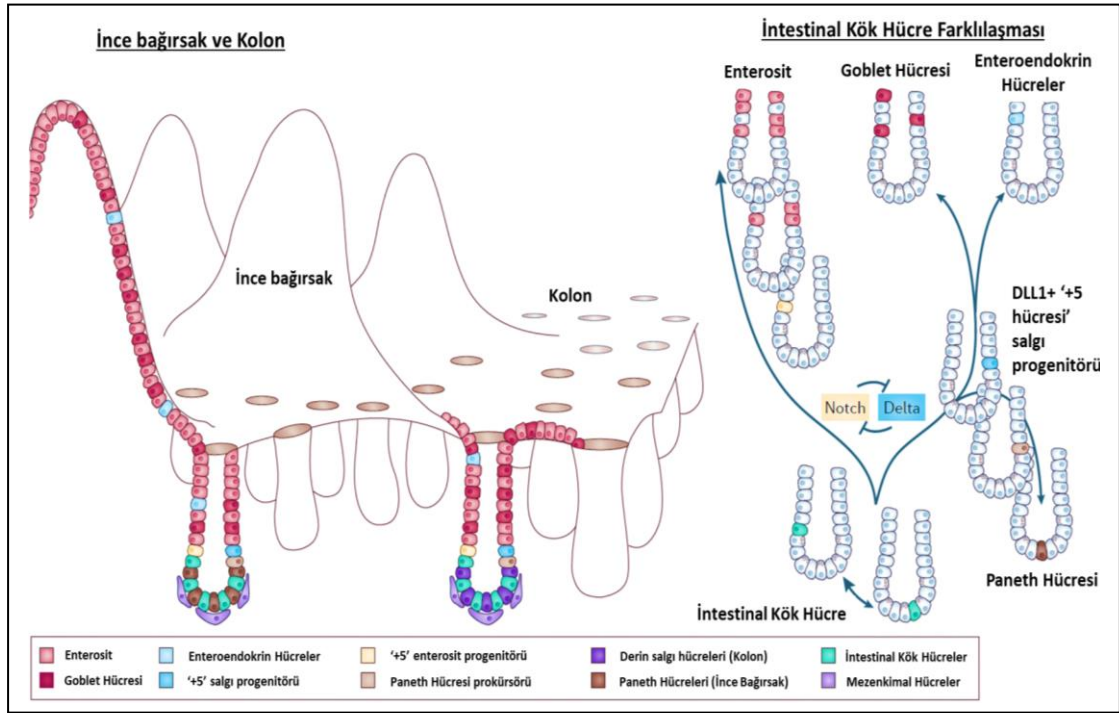
Şekil 2.4. Laboratuvarımızda oluşturulan *Apc*^{+/-} mutant farenin 16. ekzonunda 750-752. kodonunda meydana gelen 8 nükleotid delesyonu ve duodenumunda oluşmuş polip örneği.

2.4. İntestinal Kök Hücreler (İKH)

2.4.1. İnce Bağırsak ve Kolon Epitelinin Özellikleri

Bağırsak epitel kriptler ve parmak benzeri çıkıntılar (villus) içerir. Kript dipleri, hızla döngülenen intestinal kök hücrelerini (İKH) ve geçişi güçlendiren progenitörleri içermektedir (46). Başlıca farklılaşmış hücre tipleri, enterositler (besinlerin alımında yer alırlar), goblet hücreleri (mukus üreten), enteroendokrin hücreler (hormon üreten) ve Paneth hücreleridir. Paneth hücreleri dışında, tüm hücre tipleri 4-5 gün içinde villusun ucuna klonal soylar olarak göç eder ve burada lümeneye dökülürler. Mitoz bölünüm sonrası Paneth hücreleri nispeten uzun

ömürlüdür (5-6 hafta) ve İKH niş faktörlerini salgılamak ve doğal bağışıklıkta işlev görmek için kript diplerinde İKH'ler arasına yerleşir (47). Kolon, Paneth hücrelerinin bulunmadığı düz yüzeyli bir epitelyuma sahiptir; bunun yerine, derin salgı hücrelerinin İKH niş işlevinden sorumlu olduğu düşünülmektedir (48). Aktif olarak bölünen İKH'ler niş yerleşim için rekabet eder. Paneth hücreleriyle temas kesildiğinde hücreler, Notch'un aracılık ettiği bir ikili kader kararı verir. Aktif Notch sinyali, hücreler enterositlere doğru yönlendirilirken birden çok hücre döngüsüne izin verir (49). Delta sinyali, hücre kaderini farklı salgı hücrelerine doğru yönlendirir (Şekil 2.5.) (50).



Şekil 2.5. İnce bağırsak ve kolon epitelinin yapısı. Vermeulen ve Snippert (2014)'in çalışmasından adapte edilmiştir.

2.4.2. İntestinal Kök Hücrelerin Özellikleri

Erişkin bağırsak dokusu, geç fetal gelişim sırasında villus ve intervillöz alanlara geçen yalancı çok katlı bir epitelden üretilir (51). Kriptler doğumdan sonra, proliferatif intervillöz bölgeden oluşur ve daha sonra kript bölünmesi süreciyle genişlemeye uğrar (52,53). Kriptlerin tabanında, epitelyal tek tabakayı her ~5-7

günde bir tamamen değiştiren intestinal kök hücreler bulunur ve bu hücreler, bağırsak dokusuna özgü tüm özel hücreleri oluşturabilir (54).

Yetişkin bağırsak yolu, geç fetal gelişim sırasında villus ve intervillöz alanlara geçen psödostratifiye bir epitelden üretilir. Doğumdan sonra, kriptler proliferatif intervillöz bölgeden oluşur ve daha sonra kript bölünmesi olarak bilinen bir süreç yoluyla genişlemeye uğrar (51,52). Kriptlerin tabanında, epitelyal tek tabakayı her ~5-7 günde bir tamamen değiştiren İKH'ler bulunur ve böylece bağırsağın tüm özel hücre tipleri meydana gelebilir (54). Her kript tabanı, doku içindeki proliferatif ve farklılaşmış hücreler arasındaki dengeyi korumak için toplu olarak işlev gören sınırlı sayıda eşgl İKH'ler tarafından doldurulur (29,55,56). Buradaki İKH'ler, niş doluluğu için sürekli devam eden bir rekabet içinde devamlılığı korurlar (57).

2.4.3. İntestinal Kök Hücre Nişi

İKH zellikleri ile in vivo olarak fonksiyonel yönden ilişkilendirilen ilk işaret, Wnt hedef geni Lgr5'tir. Yalnızca kript tabanında bulunan Lgr5+ hücrelerinin, uzun süreli kendi kendini yenileme yeteneğine sahip olduğu ve çok soylu (*lineage*) farklılaşma potansiyeline sahip olduğu gösterilmiştir (54). Lgr5+ hücreleri, epitelyal kök hücre nişinin önemli bir bileşenini oluşturan Paneth hücreleri arasına serpiştirilmiştir (28). Bu niş, kök hücre işlevini düzenlemek ve İKH'nin kendi kendini yenilemesini teşvik etmek için çok önemli olan sinyalleri salgılayarak İKH'lerin devamlılığı için birlikte koruyucu bir ortam oluşturan stromal hücreler ve hücre dışı matris tarafından daha da desteklenmektedir (29). İKH fonksiyonunu kontrol eden anahtar sinyal yolu, Wnt/ β -katenin yoludur ve Wnt ve R-spondin ligandları, niş tarafından kapsamlı bir şekilde salgılanır ve kriptin dibinde en yüksek seviyelere ulaşır. Wnt aktivitesi, BMP ve Grem1 ligandlarının lümene doğru yüksek oranda ifade edildiği ve farklılaşmayı ve apoptozu düzenleyen kemik morfogenetik proteini (BMP) sinyali ile dengelenir (29–31).

2.5. Tümör Oluşumu Başlangıcında Kök Hücreler

KRK geliştirmek için geçen süre ve çoğu bağırsak hücre tipinin kısa ömrü göz önüne alındığında, genellikle uzun ömürlü İKH'lerin tümör başlangıcına yol açan mutasyonların alıcıları olduğuna inanılmaktadır (18). Aslında, farklılaşmış hücre tiplerinde Apc kaybı, tümör gelişimini başlatmada başarısız olur ve bu hücrelerin apoptozu indüklediği gösterilmiştir. Bununla birlikte, farklılaşmayı teşvik eden transkripsiyon faktörü Smad4'ün etkisizleştirilmesi veya Wnt aktivasyonu ile kombinasyon halinde ek KrasG12D mutasyonlarının edinilmesi, hızlı farklılaşma ve villus bölgesinden bağırsak adenomlarının gelişimi ile sonuçlanmıştır (58–60). Kök benzeri hücrelerin bu tümör başlatma kapasitesi, kısmen yerel mikroçevre tarafından kontrol edilir, çünkü stroma tarafından üretilen TGF β , villusun yukarısındaki hücrelerin etkili bir şekilde farklılaşmasını önler (61). Ayrıca, yaralanma ve iltihaplanma koşulları altında, kök dışı mutant hücreler, kök benzeri özellikleri doğrudan veya dolaylı olarak yeniden kazanarak tümörjenez başlatabilir (59,62). Birlikte, bu çalışmalar, farklılaşmış hücrelerin kök hücre özelliklerini yeniden kazandıktan sonra malign transformasyonu destekleme potansiyelini göstermektedir; bu, artık kanserin resmi bir özelliği olarak kabul edilen bir özelliktir (Şekil 1) (63).

2.5.1. Kanser Kök Hücreleri (KKH)

İntestinal kök hücreler, yalnızca kript tabanına yerleşmiş Lgr5⁺ hücrelerdir. Kendini yenileme yeteneğine sahip olup multipl farklılaşma potansiyeline sahiptirler. İntestinal kök hücrelerin kimliklendirilmesinde in vivo olarak fonksiyonel yönde ilişkilendirilen ilk işaret, Wnt hedef geni Lgr5'tir (54). Lgr5⁺ hücreler, epitelyal kök hücre nişinin önemli bir bileşenini oluşturan Paneth hücreleri arasına yerleşmişlerdir (28). Bu niş, kök hücre işlevini düzenlemek ve İKH'lerin kendi kendini yenilemesini teşvik etmek için çok önemli olan sinyalleri salgılayarak İKH'lerin idamesi için birlikte koruyucu bir ortam oluşturan stromal hücreler ve hücre dışı matris tarafından da desteklenir (29). İKH fonksiyonunu kontrol eden anahtar sinyal yolu, Wnt/ β -katenin yoludur ve Wnt ve R-spondin ligandları, intestinal kök hücre nişi tarafından yaygın bir şekilde salgılanır ve kript tabanında en yüksek seviyelere ulaşır (30,31). Wnt

aktivitesi, kemik morfogenetik proteini (BMP) sinyali ile dengelenmektedir. BMP ve Grem1 (Gremlin 1) ligandları lümene doğru yüksek oranda ifade edilmekte ve farklılaşmayı ve apoptozu düzenlemektedir (29). Nişteki diğer birçok sinyal yolağı, İKH kaderinin düzenlenmesine doğrudan veya bağırsak mezenkimal dokusunun düzenlenmesi yoluyla dolaylı olarak katkıda bulunan Notch, EGF ve Hedgehog sinyallerini içerir (64). Sıkı şekilde kontrol edilen bu sinyal basamaklarının herhangi birinde oluşan bir bozukluk, İKH bölünmesini büyük ölçüde etkileyerek, doku homeostazının bozulmasına ve hastalığa karşı duyarlılığa yol açar.

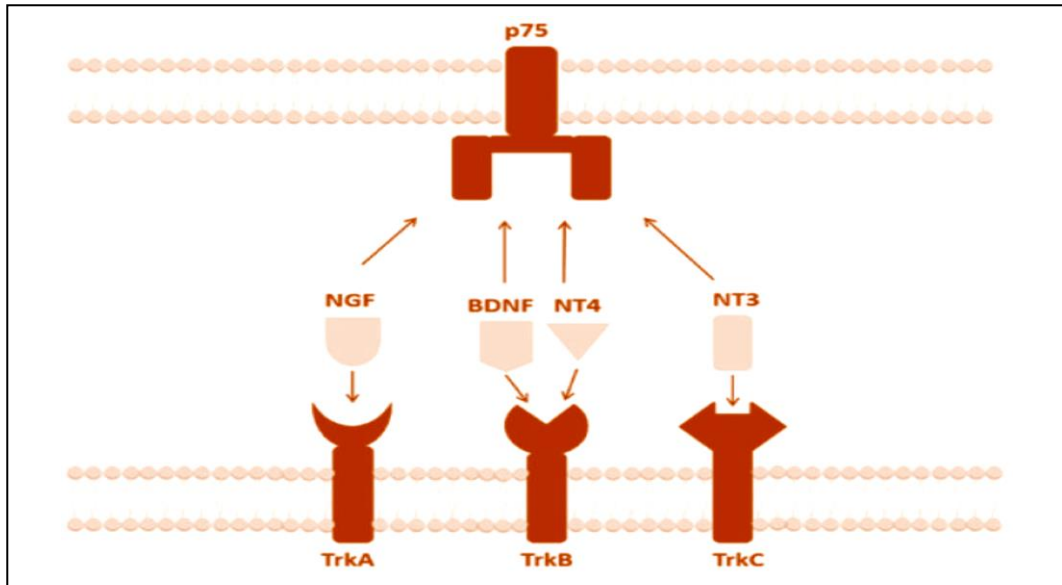
Her kript tabanı, doku içindeki proliferatif ve farklılaşmış hücreler arasındaki dengeyi korumak için toplu olarak işlev gören sınırlı sayıda eşdeğer İKH'ler tarafından doldurulur (55–57,65–67). Bu İKH'ler niş doluluğu için sürekli devam eden bir rekabet içindedir (57). Bu süreç, rastgele kayıp ve yer değiştirme olaylarıyla karakterize edilir ve nötr kayma olarak adlandırılan, bağırsak kriptlerinde klonların rastgele genişlemesine ve büzülmesine yol açar. Bağırsak kriptlerinde klonların rastgele genişlemesine ve büzülmesine yol açan nötr sürüklenme dinamikleri, kript başına işlevsel İKH'lerin sayısı ve mikro ortama dayalı değişimi arasındaki oran ile tanımlanır. İKH rekabet avantajı sağlayan bir mutasyon elde ettiğinde, nötr sürüklenme dinamikleri bozular. Bu eğilimli sürüklenme, tercihen premalign klonların genişlemesine, mutasyonun bir kript içinde sabitlenmesine ve ardından kolorektal kanserin başlamasına neden olur (56,65–67).

Adenomlar ve tümörler, normal bağırsak dokusu ile benzer bir hiyerarşik yapıya sahiptir; bu durum, İKH'lerin homeostazı sürdürmesine benzer şekilde tümörü koruyan kök hücre benzeri bir kanser hücresi popülasyonunun varlığını düşündürmektedir (68–70). Wnt sinyal yolağı, bağırsak homeostazının düzenlenmesinde ve tümör başlangıcını yönlendirmede merkezi bir öneme sahiptir. Wnt sinyalinin, İKH'lerin mikroçevresel kontrolünü düzenlemede önemli bir rol oynaması söz konusudur (9). Bir çalışmada, Apc-mutant tümörlerde Apc fonksiyonunun restorasyonunun, bu tümörlerde hızlı gerileme olması ile sonuçlandığı görülmüş olup böylelikle, Wnt sinyalinin yüksek ifadesinin yalnızca

tümörün başlatılması için değil, aynı zamanda tümörün korunması için de gerekli olduğu düşünülmüştür. Aynı zamanda, KRK hücreleri arasında heterojen Wnt sinyal seviyeleri gözlenir ve en yüksek Wnt aktivasyonuna sahip hücreler, fonksiyonel KRK özelliklerine sahiptir. Bu hücrelerin hepsi aynı klonal Wnt-aktive edici mutasyonu taşıdığı için Wnt heterojenitesinin ve dolayısıyla KKH fonksiyonunun kısmen mikroçevresel olarak tanımlandığı öne sürülmüştür (71).

2.6. Nörotrofik Reseptör Tirozin Kinaz (Ntrk)'ın Yapısı, İşlevi ve Reseptörleri

Tropomyozin reseptör kinaz (Trk) reseptörleri, nörotrofinler ile aktive edilen bir reseptör tirozin kinaz (RTK) ailesini oluşturmaktadır. TrkA, Trk B ve TrkC, sırasıyla sinir büyüme faktörü, beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) ve nörotrofin-3 (NT-3) reseptörleridir (72). BDNF/Trk B sinyalizasyonunun biyolojik fonksiyonları ilk olarak merkezi sinir sisteminde karakterize edilmiştir. Nöronlardan salgılanan BDNF sekresyonu merkezi sinir sisteminde; sinaptik plastisitenin yanı sıra merkezi sinir sisteminin gelişimi esnasında sinaptik bağlantıların oluşumu için kritiktir (73).

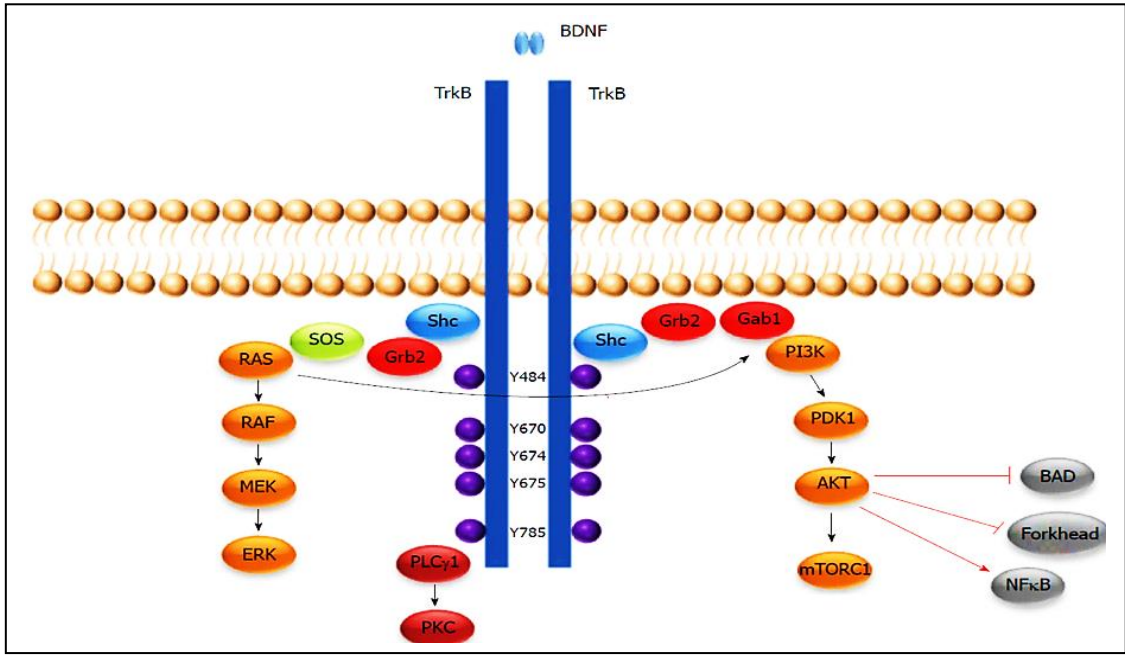


Şekil 2.6. Nörotrofinler ve reseptörleri. Meng ve ark. (2019)'nın çalışmasından adapte edilmiştir.

Nörotrofinler, merkezi ve periferel sinir sisteminde nöronun farklılaşması, sağkalımı, dendritik budama, invazyon pattern oluşumu, sinaptik fonksiyon ve plastisiteyi düzenleyen proteinlerin bir ailesidir. Burada dört nörotrofin bulunmaktadır: sinir büyüme faktörü (NGF), beyin kökenli nörotrofik faktör (BDNF), nörotrofin-3 (NT-3) ve NT-4. Bu nörotrofinler iki tip reseptöre sahiptir: p75 nörotrofin reseptör ve tropomiyozin reseptör kinazlar (Trk). P75, her dört nörotrofinde bulunan bir reseptördür. Trk reseptörlerine gelince, NGF TrkA'ya, BDNF ve NT-4 Trk B'ye ve NT-3 ise daha çok TrkC'ye bağlanmaktadır (74). p75; BDNF'in prekürsör formu (pro-BDNF) için bir reseptördür ve metalloproteinazlar ile matur formu oluşturmak için ayrılabilir. Trk B, BDNF'in matur formunun reseptörüdür (Şekil 2.6., 2.8.) (75,76).

2.7. Beyin Türevli Nörotrofik Faktör (BDNF)

Bir nörotrofin olan beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF), 1982 yılında Barde tarafından domuz beyninden keşfedilmiştir (77). Dört nörotrofin arasında BDNF, beyinde en bol miktarda bulunan büyüme faktörüdür ve beyinin fizyolojik süreçlerinin idamesinde önemli bir role sahiptir. BDNF/Trk B yolağı; nöronal sağkalım, proliferasyon, gelişim ve nöral kök hücrelerin farklılaşması ve erişkin hipokampal nörogenezisin devam etmesinde ve akson büyümesinde görev almaktadır. BDNF'in dentat girusun subgranüler bölgesinde progenitor hücrelerin farklılaşması ve olgunlaşmasında önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. BDNF ekspresyonu, hücresel proliferasyonu ve sağkalımı kontrol etmektedir ve ayrıca matriks metalloproteinaz sekresyonu yoluyla hücre invazyonunda bağlantı oluşturmaktadır (78,79). BDNF, reseptör Trk B'ye bağlanır ve sırasıyla birçok sinyal yolağı zincirini harekete geçirir. Bu sinyal yolağı kaskadları; PI3K/Akt, Ras-Raf-MEK-ERK, PLC γ yolağı, EGFR transaktivasyonu, Jak/STAT, NF-kB, UPAR/UPA, Wnt/ β -katenin ve VEGF sinyal yollarıdır. PI3K/Akt, BDNF/Trk B ile aktive olabilmektedir ve sonrasında pro-migratör, anti-apoptotik ve önyaşamsal (*prosurvival*) proteinlerin üretimine öncü olabilmektedir (Şekil 2.7.) (80).



Şekil 2.7. Bdnf/Trk B Sinyal Yolağı. Akil ve ark. (2016)'nın çalışmasından adapte edilmiştir.

BDNF, nörogenez, nöroproteksiyon, nörodejenerasyon, sinaptik plastisite ve nöronal strese direnç gibi sinir sisteminin gelişiminde baskın rolü ile bilinen hücre dışı bir sinyal proteindir (81–83) ve öğrenme ve hafıza mekanizmalarında önemlidir (84).

Gastrointestinal sistemi inerve eden juguler ve nodoz ganglionlarda bulunan hemen hemen tüm vagal duyu nöronları BDNF nöronlarıdır (62). BDNF, salgı proteini olduğu için hücre içi organellerin yanı sıra hücre dışı organellerde de bulunur. BDNF nöronlar, mikroglia, astrositler (esas olarak transsitoz yoluyla), monositler, periferik perisitler dahil vasküler endotelyal hücreler, düz ve striatal kaslar ve erkek submandibular bezleri dahil olmak üzere çeşitli hücrelerden salgılanır. Nöronlarda hem aksonlardan hem de dendritlerden farklı oranlarda da olsa salınır. Buna göre, beyin parankiminde ve kültürlenmiş hücrelerde ve ayrıca hücre kültürü ile koşullandırılmış ortamda ve tam kan, serum veya plazmada da saptanabilir (85–87).

2.7.1. BDNF'ün Fonksiyonları

BDNF esas olarak merkezi sinir sisteminde (MSS) eksprese edilir, ancak periferde de (serum, plazma, lenfositler) bulunur (88,89). BDNF, bir Nmetil-D-aspartat/gama-aminobütirik asit (NMDA/GABA) -yanıtlı nöral progenitör hücrelerin (NPH) alt kümesinde motiliteyi artırabilir (91). Ayrıca, yüksek BDNF ekspresyonuna sahip nöral kök hücreler (NKH), hasar görmüş beyin dokusuna nakledildiğinde, motor fonksiyonun iyileşmesini teşvik ederler. Bdnf, ilaç kullanım bozuklukları, birçok sistemik hastalık (diyabet, kanser, kardiyovasküler risk vb.) ve vücudun homeostatik regülasyonu ile de ilişkilidir. BDNF öncülünün proteolitik parçalanmasından sonra sentezlenir, (90,91). Çeşitli çalışmalar, pro-BDNF ve matür BDNF'in zıt etkilere sahip olduğunu (88,92) ve çeşitli fizyolojik işlevlerde önemli bir rol oynadığını göstermiştir. BDNF, başlıca antiapoptotik özelliklere sahip olan ve uzun vadede depresyonu engelleyen tropomiyosin kinaz B reseptörlerine (Trk B) bağlanır (93–96), oysa pro-BDNF tercihen p75NTR reseptörüne bağlanır ve nöronal apoptozu ve uzun süreli depresyonu destekler (97).

BDNF, Trk B reseptörü ve bununla ilişkili molekül sortilin, serumda serbest dolaşan formda olduğu gibi eksozomlarda da bulunur ve daha uzak hedeflere, hatta MSS'ye bile daha uzun etkili salınımına izin verir (98,99). Nöronal aktiviteyi ve doku hasarını kapsayan birçok tipte uyarıcının BDNF transkript seviyelerini arttırdığı bildirilmiştir (88).

2.7.2. BDNF Proteininin Yapısı

Dört farklı protein formu altında çeşitli vücut bölgelerinde bulunur: proBDNF, matür BDNF, kesik BDNF ve BDNF pro-peptid (100). Nörotrofin protein ailesinin diğer üyelerine benzer şekilde, BDNF başlangıçta yapısal olarak bir sinyal dizisi, bir ön alan ve olgun alandan oluşan bir öncü protein (preproBDNF) olarak sentezlenir (101). Memeli preproBDNF, 32 kDa moleküler ağırlığa sahip 248 amino asitlik bir proteindir. Endoplazmik retikulumda sinyal peptidinin (ön bölge) bölünmesinden sonra, proBDNF, 28 kDa'lık bir kesik BDNF formu (*truncBDNF*) veya yaklaşık aynı moleküler

2.8. Bdnf/Trk B Sinyal Yolağının Kanser ile İlişkisi

2.8.1. Bdnf/Trk B Sinyal Yolağının Wnt Sinyal Yolağı ile İlişkisi

Wnt sinyalizasyonu hasar durumunda BDNF'e benzer olarak, glia hücrelerinde artmaktadır (105). Ayrıca, Wnt aktivatörü Norrin, N-metil-D-aspartat ile indüklenen hasar esnasında retina glia hücrelerinde BDNF'i indüklemektedir. Wnt3a ligandı ise retinal gangliyon hücre hattında BDNF'i indüklemektedir (25). Yüksek BDNF düzeyleri; büyüme faktörüne erişebilirliğin azalması ve sitotoksik ajanlara maruz kalım gibi koşullar altında bulunan nöroblastom hücrelerinin sağkalımını arttırmaktadır (106,107). BDNF, sinir sistemi dışında kolorektal kanserin de yer aldığı diğer tip solid tümörlerde de yüksek oranda görülmektedir. Fakat, BDNF transkripsiyon düzeyinin hücre biyolojik fonksiyon ve BDNF ile indüklenen moleküler yollar üzerine etkisi bilinmemektedir (108).

Son zamanlarda, BDNF/Trk B sinyalinin artması ile tümör ilerlemesi ve çeşitli kanserlerde sağkalımın azalması arasında ilişki bulunması nedeniyle BDNF bir onkogen olarak rapor edilmiştir (109–111). BDNF/Trk B'nin aktivasyonu, kanser hücrelerinin çoğalmasını, hayatta kalmasını, invazyonunu ve epitelyal-mezenkimal geçişini (EMT) destekler. BDNF, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ekspresyonunu indükler ve kolon kanseri hücrelerinde hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz (ERK) ve AKT yollarını aktive eder (109,112).

Jin-Wei Yang ve ark. (2015)'nin çalışmasında, BDNF ve Wnt sinyal yolları arasında bir etkileşim olduğunu ve GSK-3 β inhibitörü olan 6-bromoindirubin-3'-oksim (BIO)' nun bu etkileşime müdahale ettiğini göstermektedir. Bu, GSK-3 β 'nin BDNF ve Wnt sinyal yollarını birbirine bağlayan kritik faktör olabileceğini ve BDNF'nin nöronal büyüme ve morfoloji üzerindeki etkilerine aracılık ettiğini düşündürmektedir. Bu çalışma sonucunda; BDNF'nin embriyonik insan omurilik nöronlarının büyümesini desteklediği bulunmuştur. BDNF, nöronlarda Wnt sinyalinin güçlü bir düzenleyicisidir ve iki yol arasındaki karışımı ortaya çıkarır. BDNF'nin düzenleyici etkisi GSK-3 β inhibisyonu tarafından bastırılmaktadır.(113).

Başka bir çalışma, BDNF ifadesinin Wnt sinyal yolu tarafından düzenlendiğini bildirmiştir (114). Ayrıca BDNF, kök hücrelerin nöral farklılaşmasını ve MAPK/ERK ve PI3K/Akt'a bağlı sinyal yolları aracılığıyla farklılaşmış hücrelerin hayatta kalmasını uyarır (115). BDNF, gelişim sürecindeki beyine transplantasyon için insan göbek kordonu mezenkimal kök hücrelerinin ERK ve β -katenin yolları aracılığıyla farklılaşmasını uyarır (116). BDNF ayrıca sinaptik vezikülleri harekete geçirir, sinaps oluşumunu artırır, aksonal morfogenezini düzenler ve β -katenin etkileşimlerini bozarak yenidoğan koklear ganglion eksplantlarından nörit büyümesini destekler (117,118). BDNF ayrıca kültürlenmiş NKH'lerde hücre içi β -katenin sinyalleşme basamaklarını da düzenler (119–121).

2.8.2. Bdnf/Trk B Sinyal Yolağının Tümör Oluşumu ile İlişkisi

BDNF ile aktive edilmiş tümör hücrelerindeki PI3K/AKT ve ERK yolları, kemoterapötik ilaçlara duyarız hücrelerin meydana gelmesine yol açabilmektedir (122). Önceki bir çalışmada, tümör olmayan kolon dokularına kıyasla kolon karsinom dokularında BDNF'in yüksek oranda ifade edildiği görülmüştür (123). BDNF/Trk B yolağının tümör hücrelerinin proliferasyonunu, sağkalımını, metastazını ve kemoterapiye direncini arttırdığı gösterilmiştir ve bu durumun, nöronal dokular dışında diğer tip kanserlerde de görülmesi söz konusu olabilmektedir (107). Son zamanlarda BDNF ve Trk B'nin; meme, akciğer, kolorektum, pankreas, prostat, karaciğer, myelom ve lenfoid tümörler gibi birçok kanser türünde yüksek seviyede upregüle edildiği ve önemli rolleri olduğu bulunmuştur (124). Trk reseptörlerinin aktivasyonu, PI3K/Akt, Ras-Raf-MEK-ERK, PLC γ yolları, EGFR'nin transaktivasyonunu kapsayan downstream sinyaller dizisini ortaya çıkarmaktadır. Sonuç olarak, bu yollar; kanser hücresinin büyümesi, proliferasyonu, sağkalımı, migrasyonu, epitelden mezenkimale geçişi, anoikisi, relapsı ve kemoterapötik duyarlılığını arttırarak onkojenik etkiler göstermektedir (123,125–127).

BDNF, nöronlar ve nöral sistem kanserlerinin fenotipik davranışlarında önemlidir. BDNF, esas olarak hücre yüzeyi tirozin kinaz reseptörü Trk B vasıtasıyla hücre biyolojik reaksiyonlara aracılık etmektedir. BDNF Trk B'ye bağlandığında,

reseptörün tirozin kinaz aktivitesi, reseptörün sitoplazmik bölgesindeki tirozin kalıntılarının fosforilasyonu yoluyla aktive edilmektedir, bu da hücrel sinyalizasyonu indüklemektedir (128). Ekstrasellüler N-terminal uç BDNF'e bağlanır, sonrasında hücredeki sinyal yolağının aktive olması için reseptör otofosforilasyonu meydana gelir (129). BDNF ekspresyonu, hücrel proliferasyonu ve sağkalımı kontrol etmektedir ve ayrıca matriks metalloproteinaz sekresyonu yoluyla hücre invazyonunda bağlantı oluşturmaktadır (78,79). BDNF ile aktive edilmiş tümör hücrelerindeki PI3K/AKT ve ERK yolları, kemoterapötik ilaçlara duyarlı hücrelerin meydana gelmesine yol açabilmektedir (122). BDNF'e uzun süre maruz kalım, nöronların ve nöronal olmayan hücrelerin ölümünü direkt olarak indükleyebilmektedir ve oksijen/glikoz ihtiyacına hassasiyeti arttırabilmektedir (130,131).

BDNF ile Trk aktivasyonu, transisyonel hücre karsinomu hücre hattında proliferasyon ve sağkalımı arttırdığı; fakat Trk B antikorunun, sitotoksiteyi indüklediği ve transisyonel hücre karsinom hücrelerinin migrasyon ve invazyonunu baskıladığı gösterilmiştir (132).

