

T.C.  
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI



HTR1B VE TPH1 GENLERİNİN KOLON KANSERİ HÜCRE  
HATLARINDA VE ORTOLOGLARININ *C. elegans*'da HİPOKSİDE  
ARAŞTIRILMASI

CANBERK TOPRAK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Jüri Üyeleri : Doç. Dr. Sümeyye AYDOĞAN TÜRKÖĞLU (Tez Danışmanı)  
Prof.Dr.Hatice YILDIRIM  
Prof.Dr.Uğur GÜNŞEN

BALIKESİR, HAZİRAN - 2025

## ETİK BEYAN

Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak tarafımda hazırlanan “**HTR1B ve TPH1 Genlerinin Kolon Kanseri Hücre Hatlarında ve Ortologlarının *C. elegans*'da Hipokside Araştırılması**” başlıklı tezde;

- Tüm bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Kullanılan veriler ve sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Tüm bilgi ve sonuçları bilimsel araştırma ve etik ilkelere uygun şekilde sunduğumu,
- Yararlandığım eserlere atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,

beyan eder, aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ederim.

**Canberk TOPRAK**



**Bu tez çalışması TÜSEB (Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı) tarafından 38374 nolu proje ile desteklenmiştir.**

## ÖZET

**HTR1B VE TPH1 GENLERİNİN KOLON KANSERİ HÜCRE HATLARINDA VE  
ORTOLOGLARININ *C. elegans*'DA HİPOKSİDE ARAŞTIRILMASI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
CANBERK TOPRAK  
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI  
(TEZ DANIŞMANI: DOÇ. DR. SÜMEYYE AYDOĞAN TÜRKÖĞLU)  
(EŞ DANIŞMAN: DR. ÖĞR. ÜYESİ DERYA OKUYAN)  
BALIKESİR, HAZİRAN-2025**

Serotonin (5-Hidroksitriptamin, 5-HT) önemli işlevlere sahip bir amin dir. Bu amin triptofan hidroksilaz (TPH) aracılığıyla L-triptofandan sentezi gerçekleştirir. Serotonin etkilerini membranda bulunan serotonin reseptörleri aracılığıyla gösterir. Serotoninin kanser hücrelerinde proliferasyonu, istilayı, yayılımı ve tümörlerde anjiyogenezde potansiyel etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Özellikle 5-HT 1A, 5-HT 1B, 5-HT 1D ve 5-HT 2A reseptörleri çeşitli kanserlerde çalışılmıştır fakat kolon kanserinde etkisi tam anlaşılammıştır. Tümör hücreleri kontrolsüz bölündüklerinden çok fazla enerji tüketirler ve mikroçevreleri hipoksik bir koşuldadır. Bu mikroçevre genlerin regülasyonunda değişikliklere sebep olabilir. Tez çalışmasında HTR1B ve TPH1 genlerinin kolon kanseri hücre modellerinde hipoksi ile değişimi mRNA ve protein seviyesinde incelenmiştir. Ayrıca model organizma olan *C.elegans*'ta bu genlerin ortoloğu olan ser-4 ve cTPH genlerinin de ifadelerine hipoksik ortamda bakılmıştır. Yapılan biyoinformatik analizlerde bu iki genin %87 benzer olduğu ve benzer hücresel sinyal yollarını etkilediği görülmüştür. HT-29 kolon kanseri hücre modelinde HTR1B ve TPH1 ifadesinin mRNA düzeyinde arttığı, SW480 kolon kanseri hücre modelinde HTR1B'nin arttığı TPH1'in ise azaldığı, HUVEC sağlıklı insan endotel hücre modelinde HTR1B'nin arttığı TPH1'in azaldığı tespit edilmiştir. *C.elegans*'ta ise ser-4 ve cTPH genlerinin mRNA seviyelerinin arttığı tespit edilmiştir. HTR1B ve TPH1 genlerinin çeşitli hücre hatları üzerindeki etkileri, serotoninergic sistemin karmaşık dinamiklerini anlamada kritik bir rol oynamaktadır. Sonuç olarak, HTR1B geninin çeşitli hücre hatları üzerindeki etkileri, bu genin kanserdeki işlevselliğini ve potansiyel terapötik kullanımlarını anlamada önemli bir adım oluşturmaktadır.

**ANAHTAR KELİMELEER:** CTPH, hipoksi, htr1b, kanser, ser-4, serotonin, tph1

Bilim Kod / Kodları : 20606/20610

Sayfa Sayısı : 67

## ABSTRACT

### INVESTIGATION OF HTR1B AND TPH1 GENES IN COLON CANCER CELL LINES AND THEIR ORTHOLOGUES IN HYPOXIA IN *C.elegans*

MSC THESIS

CANBERK TOPRAK

BALIKESIR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

(SUPERVISOR: ASSOC. PROF. SÜMEYYE AYDOĞAN TÜRKÖĞLU )

(CO-SUPERVISOR: ASSIST PROF. DR. DERYA OKUYAN )

BALIKESİR, JUNE - 2025

Serotonin (5-Hydroxytryptamine, 5-HT) is an amine with important functions. This amine is synthesized from L-tryptophan by tryptophan hydroxylase (TPH). Serotonin shows its effects through serotonin receptors located in the membrane. Serotonin has been shown to have a potential effect on proliferation, invasion, spread in cancer cells and angiogenesis in tumors. Especially 5-HT 1A, 5-HT 1B, 5-HT 1D and 5-HT 2A receptors have been studied in various cancers, but their effects in colon cancer are not fully understood due to their complexity. Since tumor cells divide uncontrollably, they consume a lot of energy and their microenvironment is in a hypoxic condition. This microenvironment may cause changes in the regulation of genes. In this thesis study, the changes in HTR1B and TPH1 genes with hypoxia in colon cancer cell models were examined at the mRNA and protein levels. In addition, the expressions of the ser-4 and cTPH genes, which are orthologs of these genes, were examined in hypoxic conditions in the model organism *C.elegans*. In the bioinformatic analyses, it was seen that these two genes were 87% similar and affected similar cellular signaling pathways. It was determined that the expression of HTR1B and TPH1 increased at the mRNA level in the HT-29 colon cancer cell model, that HTR1B increased and TPH1 decreased in the SW480 colon cancer cell model, and that HTR1B increased and TPH1 decreased in the HUVEC healthy human endothelial cell model. In *C.elegans*, it was determined that the mRNA levels of the ser-4 and cTPH genes increased. The effects of the HTR1B gene on various cell lines play a critical role in understanding the complex dynamics of the serotonergic system. As a result, the effects of the HTR1B and TPH genes on various cell lines constitute an important step in understanding the functionality of this gene in cancer and its potential therapeutic uses.

**KEYWORDS:** CTPH, hypoxia, htr1b, cancer, ser-4, serotonin, tph1

Science Code / Codes : 20606/20610

Page Number : 67

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa

ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ŞEKİL LİSTESİ .....	vi
TABLO LİSTESİ.....	vii
SEMBOL LİSTESİ .....	viii
ÖNSÖZ .....	x
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
1.1 Serotonin Biyosentezi .....	2
1.1.1 Serotonin salınımı .....	3
1.1.2 Serotonin reseptörleri .....	3
1.2 Serotonin ve Kanser.....	5
1.2.1 Meme kanseri ve serotonin .....	7
1.2.2 Prostat kanseri ve serotonin.....	8
1.2.3 Hepatoselüler kanser (hcc) ve serotonin .....	9
1.2.4 Glioma ve serotonin .....	9
1.2.5 Küçük hücreli akciğer kanseri (sclc) ve serotonin .....	10
1.2.6 Kolorektal kanser (CRC) ve serotonin.....	10
1.3 <i>Caenorhabditis elegans</i> ( <i>C. elegans</i> ).....	14
1.3.1 <i>Caenorhabditis elegans</i> model organizması hakkında temel bilgiler.....	14
1.3.2 <i>Caenorhabditis elegans</i> ve serotonin .....	15
1.3.3 <i>Caenorhabditis elegans</i> ve kanser.....	16
1.4 Hipoksi.....	17
1.4.1 Kimyasal hipoksi.....	17
1.4.2 Hipoksi ve kolorektal kanser.....	18
1.5 Amaç.....	19
<b>2. MATERYAL VE METOD.....</b>	<b>21</b>
2.1 Materyal .....	21
2.1.1 Çalışmada kullanılan kimyasallar .....	21
2.1.2 Çalışma boyunca kullanılan canlılar .....	22
2.2 Metod.....	22
2.2.1 Çalışmada kullanılan malzemelerin ve ortamın sterilizasyonu.....	22
2.2.2 Hücre kültürü yöntemleri .....	22
2.2.2.1 FCS (Fetal Calf Serum) hazırlanması .....	22
2.2.2.2 Hücre kültüründe kullanılan medyumunun hazırlanması .....	22
2.2.2.3 Tripsin-EDTA solüsyonunun hazırlanması .....	22
2.2.2.4 Çalışma boyunca kullanılacak hücre hatları ile ilgili çalışmalar .....	22
2.2.3 mRNA ile ilgili yöntemler.....	23
2.2.3.1 Çalışmadaki hücrelerden RNA izolasyonu.....	23
2.2.3.2 Elde edilen RNA'ların miktar tayini .....	23
2.2.3.3 Elde edilen RNA'ların formaldehid jel elektroforezi.....	24
2.2.3.4 cDNA sentezi.....	24
2.2.3.5 Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile cDNA kontrolü.....	24

## İÇİNDEKİLER (devam)

2.2.3.6	Agaroz jel elektroforezi .....	25
2.2.3.7	Gerçek zamanlı PZR (Real-Time PZR).....	25
2.2.4	Protein temelli yöntemler .....	27
2.2.4.1	Western blotting deney dizaynının yapılması ve protein Eekstraktlarının hazırlanması.....	27
2.2.4.2	Protein miktarlarının bradford yöntemi ile belirlenmesi .....	27
2.2.4.3	SDS-PAGE .....	28
2.2.4.4	SDS jelin blotlanması işlemi.....	29
2.2.4.5	Membrandaki proteinlerin belirlenmesi.....	30
2.2.4.6	İmmünofloresans boyama (IFC).....	30
2.2.5	<i>Caenorhabditis elegans</i> model organizması ile ilgi yöntemler.....	31
2.2.5.1	Nematod besiyerinin (NGM) hazırlanması işlemi.....	31
2.2.5.2	<i>E. coli</i> 'nin OP50 suşu için TBX agar hazırlanması .....	32
2.2.5.3	<i>E. coli</i> OP50 suşunun hazırlanması işlemi.....	32
2.2.5.4	Hipoksik ortamın oluşturulması.....	32
2.2.5.5	<i>Caenorhabditis elegans</i> model organizmasından total RNA izolasyonu ..	32
2.2.5.6	Real-Time PZR analizi .....	33
2.3	Biyoinformatik Yöntemler.....	33
2.3.1	Benzerlik çalışmaları.....	33
2.3.2	Yolak analizi çalışmaları.....	33
<b>3.</b>	<b>BULGULAR .....</b>	<b>34</b>
3.1	Biyoinformatik Analizler .....	34
3.1.1	İnsan HTR1B geni analizleri.....	34
3.1.2	İnsan TPH1 geni analizleri.....	35
3.1.3	<i>C. elegans</i> ser-4 geni analizleri .....	36
3.1.4	<i>C. elegans</i> cTPH geni analizleri.....	37
3.1.5	İnsan HTR1B ve <i>c.elegans</i> ser-4 geni benzerlik analizleri .....	38
3.1.6	İnsan TPH1 ve <i>c.elegans</i> cTPH geni benzerlik analizleri .....	39
3.2	İnsan HTR1B ve TPH1 Genlerinin mRNA Düzeyi Analizleri.....	39
3.2.1	Çalışma boyunca kullanılacak gen primerlerinin optimizasyonu .....	39
3.2.2	Çalışmada kullanılacak hücre hatlarında deney gruplarının cDNA kontrol PZR'si .....	41
3.2.3	Kolon kanseri hücre hatlarında (SW480 ve HT-29) normal ve hipoksik koşullarda HTR1B ve TPH1 ifadesinin gösterilmesi .....	42
3.2.3.1	SW480 ve HT-29 hücre hatlarında normal ve hipoksik koşullarda Real-Time PZR ile HTR1B ve TPH1 ifadesinin gösterilmesi.....	42
3.2.4	İnsan sağlıklı endotel hücre hattında (HUVEC) normal ve hipoksik koşullarda HTR1B ve TPH1 ifadesinin gösterilmesi.....	45
3.2.4.1	HUVEC hücre hattında normal ve hipoksik koşullarda Real-Time PZR ile HTR1B ve TPH1 ifadesinin gösterilmesi.....	45
3.3	İnsan HTR1B ve TPH1 Gen Protein Düzeyi Analizleri.....	46
3.4	<i>C.elegans</i> ser-4 ve cTPH Genlerinin mRNA Analizleri.....	51
3.4.1	Çalışma boyunca kullanılacak gen primerlerinin optimizasyonu .....	51
3.4.2	Çalışmada kullanılacak <i>c.elegans</i> deney gruplarının cDNA kontrol PZR'si ....	52

## **İÇİNDEKİLER (devam)**

3.4.3 C.elegans'ta normal ve hipoksik koşullarda ser-4 ve cTPH geninin ifadesinin Real-Time PZR ile gösterilmesi .....	52
<b>4. TARTIŞMA VE SONUÇ.....</b>	<b>54</b>
<b>5. KAYNAKLAR.....</b>	<b>58</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>67</b>

# ŞEKİL LİSTESİ

## Sayfa

Şekil 1.1: Serotoninin moleküler yapısı .....	2
Şekil 1.2: Serotonin biyosentezi.....	2
Şekil 1.3: Beyinde serotonin sentezi .....	3
Şekil 1.4: Serotonin reseptörü (5-HTR). .....	4
Şekil 1.5: Serotonin sinyalinin kanser üzerindeki etkileri. ....	6
Şekil 1.6: 5HT'nin kolorektal kanser kök hücresi ile ilişkisi.....	12
Şekil 1.7: <i>C. elegans</i> 'ın ışık mikroskobu görüntüsü .....	14
Şekil 1.8: <i>C. elegans</i> yaşam evreleri .....	15
Şekil 1.9: İnsan (A) ve <i>C. elegans</i> (B) serotonin yolu .....	16
Şekil 2.1: Protein ölçümlerinde kullanılan Bradford eğrisi .....	28
Şekil 3.1: HTR1B geni yolak analizi .....	34
Şekil 3.2: TPH1 geni yolak analizi. ....	35
Şekil 3.3: ser-4 geni yolak analizi. ....	36
Şekil 3.4: ctp-1 geni yolak analizi.....	37
Şekil 3.5: HTR1B ve ser-4 geni benzerlik oranı .....	38
Şekil 3.6: TPH1 ve cTPH-1 geni benzerlik oranı .....	39
Şekil 3.7: Farklı hücre hatlarında HTR1B ve TPH optimizasyon PZR sonuçları .....	41
Şekil 3.8: SW480 ve HT-29 hücre hatlarında H $\beta$ 2 kontrol PZR sonuçları.....	41
Şekil 3.9: HUVEC hücre hattında H $\beta$ 2 kontrol PZR sonuçları .....	42
Şekil 3.10: SW480 hücre hattı Real-Time PZR sonuçları .....	43
Şekil 3.11: HT-29 hücre hattı Real-Time PZR sonuçları.....	44
Şekil 3.12: HUVEC hücre hattı Real-Time PZR sonuçları.....	46
Şekil 3.13: SW-480 hücre hattı western blot ve IFC protein analizleri .....	48
Şekil 3.14: HT-29 hücre hattı western blot protein ve IFC analizleri.....	49
Şekil 3.15: HUVEC hücre hattı western blot ve IFC protein analizleri.....	50
Şekil 3.16: Ser-4 primer optimizasyon PZR sonuçları.....	51
Şekil 3.17: cTPH primer optimizasyon PZR sonuçları .....	51
Şekil 3.18: CDC-42 kontrol PZR sonuçları .....	52
Şekil 3.19: <i>C. elegans</i> model organizmasında Real-Time PZR sonuçları .....	53
ŞekilA.1: Fermantas 1 kb marker.....	66
ŞekilA.2: Thermo Scientific 100 bç marker.....	66
ŞekilA.3: PageRuler Prestained Protein marker.....	67
ŞekilA.4: Human HTR1B ve <i>c. elegans</i> ser-4 blast sonucu.....	67
ŞekilA.5: Human TPH1 ve <i>c. elegans</i> cTPH blast sonucu.....	67

## TABLO LİSTESİ

### Sayfa

<b>Tablo 1.1.</b> Bağışıklık hücrelerinde bulunan serotonin reseptörleri.....	5
<b>Tablo 1.2.</b> Kanser dokularında ve hücre hatlarında bulunan serotonin reseptörü çeşitleri	13
<b>Tablo 1.3.</b> Akış şeması.....	20
<b>Tablo 2.1.</b> Çalışmada kullanılan kimyasallar.....	21
<b>Tablo 2.2.</b> H $\beta$ 2 PZR Koşulları .....	25
<b>Tablo 2.3.</b> Real-Time PZR Bileşenleri .....	26
<b>Tablo 2.4.</b> Real-Time PZR Koşulları .....	26
<b>Tablo 2.5.</b> Çalışmada Kullanılan Primerler .....	26
<b>Tablo 2.6.</b> RİPA çözeltisi bileşenleri .....	27
<b>Tablo 2.7.</b> SDS-PAGE jel içeriği.....	29
<b>Tablo 2.8.</b> Western Blotting’de kullanılan solüsyonlar .....	29
<b>Tablo 2.9.</b> Çalışmada kullanılan antikorlar .....	30
<b>Tablo 2.10.</b> Çalışmada kullanılan primerler .....	33
<b>Tablo 3.1.</b> PZR bileşen ve miktarları .....	40
<b>Tablo 3.2.</b> PZR koşulları.....	40

## SEMBOL ve KISALTMA LİSTESİ

<b>5-HT</b>	: 5-Hidroksitriptamin, serotonin
<b>5-HTTP</b>	: 5- Hidroksitriptofan
<b>AD</b>	: Antidepresan
<b>BC</b>	: Meme kanseri
<b>BSA</b>	: Bovin serum albumin
<b>Ca<sup>+2</sup></b>	: Kalsiyum
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	: Kalsiyum klorür
<b>CC/CRC</b>	: Kolon kanseri
<b>cDNA</b>	: Komplamenter DNA
<b>CIN</b>	: Kromozomal dengesizlik
<b>CoCl<sub>2</sub></b>	: Kobalt klorür
<b>CSC</b>	: Kolorektal kanser kök hücresi
<b>cTPH</b>	: Triptofan hidroksilaz
<b>DEPC</b>	: Dietil pirokarbonat
<b>DMEM</b>	: Dulbecco's modified eagles medium
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik asid
<b>dNTP</b>	: Deoksinükleotid trifosfat
<b>EC</b>	: Enterokromaffin hücreleri
<b>EDTA</b>	: Etilendiamin tetraasetik asit
<b>EtBr</b>	: Etidyum bromür
<b>FCS</b>	: Fetal sığır serum
<b>GBM</b>	: Glioblastoma
<b>HB2</b>	: Human beta-2 microglobulin
<b>HCC</b>	: Hepatoselüler kanser
<b>HepG2</b>	: Karaciğer kanseri hücre hattı
<b>HT-29</b>	: Kolon kanseri hücre hattı
<b>HTR1B</b>	: Serotonin reseptörü 1 B
<b>Huh7</b>	: Karaciğer kanseri hücre hattı
<b>HUVEC</b>	: İnsan sağlıklı ven hücre hattı
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	: Potasyum dihidrojen fosfat
<b>LST</b>	: Laury pepto bios broth
<b>MCF-7</b>	: Meme kanseri hücre hattı
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	: Magnezyum sülfat
<b>mRNA</b>	: Mesajcı RNA
<b>MSI</b>	: Mikrosatellit kararsızlığı
<b>NCBI</b>	: National center for biotechnology information
<b>NGM</b>	: Nematod growth medium
<b>PBS</b>	: Fosfat buffer salin
<b>PC</b>	: Prostat kanseri
<b>PVDF</b>	: Poliviliniden florür
<b>PZR</b>	: Polimeraz zincir reaksiyonu
<b>RNA</b>	: Ribonükleik asid
<b>ROS</b>	: Reaktif oksijen türleri
<b>RT-PZR</b>	: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
<b>SCLC</b>	: Küçük hücreli akciğer kanseri
<b>SDS</b>	: Sodyum dodosil sülfat

## **SEMBOL ve KISALTMA LİSTESİ (Devam)**

<b>Ser-4</b>	: Serotonin reseptörü
<b>SERT</b>	: Serotonin taşıyıcısı
<b>SSRI</b>	: Serotonin geri alım inhibitörleri
<b>SW480</b>	: Kolon kanseri hücre hattı
<b>TBX</b>	: Tryptone Bile Glucuronide Agar
<b>TCA</b>	: Trisiklik antidepresan
<b>TPH</b>	: Triptofan hidroksilaz
<b>TPH1</b>	: Triptofan hidroksilaz 1
<b>UV</b>	: Ultra viyole

## ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasındaki deneysel aşamaların bir kısmı TÜSEB tarafından 38374 nolu proje ile desteklenmiştir. Deneysel çalışmaların hepsi Balıkesir Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Araştırma Laboratuvarlarında yapılmıştır.

Yüksek lisans sürecim boyunca bana her türlü desteği sağlayan, bilgisini ve samimiyetini esirgemeyen, disiplininin örnek alınacağı değerli tez danışman hocam Doç. Dr. Sümeyye AYDOĞAN TÜRKOĞLU'na,

Tez sürecimde desteklerini esirgemeyen, her zaman destek olan, beraber çabaladığım değerli tez eş danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Derya OKUYAN'a,

Yüksek lisans eğitimim boyunca benimle her türlü bilgi ve birikimlerini paylaşan değerli hocalarım; Prof. Dr. Feray KÖÇKAR, Prof. Dr. Serap DOĞAN, Prof. Dr. Serap BEYAZTAŞ UZUNOĞLU, Prof. Dr. Hatice YILDIRIM, Doç. Dr. Esra TOKAY, Doç. Dr. Mehmet Emin DİKEN, Dr. Öğr. Üyesi Begümhan YILMAZ KARDAŞ, Dr. Öğr. Üyesi Selma ÇELEN YÜCETÜRK, Dr. Öğr. Üyesi Nelin HACIOĞLU ve Arş. Gör. Dr. Serhad ONAT'a,

Bu yola başladığımda yanımda olan ve desteklerini hissettiren ekip arkadaşlarım; Dr. Fatma POYRAZLI, Uzm. Aysu BOZKURT, Uzm. Hanife AKTAŞ ve Gülsüm GÜLEÇ'e,

Bu akademik yolda beraber yürüdüğüm laboratuvar arkadaşlarım; Dr. Burcu EFE DAŞKAN, Uzm. Feyza Nur SAV, Uzm. Yasemin KELEŞ, Uzm. Hasan ÇAPRAZ, Uzm. Merve DEMİR, Ufuk MÜLHİM, Aslınur MÜZELLEFOĞLU, Meltem BALABAN, İlayda SEZER, Sertap KARABAŞ, Sibel ATAY, Kardelen SEZGİN ve Özlem KARADUMAN'a

Bu süreçte benim her türlü kahrıma, stresime, üzüntüme ve öfkeme katlandıkları için hayatımda olan dostlarıma,

En önemlisi beni bu yolda ve fikirlerimde her zaman destekleyen, arkamda duran, hayattaki gurur kaynaklarım olan sevgili annem ve babama ayrıca biricik patili dostum kedim Pamuk'a

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

**Balıkesir, 2025**

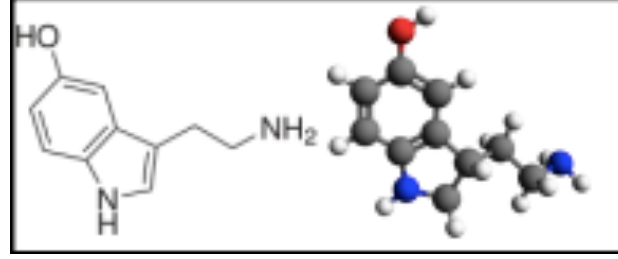
**Canberk Toprak**

## 1. GİRİŞ

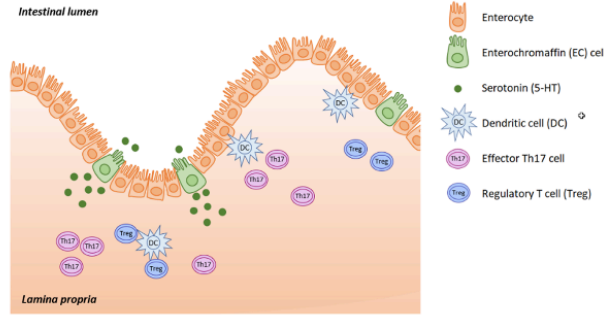
Serotonin (5-Hidroksitriptamin, 5-HT) gastrointestinal sistemde, vasküler düz kaslarda ve beyinde tanımlanmış ve bu bölgelerde önemli işlevleri olan amindir. Triptofan hidroksilaz (TPH) yardımı ile L-triptofandan sentezlenir ve etkilerini kendine özgü reseptörleri ile gösterir. Temel serotonin sentezi vücutta gastrointestinal sistemde enterokromaffin hücreleri tarafından ve beyinde raphe nuclei de yapılmaktadır. Beyinde gerçekleşen serotonin sentezinde serotonin; serotonerjik nöronlar aracılığıyla, iştahın, uykunun, ruh halinin, ağrının ve cinsel davranışın düzenlenmesi gibi çeşitli nöropsikotik işlevleri yerine getirir (Veenstra-WanderWelee et.al., 2000). Bununla birlikte, periferde üretilen serotonin, vazokonstriksiyon (Rapport et.al., 1948), anjiyogenezin düzenlenmesi (Zamani et.al., 2012), kemik yoğunluğunun ve osteoporozun kontrol edilmesi (Yadav et.al., 2010), kan şekeri seviyelerinin yanı sıra obezitenin korunması da dahil olmak üzere çeşitli metabolik fonksiyonların düzenlenmesi gibi geniş bir dizi fonksiyona sahiptir (Martin et.al., 2017). Ayrıca gastrointestinal hareketliliğin ve bağırsak mikrobiyom içeriğinin modüle edilmesi de fonksiyonları arasındadır (Berger et.al., 2009). Serotoninin bir diğer görevi ise bir büyüme faktörü olarak da işlev görmesidir. Böylelikle hücre döngüsünü (Nebigil et.al., 2000), inflamasyonu ve bağışıklığı (Herr et.al., 2017) modüle etmektedir. Esansiyel bir aminoasit olan triptofandan üretilen serotonin (5-hidroksitriptamin, 5-HT) biyojenik bir monoamin olarak görev görür. Serotoninin rolü merkezi sinir sisteminde nörotransmitter olarak ve gastrointestinal sistemde motilite aracısı olarak iyi tanımlanmıştır. Ayrıca bir çok kanser türünde tümör oluşumundaki rolü için araştırmalar devam etmektedir. Serotoninin kanser hücresi proliferasyonu, istilasını, yayılması ve tümör anjiyogenezini üzerinde potansiyel bir etkisi olduğu gösterilmiştir (Balakrishna et.al., 2021). Sebep olan mekanizma karmaşık olsa da hastalığın ilerlemesi ile tümördeki serotonin düzeylerinin ve bunun spesifik reseptör alt tipleri ile etkileşiminin ilişkili olduğu düşünülmektedir. Tez çalışmasında serotonin sinyal yolunda etkili olan HTR1B (5-Hidroksitriptamin Reseptör 1B) ve TPH1 (Triptofan hidroksilaz 1) genlerinin kolon kanserinde ifadesi ve bu ifade üzerinde hipoksinin etkisi araştırılmıştır.

