



**T. C.
İSTANBUL BİLİM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**İNSAN KANSER HÜCRE HATLARINDA PEROKSİZOM
PROLİFERATÖR İLE ETKİNLEŞEN RESEPTÖR GAMMA
GENİNDEKİ PRO12ALA POLİMORFİZMİNİN
ARAŞTIRILMASI**

**MOLEKÜLER BİYOLOG HATİCE KURNAZ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
DR. ÖĞR. ÜYESİ HANDE KOÇAK**

2019-İSTANBUL



**T. C.
İSTANBUL BİLİM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**İNSAN KANSER HÜCRE HATLARINDA PEROKSİZOM
PROLİFERATÖR İLE ETKİNLEŞEN RESEPTÖR GAMMA
GENİNDEKİ PRO12ALA POLİMORFİZMİNİN
ARAŞTIRILMASI**

**MOLEKÜLER BİYOLOG HATİCE KURNAZ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Hande Koçak**

JÜRİ ÜYELERİ

**Dr. Öğr. Üyesi Hande Koçak
Dr. Öğr. Üyesi Günnur Demircan
Dr. Öğr. Üyesi Ebru Hacıosmanoğlu**

2019-İSTANBUL

TEZ SAVUNMA SINAVI TUTANAĞI

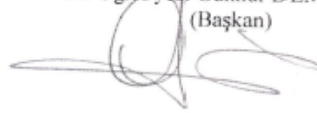
21 Haziran 2019

Yüksek Lisans öğrencisi Hatice KURNAZ, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı'nda hazırlamış olduğu "İnsan Kanseri Hücre Hatlarında Peroksisom Proliferatör ile Etkileşen Reseptör Gamma Genindeki Pro12Ala Polimorfizminin Araştırılması" konulu tezini savunmuş ve aday jüri tarafından BAŞARILI bulunarak tez hakkında OYBİRLİĞİ ile KABUL kararı verilmiştir.

Dr.Öğr. Üyesi Hande KCCAK
(Üye)



Dr. Öğr. Üyesi Günnur DEMİRCAN
(Başkan)



Dr. Öğr. Üyesi Ebru HACIOSMANOĞLU
(Üye)



BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar tüm aşamalarda etik dışı hiçbir davranışımın olmadığını, tezimdaki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması sonucu elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlar için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Hatice KURNAZ



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimin boyunca benimle bilgi ve birikimini paylaşan, desteğini üzerimden esirgemeyen değerli hocam ve tez danışmanım Dr. Öğretim Üyesi Hande KOÇAK'a sonuz teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek Lisansım boyunca benden bilgilerini ve desteklerini esirgemeyen değerli hocamlarım Dr. Öğretim Üyesi Günnur DEMİRCAN, Dr. Öğretim Üyesi Ayyub EBRAHİMİ'ye,

Yardımları ve destekleri için çalışma arkadaşlarım Şafak ŞENER, Anıl CEBECİ'ye,

Destekleri ve yanımda oldukları için arkadaşlarım Kübra ERGÜN, Didem AKÇAMLI, Selen SİPAHİ, Kadriye KOYUNCU, Esra Nur GÜLTEKİN, Özlem ALBAYRAK, Gizem SÜMER'e

Son olarak haklarını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim, benden desteğini esirgemeyen aileme SONSUZ TEŞEKKÜR ederim.

SİMGE VE KISALTMALAR

9-HODE	9-Hidroksioktadekadienoik asit
13-HODE	12-Hidroksioktadekadienoik asit
15-HETE:	15-Hidroksieikosatetraenoik Asit
15d-PGJ2:	15- Deoxy-Delta-12,14-prostaglandin J2
AF-1:	Aktivasyon Fonksiyonu-1
AF-2:	Aktivasyon Fonksiyonu-2
AP-1:	Aktive Edilmiş Protein
ATCC:	Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu Merkezi
Bax:	BCL2 İlişkili X
BCL:	B Hücreli Lenfoma
CBP:	CREB Bağlayıcı Protein
CCLE:	Cancer Cell Line Encyclopedia
CCR2:	Kemokin Reseptör Tip-2
CDK:	Siklin Bağımlı Kinaz
cDNA:	Komplementer DNA
CNV:	Kopya Sayısı Değişiklikleri
COSMIC:	Catalogue of Somatic Mutations in Cancer
COX-2:	Siklooksijenaz-2
CREB:	cAMP duyarlı elemanları bağlayıcı protein
DBD:	DNA bağlama Bölgesi
DMEM/F-12:	Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12
DMSO:	Dimetil Sülfoksit
DNA:	Deoksiribonükleik Asit
EDTA:	Etilendiamintetraasetik Asit
EGF:	Epidermal Growth Factor
FBS:	Fetal Bovin Serum
FFA:	Serbest Yağ Asidi
FPL:	Ailevi Kısmi lipodistrofi
GDM:	Gestasyonel Diabetes Mellitus

GEMiCCL:	Gene Expression and Mutations in Cancer Cell Lines
GLUT4:	Glukoz Taşıyıcı Tip 4
H. pylori:	Helicobacter pylori
HCl:	Hidroklorik Asit
HDL:	Yüksek Yoğunluklu Protein
iTAC:	İnterferon-İnducible T Cell Alpha Chemoattractant
LBD:	Ligand Bağlayıcı Bölge
MAPK:	Mitojen Tarafından Aktive Edilmiş Protein Kinaz
Mig:	Monokine İnduced By Gamma İnterferon
miRNA:	mikroRNA
MMP-9:	Matriks Metalloproteinaz 9
mRNA:	Mesajcı RNA
NCoR:	Nükleer Reseptör Korepresör
NFAT:	Aktive Edilmiş T Hücrelerinin Nükleer Faktörü
NF-κB:	Nükleer Faktör Kappa Beta
NSAID:	Nonsteroidal Anti-İnflammatuvar İlaç
oxLDL:	Oxidized Low-Density Lipoprotein
PBS:	Phosphate Buffered Salin
PGC-I:	PPAR koaktivatörü
PPAR:	Peroksizom Proliferatör ile Etkileşen Reseptör
PPARα:	Peroksizom Proliferatör ile Etkileşen Reseptör Alfa
PPARβ/δ:	Peroksizom Proliferatör ile Etkileşen Reseptör Beta/Delta
PPARγ:	Peroksizom Proliferatör ile Etkileşen Reseptör Gamma
PPRE:	PPAR Yanıt Elementi
PTEN:	Fosfataz ve Tensin Homolog
PZR:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RFLP:	Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi
RIP140α:	Reseptör Etkileşimli Protein 140 Alfa
RNA:	Ribonükleik Asit
RPMI 1640 Medyum:	Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium (RPMI 1640 Medyum)
RT-PZR:	Ters Transkriptaz PZR

RXR:	Retinoik X Reseptörü
SMRT α :	Retinoik Asit ve Tiroid Hormonu Reseptörünün Susturucu Mediatorü Alfa
SNP:	Tek nükleotit Polimorfizmi
SRC:	Steroid Reseptörü Koaktivatörleri
STAT-1:	Sinyal İleticisi ve Transkripsiyon Aktivatörü
TBE:	Tris - Borik Asit – EDTA
TRAP:	Tiroid Hormonu Reseptörleri ile İlişkili Protein
TZD:	Tiyazolidindion
UV:	Ultra-viyole
XIAP:	Apoptoz Proteininin X Bağlantılı İnhibitörü

Yüksek Lisans Tez Projesi Numarası : TBG/YL/2662017

ŞEKİLLER LİSTESİ

		Sayfa No
Şekil 1	PPAR'ın fizyolojik fonksiyonlarının genel gösterimi.....	5
Şekil 2	PPAR'nın da dahil olduğu nükleer reseptörlerin yapısı ve üzerinde yer alan bölgeler.....	6
Şekil 3	PPAR transkripsiyon düzenlemesini gerçekleştirmek için PPAR ve RXR heterodimerine bağlanan koaktivatör, korepresör, ligandlar ve PPRE bölgesinin şematik çizimi	7
Şekil 4	PPAR γ 'nın farklı dokular üzerinde rol oynadığı pleiotropik işlevleri.....	9
Şekil 5	PPAR γ geni, mRNA'ları ve protein izoformlarının şekilsel gösterimi	11
Şekil 6	Düzenleyici bir bölgedeki SNP'nin mRNA üzerindeki etkisi ve bu etki sonucunda meydana gelen değişikliklerin örnek bir gösterimi.....	14
Şekil 7	İnsanda PPAR γ üzerinde bulunan varyantlar	15
Şekil 8	Pro12Ala polimorfizminin insan sağlığı üzerine doğrudan ve dolaylı etkisi.....	18
Şekil 9	AGS, Caki-1 ve MCF10A hücre hatlarının sanger sekanslama sonuçlarının kromotogram sonuçları.....	41
Şekil 10	Hücre hatlarında PPAR γ mRNA ifadesinin MCF10A'ya göre normalizasyon grafiği.....	42
Şekil 11	Hücre hatlarında PPAR γ mRNA ifadesinin SK-BR-3'e göre normalizasyon grafiği.....	42