2.8.3. Bdnf/Trk B Sinyal Yolağının Kök Hücreler ile İlişkisi

BDNF ifadesi, Wnt sinyal yolu tarafından düzenlenmektedir (114). BDNF, kök hücrelerin nöral farklılaşmasını ve MAPK/ERK ve PI3K/Akt'a bağlı sinyal yolları aracılığıyla farklılaşmış hücrelerin hayatta kalmasını uyarır (115). BDNF, gelişmekte olan beyine transplantasyon için insan göbek kordonu mezenkimal kök hücrelerinin ERK ve β -katenin yolları aracılığıyla farklılaşmasını uyarır (116). BDNF ayrıca sinaptik vezikülleri harekete geçirir, sinaps oluşumunu arttırır, aksonal morfogenezini düzenler ve β -katenin etkileşimlerini bozarak yenidoğan koklear ganglion eksplantlarından nörit büyümesini destekler (117,118) BDNF ayrıca kültürlenmiş NKH'lerde hücre içi β -katenin sinyalleşme basamaklarını da düzenler (119,120).

BDNF/Trk B yolağının, başarılı tedavi sonrası kanserin yenilenmesine aracılık ettiği öne sürülmüştür. Trk B(+) kanser kök hücrelerinin meme kanserine sahip farelerin başarılı tedavi sonrası tümörün yenilenmesine neden olabileceği

gösterilmiştir (110,133). Bu da kemoterapi ile başarılı şekilde tümör hücrelerinin ortadan kaldırılmasından sonra Trk B inhibitörü ile tedavinin devam edilmesinin önemini göstermektedir. BDNF, reseptör Trk B'ye bağlanır ve sırasıyla birçok sinyal yolağı zincirini harekete geçirir. Bu sinyal yolağı kaskadları; PI3K/Akt, Ras-Raf-MEK-ERK, PLC γ yolağı, EGFR transaktivasyonu, Jak/STAT, NF-kB, UPAR/UPA, Wnt/ β -katenin ve VEGF sinyal yolaklarıdır. PI3K/Akt, BDNF/Trk B ile aktive olabilmektedir ve sonrasında pro-migratör, anti-apoptotik ve önylaşamsal proteinlerin üretimine öncü olabilmektedir (80).

2.9. Tez Çalışmasının Amacı

Bu tez çalışmasında, genetiğı değıştirilmiş Apc mutant fare intestinal tümör modelinde Bdnf ifadesinin azaltılmasının Apc mutasyonu ile başlayan intestinal tümör gelişimine etkisini araştırmak amaçlanmıştır. Bu kapsamda, intestinal ve kolonik polip yükü, morfolojisi, hücresel proliferasyon oranı, protein ve RNA düzeyinde moleküler değışiklikler ve farelerin sağ kalımı üzerine etkilerinin incelenmesi ve bu sayede Bdnf ifadesinin azaltılmasının intestinal tümör gelişimi üzerine etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir. Tez çalışması sonucunda, fare intestinal tümör çalışmaları için yeni bir in vivo model meydana getirilmiş olacak ve intestinal tümörlerin tedavi stratejilerinde aday molekül olabilecek Bdnf'in moleküler düzeyde nasıl bir rol oynayabileceğı hakkında bilgiler elde edilecektir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereçler

Tez çalışmasında, Apc heterozigot mutant, Bdnf heterozigot mutant ve yabancı tip C57BL/6 soy fareler kullanıldı (Tablo 4.1.). Fareler gruplar halinde (kafes başına hayvan sayısı: 8-17.), sıcaklık (22–23 °C) ve nem kontrollü odalarda, ad libitum yiyecek ve su bulunan büyük boy bireysel havalandırılmalı fare kafeslerinde (IVC), 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık siklusu ile barındırıldı. Araştırma gruplarındaki fareler günlük olarak kontrol edildi, 36 haftalık yaşa gelinceye kadar vücut ağırlıkları haftada bir kez tartıldı ve sağkalım seyri takip edildi. 36 haftalık takip süreci içinde terminal döneme giren (Şekil 3.1.) ve takip süresi tamamlandığında hayatta kalan fareler anestezi altında kurban edildi ve 36. haftanın sonunda disseksiyonları yapıldı. Tüm deney hayvanı kullanımları, Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu tarafından deneylere uygun olarak onaylanmıştır (Karar no. 2020/05-04).

3.1.1. Apc Mutant Fareler

Apc^{+/-} mutant fareler, H.Ü. Transgenik Hayvan Teknolojileri U.A.M.'de oluşturulmuştur (45). Temel olarak bu fareler, 18. kromozomundaki Apc geninin 16. ekzonunda 8 nükleotid dizisinin CRISPR/Cas9 sistemi yoluyla silinmesi ile kodon 750 düzeyinde çerçeve kayması mutasyonuna sahiptir ve bu Apc'nin prematür kesilme mutasyonuna neden olmaktadır (45).



Şekil 3.1. Deney gruplarından terminal döneme giren Apc^{+/-} dişi fare (Yaş: 157 gün).

3.1.2. Bdnf Mutant Fareler

Bdnf geninde nakavt allel içeren fare modeli 1995 yılında oluşturulmuştur (134). Bu fare modeli, Bdnf lokusunda protein kodlayan bölgeye homolog rekombinasyon yöntemi ile neomisin direnç geni (Neo) eklenerek elde edilmiştir. Yapılan çalışmalarda Bdnf nakavt farelerde Bdnf ifadesinin kaybı görülmüş olup heterozigot farelerde (+/-) ise Bdnf transkriplerinde azalma olduğu gösterilmiştir.

3.1.3. Bdnf Mutant Farelerin Temini

Araştırmamızda kullanılacak Bdnf+/- fareler, Karadeniz Teknik Üniversitesi Cerrahi Uygulama Araştırma Merkezi'nden Prof. Dr. İsmail Abidin'den hediye olarak temin edilmiştir. Prof. Dr. İsmail Abidin'in çalışmalarında; Bdnf nakavt (-/-) farelerin doğumdan sonra en fazla iki haftaya kadar yaşadığı bildirilmiş, Bdnf +/- farelerde ise Bdnf ifadesinin %40-45 civarında azalma gösterdiği ve sağkalımı negatif yönde etkilemediği belirtilmiştir (135–139). Getirilen fareler, Transgenik Hayvan Teknolojileri U.A.M.'deki 1 haftalık adaptasyon süreci tamamlandıktan sonra *wt* C57BL/6 dişi farelerin bulunduğu çiftleştirme kafeslerine alınmışlardır.

3.1.4. Yabani Tip Fareler

Çalışmamızda, genotiplerinde her hangi bir mutasyon görülmeyip *Apc* ve *Bdnf* genlerine bütünüyle sahip olan (*full length*), normal fenotipe sahip C57BL/6J soy fareler kullanılmıştır.

3.2. Yöntemler

Fare Kuyruk Dokusundan Genomik DNA İzolasyonu ve Genotipleme

3.2.1. DNA İzolasyonu

Numaralı kulak küpeleri ile işaretlenen farelerin kuyruk dokusundan tuz ve proteinaz K muamelesi (organik olmayan yöntem) yöntemi ile genomik DNA (Deoksiribonükleik asit)'ları izole edildi. Doğan yavrular 21 günlük yaşa geldiklerinde,

erkek ve dişi ayrımı yapılarak, annelerinden ayrıldı. Her yavru, kulaklarına numaralı küpeler takılarak numaralandırıldı (Şekil 3.2.). Numara verilen her yavrunun kuyruğunun uç kısmı 0,5-1 cm uzunluğunda kesilerek DNA izolasyonu için ayrı bir 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne alındı. Kuyruk dokusu konulan mikrosantrifüj tüplerinin



küpe numarası ile aynı kodlanmasına dikkat edildi.

Şekil 3.2. Farelerin numaralı küpeler ile kodlanması.

DNA izolasyonunda; mikrosantrifüj içerisine alınan tüm dokulara, 600 µl TNES ve 35 µl proteinaz K (10 mg/ml, Roche 100 mg) eklendi ve 2-3 saniye vorteksenerek karıştırıldı, ardından 55°C'deki su banyosunda doku tamamiyle lizis oluncaya dek gece boyu (8-24 saat) inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon bittikten sonra, karışım üzerine 166,7 µl 6M NaCl (37°C) eklendi ve 15 saniye kuvvetlice karıştırıldı. İşlem bittikten sonra rengi krem renge dönüşen örnekler, 12000-14000 x g'de oda ısısında (15-25°C) 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası, süpernatanttan 700 µl alınıp yeni bir 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Üzerine soğuk %100 etil alkol (EtOH) eklendi. DNA çözültiden çökelmeye başlayınca kadar tüpler, 3-5 kez ters düz edilerek nazikçe çalkalandı. Daha sonra DNA, kapalı uçlu kapillar tüp (Kimble 34505, 1.5-1.8 x 90 mm) etrafına sarılarak toplandı. Toplanan DNA, daha önce yeni 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne eklenmiş 300 µl %70 etil alkole daldırılıp çıkarıldı ve son olarak, kapillar tüpe sarılı DNA, EtOH'ü mümkün olduğunca uzaklaştırdıktan sonra, kapağı açık olan 1,5 ml'lik yeni bir tüpe yerleştirildi ve yaklaşık 10 dakika DNA yumağının kuruması beklendi. Bekleme sonrası, DNA sarılı kapillar tüplerin üzerine 300 µl LoTE eklendi ve iyice

kariştirilerek DNA'nın kapillar tüpten ayrılması sağlandı ve kapillar tüpler çıkarıldı. LoTE solüsyonu içerisindeki DNA, 55-65°C'de 10 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası, polimeraz zincir reaksiyonu için karışımın 1 µl'si kullanıldı ve geriye kalan DNA süspansiyonu -20°C'ye kaldırıldı.

3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Yöntemi ile Genotipleme

Apc ve Bdnf heterozigot mutant farelerin genotiplemesi için *DreamTaq* DNA *Polymerase* (Thermo Fisher, EP0705) kullanılarak yapılan PZR amplifikasyonları, taze dokudan izole edilmiş DNA'lar ve tasarlanmış spesifik primerler (HÜ Transgenik Hayvan Teknolojileri U.A.M.) kullanılarak ve reaksiyonlar toplam 25 µl olacak şekilde yapıldı. Amplifikasyonlar, 200 µl'lik tüplerde (Katalog No: A30588, Thermo Fisher) *Long Gene, My Gene L Series Peltier Thermal Cycler* PZR cihazı kullanılarak gerçekleştirildi.

Apc heterozigot mutant farelerin genotiplemesi için kullanılan primerler: Apc+/+ (yabanıl allel) forward: 5'-CAGCAGCTTTAAGGAATCTCA-3', Apc+/+, Apc+/- reverse: 5'- TCTGACCTACTATCATCATGTCG-3' ve Apc+/- (mutant allel) forward: 5'-GTCTGCCATCCCAGGAAA- 3'. Bdnf heterozigot mutant farelerin genotiplemesi için kullanılan primerler: Bdnf+/+ (yabanıl allel) forward: 5'- GGTTCGAGAGGTCTGACGAC-3', Bdnf+/- (mutant allel) forward: 5'-GTGATATTGCTGAAGAGCTTGG - 3' ve Bdnf+/-, Bdnf+/- reverse: 5'-GGTCAGTGACATACACAGGAAG-3'. PZR amplifikasyonu sonucunda, Apc yabanıl allel 268 bç, mutant allel ise 185 bç ürün verirken, Bdnf yabanıl allel 579 bç, mutant allel ise 480-500 bç ürün vermektedir (Tablo 3.1.). Böylelikle, mutant fareler Apc+/-, Bdnf+/- ve her iki mutasyona sahip fareler Apc+/- Bdnf+/- olarak belirlendi ve mutant olmayan farelerden ayrıldı.

100nM olarak alınan primerler, 20 µl ana stok primerden alınıp 180 µl otoklavlanmış ve 0,22 µm'lik filtreden geçirilmiş distile su içerisinde resüspanse edilerek 10mM stok solüsyonlar 200 µl volümde hazırlandı ve kullanım sonrası -20°C'ye kaldırıldı. DNA'nın çoğaltılması amacıyla, PZR'u bileşenleri ve PZR koşulları aşağıda belirtilen şekilde hazırlandı (Tablo 3.2., 3.3.). Önceki deneylerde pozitif

olduğu bilinen Apc ve Bdnf mutant genine sahip DNA'lar pozitif kontrol olarak kullanıldı. DNA örneğinin eklenmediği, sadece LoTE konulan reaksiyonlar negatif kontrol olarak değerlendirildi.

Tablo 3.1. Deney gruplarındaki farelerin genotiplendirilmesi için kullanılan primerler.

Multipleks PZR Primer Dizileri			
(5'→3')			
Genotip	Forward	Reverse	Ürün Boyutu
Apc+/+	CAGCAGCTTTAAGGAATCTCA	TCTGACCTACTATCATCATGTCG	268 bç
Apc+/-	GTCTGCCATCCAGGAAA	TCTGACCTACTATCATCATGTCG	185 bç
Bdnf+/+	GGTTCGAGAGGTCTGACGAC	GGTCAGTGACATACACAGGAAG	579 bç
Bdnf+/-	GTGATATTGCTGAAGAGCTTGG	GGTCAGTGACATACACAGGAAG	480-500 bç

Apc mutant geni için kurulan PZR ürünleri, %1'lik agaroz jel elektroforezinde; Bdnf mutant geni için kurulan PZR ürünleri, %1,5'luk agaroz jel elektroforezinde değerlendirildi ve bantlar UV ışığı altında görüntülendi. Mutant gene sahip pozitif olduğu belirlenen hayvanlar PZR sonucuna göre tespit edildi ve araştırma grupları bu sonuçlara göre oluşturuldu.

Tablo 3.2. Apc Mutant Fare Genotiplendirilmesinde Kullanılan PZR Bileşenleri ve PZR Koşulları.

PZR Bileşenleri:		PZR Cihazı Program Koşulları:	
Apc Mutant Fareler	1X (ul)	Apc Mutant Fare	
ddH2O	17,25 ul		95°C 2 dakika
10 X Dream PCR buffer	2,5 ul		
Apc_G_F_Yeni 1	0,5 ul		95°C 30 saniye
Apc_G_R	1 ul		
Fmut_2	2 ul	35x	59°C 30 saniye
10 mM dNTP	0,5 ul		72°C 30 saniye
Dream Taq Poly.	0,25 ul		
Toplam hacim	24 ul		72°C 5 dakika
Template DNA	1 ul		
En son hacim	25 ul		4°C ∞

Tablo 3.3. Bdnf Mutant Fare Genotiplendirilmesinde Kullanılan PZR Bileşenleri ve PZR Koşulları.

PZR Bileşenleri:		PZR Cihazı Program Koşulları:	
Bdnf Mutant Fareler		Bdnf Mutant Fare	
	1X (ul)		
ddH ₂ O	17,25 ul		95°C 2min
10 X Dream PCR buffer	2,5 ul		
Bdnf-F2	0,5 ul		95°C 30 sec.
Bdnf-Neo-R1	1 ul	40x	62°C 30 sec.
Bdnf-Neo-F1	2 ul		
10 mM dNTP	0,5 ul		72°C 30 sec.
Dream Taq Poly.	0,25 ul		
Toplam hacim	24 ul		72°C 5 min.
Template DNA	1 ul		
En son hacim	25 ul		4°C ∞

3.2.3. Agaroz Jelin Hazırlanması

Agaroz (Biomax, 100 g) ve 1xTAE Tamponu (Tris-asetat-EDTA) jel elektroforezinin yapılacağı tankın boyutuna göre karıştırıldı (%1'lik agaroz jel için: 0.8 g agaroz + 80ml 1xTAE tamponu; %1,5'luk agaroz jel için: 1,2 g agaroz + 80ml 1xTAE tamponu). Karışım mikrodalga fırında kaynatılarak agarozun erimesi sağlandı. 2-3 dakikalık kaynatma sonucunda şeffaf bir görüntü elde edildi ve hava kabarcıklarının gitmesi için oda ısısında kısa bir süre bekletildi. Daha sonra bu karışıma 4 µl etidyum bromür eklenip karıştırıldıktan sonra, tarak yerleştirilmiş olan elektroforez tankına döküldü ve jel, en az 20 dakika, polimerizasyona bırakıldı. DNA örnekleri 6x yükleme boyası ile karıştırıldıktan sonra, ilk kuyucuk boş bırakılarak, jel kuyucuklarına yüklendi, ardından ilk kuyucuğa 1 Kb Plus DNA *Ladder* (Thermo Fisher, 10787026) yüklendi. Örnekler, Apc mutant geni için kurulan PZR'da, %1'lik agaroz jelde 100V'da 1 saat; Bdnf mutant geni için kurulan PZR'da, %1,5'luk agaroz jelde 120V'da 70 dakika DNA fragmanları ayrılana dek yürütüldü.

50X TAE Tamponu: Toplam 1 L'lik hacim için bileşenler:

242 g Tris Base

57,1 ml Glacial Acetic Acid

100 ml 0,5M EDTA pH 8.0

Hacim 1 L'ye tamamlanincaya kadar distile su

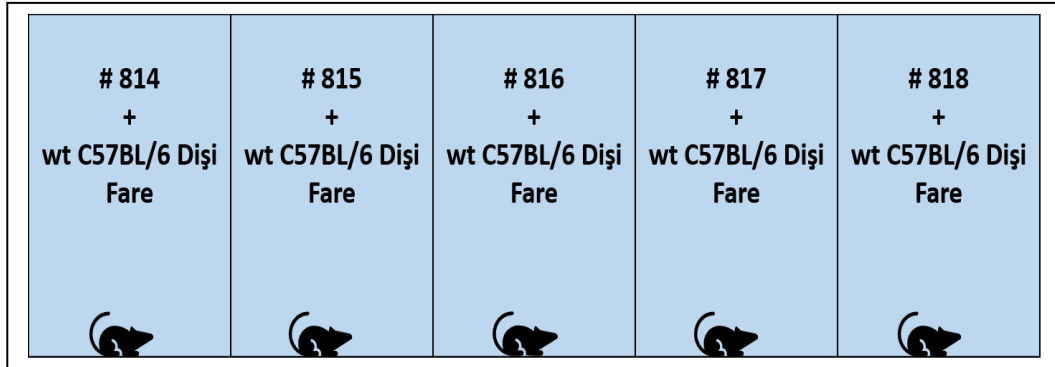
Kontrol ve Deney Gruplarının Oluşturulması

3.2.4. Apc Mutant Fare Kolonisinin Genişletilmesi

Araştırma gruplarını oluşturmak için, Bdnf +/- damızlık erkek farelerle çiftleştirilecek dişi Apc +/- farelerin kolonisi genişletildi. F7 jenerasyonundaki Apc +/- C57BL/6 fareler çoğaltılarak F8 jenerasyonuna ulaştırıldı. F8 jenerasyonu olan yavru fareler 3-4 haftalık yaşa ulaştığında genotiplenmeleri yapıldı ve çiftleştirme kafeslerine yerleştirilecek Apc +/- dişi fareler tespit edildi.

3.2.5. Bdnf Mutant Fare Kolonisinin Genişletilmesi

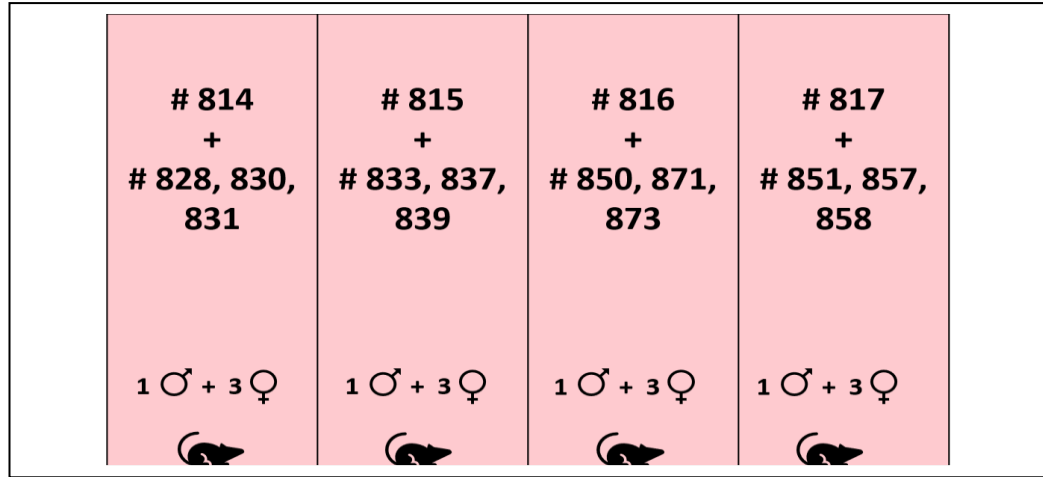
Bdnf +/- erkek fareler için Şekil 3.3.'te gösterilen plana göre çiftleştirme kafesleri oluşturuldu ve yabancı tip (wt) dişi C57BL/6 farelerle çiftleştirilerek koloni genişletildi.



Şekil 3.3. Bdnf +/- Erkek Farelerin wt C57BL/6 Dişi Fareler ile Çiftleştirilmesi.

3.2.6. Apc +/- Bdnf +/- Fare Kolonisinin Oluşturulması

Bdnf +/- erkek fareler (#814, 815, 816 ve 817) ile F8 jenerasyonu Apc +/- dişi farelerin için Şekil 3.4.'te gösterilen şekilde çiftleştirme kafesleri oluşturuldu. İlerleyen zamanlarda, Apc +/- dişi farelerin polip yüklerinin artması ve hastalık belirtileri göstermeleri sebebiyle, çiftleştirme kafesleri Bdnf +/- dişi fareler ve Apc +/- erkek fareler olacak şekilde yenilendi.



Şekil 3.4. Bdnf+/- Erkek Fareler ile Apc+/- C57BL/6 Dişi Farelerin Çiftleştirme Grupları.

3.2.7. Kontrol ve Deney Gruplarının Oluşturulması

Çaprazlamalar sonucu doğan ilk 34 yavruda Apc ve Bdnf heterozigot mutasyonlarından her ikisine de sahip yavrulara rastlanmadı. Sonraki doğan ilk grupta Apc ve Bdnf heterozigot mutasyonlarının her ikisine de sahip ilk yavrular elde edilmeye başlandı ve bu yavrular dahil olmak üzere devamında doğan tüm dişi ve erkek yavrular (toplam 98 yavru) ile araştırma grupları oluşturuldu. Genotipleme sonucunda; Apc+/-, Bdnf+/-, Apc+/-Bdnf+/- ve yabanıl tip (*wt*) fareler elde edildi ve bu farklı genotiplerden 4 ayrı deney grubu oluşturuldu. Apc+/-Bdnf+/- fareler, yazının devamında Apc/Bdnf çift mutant fareler olarak da ifade edilecektir.

3.2.8. Transgenik Fare Üretimi ve İdamesi için Standardize Yem Hazırlanması

Transgenik ve mutant fare soyları biyolojik yollarda rol alan bazı proteinleri farklı seviyelerde bulundurmalarıyla diğer fare soylarından ayrılırlar. Hatta bazı transgenik ve mutant soyların protein değerlendirme kapasitelerinin düşük olduğu bilinmektedir. Bu nedenle biyolojik yollarda işlev gören proteinlerin yapısında bulunan kritik amino asitlerin dengeli ve düzenli olarak bu hayvanlara diyet yoluyla sunulması önem taşımaktadır. Bunun yanında fizyolojik dönem (büyüme, gebelik,

laktasyon veya yaşama payı) günlük besin madde ihtiyaçları, tüm memeli canlılarda olduğu gibi farelerde de farklılık gösterir.

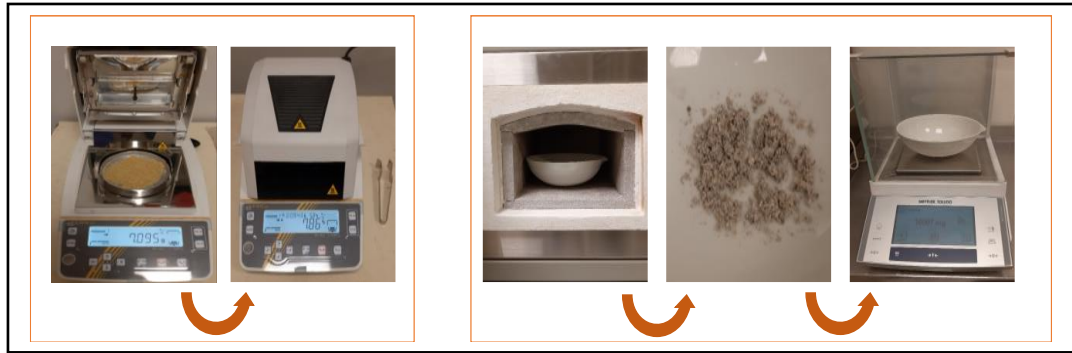
Çalışmamızda, deney ve kontrol gruplarındaki fareler fizyolojik dönemlerine uygun besin içeren iki farklı diyetle beslendi. Üretimde kullanılacak farelere ve bu farelerin büyüme dönemindeki yavrularına %24 ham protein, %9 ham yağ ve %47,4 azotsuz ekstrakt içeren “Transgenik Fare Üretim Diyeti (TFÜD)” uygulandı. Tümör gelişimi süresince takip edilen farelere ve kontrol gruplarına %20 ham protein, %9 ham yağ ve %51,3 azotsuz ekstrakt içeren “Transgenik Fare Bakım Diyeti (TFBD)” uygulandı ve tüm deney grupları çalışmanın sonlandırılacağı 36 haftalık yaşa (252 gün) gelene kadar bu diyetle tutuldu. Diyetlerin besin içerikleri Resmi Tarım Kimyagerleri Derneği'ne (*AOAC International*) göre analiz edildi (140).



Şekil 3.5. Transgenik fare diyetlerinin hazırlanması. Diyet hazırlama aşamaları: 1. Diyetlerin dengeli aminoasit profili ve yeterli protein değerini sağlayacak şekilde formüle edilmesi. 2. Sistemantik ve yeterli homojenizasyon. 3. Peletleme. 4. Kurutma ve Paketleme.

Diyet içeriği analizlerinde; nem ve ham kül analizleri H.Ü. Transgenik Hayvan Teknolojileri U.A.M.'de gerçekleştirildi. Ham protein, ham yağ, ham selüloz analizleri ise A. Ü. Veteriner Fakültesinde yaptırıldı. N' suz öz madde değeri ise hesaplanarak

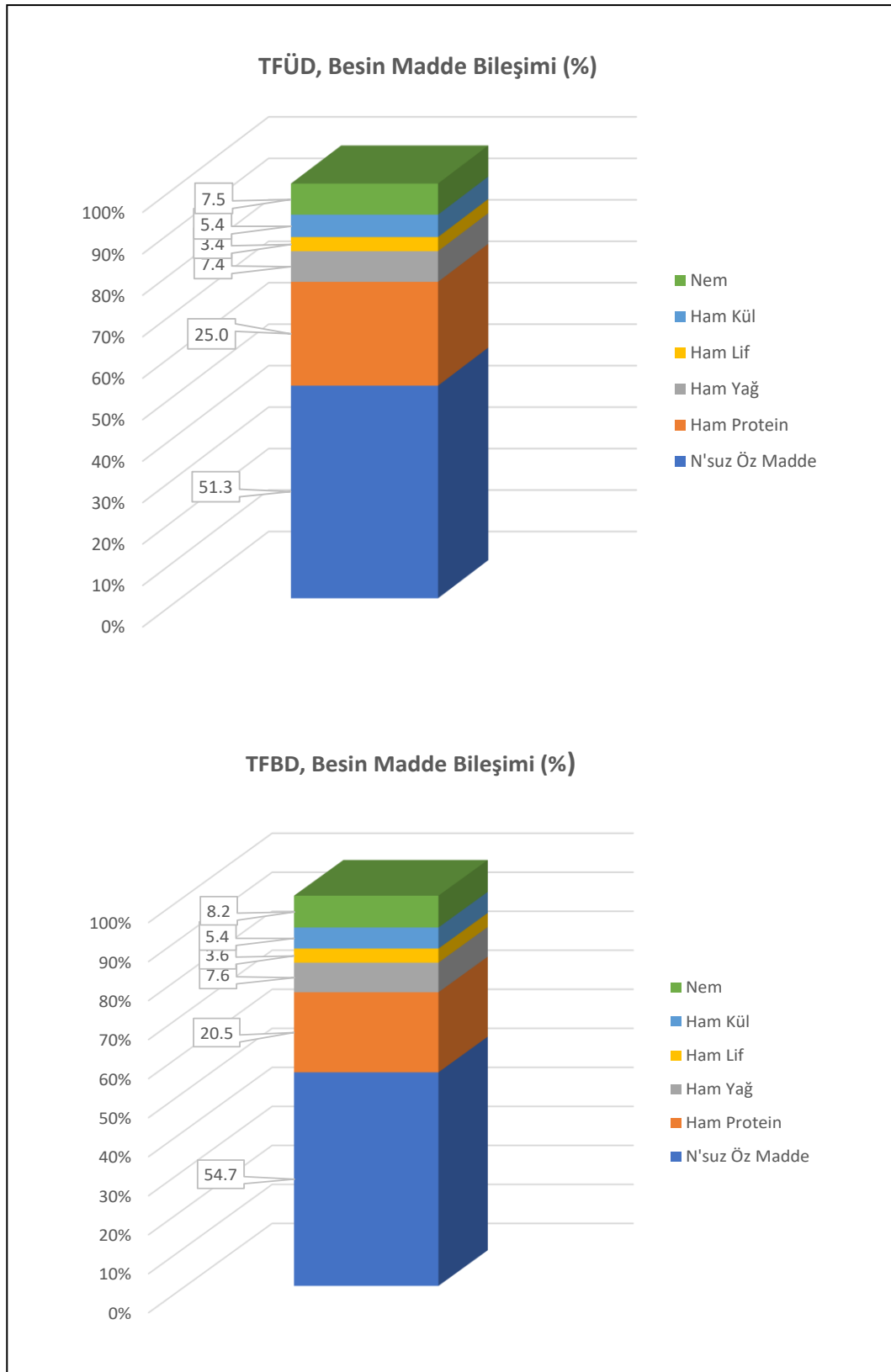
bulundu. Diyetlerdeki toplam enerji; transgenik fare üretim diyetinde, enerjinin %24'ü yağdan, %48'i karbonhidratlardan, %28'i proteinden; transgenik fare bakım diyetinde ise enerjinin %24'ü yağdan, %53'ü karbonhidratlardan, %23'ü proteinden elde edilecek şekilde tasarlanmıştır. *Atwater* sistemine göre her iki diyette de metabolik enerji 3670 kcal/kg olarak hesaplanmıştır (141) (Şekil 3.5., 3.6., 3.7.; Tablo 3.4.).



Şekil 3.6. Diyetlerin nem ve ham kül analizleri için işlemler.

Tablo 3.4. Diyetlerin nem ve ham kül analizleri.

H.Ü. Transgenik Hayvan Teknolojileri U.A.M.'de Gerçekleştirilen Analizler						
	Transgenik Fare Üretim Diyeti			Transgenik Fare Bakım Diyeti		
	<u>1. Analiz</u>	<u>2. Analiz</u>	<u>Ortalama</u>	<u>1. Analiz</u>	<u>2. Analiz</u>	<u>Ortalama</u>
Nem Analizi	7,32%	7,64%	<u>7,48%</u>	7,92%	8,40%	<u>8,16%</u>
Ham Kül Analizi	5,46%	5,43%	<u>5,45%</u>	5,44%	5,35%	<u>5,40%</u>



Şekil 3.7. Transgenik Fare Diyetleri Besin Madde Bileşimleri.

Farelerin Kurban Edilmesi, Taze Doku Örneklerinin Toplanması ve Polip Sayımı

3.2.9. Diseksiyonlar ve Taze Doku Örneklerinin Toplanması

Takip süreci içerisinde terminal döneme girmiş ve takip süresini tamamlamış fareler, 36. haftada anestezi altında servikal dislokasyon ile kurban edildi ve örnek kayıt formuna (Şekil 3.8) cinsiyet, grup numarası, fare kulak numarası, doğum tarihi, kurban edildiği günün tarihi vd. bilgiler ile kaydedildi. Daha sonra diseksiyon yapılarak, gastrointestinal sistem organları (mide, karaciğer, ince bağırsak, kolon), dalak, akciğer, kalp, böbrekler ve beyin çıkarıldı. Gastrointestinal sistem (GİS), özofagustan anüse kadar çıkarılıp +4°C'de 1X PBS içerisinde konuldu ve temizlendi. Petri kabı üzerinde tüm gastrointestinal traktüs longitudinal olarak açıldı ve 1X PBS ile yıkandı. Daha sonra bağırsak polip ve mukoza taze doku örnekleri toplandı ve protein ve RNA analizleri için -80°C'de dondurularak saklandı. GİS dışında geriye kalan dokular, 25-35 ml %10 tamponlu formalin (Katalog No: TK.060161.05001, Tekkim) içerisinde fikse edildi. GİS; ince bağırsak ve kolonun kıvrımlı halinin açılması için, tabanında parafin zemin bulunan kaplarda iğneler ile gerdirilerek 50-60 ml %10 tamponlu formalin içerisinde en az 24 saat boyunca fikse edildi (Şekil 3.9.).