## 1.1 Serotonin Biyosentezi

Serotonin enterokromaffin hücreleri (EC) tarafından sentezlenir ve az miktarı bağırsak lümenine salınırken çoğunluğu lamina propriaya salgılanır.

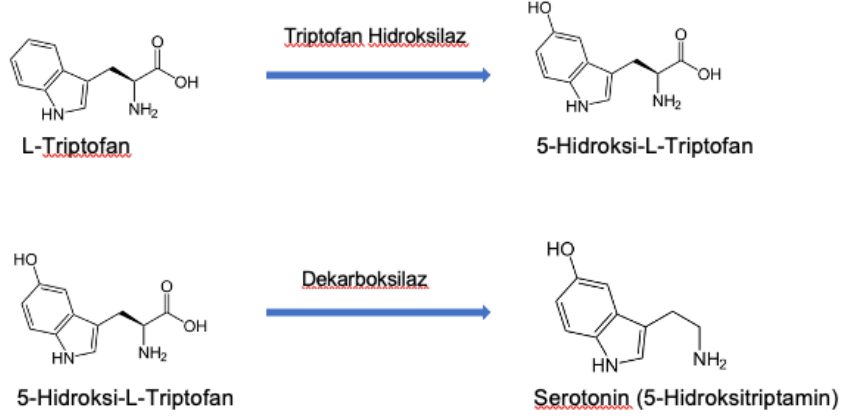


Şekil 1.1: Serotoninin moleküler yapısı



Şekil 1.2: Serotonin biyosentezi (Kanova ve Kohout 2021)

Serotoninin diğer bir sentez şekli ise beyinde L-triptofanın iki basamaklı bir şekilde serotonine dönüşümüdür. Triptofan, triptofan hidroksilaz yardımıyla hidroksillenir ve böylelikle kan-beyin bariyerini kolayca geçebilen 5-hidroksitriptofan sentezlenir. Sentezlenen 5-hidroksitriptofan ise sitoplazmada dekarboksilaz yardımıyla dekarboksilasyona uğrar ve serotonin sentezi tamamlanmış olur.



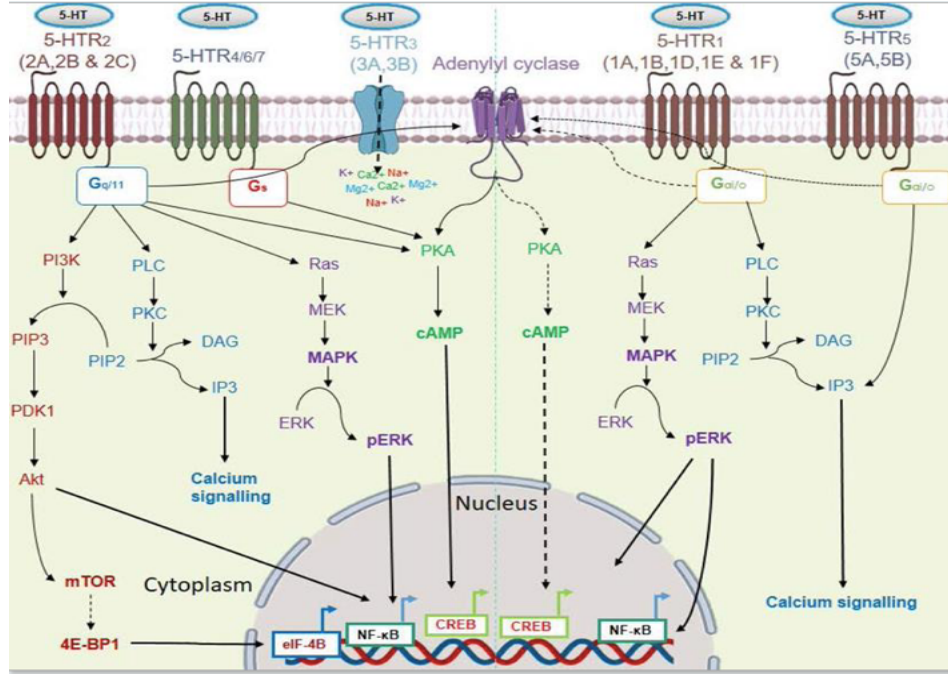
**Şekil 1.3:** Beyinde serotonin sentezi (Hamon et.al., 1948'den uyarlanmıştır.)

### 1.1.1 Serotonin salınımı

5-HTP (5-Hidroksitriptofan)'nin sitoplazma dekarboksilasyonunun ardından meydana gelen serotoninler aksonal terminalden salınmak üzere sitoplazmadaki veziküllerde depolanmaktadır. Serotoninin veziküllerde depolanması sitoplazmadan aktif transportu gerektirir. Veziküler transporterlar bu enerjiyi zarda bulunan hidrojen ATPazları kullanarak sağlar. Amfetamin türevleri SERT (Açık hali?) transporterını ve veziküler transporterı baskılar. Bu şekilde serotoninin vezikül içine girememesine sebep olur. Hücre içinde serotonin seviyesinin artması SERT'in normalde yaptığı taşınımın tersi bir şekilde hücre dışına serotonin çıkışına sebep olur. Fizyolojik pH'da iyonize halde bulunan serotonin, basit difüzyonla zardan geçemez ve bütün vezikül içeriğinin boşaltılmasıyla yani ekzositozla geçmektedir. Depolarizasyon olsun ya da olmasın hücre içine kalsiyum girişi serotonin salınmasını artırır.

### 1.1.2 Serotonin reseptörleri

Serotonin, etkilerini pre-sinaptik ve post-sinaptik hücre membranlarında bulunan farklı tipteki reseptörler ile göstermektedir. Bu reseptörler 5-Hidroksitriptamin reseptörleridir ve 1'den 7'ye kadar isimlendirilmişlerdir (5-HTR<sub>1</sub>-5-HTR<sub>7</sub>). Buldukları bölgelere ve reseptöre göre serotonin işlevi değişebilir.



**Şekil 1.4:** Serotonin reseptörü (5-HTR) alt tiplerinin sinyal yolları

Serotonin, 15 reseptör alt tipi aracılığıyla sinyal verir. Reseptörlerin çoğu, 5-HTR3 alt ailesi dışında GPCR'lere (G protein kenetli reseptör) aittir. Bu reseptörler, birbirine bağlı 5-HTR<sub>1</sub> ailesi uyarıldığında Protein Kinaz A (PKA) yolunun baskılanması sağlar.

- 5-HTR<sub>2</sub> ailesi uyarıldığında Protein Kinaz C (PKC) yolu aracılığıyla sinyal iletilir.
- 5-HTR<sub>3</sub> serotonin reseptör ailesi iyon kanalları ile ilişkili olduğu için serotonin reseptöre bağlanınca plazma zarı depolarizasyona uğrar.
- 5-HTR<sub>4</sub> G<sub>s</sub> proteini ile ilgili olduğu için serotonin ile etkileşime girdiğinde hücre içinde cAMP derişimini artırır.
- 5-HTR<sub>5</sub> ailesi uyarılması da Protein Kinaz A (PKA) yolunu baskılar.
- 5-HTR<sub>6</sub> ve 5-HTR<sub>7</sub> reseptörleride G<sub>s</sub> proteinleri ile ilişkili olup aktivasyonu cAMP derişimini arttırmaktadır.

Bağıışıklık hücreleri 5-HT reseptörlerini, SERT (Serotonin Taşıyıcısı) ve TPH'yi eksprese eder. Serotoninin makrofajlardan ve monositlerden sitokin salınımı üzerinde karmaşık etkiler uyguladığı birçok çalışmada bildirilmiştir ve bu nedenle immün mikroçevrenin kontrolünde çok önemli bir faktördür. İnflamatuar yollardan gelen aşağı akış sinyalinin

karsinogenezi kontrol ettiği artık anlaşılmıştır. Bu nedenle, serotonin kaynaklı bağışıklık tepkisi, kanser ilerlemesinin başka bir mekanizması olabilir.

**Tablo 1.1:** Bağışıklık hücrelerinde bulunan serotonin reseptörleri

Bağışıklık Hücresi	5-HT Alıcıları	Tepki
Monositler ve Makrofajlar	1A, 1E, 2A, 3A, 4, 7	IL-6, 1 $\beta$ , 8/CXCL8'I serbest bırakır, IFN- $\gamma$ kaynaklı fagositoz, T-hücresi uyarımı, TNF- $\alpha$ salınımını engeller, NK hücre baskılanmasını engeller.
Dendritik Hücreler	1B, 1E, 2A, 2B, 4, 7	
Nötrofiller	1A, 1B, 2	Tümör hücresi fagositozu ve oksidatif patlamayı engeller.
T Hücreleri	1A, 1B, 2A, 2C, 3A, 7	IL-2, 16 ve IFN- $\gamma$ , T hücre proliferasyonunu serbest bırakır.
B Hücreleri	1A, 2A, 3, 7	
Endotel Hücreleri		T-hücresi kemotraktan salınımı, eNOS ifadesi, lökosit diapedezisini inhibe eder.
Vasküler Düz Kas Hücreleri		IL-6 sentezi, ICAM-1, VCAM-1, NO, NFKB'nin TNF- $\alpha$ kaynaklı ekspresyonunu inhibe eder.
Mikroglia	2B, 5A, 7	Yaralanmaya bağlı microglial hareketliliği ve beyin olgunlaşmasını teşvik eder.

## 1.2 Serotonin ve Kanser

Kanser; hücrelerin yeni büyüme anlamına gelen neoplazi ile adlandırılan kontrolsüz büyüme ve çoğalma ile meydana gelmektedir. Büyüme şekillerine göre benign ya da malign olabilirler ve neoplazm olarak isimlendirilir. Kanser ise malign neoplazmdır. Kanserdeki temel ilke somatik hücre genomunda meydana gelen moleküler değişikliklerden kaynaklı genetik hastalıktır (Kumar et.al., 2015).

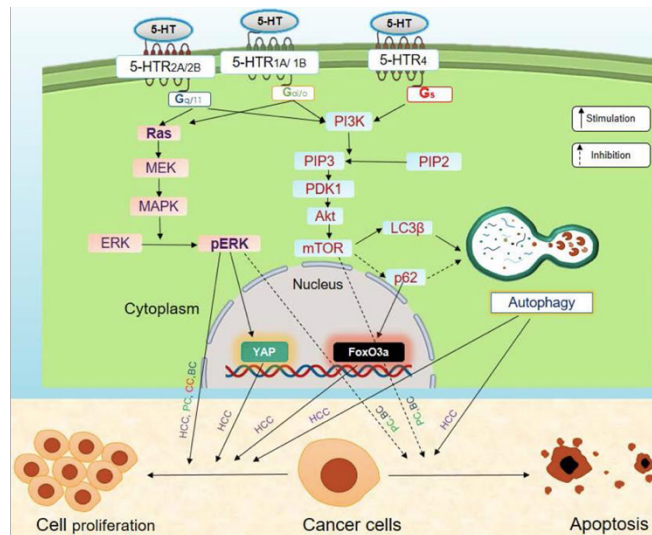
Esansiyel bir aminoasit olan triptofandan üretilen serotonin (5-hidroksitriptamin, 5-HT) biyojenik bir monoamin olarak görev görür. Serotoninin rolü merkezi sinir sisteminde nörotransmitter olarak ve gastrointestinal sistemde motilite aracısı olarak iyi tanımlanmıştır ve çeşitli kanserlerde tümör oluşumundaki işlevi araştırılmaktadır.

Serotoninin kanser hücresi proliferasyonu, istilası, yayılması ve tümör anjiyogenezi üzerinde potansiyel bir etkisi olduğu gösterilmiştir (Balakrishna et.al., 2021). Sebep olan mekanizma karmaşık olsa da tümördeki serotonin düzeylerinin ve bunun spesifik reseptör alt tipleri ile etkileşiminin, hastalığın ilerlemesi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Serotonin sinyali,

MAPK ve PI3K/Akt sinyal eksenini aracılığıyla kanser hücrelerinin proliferasyonunu uyararak ve apoptozu inhibe ederek tümörün ilerlemesini teşvik eder. Serotonin (5-hidroksitriptamin, 5-HT), çoklu reseptör alt tiplerinin bağlanması yoluyla periferik ve merkezi etki dahil olmak üzere çok çeşitli fizyolojik etkilere aracılık eden bir nörotransmitterdir (Wilkinson ve Dourish 1991). Serotonin reseptörlerinin özellikle 5-HT 1A, 5-HT 1B mitojenik etkileri olmasına rağmen, 5-HT 1D ve 5-HT 2A, meme kanseri, prostat kanseri ve mesane kanserinde araştırılmış olup (Dizeyi et.al., 2004; Siddiqui et.al., 2006; Sonier et.al., 2005, 2006) bu reseptörlerin kolorektal kanserdeki önemi tam çalışılmamıştır.

*İn vitro* çalışmalar; meme kanseri, prostat kanseri, idrar kesesi kanseri, kolorektal kanser, karsinoid ve küçük hücreli akciğer kanseri gibi çeşitli kanserlerde serotonin antagonistlerinin anti-kanser etkisini göstermiştir. Serotoninin anti-kanser terapötik bir hedef olarak kullanımını değerlendirmek ve kanserdeki rolünü daha fazla aydınlatmak için *in vivo* çalışmalara ihtiyaç vardır.

Serotonin bağışıklık düzenleyici özellikleri açısından da incelenmektedir ve çalışmalarda, potansiyel anti-inflamatuar etkisi gösterilmiştir. Böylelikle ileride serotonin antagonistlerinin immünoterapi ile kombinasyonu ilgi konusu olacaktır.



**Şekil 1.5:** Serotonin sinyalinin kanser üzerindeki etkileri. (Burada, düz siyah oklar stimülasyonu, kesikli siyah oklar ise inhibisyonu gösterir. Kısaltmalar: BC, Meme kanseri; CC, Kolon kanseri; HCC, Hepatoselüler karsinom; PC, Prostat kanseri. (Karmakar et.al., 2021))

### 1.2.1 Meme kanseri ve serotonin

Meme kanseri prognoz belirteçleri şimdiye kadar sınırlı kalmıştır. Bu, terapötik parametrelerin yanı sıra prognostik parametreleri aramak için heyecan verici bir yol açar. Serotonin'in meme bezi gelişimindeki sahip olduğu rolü ve hamilelik, emzirme ve involüsyon esnasında normal meme dokusunda epitelyal homeostaz için bir düzenleyici olarak rolü iyi tanımlanmıştır. Epitelyal homeostazda meydana gelen düzensizlik ile meme kanserinin başlaması ve ilerlemesi arasında bir ilişki kurulmuştur (Sarrouilhe et.al., 2015).

Serotonin, kısmen 5-HT<sub>2A</sub> reseptörleri aracılığıyla neoplastik meme hücrelerinin büyümesini destekler. Bu, serotonin ve seçici 5-HT<sub>2A</sub> reseptör agonistinin hücre büyümesini konsantrasyona bağlı bir şekilde uyardığı insan meme adenokarsinom hücre hattı olan MCF-7 hücre hattında aydınlatılmıştır (Sonier et.al., 2006). Ayrıca, artan serotonin sentezine karşılık gelen tümör ilerlemesi sırasında TPH1 ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (Pai et.al., 2009).

Çeşitli 5-HT reseptörlerinin ekspresyonunu incelemek için doku mikrodizisi yapıldı. 5-HT<sub>1A</sub>'nın yüksek ekspresyonu meme kanseri hücrelerinin plazma membranında görüldü, ancak aynı zamanda ön planda malign olmayan hücrelerin sitoplazmasında da gözlemlendi. 5-HT<sub>1B</sub> ve 2B ekspresyonu değişkenlik gösterirken hem malign hem de malign olmayan hücrelerin sitoplazmasında ifadesi gözlemlendi. 5-HT<sub>2B</sub> ile östrojen-a arasında ve 5-HT<sub>4</sub> ile östrojen-a ve progesteron reseptörleri arasında önemli bir korelasyon da tanımlandı. Bununla birlikte, reseptör alt tipi ile tümör derecesi arasında bir ilişki bulunmadı. Bununla birlikte, reseptör alt tipi ile tümör derecesi arasında bir ilişki bulunamamıştır. 5-HT reseptör alt tipleri ile tümör progresyonu arasında güçlü bir korelasyon kurmak ve serotoninin prognostik bir belirteç olarak kullanımını belirlemek için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır (Kopparapu et.al., 2013).

Depresyon, meme kanserli hastaların çoğunda görülen yaygın bir semptomdur. Bu genellikle, seçici serotonin geri alım inhibitörleri (SSRI) veya trisiklik antidepresanlar (TCA) gibi antidepresan (AD) ilaçları ile tedavi edilir. Bir hayvan çalışması, TCA ve SSRI'nin tümör büyümesini destekleyebileceğini ve meme kanseri riskini artırabileceğini ortaya koymuştur, (Brandes et.al., 1992) ancak bu, insan veya *in vitro* çalışmalarla doğrulanmamıştır. AD ile meme kanseri riski arasındaki ilişkiyi inceleyen bir meta-analiz yapıldı ve AD kullanıcıları arasında genel meme kanseri riski arasında korelasyon

bulunmamıştır (Eom et.al., 2012). Bununla birlikte, SSRI'ların hücre proliferasyonunu inhibe edebileceği öne sürülmüştür. Bir çalışma, SSRI fluoksetinin antikanserojenik bir etkiye sahip olabileceğini ve kemosenitiviteyi artırabileceğini göstermiştir (Zhou et.al., 2012).

### **1.2.2 Prostat kanseri ve serotonin**

Prostat kanseri (PC), erkeklerde en sık görülen kanserdir ve hormona dirençli metastatik prostat kanseri, bu ilerleyici malignitenin son aşamasını temsil eder. Nöroendokrin hücreler (NE), normal prostat bezinde, bazal ve ekzokrin salgı hücrelerinde bulunan epitel hücre tipleridir. NE hücreleri, metastatik PC dahil olmak üzere çoğu prostat kanserinde de bulunur. Bu hücreler, diğer peptid hormonlarıyla birlikte serotonin üretir ve salgılarlar (Sarrouilhe et.al., 2015).

5-HT Serotonin iyi huylu prostat dokusunda, PC'de ve metastazlarda tespit edilmiştir. PC üzerindeki etkisine farklı tümör evrelerinde farklı reseptör alt tipleri aracılık eder. 5-HT1A ve 5-HT1B reseptörlerinin güçlü ekspresyonu, yüksek Gleason skoru ve metastatik PC ile agresif PC'de görülmüştür (Dizeyi et.al., 2004).

5-HT4 reseptörleri ağırlıklı olarak yüksek dereceli tümörlerde bulunmuştur. Öte yandan, 5-HT2B reseptör ekspresyonu patolojik olarak değişmiş prostat dokusu ile ilişkilendirilmiştir, bu da bunun PC'nin erken evrelerinde yer aldığını düşündürmektedir (Dizeyi et.al., 2005).

Bu çalışmalar, NE hücrelerinin ve serotonin sekresyonunun, serotonin kaynaklı büyüme faktörü salınımı yoluyla androjenden yoksun bir ortamda prostat hücresi büyümesini destekleyebileceği hipotezini desteklemektedir. Androjen bağımsız hücre hattı kullanılarak yapılan *in vitro* çalışma, serotoninin hücre proliferasyonu üzerinde doza bağlı bir uyarıcı etkiye neden olduğunu gösterilmiştir (Siddiqui et.al., 2006).

Başka bir *in vitro* çalışma, serotoninin, Mitojen ile aktive olan protein (MAP) kinazı ve PC hücre göçünde yer alan PI3K/Akt sinyal yollarını aktive ettiğini gözlemlenmiştir. Ayrıca, seçici bir 5-HT1A reseptör antagonisti ile ön işleme tabi tutulan hücre hatlarının, sinyal yolları üzerinden hücre çoğalmasımı ve göçünü azalttığını belirlenmiştir (Dizeyi et.al., 2011).

Bu çalışmalar, hormon bağımsız hücre hatlarının 5-HT reseptör antagonistlerine duyarlı olduğunu ve 5-HT1B antagonistinin ileri araştırmalar için daha olası terapötik seçenek olduğunu göstermektedir (Siddiqui et.al., 2006). Bununla birlikte, androjene yanıt veren hücre hatları ile yapılan başka bir çalışma, serotoninin fizyolojik konsantrasyonunda PC hücre büyümesine aracılık etmede 5-HT1A ve 1B reseptörlerinin hipotezini desteklememektedir (Pirozhok et.al., 2007). Bu tutarsız sonuçlar muhtemelen 5-HT reseptör alt tiplerinin daha düşük serotonin afinitesinden kaynaklanmaktadır (Sarrouilhe et.al., 2015).

### **1.2.3 Hepatoselüler kanser (HCC) ve serotonin**

Serotonin, parsiyel hepatektomiden sonra karaciğer rejenerasyonunu başlatır ve vasküler endotelial büyümeyle ilgili sinyal yolları üzerinden iskemik hasardan sonra doku onarımını destekler (Lesurtel et.al., 2012).

Doza bağlı bir şekilde serotoninin, insan HCC hücre hatları olan Huh7 ve HepG2'nin hücrelerinin hayatta kalmasını ve proliferasyonunu desteklediği bulunmuştur (Sarrouilhe et.al., 2015). Serotoninin bu etkilerine 5-HT reseptörleri aracılık eder.

Antagonistleri, HepG2 hücre dizileri üzerinde güçlü sitotoksik etkiler gösterdiği, (Soll et.al., 2012) ve bu nedenle 5-HT reseptörlerinin HCC'li hastalar için yeni bir terapötik hedefi temsil edebileceğini düşündürmektedir.

### **1.2.4 Glioma ve serotonin**

Glioblastoma (GBM), yetişkinlerde en sık görülen malign glioma şeklidir. SSRI'lar (serotonin geri alım inhibitörü) gibi antidepresanların astrositlerde hücre içi kalsiyum ( $Ca^{2+}$ ) seviyelerini artırdığını, böylece mitokondriyal hasarı ve astrosit apoptozisini indüklediğini göstermiştir. Fluoksetinin etkisi glioma hücre hatlarında incelendiğinde hücreler üzerindeki AMPA reseptörleri ile etkileşime girdiği, böylece  $Ca^{2+}$  akışını indüklediği ve hücre ölümünü tetiklediği bulunmuştur. Bu bulgular, SSRI'ların GBM tedavisinde potansiyel bir rolü olabileceğini ifade etmektedir (Balakrishna et.al., 2021).

### 1.2.5 Küçük hücreli akciğer kanseri (SCLC) ve serotonin

Küçük hücreli akciğer kanseri (SCLC), erken metastaz yapan çok agresif bir epitelyal tümördür ve tütün kullanımı ile ilişkilidir. Nikotin, SCLC hücrelerinin proliferasyonunu uyarır ve bu hücrelerden serotonin salınımını da uyarır.

Serotonin'in SCLC proliferasyonuna etkisini belirlemek için yapılan çalışmada, SCLC hücre hatlarına serotonin ilavesinin doza bağlı bir şekilde hücre proliferasyonunu indüklediği ve bir 5-HT1 reseptör antagonistinin bu etkiyi bloke ettiği *in vitro* olarak belirlenmiştir (Cattaneo et.al., 1993).

### 1.2.6 Kolorektal kanser (CRC) ve serotonin

Her iki cinsiyette de dünyada görülen en sık üçüncü kanserdir ve mortalite açısından ikinci sıradadır (Bray et.al., 2018). İnsidansı artan D vitamini alınımı, düzenli aspirin alınımı, postmenopozal östrojen tedavisi gibi yöntemlerle azalmaktadır. Lif bakımından düşük beslenme, işlenmiş et tüketiminin ve sosyoekonomik düzeyin düşük olduğu ülkelerde ise insidansı yükselmektedir (Fidler et.al., 2017).

Kolorektal kanser (CRC), kromozomal dengesizlik (CIN) veya mikrosatellit kararsızlığı (MSI) ile karakterize edilebilir bir mutajenik hastalıktır (Li et.al., 2021; Schmitt et.al., 2021). CRC, kolonositlerin anormal büyüme, istila etme ve metastaz yapma yeteneği gibi fizyolojik özelliklerine bağlı olarak anormal işlevler kazandığı kötü huylu bir hastalıktır (Sakita et.al., 2017). CRC, batı ülkelerinde en sık görülen üçüncü kanserdir ve kansere bağlı ölümlerin ikinci önde gelen nedenidir bu nedenle her yıl artan insidans oranları göstermektedir (Torre et.al., 2017.) Tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu ve onkogenlerin aktivasyonu, CRC'lerin karsinogeneze yol açabilir (Zhou et.al., 2013). Son yıllarda bu malignitenin tedavisinde önemli ilerlemeler kaydedilmiş ve yeni kemoterapötik ajanlar kullanıma sunulmuştur. Sonuç olarak, yeni terapötiklerle tedavi edilen metastatik kolorektal kanserli hastaların hayatta kalma oranlarında artış olmuştur (El-Salhy et.al., 2003).