TABLolar LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 1 Tablolardan uyarlanan PPAR izoformlarının dokularda ifadeleri, ligandları ve fonksiyonları.....	8
Tablo 2 PPAR γ çeşitli yolakların kontrolünü farklı gen gruplarının kontrolü ile sağlar.....	9
Tablo 3 Tek nükleotit polimorfizmlerinin dağılımı, lokalizasyonu, allel sayısı, biyolojik etkisi, SNP değerlendirilmesi.....	13
Tablo 4 Hücre hatları ve özellikleri.....	24
Tablo 5 Hücrelerin büyümesi için kullanılan besiyerleri ve eklenen diğer malzemeler.....	29
Tablo 6 PZR işlemi için kullanılan primer dizileri.....	33
Tablo 7 PZR işlemi sırasında kullanılan malzemeler ve miktarları	34
Tablo 8 PZR döngü sıcaklıkları ve süreleri.....	34
Tablo 9 PZR ürününün enzim ile kesimi sırasında kullanılan malzemeler ve miktarları.....	34
Tablo 10 5X TBE hazırlamak için kullanılan malzemeler ve miktarları....	35
Tablo 11 cDNA sentezinde kullanılan döngü ve sıcaklıklar.....	36
Tablo 12 GZ-PZR işleminde kullanılan primerler ve dizileri.....	37
Tablo 13 GZ- PZR için kullanılan malzemeler ve miktarları.....	37
Tablo 14 GZ-PZR döngü sıcaklıkları ve süreleri.....	38

RESİMLER LİSTESİ

	Sayfa No
Resim 1 Hücre hatlarının PZR işlemi sonucunu görüntülemek için yapılan agaroz jel elektroforezi sonucunun görüntüsü.....	39
Resim 2 HUVEC, MCF10A, AGS, Caki-1, MDA-MB-453 ve MDA-MB-468 ve SK-BR-3 hücre hatlarından elde edilen PZR ürünlerinin BstUI kesim enzimi sonucunun görüntülenebilmesi için yapılan agaroz jel elektroforezi sonucunun görüntüsü.....	40
Resim 3 MCF7, Jurkat, THP-1, Caco-2, Ishikawa ve HeLa hücre hatlarında elde edilen PZR ürünlerinin BstUI kesim enzimi sonucunun görüntülenebilmesi için yapılan agaroz jel elektroforezi sonucunun görüntüsü.....	40

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
BEYAN.....	i
TEŞEKKÜR.....	ii
SİMGE VE KISALTMALAR.....	iii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vi
TABLolar LİSTESİ.....	vii
RESİMLER LİSTESİ.....	viii
İÇİNDEKİLER.....	ix
1. ÖZET.....	1
2. SUMMARY.....	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
4. GENEL BİLGİLER.....	5
4.1. PEROKSİZOM PROLİFERATÖR İLE ETKİNLEŞEN RESEPTÖR (PPAR)	5
4.1.1. PPAR Özellikleri ve Çeşitleri.....	6
4.1.2. PPAR γ 'nın Özellikleri ve Çeşitleri	8
4.1.3. PPAR γ 'ın Varyantları ve Etkileri.....	12
4.1.3.1. Tek Nokta Polimorfizmleri.....	12
4.1.3.2 PPAR γ Varyantları.....	14
4.1.3.2.1. P113Q Varyantı (rs1800571)	15
4.1.3.2.2. Val290Met Varyantı (rs72551362).....	15
4.1.3.2.3. Pro467Leu Varyantı (rs121909244).....	16
4.1.3.2.4. His477His Varyantı (rs3856806).....	16
4.1.3.2.5. Arg425Cys Varyantı (rs72551364).....	16
4.1.3.2.6. Phe360Leu Varyantı (rs72551363).....	17
4.1.3.2.7. 185Stop Varyantı.....	17
4.2. Pro12Ala POLİMORFİZMİ.....	17
4.2.1 PPAR γ ve Pro12ala Polimorfizminin Hastalıklardaki Rolü.	18
4.2.1.1 PPAR γ ve Pro12Ala Polimorfizminin Kanser Dışındaki Hastalıklar ile İlişkisi	18

4.2.1.2. PPAR γ ve Pro12Ala Polimorfizminin Kanser ile İlişkisi.....	20
4.3. HÜCRE HATLARI VE ÖZELLİKLERİ.....	23
5. GEREÇ VE YÖNTEM.....	25
5.1. GEREÇLER.....	25
5.1.1. Çalışmada Kullanılan Laboratuvar Gereçleri.....	25
5.1.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	26
5.1.3. Çalışmada Kullanılan Kitler.....	28
5.2. YÖNTEM.....	28
5.2.1. Hücre Kültürü.....	28
5.2.1.1. Hücre Kültüründe Kullanılacak Hücrelerin Besiyerleri.....	28
5.2.2. Hücre Kültürü Teknikleri.....	30
5.2.2.1. Hücre Hattının Açılması.....	30
5.2.2.2. Hücrelerin Çoğaltılması.....	30
5.2.2.3. Hücrelerin Pasajlanması.....	30
5.2.2.4. Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması.....	30
5.2.3. DNA İzolasyonu.....	31
5.2.4. Total RNA İzolasyonu.....	32
5.2.5. Spektrofotometre ile Saflık Ölçümü.....	33
5.2.6. PZR-RFLP Yöntemi.....	33
5.2.6.1. PZR Yöntemi.....	33
5.2.6.2. Restriksiyon Enzimi ile Kesim.....	34
5.2.6.3. Agaroz Jel Elektroforezi ve Görüntüleme.....	35
5.2.7. Sanger Sekanslama.....	36
5.2.8. cDNA sentezi.....	36
5.2.9. Gerçek Zamanlı PZR (GZ-PZR) Yöntemi.....	37
5.2.10. Veri Analizi.....	38
6. BULGULAR.....	39
6.1. HÜCRE HATLARINDA PPAR γ Pro12Ala POLİMORFİZMİN ARAŞTIRILMASI.....	39

6.2. HÜCRE HATLARINDA PPAR γ EKSPRESYONUNUN ARAŞTIRILMASI.....	41
7. TARTIŞMA.....	43
8. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	50
9. KAYNAKLAR.....	52
EKLER.....	69
EK 1: ÖZGEÇMİŞ	
EK 2: ETİK KURUL ONAYI	
EK 3: TEZ ÇALIŞMASI İZİN YAZILARI	



1. ÖZET :

İnsan Kanser Hücre Hatlarında Peroksizom Proliferatör İle Etkinleşen Reseptör Gamma Genindeki Pro12Ala Polimorfizminin Araştırılması

Öğrencinin Adı: Hatice Kurnaz

Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Hande Koçak

Anabilim Dalı: Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Tek Nükleotit polimorfizmleri (SNP), DNA dizisinde tek bir nükleotitte meydana gelen değişikliklerdir. SNP'ler genomda en sık görülen genetik varyasyonlar olup gen ifadesini ve fonksiyonunu etkileyebildikleri bilinmektedir.

Peroksizom Proliferatör ile Etkinleşen Reseptör Gamma (PPAR γ) geninin 12. kodonunun 34. nükleotidinde meydana gelen C \rightarrow G dönüşümü ile oluşan prolin amino asitinin alanin amino asitine değişimi sonucunda Pro12Ala polimorfizmi oluşmaktadır. Son zamanlarda yapılan birçok çalışma Pro12Ala polimorfizminin obezite, diyabet, bazı kanser türleri gibi birçok hastalık ile ilişkili olabileceğini göstermiştir. Hücresel düzeyde ise kanser ile Pro12Ala polimorfizmi ilişkisini inceleyen bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu çalışmada kanser hücre hatları ile normal hücre hatlarında Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) yöntemi ile Pro12Ala polimorfizmi incelenmiş ve Pro12Ala polimorfizminin PPAR γ mRNA ekspresyonu üzerindeki etkisi Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (GZ-PZR) yöntemi ile araştırılmıştır.

Araştırma sonucunda, taranan 13 hücre hattı içerisinde sadece AGS ve Caki-1 hücre hatlarında Pro12Ala polimorfizmi tespit edildi. Bu hücre hatlarının PPAR γ mRNA ifadesinin, Pro12Ala polimorfizmi bulunmayan MCF10A, SK-BR-3, MDA-MB-453, MDA-MB-458 hücre hatlarına kıyasla daha düşük olduğu bulundu.