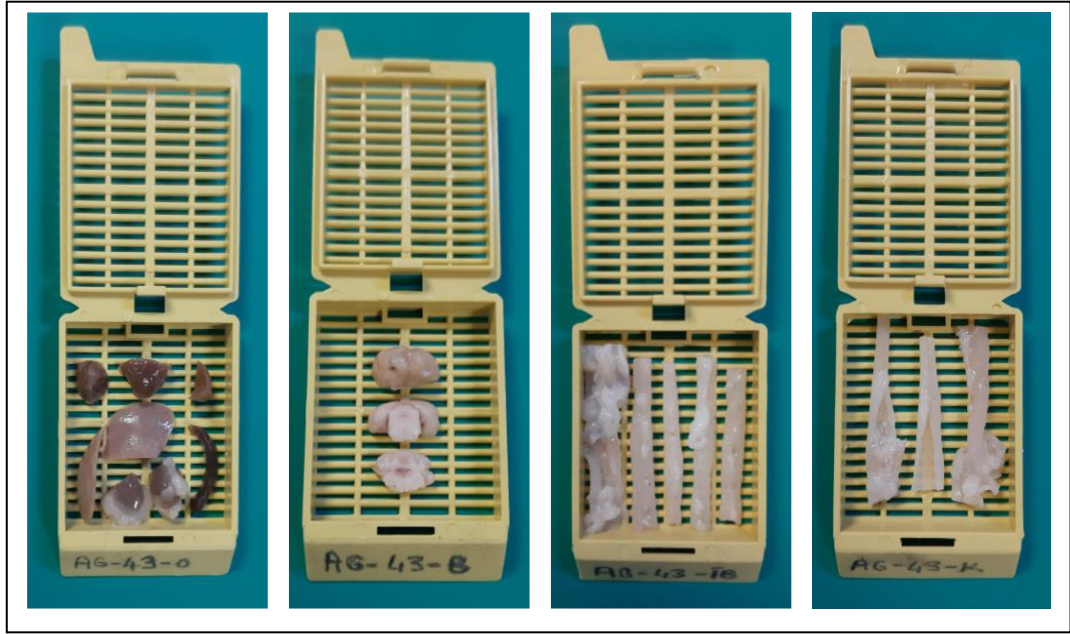
Şekil 3.8. Makroskopik inceleme için Örnek Kayıt Formu.



Şekil 3.9. Diseksiyon ve taze doku toplama alanı.

3.2.10. İntestinal ve Kolonik Poliplerin Sayımı ve Dokuların Makroskopik İncelenmesi

Dokuların fiksasyona bırakılmasından bir gün sonra, fiksasyonu gerçekleştiren örneklerin makroskopik fotoğrafları çekildi ve kaydedildi. Daha sonra bu örnekler stereo mikroskop altında incelendi. Bağırsak ve kolon poliplerinin sayısını kesin olarak belirlemek için mikroskop (ZEISS marka Stemi 305 Model Stereo mikroskop) altında 10X büyütmede intestinal ve kolonik tümörlerinin lokalizasyonu ve sayısı kaydedildi (142). Kayıt sistemi tamamlandıktan sonra histomorfolojik inceleme için örnekler alındı ve bu örneklerden formalinle sabitlenmiş parafine gömülü (FFPE) bloklar hazırlandı (Şekil 3.10.). Bu parafin bloklardan H&E ile boyanmış lamalar elde edildi. Aynı zamanda, kurban edilen farelerin gastrointestinal sistem dışındaki organları da morfolojik olarak incelendi.



Şekil 3.10. FFPE blokların hazırlanması öncesi oluşturulan kaset örnekleri.

3.2.11. İmmünohistokimyasal Analiz

FFPE intestinal tümör blokları hazırlandı ve bu bloklardan hazırlanan 4µm kalınlığındaki boyasız kesitler 60°C'de gece boyunca deparafinize edildi. Daha sonra 20 dakika ksilenden ve kademeli olarak 10'ar dakika alkol (%96, 90, 70) solüsyonlarından geçirilen kesitlere rehidrasyon yapıldı. Heat induced epitope retrieval (HIER) yöntemiyle sitrat kullanılarak mikrodalga fırında 10 dakika antijen geri çağırma işlemi gerçekleştirildi ve sonrasında yıkamanın ardından hidrojen peroksit ile endojen peroksidaz aktivitesi 20 dakika boyunca bloke edildi. Bu işlemler sonrası distile su ve 1X PBS ile yıkama yapıldı ve sonrasında kesitler, 5 dakika boyunca keçi serumu ile blokladı. Devamında, serum alındıktan sonra, örnekler kurumadan ve yıkama yapılmaksızın primer antikor (1:500 dilüsyon BDNF antikor (FNab00859, FineTest, Wuhan Fine Biotech Co., Ltd.) ve 1:200 dilüsyon Beta-katenin antikor (D13A1, Rabbit mAb, #8814, Cell Signaling Technology)) eklenerek 1 saat inkübasyona bırakıldı. Sonrasında yıkanan örnekler sekonder antikorda (Biotinylated Goat Anti-Rabbit IgG (H+L); ab64256) yarım saat bekletildi. Daha sonra yıkama yapıp streptavidin biotin peroksidaz (Streptavidin HRP, ab64269, Abcam, UK) uygulaması yapıldı. Tekrar yıkama yapıldıktan sonra, son aşamada DAB (3,3'-

Diaminobenzidine) kullanılarak ışık mikroskopunda reaksiyon süresi değerlendirilerek kromojen eklendi. 10 dakika DAB uygulaması sonrası örnekler distile su içerisine alınıp reaksiyon durduruldu. Ardından, 5-10 saniye hematoksilin uygulandı ve hemen sonrasında slaytlar akan ılık musluk suyu altında 10 dk yıkandı ve sonrasında dehidrasyon için dereceli alkolden (%70, 90, 96) geçirilip ksilen solüsyonunda 20 dakika bekletildi ve sonrasında balsam ile kapatılarak mikroskopik olarak değerlendirme yapıldı.

3.2.12. BrdU İşaretlemesi

İmmünohistokimyasal olarak farelerin gastrointestinal sisteminde bulunan tümör dokularındaki proliferasyon, BrdU (5-Bromo-2'-Deoxyuridin) işaretlemesi ile incelenmiştir. İlk olarak, test edilecek fareler tartıldı ve vücut ağırlıklarına göre uygun dozda (100 mg/kg) BrdU (Katalog numarası: B23151, Invitrogen, *Thermo Fisher Scientific*) intraperitoneal olarak enjekte edildi. Enjeksiyondan 1 saat sonra diseksiyon yapıldı ve ardından mukoza ve polip örneklerinden kesitler hazırlandı. FFPE kesitler, anti-BrdU antikoru (1:500 dilüsyon; BrdU *Polyclonal Antibody*, Katalog # PA5-32256, Invitrogen, *Thermo Fisher Scientific*) ile yukarıda açıklanan şekilde immünohistokimya yoluyla BrdU işaretlemesi için boyandı.

3.2.13. İntestinal Tümörlerden ve Neoplastik Olmayan Mukozadan Protein İzolasyonu ve Western Blot Yöntemi ile İncelenmesi

Diseksiyon sonrası toplanıp -80°C'ye kaldırılan örnekler, proteaz inhibitör kokteyli (*cOmplete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail, Sigma-Aldrich*) eklenmiş *radioimmunoprecipitation assay* (RIPA) solüsyonunda homojenize edilerek total protein izolasyonu yapıldı. Elde edilen proteinlerde, bikinkoninik asit (BCA, Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific, 23225) yöntemi ile protein saflaştırması yapıldı ve protein konsantrasyonları belirlendi.

Western Blot analizi için Mini-PROTEAN Tetra Cell sistemi (Bio-rad) kullanıldı. Protein örnekleri, aynı miktarda protein (0,5-1ug/ul) içerecek şekilde RIPA solüsyonu ile dilüe edildi, β-merkaptoetanol ile kaynatılarak denatüre edildi ve her bir

kuyucukta 30 ug protein olacak şekilde sodyum dodesil sülfat (SDS)-poliakrilamid jele (%10-12) yüklendi. Proteinler elektroforez ile moleküler ağırlıklarına göre ayrıldı. Jel elektroforezi sonrasında, ayrılmış proteinler, immün blotlama ile PVDF (*polyvinylidene difluoride*) membrana aktarıldı. Proteinlerin transfer olduğu membran, bloklama tamponu (%5 BSA'lı (w/v) TBST (*tris-buffered saline and tween 20*)) içinde 1 saat oda sıcaklığında ve çalkalayıcıda blokladı. Bu işlem sonrasında, membran üzerindeki bloklama tamponu dökülüp yıkama yapmadan primer antikor (Anti-Bdnf (1:1000, FNab00859, FineTest), Anti-Beta katenin(1:200, #8814, Cell Signaling Technology) eklendi ve çalkalayıcı üzerinde +4°C'de 12-16 saat bekletildi. Bekleme sonrası, membran TBST ile çalkalayıcıda yıkandı. Yıkama sonrası membran, 1:10000 dilüe edilmiş sekonder antikor (Sigma-Aldrich) ile oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde 1 saat muamele edildi. Sonrasında, TBST ile yıkama yapıp, membran çalışma çözeltisi içerisinde görüntüleme yapıldı. β -aktin (Sigma-Aldrich), protein yüklemesinin pozitif kontrolü olarak uygulandı.

3.2.14. İntestinal Tümörlerden ve Neoplastik Olmayan Mukozadan RNA İzolasyonu ve Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu

A) RNA İzolasyonu

Taze olarak toplanarak RNALater (AM7020, İnvitrogen) solüsyonuna alınmış fare sağlıklı mukoza ve tümörlerine ait örneklerden Trizol (Cat. No: 15596-018, Invitrogen) yöntemi kullanılarak total RNA izolasyonu yapıldı. RNALater içindeki doku homojenizatöre alınarak 1000 ul Trizol eklendi. Burada homojenize edilen doku lizati 1,5 ml'lik steril eppendorf tüpe aktarıldı. Örnek bu aşamada 5 dk. oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Sonrasında üzerine 0,2 ml kloroform eklenerek 15 sn kuvvetlice karıştırıldı ve sonrasında oda sıcaklığında 2-3 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası, 12,000 g'de 15 dk 4 °C'de santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası oluşan üç fazdan en üstteki şeffaf kısım kontaminasyon olmaksızın yeni bir steril eppendorf tüpe aktarıldı. RNA'yı çöktürmek amacıyla 0,5 ml izopropanol eklenerek tüp aşağı yukarı çevrilip homojenlik sağlandıktan sonra 10 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.

Sonrasında 12,000 g'de 10 dk 4°C'de santrifüj edilip süpernatant atıldı. Elde edilen pelet, yıkama amacıyla üzerine %75'lik EtOH'den 1 ml eklenerek vortekslenildi. Bu aşamadan sonra 7,500 g'de 5 dk. 4 °C'de santrifüjlenerek süpernatant atılıp pelet oda sıcaklığında 5-10 dk. bekletilerek alkolün uzaklaştırılması sağlandı. Bekleme sonrasında, pelet üzerine 100-200 µl RNase içermeyen su eklendi ve 10 dk 55-60 °C'de inkübe edildi. Ardından, RNA örneklerinin saflık ve miktar tayini ölçümleri Nano-Drop ND-2000 ile yapıldı. Tek kullanımlık olarak hazırlanan RNA örnekleri -80°C'ye kaldırıldı.

B) cDNA Sentezi

İzole edilen total RNA'dan High Capacity cDNA Reverse Transcription Kiti (REF: 4368814, Thermo Scientific) kullanılarak ve kit protokolü takip edilerek komplementer DNA (cDNA) sentezi yapıldı. Reaksiyon bileşenleri ve termal döngü cihazı (LongGene, MyGene L Series Peltier Thermal Cycler) koşulları Tablo 3.5'te belirtilen şekilde hazırlandı.

Tablo 3.5. cDNA sentezi reaksiyon bileşenleri ve termal döngü cihazı program koşulları.

cDNA Sentezi Reaksiyon Bileşenleri:		Termal Döngü Cihazı Program Koşulları	
<u>cDNA Sentezi</u>		<u>Program Koşulları:</u>	
<u>2X Ana Karışım</u>	<u>1X (ul)</u>	<u>Reaksiyon Sıcaklığı:</u>	<u>Zaman:</u>
<i>10X RT Buffer</i>	2	25°C	10 dakika
<i>25X dNTP Mix (100 mM)</i>	0.8	37°C	120 dakika
<i>10X RT Random Primers</i>	2	85°C	5 dakika
<i>MultiScribe™ Reverse Transcriptase</i>	1	4°C ∞	Bekletme
<i>RNase Inhibitor</i>	0		
Nükleaz içermeyen H ₂ O	4.2		
Reaksiyon başına toplam hacim:	10		
cDNA:	10		
En son hacim:	20		

C) Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Komplementer DNA sentezi yapıldıktan sonra, gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonun hazırlanacağı yüzey RNase AWAY (83931-250ML, Sigma) ile temizlendi. Luminaris Color HiGreen Low ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific, LSG-K0373) kiti kullanılarak, Bdnf+/-, Apc+/- ve Apc+/-Bdnf+/- fare intestinal mukoza ve intestinal tümör dokularından elde edilen ve 1:20 oranında dilüe edilmiş cDNA örnekleri kullanılarak BDNF, Trk B, beta katenin ve Lgr5'e ait RNA'ların rölatif miktarı belirlendi. Reaksiyon bileşenleri ve termal döngü cihazı koşulları Tablo 3.6'da gösterilen şekilde hazırlandı. Hazırlanan reaksiyonlar, Stratagene Mx3005P cihazında analiz edildi. Her bir reaksiyon üç defa tekrarlandı.

Negatif kontrol olarak cDNA yerine nükleaz içermeyen distile su konularak amplifikasyonun doğruluğu tespit edildi. Pozitif kontrol olarak yabancı tip fare dokularından elde edilen cDNA'ler kullanıldı. Hedef genlere ait mRNA'ların normalizasyonu için beta aktin primerleri kullanıldı.

Tablo 3.6. Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu bileşenleri ve termal döngü cihazı program koşulları.

Reaksiyon Bileşenleri:		Stratagene Mx3005P Cihazı Program Koşulları:	
<u>Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu</u>		<u>Program Koşulları</u>	
<u>Ana Karışım</u>	<u>1X (ul)</u>	<u>Tekrar Sayısı</u>	<u>Reaksiyon sıcaklığı ve zaman</u>
<i>Master Mix</i>	10	1x	50°C 2 dakika
dH ₂ O (DNaz/RNaz içermeyen)	3	1x	95°C 10 dakika
İleri Primer	1	40x	95°C 15 saniye
Geri Primer	1		60°C 30 saniye
cDNA /tüp	5		72°C 30 saniye
		1x	95°C 15 saniye
		1x	60°C 30 saniye
		1x	95°C 30 saniye
			4°C ∞

3.2.15. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel incelemeler için *IBM SPSS Statistics 23.0*, *GraphPad Prism 9.5.1* *Windows* versiyonu ve *ImageJ* (Fiji) yazılımları kullanılmıştır. *Apc*^{+/-} fareler ve *Apc*^{+/-} *Bdnf*^{+/-} çift mutant farelerin ince bağırsak ve kolonlarındaki polip sayıları arasındaki ilişki ile aynı iki grubun dalaklarındaki megakaryosit sayıları arasındaki ilişki Mann-Whitney U testi kullanılarak analiz edildi. *Apc* heterozigot mutasyonu ile *Bdnf* heterozigot mutasyonu ile hayatta kalma arasındaki ilişki, Kaplan-Meier analizi kullanılarak çizilen hayatta kalma eğrileri ile analiz edildi. Grupların sağkalım eğrileri arasında fark olup olmadığını değerlendirmek için log-rank testi kullanıldı. İntestinal mukoza ve intestinal tümör dokularında *Bdnf*, *Trk B*, beta katenin ve *Lgr 5* gen ifadelerinin tüm gruplar arasındaki ekspresyon farkları Kruskal-Wallis testi ile incelendi. Sonuçlar ortalama \pm SD olarak ifade edildi. 0.05 veya daha düşük bir p değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

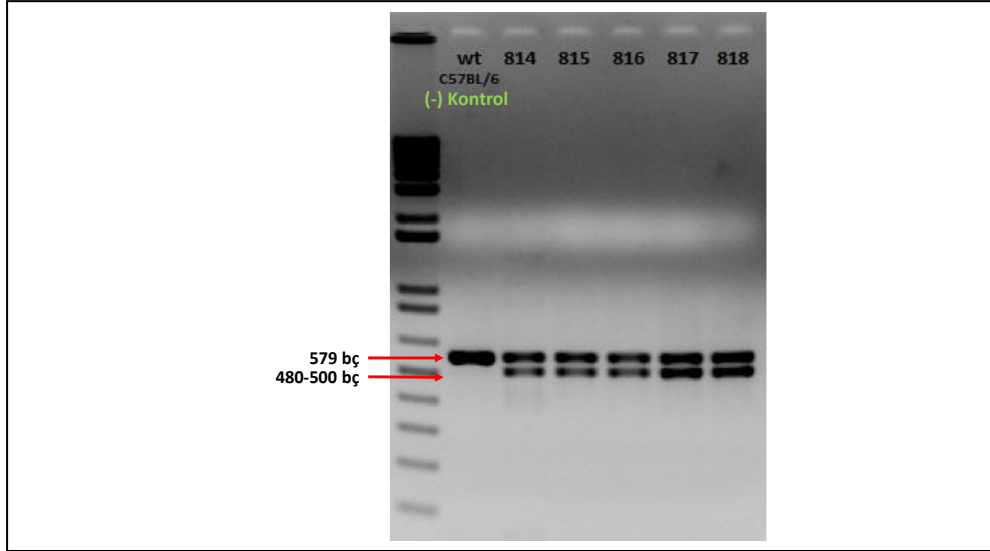
4. BULGULAR

4.1. Bdnf +/- Farelerin Genotiplenmesi ve Koloninin Genişletilmesi

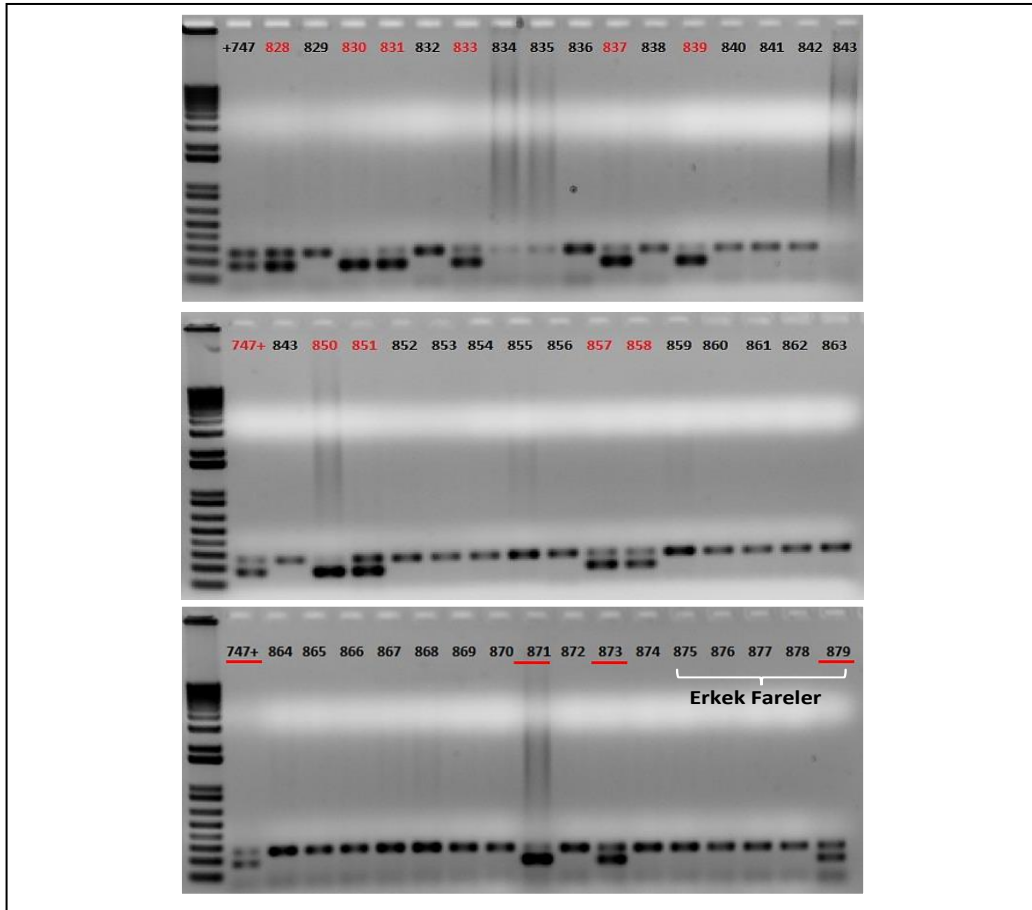
Bdnf+/- damızlık erkek fareler Karadeniz Teknik Üniversitesi Cerrahi Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edildi. H.Ü. Transgenik Hayvan Teknolojileri UAM'deki IVC fare kafeslerinde tutulan farelere kulak küpeleri ile numaralar (814- 818) verildikten sonra genotipleme ile doğrulamanın yapılabilmesi için kuyruk dokularından genomik DNA izolasyonu yapıldı. PZR deneyi optimize edilerek Şekil 4.1.'de gösterilen genotipleme sonuçları elde edildi ve mutasyon durumlarının doğrulanması yapılmış oldu. Genotipleme doğrulanması yapılan Bdnf+/- damızlık erkek fareler adaptasyon sürelerini tamamladıktan sonra tek olarak ayrı kafeslere alındıktan sonra damızlık performanslarının teyidi için yanlarına yabancı tip (wt) C57BL/6 dişi fareler eklendi. Dişi fareler, Bdnf +/- erkek farelerin yanına 14 gün bırakıldı. 14. gün sonunda #814, 815, 816 ve 817 ile çiftleşen dişi farelerin gebe olduğu tespit edildi ve ayrılarak, bir kafeste iki fare olacak şekilde, doğum kafeslerine yerleştirildi. İlerleyen süreçte, #818 numaralı farenin yanına bırakılan dişinin de gebe olduğu tespit edildi ve gebe fare aynı şekilde ayrı kafese alındı. Tüm kafeslerde yavru olması sonucunda, 5 erkek farenin de araştırma gruplarının oluşturulması için gereken çaprazlama deneyleri için uygun olduğuna karar verildi.

4.2. Dişi Apc +/- Farelerin Elde Edilmesi için Koloninin Çoğaltılması

Apc mutant farelerin Bdnf mutant fareler ile çaprazlanabilmesi için koloni genişletildi. İlk olarak, F7 jenerasyonu Apc+/- C57BL/6 fareler çoğaltılarak F8 Apc+/- C57BL/6 fare jenerasyonuna ulaşıldı. Apc+/- C57BL/6 F8 jenerasyonu yavru fareler 21 günlük yaşa ulaştığında genotiplenmeleri yapılarak Apc+/- dişi fareler tespit edildi. Şekil 4.2.'deki PZR'nundan elde edilen ürünlerin jel görüntüsünde yer alan veriye göre üretim kafesleri için toplamda 12 adet Apc mutant dişi fare belirlendi.



Şekil 4.1. Bdnf +/- Damızlık Erkek Farelerin (#814, 815, 816, 817, 818) Genotiplendirilmesi: PCR ürünlerinin Agaroz Jeldeki Görüntüsü.



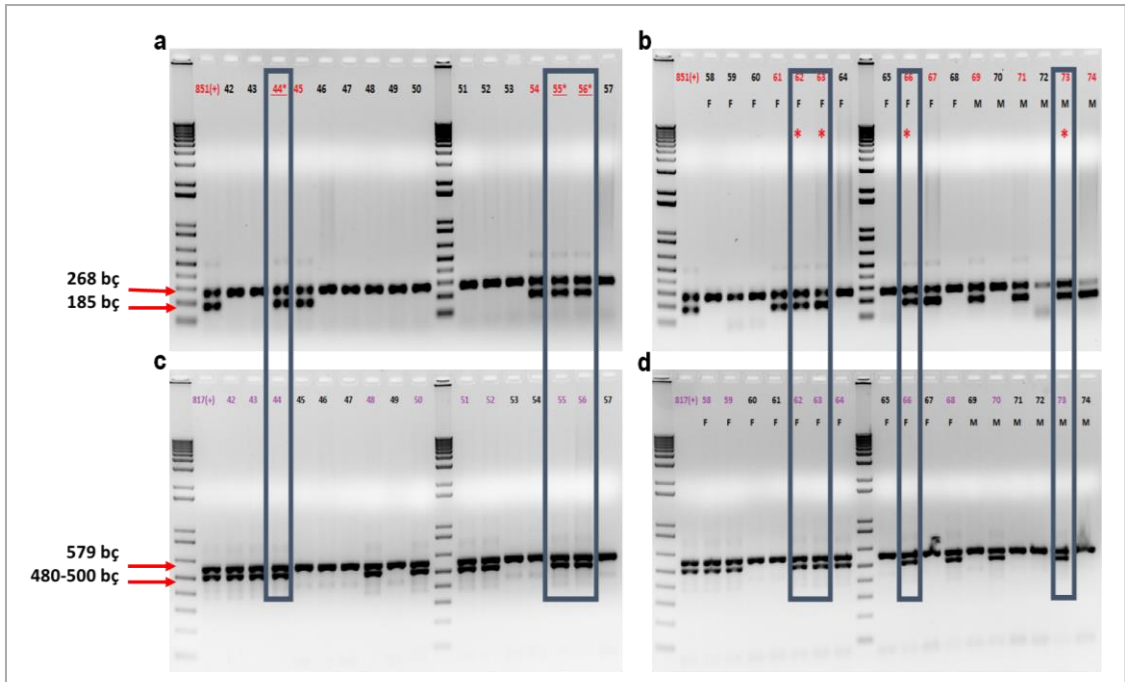
Şekil 4.2. Apc +/- kolonisinin genişletilmesi sonucunda; 828, 830, 831, 833, 837, 839, 850, 851, 857, 858, 871, 873 küpe numaralı toplam 12 adet Apc +/- dişi fare ve 879 küpe numaralı Apc +/- erkek fare elde edildi.

4.3. Kontrol ve Deney Gruplarının Oluşturulması ve Takibi

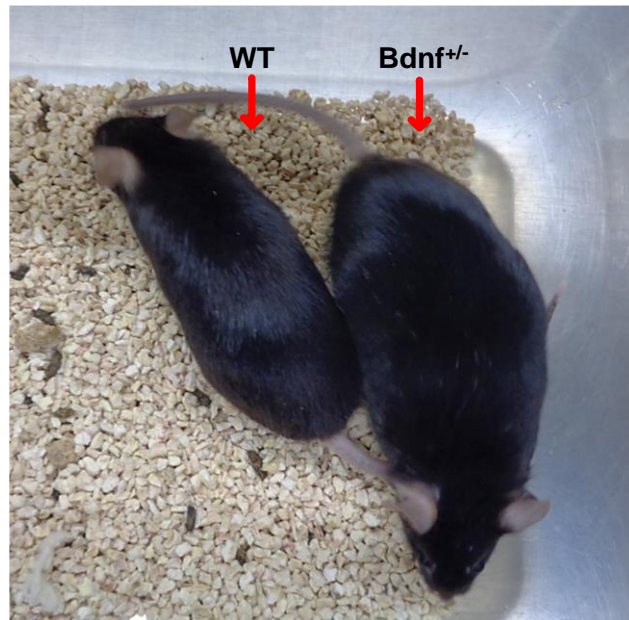
Apc ve Bdnf mutant fareler çaprazlandıktan sonra elde edilen 98 yavrunun genotiplenmesi sonucunda, Apc/Bdnf çift mutant fareler elde edilerek, deney grupları oluşturuldu (Şekil 4.3.). Bu genotiplerin dört grupta dağılımı şu şekilde gerçekleştirildi; yabancı tip (n=28; 10 dişi, 18 erkek), Bdnf mutant (n=23; 13 dişi, 10 erkek), Apc mutant (n=29; 12 dişi, 17 erkek) ve Apc/Bdnf çift mutant (n=18; 8 dişi, 10 erkek) (Tablo 4.1.). Bu gruplardaki farelerin takibinde Bdnf mutant alelleri taşıyan farelerde aşırı kilo alımı ile karakterize görünüm kaydedildi. Bdnf mutant ve yabancı tip farelerin karşılaştırmalı görüntüleri Şekil 4.4.'te gösterilmektedir. Bu fenotipe ek olarak, bazı Bdnf mutant farelerde agresif davranış kaydedildi (Şekil 4.5.). Bu fareler koloniden ayrıldı ve farklı kafeslerde takip edildi. Bu agresif fenotipin ayrıntılı karakterizasyonu için daha ileri deneysel araştırmalar bu çalışmada gerçekleştirilmedi.

Tablo 4.1. Kontrol ve Deney Grupları.

<u>Grup Numarası</u>	<u>Fare Genotipi ve Irkı</u>	<u>Cinsiyet</u>	<u>Önerilen Gruptaki Hedef Fare Sayısı (n)</u>	<u>Gerçekleşen Gruptaki Mevcut Fare Sayısı (n)</u>
A1. Grup	Wt C57BL6 (Apc+/+ Bdnf+/+)	Dişi	6	10
A2. Grup		Erkek	6	18
B1. Grup	Bdnf+/- C57BL6 (Apc +/+ Bdnf +/-)	Dişi	6	13
B2. Grup		Erkek	6	10
C1. Grup	Apc+/- C57BL6 (Apc +/- Bdnf +/+)	Dişi	10	12
C2. Grup		Erkek	10	17
D1. Grup	Apc +/- Bdnf +/- C57BL6	Dişi	10	8
D2. Grup		Erkek	10	10
		TOPLAM:	64	98



Şekil 4.3. Kontrol ve deney gruplarının oluşturulması için $Apc^{+/-}$ ve $Bdnf^{+/-}$ PZR ürünü agaroz jel görüntüleri. (a, b) $Apc^{+/-}$ farelerinin genotiplenmesi. (c, d) $Bdnf^{+/-}$ farelerinin genotiplenmesi. Çerçeve içerisindeki genotipleme sonuçları, aynı farede hem Apc hem de $Bdnf$ mutasyonları olduğunu gösterir ($Apc^{+/-}Bdnf^{+/-}$ fareler).



Şekil 4.4. Aynı yaştaki (165 gün) $Bdnf^{-/-}$ ve wt erkek fareler, soy içerisinde çoğaltılmıştır. $Bdnf^{-/-}$ erkek farenin vücut ağırlığı: 54,82 g; wt erkek farenin vücut ağırlığı: 25-30 g.

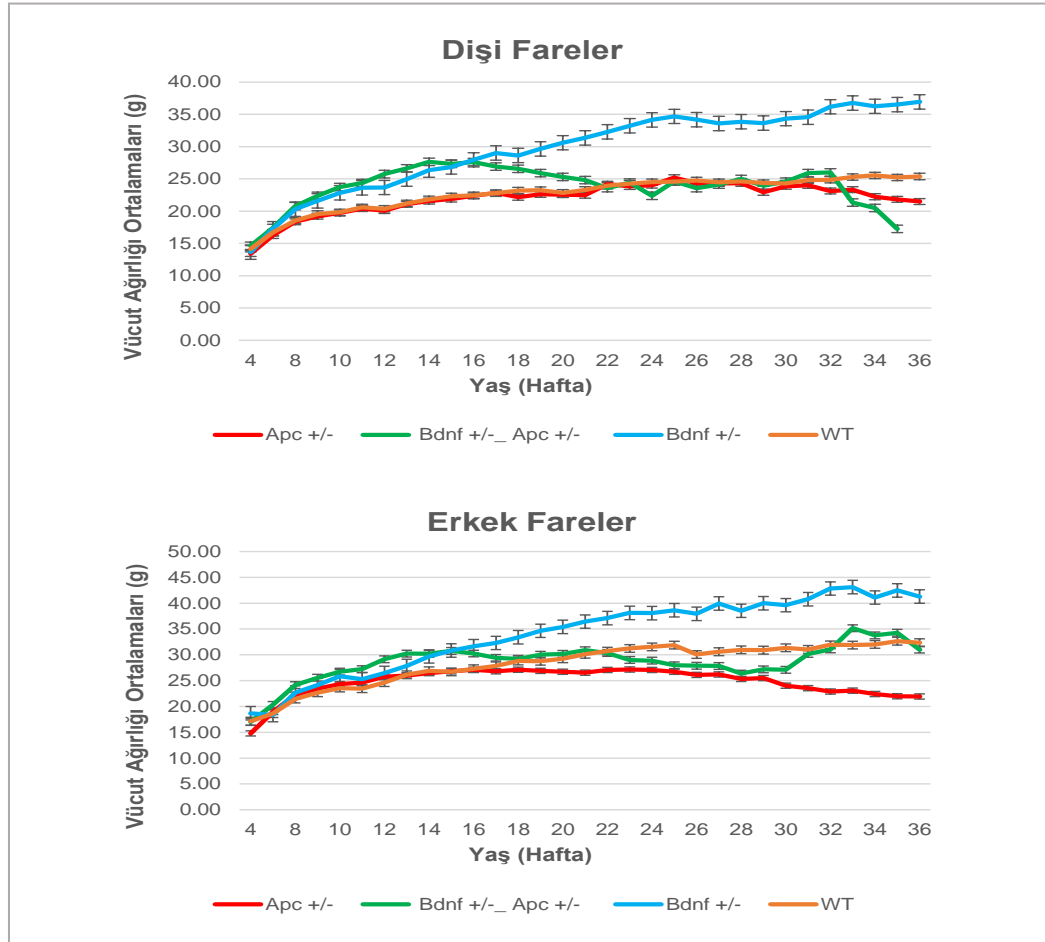


Şekil 4.5. Grupta agresif davranış gösteren Bdnf+/- erkek fareler, yaş: 30-60 gün. Agresif davranışın ardından fareler ayrı kafeslere alındı.