Murin modellerinde, yüksek serotonin seviyelerinin lenfositleri aktive ederek, insan inflamatuvar bağırsak hastalığını taklit eden sitokin salınımına yol açtığı bulundu. Bu, kolorektal tümörjenezden serotonin aracılı proinflamatuvar bir mikro-çevrenin sorumlu olabileceğini düşündürmektedir (Chan et.al., 2020).

Yapılan bir *in vivo* çalışmada, intraperitoneal serotonin enjeksiyonunun, sıçanlarda kolon adenokarsinom hücrelerinde mitotik hızı arttırdığını ve TPH inhibitörünün tümör hücresi mitotik hızını azalttığı gösterilmiştir (Sarrouilhe et.al., 2015).

Yapılan başka çalışmada CRC ile ilişkili erken mutajenik süreci araştırmak için 5-HT sentezinde kusurlu fare modelleri kullanıldı. Sonuçta, kolorektal karsinogenezin erken evrelerinde DNA onarımını destekleyen serotoninin yeni bir koruyucu rolü olduğu belirlenmiştir(Sakita et.al., 2019). Bu çelişkili sonuçlar, CRC'de serotoninin tam etki mekanizmasını aydınlatmak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç olduğunu göstermektedir.

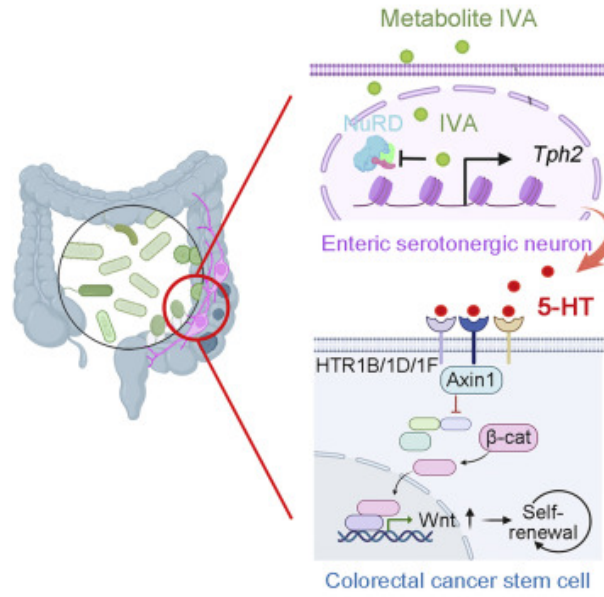
Serotonerjik antagonistlerin, antineoplastik tedaviyi takiben kanser hücresi büyümesini önleyebileceği ve SSRI'ların doğrudan sitotoksik etki yoluyla tümör büyümesini engelleyebileceği öne sürülmüştür.

5-HT1B reseptör antagonistinin, CRC hücrelerinin apoptozunu arttırdığı ve tedavi için potansiyel bir hedef olarak kabul edilebileceği de öne sürülmüştür (Ataee et.al., 2010).

Yüksek serotonin seviyesi lenfositleri aktive eder ve böylelikle insan inflamatuvar bağırsak hastalığını taklit eden sitokin salınımına yol açar. Bu da, serotoninin pro-inflamatuvar bir mikro çevrede kolorektal tümörjenezden sorumlu olabileceğini düşündürmektedir (Chan et.al., 2020). Serotonerjik antagonistlerin, antineoplastik tedaviyi takiben kanser hücresi büyümesini önleyebileceği ve seçici serotonin geri alım inhibitörlerinin (SSRI) doğrudan sitotoksik etki yoluyla tümör büyümesini engelleyebileceği öne sürülmüştür. 5-HT1B reseptör antagonisti, kolorektal kanser hücrelerinde apoptozu artırır ve tedavi için hedef potansiyeline sahiptir (Ataee et.al., 2010).

Nörotransmitter olan 5-HT, kolorektal kanser kök hücrelerinin (CSC) kendi kendini yenilemesini sağlar. 5-HT resptörleri HTR1B, HTR1D ve HTR1F kolorektal kanser kök hücrelerinde ifade edilir. Tümörle ilişkili mikrobiyota, 5-HT üretimini teşvik eder. Farelerde 5-HT sinyali blokajı, tümörün ilerlemesini ve kolorektal kanser (CRC) metastazını baskılar. Kolorektal kanser kök hücreleri (CSC'ler), kolorektal tümör oluşumuna ve metastaza katkıda bulunur. Kolorektal CSC'ler özel nişler içinde bulunur ve kendini yenileme ve farklılaşma kapasitelerini barındırır. Bununla birlikte, CSC'lerin niş düzenlemeleri belirsizliğini korumaktadır. Burada, CSC'nin kendini yenilemesi ve kolorektal tümör oluşumu için

bağırsak sinir hücrelerinin gerekli olduğu gösterilmektedir. Enterik serotonerjik nöronlar, CSC kendini yenileme modülatörü olarak işlev görmek için 5-hidroksitriptamin (5-HT) üretir. 5-HT reseptörleri HTR1B/1D/1F, kolorektal CSC'lerde yüksek oranda ifade edilir ve Wnt/ $\beta$ -katenin sinyalini başlatmak için 5-HT ile birleşir. 5-HT sinyali, CRC ciddiyeti ile ilişkilidir. Farelerde 5-HT sinyalini bloke edilmesi, yalnızca kolorektal CSC'lerin kendi kendini yenilemesini engellemekle kalmaz, aynı zamanda CRC tümörlerine karşı terapötik etkinlik gösterir (Zhu et.al., 2022).



**Şekil 1.6:** 5HT'nin kolorektal kanser kök hücresi ile ilişkisi (Zhu et.al., 2022)

**Tablo 1.2:** Kanser dokularında ve hücre hatlarında bulunan serotonin reseptörü çeşitleri  
(Karmakar et.al., 2021'den uyarlanmıştır.)

Kanser Türü	Kullanılan Modeller	Serotonin Reseptörü (5-HTR) İfadesi
Hepatosellüler Kanser	İnsan hepatosellüler karsinom hücre hatları (Huh7 ve HepG2), insan HCC dokuları ve fare ksenograft modelleri.	1A, 1B, 2B, 7
Prostat Kanseri	Prostat kanseri hücre dizileri (PC-3, DU-145 ve LCaNP) ve insan prostat kanseri dokusu.	1A, 1B, 1D, 2A, 2B, 2C, 4
Meme Kanseri	Hormona duyarlı hücre dizileri (MCF7 ve T47D), üçlü negative meme kanseri hücre dizileri (MDA-MB-231, HCC-1395 ve Hs578T) ve insan meme kanseri dokuları.	1B, 2A, 2B, 3A, 4, 7
Kolon Kanseri	Fare kolon kanseri hücre hatları (CT26 ve MC38), insan kolon kanseri hücre hattı (HT29) ve insan kolon kanseri dokusu.	1A, 1B, 3, 4
Pankreas Kanseri	İnsan pancreas kanseri hücre dizileri (AsPC-1, BxPC-3, Capan-2, CFPAC-1, HPAC, PANC-1 ve SW1990PANC-1 ve MIAPaCa-2) ve insan pankreas kanseri doku mikrodizileri.	1B, 2B
Yumurtalık Kanseri	İnsan yumurtalık kanseri hücre dizileri (SKOV3, HEYA8, 2774, ES2, TOV112D, OV90, SW626, UWB1.298 ve CaOV3) ve insan yumurtalık kanseri dokuları.	1A, 1B, 2A, 2B, 4
Melanom	Uveal melanom hücre dizisi, insan derisi melanom hücre dizisi (IPC-298).	2A, 2B, 2C
Glioblastom	Glioblastoma hücre hatları (U-373MG, U-138MG, U-87MG, DBTRG-05MG, T98G, H4, CCF-STTG1 ve Hs683) ve insan glioblastoma dokuları.	5A, 7
Akciğer Kanseri	Lewis akciğer kanserinin <i>in vivo</i> fare modeli ve depresyonlu hasta akciğer adenokarsinomu örnekleri.	1B

**Tablo 1.2 (devam)**

Safra yolu Kanseri (Kolanjiokarsinom)	Kolanjşokarsinom hücre hatları (Mz-Cha-1, Huh-28, Hucc-T1, CCLP-1, SG231, TFK1).	1A, 2A, 2B, 4, 6
İdrar Kesesi Kanseri	İnsan mesane kanseri hücre dizisi (HT1376).	1A, 1B, 1D, 2A, 2B, 2C
Plasenta Kanseri (Koryokarsinom)	İnsan trofoblast hücre dizileri (JEG3 ve BeWo)	2A

### 1.3 *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*)

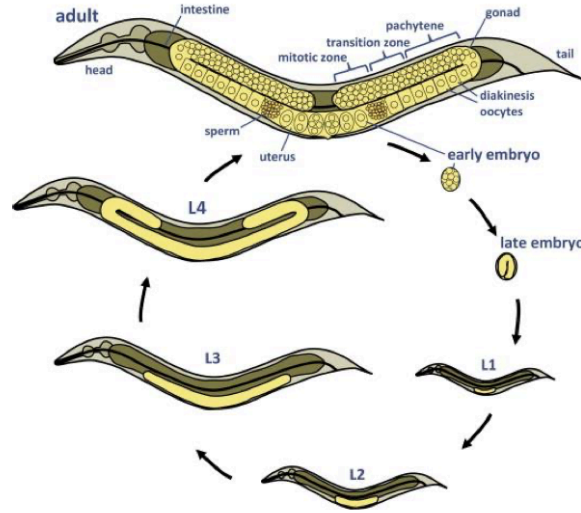
#### 1.3.1 *Caenorhabditis elegans* model organizması hakkında temel bilgiler

*Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), boyutları 1 mm olan, mikroskop yardımıyla görülebilen, patojenik özelliği olmayan, doğada ağaç diplerinde yaşama potansiyeline sahip organizmadır. Laboratuvarda, petri kaplarının içinde besin olarak kullandıkları bakteriyle (*Escherichia coli* OP50 suşu) yaşamını sürdürebilme yeteneğine sahip nematodur (Ünlü E. 2010). Bu organizma, hermafrodit ve erkek olmak üzere iki cinsiyette bulunur (Brenner S. 1973). Popülasyonun %0.5' inden daha azını erkek cinsiyeti oluşturur (Riddle DL. et.al., 2010). *C. elegans*'ın dört (L1-L4) larval dönemi vardır. Larval dönemler yaklaşık 3 gün sürmektedir. Larval dönemlerin sonunda embriyo üretebilen erişkin forma gelebilmektedir. Şekil 1.7'de *C. elegans*'a ait ışık mikroskobu görüntüsü verilmiştir.



**Şekil 1.7:** *C. elegans*'ın ışık mikroskobu görüntüsü (Savaş, N. vd., 2018).

*C. elegans*, ortam uygun değilse (açlık, sıcaklık gibi) L1-L2 evresinden sonra L3 evresi yerine “Dauer” olarak isimlendirilen forma dönüşebilmektedir. Dauer’de 4 aya kadar yaşayabilir. Ortam tekrar uygun hale gelişince bu formdaki bireyler, hayat döngülerine L4 evresinden devam eder ve gelişimlerini tamamlarlar (www.wormatlas.org). *C. elegans*’ın yaşam evreleri Şekil 1.8’de gösterilmiştir.

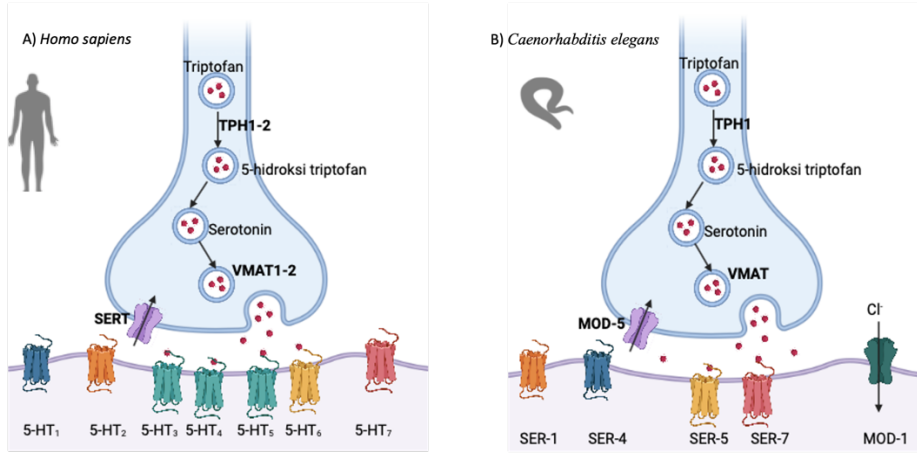


Şekil 1.8: *C. elegans* yaşam evreleri (www.wormclassroom.org)

### 1.3.2 *Caenorhabditis elegans* ve serotonin

Serotonin, *C. elegans* üzerinde de önemli bir rol oynar. Bu organizmada serotonin, sinir sisteminde ve diğer dokularda çeşitli fizyolojik süreçlerin düzenlenmesinde kullanılan bir nörotransmitter olarak işlev görür. *C. elegans*'ta serotonin, sinir hücrelerinden salgılanır ve sinaptik iletimde rol alır. *C. elegans*, özellikle sinir sisteminin çalışması ve davranışsal tepkilerin düzenlenmesi gibi konularda yapılan çalışmalarda kullanılan bir model organizmadır. Serotonin, bu organizmada davranışsal regülasyon, hareket kontrolü, gelişim ve yaşlanma gibi çeşitli süreçlerde önemli bir rol oynar. *C. elegans*'ın basit sinir sistemi, nöronların ve nöromodülatörlerin işlevlerini anlamak için incelenmesi ideal bir sistem sunar (White, Southgate et.al., 1986; Dag, Nwabudike et.al., 2023). Bununla birlikte, *C. elegans* üzerinde yapılan araştırmalar, serotonin sisteminin evrimsel olarak oldukça korunduğunu ve insanlarda da benzer biyolojik işlevlere sahip olduğunu göstermektedir (Şekil1.10.). *C. elegans* serotonin yolunda, serotonin triptofan hidroksilaz (TPH1) tarafından sentezlenir ve monoamin oksidaza (MAOA) homolog bir enzim tarafından parçalanır. Bu nedenle, *C.*

*elegans* üzerinde yapılan çalışmalar insan sağlığı, hastalıklarının anlaşılmasına ve tedavisine yönelik araştırmalarda da önemli ipuşları sağlayabilir.



**Şekil 1.9:** İnsan (A) ve *C. elegans* (B) serotonin yolu (Curran ve Chalasani 2012 Uyarlanmıştır.)

### 1.3.3 *Caenorhabditis elegans* ve kanser

*Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), kanser araştırmalarında önemli bir role sahip model organizmadır. Bu küçük nematod, genetik ve moleküler mekanizmaların anlaşılması için önemli avantajlara sahip olduğundan tercih edilmektedir. İnsan kanser genlerinin homologlarını içermesiyle birlikte, apoptoz ve otofaji gibi hücrel süreçlerinin kanser ile ilişkisinin araştırılmasında kullanılmıştır (invivobiosystems). Bu model organizma genetik manipölasyonlar ve ilaç taramaları için potansiyel bir ortamdır ve bu özelliği sayesinde kanser mekanizmalarının araştırılması ve yeni ilaç hedeflerinin keşfinde önemli bir role sahiptir (Cerón 2023).

## 1.4 Hipoksi

Dokudaki oksijen seviyesinin normal değerin altına düşmesi hipoksiya olarak tanımlanır. Solid (katı) tümörlerde hipoksiya oldukça olağan bir durumdur. Tümör hücreleri yeterli oksijen alamadığında farklı genetik yollara giderek hipoksik duruma adapte olurlar. Hipoksiya, bazı tümör çeşitlerinde radyo ya da kemoterapötik tedavi direncinin gelişiminde rol almaktadır. Literatürdeki birçok klinik durumda hipoksik durumun artışıyla tümör çapının doğru orantılı olduğunu göstermektedir. Hipoksik tümör hücrelerinin bu duruma çeşitli genetik faktörler meydana getirerek adapte olması sonucu, apoptoza ve diğer hücre ölüm sinyallerine duyarlılığı azalır. Bunun sonucunda da bu hipoksik tümör hücreleri, sistemik ve bölgesel farklılıklardan kaynaklı agresif olabilir. Böylece proliferasyon, anjiyoogenez ve sistemik metastaz kapasitesini destekleyen sinyalizasyonu arttırabilmektedir. Hipoksik durumda hücre sel cevaplara esas olarak HIF1A geni tarafından kodlanan HIF-1 $\alpha$  aracılık eder ve hipoksik durumda hücre llerde bir transkripsiyon faktörü olarak indüklenir (Türkoğlu vd., 2021).

### 1.4.1 Kimyasal hipoksi

Hipoksik koşullar altındaki değişimlerin incelenmesi için, çeşitli hipoksik modeller geliştirilmiştir. Bu modeller fiziksel ve kimyasaldır. Fiziksel modelin kontrolü zor olmakla birlikte istenen %95 nitrojen ve %5 karbondioksit gaz karışımı içeren hipoksi odaları ve gaz silindirleri bu koşulları sağlamaya ve sürdürmeye yeterlidir. Oksijen konsatrasyonunun kontrol altında olması için oksijen analizörleri bulunmaktadır. Diğer model olan kimyasal hipoksi de kobalt klorür (CoCl<sub>2</sub>), sodyum sülfid ve deferoksamin gibi ajanlar kullanılmaktadır (Abudara et.al., 2002).

*C. elegans*'larda hipoksi taklit edilirken sodyum sülfid kullanılabilir. Çünkü Sodyum sülfidin su ile olan reaksiyonu yanma ile sonuçlanmaz, böylelikle kükürt dioskit açığa çıkmaz (Jiang et.al., 2010).

Hücre sel düzeyde hipoksik model oluşturulurken CoCl<sub>2</sub> tercih edilir. CoCl<sub>2</sub> ortamdaki prolin hidroksilazlar ile tepkimeye girer ve prolin hidroksilazın HIF1-  $\alpha$ 'yı hidroksile etmesini engellemekte rol alır. Hidroksilasyon gerçekleşmediğinden HIF1-  $\alpha$  ortamda birikir ve hedef genin promotöründe yer alan HRE bölgesine bağlanır (Türkoğlu vd., 2021).

#### 1.4.2 Hipoksi ve kolorektal kanser

Katı tümörlerin çoğu hipoksik çevreye sahiptir (K. Hongo et.al., 2013). Bazı kanser hücrelerinde HIF (Hipoksi İndüklenebilir Faktör)'in ekspresyonunun fazla olduğu ve kolorektal kanserinde dahil olduğu olumsuz klinik sonucu ve farklı tümör ilerlemesi ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir (K. Xu et.al., 2019). Hipoksi ile mikro çevrede değişiklikler meydana gelir bu değişiklikler metabolizmayı ve onkojenik genleri uyararak kan damarları şeklinde metastazı indükler böylelikle kanserde önemli bir rolü üstlenir (R. Vadde et.al., 2017). Kanser hücreleri, hipoksik koşullara uyum sağlamak için kaçış mekanizmaları geliştirir. Sonuçta, yayılım için uzak organlara kaçma yeteneği kazanırlar (K. Hongo et.al., 2013). Tümörde meydana gelen bu özellik, ilaç direncine ve kanser gelişimine neden olduğu için önemli bir faktördür.

Hipoksi, kolorektal kanser gelişiminde tipik bir özelliktir (Wang ve Semenza, 1993; Biddlestone et.al., 2015 ). Hipoksi, inflamatuvar yanıt, tümör vaskülarizasyonu, metastaz ve radyo veya kemo-dirençte yer alan birçok genin ekspresyonunu aktive eden transkripsiyon faktörü HIF1 $\alpha$ 'yı stabilize edebilir (Semenza, 2004; Baba et.al., 2010; Biddlestone et.al., 2015 ). HIF1 $\alpha$  ayrıca kolorektal kanser gelişimi sırasında ATP ve makromolekül anabolizması taleplerini karşılamak için hücre metabolizmasını transkripsiyonel olarak düzenler (Ioannou et.al., 2015 ). Hipoksinin neden olduğu reaktif oksijen türlerinin (ROS) HIF1-  $\alpha$  'nın stabilize edilmesinde ve aktive edilmesinde önemli bir rol oynadığı rapor edilmiştir (Niecknig et.al., 2012 ; Movafagh et.al., 2015). Memeli hücrelerinde ROS üretiminin ana bölgesi mitokondriyal elektron taşıma zinciridir (Liu et.al, 2002). Bu nedenle mitokondri HIF-1 $\alpha$  stabilitesi ile oldukça ilişkilidir.

## 1.5 Amaç

Farklı kolon kanseri hücre hatlarında HTR1B ifadelerinin olduğu gösterilmiştir ve diğer çalışmalarda TPH1 ifadesi de araştırılmıştır. Literatüre bakıldığında kolon kanseri ile serotonin ve hipoksi arasındaki ilişkinin daha fazla incelenmeye ihtiyacı olduğu görülmektedir. Çalışmada kolon kanseri modelleri olan HT29 ve SW480 hücre hatlarında normal ve hipoksik koşullarda HTR1B ve TPH1 genlerinin mRNA ve protein düzeyindeki değişiminin belirlenmesi amaçlanmaktadır. Çalışmamızda kimyasal hipoksi modeli hücrelere uygulanacak ve ilgili genlerin ifade profilleri Real Time PCR ile mRNA seviyesinde ve Western Blot/IFC ile protein seviyesinde incelenecektir.

- i. Hedef gen bölgelerinin çoğaltılması için *in siliko* analizler ile primer dizaynı yapılması.
- ii. SW480, HT-29 ve HUVEC hücre hatlarında hipoksik modelin CoCl<sub>2</sub> ile oluşturulması ve doğrulanması.
- iii. Çalışmadaki hücre hatlarında HTR1B ve TPH1'in ifadesinin hem normal hem de hipoksik koşullardaki ifadesinin mRNA düzeyinde Real- Time PZR ile protein düzeyinde ise Western Blot/IFC tekniği ile belirlenmesi.
- iv. *C.elegans* model organizmasında sodyum sülfid ile hipoksik ortamın oluşturulması ve doğrulanması.
- v. İnsan genleri ile %60-80 benzer genleri olan *C.elegans*'tan total RNA izolasyonu ile HTR1B ve TPH1 benzeri genler olan Ser-4 ve cTPH genlerinin ifadesinin normal ve hipoksik koşullarda ifade farklılıklarının Real-Time PZR ile mRNA seviyesinde belirlenmesi.
- vi. Çeşitli biyoinformatik yöntemleri ile çalışılan genlerin rol aldıkları metabolik yolların araştırılması.

**Tablo 1.3:** Akış Şeması

Normal Ve Hipoksik Koşullarda Kolon Kanseri Hücre Hatlarında HTR1B ve TPH1 <i>Caenorhabditis elegans</i> 'da Ser-4 ve cTPH Genlerinin İfadeinin Araştırılması	
Hücre Kültürü Çalışmaları	<i>Caenorhabditis elegans</i> ile İlgili Çalışmalar
İn Siliko Analizler	C. elegans'ların Büyütülmesi
Hücrelerin Büyütülmesi	Genomik Düzeyde Çalışmalar
mRNA Düzeyi Çalışmalar	mRNA Düzeyinde Çalışmalar
Hücrelerden Protein İzolasyonu	RNA İzolasyonu
Normal ve Hipoksik Koşullar	cDNA Sentezi
Hipoksik Koşulun Oluşturulması	Hipoksik Koşulun Oluşturulması
Hipoksik Koşulun Doğrulanması	Hipoksik Koşulun Doğrulanması
Total RNA İzolasyonu	Ser-4, cTPH, CDC-42 ve CeHIF1 ile Real-Time PZR
cDNA sentezi	CeHIF1
HIF1- $\alpha$ Seviyesine Real-Time PZR ile Bakılması	Seviyesine Real-Time PZR ile Bakılması
HTR1B, TPH1, HIF1- $\alpha$ ve H $\beta$ 2 Real-Time PZR	
	Canlıların Senkronizasyonu
	LST Besiyeri Hazırlanması
	NGM Besiyeri Hazırlanması

## 2. MATERYAL VE METOD

### 2.1 Materyal

#### 2.1.1 Çalışmada kullanılan kimyasallar

Bu bilimsel araştırmada kullanılan malzemelerin hepsi çalışma alanımız olan moleküler biyoloji araştırmalarında kullanılacak saflık ve sterillliğe sahip olup, RT-PZR, PZR deneyleri sırasında kullanılmakta enzimler ve kimyasallar LightCycler, Fermentas ve Thermo scientific firmaları tarafından temin edilmiştir.

**Tablo 2.1:** Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

Kimyasal Adı	Temin Edilen Firma
APS (Amonyum persülfat)	Fisher Chemicals
Agar	Sigma
Agaroz	Sigma
Akrilamid-Bisakrilamid	Merck
Antibiyotik	Gibco
Beta-merkaptotanol	Merck
BSA (Bovin Serum Albumin)	Sigma
DEPC (Dietyl Pirokarbonat)	Sigma
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)	EuroClone, Gibco
DMSO	Sigma
dNTP	Thermo Scientific
EDTA (Etilendiamintetraasetik asit)	Merck
Etanol	Sigma
Etidyum Bromür (Et-Br)	Sigma
FCS (Fetal Calf Serum)	Gibco
Formaldehid	Sigma
Gliserol	Merck
İzoprapanol	Merck
Kalsiyum Klorür (CaCl <sub>2</sub> )	Sigma
LST (Laurly Pepto Bios Broth)	Biolife
Magnezyum Klorür (MgCl <sub>2</sub> )	Thermo Scientific
Metanol	Merck
NaCl <sub>2</sub> (Sodyum klorür)	Merck
NaOH (Sodyum hidroksit)	Merck
Nylon Membran	Millipore
Pierce ECL (Western Blotting substrat)	Thermo Scientific
SDS (Sodyum dodecyl sulfate)	Sigma
Sodyum Sülfid	Sigma
Süt tozu	Sigma
SYBR® Green PZR Master Mix ve Gradiend su	Roche
TEMED (Tetramethylethylenediamine)	Sigma
Tripan mavi solüsyonu	Sigma
Tripsin	Sigma
Tris Base	Sigma
Tween 20	Sigma

### **2.1.2 Çalışmada boyunca kullanılan canlılar**

Bu tez çalışmasında model organizma olarak kullanılan *C.elegans* Minesotta Üniversitesi'nden AB1 suşu olarak, hücre hatlarından kolon kanseri için Orta Doğu Teknik Üniversitesi'nden SW480 ve HT-29 ise Çanakkale 18 Mart Üniversitesi'nden ayrıca sağlıklı endotel hücre hattı HUVEC ise Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden tedarik edilmiştir.