Anahtar Kelimeler: PPAR γ , Pro12Ala Polimorfizmi, Kanser, Hücre hattı, mRNA ekspresyonu

2. SUMMARY :

Investigation of Pro12Ala Polymorphism in the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma Gene in Cancer Cell Lines

The Name of the Student: Hatice Kurnaz

Supervisor: Asst. Prof. Hande Koçak, PhD

Department: Medical Biology and Genetics

Single nucleotide polymorphisms (SNPs) are the variations in single nucleotide in the DNA sequence. They are the most common genetic variations in genome. It is known that SNPs may have effects on gene expression and function.

The Pro12Ala polymorphism is the change of proline amino acid to alanine amino acid by the conversion of cytosin(C) to guanine (G) at 34th nucleotide of the 12th codon in the Peroxisome Proliferator Receptor Gamma (PPAR γ) gene. Several recent studies have shown that Pro12Ala polymorphism may be associated with many diseases, such as obesity, diabetes, and some types of cancer. At the cellular level, there were no studies investigating the relationship between cancer and Pro12Ala polymorphism.

In this study, Pro12Ala polymorphism in PPAR γ gene was investigated in cancer cell lines and normal cell lines via using restriction fragment length polymorphism (RFLP) method and the effect of Pro12Ala polymorphism on PPAR γ mRNA expression was investigated via using Real Time Polymerase Chain Reaction method.

In conclusion; amongst 13 cell lines that are screened, Pro12Ala polymorphism was detected in only AGS and Caki-1 cell lines. PPAR γ mRNA expression of these cell lines was found to be lower than PPAR γ mRNA expression of cell lines without Pro12Ala polymorphism such as MCF10A, SK-BR-3, MDA-MB-453, MDA-MB-458 cell lines.

Key Words: PPAR γ , Pro12Ala Polimorphism, Cancer, Cell line, mRNA expression

3. GİRİŞ VE AMAÇ :

Peroksizom proliferatör ile etkinleşen reseptör (PPAR), lipid metabolizması ve adipogenezin düzenlenmesinde görev alır (Gimble ve ark., 1998; Corrales ve ark., 2018a). PPAR, farklı genler tarafından kodlanan ve yüksek oranda birbirlerine benzerlik gösteren üç farklı alt birimden oluşur. Bu alt birimler α , β/δ ve γ olarak adlandırılmaktadır (Fang ve ark., 2016; Meirhaeghe ve Amouyel, 2004; Yousefnia ve ark., 2018).

PPAR γ bir adipojenik düzenleyicidir (Meirhaeghe ve Amouyel, 2004). PPAR γ , yağ hücrelerinin yanı sıra diğer doku ve hücrelerde de eksprese edilmektedir (Wang ve Kilgore, 2002; Giaginis ve ark., 2009; Jain ve ark., 1998; Kliewer ve ark., 1994). PPAR γ , nükleer reseptör ailesinin diğer üyelerine kıyasla daha fazla adipojenik etkiye ve transkripsiyon aktivitesine sahiptir (Tontonoz ve ark., 1994; Tontonoz ve Spiegelman, 2008).

PPAR γ 'nın iki protein izoformundan biri olan PPAR γ 2 proteini PPAR γ 1'den farklı olarak 30 aminoasitlik eklentiye sahiptir (Tontonoz ve ark., 1994; Tontonoz ve Spiegelman 2008; Fajas ve ark., 1997; Berger ve Moller, 2002). PPAR γ 1 mRNA'sı A1, A2 ve 1-6 ekzonlarını içerir ve Promotor P1'i kullanırken; PPAR γ 2 mRNA'sı ise B ve 1-6 ekzonlarını içerir ve Promotor P2 kullanır (He, 2009; Gouda ve ark., 2010).

PPAR γ 2'deki tek nükleotit değişimi ile meydana gelen alanin aminoasiti ile prolin aminoasitine dönüşümü Pro12Ala polimorfizmini oluşturur (Mansoori ve ark., 2015; Yen ve ark., 1997). Pro12Ala polimorfizmi ve kanser ilişkisini inceleyen birçok farklı çalışmada bu polimorfizmin kanser riski üzerindeki olası etkisinin kanıtlayacak ya da yalanlayacak ortak bir sonuca ulaşılamamış olup farklı çalışmalarda aynı kanser türüne ait farklı sonuçlar elde edildiği görülmüştür.

Yapılan literatür çalışmalarında PPAR γ 'nın obezite, diyabet ve bazı kanser türleri gibi birçok hastalık ile bağlantılı olabileceği görülmüştür. Adiposit farklılaşmasının PPAR γ tarafından programlanabilmesi ve PPAR γ 'nın güçlü bağlandığı agonist ligandlarının bulunması, PPAR γ 'nın kanser ile ilişkili olabileceğini

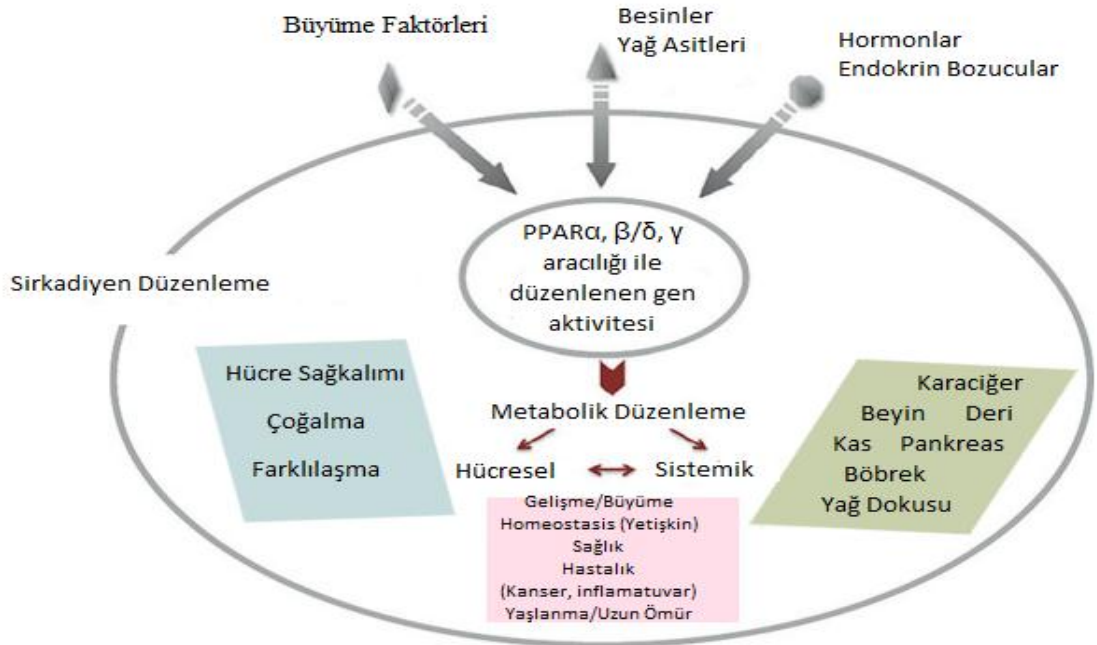
düşündürmüştür (Tontonoz ve Spiegelman, 2008). Yapılan bir çalışmada PPAR γ 'nın akciğer kanseri üzerinde etkili olabileceği gösterilmiştir (Tsubouchi ve ark., 2000). Bir çalışmada ise post genomik ve genomik olarak PPAR γ incelenmiş ve obezitede PPAR γ 'daki Pro12 allelinin mRNA ifade düzeyinde artışa sebep olduğu görülmüştür (Berhouma ve ark., 2013).

Yapılan literatür çalışması sonucunda Pro12Ala polimorfizmini ve bu polimorfizmin PPAR γ ekspresyonu üzerine etkisini kanser hücre hatlarında inceleyen çalışmaya rastlanmamıştır. Bu sebeple çalışmamızda farklı hücre hatlarında Pro12Ala polimorfizminin varlığını araştırmak ve Pro12Ala'nın PPAR γ mRNA ekspresyon düzeyinde etkisini araştırmak amaçlanmıştır. Çalışmanın ilerleyen sürecinde gönüllüler ve kanser hastalarındaki Pro12Ala polimorfizmine bakılarak Pro12Ala polimorfizminin çeşitli kanser türleri ile ilişkisinin araştırılmasının yanında Pro12Ala polimorfizminin PPAR γ mRNA ifadesine etkisinin kanser hücre hatları ile normal hücre hatlarında karşılaştırılması planlanmaktadır.