4.4. Apc+/- ve Yabanıl Tip Farelere Kıyasla, Takip Sürecinde Apc/Bdnf ve Bdnf+/- Farelerin Vücut Ağırlığı Dağılımındaki Farklılıklar

Deney gruplarındaki tüm farelerin vücut ağırlıkları ölçümleri; 4, 6 ve 8 haftalık yaşta ve 8 haftalık yaştan 36 haftalık yaşa kadar haftada bir kez ölçüm yapılacak şekilde tamamlandı (Şekil 4.6.). Hem dişi hem erkek Bdnf mutant ve Apc/Bdnf çift mutant farelerde, kontrolleri (Apc mutant ve yabanıl tip) ile karşılaştırıldığında, belirgin kilo artışı olduğu görüldü. Araştırma gruplarında, 36 hafta boyunca yapılan haftalık vücut ağırlıkları tartımı sonucunda; 16. haftaya kadar Bdnf+/- ve Apc/Bdnf mutant hem dişi hem erkek fare gruplarında doğru orantılı belirgin bir kilo artışı görülürken, Apc+/- ve yabanıl tip dişi ve erkek fare gruplarında birbirine paralel şekilde ve az miktarda kilo alımı gözlemlendi. 16 hafta sonrasında, Apc+/- Bdnf+/- hem dişi hem erkek farelerde kilo artışı azalmaya başladı. 30. haftaya

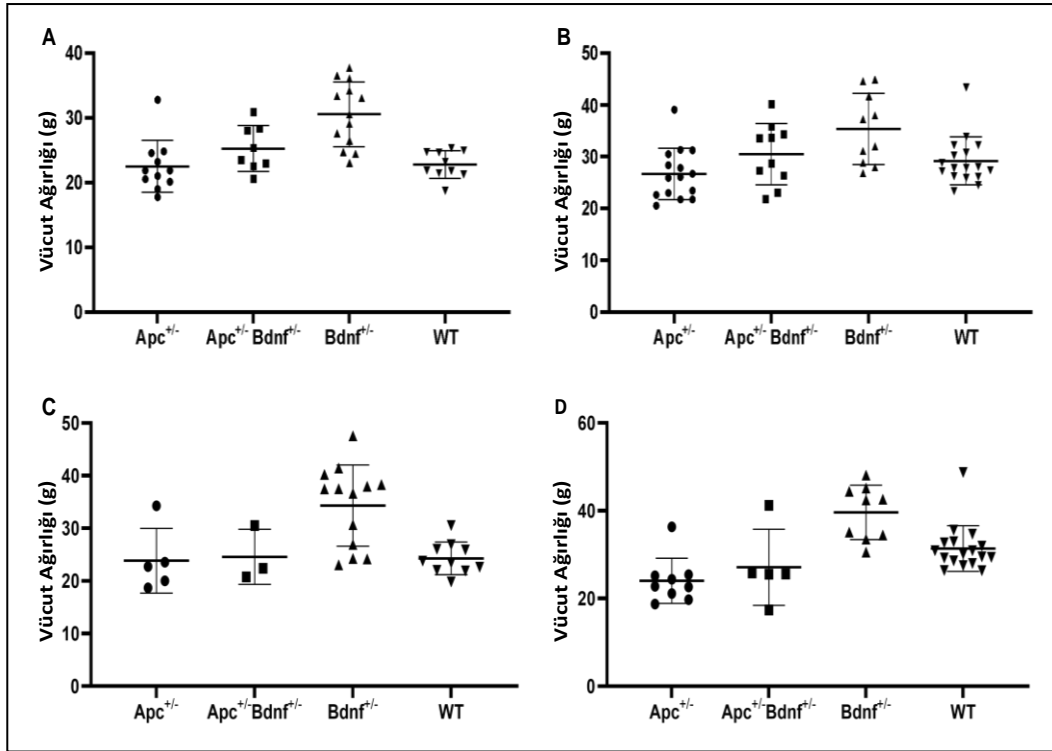
kadar Bdnf+/- fare grupları hariç diğer gruplarda kilo alımı sabit bir seyirde iken 30. haftadan sonra Apc+/- farelerde vücut ağırlığının azalmaya başladığı görüldü.



Şekil 4.6. Deney gruplarının 36 haftalık vücut ağırlığı takibi. Sonuçlar ortalama \pm standart hata olarak gösterilmiştir.

Bdnf mutant ve wt fareler, takip süresi boyunca kilo almaya devam etti. Hem dişi hem erkek fareler için kilo alma modelinin seyri birbirine paralel ilerledi. Bdnf mutant fare grubunda takip süreci içinde hem dişi hem erkek farelerde belirli bir grup, ortalama üstü vücut ağırlığına ulaşırken geriye kalan grubun vücut ağırlığı ortalamanın altında kaldı. Her bir genotipteki dişi ve erkek fareler için kilo alımı seyri, birbirine paralel şekilde ilerledi. Vücut ağırlığı ölçümleri tamamlandığında, Bdnf+/- dişi ve erkek farelerin vücut ağırlığının diğer gruplara göre anlamlı derecede yüksek olduğu gözlemlendi Aynı zamanda, Bdnf+/- dişi ve erkek farelerin grup içi kilo dağılımı incelendiğinde, bu dağılımın grup ortalamasının her iki tarafında belirli bir gruplaşma

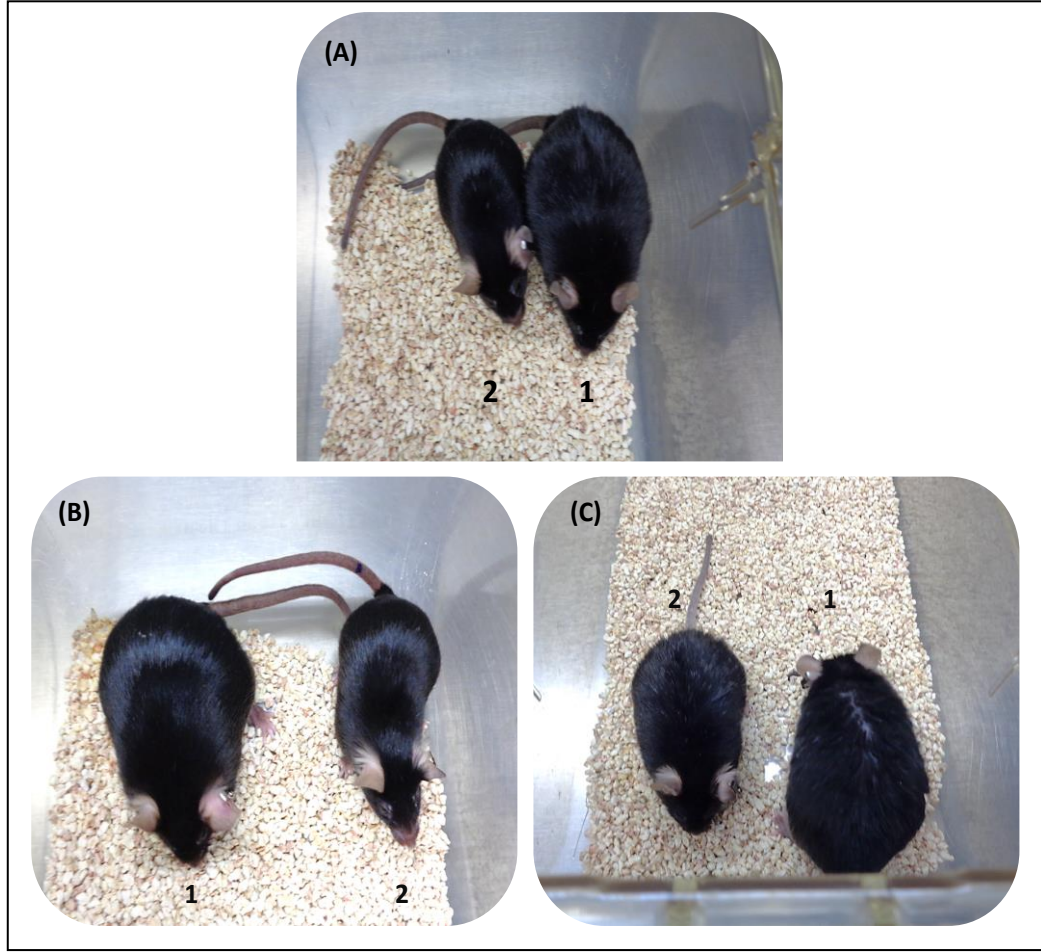
oluşturduğu görüldü. Hem *Bdnf*+/- dişi ve hem erkek farelerin vücut ağırlığı dağılımları incelendiğinde, grubun yarısı normal vücut ağırlığına sahipken diğer yarısında belirgin bir kilo artışı olduğu görüldü (Şekil 4.7., 4.8.) (143).



Şekil 4.7. Araştırma gruplarında; 20 haftalık yaştaki dişi (A) ve erkek (B) farelerin vücut ağırlığı dağılımı, 30 haftalık yaştaki dişi (C) ve erkek (D) farelerin vücut ağırlığı dağılımı.

4.5. *Apc*/*Bdnf* Çift Mutant Farelerde Hastalık Fenotipindeki Değişimler

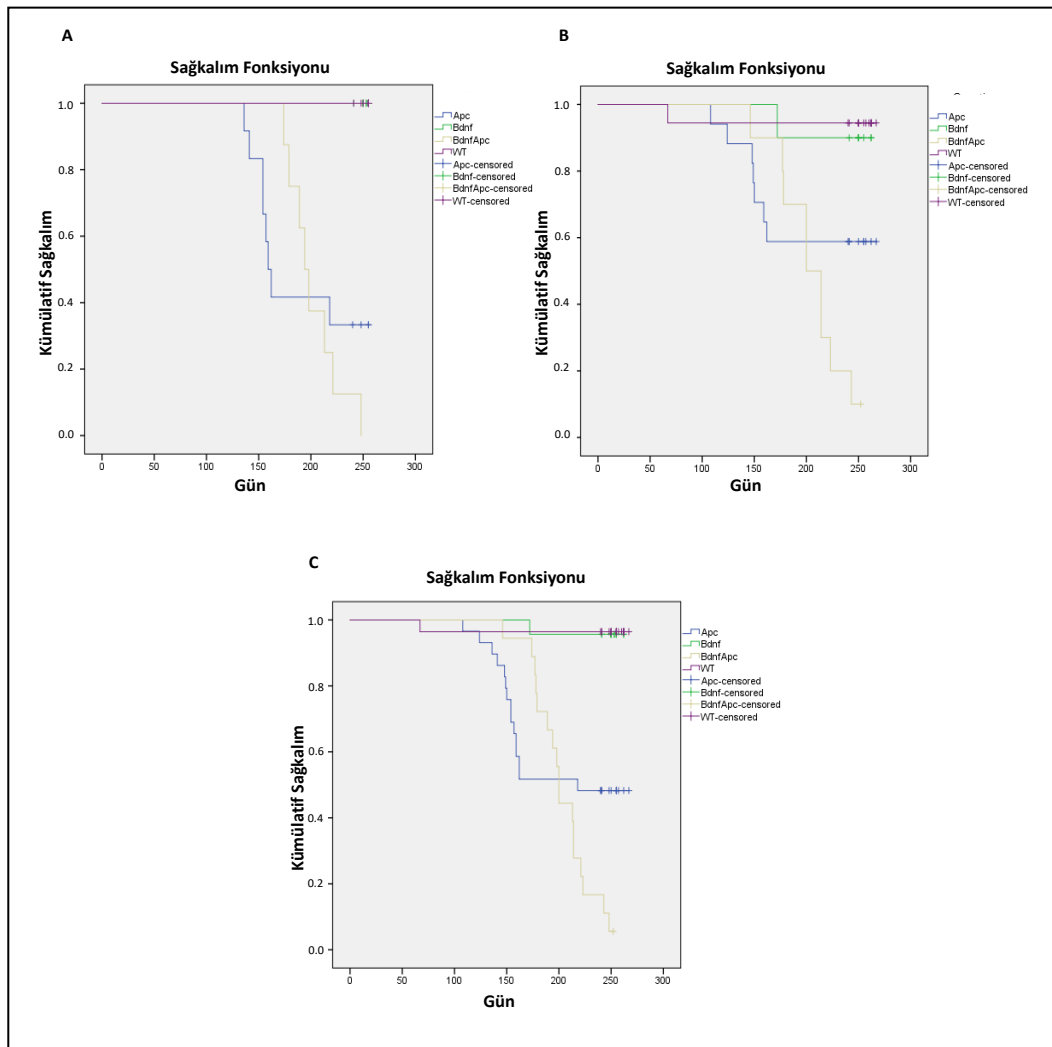
Azaltılmış *Bdnf* ifadesine sahip *Apc*+/- fareler, *Bdnf*+/- fareler ile, 4 haftalık yaştan 16 haftalık yaşa kadar normal aralığın üzerinde benzer şekilde kilo alma süreci gösterdiler. *Apc*+/- *Bdnf*+/- fareler aynı zamanda, yaklaşık 5 ay boyunca hiçbir hastalık fenotipi göstermedi. 20 haftalık yaşa gelene kadar yabanıl tip ve *Apc*+/- farelere kıyasla kilo alma eğilimindeydiler. Ayrıca, bağırsak tümör gelişim semptomları, kilo kaybı, kürkün bozulması, postürün kötüleşmesi ve anemi gibi hastalık semptomlarını geliştirmediler.



Şekil 4.8. (A) 217 günlük yaştaki Bdnf+/- erkek fareler; 1: 52.27 g, 2: 27.07 g. 217 günlük yaştaki dişi fareler için fotoğraf çekimi yapılmadı. (B) 252 günlük yaştaki Bdnf+/- dişi fareler; 1: 50.42 g, 2: 24.48 g. (C) 252 günlük yaştaki Bdnf+/- erkek fareler; 1: 48,13 g, 2: 33,85 g.

4.6. Apc/Bdnf Çift Mutant Farelerin Sağkalım Sürelerindeki Değişim

Araştırma gruplarında takip süresi boyunca sağkalım analizi Kaplan-Meier yöntemi ile incelendi ve analiz sonucunda sağkalım eğrilerinin anlamlı olduğu görüldü. Apc+/- farelerde 104. günden itibaren ölüm görülmeye başlanırken, Apc/Bdnf çift mutant farelerde 180. günden itibaren ölüm görülmeye başlandı. Yabanıl tip ve Bdnf+/- fareler, gruplardaki birer fare dışında, takibin sonuna kadar (252 gün) hayatta kaldı (Şekil 4.9.).



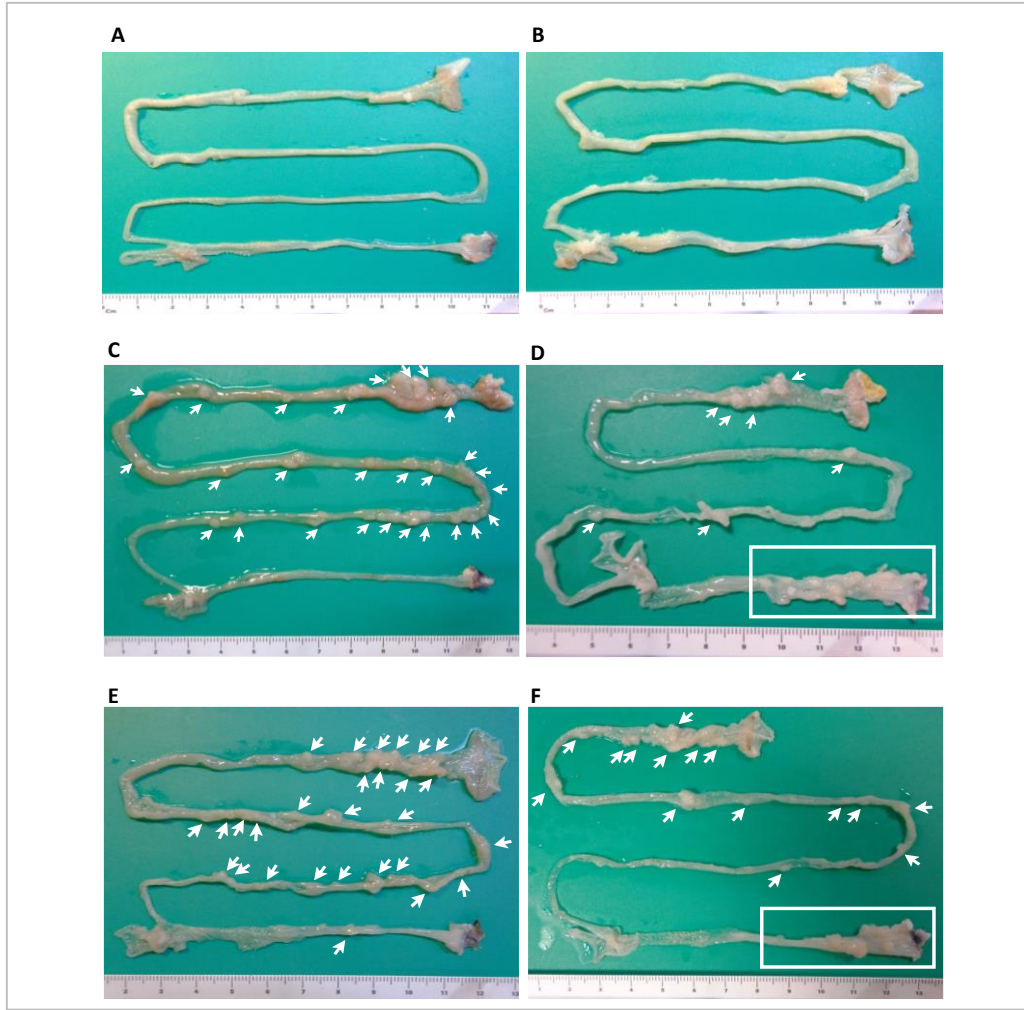
Şekil 4.9. 36 haftalık takip boyunca deney gruplarının sağkalımını gösteren Kaplan-Meier eğrileri. Dişi (A), erkek (B) ve tüm (C) farelerden oluşan deney grupları için sağkalım eğrileri. *P < 0.05, Kaplan Meier analizi, log-rank testi.

4.7. Apc+/- Farelerde Azaltılmış Bdnf Ekspresyonunun Bağırsak ve Kolonik Polip Fenotipine Etkisi

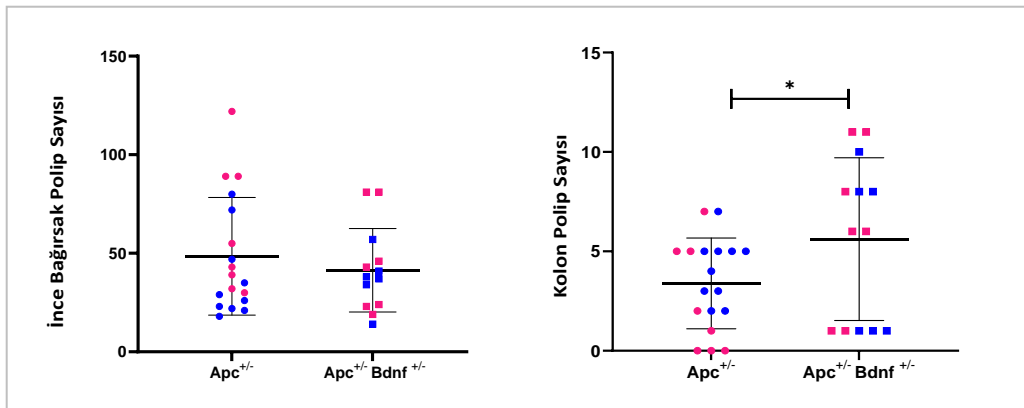
Araştırma gruplarında polip oluşumu beklenen Apc+/- ve Apc/Bdnf çift mutant dişi ve erkek farelerde; terminal döneme girenler ve takip süresini tamamlayan fareler anestezi altında servikal dislokasyon yöntemi ile kurban edildi. Farelerin tüm gastrointestinal sistemi, diseksiyondan sonra fotoğraflandı ve belgelendi (Şekil 4.10.). İnce bağırsak ve kolondaki polip sayıları sayılarak lokalizasyonları ve dağılımları kaydedildi. Apc+/- farelerde polip sayısı ince bağırsakta 20-122, kolonda 1-7 polip aralığındaydı. Apc+/-Bdnf+/- farelerde ince bağırsakta 20-90 adet polip görülürken kolonda 1-13 adet polip görüldü. Apc+/- farelerde polip sayımı yapıldığında, ince bağırsakta 20-122 adet, kolonda 1-7 adet polip sayıldı. Apc+/- Bdnf+/- farelerde, ince bağırsakta 20-90 adet polip görülürken, kolonda 1-13 adet polip görülmüştür. Apc+/- ve Apc+/- Bdnf+/- dişi ve erkek farelerde ince bağırsak polip sayısı ortalamalarına bakıldığında; Apc+/- farelerin ince bağırsak polip sayısı ortalaması Apc+/- Bdnf+/- farelere kıyasla daha yüksektir, ancak bu fark istatistik olarak anlamlı değildir. Her iki grupta kolon polip sayısı ortalamalarına bakıldığında; Apc+/- Bdnf+/- farelerin kolon polip sayısı ortalaması Apc+/- farelere kıyasla belirgin olarak daha yüksektir ve bu fark istatistik olarak anlamlıdır (Şekil 4.11.). Apc+/- ve Apc+/- Bdnf+/- farelerin ince bağırsak ve kolon polip sayıları ortalamaları Tablo 4.2.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.2. Apc+/- ve Apc+/-Bdnf+/- farelerin ince bağırsak ve kolon polip sayısı ortalamaları.

Cinsiyet	Genotip	İnce Bağırsak Polip Sayısı Ortalamaları	Standart Sapma	Standart Hata
Dişi Fareler	Apc +/-	62,38	31,46	11,12
Erkek Fareler	Apc +/-	37,3	20,98	6,63
Dişi Fareler	Apc+/- Bdnf+/-	45,29	24,49	9,26
Erkek Fareler	Apc+/- Bdnf+/-	36,83	12,62	5,15
Tüm Fareler	Apc +/-	48,44	28,98	6,83
Tüm Fareler	Apc+/- Bdnf+/-	41,38	20,35	5,64
Cinsiyet	Genotip	Kolon Polip Sayısı Ortalamaları	Standart Sapma	Standart Hata
Dişi Fareler	Apc +/-	2,5	2,60	0,92
Erkek Fareler	Apc +/-	4,1	1,51	0,48
Dişi Fareler	Apc+/- Bdnf+/-	6,29	3,93	1,24
Erkek Fareler	Apc+/- Bdnf+/-	4,83	3,89	1,23
Tüm Fareler	Apc +/-	3,39	2,21	0,52
Tüm Fareler	Apc+/- Bdnf+/-	5,62	3,93	0,93



Şekil 4.10. Kontrol ve deney gruplarının diseksiyon sonrası gastrointestinal sistemi görüntüleri. (A) Yabanıl tip fare. (B) *Bdnf*^{+/-} fare. (C) *Apc*^{+/-} dişi fare. (D) *Apc*^{+/-} *Bdnf*^{+/-} dişi fare. (E) *Apc*^{+/-} erkek fare. (F) *Apc*^{+/-} *Bdnf*^{+/-} erkek fare. Çerçeve içerisindeki bölge, *Apc*^{+/-} *Bdnf*^{+/-} mutant farelerin distal kolonundaki yoğun polip yükünü göstermektedir.

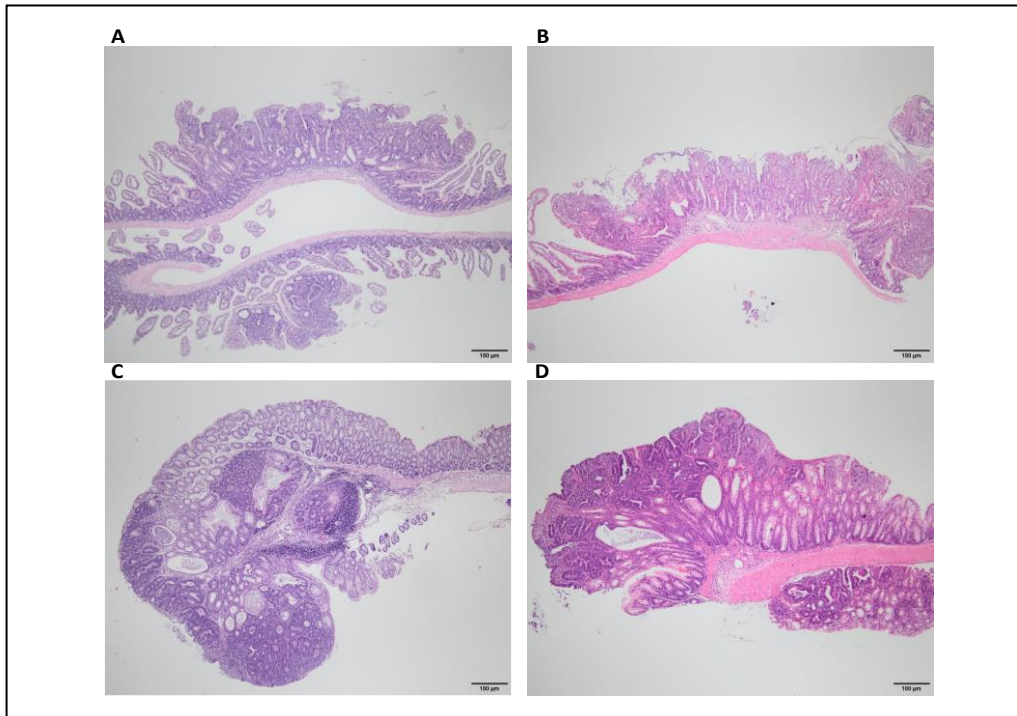


Şekil 4.11. *Apc*^{+/-} ve *Apc*^{+/-} *Bdnf*^{+/-} farelerde polip yükü dağılımları. Pembe renk: dişi fareler, Mavi renk: erkek fareler. n= 6-10, gruplardaki fare sayıları. Mann

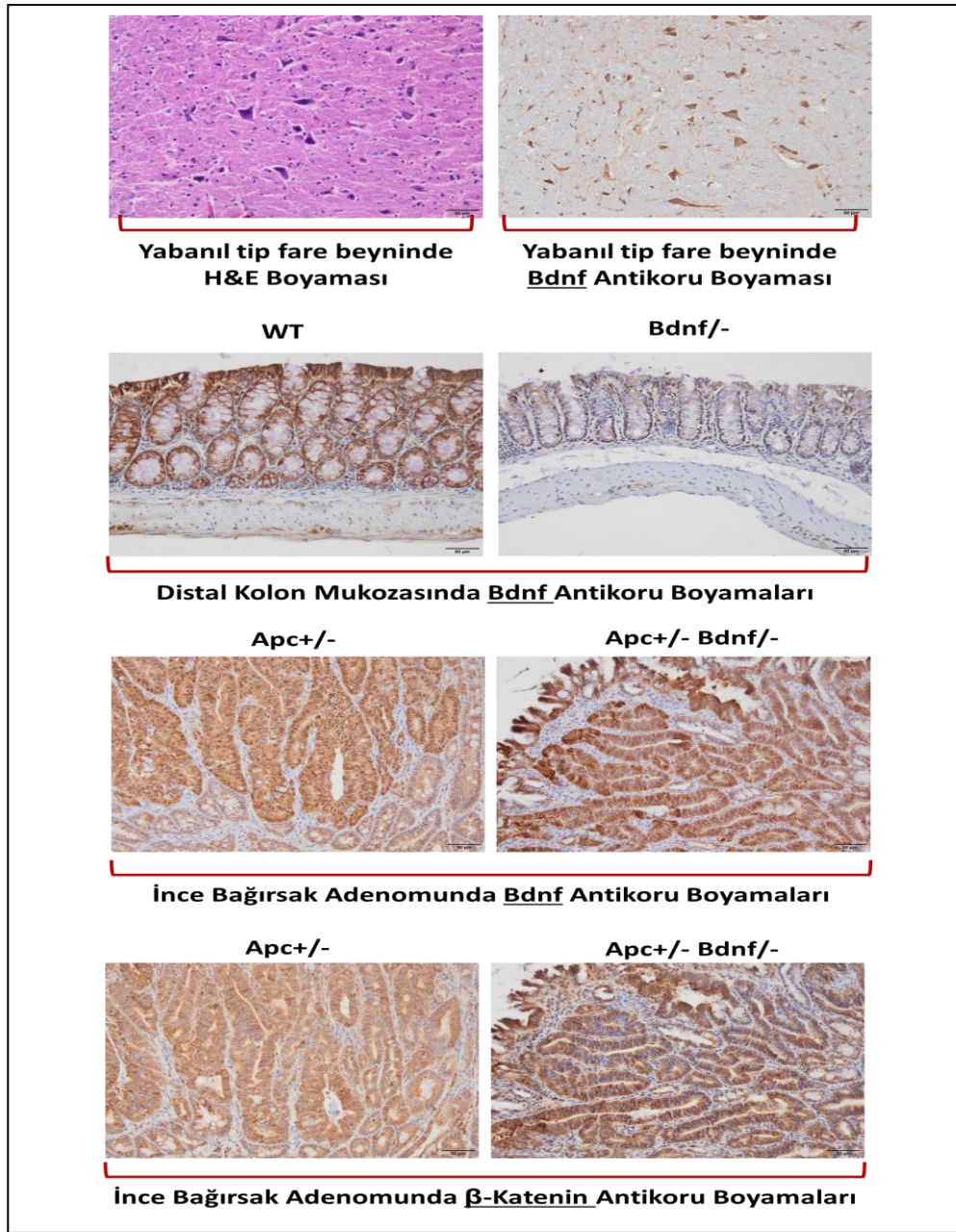
Whitney-U testine göre $Apc^{+/-}$ ve $Apc^{+/-}Bdnf^{+/-}$ farelerindeki kolon polip sayıları karşılaştırıldığında aradaki fark anlamlı bulunmuştur, $P < 0,05$.

4.8. İntestinal Mukoza ve Tümörlerin İmmünohistokimyasal Olarak İncelenmesi

Bloklardan hazırlanan kesitlerde immünohistokimyasal incelemeler için hematoksilin-eozin (H&E) ve primer antikolar ile boyamalar yapıldı. Bdnf antikoruna ile boyama için pozitif kontrol olarak beyin örneği kullanıldı. Bdnf mutant farelerin distal kolonundaki Bdnf antikoruna ile boyama yoğunluğunun, wt farelere kıyasla azalmış olduğu görüldü. Apc mutant ve $Apc/Bdnf$ çift mutant fare intestinal doku kesitlerinde ince bağırsak poliplerinde Bdnf ve β -katenin antikoruna boyamalarına bakıldığında, örüntü ve yoğunluk açısından benzerlik olduğu, böylelikle Bdnf ifadesinin β -katenin ile ilişkili olabileceği görülmüştür (Şekil 4.12., 4.13.).



Şekil 4.12. Sırasıyla $Apc^{+/-}$ ve $Apc^{+/-}Bdnf^{+/-}$ farelerin ince bağırsak (A ve B) ve kolon adenom (C ve D) doku kesitlerinin hematoksilin-eozin (H&E) boyamaları. Ölçek çubuğu: 100 µm.