## **2.2 Metod**

### **2.2.1 Çalışmada kullanılan malzemelerin ve ortamın sterilizasyonu**

Çalışma boyunca aktif olarak kullanımda olacak cam malzemelerin tamamı, solüsyonların bir takımı, deney tüpü, mikropipet uçları, bakteri kültürleri 121°C' de 15-30 dakika boyunca otoklavda sterilize edildikten sonra pastör fırınında kurutularak kullanıma hazır hale getirilmiştir.

### **2.2.2 Hücre kültürü yöntemleri**

#### **2.2.2.1 FCS (Fetal Calf Serum) hazırlanması**

Protokol gereği -20° C' de saklanan FCS, ilk kullanımından önce +4° C bir gece bekletilerek çözünmesi sağlanır. Ardından inaktivasyonunu sağlamak için 37° C' de 15 dk ve 56° C' de 35 dk bekletilir. Çözünme sağlandıktan sonra 0,22 µm'lik filtre ile filtrelenir ve alikotlara bölünerek -20° C de depo edilerek kullanıma hazır hale getirildi.

#### **2.2.2.2 Hücre kültüründe kullanılan medyumunun hazırlanması**

Hücre kültüründe kullanılan DMEM içerisinde %10 FCS içerecek şekilde hazırlandı, yani 50 mL DMEM içerisinde 5 mL FCS eklendi. Antibiyotikte ise derişimi 100 ünite/mL Penicillin ya da 10 µg/mL son derişime sahip Streptomycin eklendi.

#### **2.2.2.3 Tripsin-EDTA solüsyonunun hazırlanması**

Tripsin-EDTA solüsyonu hazırlanışı; %0,05 Tripsin ve 0,5 mM EDTA'nın steril PBS (1 X) içerisinde çözülmesi sağlandıktan sonra 0,22 µm' lik filtreden filtre edilerek sterilizasyonu yapıldı ve ana stok halinde -20° C' de depo edildi.

#### **2.2.2.4 Çalışma boyunca kullanılacak hücre hatları ile ilgili çalışmalar**

Stokları uzun süre -80° C' de saklanan hücreler, soyun başlatılması için çıkarıldıktan sonra çözümleri beklendi ve çözülmüş hücreler 2 mL %10 FCS içeren DMEM içerisine eklendi, 1000 rpm hızda 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant kısım atıldı ve çökelti %10

FCS'li DMEM ile pellet kalmayacak şekilde pipetaj yapılarak çözülmesi sağlandı. Hücreler yetiştirilmek için 75cm<sup>2</sup>'lik flasklara eklenerek %5 CO<sub>2</sub>'e sahip ve 37 °C sıcaklığa sahip inkübatörde büyütülmesi sağlandı. Hücreler buldukları flaskların %90'ını doldurduktan sonra flask içerisinde bulunan medyum 1,5 mL Tripsin-EDTA ile hücrelerin kaldırılması için uzaklaştırıldı ve 1,5 mL Tripsin-EDTA eklenerek yaklaşık 3 dk inkübatörde hücrelerin tutundukları yüzeyden kalkması için beklendi. Hücreler buldukları yüzeyden ayrılınca TripsinEDTA' nın inaktivasyonunu sağlamak için iki katı kadar hacimde (3 mL) %10 FCS içeren medyum eklendi. Flasktaki hücreler tüplere aktarıldı ve 5 dakika 1000 rpm' de santrifüj yapıldı. Süpernatant uzaklaştırıldı ve oluşun pelletler 2 mL medyum ile birlikte pipetajla çözüldü ve flasklara pipet yardımıyla aktarıldı. Flasklar tekrardan %5 CO<sub>2</sub> içeren 37°C inkübatöre konuldu ve hücrelerin büyümesi beklenildi.

### **2.2.3 mRNA ile ilgili yöntemler**

#### **2.2.3.1 Çalışmadaki hücrelerden RNA izolasyonu**

6'lı well platelere SW-480, HT-29 ve HUVEC hücre hatları kuyularda 500.000 hücre şekilde yayıldı. Hücrelerin buldukları well platelerde yüzeye tutunması için 24 saat beklendi. 24 saat sonunda hipoksik koşul meydana getirilecek gruplara 150mM CoCl<sub>2</sub> uygulandı ve hücreler 24, 48 ve 72 saat olacak şekilde hipoksik koşula maruz bırakıldı. Saat dilimleri dolan gruplarda hücreler Tripsin-EDTA kullanılarak kaldırıldı. İlk olarak, RNAaz'ları inhibe etmek için DEPC ile ellerimiz ve yüzeyler iyi bir şekilde sterilize edildi. Pellet haline getirilen hücrelerden RNA izolasyonu için kullanılan ticari kitin içindeki protokolde anlatılan basamaklar yapılarak RNA izolasyonu gerçekleştirildi. İzolasyonu yapılan RNA'lar -80°C dondurucuda cDNA sentezi için stoklandı.

#### **2.2.3.2 Elde edilen RNA'ların miktar tayini**

İzole etmiş olduğumuz RNA'ların 260 - 280 nm'de absorbans ölçümü saflık ve miktar tayini için yapılmaktadır. Ölçümlerde kör değeri olarak 200 µL dH<sub>2</sub>O kullanılmaktadır, RNA ölçümlerinde 195 µL dH<sub>2</sub>O ve 5 µL izole edilen RNA konularak yapıldı. RNA'ların saflıklarını değerlendirmek için ölçülen absorbans değerleri ile:

$$\text{RNA miktarı} = A_{260} \times \text{Sulandırma Katsayısı} \times 40\text{ng}/\mu\text{L}, \quad (2.1)$$

$$\text{Saflık} = A_{260}/A_{280} \text{ formülleri kullanıldı.} \quad (2.2)$$

### **2.2.3.3 Elde edilen RNA'ların formaldehid jel elektroforezi**

Kullanılmakta olan tank, aparatlar ve cam malzemeler protokole başlamadan önce sırasıyla %0,5' lik SDS, DEPC' li su ve etanol ile yıkanarak kurutulmaya bırakıldı. 0,5 g agaroz tartıldıktan sonra 50 mL DEPC' li su ve 5 mL 10 X FA jel tampon içerisinde mikrodalga fırında kaynaması sağlandı. Jelin sıcaklığı bir miktar azaldığında 900 µL formaldehid ve 1 µL etidyum bromür (EtBr) jel içerisine eklendi ve kasete dökülerek donması beklendi. Kasete dökülen jel donduktan sonra 1X FA jel tamponu ile doldurulmuş tank içine yerleştirildi. 2 X yükleme boyasından 3 µL ve RNA örneğinden 5 µL olacak şekilde tüplere konuldu ve 65° C sıcaklıkta 10 dakika bekletildi sonrasında buzda soğutulmuş tüpteki örneklerin jeldeki kuyulara yükleme işlemi yapıldı. Jelde örneklerin yürütülmesi sonrasında RNA örnekleri jel ile birlikte UV ışık ile görüntülenmesi yapıldı.

### **2.2.3.4 cDNA sentezi**

İzolasyonları ve miktar tayini yapılan RNA'ların cDNA sentezini yapmak için 1 µg miktarda hesaplamalar yapıldı. Son hacmi dH<sub>2</sub>O ile 12,5 µL' ye tamamlanacak şekilde 1µL Oligo dT eklendi ve 65° C sıcaklıkta 5 dakika PZR cihazında inkübe edilerek ilk basamak tamamlandı. Her bir örnekte 4 µL RT Buffer, 2 µL dNTP, 0,5 µL Ribolock İnhibitör ve 1 µL Revers Transkriptaz enzimi bulunacak şekilde bir karışım hazırlandı ve her bir tüpe 7,5 µL hacim düşecek şekilde dağıtıldı. Örnekler PZR cihazında 42° C sıcaklık 1 saat ve 72° C sıcaklıkta 10 dakika inkübasyona bırakıldı ve ikinci basamağın tamamlanması sağlandı. PZR cihazında inkübe edilen örnekler cihazdan alınıp daha sonraki adımlar için -20°C dondurucuda sonra kullanılmak üzere saklandı.

### **2.2.3.5 Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile cDNA kontrolü**

Elde edilen cDNA'lardan sonra Hβ2 primerleri ile tablo 2.2'teki koşullarda PZR uygun bir şekilde yapıldı. PZR reaksiyonları her bir tüpte 50 µL hacimde gerçekleştirildi. Kalıp olarak cDNA'lardan 1 µL (yaklaşık olarak 1000 ng) kullanıldı. Son konsantrasyonu 2 ng ileri ve geri primerden, 200 mM her bir dNTP' den, 1 X Tampon (Fermentas) (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 9.0, %1 (v/v) Triton X-100) ve 0,5 µl Taq DNA polimeraz (Fermentas), 1 mM MgCl<sub>2</sub> ile yapıldı. PZR sonuçlarının incelenmesi için agaroz jel elektroforezi yapılarak görüntüleme işlemi yapıldı.

**Tablo 2.2:** H $\beta$ 2 PZR Koşulları

Sıcaklık	Süre	Döngü
94 <sup>0</sup> C	3 dk	1
94 <sup>0</sup> C	30 sn	35
60 <sup>0</sup> C	30 sn	
72 <sup>0</sup> C	30 sn	
72 <sup>0</sup> C	10 dk	1
+4 <sup>0</sup> C	∞	1

### 2.2.3.6 Agaroz jel elektroforezi

Sentezi yapılan cDNA'ların görüntülenmesi için hazırlanan %1 lik jel, 0,1L 0,5 X TBE erlen içerisinde 1 gr Agar tartıldı ve mikrodalga fırında kaynatıldı sonrasında jel soğuması için kabin içinde bekletildi. Jel yürütme kasetine dökülmeden önce erlen içerisine 2,5  $\mu$ L Etidyum Bromür eklemesi yapıldı. Kasete taraklar yerleştirildi ardından jelin dökülmesi işlemi yapıldı ve jelin donup polimerleşmesi için belirli bir zaman beklendi. Jelin donup polimerleşmesinden sonra taraklar jelden çıkarıldı ve örnekler kuyulara 20  $\mu$ L olacak şekilde yüklendi. 20  $\mu$ L hacimde 3  $\mu$ L boya olacak şekilde eklendi. 0,5 X TBE ile doldurulmuş tank içerisine yerleştirilen jel 90 V elektrik akımında 40 dk yürütüldü, yürütüldükten sonra UV ışık ile örnekler görüntüleme işlemine alındı.

### 2.2.3.7 Gerçek zamanlı PZR (Real-Time PZR)

Bu tez çalışması için 'LightCycler 480 SSB Green I MasterMix' Real-Time PZR kiti kullanılarak yapıldı. 96'lı well platelerde her örnek 3 deney tekrarlı olacak şekilde deney planı yapıp deney kuruldu. Kitin prosedüründe olduğu şekilde (tablo 2.3) örnekler ve master mix paylaştırıldı ve kuyularda baloncuk oluşmamasına dikkat edildi sonrasında plaka film ile kapatıldı. Roche marka Gerçek Zamanlı PZR cihazına tablo 2.4' teki koşullar ile ve tablo 2.5' daki primerler kullanılarak Real-Time PZR protokolü kuruldu. Döngü tamamlandıktan sonra elde edilen Ct değerleri bilgisayarda excel programı kullanılarak analizleri yapıldı.

**Tablo 2.3:** Real-Time PZR Bileşenleri

Bileşenler	Miktar
cDNA	1 µL
Forward Primer	0,5 µL
Reverse Primer	0,5 µL
Master Mix	6,25 µL
dH <sub>2</sub> O	4,25 µL
Son Hacim	12,5 µL

**Tablo 2.4:** Real-Time PZR Koşulları

Sıcaklık	Süre	Döngü
95 °C	10 dk	1
95 °C	10 sn	35
55 °C	10 sn	
72 °C	10 sn	
72 °C	5 dk	1

**Tablo 2.5:** Çalışmada Kullanılan Primerler

Primerler	Forward Primer Dizisi	Reverse Primer Dizisi	Ürün Büyüklüğü
HTR1B	5'- AAGAAGAAACTCATGGCCGCTAG GG-3'	5'- GGGGTTGATGAGGGAGTTGA GATAG-3'	198 bç
TPH1	5'-GGGAAATGGGAGTAGCTAAG- 3'	5'- GGACCCATGAGTAGGATAGA- 3'	197 bç
Hβ-2	5'-TTTCTGGCCTGGAGGCTATC-3'	5'- CATGTCTCCATCCCACTTAAC T-3'	314 bç
HIF1-α	5'-CCACCTATGACCTGCTTGGT-3	5'-TGTCCTGTGACTTGTCC-3'	302 bç

## 2.2.4 Protein temelli yöntemler

### 2.2.4.1 Western blotting deney dizaynının yapılması ve protein Ekstraktlarının hazırlanması

Hücre kültüründe HT-29, SW480 ve HUVEC hücreleri DMEM High Glukoz içeren besiyerinde büyütüldükten sonra, hücreler protein izolasyonundan 24 saat önce 6'lı well platalere 500.000 hücre olacak şekilde yayma işlemi yapıldı ve yüzeye tutunmaları için bir gece beklendi. Daha sonra deney grubu oluşturulması için 24, 48, 72 saat gruplarına hipoksi için son konsantrasyonu 150 mM olacak şekilde  $CoCl_2$  uygulaması yapıldı. Süresi dolan deney grubundaki hücreler tablo 2.6.' da reçetesi verilen ripa buffer hazırlandı ve ripa buffer yardımıyla ile buz üzerinde kazınma işlemi uygulandı. 40 dk buz üzerinde bekletilmiş ekstraktalar 15 dk'lık aralıklarla bir pipetajlandı. Süre dolunca 20 dk 13.000 rpm' de santrifüj ile hücre kalıntılarının dibe çöktürülmesi işlemi yapıldı. Proteinler için kullanacağımız süpernetant kısım yeni bir ependorf tüpüne aktarıldı ve  $-80^{\circ}C$  dondurucuda kullanıma kadar stoklandı.

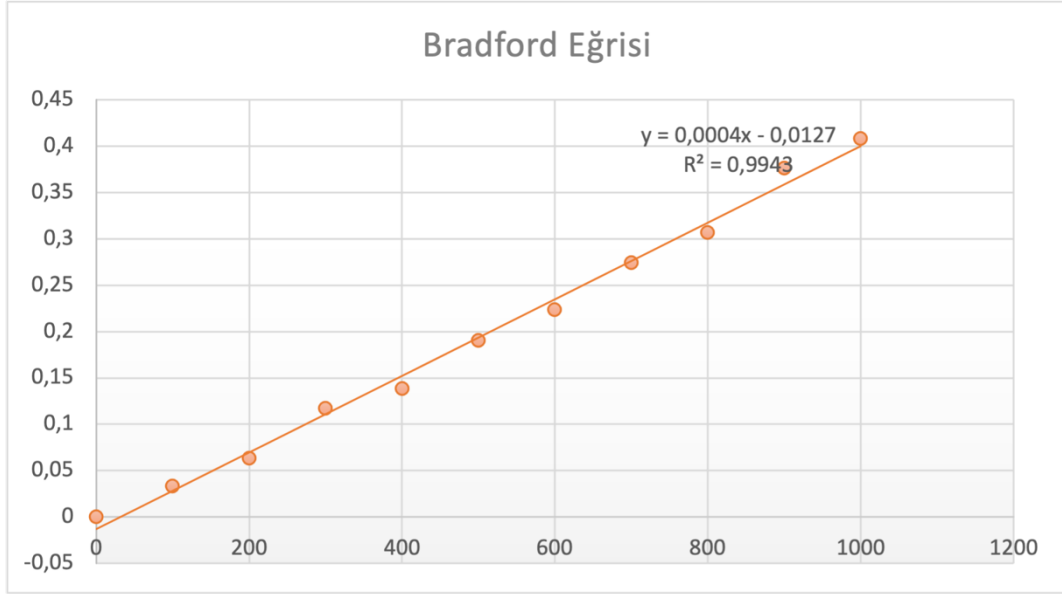
**Tablo 2.6:** RİPA çözeltisi bileşenleri

Kimyasal	Miktar
Proteaz İnhibitörü	1 Tablet
140mM NaCl	7 mL
1mM EGTA	500 $\mu$ L
1mM EDTA	100 $\mu$ L
%1 Triton X100	500 $\mu$ L
%0,1 SDS	10 mL
%0,1 Sodyum deoxycholate	0,05 g
10 mM TrisCl (pH:8)	500 $\mu$ L

### 2.2.4.2 Protein miktarlarının bradford yöntemi ile belirlenmesi

Bradford çözeltisi protein miktarını belirlemek amacıyla kullanıldı. İlk olarak 1000 mg/ $\mu$ L-100mg/ $\mu$ L farklı 10 konsantrasyon derişimde olacak şekilde standart BSA çözeltisi ayarlandı. Hazırlanan çözeltiler 96'lık well platede 5 $\mu$ L hacimde paylaştırıldı. Üstlerine 250  $\mu$ L Bradford reaktifi eklendi. 10 dk karanlıkta saklandıktan sonra 595nm absorbands değerleri ölçülerek not alındı. Ölçümlerin 3 tekrarlı yapılmasına dikkat edilmiştir. Bu koşullar sonucu oluşturulan Bradford eğrisi şekil 2.1.' de gösterilmektedir. Ölçümde kullanılmakta olan 96'lı wellin her bir kuyusuna 250  $\mu$ L hacimde Bradford çözeltisi konularak üstlerine 2,5  $\mu$ L

protein örneğimizden ve 2,5 µL de dH<sub>2</sub>O eklenerek 15 dk karanlıkta bekletilerek inkübasyonu sağlandı. Sonrasında 595 nm dalga boyunda spektrofotometre aracılığıyla absorbans ölçümü yapıldı. Standart eğri grafiğine göre hesaplamalar yapıldı ve protein ekstarktlarının değerleri kör değerinden çıkarılarak egride bulunan denklem aracılığıyla protein miktarları hesaplandı.



Şekil 2.1: Protein ölçümlerinde kullanılan Bradford eğrisi

### 2.2.4.3 SDS-PAGE

Bu deneyde kullanımda olacak malzemelerin hepsi başlanmadan önce sterilize edildi. 1mm kalınlığındaki camlar aparatlara yerleştirildi ve alt kısımda lower buffer olacak şekilde üst tarafta 2-3 cm boşluk kalacak şekilde döküldü (yani proteinlerin ayrımının gerçekleşeceği jel), oluşan köpüklerin giderilmesi için jelin üstüne izopropanol damlatıldı ve jelin donması için belirli bir zaman beklendi. Jel donduktan sonra izopropanolün uzaklaştırılması için laboratuvarda bulunan kurutma kağıtları kullanıldı. Üst jelde proteinlerin yüklenmesini sağlamak için upper buffer (Tablo 2.7.) kullanarak üst jel döküldü ve jelin donması beklenmeden taraklar yerleştirildi. Donan jellerden taraklar çıkarıldı ve jeller tank içinde uygun yerlere konuldu.

**Tablo 2.7: SDS-PAGE jel içeriği**

%10 Ayırma Jeli	Miktar	%5 Yığıma Jeli	Miktar
Lower Buffer	2,5 mL	Upper Buffer	1,25 mL
Akrilamid-Bisakrilamid (%30)	3,33 mL	Akrilamid-Bisakrilamid (%30)	873,33 µL
dH <sub>2</sub> O	4117 µL	dH <sub>2</sub> O	2852 µL
%10 (w/v) APS	100 µL	%10 (w/v) APS	50 µL
TEMED	10 µL	TEMED	5 µL

Miktar hesaplaması yapılan proteinlerden HT-29 ve SW480 için 40 µg, HUVEC için ise 35 µg hacimde jele yüklenme protokolü uygulandı. Protein örneklerinin üzerine 900µL 4X Sample LaemLi Buffer içerisine 100µL β-merkaptoetanol olacak şekilde bir bir karışım protokole göre hazırlandı ve bu karışımdan her örneğe 7,5µl olacak şekilde paylaştırılarak son miktar 22,5µL hacime tamamlanmıştır. Örnekler 95°C' de 5 dakika bekletilere denatüre edildikten sonra jele yüklendi. Jele yüklenen örneklerin son kuyuların veya ilk kuyularına 5 µl Protein Ladder marker yüklendi. Jel yürütülme işlemi için, 1 X Running Buffer (0.1 (w/v) SDS içerir) gerekli hacime kadar tank içine dökülerek 90 volta neredeyse 120 dakika yürütme işlemi uygulandı.

**Tablo 2.8: Western Blotting'de kullanılan solüsyonlar**

Western Blotting Solüsyonları	İçerik
SDS Page Alt Jel Tamponu (Lower)	1,5 M Tris-HCl (pH 8,8), %10 (w/v)SDS
SDS Page Üst Jel Tamponu (Upper)	1 M Tris-HCl (pH 6,8), %10 (w/v) SDS
Yürütme Tamponu	25 mM Tris, 250 mM Glisin, %0,1 (w/v) SDS
Transfer Tamponu	25 mM Tris, 192 mM Glisin, %20 (v/v) Metanol
10 X TBS	10 mM Tris-HCl, 20 mM NaCl, pH 7.4

#### 2.2.4.4 SDS jelin blotlanması işlemi

Transfer işlemine başlanmadan önce transfer buffer Tablo 2.8.'deki gibi hazırlandı. Transfer bufferın soğuk olması gerektiği için -20°C' de bekletildi. Transfer sisteminde kullanılacak aparatlar ve süngerler aynı soğuk transfer buffer içinde ıslatıldı. Kurutma kağıtları ve PVDF membran jellerin boyutları uygun bir şekilde kesilerek uyumlu boyutlarda hazırlandı. Transferde kullanılacak olan PVDF naylon membranların aktif hale getirilebilmesi için

metanol içerisinde 1 dakika tutulduktan sonra transfer buffera alındı. Cam levhalar arasında bulunan jel çıkartıldı, yığma jelinde gerekli olmayan kısımların kesilerek uzaklaştırılması sağlandı. Daha sonra bir sonraki basamak olan transfer işlemine geçildi. Transfer işlemi için kasette yerleştirme Şekil 2.2. 'da gösterildiği gibi sandviç modeli yapıldı. Daha sonra kaset, transfer bufferın dolu olduğu tankın içine yerleştirildi ve 15V akım'da gece boyu +4 °C' de transfere bırakıldı.

#### 2.2.4.5 Membrandaki proteinlerin belirlenmesi

Transfer işlemi tamamlanan membranlar alındı ve yağsız süt tozu içeren 20 mL bloklama çözeltisi ile 1 saat oda sıcaklığında çalkalayıcı ile inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda bloklama çözeltisi uzaklaştırıldı ve membran 3 kez 1X TBS tamponu ile 5' er dakika boyunca yıkanma protokolü uygulandı. Membranlar primer antikorlar aracılığıyla bakılacak genin (Tablo 2.9.) proteinine uygun şekilde inkübe edildi. İnkübasyon tamamlandıktan sonra membran aynı şekilde 3 kez 1X TBS tamponu kullanılarak 5'er dakika yıkandıktan sonra, sekonder antikorla (1-1,5 saat) oda sıcaklığında inkübe edildi. Membranlar ECL kitinin Reagent A ve Reagent B çözeltilerinden her birinden 100' er µL hacimde alınarak karışım oluşturuldu ve membranın aktif yüzeyine uygulandıktan sonra 2-3 dk karanlıkta bekletildi. Fusion FX VILBER LOURMAT cihazı kullanılarak membran sonuçları görüntüledi.

**Tablo 2.9.** Çalışmada kullanılan antikorlar

Çalışmada Kullanılan Primer Antikorlar	İnkübasyon Süresi
HTR1B	1 gece (12-18 saat)
TPH1	1 gece (12-18 saat)
β-Aktin	1-1,5 saat

#### 2.2.4.6 İmmünofloresans boyama (IFC)

IFC deneyinden önce büyütülen, HT-29, HUVEC ve SW480 hücreleri flasklardan Tripsin-Edta kullanılarak kaldırıldı ve sayım işlemi yapıldı. 12'li welllerde kuyu başına 250.000 hücre sayısına sahip olarak yayıldı. Hücrelerin kuyucukların yüzeyine tutunmaları yuvarlak lamel ile sağlandı. 12-18 saat hücrelerin yüzeye tutunması için 37 °C' de %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde bekletildi. Süre bitince hipoksik koşulun oluşturulacağı gruplara son derişimi 150mM olacak şekilde CoCl<sub>2</sub> uygulaması yapıldı ve 24 saat inkübasyona için bekletildi. 24 saat sonra hücrelerin bulunduğu kuyular medyumlarından arındırıldı ve kuyulara 2 kez PBS tamponu ile yıkanma işlemi uygulandı. Kuyuların yüzeyi %4 paraformaldehit ile 2-3 mm

kaplandı ve 15 dk fikse işlemine bırakıldı. 15 dk sonra fiksatif olan formaldehit uzaklaştırıldı ve kuyular %0,1 Triton X 100 içeren PBS tamponunda 10 dk bekleme işlemine alındı. Bu işlemin yapılma amacı antikorların hücre içine girmesini kolaylaştırmaktır. 10 dk bekleme süresi dolunca kuyular PBS tamponuyla 2 kez yıkandı. %1 oranında BSA içeren PBS çözeltisinde 1 saat maruz bırakılarak spesifik bağlanmaların engellemesi amacıyla oda sıcaklığında inkübasyonu sağlandıktan sonra kuyucuklara tekrar PBS tamponu ile yıkama işlemi uygulandı. Kuyucukların üzerine 1/500 oranında %1 BSA içeren PBS ile sulandırılan primer antikor eklenmesi işleminin ardından well plateler bir köpüğün içerisinde yer alan nemli havlu kağıdın üzerinde 1 saat oda ısısında inkübasyon işlemi için bekletildi. Antikorlama basamağının tamamlanmasının ardından PBS tamponu ile tekrar yıkama işlemi yapılan kuyulara ışık geçirmeyen ortamda sekonder antikor ile muamele yapıldı ve primer antikor basamağında gerçekleştirildiği gibi köpük içerisinde nemli bir ortam sağlanarak inkübasyon basamağı sağlandı. Bu aşamadan sonra karanlık ortama geçildi. Sekonder antikor muamele basamağı biten hücreler karanlık ortamda 3 kez PBS tamponu aracılığıyla yıkama işlemi gerçekleştirildi. Sonrasında hücre çekirdeklerinin boyanmasının sağlanmasını ortama 1 µg/mL DAPI (4',6-diamidino-2- fenilindol) eklenerek yapıldı. Eklenen DAPI tekrar bulunduğu ortamdan alınıp PBS tamponu ile yıkaması yapıldı. Her bir kuyuda sinyalin solmasının engellenmesi için Mounting Medyum damlatıldı ve 12'li welllerdeki yuvarlak lamellerin çıkarılması yapıldı ve çıkarılan lameller lam üzerine ters tutunan hücreler içeri bakacak şekilde kapatılma işlemi yapıldı. Deney sonuçlarının görüntü çekimlerinde "Olympus DP72" cihazı kullanıldı.