4. GENEL BİLGİLER :

4.1. PEROKSİZOM PROLİFERATÖR İLE ETKİNLEŞEN RESEPTÖR (PPAR)

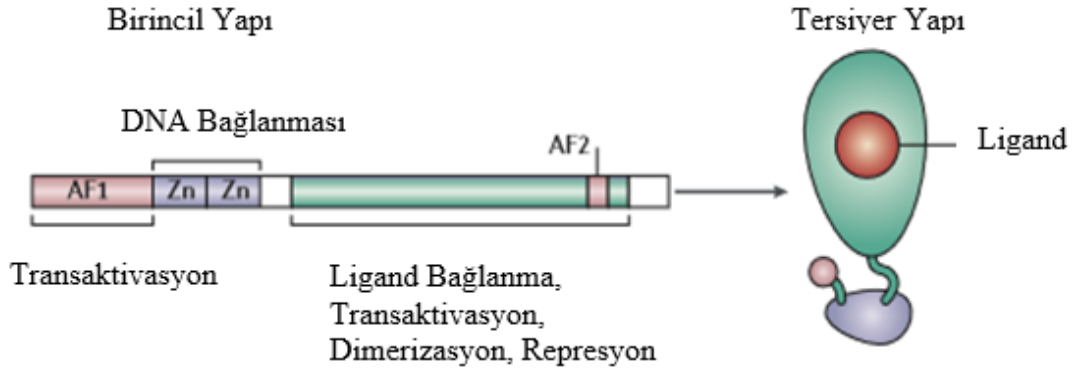
Peroksizom proliferatör ile etkinleşen reseptör (PPAR), nükleer hormon reseptörü süper ailesine ait olan ligand bağımlı bir transkripsiyon faktörüdür. Ligand bağlanması ile aktifleşip hedef genlerin trans-aktivasyonunu ve trans-represyonunu sağlamakla birlikte kompleks biyolojik etkilere neden olmaktadır (Corrales ve ark., 2018b; Thomas ve ark., 2011). Bu transkripsiyon faktörünün temel görevi lipid metabolizması ve adipogenezden sorumlu olan genlerin promotorlarını kontrol etmektir (Gimble ve ark., 1998; Yousefnia ve ark., 2018; Corrales ve ark., 2018a). Bununla birlikte PPAR aracılı gen aktivitesi düzenlemesi birçok farklı sistemik ve hücrel metabolik yolakta görevli olup birçok farklı dokuda önemli rol oynar. (Şekil 1) (Dhaini ve Daher, 2019).



Şekil 1. PPAR'ın fizyolojik fonksiyonlarının genel gösterimi [(Dhaini ve Daher, 2019)'dan adapte edilmiştir]

4.1.1. PPAR'ın Özellikleri ve Çeşitleri

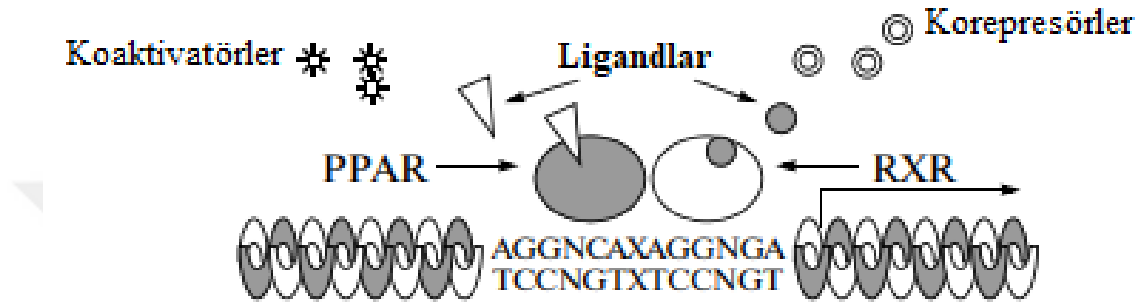
PPAR proteini beş farklı bölgeden oluşmaktadır(Şekil 2). Ligand bağlayıcı bölge (LBD), yarışmalı olarak ligandları bağlanmakla görevlidir (Glass ve Ogawa, 2006) ve PPAR, büyük ligand bağlama ceplerine sahip olması nedeni ile çeşitli ligandlar bağlayabilmektedir (Varga ve ark. 2011). Trans-aktivasyon alanı, transkripsiyonel aktivasyonu sağlamakla görevlidir. DNA bağlanma bölgesi (DBD), PPAR'ın DNA üzerindeki PPAR yanıt elementlerine (PPRE) bağlanmasını sağlayan bölgedir (Brown ve Plutzky, 2007; Mangelsdorf ve ark., 1995). Aktivasyon fonksiyonu-1 (AF-1) bölgesi, ligand bağımsız olarak amino terminal trans-aktivasyon bölgesi iken; aktivasyon fonksiyonu-2 (AF-2) bölgesi, LBD içinde yer alan, koaktivatör ve korepresörlerin bağlandığı bölgedir (Glass ve Ogawa, 2006; Beekun ve ark., 2009).



Şekil 2. PPAR'nın da dahil olduğu nükleer reseptörlerin yapısı ve üzerinde yer alan bölgeler [(Glass ve Ogawa, 2006)'dan adapte edilmiştir]

PPAR'ın üç farklı gen tarafından kodlanan ve % 60-80 oranında birbirleri ile benzerlik gösteren α , β/δ ve γ olarak adlandırılan 3 farklı izoformu bulunmaktadır (Fang ve ark., 2016; Meirhaeghe ve Amouyel, 2004; Yousefnia ve ark., 2018). Bu izoformların biyolojilerinin aynı olduğu bilinmektedir. Ligandlar kendi izoformlarına LBD bölgesinden bağlanır (Brown ve Plutzky, 2007). Bu bağlanma hedef genlerin mRNA ifadelerinin seviyelerinde farklılıklara neden olmaktadır (Willson ve ark., 2000). Ligand bağlanması ile AF-2 bölgesinde konformasyonel değişiklik meydana gelir. Retinoik X Reseptörü (RXR), kendi ligandı ile aktive olarak PPAR ile heterodimer oluşturur. Bu heterodimer yapısı, PPRE'ye, DBD'i aracılığı ile bağlanır (Brown ve Plutzky, 2007). Steroid reseptörü koaktivatörleri (SRC) ve CREB (cAMP

duyarlı elemanları bağlayıcı protein) bağlayıcı proteininin (CBP)-p300 de bağlandığı bir promotor elementi olan PPRE, aralarında birkaç nükleotit bulunan AGGTCA tekrarlarından oluşur (Meirhaeghe ve Amouyel, 2004, Brown ve Plutzky, 2007). PPAR izoformlarının transkripsiyon düzenlemesinde görev yapabilmesini sağlayan çeşitli koaktivatörler ve korepresörler ile beraber çalıştığı bilinmektedir. (Şekil 3) (Brown ve Plutzky, 2007; Kravchenkoa ve Yarmysh, 2011).



Şekil 3. PPAR transkripsiyon düzenlemesini gerçekleştirmek için PPAR ve RXR heterodimerine bağlanan koaktivatör, korepresör, ligandlar ve PPRE bölgesinin şematik çizimi [(Kravchenkoa ve Yarmysh, 2011)' den adapte edilmiştir]

PPAR hedef genleri üzerinde yapılan bir çalışma PPAR α 'nın 83 hedef geni, PPAR β/δ 'nın 83 hedef geni ve PPAR γ 'nın 104 hedef geni olduğunu göstermiştir (Fang ve ark., 2016; Yousefnia ve ark., 2018). Bu izoform, ifade ve ligand bağlanma spesifitesi açısından dokuya göre farklılık gösterir (Wang ve Kilgore, 2002). PPAR izoformlarının buldukları dokular ve fonksiyonları Tablo 1'de ayrıntılı olarak verilmiştir (Dhaini ve Daher, 2019).

Tablo 1: Tablolardan uyarlanan PPAR izoformlarının dokularda ifadeleri, ligandları ve fonksiyonları [(Dhaini ve Daher, 2019)'dan adapte edilmiştir.]