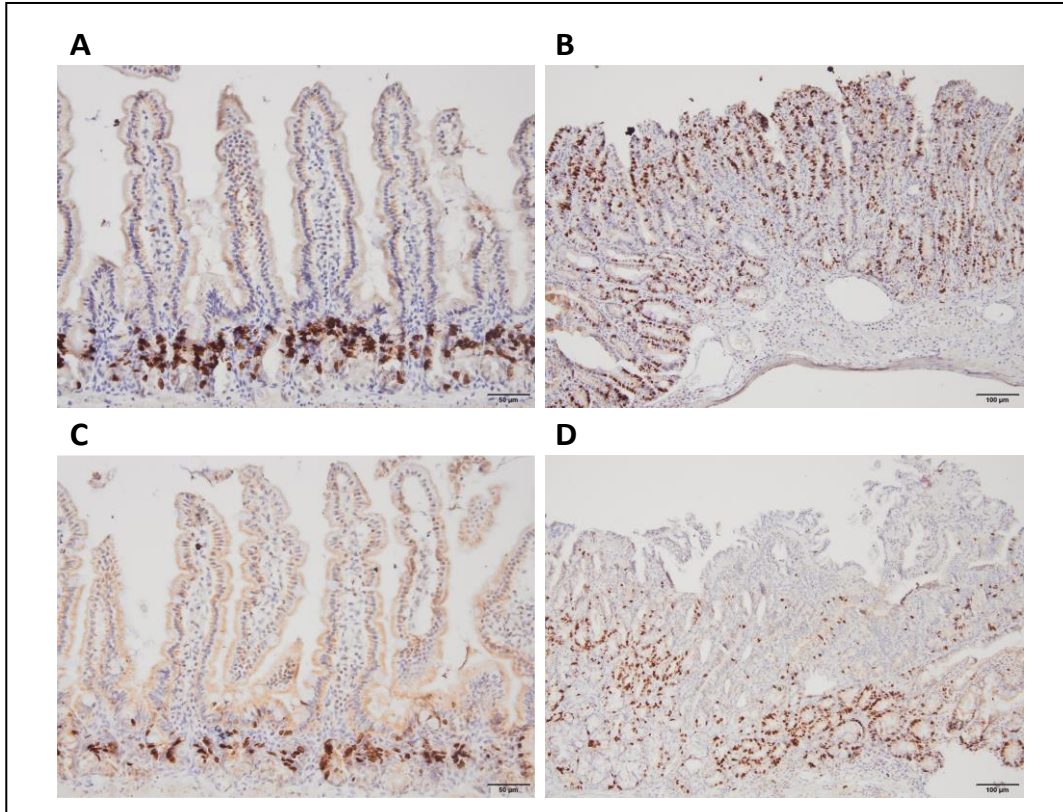


Şekil 4.13. Yabanıl tip ve Bdnf+/- farelerin beyin ve distal kolonunda; Apc+/- ve Apc+/- Bdnf+/- farelerin ince bağırsak adenomunda immünohistokimyasal analizler.

4.9. Apc+/-Bdnf+/- Fareler ve Apc+/- Farelerin İntestinal Tümörleri Arasındaki Proliferasyon Farkı

BrdU antikoru ile işaretlemeye; her iki grupta ince bağırsak mukozasının proliferatif bölgesi pozitiflik gösterirken, Apc+/-Bdnf+/- farelerin bağırsak mukozasındaki hücre proliferasyonu yoğunluğunun Apc+/- farelere kıyasla azalmış

olduğu görüldü. Apc mutant farelerde tümör bölgesinde çoğalan hücrelerin yoğunluğu, Apc/Bdnf çift mutant farelerin tümör bölgesine göre belirgin ölçüde daha yüksekti (Şekil 4.14.).

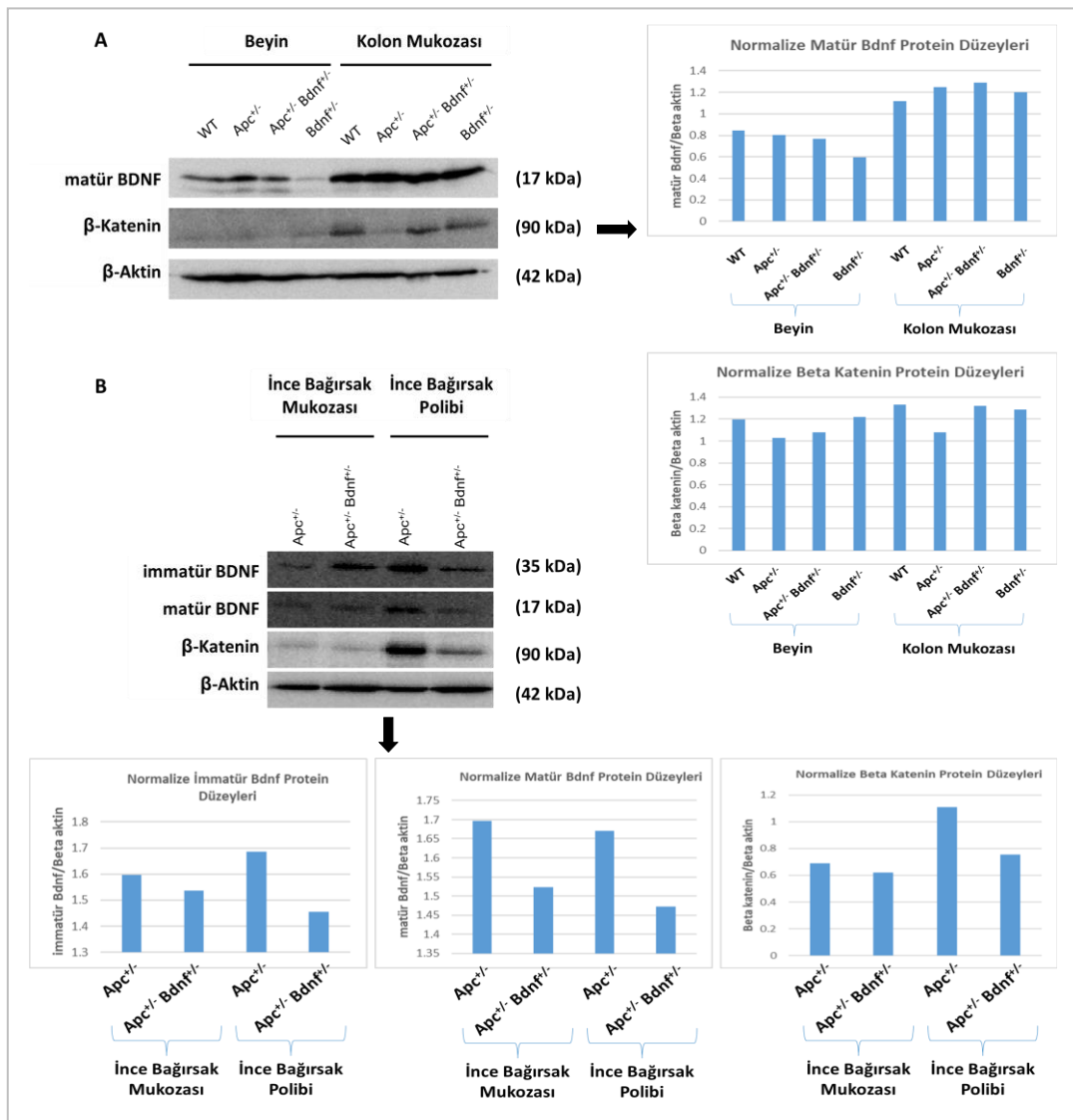


Şekil 4.14. Apc mutant (A-B) ve Apc/Bdnf çift mutant (C-D) farelerin ince bağırsak mukozası (A, C) ve adenomunun (B, D) BrdU işaretleme. Ölçek çubukları: 50 µm (A, C) ve 100 µm (B, D).

4.10. Western Blot Analizi ile Apc^{+/-}Bdnf^{+/-} Fareler ve Apc^{+/-} Farelerin İntestinal Tümörlerindeki Bdnf ve β-Katenin İfadelerinin İncelenmesi

Western blot analizleri sonucunda beyin, kolon mukozası, ince bağırsak mukozası ve ince bağırsak polip dokularındaki protein ifadeleri incelendiğinde beyindeki matür Bdnf ifadesinin; Bdnf^{+/-} farelerde belirgin olarak azaldığı, Apc^{+/-}Bdnf^{+/-} farelerde ise Apc^{+/-} farelere kıyasla az miktarda azaldığı görüldü. Kolon mukozasında matür Bdnf ifadesinin, β-katenin ifadesi ile karşılaştırıldığında tüm deney gruplarında belirgin olarak ifade olduğu tespit edildi. Apc^{+/-} farelerin kolon

mukozasındaki beta katenin ifadesinin; $Apc^{+/-}Bdnf^{+/-}$, $Bdnf^{+/-}$ ve yabanıl tip farelere kıyasla azaldığı görüldü. İntestinal mukozadaki immatür Bdnf ifadesinin $Apc^{+/-}Bdnf^{+/-}$ farelerde arttığı tespit edildi (Şekil 4.15a). $Apc^{+/-}$ farelere kıyasla, $Apc^{+/-}Bdnf^{+/-}$ farelerin intestinal poliplerindeki beta katenin ifadesinin, diğer gruplarla karşılaştırıldığında immatür ve matür Bdnf ifadeleri ile birlikte beklenildiği gibi paralel olarak azaldığı belirlendi. $Apc^{+/-}Bdnf^{+/-}$ farelerin intestinal mukozasındaki immatür Bdnf ifadesinin $Apc^{+/-}$ farelere kıyasla arttığı görüldü (Şekil 4.15b).



Şekil 4.15. Western blot analizinde; (A) yabanıl tip (wt), $Apc^{+/-}$ mutant, A/B çift mutant ($Apc^{+/-}Bdnf^{+/-}$) ve $Bdnf^{+/-}$ mutant farelerin beyin ve kolon mukozasında BDNF ve β -katenin protein düzeyleri. (B) Apc mutant ve A/B çift mutant farelerde ince bağırsak mukozası ve polibinde Bdnf ve β -katenin protein düzeyleri.

4.11. Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR Analizi ile İntestinal Mukoza ve Tümör Dokusunda Bdnf, Trk B, Beta Katenin ve Lgr5 Gen Ekspresyonlarının İncelenmesi

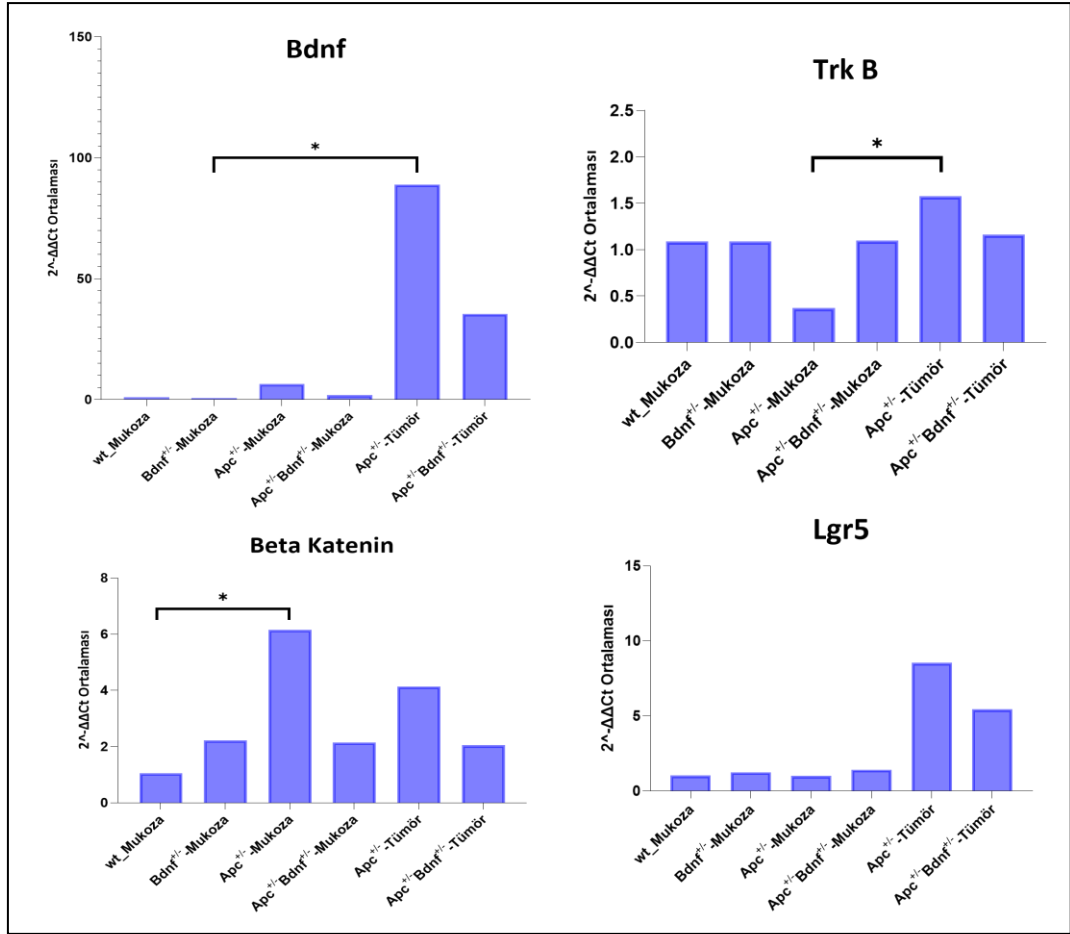
Kantitatif gerçek zamanlı PZR analizleri sonucunda, ince bağırsak mukozası ve ince bağırsak polip dokularındaki Bdnf, Trk B, beta katenin ve Lgr5 gen ifadeleri incelendi. Bdnf+/-, Apc +/- ve Apc+/-Bdnf+/- farelerde Bdnf ifadesinin azaltılmasının tümör dokularında ve diğer gen ifadelerinde etkilerini inceleyebilmek amacıyla, Bdnf+/-, Apc +/- ve Apc+/-Bdnf+/- farelerin intestinal mukoza ve tümör örneklerinde kantitatif gerçek zamanlı PZR analizi yapıldı. Bu amaçla izole edilen RNA örneklerinden Bdnf, Trk B, beta katenin ve Lgr5'e özgü primerler kullanılarak amplifiye edilen cDNA'lar kantitatif olarak değerlendirildi. Kontrol grupları olarak, herhangi bir mutasyona sahip olmayan, sağlıklı fenotipe sahip yabanıl tip fareler araştırma gruplarına dahil edildi.

Tüm gen ifadeleri, yabanıl tip fare ince bağırsak mukozasının Bdnf, Trk B, beta katenin ve Lgr5 gen ifadelerinin $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değeri ile kıyaslanarak değerlendirildi. Sonuçlara göre; Apc+/- farenin intestinal mukozasında Bdnf gen ifadesinin yabanıl tip farelere kıyasla yaklaşık 6 kat arttığı, fakat Apc+/-Bdnf+/- farenin intestinal mukozasında gen ifadesinde değişim olmadığı görüldü. Apc+/-Bdnf+/- farenin intestinal tümöründeki Bdnf gen ifadesinde ise Apc +/- farelere kıyasla yaklaşık 2,5 kat azalma olduğu görüldü. Bdnf+/- farelerin intestinal mukozasındaki Bdnf gen ifadesinde diğer tüm gruplara göre azalma olduğu gözlemlendi. Trk B gen ifadesinin; Apc+/- farenin intestinal mukozasındaki ifadesinin diğer tüm gruplara göre yaklaşık 3 kat azaldığı, Apc+/-Bdnf+/- farenin intestinal tümöründe ise diğer tüm gruplara göre yaklaşık 1,5 kat arttığı görüldü. Apc+/- farenin intestinal mukozasında beta katenin gen ifadesinin yabanıl tip farelere kıyasla yaklaşık 6 kat arttığı, Apc+/-Bdnf+/- farenin intestinal mukozasında ise 2 kat arttığı görüldü. Apc+/-Bdnf+/- farenin intestinal tümöründeki beta katenin gen ifadesinde ise Apc +/- farelere kıyasla yaklaşık 2 kat azalma olduğu tespit edildi. Bdnf+/- farelerin intestinal mukozasındaki ifadesinde de 2 kat artış olduğu belirlendi. Lgr5 gen ifadesinin tüm grupların intestinal mukozasında yaklaşık aynı oranda ifade edildiği görüldü. Apc+/- Bdnf+/- farenin

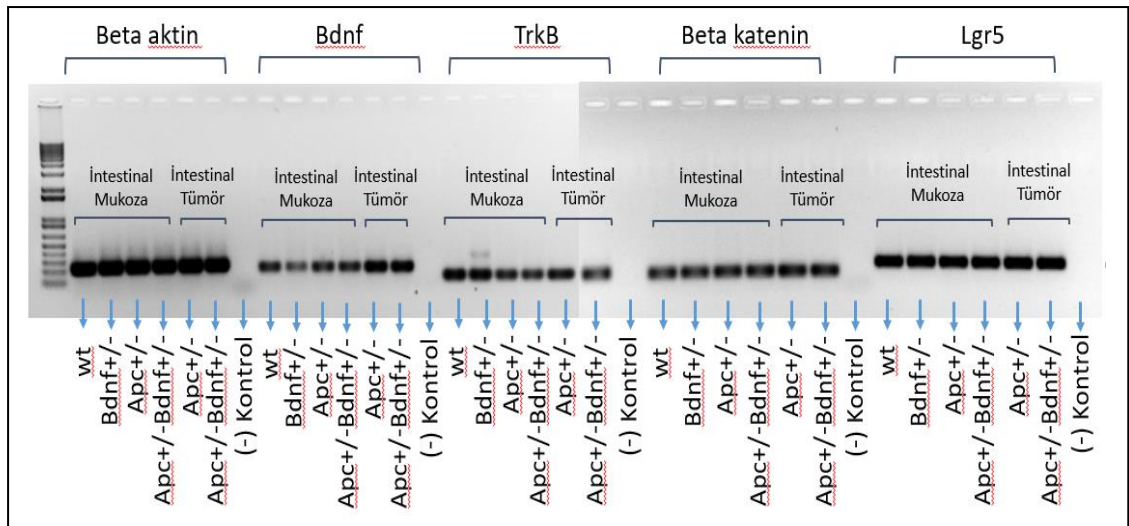
intestinal tümöründeki Lgr5 gen ifadesinde ise Apc +/- farelere kıyasla yaklaşık 1,5-2 kat azalma olduğu tespit edildi.

Araştırma gruplarının intestinal mukoza ve intestinal tümör dokusundaki Bdnf, Trk B, beta katenin ve Lgr5 gen ifadeleri istatistiksel olarak incelendiğinde, Kruskal-Wallis testi sonucuna göre, yabancı tip, Bdnf+/-, Apc+/- ve Apc+/- Bdnf+/- farelerin intestinal mukozası ve Apc+/-, Apc+/- Bdnf+/- farelerin intestinal tümöründeki Bdnf ifadesinde gruplar arasında anlamlı olarak fark olduğu belirlenmiştir ($p < 0,01$; $p = 0,009$). Aynı test ile beta katenin ve Lgr5 gen ifadeleri incelendiğinde ise, bu gen ifadelerinde de gruplar arasında anlamlı olarak fark olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,05$; Beta katenin ifadeleri için: $p = 0,013$, Lgr5 ifadeleri için: $p = 0,03$). Gruplarda Trk B gen ifadesi incelendiğinde, tüm gruplar arasında bu gen ifadesinde anlamlı fark olmadığı belirlenmiştir ($p = 0,092$).

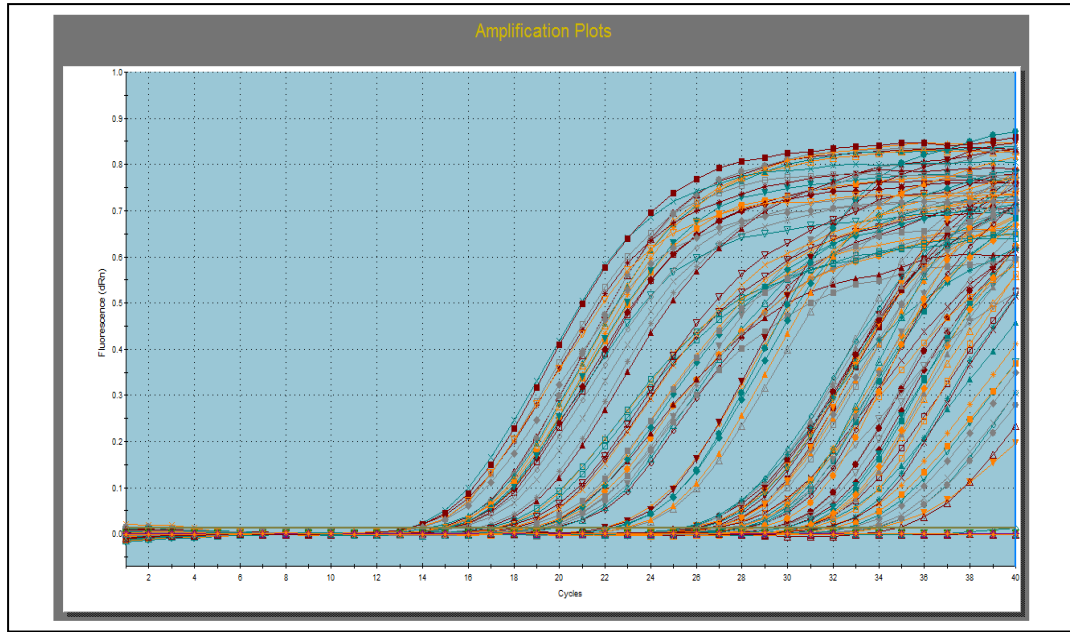
Yukarıdaki analizlere ek olarak, Mann-Whitney U testi ile gruplar ikili olarak değerlendirildiğinde; Bdnf+/- farenin intestinal mukozası ile Apc+/- farenin intestinal tümör dokusundaki Bdnf ifadeleri arasında, Apc+/- farenin intestinal mukozası ile Apc+/- farenin intestinal tümör dokusundaki Trk B ifadeleri arasında ve yabancı tip farenin intestinal mukozası ile Apc+/- farenin intestinal mukozasındaki beta katenin ifadeleri arasında anlamlı fark olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,05$).



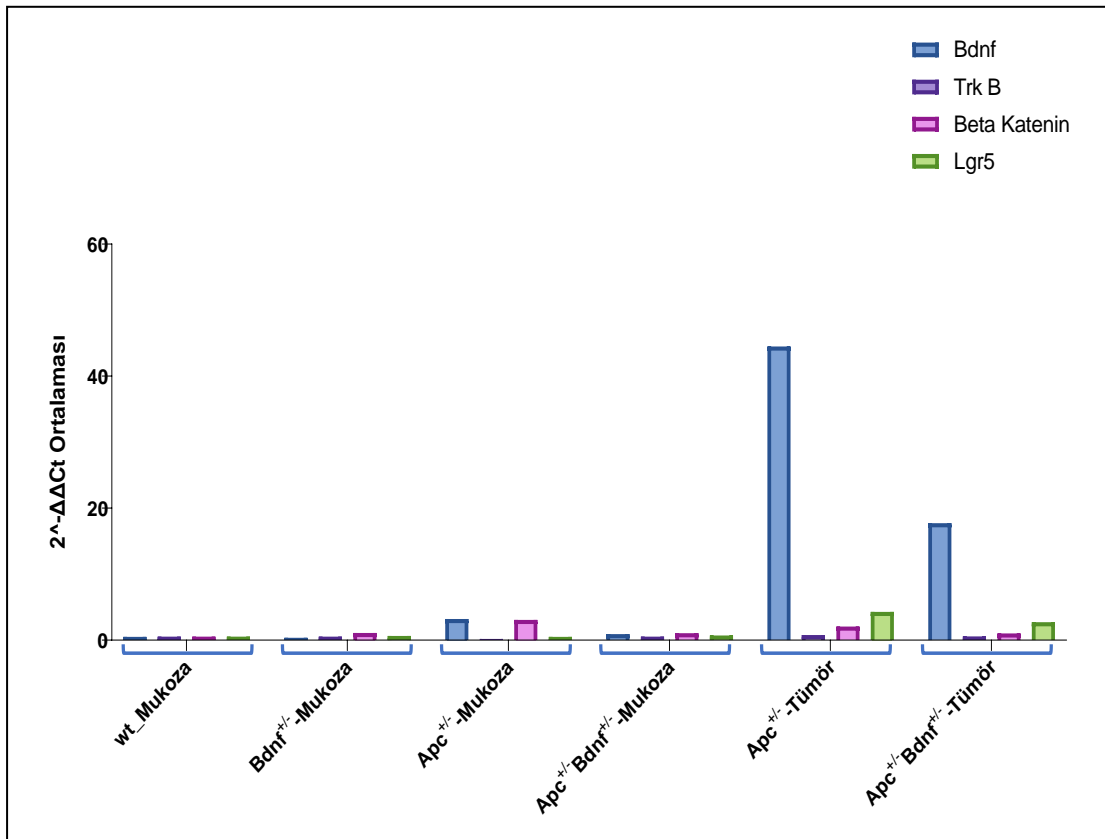
Şekil 4.16. Kantitatif gerçek zamanlı PZR analiz sonuçları. Her gruptan bir fare dokusu ile çalışıldı ve deneyler üç kez tekrar edildi. *Mann Whitney-U*, $p < 0,05$.



Şekil 4.17. Kantitatif PZR ürünlerinin agaroz jeldeki (%1) görüntüleri.



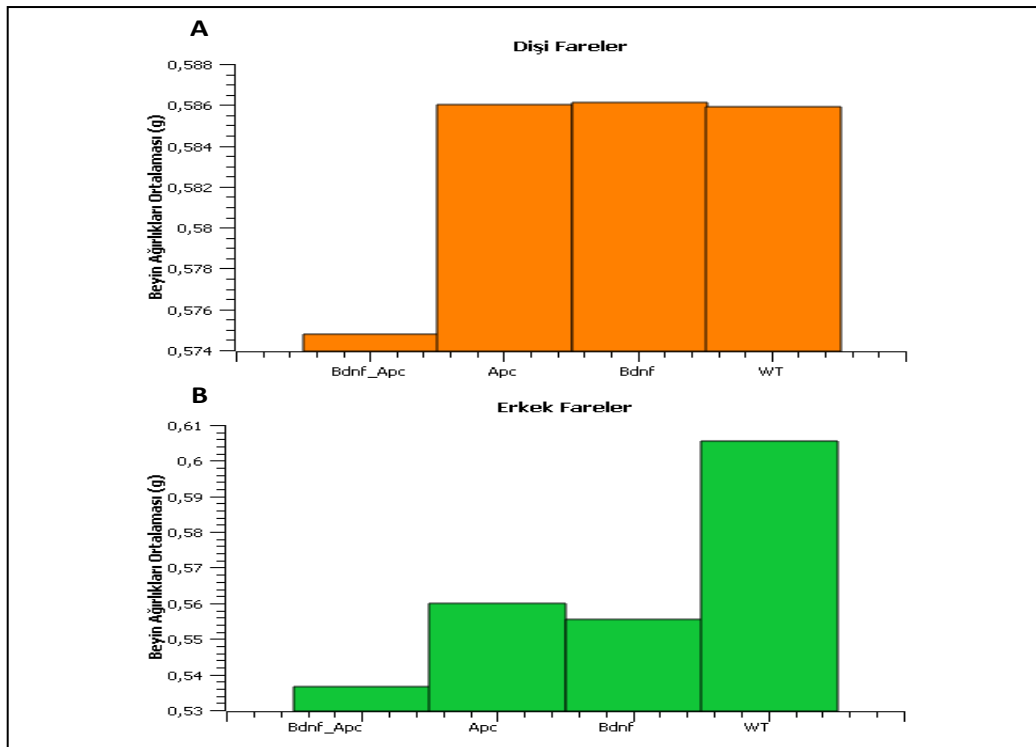
Şekil 4.18. Amplifikasyon eğrileri.



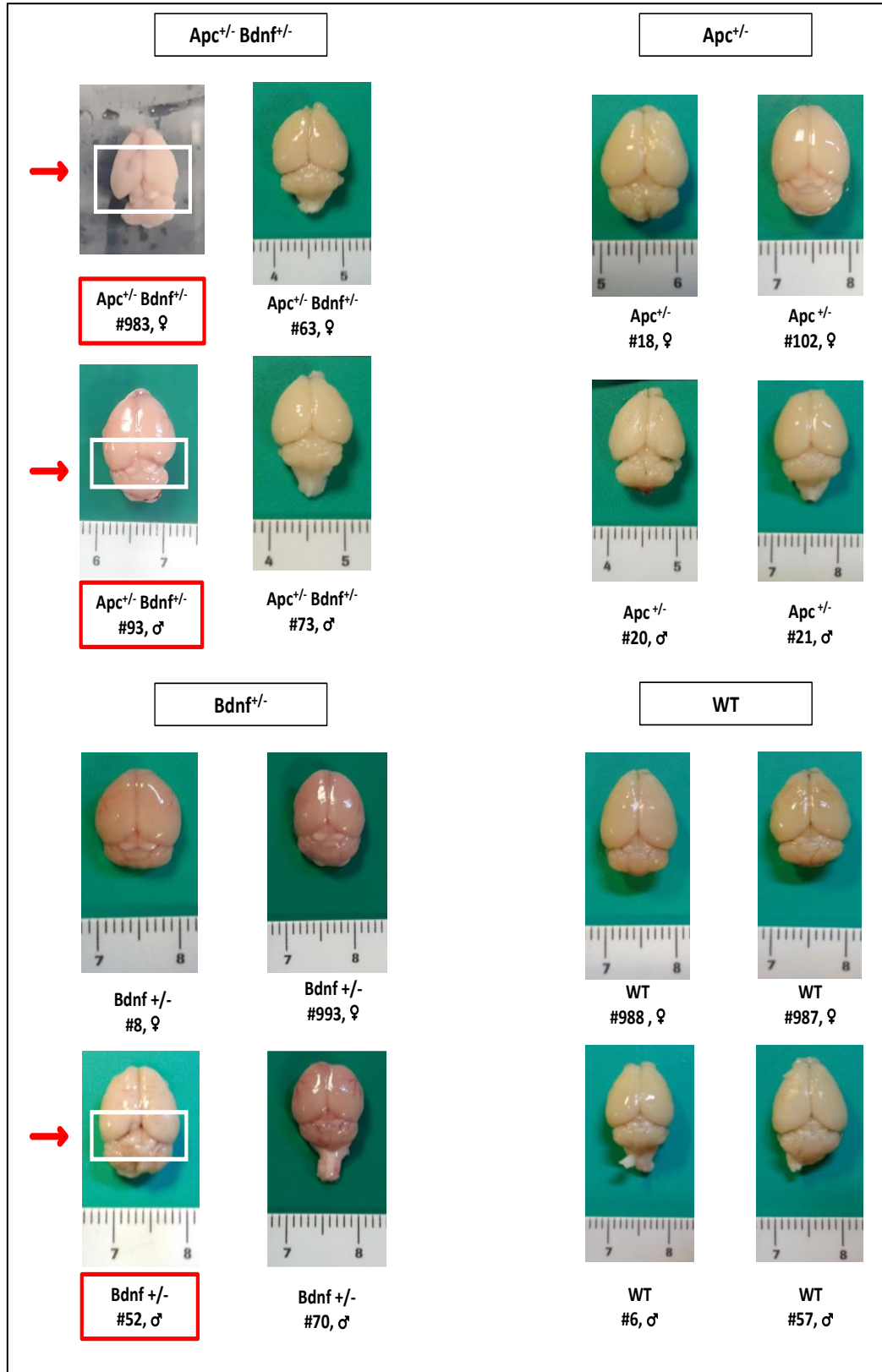
Şekil 4.19. Kantitatif gerçek zamanlı PZR analizinde tüm genlerin aynı dokuda (ince bağırsak mukozası ve tümörü) birlikte gösterimi. Her gruptan bir fare dokusu ile çalışıldı ve deneyler üç kez tekrar edildi.