## **2.2.5 *Caenorhabditis elegans* model organizması ile ilgi yöntemler**

### **2.2.5.1 Nematod besiyerinin (NGM) hazırlanması işlemi**

İlk olarak NGM (Nematode Growth Medium) hazırlığı için 2,5 g peptone, 3 g NaCl ve 20 g agar tartılıp bir litre saf su ile çözdürüldü ve karışım 121°C'de 15 dakika otoklavlandıktan sonra 55°C'ye soğutuldu. Soğumuş karışıma 1 mL kolesterol, 1 mL 1M MgSO<sub>4</sub>, 25 mL 1,5M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ve 1 mL 1M CaCl<sub>2</sub> eklenir ve besiyeri homojen hale gelene kadar karıştırdı ve petri kaplarına dökülerek katılaşması beklendi.

### **2.2.5.2 *E. coli*'nin OP50 suşu için TBX agar hazırlanması**

TBX (Tryptone Bile Glucuronide Agar) agardan 9,125 g tartılarak 250 mL saf su üzerine ilave edilir ve otoklavda 125°C sıcaklıkta 15 dakika sterilizasyonu sağlanır, sonrasında 55 °C'ye kadar soğuması için bir süre beklenir. NGM hazırlanmış petripler katılaştıktan sonra *E. coli* ekilip 37°C de 16-24 saat bekletilir. Bu işlem stok halindeki *E. coli* OP50 şuşununda olası bir kontaminasyonun ayırt edilmesi için yapılır ve duruma göre kontaminasyon protokolleri uygulanır.

### **2.2.5.3 *E. coli* OP50 suşunun hazırlanması işlemi**

*E. coli* OP50 suşunun yetiştirilmesi için LST (Lauryl Sulfate Broth) 9,125 g Lauryl Sulfate Broth hassas terazide tartıldı ve 250 mL saf su ile karıştırıldı. Karışım 121°C'de 15 dakika otoklavlandı ve 37°C'ye soğutuldu. Soğuyan karışıma bir koloni *E. coli* ekildi ve 37°C'de 24 saat çalkalamalı inkübatörde bekletildi. Katılaştıran *C.elegans* besiyerine 400µL *E. coli* OP50 suşu yaydı ve kuruması beklendi.

### **2.2.5.4 Hipoksik ortamın oluşturulması**

Hipoklorit ile yetişkin *C. elegans*'larda embriyolar alındı ve 16 saat sonra L1 evre canlılar elde edildi. Solucanlar daha sonra NGM plakalarda 3 gün bekletildi. *C. elegans* hipoksik modeli oluşturulması için M9 tamponunda 1g/L konsantrasyonda sodyum sülfid solüsyonu hazırlandı. Solucanlar 3 gün sonra hazırlanan M9 tamponu ile plakalar yıkandı ve canlılar 15 mL'lik falkonlara aktarıldı, farklı zaman aralıklarında inkübasyon sağlandı. İnkübasyon sonunda canlılar yeni NGM'li plakalara aktarıldı ve 24 saat geri kazanım için beklendi.

### **2.2.5.5 *Caenorhabditis elegans* model organizmasından total RNA izolasyonu**

*C. elegans*'lar, M9 tamponu ile yıkandı ve besiyerlerinden toplandı. Ardından canlılar falkon tüpüne konuldu ve üzerindeki M9 aspirasyon edildi. Taze M9 eklenerek falkon tüpü buz üzerinde bekletildi. Canlılar tüplere alındı ve santrifüj edilerek pellet oluşturuldu. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra üzerine Trizol eklendi ve tüpler sıvı nitrojene atılarak hızlıca donduruldu ve RNA izolasyonu protokole uygun olarak gerçekleştirildi (Riccio 2019).

### 2.2.5.6 Real-Time PZR analizi

Real-Time PZR analizi 2 farklı cDNA sentezi gerçekleştirilerek *C.elegans*'ta analizi yapılmıştır. *C.elegans* model organizmasında normalizatör olarak bulunan CDC-42 geni kontrol PZR'ında primerleri kullanılarak PZR gerçekleştirilmiştir. Real-Time PZR yapılarak ser-4 ve cTPH genlerinin hipoksi uygulanmış ve uygulanmamış gruplardaki ekspresyon seviyeleri incelenmiştir. Hipoksik koşulların doğrulanması için ceHIF primerleri kullanılarak doğrulama işlemi yapılmıştır.

**Tablo 2.10:** Çalışmada kullanılan primerler

Primerler	Forward Primer Dizisi	Reverse Primer Dizisi	Ürün Büyüklüğü
ser-4	5'- CAGGTTTTCTCCACAGCGAC-3'	5'-CTTGATTCATTGTGGCGTGGA- 3'	287 bç
cTPH	5'- CTCTACTTCTTTCCATTGAAT TTG-3'	5'- GGAAAGTAGTAATGAGACATTCT TG-3'	217 bç
CDC-42	5'- AGCCATTCTGGCCGCTCTCG-3'	5'-GCAACCGCTTCTCGTTTGGC-3'	203 bç
ceHIF	5'- CAACGTGTTTATGGGCAAAT- 3'	5'-CATTGCAAAAACGTCATCGTA-3'	211 bç

## 2.3 Biyoinformatik Yöntemler

### 2.3.1 Benzerlik çalışmaları

Unipro UGENE programı içerisinde yer alan dizi hizalama seçeneği ile NCBI veri tabanından BLAST programı aracılığıyla HTR1B ve ser-4; TPH1 ve cTPH-1 genlerinin hizalamaları yapılarak benzerlik oranları analiz edildi.

### 2.3.2 Yolak analizi çalışmaları

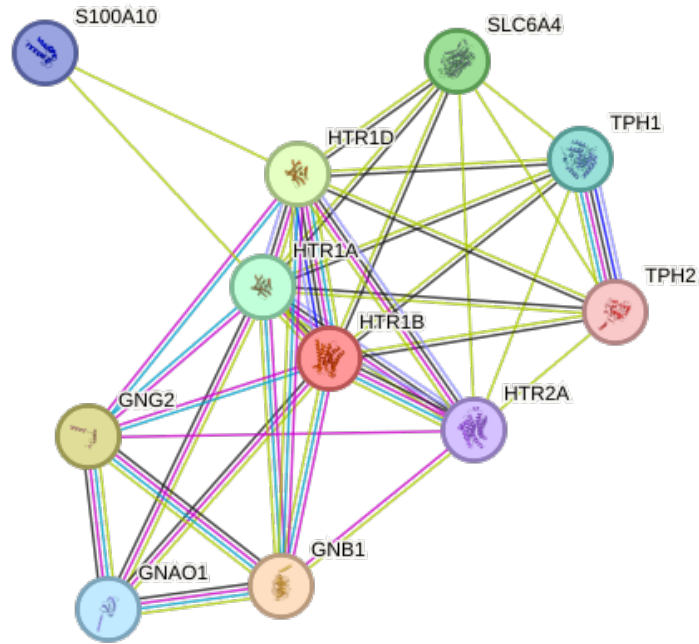
Yolak analizi çalışmalarında STRING ve KEGG programları kullanılarak çalışılan genlerin hangi metabolik yollarda rollerinin olduğu ve bu genlerin benzer metabolik yollarda rol alıp almadıkları analiz edildi.

### 3. BULGULAR

#### 3.1 Biyoinformatik Analizler

##### 3.1.1 İnsan HTR1B geni analizleri

HTR1B serotonin metabolizmasında önemli bir reseptördür. Yapılan STRING ve KEGG yolak analiz çalışmaları sonucunda *HTR1B* geninin; Serotonerjik sinaps, folat biyosentezi, triptofan metabolizması, tat iletimi, GABAerjik sinaps, morfin bağımlılığı, sirkadiyen sürüklenme, cAMP sinyal yolu, nöroaktif Ligand-Reseptör etkileşimi yollarında görev aldığı görülmüştür. Ayrıca etkileşimde olduğu *GNG2* geni ile birlikte kanser yolağında da rol almaktadır.

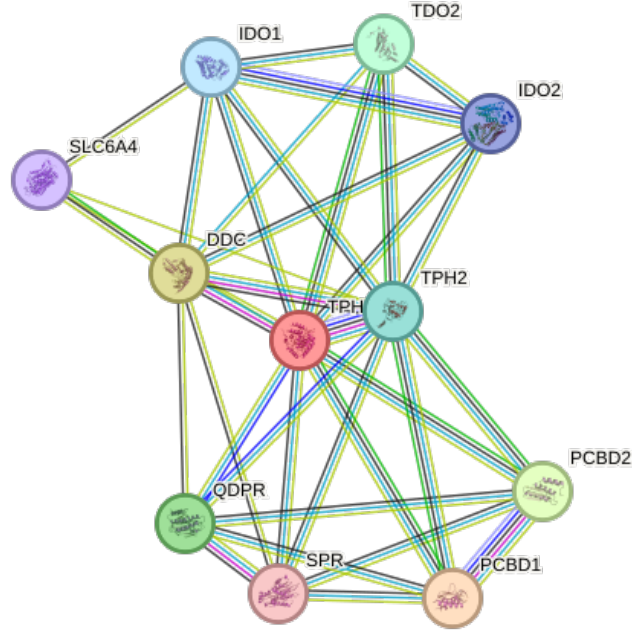


**Şekil 3.1:** HTR1B geni yolak analizi (HTR1B: 5-hidroksitriptamin reseptörü 1B, GNB1:

Guanin nükleotid bağlayıcı protein G(I)/G(S)/G(T) alt birimi beta-1, GNG2: Guanin nükleotid bağlayıcı protein G(I)/G(S)/G(O) alt birimi gama-2, HTR1D: 5-hidroksitriptamin reseptörü 1D, SLC6A4: Sodyum bağımlı serotonin taşıyıcısı, HTR1A: 5-hidroksitriptamin reseptörü 1A, TPH1: Triptofan hidroksilaz 1, GNAO1: Guanin nükleotid bağlayıcı protein G(o) alt birim alfa, S100A10: Protein S100-A10, HTR2A: 5-hidroksitriptamin reseptörü 2A, TPH2: Triptofan hidroksilaz 2.).

### 3.1.2 İnsan TPH1 geni analizleri

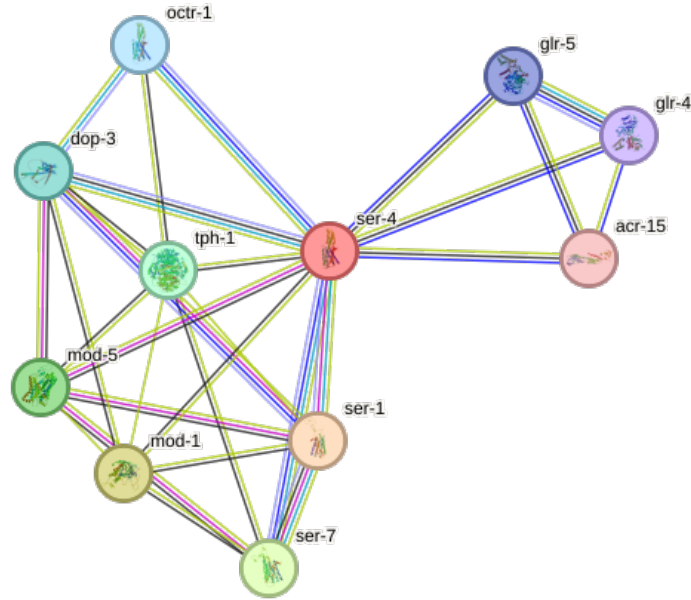
TPH1 geni serotonin metabolizmasında serotonin üretimi için önemli rol oynayan bir enzimi kodlamaktadır. STRING ve KEGG analizleri sonucuna göre TPH1 geni; Folat biyosentezi, triptofan metabolizması, serotonerjik sinaps, metabolik yolak ve Afrika tripanosomiyazı gibi çeşitli yollarda role sahiptir.



**Şekil 3.2:** TPH1 geni yolak analizi (TPH1: Triptofan hidroksilaz 1, SLC6A4: Sodyum bağımlı serotonin taşıyıcısı, PCBD1: Pterin-4-alfa-karbinolamin dehidrataz, PCBD2: Pterin-4-alfa-karbinolamin dehidrataz 2, DDC: Aromatik-L-amino-asit dekarboksilaz, QDPR: Dihidropteridin redüktaz, TDO2: Triptofan 2,3-dioksijenaz, TPH2: Triptofan hidroksilaz 2, IDO1: İndolamin 2,3-dioksijenaz 1, IDO2: İndolamin 2,3-dioksijenaz 2, SPR: Sepiapterin redüktaz.).

### 3.1.3 *C. elegans* ser-4 geni analizleri

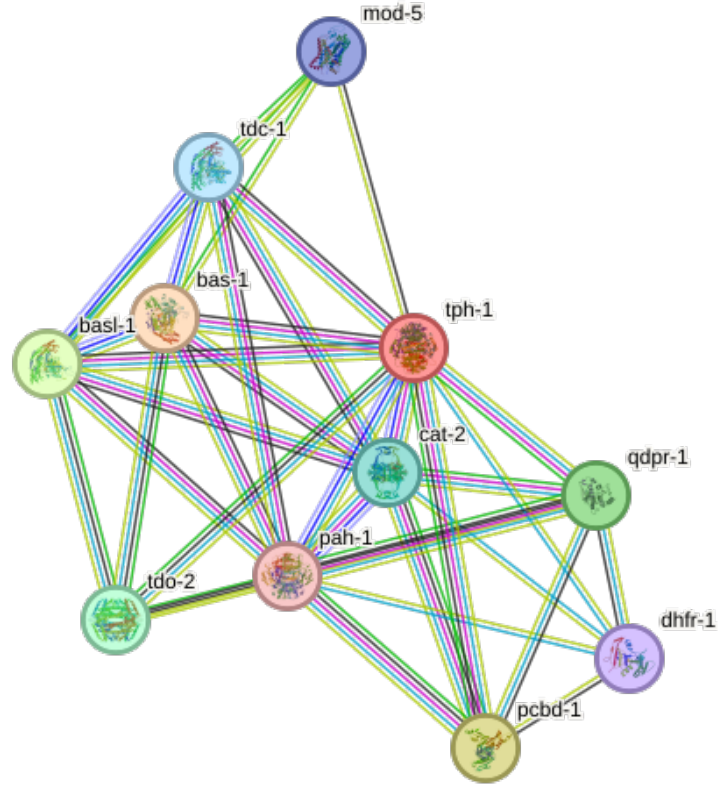
Yapılan analizler sonucunda *ser-4* geninin; Nöroaktif Ligand-Reseptör etkileşimi, kalsiyum sinyal yolu, akson rejenerasyonu yollarında görev aldığı görülmüştür. Her iki modelde seçilen genler ortak olarak G proteinine bağlı reseptör sinyal yolu, dopamine hücresel yanıt, kimyasal sinaptik iletim, kimyasal uyarıya hücresel yanıt, çok hücreli organizma süreçlerinin düzenlenmesi, serotonin bağlanması, G proteinine bağlı serotonin reseptör aktivitesi, nörotransmitter reseptör aktivitesi ve GPCR ligand bağlanması sinyal yolları ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir.



**Şekil 3.3:** ser-4 geni yolak analizi (ser-4: G\_PROTEIN\_RECEP\_F1\_2 alanı içeren protein, ser-1: G\_PROTEIN\_RECEP\_F1\_2 domaini içeren protein, mod-1: Serotonin kapılı klorür kanalı, ser-7: G\_PROTEIN\_RECEP\_F1\_2 domaini içeren protein, mod-5: Taşıyıcı, tph-1: BH4\_AAA\_HYDROXYL\_2 alanı içeren protein, dop-3: Dopamin reseptörü 3, octr-1: G\_PROTEIN\_RECEP\_F1\_2 domaini içeren protein, glr-5: GLutamat Reseptör ailesi, glr-4: GLutamat Reseptör ailesi, acr-15: Asetilkolin Reseptörü).

### 3.1.4 *C. elegans* cTPH geni analizleri

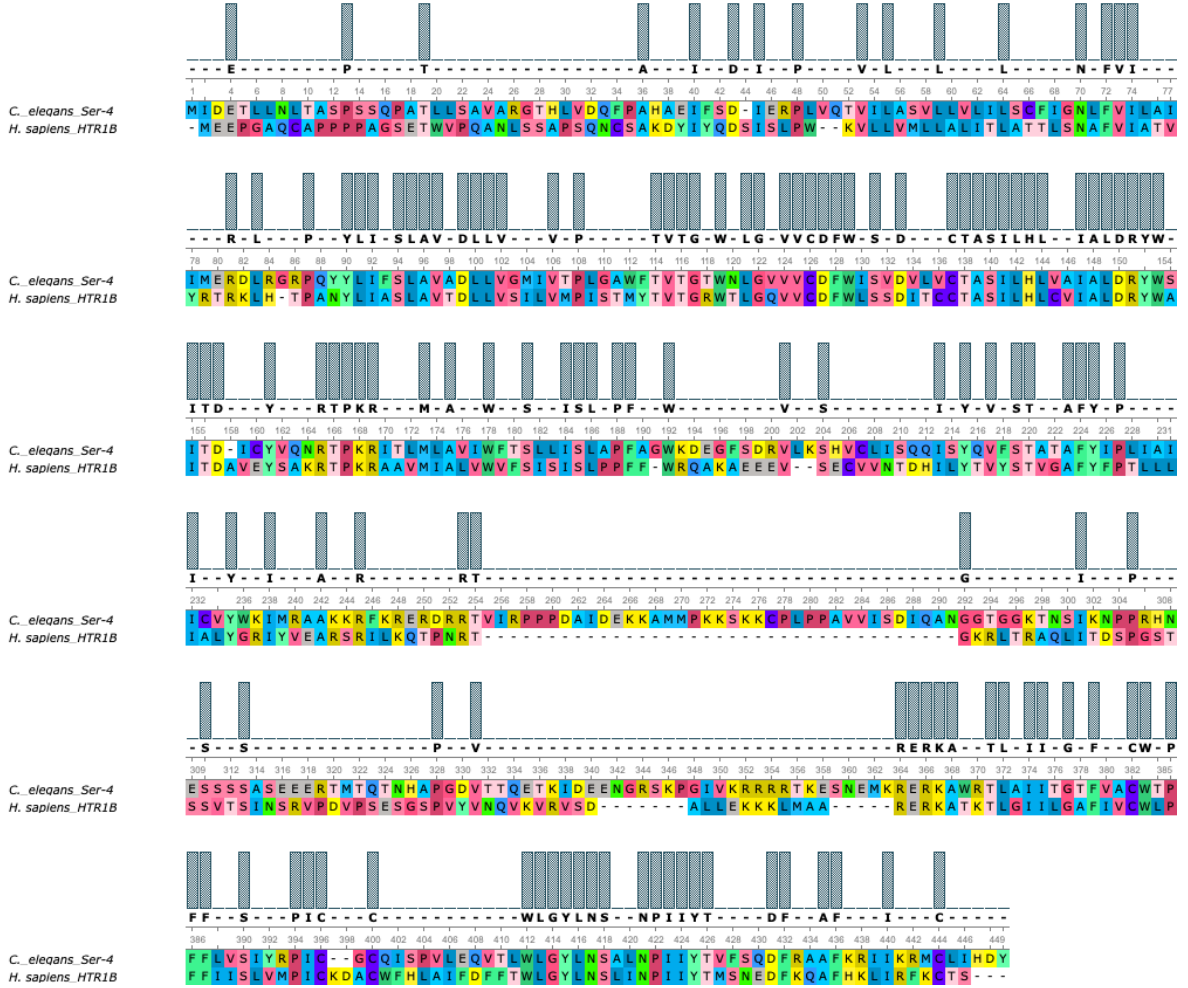
Yapılan KEGG ve STRING yolak analizleri sonucunda *ctph-1* geninin; Folat biyosentezi, tirozin metabolizması, triptofan metabolizması, fenilalanin metabolizması, metabolik yollar ve akson rejenerasyonu yollarında rol aldığı görüldü.



**Şekil 3.4:** *ctph-1* geni yolak analizi (*tph-1*: BH4\_AAA\_HYDROXYL\_2 alanı içeren protein, *mod-5*: Taşıyıcı, *tdc-1*: Tirozin dekarboksilaz, *bas-1*: Biyojenik Amin Sentezi, *basl-1*: BAS benzeri, *cat-2*: Tirozin 3-monooksijenaz, *pah-1*: Fenilalanin-4-hidroksilaz *tdo-2*: Triptofan 2,3-dioksijenaz, *pcdb-1*: Varsayılan pterin-4-alfa-karbinolamin dehidrataz, *dhfr-1*: Varsayılan dihidrofolat redüktaz, *qdpr-1*: Kinoid Dihidro Pteridin Redüktaz)

### 3.1.5 İnsan HTR1B ve *C.elegans* ser-4 geni benzerlik analizleri

Yapılan dizi benzerlik analizleri sonucunda NM\_000863.3 koduna sahip HTR1B geni 390 aminoasid (aa) ve NM\_065051.8 kodunda ser-4 geni 445 aa için benzerlik oranı %87 olarak bulundu. En çok benzerlikte 81. ve 192. aminoasidler arasında görüldü.



Şekil 3.5: HTR1B ve ser-4 geni benzerlik oranı

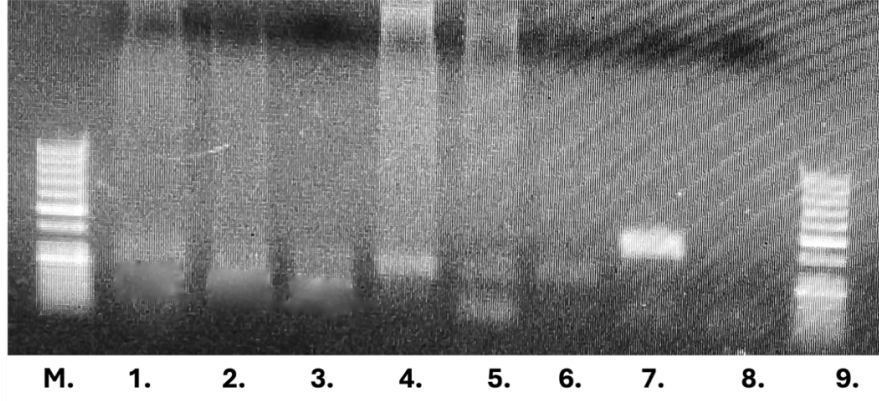


**Tablo 3.1:** PZR bileşen ve miktarları

	HUVEC	HT-29	SW480	HUVEC	HT-29	SW480	Pozitif Kontrol	Negatif Kontrol
cDNA	2 µL	2 µL	2 µL	2 µL	2 µL	2 µL	1 µL	-
Buffer	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL
MgCl <sub>2</sub>	4 µL	4 µL	4 µL	4 µL	4 µL	4 µL	4 µL	2 µL
dNTP	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL
Forward Primer	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL
Reverse Primer	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL
Taq DNA Polimeraz	0,5 µL	0,5 µL	0,5 µL	0,5 µL	0,5 µL	0,5 µL	0,5 µL	0,5 µL
dH <sub>2</sub> O	35,5 µL	35,5 µL	35,5 µL	35,5 µL	35,5 µL	35,5 µL	38,5 µL	39,5 µL

**Tablo 3.2:** PZR koşulları

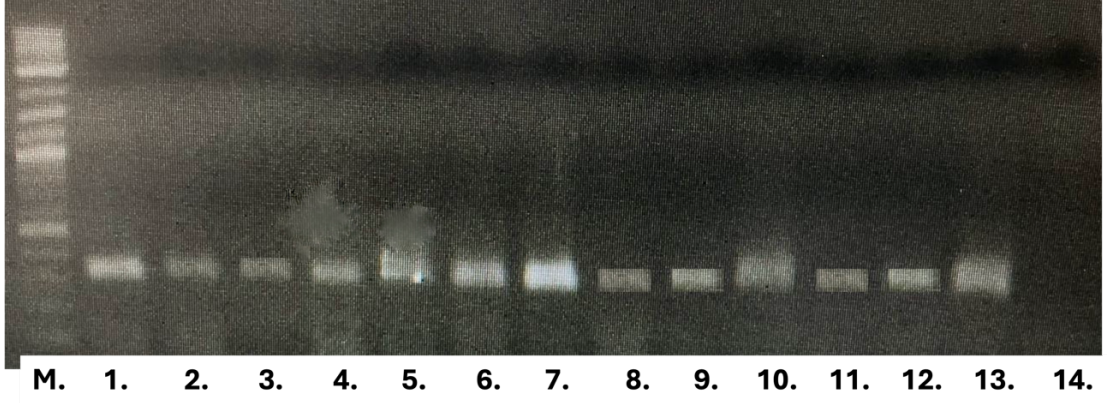
Sıcaklık	Süre	Döngü
94 °C	3 dk	1
94 °C	30 sn	35
55 °C	30 sn	
72 °C	30 sn	
72 °C	10 dk	1
+4 °C	∞	1



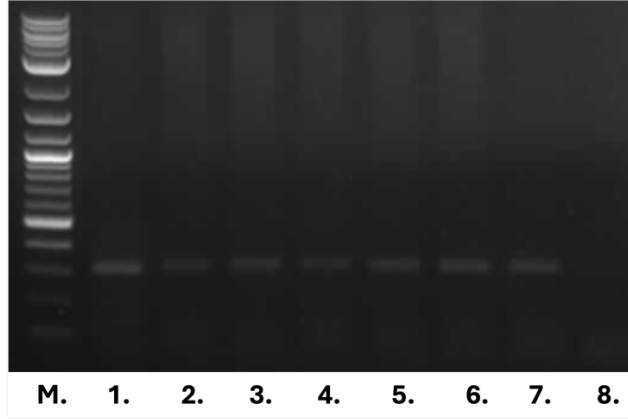
**Şekil 3.7:** Farklı hücre hatlarında HTR1B ve TPH optimizasyon PZR sonuçları (**M:** 50 bç marker, **1:** HUVEC HTR1B, **2:** HT-29 HTR1B, **3:** SW480 HTR1B, **4:** HUVEC TPH1, **5:** HT-29 HTR1B, **6:** SW480 TPH1, **7:** Pozitif kontrol, **8:** Negatif kontrol, **9:** 50 bç marker)

### 3.2.2 Çalışmada kullanılacak hücre hatlarında deney gruplarının cDNA kontrol PZR'si

Çalışmada kullanılacak olan hücre hatlarından kurulan deney sonrası izole edilen RNA'lardan sentezlenen cDNA'ların kontrolü için H $\beta$ 2 kontrol PZR'si belirtilen PZR koşullarında yapılarak kontrol edildi ve agaroz jel elektroforezi ile görüntüledi.