Gen	Eksprese Olduğu Dokular	Fonksiyonu
PPAR α	Karaciğer, kalp, böbrekler, bağırsak, kahverengi adipoz doku	Yağ asidi ve kolesterol katabolizmasını aktive eder ve glukoneogenezi ve keton vücut sentezini uyarır. Heme sentezini uyarır. Aminoasit metabolizmasını ve üre sentezini kontrol eder. İnsülin direncini azaltır.
PPAR β/δ	Deri, Gastrointestinal, adipoz doku, iskelet kası, beyin, plasenta	Enerji homeostazi, yağ asidi katabolizması ve adaptif termojenezi kontrol eder. Hücre proliferasyonunu ve terminal farklılaşmasını kontrol eder. İltihabı engeller. Plasenta ve Gastrointestinalin gelişiminde rol oynar.
PPAR γ	PPAR γ 1; Gastrointestinal, beyin, Kas hücreleri, İmmün hücreleri PPAR γ 2; Yağ dokuları	Adipogenezi ve lipid biyosentezini düzenler. Beyaz yağ dokusunda lipit depolanmasını ve kahverengi yağ dokusunda enerji dağılımını sağlar. İnsülin direncini azaltır. Adipositlerin farklılaşmasını destekler Plasenta ve embriyonik kalp gelişiminde rol oynar

4.1.2. PPAR γ 'nın Özellikleri ve Çeşitleri

PPAR γ adipojenik düzenleyici olması nedeni ile özellikle farklılaşmayı sağlamak için yağ hücrelerinde eksprese edilir (Meirhaeghe ve Amouyel, 2004; Wang ve Kilgore, 2002; Chawla ve ark., 1994). Bunun yanında PPAR γ , adiposit farklılaşması, lipit depolanması, inflamatuvar süreç yönetimi, glukoz ve insülin homeostasisi gibi görevleri yerine getirdiği için az da olsa diğer hücre ve dokularda da eksprese edilmektedir (Giaginis ve ark., 2009; Jain ve ark., 1998; Kliewer ve ark., 1994). PPAR γ 'nın adipositler dışında da karaciğer, kas, meme bezi gibi birçok dokuda farklı işlevlerin gerçekleşmesinde görevlidir. (He, 2009) (Şekil 4).



Şekil 4. PPAR γ 'nın farklı dokular üzerinde rol oynadığı pleiotropik işlevleri [(He, 2009)'dan adapte edilmiştir]

PPAR γ , diğer nükleer reseptör ailelerinden daha fazla transkripsiyon aktivitesine ve adipojenik aktiviteye sahiptir (Tontonoz ve ark., 1994; Tontonoz ve Spiegelman, 2008). PPAR γ işlevlerini yerine getirebilmek için Tablo 2'de de gösterildiği üzere birçok yolak ile etkileşim halindedir. (Brown ve Plutzky, 2007).

Tablo 2. PPAR γ çeşitli yolakların kontrolünü farklı gen gruplarının kontrolü ile sağlar [(Brown ve Plutzky, 2007)'den adapte edilmiştir]

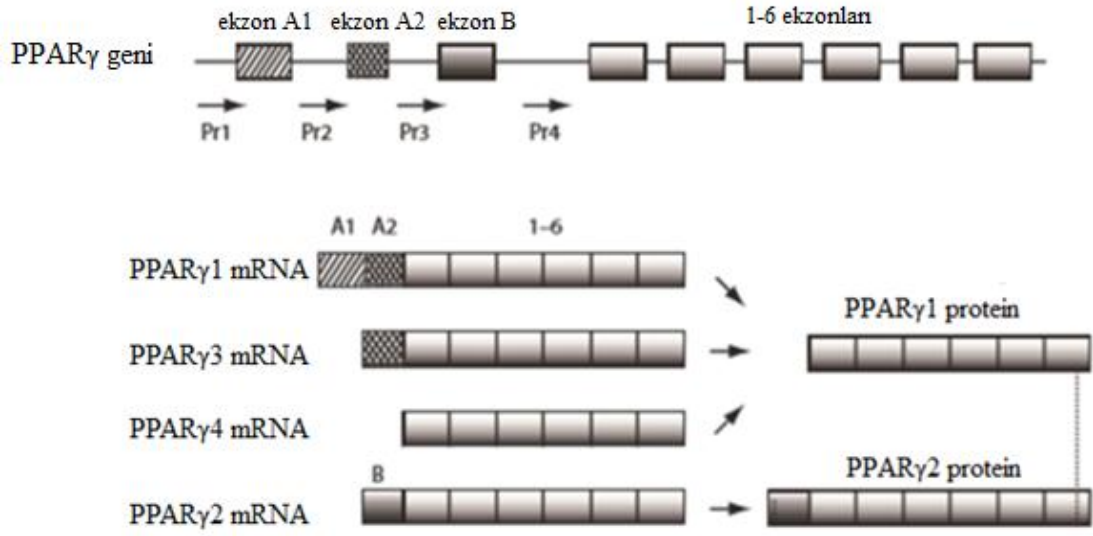
Adipogenesis	Lipid Metabolizması	Glukoz Kontrolü	İltihap/Vasküler
AP2	Düşük yoğunluklu lipoprotein	GLUT4	İnterferon- γ ,
Adiponektin	ABCA1	Thioredoksin bağlanma proteini-2	Kemokinler (Mig, iTAC, IP10),
Adipsin	ABCG1	Resistin	Kemokin reseptörleri (CCR2)
CCATT/çoğaltan bağlayıcı protein α	Yağ asidi bağlanma proteini-4		Yümör nekrosis faktör- α MMP-9

İnsanda PPAR γ geni (OMIM: 601487) kromozom 3p25'de yer alır ve Şekil 5'de gösterildiği gibi PPAR γ 'nın PPAR γ 1, PPAR γ 2, PPAR γ 3, PPAR γ 4 olmak üzere dört farklı transkripti bulunmaktadır (Aprile ve ark., 2014). PPAR γ 2 beyaz ve kahverengi yağ dokularında önemli miktarda eksprese edilirken, PPAR γ 3 beyaz adiposit ve hepatosellüler hücreler, insan bağırsak hücreleri gibi çeşitli hücrelerde eksprese edilir. PPAR γ 1 ise makrofaj hücrelerinde, kolon, kemik, karaciğer gibi birçok organın

hücrelerinde eksprese edilir. PPAR γ 4 adipoz dokuda eksprese edilir fakat hakkında fazla bilgi yoktur. PPAR γ 1, PPAR γ 3, PPAR γ 4 aynı protein ürününü kodlamaktadır (Meirhaeghe ve Amouyel, 2004; Corrales ve ark., 2018b). PPAR γ 'nın PPAR γ 1 ve PPAR γ 2 olmak üzere iki protein izoformu vardır (Şekil 5) (Gimble ve ark., 1998; Aprile ve ark., 2014). PPAR γ 2 mRNA'sı, PPAR γ 1'den farklı olarak farklı promotor kullanımını ve alternatif splayzing nedeni ile 30 aminoasitlik eklentiye sahiptir (Tontonoz ve ark., 1994; Tontonoz ve Spiegelman 2008; Fajas ve ark., 1997; Berger ve Moller, 2002). PPAR γ 1, Promotor P1'i, PPAR γ 2, Promotor P2'yi, PPAR γ 3 Promotor P3'ü, PPAR γ 4 ise Promotor P4'ü kullanır (He, 2009; Dragojevič ve ark., 2008). PPAR γ 1 mRNA'sı A1, A2 ve 1-6 ekzonlarını içerirken; PPAR γ 2 mRNA'sı B ve 1-6 ekzonlarını içerir, PPAR γ 3 mRNA'sı A2 ve 1-6 ekzonlarını içerir, PPAR γ 4 ise 1-6 ekzonlarını içerir (Şekil 5) (He, 2009; Gouda ve ark., 2010; Dragojevič ve ark., 2008). Ek olarak PPAR γ 2, PPAR γ 1 ile kıyaslandığında adipojenik ve transkripsiyonel aktivitesi de daha yüksektir (Mueller ve ark., 2002).

PPAR γ 'nın (pre-)adipositlerdeki ekspresyonunun düzenlenmesinde üç faktör etkilidir. Bu üç faktör epigenetik değişiklikler ve ilave kromatin yapılanmaları, PPAR γ 'nın ekspresyonunu düzenleyen transkripsiyon faktörleri ve mikroRNA (miRNA)'lardır. (Broekema ve ark., 2019).

PPAR γ 'nın endojen ligandlarından bazıları doymamış yağ asitleri, 15-Deoxy-Delta-12,14-Prostaglandin J2 (15d-PGJ2), 15-HETE, 9-HODE, 13-HODE ve Okside Düşük Yoğunluklu Lipoprotein (oxLDL)'lerin bileşenleri iken, sentetik ligandlarından bazıları ise Tiyazolidindionlar (TZD'ler) (rosiglitazon, pioglitazon, troglitazon ve ciglitazon), farglitazar, tirozin türevleri, Nonsteroidal Anti-İnflammatuar İlaç (NSAID)'lardır (Varga ve ark., 2011; Wang ve ark., 2006). PPAR γ ligandlarının tümör gelişimini baskılayabilmektedir (Tachibana ve ark., 2008; Grygiel-Górniak, 2014).



Şekil 5. PPAR γ geni (ilk sıra), mRNA'ları ve protein izoformlarının şekilsel gösterimi [(Dragojevič ve ark., 2008)'den adapte edilmiştir.]