4.12. Ekstragastrointestinal Sistem İncelemesi ve Diğer Bulgular

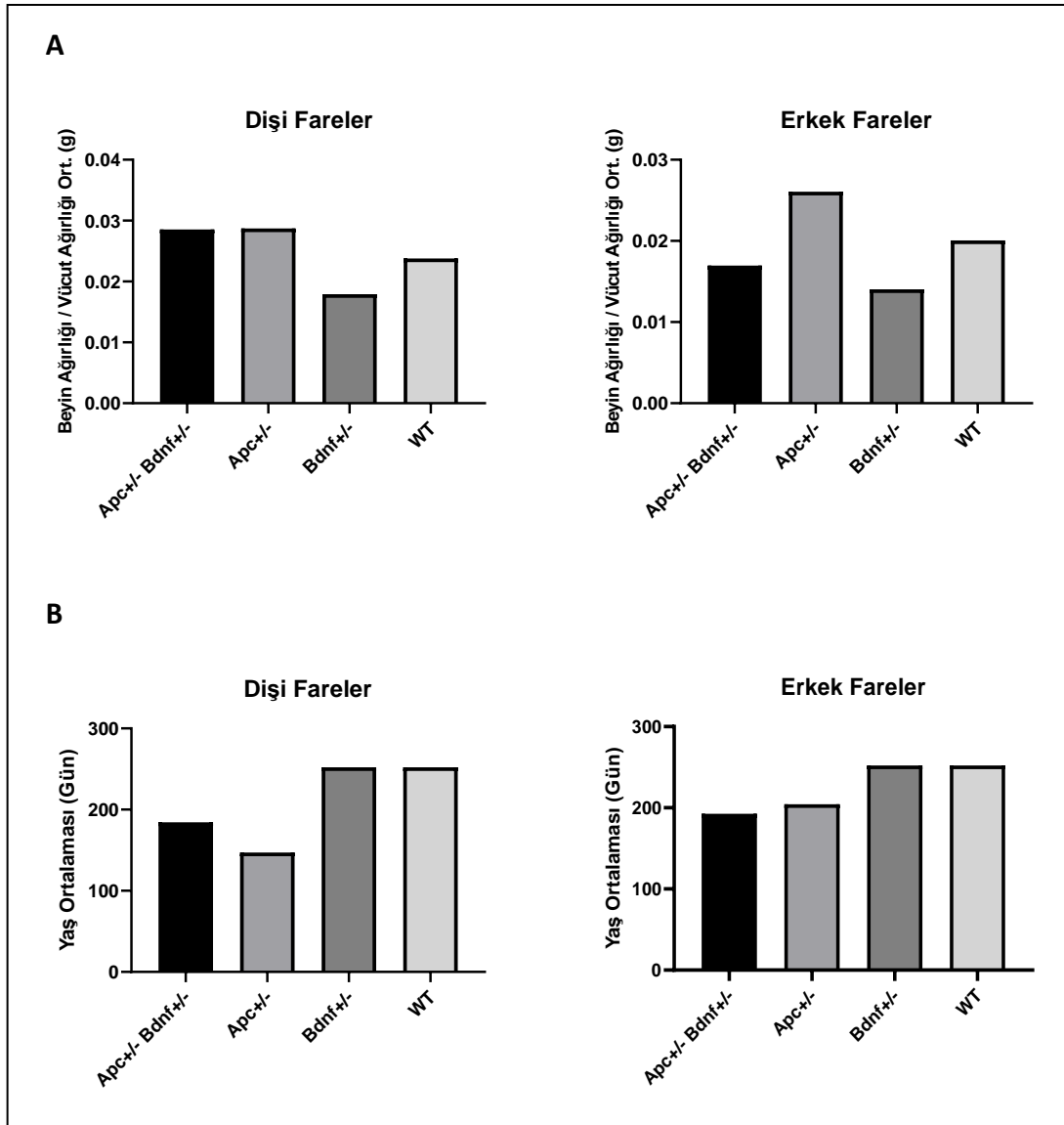
Gastrointestinal sistem diseksiyonu ve makroskopik ve histolojik incelemeleri ile beraber, aynı incelemeler diğer organlar için de değerlendirildi. Bu kapsamda yapılan makroskopik ve histolojik incelemelerde; Bdnf mutant aleli taşıyan gruplardaki bazı farelerin serebral hemisferlerinde asimetri ve morfolojik farklılıklar kaydedildi (Şekil 4.17.). Bu tespit sonrası makroskopik inceleme yapılan tüm gruplarda, beyin anomalisi olan fare sayısı; Bdnf mutant grubunda (n=23) 2 adet, Apc/Bdnf çift mutant grubunda (n=15) 2 adet olarak bulundu. Bunun üzerine, fiksasyon sonrası solid beyin ağırlıkları ölçüldü. Dişi farelerde; *wt*, Bdnf+/- ve Apc+/- fare gruplarında benzer ağırlık tespit edilirken, Apc+/- Bdnf+/- farelerdeki beyin ağırlığının belirgin olarak azaldığı tespit edildi. Erkek farelerde ise; Bdnf+/- ve Apc+/- fare gruplarının beyin ağırlığında, *wt* farelere kıyasla, belirgin azalma olduğu görülürken, Apc+/- Bdnf+/- farelerdeki beyin ağırlığının bu üç gruptaki beyin ağırlıklarından belirgin olarak daha az olduğu görüldü (Şekil 4.16.).



Şekil 4.20. Araştırma gruplarındaki dişi (A) ve erkek (B) farelerin fiksasyon sonrası solid beyin tartımları.

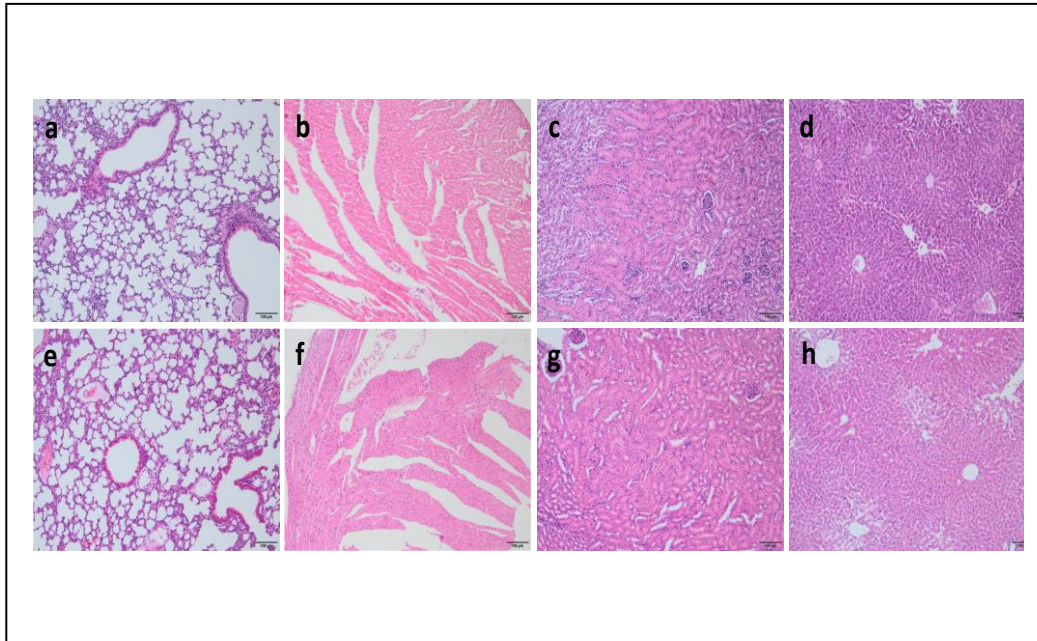


Şekil 4.21. Araştırma gruplarında beyin diseksiyonu örnekleri. Çerçeve içindeki bölge, serebral hemisferler arasında gözlenen asimetriyi gösterir.



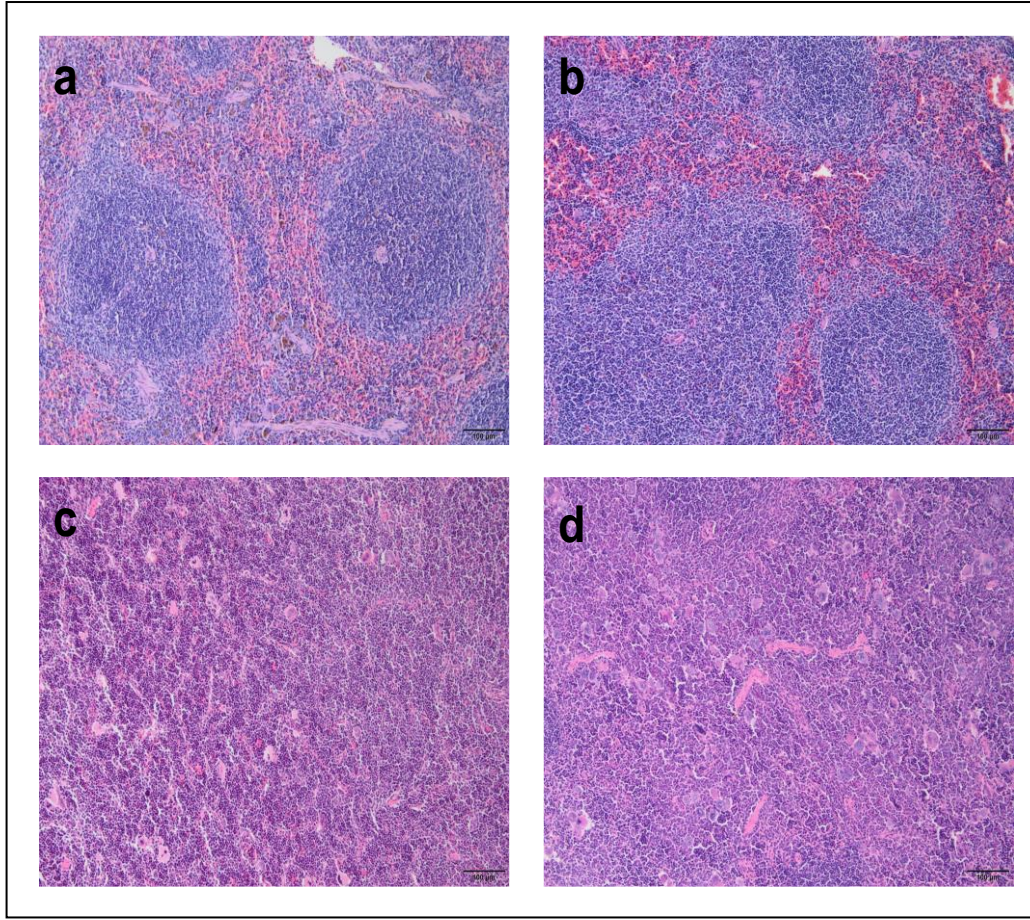
Şekil 4.22. (A) Solid beyin tartımı yapılan dişi ve erkek farelerin beyin ağırlıklarının vücut ağırlıklarına oranlarının ortalamaları (g). (B) Aynı farelerin yaş ortalamaları (gün). Araştırma gruplarında solid beyin tartımı yapılan tüm fareler (n); Apc+/- Bdnf+/-: 7, Apc+/-:6, Bdnf+/-: 11, WT: 20. Taze doku toplama sebebiyle doku bütünlüğü bozulan beyin örneklerinin ağırlıkları dahil edilmedi.

Akciğer, kalp ve böbreklerin hem morfolojik hem de histolojik değerlendirmelerinde anlamlı bir patolojik bulgu gözlenmedi, ancak bazı Bdnf mutant farelerin (n=4) ve Apc/Bdnf çift mutant farelerin (n=17) karaciğerlerinin santral ven çevresinde makrovesiküler yağ değişimi kaydedildi (Şekil 4.18.).

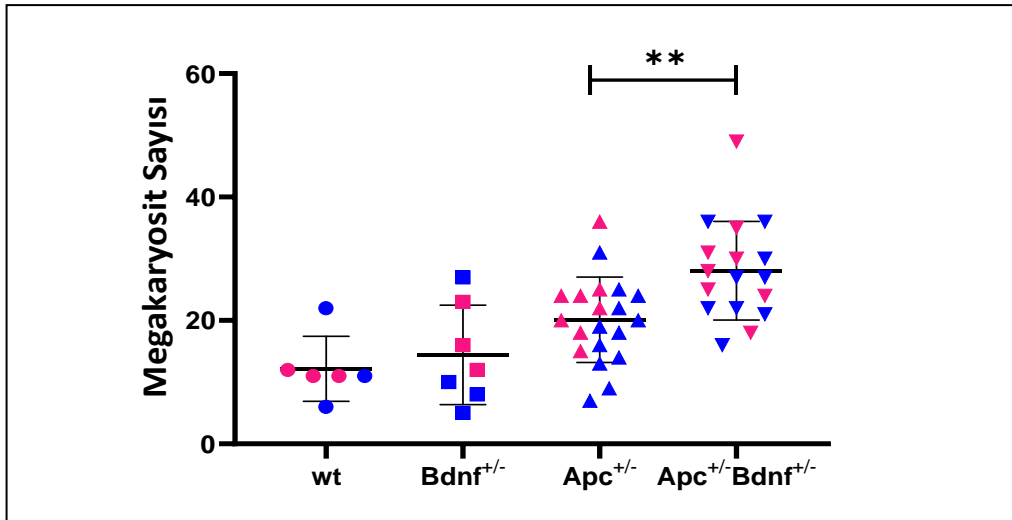


Şekil 4.23. Sırasıyla Apc mutant (a-d) ve Apc/Bdnf çift mutant (e-h) farelerinden alınan akciğer, kalp, böbrek ve karaciğer doku kesitlerinin H&E boyaması. Ölçek çubuğu: 100 µm.

Dalak dokusu incelendiğinde; özellikle Apc mutant aleli taşıyan farelerde lenfoid hiperplazi varlığı dikkat çekti. Yabanıl tip ve Bdnf mutant farelerin dalaklarında beyaz ve kırmızı pulpa ayrımı kolaylıkla yapılabilirken, Apc mutant ve Apc/Bdnf çift mutant farelerin dalaklarında bu ayrım yapılamamıştır. Ayrıca bu farelerde megakaryosit sayısının arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.19.). Bu nedenle megakaryositler mikroskopik olarak sayılmış ve megakaryositlerin gruplara göre dağılımı Şekil 4.20.'de verilmiştir. Buradan da görülebileceği gibi Apc mutant farelerin dalaklarında megakaryosit artışı gözlenmiş ve bu artış Apc/Bdnf çift mutant farelerde daha da fazla olmuş ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.



Şekil 4.24. Sırasıyla *wt*, *Bdnf*, *Apc* ve *Apc/Bdnf* mutant farelerin dalak dokusu kesitlerinin H&E boyamaları (a-d). Ölçek çubuğu: 100 μ m.



Şekil 4.25. Gruplarda dalaktaki her iki yüksek güçlü alan başına megakaryosit sayısı dağılımları. *Mann Whitney-U* testine göre *Apc*^{+/-} ve *Apc*^{+/-}*Bdnf*^{+/-} farelerdeki megakaryosit sayıları karşılaştırıldığında aradaki fark anlamlı bulunmuştur, $P < 0,01$. Pembe renk: dişi fareler, Mavi renk: erkek fareler.

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında; Apc mutasyonu ile indüklenen fare intestinal tümör modelinde Bdnf ifadesinin azaltılmasının etkileri araştırıldı. Çalışma sonucunda fenotipik incelemelerde; Apc mutant farelerde Bdnf ifadesindeki azalmanın ince bağırsaktaki polip sayısını hafifçe azalttığı, kolonda polip oluşumunu belirgin olarak arttırdığı ve sağkalımı değiştirdiği görüldü. Moleküler düzeyde incelediğimizde; Apc+/- Bdnf+/- farelerin intestinal poliplerinde; Bdnf, Trk B, beta katenin ve Lgr5 gen ifadeleri ile matür ve immatür Bdnf ve beta katenin protein düzeylerinin Apc+/- farelere göre azaldığı tespit edildi.

Önceki çalışmalarda, nörotransmitter sinyal yollarının hem KRK hem de mide kanserinde rolü olduğu gösterilmiştir (144,145). BDNF sinyali ile Wnt/ β -katenin yolağının etkileşime girdiğine dair kanıtlar gösteren çalışmalar mevcuttur (146,147). Bu bilgiler ışığında BDNF ve Wnt/ β -katenin yolağının etkileşimi, karsinogenez sürecinde normal fizyolojik süreçlerden ayrı olarak detaylı şekilde çalışılması gereken bir konu olarak düşünülmelidir.

Nörotrofin reseptörlerinden Trk B sinyali, epitel hücrelerini tümörjenezde anoikise dirençli hale getiren spesifik ve güçlü bir sağkalım sinyali üretir, böylece epitel hücreleri güçlü tümörjenik, invaziv ve metastatik kapasiteler kazanır. Trk B sinyali, E-cadherinin aşağı regülasyonu ve vimentinin yukarı regülasyonu gibi EMT benzeri değişimler yoluyla kanser hücresi invazyonu ve metastazını artırır (148,149). Mide kanseri hücreleri BDNF tarafından aktive edildiğinde; Trk B'nin sırasıyla protein kinaz B (Akt) ve ERK gibi aşağı akış sinyal moleküllerini aktive ederek hücre proliferasyonunu arttırdığı ve apoptozu inhibe ettiği bildirilmiştir (128,150). Okugawa ve ark. (2013)'nin çalışması da bu bulguları destekler nitelikte; hücre hatlarında artan proliferatif aktiviteyi ve anoikis direncini göstermektedir. BDNF ile aktive olan tümör hücrelerinde PI3K/AKT ve ERK yolları kemoterapötik ilaçlara duyarsız hücre oluşumuna yol açabilmektedir (122,126). BDNF/Trk B yolağının tümör hücrelerinin proliferasyonunu, sağkalımını, metastazını ve kemoterapiye karşı

direncini arttırdığı gösterilmiştir ve bu nöronal dokular dışında diğer kanser türlerinde de görülebildiği tespit edilmiştir (107).

Yapılan çalışmalarda, kanser hücre hatlarında BDNF ve Trk B mRNA ekspresyon düzeylerinin, normal doku hücrelerine göre daha yüksek oranda olduğu görülmüştür (151). Farias ve ark. (2010)'nın çalışmasına göre; kolorektal adenokarsinom tümör örneklerinde ELISA testi ile BDNF protein miktarına bakıldığında önemli derecede daha yüksek seviyede BDNF proteini varlığı saptanmış iken aynı hastadan alınan neoplastik olmayan komşu dokularda BDNF protein düzeyi daha düşük bulunmuştur. BDNF ve Trk B immünohistokimya analizlerinde, en çok kolorektal tümörlerde ifade edilmiştir ve neoplastik olmayan kolorektal dokularına kıyasla kolorektal kanserlerde BDNF düzeyleri artmıştır (152). Çalışmamızda da Apc+/- fare intestinal polip dokusunda intestinal mukozaya göre yüksek oranda Bdnf ve Trk B ifadesi olduğu tespit edilmiştir. Bu oranın, Bdnf ifadesi azalmış Apc+/- farenin polip dokusunda azaldığı belirlenmiştir. Okugawa ve ark. (2013)'nin çalışmasında, mide kanserli hastalardan elde edilen klinik örneklerde immünohistokimyasal analiz yapıldığında; komşu normal dokulara kıyasla tümörlü dokularda BDNF ifadesinin daha fazla olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda tümör dokusunda invaziv alandaki BDNF ifadesinin merkez alana göre daha fazla olduğu ortaya çıkmıştır. BDNF'in invaziv alanda aşırı ifadesi, mide kanseri hastalarında damar tutulumu, lenf nodu metastazı, peritoneal yayılım ve kötü prognoz ile önemli bir korelasyona sahiptir. BDNF ifadesinin, merkezi alana göre invaziv alandaki ifade artışı kötü prognoz ile ilişkilidir. Aynı zamanda tümör invaziv alanda BDNF ve Trk B'nin birlikte yüksek ifade oluşu, aynı hastalarda lenf nodu metastazı ve kötü prognoz ile önemli ölçüde korele olmaktadır (148).

Yang ve ark. (2013)'nin çalışmasında, kötü prognozlu tümörlerde oldukça yüksek seviyede BDNF ifadesi olduğu gösterilmiştir. İnsan kolon kanserindeki BDNF mRNA düzeylerinin yükseldiği bildirilmiştir. Caco2 ve HRT18 hücre hatlarında BDNF gen ifadesi azaltıldığında, kontrol grubuna kıyasla hücresel proliferasyonun inhibe olduğu görülmüştür. Böylelikle, BDNF'in insan kolon kanseri hücrelerinin

proliferasyonunu kolaylaştırdığı gösterilmiştir (145). Çalışmamızda, Apc+/- mutasyonu olan farelere göre Bdnf ifadesi azaltılmış Apc+/- farelerin poliplerinde proliferatif hücre yoğunluğunun büyük oranda azaldığı tespit edilmiştir. Böylelikle, BDNF'in intestinal tümör hücrelerinin sağkalım ve proliferasyonunu destekleyebileceği sonucu ortaya çıkmıştır.

Tanaka ve ark. (2010)'nın çalışmasında, 8 haftalık erkek immün yetmezli BALB/c farelere DLD1 hücrelerinin intraperitoneal enjekte edilmesi ile oluşturulan peritoneal metastaz modelinde kantitatif analizlere bakıldığında, Trk B reseptör blokajı gerçekleştiğinde (Trk B inhibitörü K252a uygulandığında) anoikis direncinin, metastazın ve kanser hücrelerinin periton boşluğuna kolonizasyonunun engellenebileceği öne sürülmüştür. Son çalışmalarda, BDNF/Trk B sinyalizasyonu aracılı hücre göçüne beta 5 integrinin dahil olduğu, matriks metalloproteinaz-2 ve 9 yoluyla BDNF/Trk B sinyalinin invazyonu indüklediği ve BDNF/Trk B sinyalinin EMT ve anoikis direncine aracılık ettiği gösterilmiştir. (126). BDNF/Trk B yolağı, ankraj bağımlı kanser hücrelerinin programlı ölümüne karşı dirençliliği arttırmaktadır. Ayrıca, BDNF/Trk B up-regülasyonunun metastatik tümör hücrelerinde bulunmasından sonra bu yolağın birçok kanser tipinde anoikise direnci düzenlediği bildirilmiştir. Buna karşın, metastatik olmayan tümör hücrelerinde ve metastaz sonrası sağkalımda başarısız olan tümör hücrelerinde BDNF/Trk B yolağı aktivasyonunun gerçekleşmediği görülmüştür (153). Trk B reseptör aktivasyonu, STAT3 tirozin 705 fosforilasyonunu indüklemektedir ve sonrasında PI3K/Akt sinyal yolağını aktive etmektedir. Böylece bu yolak mTORC1'i aktive edecektir. Sonuç olarak, efektörlerinin direkt fosforilasyonu ile protein sentezi ve hücre sağkalımı artmaktadır. Ayrıca, PI3K/Akt yolağı, Trk B ifadesinin transkripsiyonel bir aktivatörü olan HIF1 α 'nın artması için indüklenebilmektedir. Bu pozitif feedback döngüsü, BDNF/Trk B'nin tümör üzerindeki etkisi artırmakta ve genişletmektedir (154–156). PI3K'nin inhibisyonu, BDNF'nin kanser hücrelerini etopozidden (kemoterapötik ilaç) koruma yeteneğini ortadan kaldırdığı için kemoterapötik etkinliğin genel bir kısıtlayıcısı olan BDNF/Trk B, PI3K/Akt yolağına aracılık ederek bu rolünü göstermektedir (157). PI3K/Akt yolağı, mitokondriyal aracılı veya intrinsik apoptozu kolaylaştıran pro-

apoptotik bir protein olan Bim'in downregülasyonu ile ekstrinsik apoptoza karşı direnci arttırır. Ek olarak, PI3K/Akt yolağı, Fas aracılı kaspaz-8'e bağı apoptozu inhibe etmeye çalışan Fas apoptotik inhibitör molekül 2'nin (FAIM2) upregülasyonunda yer alır (106,122,158). İki olası yolak ayrıca, BDNF'in PI3K/Akt aktivasyonu aracılığıyla anoikislere karşı direnci nasıl arttırdığını açıklamaktadır. EGFR'nin transaktivasyonu PLC γ ekspresyonunu uyarır, bu da hücre içi bölümlerden kalsiyum iyonlarının salınmasına ve diaçilgliserol oluşumuna neden olmaktadır. Diaçilgliserol, karsinogenez ve malign fenotipin korunmasıyla ilişkili protein kinaz C'yi (PKC) aktive edebilmektedir. Ayrıca EGFR, siklin bağımlı kinazları (CDK) ve siklinleri düzenleyerek kanser hücrelerinin G1 fazı ve S fazına ilerlemesine neden olabilir (159,160). EGFR ayrıca Raf, MAPK, sitosolik kinazlar ve nükleer transkripsiyon faktörleri de dahil olmak üzere çok sayıda protein faktörü içeren Ras aktivasyonuna neden olabilir (161,162). Ras'ın aktivasyonu, hücre döngüsünün ilerlemesini hızlandıracak ve kanserli hastaların kötü prognozuna katkıda bulunacaktır (163). Ayrıca, EGFR'nin transaktivasyonunun, meme kanseri, baş ve boyun kanseri ve prostat kanserinde gösterildiği gibi kanseri PI3K/Akt yolu ile düzenlemesi mümkündür (164–166). BDNF/Trk B yolağının, birçok kanser türünde genel olarak upregüle edilen bir büyüme faktörü olan EGFR'yi transaktive ettiği gösterilmiştir. Bu transaktivasyon; embriyonik kortikal nöronların, akciğer kanser hücrelerinin ve over kanser hücrelerinin proliferasyonu ve migrasyonu için önemlidir (167–169). BDNF'in verilmesi, kolon kanserindeki EGFR inhibisyonunun onkolitik rolünü önlemektedir. Ayrıca, BDNF ve EGFR'nin birbirini dengelediği görülmektedir, öyle ki kolon kanser hücrelerinin proliferasyonunu baskılamak için iki yolağın çift yönlü inhibisyonu etkili şekilde çalışmaktadır (170). Ayrıca, BDNF/Trk B yolunun, endojen EGF ligandı olmasa bile EGFR'yi aktifleştirdiği gösterilmiştir. İn vitro bir çalışmada; BDNF uygulanmasının, EGF'nin kültür ortamında mevcut olup olmadığına bakılmaksızın, beklenen Trk B fosforilasyonuna ve ayrıca EGFR fosforilasyonuna yol açtığı gösterilmiştir (168). Merkezi sinir sisteminde, BDNF/Trk B'nin Ras-Raf-MEK-ERK sinyalizasyonunu aktive ettiği ve nöronal farklılaşmayı düzenlediği belgelenmiştir (171). BDNF/Trk B yolunun ayrıca protein kinaz C'nin PLC γ aracılı ekspresyonunu teşvik ederek sinaptik

plastisiteyi düzenlediği gösterilmiştir (172). Son çalışmalar Ras ve PLC aracılı onkogenik rolün BDNF/Trk B tarafından tetiklenebileceğini göstermiştir. Örneğin, BDNF/Trk B, PLCγ stimülasyonu ile NF-kB ekspresyonunu aktive eder ve bu nedenle anoikisleri baskılayarak yumurtalık kanseri hücre sağkalımını artırır (173). BDNF/Trk B'nin, Ras-Raf-MEK-ERK yolunu aktive ederek epitel-mezenkimal geçişin yanı sıra rahim ağzı kanserinin invazyonunu ve metastazını desteklediği de gösterilmiştir (174).

Son çalışmalarda, KKH popülasyonu için tanımlayıcı işaret olan Lgr5'i kullanarak, kanser kök hücrelerinin KRK gelişimini yönlendirmedeki kritik rolünü vurgulamıştır. Örneğin, böbrek kapsülü altına nakledilen hastadan türetilen organoidlerde LGR5+ hücrelerinin ablasyonu, önemli ölçüde tümör gerilemesi ile sonuçlanmıştır (69). Bununla birlikte, ablasyon durdurulduktan sonra, farklılaşmış hücrelerin LGR5'i yeniden ifade ettiği ve tümör ilerlemesini sürdürdüğü gösterilmiştir. Benzer bir çalışma, Lgr5+ popülasyonu hücrelerin seçici olarak öldürülmesinin, Lgr5+ hücrelerinin Lgr5- popülasyonundan hızla yeniden ortaya çıkması nedeniyle, tümör büyümesine müdahale etmediğini göstermiştir (70). Bu sonuçlar, KRK hücrelerinin normal epitel hücrelerinde orijinal olarak gözlemlenen duruma benzer bir plastik potansiyeli koruduğunu ve bu plastisiteyi kanser büyümesini desteklemek için kullandığını ortaya koymaktadır. Bunlara karşın, bu plastisitenin, aynı modelle çalışılan karaciğer metastazlarında gözlenmediği görüldü. Bu durumda, yerel mikroçevrenin KKH dinamiklerini düzenlemede güçlü bir role sahip olduğu görülmektedir (70).

BDNF'in tümör gelişimindeki etkileri haricinde, tokluk ve vücut ağırlığı düzenlemesindeki rolü kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. WAGR sendromu bağlamında hem fare modellerinde hem de insanlarda bir BDNF alelinin kaybı, hiperfaji ve obezite ile ilişkilidir. Diğer beyin bölgelerindeki serotonerjik düzensizlikler de katkıda bulursa da bu fenotipin altında tokluğu kontrol eden hipotalamik sinir devrelerindeki düzensizlikler yatmaktadır (175). Bu fenotipi Bdnf mutant ve Apc/Bdnf çift mutant farelerimizde de gözlemledik. Bununla birlikte, ilginç

bir şekilde, Bdnf mutant farelerinin sadece yarısı, yabancı tipe kıyasla önemli ölçüde fazla kilolu hale gelirken, diğer yarısı kilo almamıştır. Benzer bir fenotip, Kernie ve arkadaşları tarafından gözlemlenmiştir (2000) ancak bu olgunun nedeni hiç araştırılmamıştır (143). Bu tutarsızlığın, alellerden birini bozmak için Bdnf genine yerleştirilen Neo kasetinden kaynaklanabileceğini düşünüyoruz (134). Aslında, tutulan Neo kasetlerin, yerleştirme bölgesinin hem yakınında hem de ötesinde genlerin ekspresyonunu bozabileceği ve beklenmedik fenotiplere neden olabileceği bilinmektedir (176). Bu nedenle, CRISPR/Cas9 veya doku/hücreye özgü mutasyonlar gibi daha belirli yok etme teknikleriyle yeni bir transgenik fare modeli oluşturmak çok önemlidir. Bdnf ekspresyonunun azalmasına karşılık beyinde artan Bdnf ekspresyonu kilo kaybına neden olur (143). Agullo-Ortuño ve ark. (2019), kaşeksisi olan kanser hastalarında, kaşeksisi olmayanlara kıyasla önemli ölçüde artmış BDNF seviyeleri gözlemlenmiştir (177). Bunu destekler şekilde, Apc/Bdnf çift mutant farelerin, özellikle erkeklerin, ömürleri boyunca Apc mutant farelerden daha ağır olduğunu gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, bu farelerin daha fazla metabolik karakterizasyonu, bu etkinin yalnızca Bdnf heterozigotluğunun neden olduğu hiperfajiden mi yoksa sistemik kaşektik düzensizliğin hafifletilmesinden mi kaynaklandığını ayırt etmek için gereklidir.

BDNF, merkezi sinir sistemindeki serotonerjik (5-HT) nöronlar üzerinde trofik etkilere sahiptir. Bdnf mutant farelerde yetişkin erkeğin gelişimi, 5-HT disfonksiyonu ile ilişkilidir. Bdnf mutant farelerde ön beyin 5-HT seviyeleri ve lif yoğunluğu doğum sonrası ilk dönemde normaldir, ancak erken yaşa bağlı düşüşler vardır. Fizyolojik, çevresel ve psikolojik koşulların neden olduğu BDNF ifadesindeki değişiklikler, merkezi 5-HT sistemlerinin işlev bozukluğuna yol açabilir ve özellikle saldırganlık ve dürtüsellik alanında davranış değişikliklerine neden olabilir. ProBDNF ve BDNF'nin genetik olarak tanımlanmış savunma saldırganlığında bir rolü olduğu öne sürülmüştür. Genetik olarak yakından ilişkili ancak sosyal olarak farklı iki farenin müteakip çiftleşmesinden kaynaklanan stres durumunda çeşitli beyin bölgelerinde değiştirilmiş nörotrofin konsantrasyonları bulunmuştur. Ayrıca kortikal ve hipokampal BDNF ve NGF içeriğinin izolasyon nedeniyle agresif davranış ve

aktivitede rol oynadığı gösterilmiştir (178–180). Ayrıca çalışmamızdaki beyin diseksiyonu bulguları, bazı Bdnf mutant farelerde beyin malformasyonu olduğunu gösterdi. Agresif fenotip ve beyin anomalileri radyolojik görüntüleme, fonksiyonel ve davranışsal çalışmalarda daha fazla değerlendirilmelidir.

Apc^{+/-} ve Apc/Bdnf çift mutant farelerde beyaz-kırmızı pulpa ayrımında silinme, dalakta lenfoid ve megakaryositik hiperplazi ve splenomegali gözlemledik. Bu bulgular artmış ekstramedüller hematopoezi düşündürmektedir. Benzer bir fenotip, yaygın olarak kullanılan bir transgenik KRK fare modeli olan ve şiddetli anemi geliştiren ve yaklaşık 15-20 haftalıkken ölen Apc^{Min/+} farelerinde de gözlemlenmiştir (39,181). Bu transgenik farelerde gözlemlenen artmış splenik hematopoez ve megakaryopoez, bağırsak poliplerinden kaynaklanan kronik kan kaybından kaynaklanan anemiye karşı basitçe telafi edici bir mekanizma olabilir. Ancak bu fareler, anemik hale gelmeden önce bu fenotipi yaklaşık 15 haftalıkken geliştirirler (181). Ayrıca anemileri, kronik kan kaybı anemisinde gözlenen mikrositik ve hipoproliferatif durumdan ziyade, artmış retikülositler, dolayısıyla makrositik ve hiperproliferatif durum ile ilişkilidir (39). Bu nedenle, diğer süreçler, Apc^{min/+} farelerinin anemisine ve ekstramedüller hematopoezine katkıda bulunmalıdır. Aslında, yaşlı Apc^{min/+} fareleri, splenomegali, makrositik anemi, olgunlaşmamış eritropoez, nötrofili ve monositoz ile karakterize miyelodisplastik sendrom/miyeloproliferatif hastalık (MDS/MPD) geliştirir (182). Mx1-Cre sistemi ile hematopoietik hücrelerde Apc alellerinden birinin indüklenebilir ve koşullu nakavt edilmesi, nispeten az bağırsak polip oluşumuna rağmen, bu farelerde indüksiyondan 2-3 ay sonra ciddi makrositer aneminin gelişmesine neden oldu. Ekstramedüller ve etkisiz hematopoez bulguları da gözlenmiştir (183). Buna karşılık, çok sayıda polip geliştiren Apc'nin bağırsağa özgü yıkımlandığı fareler sadece hafif derecede anemiktir (142,184). Genel olarak bu gözlemler, Apc heterozigot farelerde gözlenen ekstramedüller hematopoez ve aneminin, çoğunlukla başlangıçtaki miyelodisplazi gelişimine bağlı olarak ileri yaşlarda geliştiğini ve ardından bağırsak poliplerinden kronik kan kaybının geldiğini göstermektedir Apc^{min/+}'a benzer yeni Apc mutant

farelerimizin de gözlemlenen dalak fenotipini açıklayan miyelodisplazi geliştirdiğini düşünüyoruz.