**Şekil 3.8:** SW480 ve HT-29 hücre hatlarında H $\beta$ 2 kontrol PZR sonuçları (**M:** 100 bç marker, **1:** SW480 24h normoksi, **2:** SW480 24h hipoksi, **3:** SW480 48h normoksi, **4:** SW480 48h hipoksi, **5:** SW480 72h normoksi, **6:** SW480 72h hipoksi, **7:** HT-29 24h normoksi, **8:** HT-29 24h hipoksi, **9:** HT-29 48h normoksi, **10:** HT-29 48h hipoksi, **11:** HT-29 72h normoksi, **12:** HT-29 72h hipoksi, **13:** Pozitif kontrol, **14:** Negatif kontrol)



**Şekil 3.9:** HUVEC hücre hatlarında H $\beta$ 2 kontrol PZR sonuçları (**M:** 100bç marker, **1:** HUVEC 24h normoksi, **2:** HUVEC 24h hipoksi, **3:** HUVEC 48h normoksi, **4:** HUVEC 48h hipoksi, **5:** HUVEC 72h normoksi, **6:** HUVEC 72h hipoksi, **7:** Pozitif kontrol, **8:** Negatif kontrol)

### **3.2.3 Kolon kanseri hücre hatlarında (SW480 ve HT-29) normal ve hipoksik koşullarda HTR1B ve TPH1 ifadesinin gösterilmesi**

#### **3.2.3.1 SW480 ve HT-29 hücre hatlarında normal ve hipoksik koşullarda Real-Time PZR ile HTR1B ve TPH1 ifadesinin gösterilmesi**

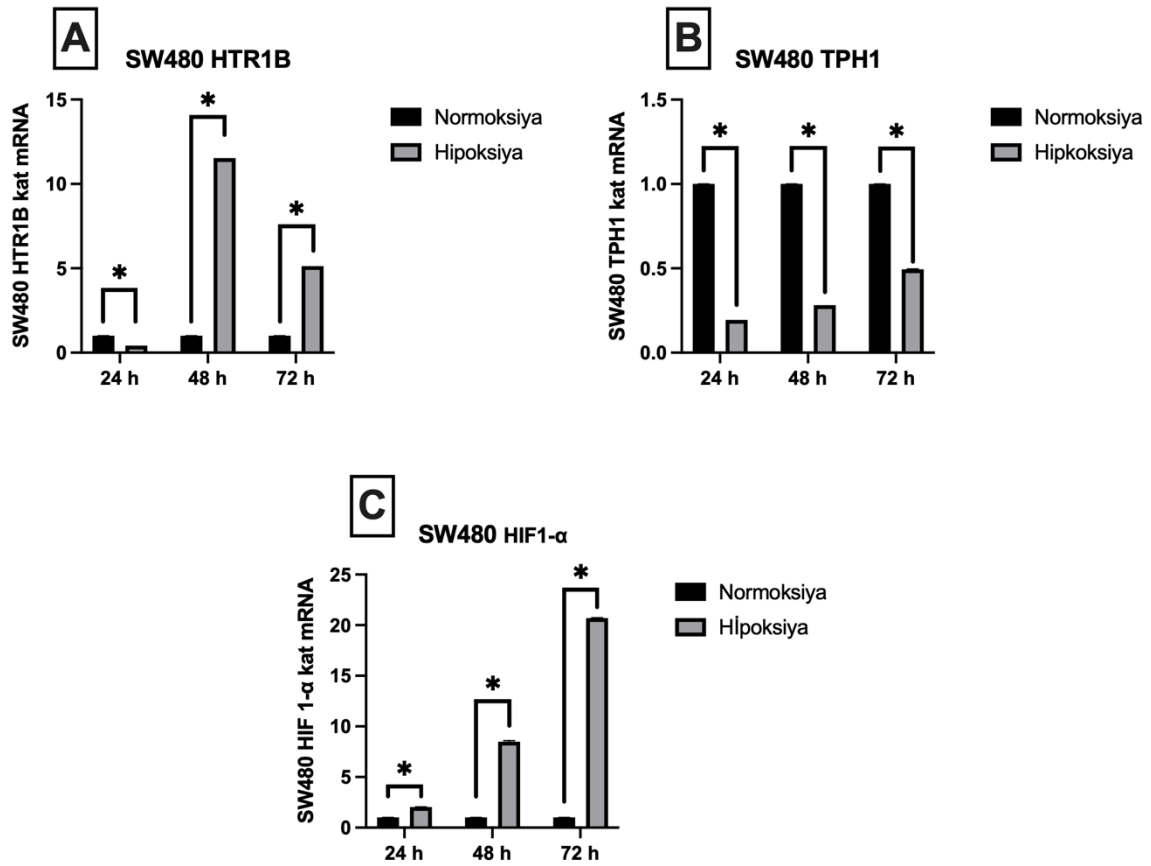
Çalışmada kullanılacak SW480 ve HT-29 hücre hatları bölüm 2.2.2.4' te anlatıldığı üzere büyütülmeleri sağlandı. İstenilen sayıya ulaşan hücrelerden 6'lık well paltelere 500.000 hücre olacak şekilde yayılma işlemi yapıldı. Hipoksik koşul uygulanacak gruplara 150mM CoCl<sub>2</sub> uygulandı ve zaman dilimleri dolan gruplardan bölüm 2.2.3.1'de anlatıldığı gibi RNA izolasyonu yapıldı. İzolasyonu yapılan RNA'lardan bölüm 2.2.3.4'te anlatıldığı gibi cDNA sentezi işlemi yapıldı.

HTR1B ve TPH1 genlerinin ifadesinin kolon kanseri modellerinde belirlenmesi için hassasiyeti oldukça yüksek olan bir Real-Time PZR tekniği kullanılarak deney kurulmuştur. Hipoksik koşulun oluşup oluşmadığını göstermek için HIF1-  $\alpha$  primerleri kullanılarak doğrulama işlemi yapılmıştır. HIF1-  $\alpha$ 'nın ifadesindeki artış hipoksik koşulun oluştuğunu göstermektedir. Real-Time PZR Tablo 2.3 ve 2.4'te verilen değerlere göre kurulmuştur.

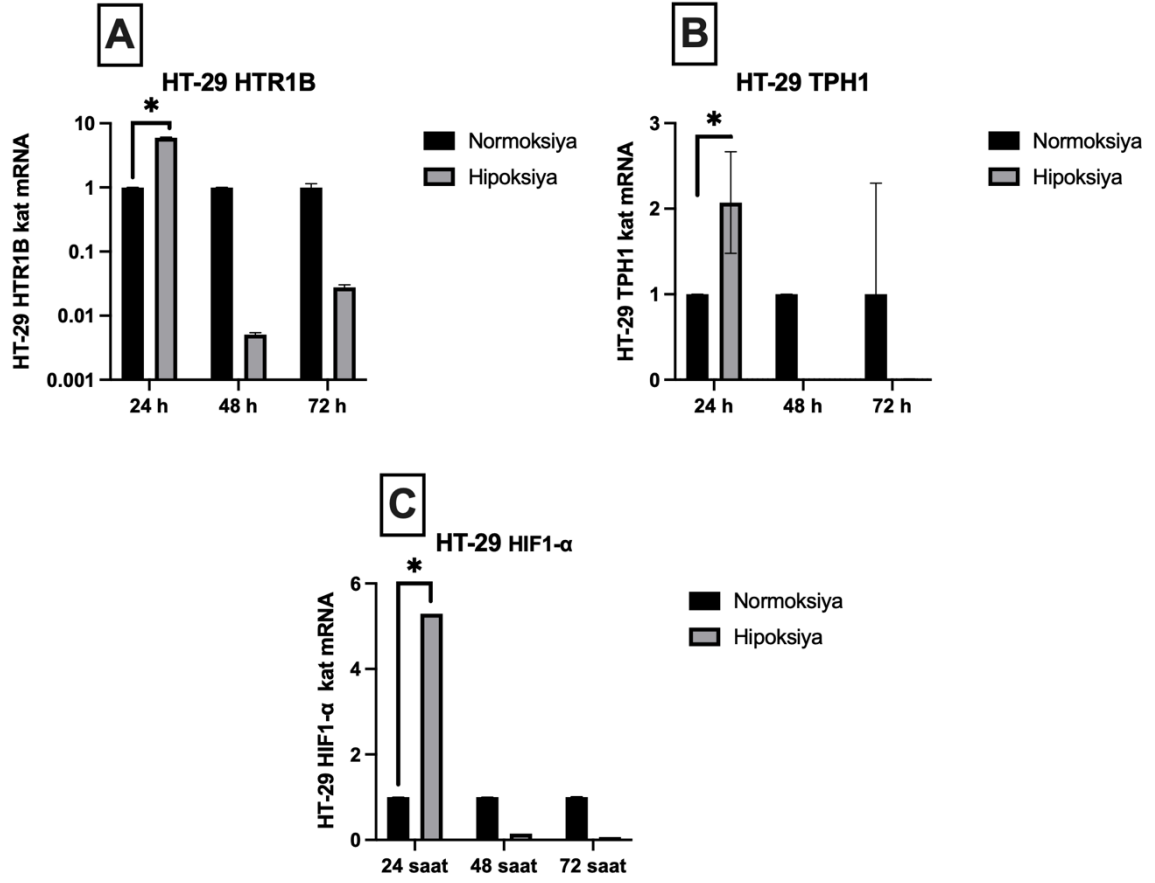
Şekil 3.10. incelendiğinde SW480 hücre hattında bütün saat dilimlerinde hipoksinin oluştuğu gözlenmiştir. Bu zaman dilimlerindeki HTR1B ve TPH1 ifadesine bakıldığında,

normal koşuldaki hücre grubuna kıyasla HTR1B ifadesinin 48. ve 72. saatte arttığı, 24. saatte ise azaldığı gözlenmektedir. TPH1 genin ifadesine bakıldığında ise bütün saat dilimlerinde azaldığı görülmüştür.

Şekil 3.11. incelendiğinde HT-29 hücre hattında sadece 24. saatte HIF1-  $\alpha$ 'nın ifadesinin arttığı ve hipoksik koşulun oluştuğu görülmektedir. HT-29 hücre hattında 24. saate hem HTR1B hem de TPH1 genlerinin ifadesinin normal koşullara kıyasla anlamlı bir şekilde arttığı görülmektedir. Diğer zaman dilimleri grafiksel olarak sunulsa da hipoksik durumun oluşmadığı düşünüldüğünden yalnızca 24 saat üzerinden değerlendirmeyi yapmak ve yorumlamak uygun görülmüştür.



Şekil 3.10: SW480 hücre hattı (A) HTR1B, (B) TPH1 ve (C) HIF1-  $\alpha$  Real-Time PZR sonuçları



**Şekil 3.11:** HT-29 hücre hattı (A) HTR1B, (B) TPH1 ve (C) HIF1-  $\alpha$  Real-Time PZR sonuçları

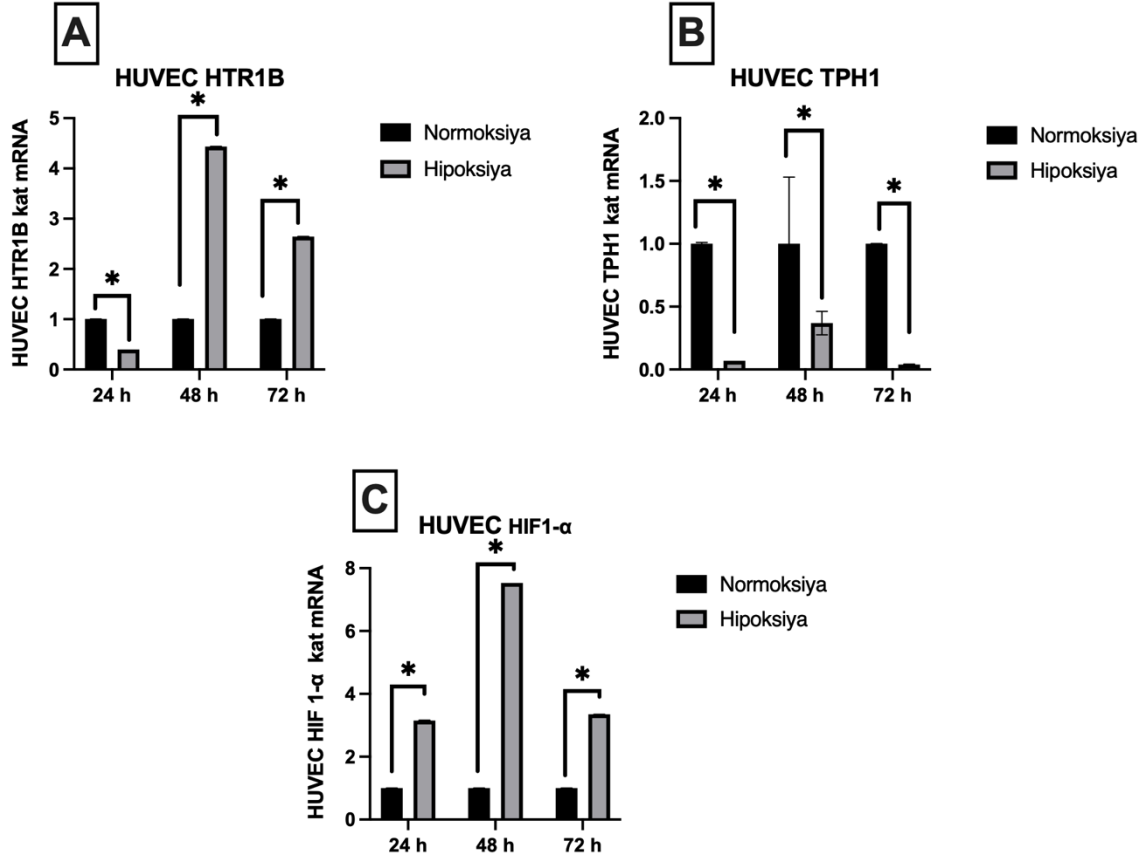
### **3.2.4 İnsan sağlıklı endotel hücre hattında (HUVEC) normal ve hipoksik koşullarda HTR1B ve TPH1 ifadesinin gösterilmesi**

#### **3.2.4.1 HUVEC hücre hattında normal ve hipoksik koşullarda Real-Time PZR ile HTR1B ve TPH1 ifadesinin gösterilmesi**

Çalışmada kullanılacak HUVEC hücre hattında bölüm 2.2.2.4' te anlatıldığı üzere büyütölmeleri sağlandı. İstenilen sayıya ulaşan hücrelerden 6'lık well paltelere 500.000 hücre olacak şekilde yayılma işlemi yapıldı. Hipoksik koşul uygulanacak gruplara 150mM CoCl<sub>2</sub> uygulandı ve zaman dilimleri dolan gruplardan bölüm 2.2.3.1'de anlatıldığı gibi RNA izolasyonu yapıldı. İzolasyonu yapılan RNA'lardan bölüm 2.2.3.4'te anlatıldığı gibi cDNA sentezi işlemi yapıldı.

HTR1B ve TPH1 genlerinin ifadesinin insan sağlıklı endotel hücreleri olan HUVEC hücre hattında belirlenmesi Real-Time PZR kurulmuştur. Hipoksik koşulun oluşup oluşmadığını göstermek için HIF1-  $\alpha$  primerleri kullanılarak doğrulama işlemi yapılmıştır. HIF1-  $\alpha$ 'nın ifadesindeki artış hipoksik koşulun oluştuğunu göstermektedir. Real-Time PZR Tablo 2.3 ve 2.4'te verilen değerlere göre kurulmuştur.

Şekil 3.12. incelendiğinde HUVEC hücre hattında bütün saat dilimlerinde HIF1-  $\alpha$  ifadesinin arttığı ve hipoksik koşulun oluştuğu görölmektedir. Bu zaman dilimlerindeki HTR1B ve TPH1 ifadesine bakıldığında, normal koşuldaki hücre grubuna kıyasla HTR1B ifadesinin 48. ve 72. saatte ifadesinin normal hücre grubuna kıyasla anlamlı bir şekilde arttığı, 24. saatte ise azaldığı gözlenmektedir. TPH1 genin ifadesine bakıldığında ise bütün saat dilimlerinde normal koşullardaki hücre gruplarına kıyasla ifadesinin anlamlı bir şekilde azaldığı görölmüştür.



**Şekil 3.12:** HUVEC hücre hattı (A) HTR1B, (B) TPH1 ve (C) HIF1-  $\alpha$  Real-Time PZR sonuçları

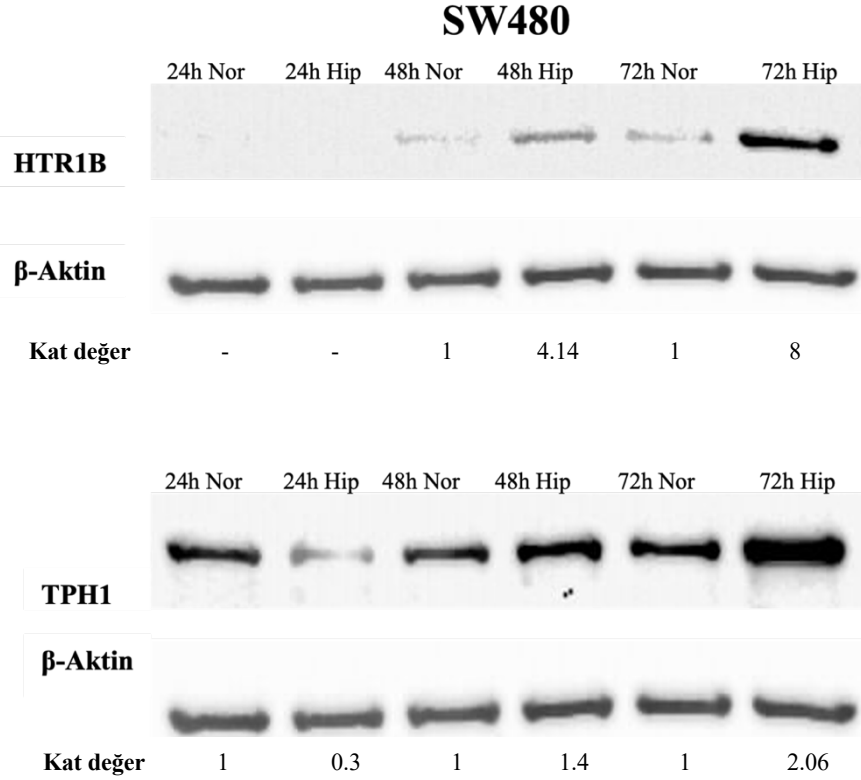
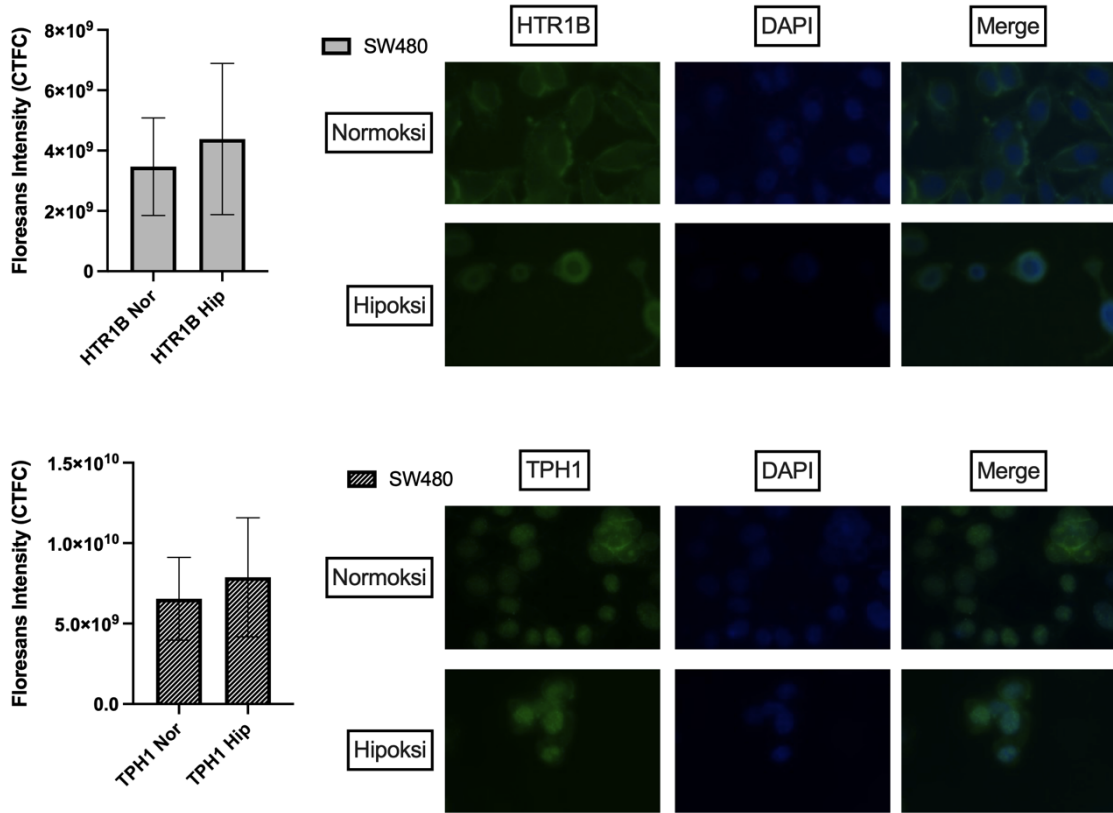
### 3.3 İnsan HTR1B ve TPH1 Geni Protein Düzeyi Analizleri

HUVEC, SW-480 ve HT-29 hücre hatları ile yapılacak protein düzeyindeki HTR1B ve TPH1 ifadesindeki farklılıkların incelenmesi için hücreler yetiştirildi. Yetiştirilen hücreler yeterli sayıya ulaştığında bölüm 2.2.4.1’de anlatıldığı şekilde her bir 6’lı wellde kuyularda 500.000 hücre bulunacak şekilde hücrelerin yayılması işlemi yapıldı ve hipoksik ortamın oluşturulacağı gruplara 150 mM CoCl<sub>2</sub> uygulaması yapıldı. Zaman dilimleri 24, 48 ve 72 saat olarak yapıldı, süresi dolan gruplarda bölüm 2.2.4.1.’de anlatıldığı gibi RİPA Buffer ile izolasyon yapıldı. İzole edilen proteinlerin miktarının ölçümü bölüm 2.2.4.2’de anlatıldığı gibi Bradford çözeltisi ile hesaplandı. Bölüm 2.2.4.3’te anlatıldığı üzere SDS-PAGE jelleri hazırlandı ve hazırlanan jellere HT-29 ve SW480 için 40  $\mu$ g, HUVEC için ise 35  $\mu$ g protein olacak şekilde yükleme işlemi yapıldı. Jeldeki proteinlerin antikorlar ile muamelesi için bölüm 2.2.2.4’te anlatıldığı gibi 1 gece +4  $^{\circ}$ C’de inkübe edildi. İnkübasyonu tamamlanan jeller bölüm 2.2.2.5’te anlatıldığı gibi görüntüleme işlemi yapıldı ve elde edilen görüntülen image j analiz programı kullanılarak analiz edildi.