PPAR γ aktivasyonu ve baskılanmasında koaktivatörler ve korepresörler görev yapmaktadır (Şekil 3). CBP-p300, SRC ailesi, RNA polimeraz II transkripsiyon aracısı (MED)-1, tiroid hormonu reseptörleri ile ilişkili protein (TRAP) 220, PPAR koaktivatörü (PGC)-1 koaktivatörleri PPAR γ 'nın aktivitesini düzenleyen koaktivatörlerden bazılarıdır. Retinoik Asit ve Tiroid Hormonu Reseptörünün Susturucu Mediatörü Alfa (SMRT α), Nükleer Reseptör Korepresör (NCoR), Reseptör Etkileşimli Protein 140 α (RIP140 α) ise PPAR γ 'nın aktivitesini baskılayan korepresörlerden bazılarıdır (Leader ve ark, 2006; Kotta-Loizou ve ark., 2012; Dhaini ve Daher, 2019).

Giaginis ve arkadaşları ve Belvisi ve arkadaşları tarafından derlenen makalelere göre PPAR γ 'nın hedef gen trans-represyonunu sağlamak için üç potansiyel mekanizması vardır (Giaginis ve ark., 2009; Belvisi ve ark., 2006). İlk mekanizma olarak ligand aktivasyonundan sonra PPAR γ /RXR heterodimerlerinin diğer transkripsiyon faktörleri ile pro-inflamatuvar gen uyarımı açısından önemli olan koaktivatörlere bağlanabilmesini göstermişlerdir. Böylece aktive edilmiş protein-1 (AP-1), sinyal ileticisi ve transkripsiyon aktivatörü (STAT-1), Nükleer Faktör- κ B (NF- κ B) ve aktive edilmiş T hücrelerinin nükleer faktörü (NFAT) gibi pek çok transkripsiyon faktörünün transkripsiyonel trans-aktivasyonu, oldukça düşürülebilir. İkinci potansiyel trans-represyon mekanizması; NFAT, NF- κ B ailesi p50, p65 alt

üniteleri gibi transkripsiyon faktörleri PPAR γ ve RXR heterodimerine bağlanmasıdır. Üçüncüsü mekanizmanın ise ligand ile aktive olan PPAR γ ve RXR heterodimeri mitojen tarafından aktive edilen protein kinaz (MAPK) yolağını negatif yönde düzenlemesi olduğu önerilmiştir. PPAR γ ve RXR heterodimeri MAPK ailesinin üyelerinden bazılarının aktivasyonunu ve fosforilasyonunu inhibe edebilir. (Giaginis ve ark., 2009; Belvisi ve ark., 2006).

4.1.3. PPAR γ 'ın Varyantları ve Etkileri

4.1.3.1. Tek Nokta Polimorfizmleri

DNA dizilerindeki meydana gelen nükleotit değişikliklerini adlandırmak için farklı terimler kullanılmaktadır. Bu değişiklikler popülasyonda görülme sıklığının %1'den fazla olması durumunda polimorfizm olarak adlandırılırken, görülme sıklığı %1'den düşük ise mutasyon olarak adlandırılmaktadır (Aksoy ve Soydemir, 2017; Utine ve Utine; 2012). Bu değişikliklerin görülme sıklıklar popülasyondan popülasyona değişmesi bu değişikliklerin fonksiyonel sonuçlarını daha önemli hale getirmiştir. Bu terimler sadece popülasyonda görülme sıklığı üzerinden değerlendirme yapıldığında söz konusu DNA değişikliklerinin protein üzerinde yarattığı fonksiyonel sonuçları kapsamak konusunda yetersiz kalmaktadır. Bu durum polimorfizm ve mutasyon kavramlarının kullanımında ortak bir görüş oluşturmayı zorlaştırmaktadır. Bu nedenlerden dolayı polimorfizm ve mutasyon kavramları yerine varyant kavramının kullanılması yaygınlaşmaya başlamıştır. (Karki ve ark., 2015; Condit ve ark., 2002).

Genetik polimorfizmler, gen ürününde aminoasit değişimine, kodlama bölgesindeki çerçeve kayması ile delesyon ve insersiyon oluşmasına neden olabilir. Bunun yanında gen transkripsiyonunu, RNA splayzını, mRNA stabilitesini veya mRNA translasyonunu direk etkileyebilir veya bir genin tamamen silinmesine neden olabilir (Daly ve Day, 2001). Bununla birlikte bazı polimorfizmler tümör büyümesi ve metastazı gibi tümör özelliklerini etkileyebilir ve kansere yatkınlığa neden olabilir (Zhang ve ark., 2013).

Tek Nükleotit Polimorfizmi (SNP), DNA üzerindeki kodlanan ve kodlanmayan bölgelerde meydana gelen tek bir bazın başka bir baz ile yer değiştirmesi sonucu oluşan genelde popülasyonda görülme sıklığı %1'inden fazla olan değişikliklerdir. (Aksoy ve Soydemir, 2017; Seçer ve ark., 2011). En sık görülen genetik varyant olan SNP'lerin büyük bir çoğunluğunun insan hastalıkları üzerinde etkilerinin olduğu bilinmektedir. Ek olarak SNP'ler az bulunan allelerin tanımlanmasında da büyük önem taşır. Ramírez-Bello ve Jiménez-Morales'nın hazırladığı tablodan uyarlanan SNP özellikleri Tablo 3'te gösterilmiştir (Ramírez-Bello ve Jiménez-Morales, 2017).

Tablo 3. Tek nükleotit polimorfizmlerinin insan genomunda dağılımı, lokalizasyonu, allel sayısı, biyolojik etkisi, SNP değerlendirmesi [(Ramírez-Bello ve Jiménez-Morales, 2017)'den adapte edilmiştir]

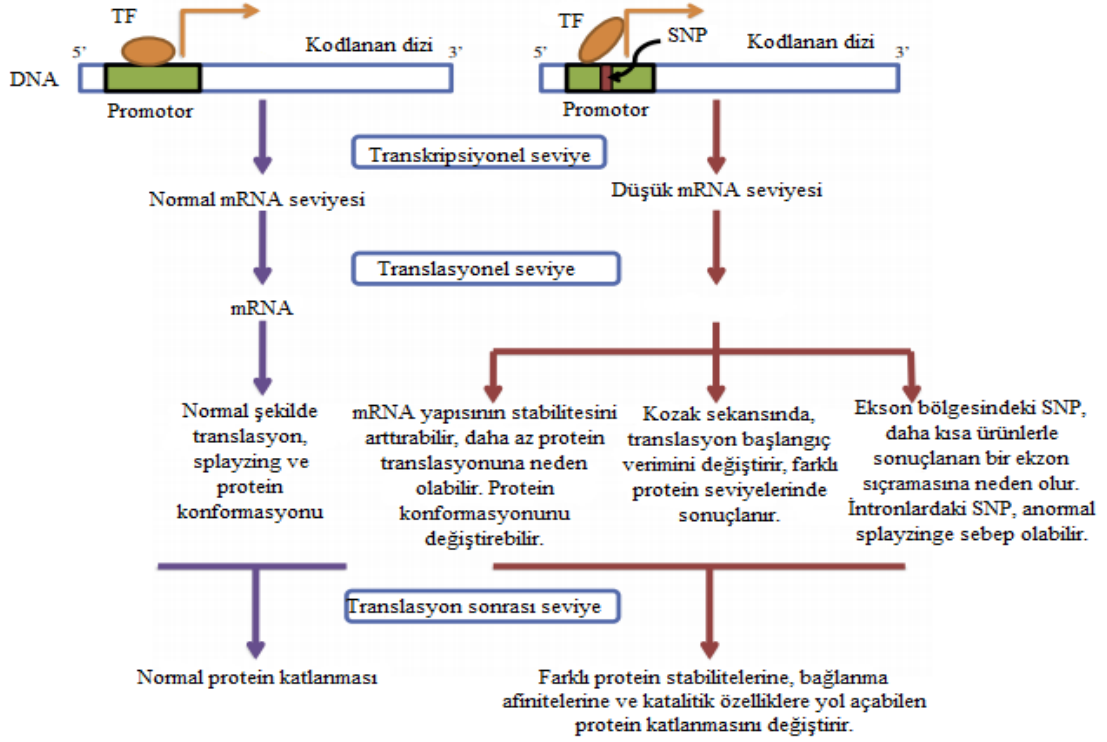
Özellikler	Açıklama
Dağılım	Ortalama olarak, her 250 bç'de bir SNP bulunur; yaklaşık 11 milyon SNP rapor edilmiştir.
Yerleşim	Inter-genik (veya ekstra-genik) ve intra-genik bölgeler; Protein kodlama ve kodlamayan genler son bölgelerde bulunur.
Allele sayısı	Genellikle bialleliktir, ancak triallelik ve quadriallelik olabilir.
Biyolojik etkisi	Nötr ve fonksiyonel
SNP değerlendirme	Otomatik teknolojiler aracılığı ile kolayca genotipleme

SNP genotipleme için birçok farklı yöntem kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)-Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) yöntemi, DNA dizi analizi, mikroarray analizi, allele spesifik hibridizasyon, PZR tabanlı metodlar, oligonükleotit ligasyonu bunlardan birkaç tanesidir (Chuang ve ark., 2008; Wang ve ark., 2018; Myakishev ve ark., 2001).