Yeni bir bulgu olarak; *Apc*^{+/-} farelere kıyasla *Apc/Bdnf* çift mutant farelerde 2-yüksek güç alanı başına megakaryosit sayılarında önemli bir artış gözlemledik. Bununla birlikte, *Bdnf*^{+/-} fareleri, vahşi tipe karşılaştırıldığında, yüksek büyütme alanı başına önemli ölçüde farklı splenik megakaryositlere sahip değildi. İnsan megakaryositleri BDNF'yi ve kesik Trk B'yi eksprese eder ancak p75NTR'yi ifade etmez (185,186). Ancak fare megakaryositleri BDNF üretmezler ve Trk B mi yoksa p75NTR mi eksprese ettikleri bilinmemektedir (185). BDNF'nin daha önce Trombopoietin (TPO) uyarımı altında insan megakaryosit hücre dizisi MEG-01'in otokrin/parakrin tarzda proliferasyonunu indüklediği gösterilmiştir (187). Bununla birlikte, BDNF ekspresyonunun olmaması nedeniyle insan benzerlerinden önemli ölçüde farklı olan fare megakaryositlerinde BDNF sinyalinin rolü bilinmemektedir. Deneylerimizde BDNF'in yıkılması, splenik megakaryosit sayılarını yabancı tipe kıyasla değiştirmede, ancak BDNF'nin tek alelinin, B ve T lenfositleri gibi diğer hematopoietik hücre soylarının gelişimi için yeterli olduğu bilinmektedir (188,189). Bu nedenle, BDNF'nin fare megakaryosit gelişimi üzerindeki rolünü araştırmak için *Bdnf* nakavt fareler incelenmelidir. İlginç bir şekilde, bir *Bdnf* alelinin kaybının, artan Wnt/ β -katenin sinyal durumu altında megakaryositler üzerinde artan bir proliferatif kapasite sağladığını gözlemledik. Bu bulgu, BDNF'nin artan Wnt/ β -katenin sinyali altında hiperproliferatif olan megakaryositler üzerinde baskılayıcı bir rolü olduğunu düşündürmektedir. Artan Wnt/ β -katenin sinyali altında proBDNF/p75NTR sinyalinin arttığını ve bunun da öncekinin hiperproliferatif etkilerini antagonize ettiğini varsayıyoruz. İnsan CD34+ hematopoietik progenitör/kök hücreleri (HPSC), önemli miktarlarda hem p75NTR hem de BDNF ifade eder ve olgunlaşma ile ilkinin ifadesini kaybeder (186,190). Bununla birlikte, artan Wnt/ β -katenin sinyali, HPSC'de p75NTR ekspresyonunu ve bu hücrelerde ve/veya kemik iliği ve dalak nişlerindeki diğer hücrelerde proBDNF ekspresyonunu uyarabilir. Serum BDNF seviyeleri yüksek olan kronik lenfositik ve akut lösemi hastalarında daha iyi sonuçlar bildirilmesi de hipotezimizle açıklanabilir (48, 49). Bu hipotezi test etmek için HPSC'de Wnt/ β -

katenin ve BDNF sinyalini yöneten mekanizmaların derinlemesine çalışılması gereklidir.

Kanser, mikro ortamından etkilenir, ancak daha geniş çevresel etkiler de ilerleyişinde rol oynar (191). Çevresel faktörleri ve yaşam tarzı; kanserin başlamasında, ilerlemesinde ve ilerlemesinde oldukça etkilidir. Kanser, makroçevresinden, özellikle bireyin fiziksel ve sosyal çevresi ile etkileşiminden etkilenir, ancak bunların altında yatan mekanizmalar zayıf bir şekilde tanımlanmıştır (192). Bu mekanizmaları daha iyi aydınlatabilmek adına, *in vitro* ve *in vivo* araştırmalar ile beraber gen tedavileri de moleküler incelemeleri derinleştirebilir. Önceden bahsedildiği gibi bazı çalışmalar, BDNF'in kanser hücrelerinin hayatta kalmasını ve direncini artırabileceğini öne sürmektedir. Bu nedenle, BDNF'in kanser gen tedavisi için potansiyel bir hedef veya araç olup olmadığını belirlemek, araştırılmak üzere bekleyen bir sorudur.

BDNF ile ilişkili yapılan gen tedavisi araştırmaları; alzheimer hastalığı, sarmal ganglion nöronları ve retinal ganglion hücre nöroproteksiyonu, akut omurilik yaralanması ve meme kanseri gibi hastalıklar üzerinde incelenmiştir. Bu araştırmalarda genellikle, viral vektör (adenovirüs (AV), adeno ilişkili virüs (AİV)) kullanılarak ilgili hücrelere (Örn. Fibroblast) BDNF gen kasetinin aktarılması, viral vektörle ya da viral olmayan yöntem katyonik nano kabarcık kullanımı ile BDNF gen ifadesinin artırılması gibi uygulamalar seçilmiştir. Elde edilen sonuçlar umut vadeci olmakla birlikte bazı sonuçlar tatmin edici olmamıştır (193–198).

BDNF, hipotalamusta yağ dokusunun tercihli sempatonöral aktivasyonuna ve ardından obezite ve kansere karşı dirence yol açan önemli bir araçtır. BDNF ile ilişkili meme kanseri üzerine yapılan bir çalışmada, BDNF'nin rekombinant adeno-ilişkili viral vektör aracılı aşırı ekspresyonu, gıda alımında değişiklik olmaksızın belirgin kilo kaybına ve adipozitenin azalmasına yol açtığı görülmüştür. BDNF gen tedavisi ile, glikoz toleransının iyileştiği, yağlanmayı hafiflettiği, leptin seviyesini düşürdüğü, fare meme kanseri büyümesini inhibe ettiği ve metastazı önlediği tespit edilmiştir. BDNF ile tedavi, farelerde azalan tümör büyümesi, azalan anjiyogenez, azalan

proliferasyon, artan apoptoz ve azalan adiposit alımı ve lipid birikimi ile ilişkilendirilmiştir. Bu çalışmada ayrıca, BDNF gen tedavisi hipotalamus, meme bezi, deri altı yağ dokusu ve meme tümöründe inflamasyon belirteçlerini azaltmıştır (193). BDNF ile ilişkili kanser gen tedavileri araştırmaları çok az sayıdadır. Kolon kanseri tedavileri için araştırmaları gen tedavisi boyutunda derinleştirmek tedavi stratejilerini geliştirmek için faydalı olabilir.

Çalışmamızda genel olarak; Bdnf ifadesinin azaltılmasının Apc mutant farelerde kilo alımı, hastalık seyri, polip dağılımı, organlardaki makroskopi, histoloji ve patolojik değişimler, hücresel proliferasyon, RNA ve protein düzeyleri ve sağkalım üzerindeki etkilerine odaklandık. Apc^{+/-} farelerde azalmış Bdnf ifadesi; Apc/Bdnf çift mutant farelerin poliplerinde Bdnf, Trk B, β -katenin ve Lgr5 ekspresyonunu ve paralel olarak matür ve immatür Bdnf ile β -katenin protein miktarlarını azaltmıştır. İnce bağırsaktaki polip sayısını az miktarda azaltırken, hastalık fenotipini değiştirerek kolondaki polip sayısını artırmıştır. Böylece, hayatta kalma süresi biraz uzamış ve kilo alma eğilimi artmıştır. Bdnf mutasyonunun varlığı ile; enerji metabolizması, davranış ve gastrointestinal sistem dışındaki dinamiklerde meydana gelen; beyinde hemisferik asimetri oluşumu, Bdnf mutant farelerde agresif tavır ve hiperfaji, A/B çift mutant farelerin dalak dokusunda Apc^{+/-} farelere kıyasla megakaryosit artışı gibi bulguların tümü, sistemik etkilerin de ortaya çıktığını göstermektedir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada; fare intestinal tümör gelişiminin fenotipik ve moleküler düzeyde araştırmaları tamamlandı. Apc+/-, Apc+/- Bdnf+/-, Bdnf+/- ve yabancı tip dişi ve erkek fare grupları 36 hafta boyunca takip edildi. Farelerin kilo alımı, genel durumu, polip yükü ve sağkalımı gibi fenotipik süreçleri incelendi. Bdnf+/- dişi ve erkek fareler takip boyunca belirgin şekilde kilo aldı ve bu grubun yarısı normal vücut ağırlığı aralığında hafif kilo alırken diğer yarısı vücut ağırlığı ortalamasının belirgin şekilde üzerinde kilo aldı. Benzer kilo alım eğilimi Apc+/- Bdnf+/- farelerde de oldu. Apc+/- Bdnf+/- fareler; Apc+/- farelere kıyasla, yaklaşık 5 ay boyunca normal değerler üzerinde kilo aldı ve aynı zamanda, intestinal tümör gelişimine bağlı olarak ortaya çıkan; anemi, zayıflama, kürkte bozulma, postürde bozulma, rektal prolapsus oluşumu gibi hastalık fenotiplerini göstermedi. Tümör gelişimine bağlı semptomlar, Apc+/- farelerde 15. haftadan itibaren görülmeye başlanırken, bu semptomlar Apc+/- Bdnf+/- farelerde 20. haftadan sonra görülmeye başlandı. Apc+/- farelerde polip yükleri değerlendirildiğinde; Apc+/- farelerin ince bağırsağındaki polip sayısı ortalaması, Apc+/- Bdnf+/- farelere göre küçük miktarda daha fazla iken Apc+/- farelerin kolonundaki polip sayısı ortalaması Apc+/- Bdnf+/- farelere kıyasla belirgin olarak daha az bulundu. Ayrıca sağkalım yönünden Bdnf+/- mutasyonuna sahip Apc+/- farelerin sağkalım süresinin, Apc+/- farelere göre yaklaşık 2 ay kadar uzadığı görüldü.

Apc+/- Bdnf+/- farelerdeki intestinal tümör gelişimi Apc+/- fareler ile moleküler düzeyde karşılaştırıldığında; Bdnf ifadesinin azaltılması sonucunda, Apc/Bdnf çift mutant farelerin intestinal poliplerinde matür ve immatür Bdnf ve β -katenin protein düzeylerinin azaldığı görüldü. Her iki grubun intestinal mukoza ve poliplerinden elde edilen RNA düzeyleri karşılaştırıldığında; Apc+/- farelere kıyasla A/B çift mutant farelerde, Bdnf ile beraber Trk B, β -katenin ve Lgr5 ifadelerinde de azalma tespit edildi. Aynı şekilde, her iki grubun tümörlerindeki proliferatif hücre yoğunluğu incelendiğinde, A/B çift mutant farelerin intestinal poliplerinde proliferasyon yoğunluğunun azaldığı gözlemlendi. Bu bulgular dışında sistemik

etkilere baktığımızda; enerji metabolizma ile ilişkili olarak belirgin kilo alımı, nörolojik etkilerle bağıntılı olarak Bdnf+/- farelerde agresif davranış ve hiperfaji, dalak histolojisini incelediğimizde yabancı tip ve Bdnf+/- farelere kıyasla, Apc+/- mutant allele sahip her iki grupta lenfoid hiperplazisine bağlı olarak beyaz ve kırmızı pulpa ayırımında güçlük ve bu iki grup arasında A/B çift mutant farelerin dalaklarında megakaryosit sayısında belirgin olarak artış meydana geldiği görüldü. Bdnf+/- mutasyonunun varlığı, intestinal tümör gelişimi ile ilgili olarak, polip oluşum paterni ve sayısını değiştirmekte, intestinal dokuyu ve intestinal kök hücre dinamiğini moleküler düzeyde değiştirmekte ve sağkalım ve kilo alımı eğilimini belirli bir süre için iyi yöne çevirmektedir.

Sonuçlarımız, intestinal tümör gelişim dinamiklerinde Bdnf/Trk B sinyal yolağının oldukça etkili görevlere sahip olduğunu desteklemektedir. Bdnf mutasyonunun farklı yöntemlerle oluşturulduğu yeni fare modellerinde kolon kanserini incelemek ve moleküler parametreleri genişletmek, bu yolağın intestinal tümör gelişimindeki rolünü aydınlatmak için oldukça faydalı olacaktır. İntestinal kök hücre işleyişi penceresinden parametrelerin genişletilmesi ile tümör gelişim dinamiği daha detaylı aydınlatılabilecektir ve Bdnf'i hedefleyen gen tedavilerine yoğunlaşılması ile yeni tedavi stratejileri elde etmek üzere aydınlatıcı bilgiler elde edilecektir.

7. KAYNAKLAR

1. Souris JS, Zhang HJ, Dougherty U, Chen NT, Waller JV, Lo LW, vd. A novel mouse model of sporadic colon cancer induced by combination of conditional Apc genes and chemical carcinogen in the absence of Cre recombinase. *Carcinogenesis*. 25 2019;40(11):1376-86.
2. Zhang J, Dhakal IB, Zhao Z, Li L. Trends in mortality from cancers of the breast, colon, prostate, esophagus, and stomach in East Asia: role of nutrition transition. *Eur J Cancer Prev*. Eylül 2012;21(5):480-9.
3. Colorectal cancer statistics [Internet]. WCRF International. [a.yer 24 Şubat 2023]. Erişim adresi: <https://www.wcrf.org/cancer-trends/colorectal-cancer-statistics/>
4. Xi Y, Xu P. Global colorectal cancer burden in 2020 and projections to 2040. *Transl Oncol*. Ekim 2021;14(10):101174.
5. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 01 Haziran 1990;61(5):759-67.
6. Peng L, Weigl K, Boakye D, Brenner H. Risk Scores for Predicting Advanced Colorectal Neoplasia in the Average-risk Population: A Systematic Review and Meta-analysis. *Off J Am Coll Gastroenterol ACG*. Aralık 2018;113(12):1788.
7. Wasserman I, Lee LH, Ogino S, Marco MR, Wu C, Chen X, vd. SMAD4 Loss in Colorectal Cancer Patients Correlates with Recurrence, Loss of Immune Infiltrate, and Chemoresistance. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 15 Mart 2019;25(6):1948-56.
8. Aggarwal B, Prasad S, Sung B, Krishnan S, Guha S. Prevention and Treatment of Colorectal Cancer by Natural Agents From Mother Nature. *Curr Colorectal Cancer Rep*. 01 Mart 2013;9(1):37-56.
9. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Kinzler KW. Cancer Genome Landscapes. *Science*. 29 Mart 2013;339(6127):1546-58.
10. Tomasetti C, Vogelstein B. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. *Science*. 02 Ocak 2015;347(6217):78-81.
11. Pan T, Xu J, Zhu Y. Self-renewal molecular mechanisms of colorectal cancer stem cells. *Int J Mol Med*. Ocak 2017;39(1):9-20.
12. Markowitz SD, Bertagnolli MM. Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *N Engl J Med*. 17 Aralık 2009;361(25):2449-60.
13. Zhang B, Wang J, Wang X, Zhu J, Liu Q, Shi Z, vd. Proteogenomic characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*. 18 Eylül 2014;513(7518):382-7.

14. Bissahoyo A, Pearsall RS, Hanlon K, Amann V, Hicks D, Godfrey VL, vd. Azoxymethane is a genetic background-dependent colorectal tumor initiator and promoter in mice: effects of dose, route, and diet. *Toxicol Sci Off J Soc Toxicol*. Aralık 2005;88(2):340-5.
15. De Sousa E Melo F, Vermeulen L, Fessler E, Medema JP. Cancer heterogeneity--a multifaceted view. *EMBO Rep*. Ağustos 2013;14(8):686-95.
16. Zeuner A, Todaro M, Stassi G, De Maria R. Colorectal Cancer Stem Cells: From the Crypt to the Clinic. *Cell Stem Cell*. Aralık 2014;15(6):692-705.
17. Vaiopoulos AG, Kostakis ID, Koutsilieris M, Papavassiliou AG. Colorectal Cancer Stem Cells. *STEM CELLS*. 2012;30(3):363-71.
18. Barker N, Ridgway RA, van Es JH, van de Wetering M, Begthel H, van den Born M, vd. Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. *Nature*. Ocak 2009;457(7229):608-11.
19. Schepers AG, Snippert HJ, Stange DE, Born M van den, Es JH van, Wetering M van de, vd. Lineage Tracing Reveals Lgr5+ Stem Cell Activity in Mouse Intestinal Adenomas. *Science*. 10 Ağustos 2012;337(6095):730-5.
20. Foretova L, Petrakova K, Palacova M, Kalabova R, Svoboda M, Navratilova M, vd. Genetic testing and prevention of hereditary cancer at the MMCI--over 10 years of experience. *Klin Onkol Cas Ceske Slov Onkol Spolecnosti*. 2010;23(6):388-400.
21. Nguyen TLA, Vieira-Silva S, Liston A, Raes J. How informative is the mouse for human gut microbiota research? *Dis Model Mech*. Ocak 2015;8(1):1-16.
22. Treuting PM, PhD SD MD, Frevert CW, Liggitt D, Montine KS. *Comparative Anatomy and Histology: A Mouse and Human Atlas (Expert Consult)*. Academic Press; 2012. 475 s.
23. Nüsslein-Volhard C, Wieschaus E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature*. Ekim 1980;287(5785):795-801.
24. Sharma RP. Wingless a new mutant in *Drosophila melanogaster* [Internet]. 1973 [a.yer 25 Haziran 2020]. Erişim adresi: /paper/Wingless-a-new-mutant-in-Drosophila-melanogaster-Sharma/f6d1d4f1c0654a2883eee80b20382b84165505fd
25. Fragoso MA, Yi H, Nakamura REI, Hackam AS. The Wnt Signaling Pathway Protects Retinal Ganglion Cell 5 (RGC-5) Cells from Elevated Pressure. *Cell Mol Neurobiol*. Ocak 2011;31(1):163-73.
26. Hatzis P, van der Flier LG, van Driel MA, Guryev V, Nielsen F, Denissov S, vd. Genome-wide pattern of TCF7L2/TCF4 chromatin occupancy in colorectal cancer cells. *Mol Cell Biol*. Nisan 2008;28(8):2732-44.

27. Korinek V, Barker N, Morin PJ, van Wichen D, de Weger R, Kinzler KW, vd. Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma. *Science*. 21 Mart 1997;275(5307):1784-7.
28. Sato T, van Es JH, Snippert HJ, Stange DE, Vries RG, van den Born M, vd. Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature*. Ocak 2011;469(7330):415-8.
29. McCarthy N, Kraiczy J, Shivdasani RA. Cellular and molecular architecture of the intestinal stem cell niche. *Nat Cell Biol*. Eylül 2020;22(9):1033-41.
30. van Neerven SM, Vermeulen L. The interplay between intrinsic and extrinsic Wnt signaling in controlling intestinal transformation. *Differentiation*. 01 Temmuz 2019;108:17-23.
31. Nusse R, Clevers H. Wnt/ β -Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. *Cell*. 01 Haziran 2017;169(6):985-99.
32. Stastna M, Janeckova L, Hrckulak D, Kriz V, Korinek V. Human Colorectal Cancer from the Perspective of Mouse Models. *Genes*. 11 2019;10(10).
33. Nishisho I, Nakamura Y, Miyoshi Y, Miki Y, Ando H, Horii A, vd. Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science*. 09 Ağustos 1991;253(5020):665-9.
34. Polakis P. Wnt signaling and cancer. *Genes Dev*. 01 Ağustos 2000;14(15):1837-51.
35. Shao L, Oshima S, Duong B, Advincula R, Barrera J, Malynn BA, vd. A20 restricts wnt signaling in intestinal epithelial cells and suppresses colon carcinogenesis. *PloS One*. 2013;8(5):e62223.
36. Rubinfeld B, Albert I, Porfiri E, Fiol C, Munemitsu S, Polakis P. Binding of GSK3beta to the APC-beta-catenin complex and regulation of complex assembly. *Science*. 17 Mayıs 1996;272(5264):1023-6.
37. Behrens J, Jerchow BA, Würtele M, Grimm J, Asbrand C, Wirtz R, vd. Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC, and GSK3beta. *Science*. 24 Nisan 1998;280(5363):596-9.
38. Hayashi S, Rubinfeld B, Souza B, Polakis P, Wieschaus E, Levine AJ. A *Drosophila* homolog of the tumor suppressor gene adenomatous polyposis coli down-regulates beta-catenin but its zygotic expression is not essential for the regulation of Armadillo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 07 Ocak 1997;94(1):242-7.
39. Moser AR, Pitot HC, Dove WF. A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse. *Science*. 19 Ocak 1990;247(4940):322-4.

40. Moser AR, Luongo C, Gould KA, McNeley MK, Shoemaker AR, Dove WF. ApcMin: a mouse model for intestinal and mammary tumorigenesis. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. Ağustos 1995;31A(7-8):1061-4.
41. Moser AR, Dove WF, Roth KA, Gordon JI. The Min (multiple intestinal neoplasia) mutation: its effect on gut epithelial cell differentiation and interaction with a modifier system. *J Cell Biol.* Mart 1992;116(6):1517-26.
42. Svendsen C, Alexander J, Knutsen HK, Husøy T. The min mouse on FVB background: susceptibility to spontaneous and carcinogen-induced intestinal tumorigenesis. *Anticancer Res.* Mart 2011;31(3):785-8.
43. Steffensen IL, Alexander J. Impact of genetic background on spontaneous or 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)-induced intestinal tumorigenesis in Min/+ mice. *Cancer Lett.* 28 Ağustos 2006;240(2):289-96.
44. Moser AR, Hegge LF, Cardiff RD. Genetic background affects susceptibility to mammary hyperplasias and carcinomas in Apc(min)/+ mice. *Cancer Res.* 15 Nisan 2001;61(8):3480-5.
45. Akyol A. AKYOL_AYTEKİN_TÜBİTAK_ProjeNo_215S926.pdf. 2018.
46. Wright NA, Alison M. The biology of epithelial cell populations. Oxford [Oxfordshire], New York: Clarendon Press ; Oxford University Press; 1984. 2 s. (Oxford science publications).
47. Ireland H, Houghton C, Howard L, Winton DJ. Cellular inheritance of a Cre-activated reporter gene to determine Paneth cell longevity in the murine small intestine. *Dev Dyn Off Publ Am Assoc Anat.* Ağustos 2005;233(4):1332-6.
48. Rothenberg ME, Nusse Y, Kalisky T, Lee JJ, Dalerba P, Scheeren F, vd. Identification of a cKit(+) colonic crypt base secretory cell that supports Lgr5(+) stem cells in mice. *Gastroenterology.* Mayıs 2012;142(5):1195-1205.e6.
49. Pellegrinet L, Rodilla V, Liu Z, Chen S, Koch U, Espinosa L, vd. Dll1- and dll4-mediated notch signaling are required for homeostasis of intestinal stem cells. *Gastroenterology.* Nisan 2011;140(4):1230-1240.e1-7.
50. Riccio O, van Gijn ME, Bezdek AC, Pellegrinet L, van Es JH, Zimmer-Strobl U, vd. Loss of intestinal crypt progenitor cells owing to inactivation of both Notch1 and Notch2 is accompanied by derepression of CDK inhibitors p27Kip1 and p57Kip2. *EMBO Rep.* Nisan 2008;9(4):377-83.
51. Guiu J, Jensen KB. From Definitive Endoderm to Gut—a Process of Growth and Maturation. *Stem Cells Dev.* Eylül 2015;24(17):1972-83.
52. Guiu J, Hannezo E, Yui S, Demharter S, Ulyanchenko S, Maimets M, vd. Tracing the origin of adult intestinal stem cells. *Nature.* Haziran 2019;570(7759):107-11.

53. Bruens L, Ellenbroek SIJ, van Rheenen J, Snippert HJ. In Vivo Imaging Reveals Existence of Crypt Fission and Fusion in Adult Mouse Intestine. *Gastroenterology*. Eylül 2017;153(3):674-677.e3.
54. Barker N, van Es JH, Kuipers J, Kujala P, van den Born M, Cozijnsen M, vd. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature*. Ekim 2007;449(7165):1003-7.
55. Kozar S, Morrissey E, Nicholson AM, van der Heijden M, Zecchini HI, Kemp R, vd. Continuous Clonal Labeling Reveals Small Numbers of Functional Stem Cells in Intestinal Crypts and Adenomas. *Cell Stem Cell*. 07 Kasım 2013;13(5):626-33.
56. Nicholson AM, Olpe C, Hoyle A, Thorsen AS, Rus T, Colombé M, vd. Fixation and Spread of Somatic Mutations in Adult Human Colonic Epithelium. *Cell Stem Cell*. 2018;22(6):909-918.e8.
57. Ritsma L, Ellenbroek SIJ, Zomer A, Snippert HJ, de Sauvage FJ, Simons BD, vd. Intestinal crypt homeostasis revealed at single-stem-cell level by in vivo live imaging. *Nature*. Mart 2014;507(7492):362-5.
58. van der Heijden M, Zimmerlin CD, Nicholson AM, Colak S, Kemp R, Meijer SL, vd. Bcl-2 is a critical mediator of intestinal transformation. *Nat Commun*. 09 Mart 2016;7(1):10916.
59. Schwitalla S, Fingerle AA, Cammareri P, Nebelsiek T, Göktuna SI, Ziegler PK, vd. Intestinal tumorigenesis initiated by dedifferentiation and acquisition of stem-cell-like properties. *Cell*. 17 Ocak 2013;152(1-2):25-38.
60. Perekatt AO, Shah PP, Cheung S, Jariwala N, Wu A, Gandhi V, vd. SMAD4 Suppresses WNT-Driven Dedifferentiation and Oncogenesis in the Differentiated Gut Epithelium. *Cancer Res*. 01 Eylül 2018;78(17):4878-90.
61. Cammareri P, Vincent DF, Hodder MC, Ridgway RA, Murgia C, Nobis M, vd. TGF β pathway limits dedifferentiation following WNT and MAPK pathway activation to suppress intestinal tumorigenesis. *Cell Death Differ*. Ekim 2017;24(10):1681-93.
62. Hayakawa Y, Tsuboi M, Asfaha S, Kinoshita H, Niikura R, Konishi M, vd. BHLHA15-Positive Secretory Precursor Cells Can Give Rise to Tumors in Intestine and Colon in Mice. *Gastroenterology*. 01 Mart 2019;156(4):1066-1081.e16.
63. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov*. 12 Ocak 2022;12(1):31-46.
64. Spit M, Koo BK, Maurice MM. Tales from the crypt: intestinal niche signals in tissue renewal, plasticity and cancer. *Open Biol*. 12 Eylül 2018;8(9):180120.

65. Lopez-Garcia C, Klein AM, Simons BD, Winton DJ. Intestinal Stem Cell Replacement Follows a Pattern of Neutral Drift. *Science*. 05 Kasım 2010;330(6005):822-5.
66. Snippert HJ, van der Flier LG, Sato T, van Es JH, van den Born M, Kroon-Veenboer C, vd. Intestinal Crypt Homeostasis Results from Neutral Competition between Symmetrically Dividing Lgr5 Stem Cells. *Cell*. 01 Ekim 2010;143(1):134-44.
67. Baker AM, Cereser B, Melton S, Fletcher AG, Rodriguez-Justo M, Tadrous PJ, vd. Quantification of Crypt and Stem Cell Evolution in the Normal and Neoplastic Human Colon. *Cell Rep*. 21 Ağustos 2014;8(4):940-7.
68. Cortina C, Turon G, Stork D, Hernando-Momblona X, Sevillano M, Aguilera M, vd. A genome editing approach to study cancer stem cells in human tumors. *EMBO Mol Med*. Temmuz 2017;9(7):869-79.
69. Shimokawa M, Ohta Y, Nishikori S, Matano M, Takano A, Fujii M, vd. Visualization and targeting of LGR5+ human colon cancer stem cells. *Nature*. Mayıs 2017;545(7653):187-92.
70. de Sousa e Melo F, Kurtova AV, Harnoss JM, Kljavin N, Hoeck JD, Hung J, vd. A distinct role for Lgr5+ stem cells in primary and metastatic colon cancer. *Nature*. 29 Mart 2017;543(7647):676-80.
71. Vermeulen L, De Sousa E Melo F, van der Heijden M, Cameron K, de Jong JH, Borovski T, vd. Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. *Nat Cell Biol*. Mayıs 2010;12(5):468-76.
72. Barbacid M. The Trk family of neurotrophin receptors. *J Neurobiol*. Kasım 1994;25(11):1386-403.
73. Thomas K, Davies A. Neurotrophins: A Ticket to Ride for BDNF. *Curr Biol*. Nisan 2005;15(7):R262-4.
74. Huang EJ, Reichardt LF. Neurotrophins: Roles in Neuronal Development and Function. *Annu Rev Neurosci*. Mart 2001;24(1):677-736.
75. Hempstead BL. Dissecting the diverse actions of pro- and mature neurotrophins. *Curr Alzheimer Res*. Şubat 2006;3(1):19-24.
76. Hwang JJ, Park MH, Choi SY, Koh JY. Activation of the Trk Signaling Pathway by Extracellular Zinc ROLE OF METALLOPROTEINASES. *J Biol Chem*. 25 Mart 2005;280(12):11995-2001.
77. Barde YA, Edgar D, Thoenen H. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J*. Mayıs 1982;1(5):549-53.

78. Huang YT, Lai PC, Wu CC, Hsu SH, Cheng CC, Lan YF, vd. BDNF mediated TrkB activation is a survival signal for transitional cell carcinoma cells. *Int J Oncol.* Haziran 2010;36(6):1469-76.
79. Zhang S, Guo D, Luo W, Zhang Q, Zhang Y, Li C, vd. TrkB is highly expressed in NSCLC and mediates BDNF-induced the activation of Pyk2 signaling and the invasion of A549 cells. *BMC Cancer.* Aralık 2010;10(1):43.
80. DeWitt J, Ochoa V, Urschitz J, Elston M, Moisyadi S, Nishi R. Constitutively active TrkB confers an aggressive transformed phenotype to a neural crest-derived cell line. *Oncogene.* Şubat 2014;33(8):977-85.
81. Marosi K, Mattson MP. BDNF mediates adaptive brain and body responses to energetic challenges. *Trends Endocrinol Metab TEM.* Şubat 2014;25(2):89-98.
82. Mattson MP, Maudsley S, Martin B. BDNF and 5-HT: a dynamic duo in age-related neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci.* 01 Ekim 2004;27(10):589-94.
83. Murray PS, Holmes PV. An Overview of Brain-Derived Neurotrophic Factor and Implications for Excitotoxic Vulnerability in the Hippocampus. *Int J Pept.* 2011;2011:654085.
84. Bekinschtein P, Cammarota M, Izquierdo I, Medina JH. BDNF and memory formation and storage. *Neurosci Rev J Bringing Neurobiol Neurol Psychiatry.* Nisan 2008;14(2):147-56.
85. Pruunsild P, Kazantseva A, Aid T, Palm K, Timmusk T. Dissecting the human BDNF locus: bidirectional transcription, complex splicing, and multiple promoters. *Genomics.* Eylül 2007;90(3):397-406.
86. Matsuda N, Lu H, Fukata Y, Noritake J, Gao H, Mukherjee S, vd. Differential activity-dependent secretion of brain-derived neurotrophic factor from axon and dendrite. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 11 Kasım 2009;29(45):14185-98.
87. Dieni S, Matsumoto T, Dekkers M, Rauskolb S, Ionescu MS, Deogracias R, vd. BDNF and its pro-peptide are stored in presynaptic dense core vesicles in brain neurons. *J Cell Biol.* 19 Mart 2012;196(6):775-88.
88. BINDER DK, SCHARFMAN HE. Brain-derived Neurotrophic Factor. *Growth Factors Chur Switz.* Eylül 2004;22(3):123-31.
89. Yamamoto H, Gurney ME. Human platelets contain brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* Kasım 1990;10(11):3469-78.
90. Koskela M, Bäck S, Võikar V, Richie CT, Domanskyi A, Harvey BK, vd. Update of neurotrophic factors in neurobiology of addiction and future directions. *Neurobiol Dis.* Ocak 2017;97(Pt B):189-200.