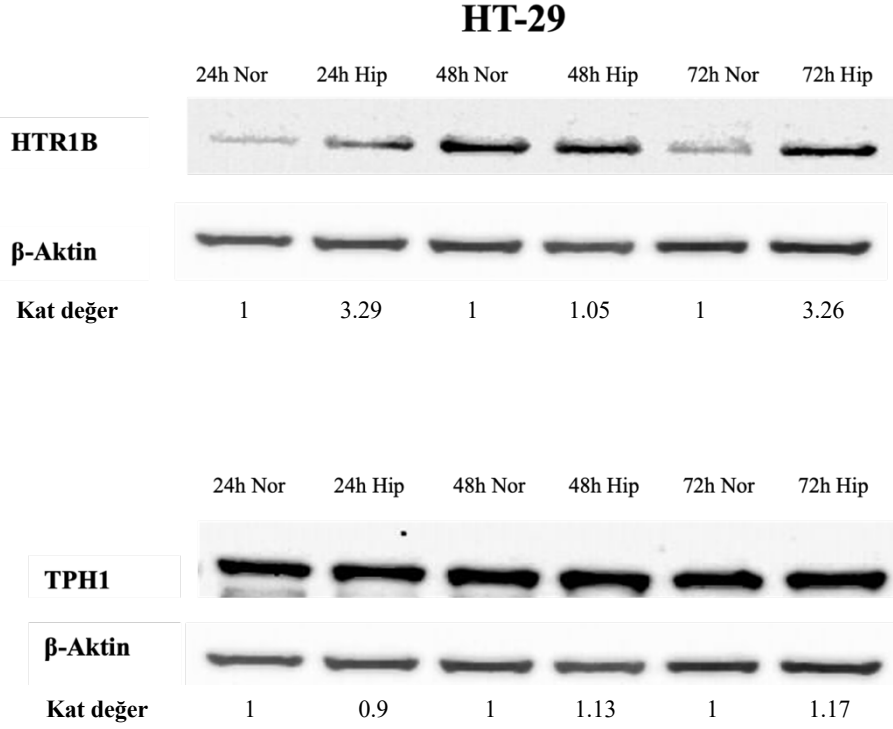
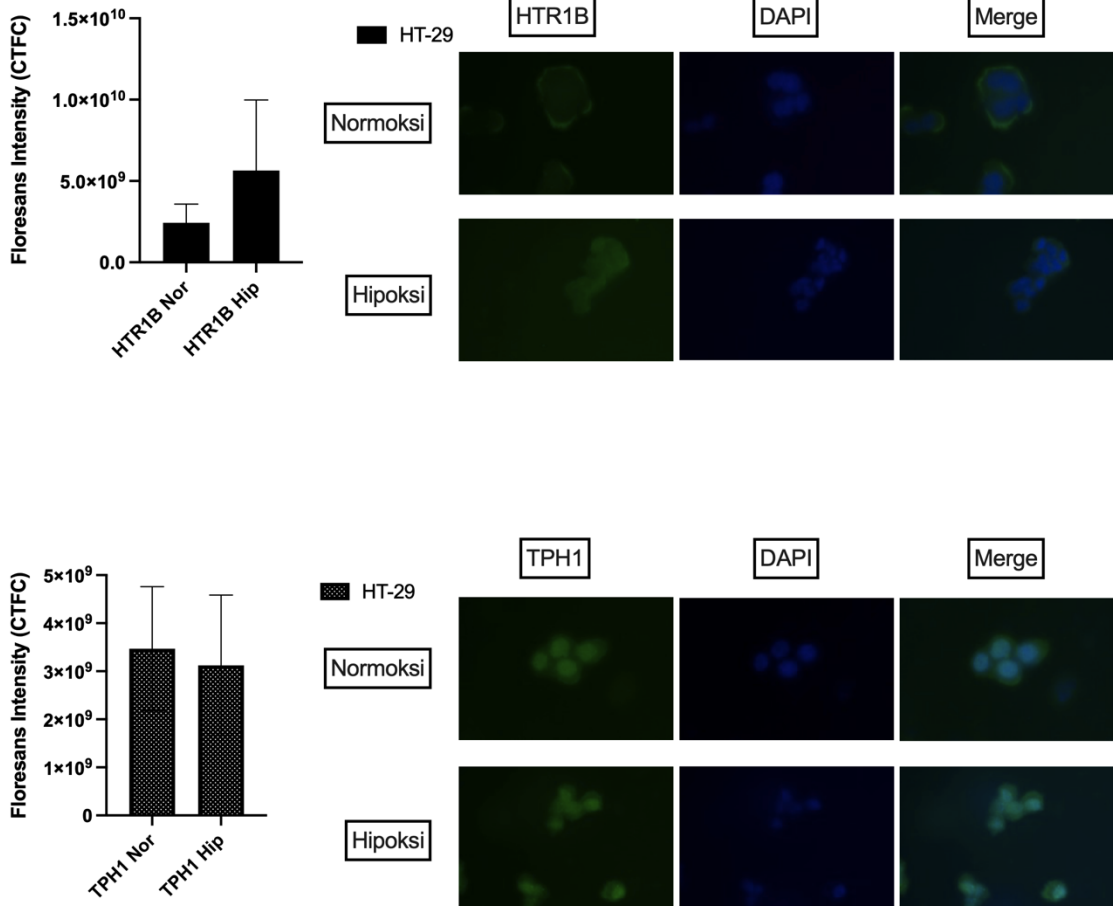
Şekil 3.13. incelendiğinde SW480 hücre hattında 24, 48 ve 72 saatte western blot analizinde HTR1B ve TPH1 protein ifadesi  $\beta$ -Aktin protein ifadesi ile normalize edilmiştir. mRNA seviyesinde HTR1B ifadesi 24. Saatte normal koşullarda bulunan kontrol grubu hücreleri ile kıyaslandığında azalırken; 48. ve 72. Saatte normal koşullardaki kontrol grubuna göre arttığı tespit edilmişti benzer şekilde 48 ve 72. Saatlerde protein seviyesinde de hipoksik koşullarda artış tespit edilmiştir. mRNA seviyesinde elde edilen TPH1 ifadesindeki azalış protein seviyesinde yalnızca 24 saatte tespit edilmiştir. 48 ve 72 saatlerde ise mRNA ile korele olmayan bir artış tespit edilmiştir. IFC analizine bakıldığında ise hem HTR1B hem de TPH1 protein ifadesinin hipoksik koşulda normoksiye göre bir artış görülmüştür. Bu artış western blot analizindeki 48 ve 72 saatlerle protein düzeyinde koreledir. HTR1B hem mRNA düzeyindeki hem de protein düzeyindeki analizleri birbiriyle koreledir. Ancak TPH1 için mRNA düzeyindeki çalışmalardan western blot ile sadece 24 saat analizleri koreledir.

HT-29 hücre hattında mRNA seviyesi ile ilgili yapılan analizlerde (Şekil 3.11C) sadece 24. Saatte HIF1-  $\alpha$ 'nın ifadesinin arttığı ve hipoksik koşulun olduğu görülmektedir. HT-29 hücre hattında 24. saate hem HTR1B hem de TPH1 genlerinin mRNA ifadesinin hipoksik koşullarda normal koşullara kıyasla anlamlı bir şekilde arttığı görülmektedir. Şekil 3.14 incelendiğinde yapılan western blot analizine göre mRNA sonuçlarına benzer şekilde HTR1B protein seviyesinin tüm zaman dilimlerinde arttığı tespit edilmiştir. Aynı şekilde IFC analizine de bakıldığında HTR1B protein seviyesindeki artış görülmektedir ve HTR1B için mRNA ve protein seviyesindeki çalışmalar koreledir. Ancak TPH1 için mRNA seviyesindeki artış western blot analizinde 48 ve 72 saatlerde görülmüştür. IFC analizine bakıldığında ise TPH1 proteininin azaldığı görülmüştür.

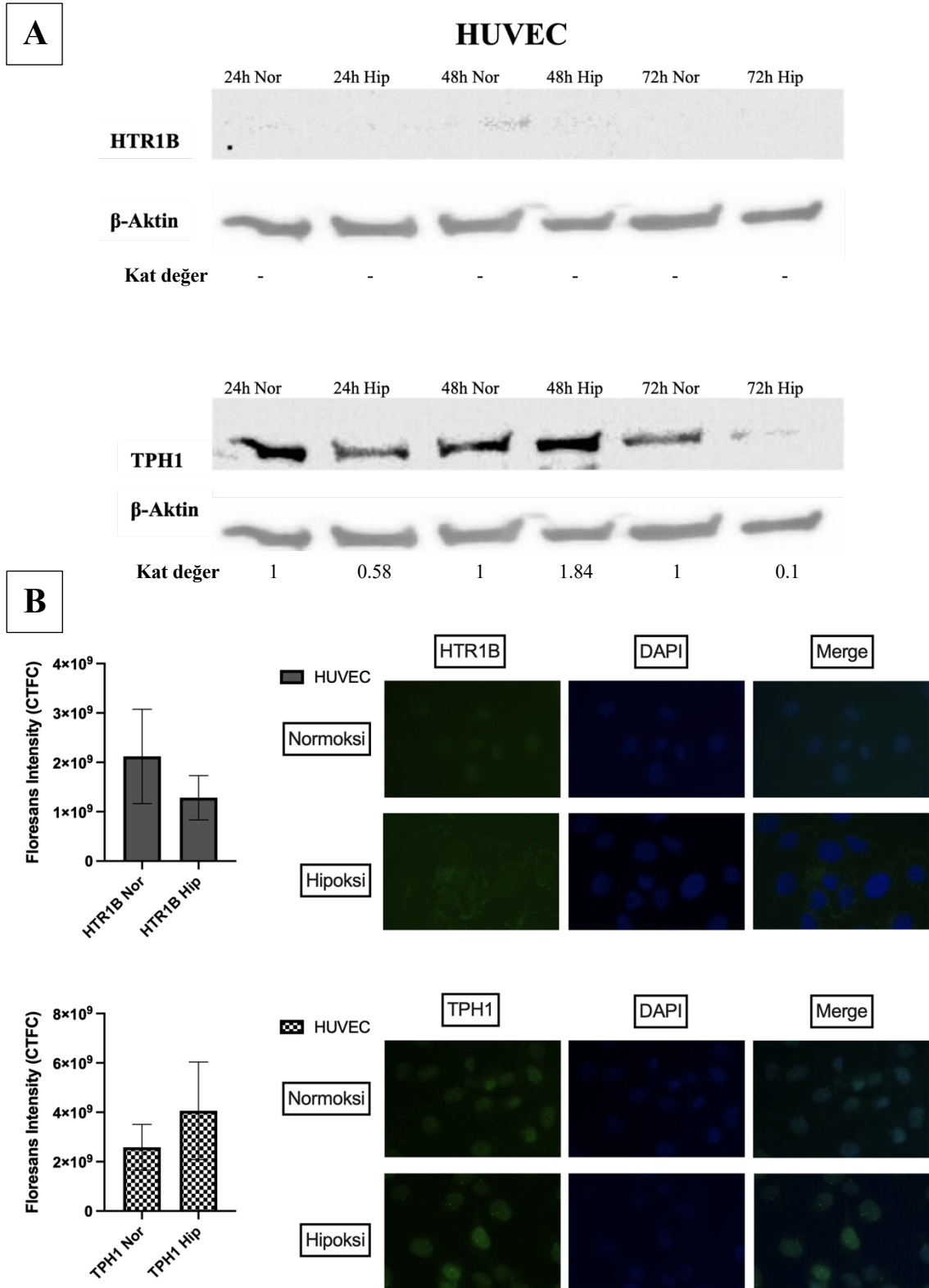
HUVEC hücre ile yapılan Western Blot analizlerinde HTR1B için gerekli olan bantlar elde edilememiştir. Bu sebeple tüm protein analizleri için western blota alternatif olarak IFC analizleri yapılmıştır. HUVEC hücre hattında TPH1 ifadesi western blot ile tespit edilmiştir. 48 saatte hipoksik koşullarda TPH1 protein ifadesinde up-regülasyon tespit edilmiştir (Şekil 3.15). Yapılan IFC analizlerinde TPH1 ifadesinin up-regülasyonu doğrulanmıştır. Ayrıca HTR1B proteininin HUVEC hücre hattında hipoksi koşulda seviyesinin azaldığı görülmüştür. Ama bu sonuçlar mRNA seviyesi ile korele değildir.

**A****B**

**Şekil 3.13:** SW-480 hücre hattı normoksi ve hipoksi koşullarda HTR1B ve TPH1 (A) Western Blot ve (B) IFC protein analizleri

**A****B**

**Şekil 3.14:** HT-29 hücre hattı normoksi ve hipoksi koşullarda HTR1B ve TPH1 (A) Western Blot ve (B) IFC protein analizleri

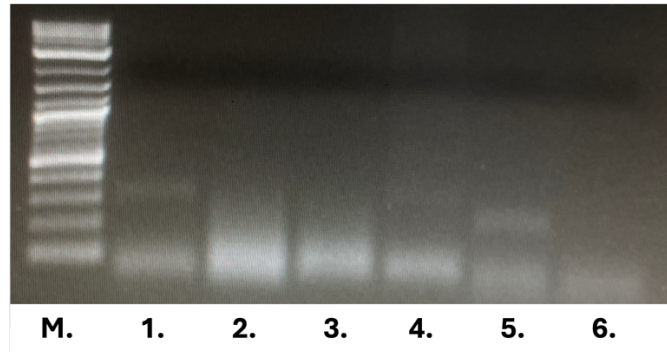


**Şekil 3.15:** HUVEC hücre hattı normoksi ve hipoksi koşullarda HTR1B ve TPH1 (A) Western Blot ve (B) IFC protein analizleri

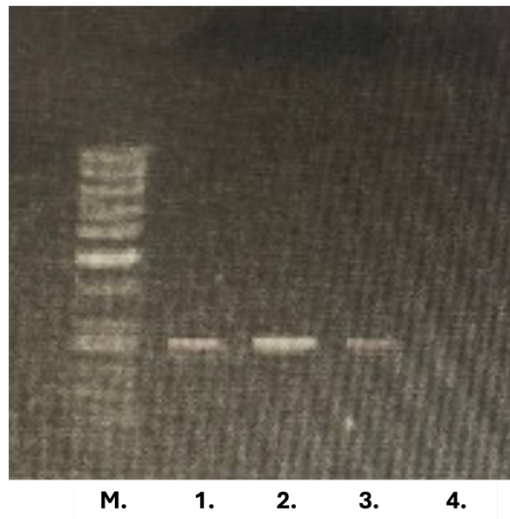
### 3.4 *C.elegans* ser-4 ve cTPH Genlerinin mRNA Analizleri

#### 3.4.1 Çalışmaboyunca kullanılacak gen primerlerinin optimizasyonu

Çalışmanın *C. elegans* ile ilgili deneysel kısmına başlamadan önce çalışmada kullanılacak tasarlanan ekspresyon primerlerinin çalışma koşullarını ve Real-Time PZR aşamasındaki çalışma sıcaklıklarının belirlenmesi için standart PZR koşulları kullanılmıştır. CDC-42 primerleri Real-Time PZR çalışmalarında normalizasyon gen olarak kullanılacağından protokolda bu primerler de kullanılarak deney kurulmuştur.



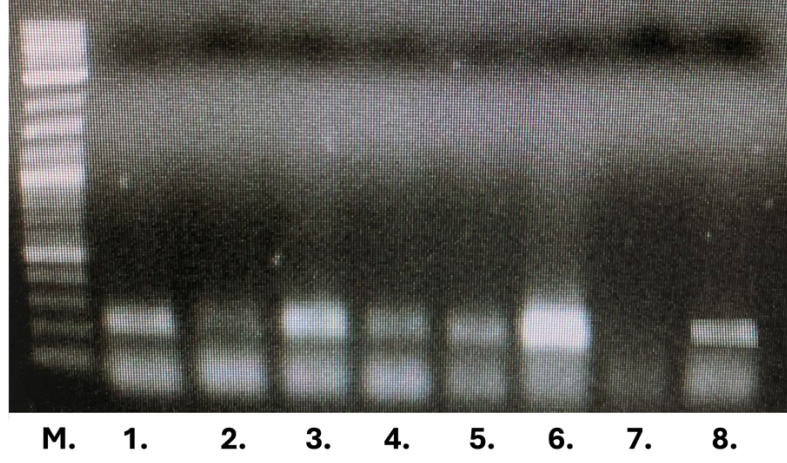
**Şekil 3.16:** Ser-4 primer optimizasyon PZR sonuçları (M: 100 bç Marker, 1: ser-4 1mM MgCl<sub>2</sub>, 2: ser-4 1mM MgCl<sub>2</sub> negatif kontrol, 3: ser-4 2mM MgCl<sub>2</sub> negatif kontrol, 4: ser-4 2mM MgCl<sub>2</sub>, 5: Pozitif kontrol, 6: Negatif kontrol)



**Şekil 3.17:** cTPH primer optimizasyon PZR sonuçları (M: 50 bç Marker, 1: ctpH-1 1mM MgCl<sub>2</sub>, 2: ctpH-1 2mM MgCl<sub>2</sub>, 3: Pozitif kontrol, 4: Negatif kontrol)

### 3.4.2 Çalışmada kullanılacak *C.elegans* deney gruplarının cDNA kontrol PZR'si

Çalışmanın *C.elegans* ile ilgili deneysel kısmında kullanılacak olan canlılardan kurulan deney sonrası izole edilen RNA'lardan sentezlenen cDNA'ların kontrolü için CDC-42 kontrol PZR'si belirtilen PZR koşullarında yapılarak kontrol edildi ve agaroz jel elektroforezi ile görüntülendi.



**Şekil 3.18:** CDC-42 kontrol PZR sonuçları (M: 50 bp Marker, 1: 1h normoksi, 2: 1h hipoksi, 3: 3h normoksi, 4: 3h hipoksi, 5: 24h normoksi, 6: 24h hipoksi, 7: Negatif kontrol, 8: Pozitif kontrol)

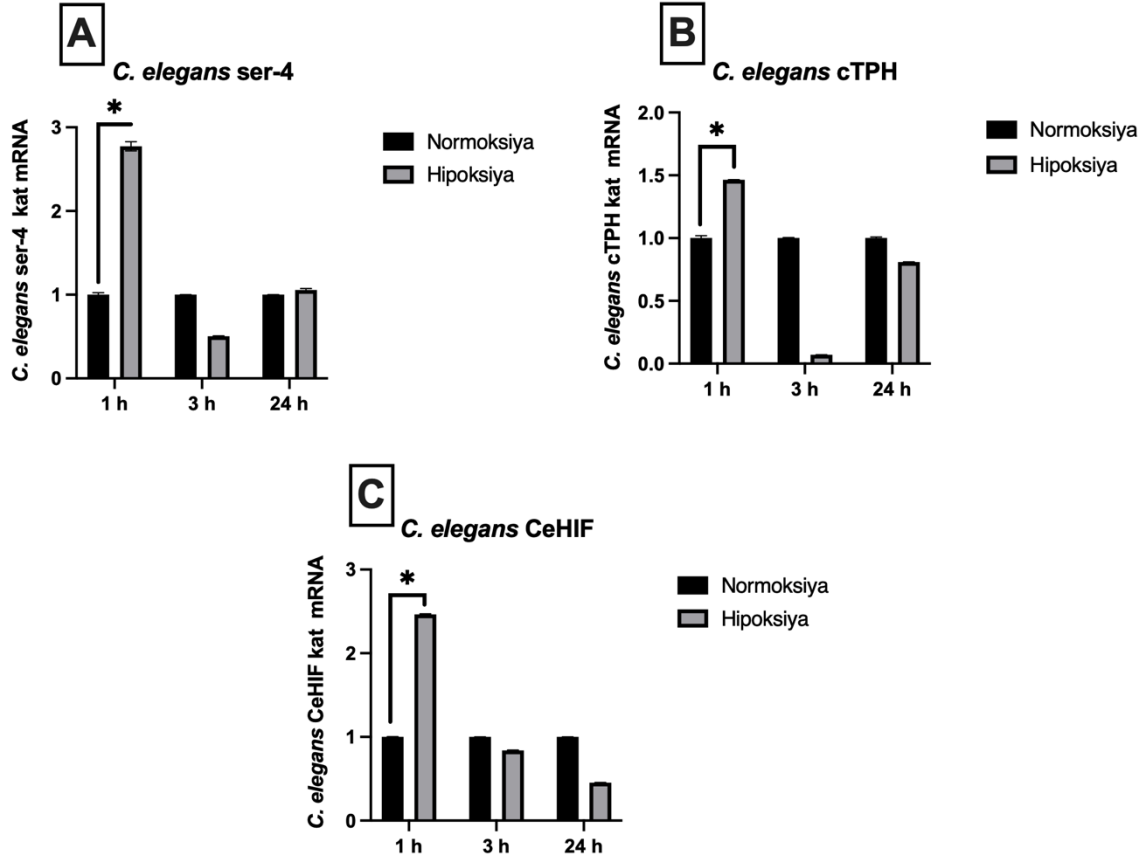
### 3.4.3 *C.elegans*'ta normal ve hipoksik koşullarda ser-4 ve cTPH geninin ifadesinin Real-Time PZR ile gösterilmesi

*C.elegans*'lar bölüm 2.2.5.1'de anlatılan petrilere *E.coli* OP50 suşu yayılarak yetiştirilmiştir. Çalışmada yeterli olacak canlı sayısına ulaşıncaya 2.2.5.4'te belirtilen yöntem ile hipoksik model oluşturulma işlemi yapılmıştır. Zaman dilimleri dolan deneysel gruplardan bölüm 2.2.5.5'te anlatıldığı gibi total RNA izolasyonu işlemi gerçekleştirilmiştir.

Ser-4 ve cTPH genlerinin ifadesinin belirlenmesi için *C.elegans* model organizmasında Real-Time PZR kurulmuştur. Hipoksik koşulun doğrulanması için CeHIF primerleri kullanılmıştır. CeHIF'in ifadesindeki artış hipoksik koşulun oluştuğunu göstermektedir. Real-Time PZR tablo 2.3 ve 2.4'te verilen değerlere göre kurulmuştur.

Şekil 3.16. incelendiğinde *C.elegans* model organizmasında sadece 1. Saat diliminde CeHIF ifadesinin arttığı ve hipoksik koşulun oluştuğu görülmektedir. Bu zaman dilimindeki ser-4 ve cTPH ifadesine bakıldığında, normal koşuldaki *C.elegans*'a kıyasla ser-4 ifadesinin 1. Saatte ifadesinin normal koşula kıyasla anlamlı bir şekilde arttığı ancak 24. saatte de bir

artışın olduğu görülmektedir ama 24. saate hipoksik koşul oluşmamıştır, 3. saatte ise azaldığı gözlenmektedir. Normal gruba kıyasla cTPH genin ifadesine bakıldığında ise 1. saat diliminde ifadesinin anlamlı bir şekilde arttığı görülmüştür.



Şekil 3.19: *C. elegans* model organizmasında (A) ser-4, (B) cTPH ve (C) CeHIF Real-Time PZR sonuçları

#### 4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Son yıllardaki çalışmalar serotonin ve serotonin reseptörlerinin kanserde önemli bir role sahip olabileceğini göstermektedir. 5-HT1B reseptör antagonistinin, kolorektal kanserde hücrelerin apoptozunu arttırdığını ve potansiyel bir tedavi olabileceği öne sürülmüştür (Ataee et.al., 2010).

Serotonin kolorektal kanser kök hücrelerinde kendilerini yenilemeleri için teşvik etmektedir (Zhu et.al., 2022). Serotonin sinyalinin bloke edilmesi yenilemeyi durdurmakla beraber terapötik etkiyede sahiptir (Zhu et.al., 2022).

Tümörler yapıları gereği hipoksik bir ortama sahiptir (K. Hongo et.al., 2013). Normal hücrelerin bulunduğu ortamda hipoksi meydana gelirse bu durum hücre proliferasyonunu artırır. Kolorektal kanserin sahip olduğu özelliklerden biri de gelişimi sırasında hipoksi göstermesidir (Wang ve Semenza, 1993; Biddlestone et.al., 2015). Bu sebepten ötürü hipoksi kolorektal kanserin prognozunu anlamak için önemli bir yere sahiptir.

Deneysel çalışmamızda HT-29, SW-480 kolon kanseri hücre modelleri ve HUVEC sağlıklı insan endotel hücre modeli kullanılmıştır, bu hücre modelleri ile hipoksik koşul oluşturmak için  $CoCl_2$  ile kimyasal hipoksi modeli kullanılmıştır. HTR1B ve TPH1 genlerinin normal ve hipoksik ortamdaki değişimlerinin belirlenebilmesi için mRNA seviyesinde Real-Time PZR, protein seviyesinde ise hem Western Blot hem de IFC deneyleri kurulmuştur.  $CoCl_2$ 'ün sitotoksik etkilerine önceki çalışmalarda bakıldığı için tekrar sitotoksik etkisine bakılmamıştır (Poyrazlı et.al., 2024).

Deneysel çalışmada kullandığımız hücre modelleri hücre kültüründe uygun koşullarda çoğaltılmıştır. Kimyasal hipoksi için 150 mM son konsantrasyonda olacak şekilde  $CoCl_2$  uygulaması yapılmıştır. Zaman dilimleri dolan deney gruplarından elde edilen pelletler ile RNA izolasyonu yapılmıştır, RNA ölçümlerine göre cDNA sentezi gerçekleştirildi. Kimyasal hipoksi ile hipoksik koşulun oluşup oluşmadığına bakmak için HIF1-  $\alpha$  ifadesine Real Time PZR ile bakılarak yorum yapılmıştır.

HTR1B ve TPH1 genlerinin mRNA seviyesindeki çalışmalarında kullanılmak üzere ekspresyon primerleri tasarlanmıştır. Tasarlanan bu primerlerin çalışma koşullarını

ayarlamak için optimizasyon PZR'si gerçekleştirildi. Gerçekleştirilen PZR sonucunda HTR1B 198 bç uzunluğunda bölgeyi, TPH1 ise 197 bç uzunluğundaki bölgeyi 55°C' de çoğaltmıştır, böylelikle primerlerin çalışma sıcaklığı 55°C olarak ayarlanmıştır. Real-Time PZR'de de bu sıcaklık kullanılmıştır. Öncelikle hipoksik koşulun oluşup oluşmadığını göstermek için HIF1-  $\alpha$  primerleri kullanılarak doğrulama işlemi yapılmıştır. HIF1-  $\alpha$ 'nın ifadesindeki artış hipoksik koşulun oluştuğunu göstermektedir. SW480 hücre hattında bütün saat dilimlerinde hipoksinin oluştuğu gözlenmiştir. Bu zaman dilimlerindeki HTR1B ve TPH1 ifadesine bakıldığında, normal koşuldaki hücre grubuna kıyasla HTR1B ifadesinin 48. ve 72. saatte arttığı, 24. saatte ise azaldığı gözlenmektedir. TPH1 genin ifadesine bakıldığında ise bütün saat dilimlerinde azaldığı görülmüştür.

SW480 hücre hattında bu kez çalışılan genlerin protein seviyesinde cevabını görmek için western blot analizi yapılmıştır. 24, 48 ve 72 saatte HTR1B ve TPH1 protein ifadesi  $\beta$ -Aktin protein ifadesi ile normalize edilmiştir. HTR1B mRNA seviyesine benzer şekilde 48 ve 72. Saatlerde protein seviyesinde de hipoksik koşullarda artış tespit edilmiştir. mRNA seviyesinde elde edilen TPH1 ifadesindeki azalış protein seviyesinde yalnızca 24 saatte tespit edilmiştir. 48 ve 72 saatlerde ise mRNA ile korele olmayan bir artış tespit edilmiştir. Ayrıca SW480 hücre hattında protein seviyesindeki çalışmalar için IFC analizinde yapılmıştır. Yapılan analizler sonucunda HTR1B proteini için western blot analizinde görülen 48 ve 72 saatlerdeki artış IFC analizinde de görülmüştür. TPH1 protein seviyesindeki analizde ise mRNA seviyesi ile korele olmayan artış IFC analizinde de görülmüştür.