Genlerin kontrol bölgelerinde ve genlere bağlanan düzenleyici proteinlerin kodlayıcı ve kontrol bölgelerinde bulunan DNA dizilerinde meydana gelen değişiklikler, genin ifade düzeyi olarak bilinen gen ürünlerinde ve bu ürünlerin miktarında değişime neden olur (Ekmekçi, 2008). Şekil 6'da görüldüğü gibi SNP'lerde mRNA seviyesini değiştirebilir. Promotorda meydana gelen bir SNP, transkripsiyon faktörünün promotora yerleşimini engelleyebilir ve transkripsiyonun

azalarak mRNA seviyesinde düşüşe neden olabilir. Bu durum proteinin oluşumunu çeşitli şekillerde bozabilir (Şekil 6) (Fareed ve Afzal, 2013).

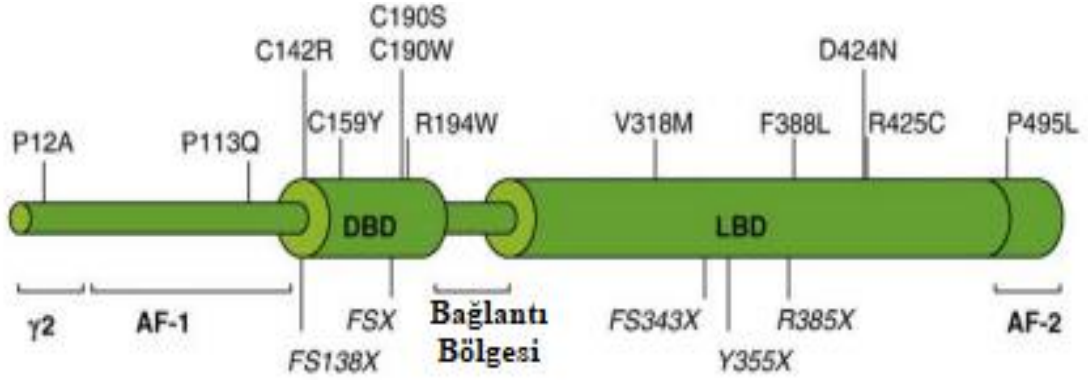
Tek nükleotit polimorfizmleri genlerin ifadesini ve fonksiyonunu etkileyebilir ve tedavi sırasında kullanılan ilacın etkisini değiştirebilir, yan etki oluşturabilir (Li ve ark., 2018, Zhang ve ark., 2013).



Şekil 6. Düzenleyici bir bölgedeki SNP'nin mRNA üzerindeki etkisi ve bu etki sonucunda meydana gelen değişikliklerin örnek bir gösterimi [(Fareed ve Afzal, 2013)'ten adapte edilmiştir.]

4.1.3.2. PPAR γ Varyantları

PPAR γ üzerinde Şekil 7'deki gösterildiği gibi bir çok varyant yer almaktadır (Jeninga ve ark., 2009). Bu varyantlardan Pro12Ala ve His477His dışındaki polimorfizmlerinden birçoğu nadir görülen polimorfizmler olduğundan dolayı haklarında çok fazla bilgiye ulaşılamamaktadır. PPAR γ 2'de yer alan varyantlardan bazıları alt başlıklar halinde verilmiştir. Çalışmamızda yer alan Pro12Ala polimorfizmi ayrı bir başlık altında değerlendirilmiştir.



Şekil 7. İnsanda PPAR γ üzerinde bulunan varyantlar. Yanlış anlamlı varyasyonlar şeklin üst kısmında, stop kodonu oluşturan mutasyonlar şeklin alt kısmında verilmiştir. [(Jeninga ve ark., 2009)’dan adapte edilmiştir.]

4.1.3.2.1. P113Q Varyantı (rs1800571)

Literatürde Pro113Gln ve Pro115Gln gibi farklı numaralandırmalar ile bildirilmiş olan bu yanlış okuma varyantı PPAR γ proteininin 113. (diğer bir numaralandırmaya göre 115.) pozisyonundaki prolin amino asidinin glutamin amino asidine dönüşmesine neden olur. Bu amino asit değişikliği bu amino asidin yakınındaki Ser112’nin (diğer bir numaralandırmaya göre Ser114’ün) fosforilasyonunu engellemektedir. Normalde Ser112/Ser114’ün fosforilasyonu, PPAR γ 2’nin hücrelerin adiposite farklılaşma yeteneğini kısıtladığı için lipid birikimini sınırlandırırken; Ser114/Ser112 fosforile olamadığı zaman hücrelerin adipogenez potansiyeli ve buna bağlı olarak da adiposit farklılaşması artar. Bu sebeple Pro113Gln/Pro115Gln’nin obezite, tip 2 diyabet ve insülün direnci gibi hastalıklar ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. (Ristow ve ark., 1998; Koumanis ve ark., 2002; Broekema ve ark., 2019; Brunmeir ve ark., 2018).

4.1.3.2.2. Val290Met Varyantı (rs72551362)

PPAR γ geninin Kodon 290’da meydana gelen GTG’den ATG’ye değişimi valin amino asidinin metiyonin amino asidine dönüşmesine neden olarak Val290Met (V290M) varyasyonu meydana getirmektedir.

Barroso ve arkadaşları, erken yaşta tip II diyabet ve hipertansiyon hastalıkları görülen bir bireyde bu varyantın potansiyel işlev kaybettirici etkisinin PPAR γ 'nın ligand bağlama ya da kofaktör bağlama kapasitesindeki azalmadan kaynaklanabileceğini göstermişlerdir (Barroso ve ark., 1999).

4.1.3.2.3 Pro467Leu Varyantı (rs121909244)

PPAR γ geni kodon 467'de meydana gelen CCG'den CTG'ye değişim prolin amino asidinin lösin amino asidine değişimine neden olarak Pro467Leu(P467L) varyasyonu meydana getirmektedir. Yapılan bir çalışmada Pro467Leu varyasyonu yönünden heterozigot olan annenin 30 yaşındaki oğlunda erken başlangıçlı diyabet ve hipertansiyon gözlenmişken, homozigot wild type olan diğer aile bireylerinde diyabet ve hipertansiyon gözlenmemiştir. Bu durum, domanint-negatif etki gösterdiği düşünülen Pro467Leu varyantının diyabet ve hipertansiyon ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir (Barroso ve ark., 1999).

4.1.3.2.4. His477His Varyantı (rs3856806)

Bu varyant C1431T, C161T, CAC477CAT isimleri ile de bilinmektedir (Dragojevič ve ark., 2008). En yaygın görülen PPAR γ varyantlarından olması açısından polimorfizm olarak değerlendirilir. PPAR γ geni ekzon 6'da meydana gelen CAC'den CAT'ye dönüşümü içeren bir sessiz polimorfizmdir (Doney ve ark., 2002; Yen ve ark., 1997). Koroner kalp hastalığı riskini azaltabileceği ve kolorektal kanser riski üzerinde de koruyucu bir etkiye sahip olduğu ile ilgili meta-analizler mevcuttur (Ding ve ark., 2012; Liang ve ark., 2018). Etkilerinin çevresel etmenler ve diğer genetik faktörler tarafından modülasyona uğradığı görülmüştür (Heikkinen ve ark., 2007).

4.1.3.2.5. Arg425Cys Varyantı (rs72551364)

Bu varyant R425C R397C olarak da bilinmektedir. PPAR γ geninde 6. Ekzonda bulunan CGC kodonunun TGC kodonuna dönüşümü (1273. nükleotitte meydana

gelen C'den T'ye dönüşüm) ile arginin aminoasitinin sistein aminoasitine dönüşümü sonucunda meydana gelen bir fonksiyon kaybı varyantıdır. Yapılan bir çalışmada Ailevi kısmi lipodistrofi (FPL) ile ilişkili olabileceğini gösterilmiştir (Agarwal ve Garg, 2002).

4.1.3.2.6. Phe360Leu Varyantı (rs72551363)

F360L varyantı Phe388Leu olarak da bilinmektedir. PPAR γ geni ekzon 5'de 1164. nükleotitte meydana gelen T'den A'ya dönüşüm sonucu fenilalanin aminoasitinin lösin aminoasitine değişimi ile oluşan bir varyanttır. FPL ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir (Hegele ve ark., 2002).