91. Koshimizu H, Kiyosue K, Hara T, Hazama S, Suzuki S, Uegaki K, vd. Multiple functions of precursor BDNF to CNS neurons: negative regulation of neurite growth, spine formation and cell survival. *Mol Brain*. 13 Ağustos 2009;2:27.
92. De Vincenti AP, Ríos AS, Paratcha G, Ledda F. Mechanisms That Modulate and Diversify BDNF Functions: Implications for Hippocampal Synaptic Plasticity. *Front Cell Neurosci* [İnternet]. 2019 [a.yer 30 Ağustos 2022];13. Erişim adresi: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2019.00135>
93. Pang PT, Teng HK, Zaitsev E, Woo NT, Sakata K, Zhen S, vd. Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. *Science*. 01 Ekim 2004;306(5695):487-91.
94. Teng HK, Teng KK, Lee R, Wright S, Tevar S, Almeida RD, vd. ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 01 Haziran 2005;25(22):5455-63.
95. Noble EE, Billington CJ, Kotz CM, Wang C. The lighter side of BDNF. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol*. Mayıs 2011;300(5):R1053-69.
96. Klein R, Nanduri V, Jing S, Lamballe F, Tapley P, Bryant S, vd. The trkB Tyrosine Protein Kinase Is a Receptor for Brain-Derived Neurotrophic Factor and Neurotrophin-3. *Cell*. 26 Temmuz 1991;66(2):395-403.
97. Woo NH, Teng HK, Siao CJ, Chiaruttini C, Pang PT, Milner TA, vd. Activation of p75NTR by proBDNF facilitates hippocampal long-term depression. *Nat Neurosci*. Ağustos 2005;8(8):1069-77.
98. Yuan D, Zhao Y, Banks WA, Bullock KM, Haney M, Batrakova E, vd. Macrophage exosomes as natural nanocarriers for protein delivery to inflamed brain. *Biomaterials*. Ekim 2017;142:1-12.
99. Wilson CM, Magnaudeix A, Naves T, Vincent F, Lalloue F, Jauberteau MO. The Ins and Outs of Nanoparticle Technology in Neurodegenerative Diseases and Cancer. *Curr Drug Metab*. 2015;16(8):609-32.
100. Mizui T, Ishikawa Y, Kumanogoh H, Lume M, Matsumoto T, Hara T, vd. BDNF pro-peptide actions facilitate hippocampal LTD and are altered by the common BDNF polymorphism Val66Met. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 09 Haziran 2015;112(23):E3067-3074.
101. Ibáñez CF. Emerging themes in structural biology of neurotrophic factors. *Trends Neurosci*. Ekim 1998;21(10):438-44.
102. Mowla SJ, Farhadi HF, Pareek S, Atwal JK, Morris SJ, Seidah NG, vd. Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor. *J Biol Chem*. 20 Nisan 2001;276(16):12660-6.

- 103.** Lee R, Kermani P, Teng KK, Hempstead BL. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science*. 30 Kasım 2001;294(5548):1945-8.
- 104.** Seidah NG, Mowla SJ, Hamelin J, Mamarbachi AM, Benjannet S, Touré BB, vd. Mammalian subtilisin/kexin isozyme SKI-1: A widely expressed proprotein convertase with a unique cleavage specificity and cellular localization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 16 Şubat 1999;96(4):1321-6.
- 105.** Yi H, Nakamura REI, Mohamed O, Dufort D, Hackam AS. Characterization of Wnt Signaling during Photoreceptor Degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. Aralık 2007;48(12):5733-41.
- 106.** Jaboin J, Kim CJ, Kaplan DR, Thiele CJ. Brain-derived neurotrophic factor activation of TrkB protects neuroblastoma cells from chemotherapy-induced apoptosis via phosphatidylinositol 3'-kinase pathway. *Cancer Res*. 15 Kasım 2002;62(22):6756-63.
- 107.** Thiele CJ, Li Z, McKee AE. "On Trk" - the TrkB signal transduction pathway is an increasingly important target in cancer biology. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 01 Ekim 2009;15(19):5962-7.
- 108.** Patani N, Jiang WG, Mokbel K. Brain-derived neurotrophic factor expression predicts adverse pathological & clinical outcomes in human breast cancer. *Cancer Cell Int*. 2011;11(1):23.
- 109.** Meng L, Liu B, Ji R, Jiang X, Yan X, Xin Y. Targeting the BDNF/TrkB pathway for the treatment of tumors. *Oncol Lett*. Şubat 2019;17(2):2031-9.
- 110.** Zhang S yang, Hui L ping, Li C yan, Gao J, Cui Z shi, Qiu X shan. More expression of BDNF associates with lung squamous cell carcinoma and is critical to the proliferation and invasion of lung cancer cells. *BMC Cancer*. Aralık 2016;16(1):171.
- 111.** Jia S, Wang W, Hu Z, Shan C, Wang L, Wu B, vd. BDNF mediated TrkB activation contributes to the EMT progression and the poor prognosis in human salivary adenoid cystic carcinoma. *Oral Oncol*. 01 Ocak 2015;51(1):64-70.
- 112.** Huang SM, Lin C, Lin HY, Chiu CM, Fang CW, Liao KF, vd. Brain-derived neurotrophic factor regulates cell motility in human colon cancer. *Endocr Relat Cancer*. Haziran 2015;22(3):455-64.
- 113.** Yang JW, Ru J, Ma W, Gao Y, Liang Z, Liu J, vd. BDNF promotes the growth of human neurons through crosstalk with the Wnt/ β -catenin signaling pathway via GSK-3 β . *Neuropeptides*. Aralık 2015;54:35-46.
- 114.** Yi H, Hu J, Qian J, Hackam AS. Expression of brain-derived neurotrophic factor is regulated by the Wnt signaling pathway: *NeuroReport*. Şubat 2012;23(3):189-94.

- 115.** Lim JY, Park SI, Oh JH, Kim SM, Jeong CH, Jun JA, vd. Brain-derived neurotrophic factor stimulates the neural differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells and survival of differentiated cells through MAPK/ERK and PI3K/Akt-dependent signaling pathways. *J Neurosci Res.* 2008;86(10):2168-78.
- 116.** Lim JY, Park SI, Kim SM, Jun JA, Oh JH, Ryu CH, vd. Neural Differentiation of Brain-Derived Neurotrophic Factor-Expressing Human Umbilical Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells in Culture via TrkB-Mediated ERK and β -Catenin Phosphorylation and following Transplantation into the Developing Brain. *Cell Transplant.* 01 Aralık 2011;20(11-12):1855-66.
- 117.** Mullen LM, Pak KK, Chavez E, Kondo K, Brand Y, Ryan AF. Ras/p38 and PI3K/Akt but not Mek/Erk signaling mediate BDNF-induced neurite formation on neonatal cochlear spiral ganglion explants. *Brain Res.* 09 Ocak 2012;1430:25-34.
- 118.** Bamji SX, Rico B, Kimes N, Reichardt LF. BDNF mobilizes synaptic vesicles and enhances synapse formation by disrupting cadherin- β -catenin interactions. *J Cell Biol* [Internet]. 2006 [a.yer 08 Mayıs 2022]; Erişim adresi: https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=BDNF+mobilizes+synaptic+vesicles+and+enhances+synapse+formation+by+disrupting+cadherin-%CE%B2-catenin+interactions&author=Bamji%2C+Shernaz+X.&publication_year=2006
- 119.** Hutchison MR. BDNF Alters ERK/p38 MAPK Activity Ratios to Promote Differentiation in Growth Plate Chondrocytes. *Mol Endocrinol.* 01 Ağustos 2012;26(8):1406-16.
- 120.** Pilar-Cuéllar F, Vidal R, Pazos A. Subchronic treatment with fluoxetine and ketanserin increases hippocampal brain-derived neurotrophic factor, β -catenin and antidepressant-like effects. *Br J Pharmacol.* Şubat 2012;165(4b):1046-57.
- 121.** Sun C yan, Hu Y, Huang J, Chu Z bo, Zhang L, She X mei, vd. Brain-derived neurotrophic factor induces proliferation, migration, and VEGF secretion in human multiple myeloma cells via activation of MEK-ERK and PI3K/AKT signaling. *Tumor Biol.* 01 Nisan 2010;31(2):121-8.
- 122.** Li Z, Zhang J, Liu Z, Woo CW, Thiele CJ. Downregulation of Bim by brain-derived neurotrophic factor activation of TrkB protects neuroblastoma cells from paclitaxel but not etoposide or cisplatin-induced cell death. *Cell Death Differ.* Şubat 2007;14(2):318-26.
- 123.** Brunetto de Farias C, Rosemberg DB, Heinen TE, Koehler-Santos P, Abujamra AL, Kapczinski F, vd. BDNF/TrkB Content and Interaction with Gastrin-Releasing Peptide Receptor Blockade in Colorectal Cancer. *Oncology.* 2010;79(5-6):430-9.
- 124.** Meldolesi J. Neurotrophin Trk Receptors: New Targets for Cancer Therapy. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 2018;174:67-79.

- 125.** Okamura K, Harada T, Wang S, Ijichi K, Furuyama K, Koga T, vd. Expression of TrkB and BDNF is associated with poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 01 Ekim 2012;78(1):100-6.
- 126.** Tanaka K, Okugawa Y, Toiyama Y, Inoue Y, Saigusa S, Kawamura M, vd. Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF)-Induced Tropomyosin-Related Kinase B (Trk B) Signaling Is a Potential Therapeutic Target for Peritoneal Carcinomatosis Arising from Colorectal Cancer. Coppola V, editör. *PLoS ONE*. 06 Mayıs 2014;9(5):e96410.
- 127.** Vanhecke E, Adriaenssens E, Verbeke S, Meignan S, Germain E, Berteaux N, vd. Brain-Derived Neurotrophic Factor and Neurotrophin-4/5 Are Expressed in Breast Cancer and Can Be Targeted to Inhibit Tumor Cell Survival. *Clin Cancer Res*. 01 Nisan 2011;17(7):1741-52.
- 128.** Kawamura N, Kawamura K, Manabe M, Tanaka T. Inhibition of Brain-Derived Neurotrophic Factor/Tyrosine Kinase B Signaling Suppresses Choriocarcinoma Cell Growth. *Endocrinology*. 01 Temmuz 2010;151(7):3006-14.
- 129.** Numakawa T, Suzuki S, Kumamaru E, Adachi N, Richards M, Kunugi H. BDNF function and intracellular signaling in neurons. *Histol Histopathol*. 2010;25(2):237-58.
- 130.** Kim SH, Won SJ, Sohn S, Kwon HJ, Lee JY, Park JH, vd. Brain-derived neurotrophic factor can act as a pronecrotic factor through transcriptional and translational activation of NADPH oxidase. *J Cell Biol*. 09 Aralık 2002;159(5):821-31.
- 131.** Koh J, Gwag B, Lobner D, Choi D. Potentiated necrosis of cultured cortical neurons by neurotrophins. *Science*. 28 Nisan 1995;268(5210):573-5.
- 132.** Chiu. BDNF mediated TrkB activation is a survival signal for transitional cell carcinoma cells. *Int J Oncol [Internet]*. 21 Nisan 2010 [a.yer 11 Haziran 2020];36(6). Erişim adresi: <http://www.spandidos-publications.com/ijo/36/6/1469>
- 133.** Yin B, Ma ZY, Zhou ZW, Gao WC, Du ZG, Zhao ZH, vd. The TrkB+ cancer stem cells contribute to post-chemotherapy recurrence of triple-negative breast cancers in an orthotopic mouse model. *Oncogene*. Şubat 2015;34(6):761-70.
- 134.** Korte M, Carroll P, Wolf E, Brem G, Thoenen H, Bonhoeffer T. Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci*. 12 Eylül 1995;92(19):8856-60.
- 135.** Abidin I, Yildirim M, Aydin-Abidin S, Kalay E, Cansu A, Akca M, vd. Penicillin induced epileptiform activity and EEG spectrum analysis of BDNF heterozygous mice: An in vivo electrophysiological study. *Brain Res Bull*. Ekim 2011;86(3-4):159-64.

- 136.** Abidin İ, Aydın-Abidin S, Mittmann T. Neuronal excitability and spontaneous synaptic transmission in the entorhinal cortex of BDNF heterozygous mice. *Neurosci Lett.* 18 Ocak 2019;690:69-75.
- 137.** Abidin I, Eysel UT, Lessmann V, Mittmann T. Impaired GABAergic inhibition in the visual cortex of brain-derived neurotrophic factor heterozygous knockout mice. *J Physiol.* 01 Nisan 2008;586(Pt 7):1885-901.
- 138.** Bodur A, İnce İ, Kahraman C, Abidin İ, Aydın-Abidin S, Alver A. Effect of a high sucrose and high fat diet in BDNF (+/-) mice on oxidative stress markers in adipose tissues. *Arch Biochem Biophys.* Nisan 2019;665:46-56.
- 139.** Özkanlar S, Abidin I, Aktaş M, Erol H, Gür C, Ulaş N, vd. BALB/C, BDNF Homozigot (+/+) ve BDNF Heterozigot Transgenik (+/-) Farelerde Glukoz, Lipid ve Protein Parametrelerinin Karşılaştırılması. *Atatürk Üniversitesi Vet Bilim Derg.* 22 Nisan 2016;1.
- 140.** Latimer GW Jr, Latimer GW Jr, editörler. *Official Methods of Analysis: 22nd Edition (2023).* İçinde: *Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL* [İnternet]. Oxford University Press; 2023 [a.yer 18 Temmuz 2023]. s. 0. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1093/9780197610145.002.001>
- 141.** Maynard LA. The Atwater system of calculating the caloric value of diets. *J Nutr.* 1944;28:443-52.
- 142.** Hinoi T, Akyol A, Theisen BK, Ferguson DO, Greenson JK, Williams BO, vd. Mouse model of colonic adenoma-carcinoma progression based on somatic Apc inactivation. *Cancer Res.* 15 Ekim 2007;67(20):9721-30.
- 143.** Kernie SG, Liebl DJ, Parada LF. BDNF regulates eating behavior and locomotor activity in mice. *EMBO J.* 15 Mart 2000;19(6):1290-300.
- 144.** Battaglin F, Jayachandran P, Strelez C, Lenz A, Algaze S, Soni S, vd. Neurotransmitter signaling: a new frontier in colorectal cancer biology and treatment. *Oncogene.* 01 Ekim 2022;41(43):4769-78.
- 145.** Yang X, Martin TA, Jiang WG. Biological influence of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) on colon cancer cells. *Exp Ther Med.* Aralık 2013;6(6):1475-81.
- 146.** Zhou X, Tao L, Zhao M, Wu S, Obeng E, Wang D, vd. Wnt/ β -catenin signaling regulates brain-derived neurotrophic factor release from spinal microglia to mediate HIV1 gp120-induced neuropathic pain. *Mol Pain.* 30 Nisan 2020;16:1744806920922100.
- 147.** Zhang W, Shi Y, Peng Y, Zhong L, Zhu S, Zhang W, vd. Neuron activity-induced Wnt signaling up-regulates expression of brain-derived neurotrophic factor in the pain neural circuit. *J Biol Chem.* 05 Ekim 2018;293(40):15641-51.

148. Okugawa Y, Tanaka K, Inoue Y, Kawamura M, Kawamoto A, Hiro J, vd. Brain-derived neurotrophic factor/tropomyosin-related kinase B pathway in gastric cancer. *Br J Cancer*. 15 Ocak 2013;108(1):121-30.
149. Fujikawa H, Tanaka K, Toiyama Y, Saigusa S, Inoue Y, Uchida K, vd. High TrkB expression levels are associated with poor prognosis and EMT induction in colorectal cancer cells. *J Gastroenterol*. Temmuz 2012;47(7):775-84.
150. Kupferman ME, Jiffar T, El-Naggar A, Yilmaz T, Zhou G, Xie T, vd. TrkB induces EMT and has a key role in invasion of head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogene*. 08 Nisan 2010;29(14):2047-59.
151. Guo D, Hou X, Zhang H, Sun W, Zhu L, Liang J, vd. More expressions of BDNF and TrkB in multiple hepatocellular carcinoma and anti-BDNF or K252a induced apoptosis, suppressed invasion of HepG2 and HCCLM3 cells. *J Exp Clin Cancer Res*. 2011;30(1):97.
152. Farias CB de, Rosemberg DB, Heinen TE, Koehler-Santos P, Abujamra AL, Kapczinski F, vd. BDNF/TrkB Content and Interaction with Gastrin-Releasing Peptide Receptor Blockade in Colorectal Cancer. *Oncology*. 2010;79(5-6):430-9.
153. Bao W, Qiu H, Yang T, Luo X, Zhang H, Wan X. Upregulation of TrkB Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition and Anoikis Resistance in Endometrial Carcinoma. *Agoulnik IU*, editör. *PLoS ONE*. 30 Temmuz 2013;8(7):e70616.
154. Aoki M, Blazek E, Vogt PK. A role of the kinase mTOR in cellular transformation induced by the oncoproteins P3k and Akt. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 02 Ocak 2001;98(1):136-41.
155. Chen B, Liang Y, He Z, An Y, Zhao W, Wu J. Autocrine activity of BDNF induced by the STAT3 signaling pathway causes prolonged TrkB activation and promotes human non-small-cell lung cancer proliferation. *Sci Rep*. Eylül 2016;6(1):30404.
156. Martens LK, Kirschner KM, Warnecke C, Scholz H. Hypoxia-inducible Factor-1 (HIF-1) Is a Transcriptional Activator of the *TrkB* Neurotrophin Receptor Gene. *J Biol Chem*. 11 Mayıs 2007;282(19):14379-88.
157. Yee CL, Jones KR, Finger TE. Brain-derived neurotrophic factor is present in adult mouse taste cells with synapses. *J Comp Neurol*. 2003;459(1):15-24.
158. Radin D, Lippa A, Patel P, Leonardi D. Lifeguard inhibition of Fas-mediated apoptosis: A possible mechanism for explaining the cisplatin resistance of triple-negative breast cancer cells. *Biomed Pharmacother*. 01 Şubat 2016;77:161-6.
159. Hunter T, Pines J. Cyclins and cancer II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell*. 18 Kasım 1994;79(4):573-82.

- 160.** Voldborg BR, Damstrup L, Spang-Thomsen M, Poulsen HS. Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR mutations, function and possible role in clinical trials. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. Aralık 1997;8(12):1197-206.
- 161.** Bos JL. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res*. 01 Eylül 1989;49(17):4682-9.
- 162.** Davis RJ. The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem*. 15 Temmuz 1993;268(20):14553-6.
- 163.** Sinkevicius KW, Kriegel C, Bellaria KJ, Lee J, Lau AN, Leeman KT, vd. Neurotrophin receptor TrkB promotes lung adenocarcinoma metastasis. *Proc Natl Acad Sci*. 15 Temmuz 2014;111(28):10299-304.
- 164.** Lee DH, Szczepanski MJ, Lee YJ. Magnolol induces apoptosis via inhibiting the EGFR/PI3K/Akt signaling pathway in human prostate cancer cells. *J Cell Biochem*. 2009;106(6):1113-22.
- 165.** Morris LGT, Taylor BS, Bivona TG, Gong Y, Eng S, Brennan CW, vd. Genomic dissection of the epidermal growth factor receptor (EGFR)/PI3K pathway reveals frequent deletion of the EGFR phosphatase PTPRS in head and neck cancers. *Proc Natl Acad Sci*. 22 Kasım 2011;108(47):19024-9.
- 166.** Nm D, M S, K S, Sl A, M L, S C, vd. C. 5, Oncotarget. *Oncotarget*; 2014 [a.yer 11 Haziran 2020]. Deregulation of the EGFR/PI3K/PTEN/Akt/mTORC1 Pathway in Breast Cancer: Possibilities for Therapeutic Intervention. Erişim adresi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25051360/>
- 167.** Götz R, Sendtner M. Cooperation of Tyrosine Kinase Receptor TrkB and Epidermal Growth Factor Receptor Signaling Enhances Migration and Dispersal of Lung Tumor Cells. André F, editör. *PLoS ONE*. 24 Haziran 2014;9(6):e100944.
- 168.** Puehringer D, Orel N, Lüningschrör P, Subramanian N, Herrmann T, Chao MV, vd. EGF transactivation of Trk receptors regulates the migration of newborn cortical neurons. *Nat Neurosci*. Nisan 2013;16(4):407-15.
- 169.** Qiu L, Zhou C, Sun Y, Di W, Scheffler E, Healey S, vd. Crosstalk between EGFR and TrkB enhances ovarian cancer cell migration and proliferation. *Int J Oncol*. Ekim 2006;29(4):1003-11.
- 170.** de Farias CB, Heinen TE, dos Santos RP, Abujamra AL, Schwartzmann G, Roesler R. BDNF/TrkB signaling protects HT-29 human colon cancer cells from EGFR inhibition. *Biochem Biophys Res Commun*. 24 Ağustos 2012;425(2):328-32.
- 171.** Cowley S, Paterson H, Kemp P, Marshall CJ. Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells. *Cell*. 17 Haziran 1994;77(6):841-52.

- 172.** Huang EJ, Reichardt LF. Trk Receptors: Roles in Neuronal Signal Transduction. *Annu Rev Biochem.* Haziran 2003;72(1):609-42.
- 173.** Siu MK, Wong OG, Cheung AN. TrkB as a therapeutic target for ovarian cancer. *Expert Opin Ther Targets.* Ekim 2009;13(10):1169-78.
- 174.** Yuan Y, Ye HQ, Ren QC. Upregulation of the BDNF/TrkB pathway promotes epithelial-mesenchymal transition, as well as the migration and invasion of cervical cancer. *Int J Oncol.* Şubat 2018;52(2):461-72.
- 175.** Xu B, Xie X. Neurotrophic factor control of satiety and body weight. *Nat Rev Neurosci.* Mayıs 2016;17(5):282-92.
- 176.** Pham CT, MacIvor DM, Hug BA, Heusel JW, Ley TJ. Long-range disruption of gene expression by a selectable marker cassette. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 12 Kasım 1996;93(23):13090-5.
- 177.** Agullo-Ortuño MT, Pardo-Marques V, Prieto-Garcia E, Diaz-Garcia CV, Otero I, Lopez-Martin JA. Abstract 4854: A translational multiplexed hypothesis generating study on circulating cytokines in patients with cancer cachexia. *Cancer Res.* 01 Temmuz 2019;79(13_Supplement):4854.
- 178.** Ilchibaeva TV, Kondaurova EM, Tsybko AS, Kozhemyakina RV, Popova NK, Naumenko VS. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and its precursor (proBDNF) in genetically defined fear-induced aggression. *Behav Brain Res.* 01 Eylül 2015;290:45-50.
- 179.** Lang UE, Günther L, Scheuch K, Klein J, Eckhart S, Hellweg R, vd. Higher BDNF concentrations in the hippocampus and cortex of an aggressive mouse strain. *Behav Brain Res.* 30 Ocak 2009;197(1):246-9.
- 180.** Lyons WE, Mamounas LA, Ricaurte GA, Coppola V, Reid SW, Bora SH, vd. Brain-derived neurotrophic factor-deficient mice develop aggressiveness and hyperphagia in conjunction with brain serotonergic abnormalities. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 21 Aralık 1999;96(26):15239-44.
- 181.** You S, Ohmori M, Peña MMO, Nassri B, Quiton J, Al-Assad ZA, vd. Developmental abnormalities in multiple proliferative tissues of *ApcMin*+/+ mice. *Int J Exp Pathol.* Haziran 2006;87(3):227-36.
- 182.** Lane SW, Sykes SM, Al-Shahrour F, Shterental S, Paktinat M, Celso CL, vd. The *Apcmin* mouse has altered hematopoietic stem cell function and provides a model for MPD/MDS. *Blood.* 29 Nisan 2010;115(17):3489-97.
- 183.** Wang J, Fernald AA, Anastasi J, Le Beau MM, Qian Z. Haploinsufficiency of *Apc* leads to ineffective hematopoiesis. *Blood.* 29 Nisan 2010;115(17):3481-8.
- 184.** Xue Y, Johnson R, Desmet M, Snyder PW, Fleet JC. Generation of a transgenic mouse for colorectal cancer research with intestinal cre expression limited to the large intestine. *Mol Cancer Res MCR.* Ağustos 2010;8(8):1095-104.

- 185.** Chacón-Fernández P, Säuberli K, Colzani M, Moreau T, Ghevaert C, Barde YA. Brain-derived Neurotrophic Factor in Megakaryocytes. *J Biol Chem.* 06 Mayıs 2016;291(19):9872-81.
- 186.** Labouyrie E, Dubus P, Groppi A, Mahon FX, Ferrer J, Parrens M, vd. Expression of neurotrophins and their receptors in human bone marrow. *Am J Pathol.* Şubat 1999;154(2):405-15.
- 187.** Tamura S, Nagasawa A, Masuda Y, Tsunematsu T, Hayasaka K, Matsuno K, vd. BDNF, produced by a TPO-stimulated megakaryocytic cell line, regulates autocrine proliferation. *Biochem Biophys Res Commun.* 01 Ekim 2012;427(3):542-6.
- 188.** Linker RA, Lee DH, Flach AC, Litke T, van den Brandt J, Reichardt HM, vd. Thymocyte-derived BDNF influences T-cell maturation at the DN3/DN4 transition stage: Cellular immune response. *Eur J Immunol.* Mayıs 2015;45(5):1326-38.
- 189.** Schuhmann B, Dietrich A, Sel S, Hahn C, Klingenspor M, Lommatzsch M, vd. A role for brain-derived neurotrophic factor in B cell development. *J Neuroimmunol.* Haziran 2005;163(1-2):15-23.
- 190.** Paczkowska E, Piecyk K, Luczkowska K, Kotowski M, Roginska D, Pius-Sadowska E, vd. Expression of neurotrophins and their receptors in human CD34+ bone marrow cells. *J Physiol Pharmacol Off J Pol Physiol Soc.* Şubat 2016;67(1):151-9.
- 191.** Cao L, Liu X, Lin EJD, Wang C, Choi EY, Riban V, vd. Environmental and Genetic Activation of a Brain-Adipocyte BDNF/Leptin Axis Causes Cancer Remission and Inhibition. *Cell.* Temmuz 2010;142(1):52-64.
- 192.** Kolonel LN, Altshuler D, Henderson BE. The multiethnic cohort study: exploring genes, lifestyle and cancer risk. *Nat Rev Cancer.* Temmuz 2004;4(7):519-27.
- 193.** Liu X, McMurphy T, Xiao R, Slater A, Huang W, Cao L. Hypothalamic gene transfer of BDNF inhibits breast cancer progression and metastasis in middle age obese mice. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther.* Temmuz 2014;22(7):1275-84.
- 194.** Song Z, Ye Y, Zhang Z, Shen J, Hu Z, Wang Z, vd. Noninvasive, targeted gene therapy for acute spinal cord injury using LIFU-mediated BDNF-loaded cationic nanobubble destruction. *Biochem Biophys Res Commun.* 12 Şubat 2018;496(3):911-20.
- 195.** Rejali D, Lee VA, Abrashkin KA, Humayun N, Swiderski DL, Raphael Y. Cochlear implants and ex vivo BDNF gene therapy protect spiral ganglion neurons. *Hear Res.* Haziran 2007;228(1-2):180-7.

- 196.** Arora S, Kanekiyo T, Singh J. Functionalized nanoparticles for brain targeted BDNF gene therapy to rescue Alzheimer's disease pathology in transgenic mouse model. *Int J Biol Macromol.* 31 Mayıs 2022;208:901-11.
- 197.** Rhee J, Shih KC. Use of Gene Therapy in Retinal Ganglion Cell Neuroprotection: Current Concepts and Future Directions. *Biomolecules.* 15 Nisan 2021;11(4):581.
- 198.** Mukherjee S, Kuroiwa M, Oakden W, Paul BT, Noman A, Chen J, vd. Local magnetic delivery of adeno-associated virus AAV2(quad Y-F)-mediated BDNF gene therapy restores hearing after noise injury. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther.* 02 Şubat 2022;30(2):519-33.
- 199.** Mattson MP, Maudsley S, Martin B. BDNF and 5-HT: a dynamic duo in age-related neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci.* Ekim 2004;27(10):589-94.
- 200.** Murray PS, Holmes PV. An Overview of Brain-Derived Neurotrophic Factor and Implications for Excitotoxic Vulnerability in the Hippocampus. *Int J Pept.* 2011;2011:654085.
- 201.** Binder DK, Scharfman HE. Brain-derived neurotrophic factor. *Growth Factors Chur Switz.* Eylül 2004;22(3):123-31.
- 202.** Olive KP, Tuveson DA. The use of targeted mouse models for preclinical testing of novel cancer therapeutics. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 15 Eylül 2006;12(18):5277-87.
- 203.** Zeineldin M, Neufeld KL. Understanding phenotypic variation in rodent models with germline *Apc* mutations. *Cancer Res.* 15 Nisan 2013;73(8):2389-99.

8. EKLER

EK-1: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzinleri

EK-2: Tez Çalışması Orjinallik Raporu, Turnitin Ekran Görüntüsü

Apc Mutant Fare Modelinde Azaltılmış Bdnf Ekspresyonunun İntestinal Tümör Gelişimi Üzerine Etkilerinin Araştırılması

ORJİNALLİK RAPORU

% 6	% 5	% 2	% 2
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Hacettepe University Öğrenci Ödevi	% 1
2	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 1
3	acikerisim.akdeniz.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 1
4	tur.bioconus.com İnternet Kaynağı	<% 1
5	AYŞENUR GOK, AYNUR IŞIK, SINEM BAKIR, SARP UZUN, GUNES GUNER, OZGE OZCAN, BARIS CERCI, ILYAS ONBAŞILAR, AYTEKİN AKYOL. "Role of Reduced Bdnf Expression in Novel Apc Mutant Allele-induced Intestinal and Colonic Tumorigenesis in Mice", In Vivo, 2023 Yayın	<% 1
6	www.ncbi.nlm.nih.gov İnternet Kaynağı	<% 1

link.springer.com

EK-3: Dijital Makbuz

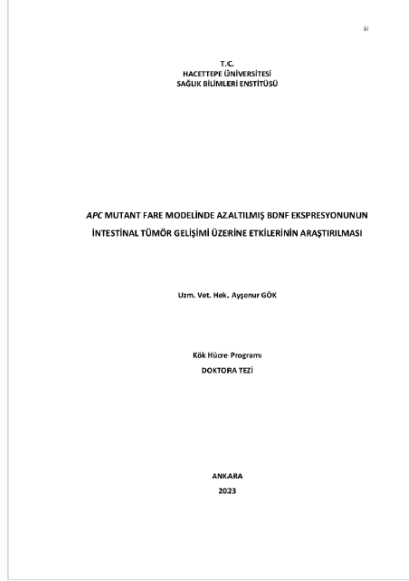


Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Ayşenur Gök
Ödev başlığı: Tez_Ayşenur Gök_Son_turnitin
Gönderi Başlığı: Apc Mutant Fare Modelinde Azaltılmış Bdnf Ekspresyonunu...
Dosya adı: Tez_Ay_enur_G_k_Son_turnitin.pdf
Dosya boyutu: 2.06M
Sayfa sayısı: 83
Kelime sayısı: 16,877
Karakter sayısı: 108,991
Gönderim Tarihi: 20-Tem-2023 06:10ÖS (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 2134079939



EK-4: Araştırma Gruplarında Farklı Genler için Ortalama Ct ve Standart Sapma Değerleri (İBM: İnce bağırsak mukozası, İBT: İnce Bağırsak Tümörü). n= 1, teknik tekrar= 3.

<u>Gruplar</u>	<u>Beta Aktin</u>	
	<u>Ortalama Ct</u>	<u>Standart. Sapma</u>
Yabanıl tip_İBM	14.62	0.32
Bdnf+/-_İBM	15.16	0.18
Apc+/-_İBM	14.94	0.12
Apc+/- Bdnf+/-_İBM	15.02	0.26
Apc+/-_İBT	13.55	0.21
Apc+/- Bdnf+/-_İBT	13.62	0.20

<u>Gruplar</u>	<u>Bdnf</u>	
	<u>Ortalama Ct</u>	<u>Standart. Sapma</u>
Yabanıl tip_İBM	33.23	0.57
Bdnf+/-_İBM	34.12	0.52
Apc+/-_İBM	30.76	0.44
Apc+/- Bdnf+/-_İBM	32.57	0.58
Apc+/-_İBT	25.49	0.11
Apc+/- Bdnf+/-_İBT	26.88	0.20

<u>Gruplar</u>	<u>Trk B</u>	
	<u>Ortalama Ct</u>	<u>Standart. Sapma</u>
Yabanıl tip_İBM	29.54	0.30
Bdnf+/-_İBM	30.09	0.63
Apc+/-_İBM	31.31	0.28
Apc+/- Bdnf+/-_İBM	30.04	0.57
Apc+/-_İBT	27.86	0.12
Apc+/- Bdnf+/-_İBT	28.33	0.28

	Beta Katenin	
<u>Gruplar</u>	<u>Ortalama Ct</u>	<u>Standart. Sapma</u>
Yabanıl tip_İBM	19.64	0.13
Bdnf+/-_İBM	19.03	0.18
Apc+/-_İBM	17.38	0.38
Apc+/- Bdnf+/-_İBM	18.95	0.39
Apc+/-_İBT	16.57	0.16
Apc+/- Bdnf+/-_İBT	17.65	0.51

	Lgr 5	
<u>Gruplar</u>	<u>Ortalama Ct</u>	<u>Standart. Sapma</u>
Yabanıl tip_İBM	26.18	0.23
Bdnf+/-_İBM	26.43	0.33
Apc+/-_İBM	26.63	0.77
Apc+/- Bdnf+/-_İBM	26.21	0.55
Apc+/-_İBT	22.06	0.21
Apc+/- Bdnf+/-_İBT	22.73	0.23

9. ÖZGEÇMİŞ