HT-29 hücre hattında yapılan mRNA analizlerinde sadece 24. saatte HIF1-  $\alpha$ 'nın ifadesinin arttığı ve hipoksik koşul oluşmuştur. HT-29 hücre hattında 24. saate hem HTR1B hem de TPH1 genlerinin ifadesinin normal koşullara kıyasla anlamlı bir şekilde arttığı görülmektedir. Diğer zaman dilimleri grafiksel olarak sunulsa da hipoksik durumun oluşmadığı düşünüldüğünden yalnızca 24 saat üzerinden değerlendirmeyi yapmak ve yorumlamak uygun görülmüştür. HIF1-  $\alpha$ 'nın ifadesindeki artış hipoksik koşulun oluştuğunu göstermektedir. Real-Time PZR tablo 2.3 ve 2.4'te verilen değerlere göre kurulmuştur. HT-29 hücre hattında mRNA seviyesi ile ilgili yapılan analizlerde (Şekil 3.11C) sadece 24. Saatte HIF1-  $\alpha$ 'nın ifadesinin arttığı ve hipoksik koşulun oluştuğu görülmektedir. HT-29 hücre hattında 24. Saate hem HTR1B hem de TPH1 genlerinin mRNA ifadesinin hipoksik koşullarda normal koşullara kıyasla anlamlı bir şekilde arttığı görülmektedir. Şekil 3.14 incelendiğinde yapılan Western Blot analizine göre mRNA sonuçlarına benzer şekilde

HTR1B protein seviyesinin tüm zaman dilimlerinde arttığı tespit edilmiştir. TPH1 protein seviyesi ise 24 saatte western blot analizinde azalmıştır ve IFC analizinde de TPH1 protein seviyesindeki azalış görülmüştür. Sadece 24 saat dilimiyle analiz yapılmasının sebebi hipoksik koşulun oluşmuş olduğu zaman dilimi 24 saat olduğu ve yorumlamanın bu şekilde yapılması doğru olacağı düşünüldüğü içindir.

Sağlık bir hücre hattı olan HUVEC hücre hattında da çalışılan genlerin hipoksik koşullardaki cevabı araştırılmıştır. HUVEC hücre hattında bütün saat dilimlerinde HIF1-  $\alpha$  ifadesinin arttığı ve hipoksik koşulun oluştuğu görülmektedir. Bu zaman dilimlerindeki HTR1B ve TPH1 ifadesine bakıldığında, normal koşuldaki hücre grubuna kıyasla HTR1B ifadesinin 48. ve 72. saatte ifadesinin normal hücre grubuna kıyasla anlamlı bir şekilde arttığı, 24. saatte ise azaldığı gözlenmektedir. TPH1 genin ifadesine bakıldığında ise bütün saat dilimlerinde normal koşullardaki hücre gruplarına kıyasla ifadesinin anlamlı bir şekilde azaldığı görülmüştür. HUVEC hücre ile yapılan Western Blot analizlerinde HTR1B için gerekli olan bantlar elde edilememiştir. Bu sebeple tüm protein analizleri için western blota alternatif olarak IFC analizleri yapılmıştır. HUVEC hücre hattında TPH1 ifadesi western blot ile tespit edilmiştir. 48 ve 72 saatler hipoksik koşullarda TPH1 protein ifadesinde up-regülasyon tespit edilmiştir. Yapılan IFC analizlerinde TPH1 ifadesinin Western Blot analizindeki up-regülasyonu doğrulanmıştır. Ayrıca HTR1B proteininin seviyesinin IFC analizinde HUVEC hücre hattında hipoksik koşulda azaldığı görülmüştür. Ama bu sonuçlar mRNA seviyesi ile korele değildir.

Çalışmamızda ayrıca *C.elegans* model organizma olarak kullanılmıştır. Hipoksik koşullarda serotonin reseptörlerinin (*HTR1B*) ve bu yolda etkili olan enzimler (TPH1) ifade seviyelerindeki değişiklikler incelenerek, farklı organizmalarda bu reseptörlerin hipoksiye verdikleri tepkiler karşılaştırılmıştır. Yapılan dizi benzerlik analizleri sonucunda NM\_000863.3 koduna sahip HTR1B 390 aminoasid (aa) ve NM\_065051.8 kodunda HTR1B *C.elegans* ortolog geni olan ser-4 445 aa protein dizisi için benzerlik oranı %87 olarak bulundu. En çok benzerlikte 81. ve 192. aminoasidler arasında görüldü. Yapılan dizi benzerlik analiz çalışmaları sonucunda NM\_004179.3 koduna sahip 444 aa protein dizisi TPH1 ve NM\_063183.7 kodu olan ve 532 aa cTPH-1 aa dizisi için benzerlik oranı %89 olarak bulundu.

Ser-4 ve cTPH genlerinin ifadesinin belirlenmesi için *C.elegans* model organizmasında Real-Time PZR kurulmuştur. Hipoksik koşulun doğrulanması için CeHIF ifadesine bakılmıştır. *C.elegans* model organizmasında sadece 1. saat diliminde CeHIF ifadesinin arttığı ve hipoksik koşulun olduğu görülmektedir. Bu zaman dilimindeki ser-4 ve cTPH ifadesine bakıldığında, normal koşuldaki *C.elegans*'a kıyasla ser-4 ifadesinin 1. saatte ifadesinin normal koşula kıyasla anlamlı bir şekilde arttığı ancak 24. saatte de bir artışın olduğu görülmektedir ama 24. saate hipoksik koşul oluşmamıştır, 3. saatte ise azaldığı gözlenmektedir. Normal gruba kıyasla cTPH genin ifadesine bakıldığında ise 1. saat diliminde ifadesinin anlamlı bir şekilde arttığı görülmüştür.

Bu genlerin hipoksik koşullara verdiği yanıtların araştırılması ve insanlarda ve *C. elegans*'ta benzerliklerinin ortaya çıkarılması, evrimsel süreçte serotonin ve metabolizması hakkında yeni bilgiler sağlamıştır. Ayrıca, bu genlerin etkili olduğu farklı kanser hücre tiplerinde terapötik protokollerin oluşturulmasında kanserle ilişkili bir durum olan hipoksinin ele alınması oldukça önemlidir. Tüm bu sonuçlar, kanserde serotonin metabolizmasının durumunu ortaya koymak için daha fazla regülasyon çalışmasına ihtiyaç olduğunu göstermektedir. HTR1B geninin çeşitli hücre hatları üzerindeki etkileri, serotonerjik sistemin karmaşık dinamiklerini anlamada kritik bir rol oynamaktadır. Sonuç olarak, HTR1B geninin çeşitli hücre hatları üzerindeki etkileri, bu genin işlevselliğini ve potansiyel terapötik kullanımlarını anlamada önemli bir adım oluşturmaktadır. Çalışmamızda, seçilen genler mRNA ve protein düzeyinde incelenmiştir. Ayrıca bu genlerin etkili olduğu sinyal yolları da biyoinformatik araçlar ile araştırılmıştır. Bu genlerin düzenleyici bölgeleri olan promotör düzeyindeki yanıtlarının incelenmesi, hipoksik yanıtın farklı gen düzenleme adımlarında değişiklik olup olmadığı hakkında bilgi sağlayabilir. HTR1B'nin çeşitli hastalık modellerinde daha kapsamlı bir şekilde incelenmesi, hedeflenen tedavi stratejilerinin geliştirilmesine katkıda bulunabilir.

## 5. KAYNAKLAR

- Abudara, V., Jiang, R.G., Eyzaguirre, C.** (2002). Behavior of junction channels between rat glomus cells during normoxia and hypoxia. *J Neurophysiol*, 88(2):639-49.
- Ataee, R., Ajdary, S., Zarrindast, M., Rezayat, M., & Hayatbakhsh, M. R.** (2010). Anti-mitogenic and apoptotic effects of 5-HT1B receptor antagonist on HT29 colorectal cancer cell line. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 136(10), 1461-1469.
- Baba, Y., Nosh, K., Shima, K., Irahara, N., Chan, A. T., Meyerhardt, J. A., ... & Ogino, S.** (2010). HIF1A overexpression is associated with poor prognosis in a cohort of 731 colorectal cancers. *The American journal of pathology*, 176(5), 2292-2301.
- Berger, M., Gray, J.A., Roth, B.L.** (2009). The expanded biology of serotonin. *Annu Rev Med*; 60:355-66
- Biddlestone, J., Bandarra, D., & Rocha, S.** (2015). The role of hypoxia in inflammatory disease. *International journal of molecular medicine*, 35(4), 859-869.
- Brandes, L. J., Arron, R. J., Bogdanovic, R. P., Tong, J., Zaborniak, C. L., Hogg, G. R., ... & LaBella, F. S.** (1992). Stimulation of malignant growth in rodents by antidepressant drugs at clinically relevant doses. *Cancer research*, 52(13), 3796-3800.
- Bray, F., Feryal, J., Soerjomataram, I., et al.** (2018). GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *Global cancer statistics CA Cancer J Clin*. 68(6):394-424.
- Brenner, S.** (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 77(1), 71-94.
- Cattaneo, M. G., Codignola, A., Vicentini, L. M., Clementi, F., & Sher, E.** (1993). Nicotine stimulates a serotonergic autocrine loop in human small-cell lung carcinoma. *Cancer research*, 53(22), 5566-5568.
- Chan, Y. L., Lai, W. C., Chen, J. S., Tseng, J. T. C., Chuang, P. C., Jou, J., ... & Sun, H. S.** (2020). TIAM2S mediates serotonin homeostasis and provokes a pro-inflammatory immune microenvironment permissive for colorectal tumorigenesis. *Cancers*, 12(7), 1844.
- Dag, U., Nwabudike, I., Kang, D., Gomes, M. A., Kim, J., Atanas, A. A., ... & Flavell, S. W.** (2023). Dissecting the functional organization of the *C. elegans* serotonergic system at whole-brain scale. *Cell*, 186(12), 2574-2592.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Dizeyi, N., Bjartell, A., Hedlund, P., Tasken, K. A., Gadaleanu, V., & Abrahamsson, P. A.** (2005). Expression of serotonin receptors 2B and 4 in human prostate cancer tissue and effects of their antagonists on prostate cancer cell lines. *European urology*, 47(6), 895-900.
- Dizeyi, N., Bjartell, A., Nilsson, E., Hansson, J., Gadaleanu, V., Cross, N., & Abrahamsson, P. A.** (2004). Expression of serotonin receptors and role of serotonin in human prostate cancer tissue and cell lines. *The Prostate*, 59(3), 328-336.
- Dizeyi, N., Hedlund, P., Bjartell, A., Tinzl, M., Austild-Taskén, K., & Abrahamsson, P. A.** (2011, July). Serotonin activates MAP kinase and PI3K/Akt signaling pathways in prostate cancer cell lines. In *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* (Vol. 29, No. 4, pp. 436-445). Elsevier.
- El-Salhy, M., Sitohy, B., & Norrgård, Ö.** (2003). Triple therapy with octreotide, galanin, and serotonin reduces the size and blood vessel density and increases apoptosis of a rat colon carcinoma. *Regulatory peptides*, 111(1-3), 145-152.
- Eom, C. S., Park, S. M., & Cho, K. H.** (2012). Use of antidepressants and the risk of breast cancer: a meta-analysis. *Breast cancer research and treatment*, 136(3), 635-645.
- Fidler, M.M., Bray, F., Vaccarella, S., et al.** (2017). Assessing global transitions in human development and colorectal cancer incidence. *Int J Cancer*. 140(12):2709-15.
- Hamon, M., Bourgoïn, S., Mestikawy, S., Goetz, C.** (1984) Central Serotonin Receptors. In: *Handbook of Neurochemistry*, Lajtha, A, Editor. Springer US: New York. pp. 107-143.
- Herr, N., Bode, C., Duerschmied, D.** (2017) The Effects of Serotonin in Immune Cells. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. 4.  
<https://invivobiosystems.com/disease-modeling/c-elegans-in-cancer-research/> (Erişim tarihi: 22 Mayıs 2025)
- <https://wormclassroom.org/> (Erişim tarihi: 22 Mayıs 2025)
- <https://www.wormatlas.org/> (Erişim tarihi: 22 Mayıs 2025)
- Ioannou, M., Paraskeva, E., Baxevanidou, K., Simos, G., Papamichali, R., Papacharalambous, C., ... & Koukoulis, G.** (2015). HIF-1 $\alpha$  in colorectal carcinoma: Review of the literature. *J buon*, 20(3), 680-689.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Jiang, B., Ren, C., Li, Y., Lu, Y., Li, W., Wu, Y., Gao, Y., Ratcliffe, PJ., Liu, H., Zhang, C.** (2011). Sodium sulfite is a potential hypoxia inducer that mimics hypoxic stress in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Inorg Chem.*, 16(2):267-74.
- Julián, C.** (2023). *Caenorhabditis elegans* for research on cancer hallmarks. *Dis Model Mech*, 16 (6): dmm050079.
- K. Hongo et al.**, (2013). Hypoxia enhances colon cancer migration and invasion through promotion of epithelial-mesenchymal transition, *J. Surg. Res.*, vol. 182, no. 1, pp. 75–84.
- K. Xu et al.**, (2019). Hypoxia induces drug resistance in colorectal cancer through the HIF-1 $\alpha$ /miR-338-5p/IL-6 feedback loop, *Mol. Ther.*, vol. 27, no. 10, pp. 1810–1824.
- Kanova, M., & Kohout, P.** (2021). Serotonin—Its synthesis and roles in the healthy and the critically ill. *International journal of molecular sciences*, 22(9), 4837.
- Karmakar, S., & Lal, G.** (2021). Role of serotonin receptor signaling in cancer cells and anti-tumor immunity. *Theranostics*, 11(11), 5296.
- Kopparapu, P. K., Tinzl, M., Anagnostaki, L., Persson, J. L., & Dizeyi, N.** (2013). Expression and localization of serotonin receptors in human breast cancer. *Anticancer research*, 33(2), 363-370.
- Kumar, A., Abbas, A. K., & Jon, C.** (2015). *Aster: Robbins and Cotran pathologic basis of disease. Professional Edition.*
- lasBalakrishna, P., George, S., Hatoum, H., & Mukherjee, S.** (2021). Serotonin pathway in cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3), 1268.
- Lesurtel, M.; Soll, C.; Humar, B.; Clavien, P.-A.** (2012). Serotonin: A double-edged sword for the liver? *Surgeon* , 10, 107–113.
- Li, J., Ma, X., Chakravarti, D., Shalpour, S., & DePinho, R. A.** (2021). Genetic and biological hallmarks of colorectal cancer. *Genes & development*, 35(11-12), 787-820.
- Liu, Y., Fiskum, G., & Schubert, D.** (2002). Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *Journal of neurochemistry*, 80(5), 780-787.
- Martin, AM., Young, RL., Leong, L., Rogers, GB., Spencer, NJ., Jessup, CF. et al.** (2017). The Diverse Metabolic Roles of Peripheral Serotonin. *Endocrinology*, 158:1049-63.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Movafagh, S., Crook, S., & Vo, K.** (2015). Regulation of hypoxia-inducible factor-1a by reactive oxygen species: new developments in an old debate. *Journal of cellular biochemistry*, 116(5), 696-703.
- Nebigil, CG., Launay, J-M., Hickel, P., Tournois, C., Maroteaux, L.** (2000). 5-Hydroxytryptamine 2B receptor regulates cell-cycle progression: Cross-talk with tyrosine kinase pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97:2591-6.
- Niecknig, H., Tug, S., Reyes, B. D., Kirsch, M., Fandrey, J., & Berchner-Pfannschmidt, U.** (2012). Role of reactive oxygen species in the regulation of HIF-1 by prolyl hydroxylase 2 under mild hypoxia. *Free radical research*, 46(6), 705-717.
- Pai, V. P., Marshall, A. M., Hernandez, L. L., Buckley, A. R., & Horseman, N. D.** (2009). Altered serotonin physiology in human breast cancers favors paradoxical growth and cell survival. *Breast cancer research*, 11(6), 1-17.
- Pirozhok, L., Meye, A., Hakenberg, O., Füssel, S., & Wirth, M.** (2007). Do Serotonin And Melatonin Have A Role In The Growth Regulation Of Prostate Cancer Cell Lines. *Eur. Urol. Suppl*, 6, 47.
- Poyrazlı, F., Okuyan, D., Köçkar, F. et al.** (2024). Hypoxic Regulation of the KLK4 Gene in two Different Prostate Cancer Cells Treated with TGF-  $\beta$ . *Cell Biochem Biophys*, 82, 2797–2812.
- Rapport, M.M., Green, A.A., Page, I.H.** (1948). Serum vasoconstrictor, serotonin; isolation and characterization. *J Biol Chem*, 176:1243-51.
- Riccio, C.** (2019). Extracting total RNA from *Caenorhabditis elegans* using phase-lock gel separation tubes.
- Riddle, D.L., Blumenthal, T., Meyer, J.B., Priess, J.R.** (2010). *C. elegans II*, 2nd edition, Cold Spring Harbor Monograph Series, 33.
- Sakita, J. Y., Bader, M., Santos, E. S., Garcia, S. B., Minto, S. B., Alenina, N., ... & Kannen, V.** (2019). Serotonin synthesis protects the mouse colonic crypt from DNA damage and colorectal tumorigenesis. *The Journal of pathology*, 249(1), 102-113.
- Sakita, J. Y., Gasparotto, B., Garcia, S. B., Uyemura, S. A., & Kannen, V.** (2017). A critical discussion on diet, genomic mutations and repair mechanisms in colon carcinogenesis. *Toxicology letters*, 265, 106-116.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Sarrouilhe, D., Clarhaut, J., Defamie, N., & Mesnil, M.** (2015). Serotonin and cancer: what is the link?. *Current molecular medicine*, 15(1), 62-77.
- Savaş, N. , Öğüt, S. & Olgun, A.** (2018). TOKSİKOLOJİK ARAŞTIRMALARDA ALTERNATİF BİR ORGANİZMA: *Caenorhabditis elegans* (C. elegans) . Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Dergisi, 2 (2) , 99-106 .
- Schmitt, M., & Greten, F. R.** (2021). The inflammatory pathogenesis of colorectal cancer. *Nature Reviews Immunology*, 21(10), 653-667.
- Semenza, G. L.** (2004). Intratumoral hypoxia, radiation resistance, and HIF-1. *Cancer cell*, 5(5), 405-406.
- Siddiqui, E. J., Shabbir, M., Mikhailidis, D. P., Thompson, C. S., & Mumtaz, F. H.** (2006). The role of serotonin (5-hydroxytryptamine1A and 1B) receptors in prostate cancer cell proliferation. *The Journal of urology*, 176(4), 1648-1653.
- Soll, C., Riener, M.O., Oberkofler, C.E., et al.** (2012). Expression of serotonin receptors in human hepatocellular cancer. *Clin Cancer Res*, 18: 5902-10.
- Sonier, B., Arseneault, M., Lavigne, C., Ouellette, R. J., & Vaillancourt, C.** (2006). The 5-HT<sub>2A</sub> serotonergic receptor is expressed in the MCF-7 human breast cancer cell line and reveals a mitogenic effect of serotonin. *Biochemical and biophysical research communications*, 343(4), 1053-1059.
- Sonier, B., Lavigne, C., Arseneault, M., Ouellette, R., & Vaillancourt, C.** (2005). Expression of the 5-HT<sub>2A</sub> serotonergic receptor in human placenta and choriocarcinoma cells: mitogenic implications of serotonin. *Placenta*, 26(6), 484-490.
- Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., & Jemal, A.** (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians*, 65(2), 87-108.
- Türkoğlu, S. A., Poyrazlı, F., Babacan, D., & Köçkar, F.** (2021). Hipoksi ve kanser. *Journal of Advanced Research in Natural and Applied Sciences*, 7(3), 450-463.
- Ünlü, E.** (2010). Deri yaşlanmasında korunma ve tedavi yöntemleri. *Dermatoz* 1, (1): 23-31.
- Vadde, R., Vemula, S., Jinka, R., Merchant, N., Bramhachari, P.V. and Nagaraju, G. P.** (2017). Role of hypoxia-inducible factors (HIF) in the maintenance of stemness and malignancy of colorectal cancer, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, vol. 113, pp. 22– 27.

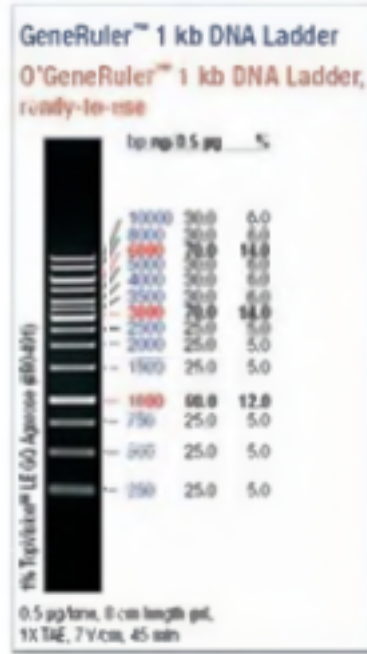
## **KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Veenstra-VanderWeele, J., Anderson, G. M., & Cook Jr, E. H. (2000).** Pharmacogenetics and the serotonin system: initial studies and future directions. *European journal of pharmacology*, 410(2-3), 165-181.
- Wang, G. L., & Semenza, G. L. (1993).** General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(9), 4304-4308.
- White, J. G., Southgate, E., Thomson, J. N., & Brenner, S. (1986).** The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 314(1165), 1-340
- Wilkinson, L.O., Dourish, C.T. (1991).** In: Peroutka SJ (ed) *Serotonin receptor subtypes: basic and clinical aspects*. Wiley, New York, pp 147–210.
- Yadav, V.K., Balaji, S., Suresh, P.S., Liu, X.S., Lu, X., Li, Z. Et al. (2010).** Pharmacological inhibition of gut-derived serotonin synthesis is a potential bone anabolic treatment for osteoporosis. *Nat Med*, 16:308-12.
- Zamani, A., & Qu, Z. (2012).** Serotonin activates angiogenic phosphorylation signaling in human endothelial cells. *FEBS letters*, 586(16), 2360-2365.
- Zhou, D., Yang, L., Zheng, L., Ge, W., Li, D., Zhang, Y., ... & Zheng, S. (2013).** Exome capture sequencing of adenoma reveals genetic alterations in multiple cellular pathways at the early stage of colorectal tumorigenesis. *Plos one*, 8(1), e53310.
- Zhou, T., Duan, J., Wang, Y., Chen, X., Zhou, G., Wang, R., ... & Xu, F. (2012).** Fluoxetine synergys with anticancer drugs to overcome multidrug resistance in breast cancer cells. *Tumor Biology*, 33(5), 1299-1306.
- Zhu, P., Lu, T., Chen, Z., Liu, B., Fan, D., Li, C., ... & Fan, Z. (2022).** 5-hydroxytryptamine produced by enteric serotonergic neurons initiates colorectal cancer stem cell self-renewal and tumorigenesis. *Neuron*, 110(14), 2268-2282.

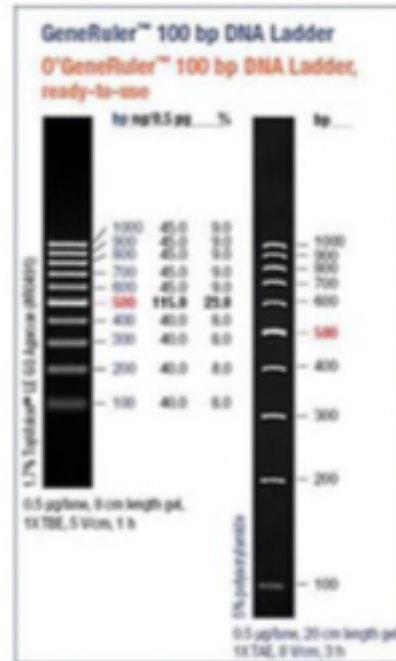
# **EKLER**

## EKLER

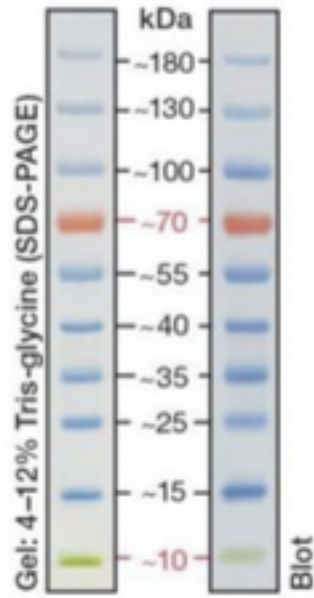
### EK A: Kullanılan Markerlar



Şekil A.1: Fermantas 1 kb marker



Şekil A.2: Thermo Scientific 100 bç marker



Şekil A.3: PageRuler Prestained Protein marker

Descriptions		Graphic Summary	Alignments	Dot Plot				
<b>Sequences producing significant alignments</b>								
<input type="checkbox"/> select all 0 sequences selected		<a href="#">Download</a> <a href="#">Select columns</a> Show 100 <a href="#">?</a>						
		<a href="#">Graphics</a> <a href="#">Multiple alignment</a> <a href="#">MSA Viewer</a>						
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input type="checkbox"/> <a href="#">unnamed protein product</a>		226	226	87%	2e-74	36.46%	445	Query_2692211

Şekil A.4: Human HTR1B ve *c. elegans* ser-4 blast sonucu

Descriptions		Graphic Summary	Alignments	Dot Plot				
<b>Sequences producing significant alignments</b>								
<input checked="" type="checkbox"/> select all 1 sequences selected		<a href="#">Download</a> <a href="#">Select columns</a> Show 100 <a href="#">?</a>						
		<a href="#">Graphics</a> <a href="#">Multiple alignment</a> <a href="#">MSA Viewer</a>						
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">unnamed protein product</a>		456	456	89%	4e-162	51.20%	532	Query_1420043

Şekil A.5: Human TPH1 ve *c. elegans* cTPH blast sonucu