4.1.3.2.7. 185Stop Varyantı

Bu varyant (A553 Δ AAAiT)fs.185(stop 186) ve FSX olarak da bilinmektedir. Bu çerçeve kayması mutasyonu gende erken stop kodonu oluşumuna sebep olmaktadır. Bu varyant tek başına insülin direncine etki göstermeyebilir. Ancak PPP1R3A genindeki (C1984 Δ AG)fs.662(stop 668) mutasyonu ile birlikte bakıldığında iki gende de meydana gelen heterozigotluk durumunda yüksek insülin direncine neden olabilmektedir (Agostini ve ark., 2006; Savage ve ark., 2002).

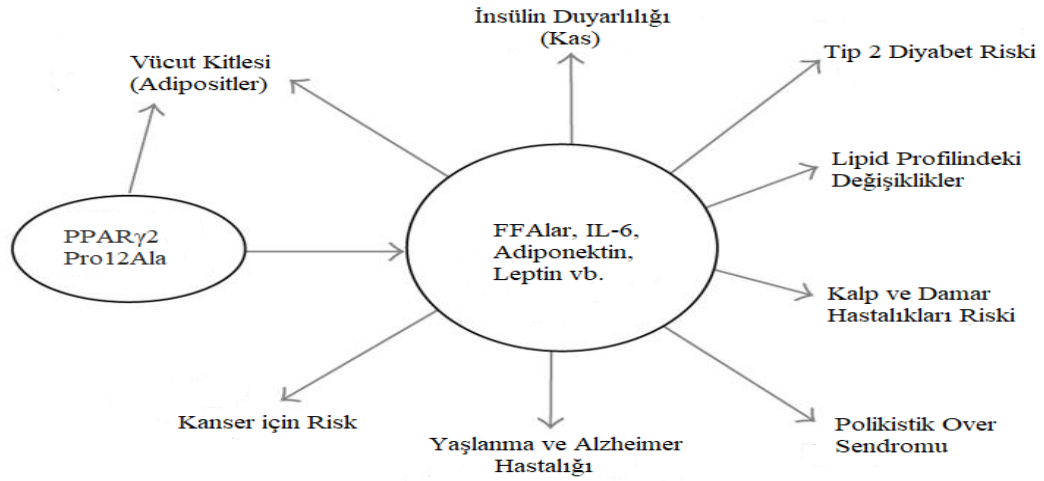
4.2. Pro12Ala POLİMORFİZMİ

PPAR γ 2'nin NH₂-Terminalinin B ekzonunun 12. kodonunda 34. nükleotitte meydana gelen C'den G'ye dönüşüm sonucu prolin aminoasitinin alanin aminoasitine değişimi Pro12Ala polimorfizmi (rs1801282) meydana gelmesine neden olur (Mansoori ve ark., 2015; Yen ve ark., 1997). Pro12Ala varyantı PPAR γ 'da en sık görülen iki varyasyondan biri olduğundan polimorfizm olarak adlandırılmaktadır. Pro12Ala polimorfizmindeki prolin aminoasitinin alanin aminoasitine dönüşümünün proteinde konformasyonel değişime neden olduğu düşünülmektedir. Pro12Ala polimorfizminin PPAR γ 2'nin DNA'ya bağlanma afinitesini azaltarak transkripsiyonel

aktivitesini düşürdüğü gösterilmiştir (Aguayo-Armendáriz ve ark., 2018; Masugi ve ark., 2000; Deeb ve ark., 1998).

4.2.1. PPAR γ ve Pro12Ala Polimorfizminin Hastalıklardaki Rolü

PPAR γ 'nın kanser, diyabet gibi birçok hastalıkta rol oynadığı bilinmektedir. Şekil 8'de gösterildiği gibi Pro12Ala polimorfizminin vücut kitlesine doğrudan veya proteinler aracılığı ile etki edebilirken, tip II diyabet, polikistik over sendromu, kanser gibi birçok hastalığa ise serbest yağ asitleri (FFA), leptin gibi molekülleri aracılığı ile etki edebileceği gösterilmiştir (He, 2009).



Şekil 8. Pro12Ala polimorfizminin insan sağlığı üzerine doğrudan ve dolaylı etkisi. [(He, 2009)'den adapte edilmiştir.]

4.2.1.1. PPAR γ ve Pro12Ala Polimorfizminin Kanser Dışındaki Hastalıklar ile İlişkisi

PPAR γ 'nın obezite, diyabet ve birçok hastalık ile bağlantılı olabileceği yapılan çalışmalarda görülmüştür. Yapılan bir çalışmada PPAR γ 'daki Pro12Ala polimorfizminin obezite ile ilişkisi gen düzeyinde ve PPAR γ 'nın mRNA ekspresyonu bakılarak araştırılmış ve bu çalışma sonucunda obezitede derialtı adiposit dokusunda Pro alleli ile PPAR γ mRNA ekspresyonundaki yüksek artış arasında ilişki olabileceği görülmüştür (Berhouma ve ark., 2013). Obezite ile Pro12Ala ilişkisini inceleyen başka bir çalışmada 33 obezite hastası ve 36 normal olmak üzere toplam 69 birey incelenmiş

Pro12Ala polimorfizminin obezite ile ilişkisinin olmadığı ama vücut yağ yüzdesinin Ala aleli taşıyanlarda daha yüksek olduğu görülmüştür (Aguayo-Armendáriz ve ark., 2018). Ek olarak 160 obezite hastası ile obez olmayan 140 birey ile yapılan bir çalışmada da Pro12Ala'nın obezite üzerinde direk etkisinin olmadığı bulunmuştur (Becer ve Çırakoğlu, 2017). Yapılan 56 çalışmayı inceleyen bir meta-analize göre ise Pro12Ala polimorfizminin Ala allelinin vücut kitle indeksini arttırabileceği bulunmuştur (Mansoori ve ark., 2015). Sonuçlarda tam bir mutabakat olmamakla birlikte büyük kısmı Ala allelinin obeziteyi arttırabileceğini düşündürmektedir.

Polikistik Over Sendromu ile Pro12Ala arasındaki ilişkiyi konu alan bir meta-analiz kapsamında 11'i Avrupa, 2'si Asya popülasyonu olmak üzere 13 farklı çalışmada toplam 1598 hasta, 1881 kontrol kullanılmıştır. Çalışma sonucunda Polikistik Over Sendromu ile Pro12Ala arasında ilişki bulunamamıştır (Tang ve ark., 2012). Buradaki bazı çalışmaları da içeren farklı bir meta-analiz çalışmasında ise 2149 hasta ve 2124 kontrollün kullanıldığı 17 çalışma incelenmiştir. Bu meta-analiz sonucunda Ala allelinin Polikistik Over Sendromu için koruyucu etkisinin olduğu, Pro allelinin ise Polikistik Over Sendromu riskini arttırabileceği görülmüştür (He ve ark., 2012). Bu sonuçlar Polikistik over sendromu ile Pro12Ala ilişkisi hakkında kesin bir kanıya varılamadığını göstermektedir.

Hipertansiyon ile Pro12Ala arasındaki ilişkiyi konu alan bir meta-analizde ise 3 410 olgu ve 3580 kontrol içeren 13 çalışma incelenmiştir. Bu meta-analiz sonucunda PA ve AA genotiplerinin hipertansiyona karşı koruyucu etki gösterdiği görülmüştür. Fakat bu ilişkinin güvenilirliği arttırmak için daha fazla çalışmaya yapılması gerektiği belirtilmiştir (Yang ve ark., 2017).

Gestasyonel Diabetes Mellitus (GDM) ile Pro12Ala polimorfizmi ilişkisini inceleyen bir meta-analizde 2980 GDM hastası ve 7054 kontrolden oluşan 12 çalışma incelenmiştir. Bu meta-analizde Gestasyonel Diabetes Mellitus ile Pro12Ala polimorfizmi arasında bir ilişki bulunamamıştır (Wang ve ark., 2016). Tip 2 Diabetes Mellitus ile Pro12Ala ilişkisini inceleyen bir başka meta analizde ise 9357 kişiden oluşan 20 çalışma incelenmiştir. Bu çalışma kapsamında Pro12Ala polimorfizminin Tip 2 diyabetes mellitus riskini azaltabileceği görülmüştür (Ding ve ark., 2015).

Kardiovasküler hastalıklarla Pro12Ala polimorfizminin ilişkisini inceleyen Asya popülasyonunda yapılmış 3 çalışma, Kafkas popülasyonunda yapılmış 8 çalışma, Afrika popülasyonunda yapılmış 1 çalışmayı içeren bir meta-analiz sonucunda Pro12Ala'nın kalp krizi riskini arttırabileceği bulunmuştur (Li ve ark., 2015). Koroner kalp hastalığı ile Pro12Ala polimorfizmi ilişkisini inceleyen bir meta-analizde 9069 kontrol ve 5795 vakadan oluşan 12 çalışma incelenmiş ve Pro12Ala'nın koroner kalp hastalığı riski ile ilişkisi bulunamamıştır (Ding ve ark., 2012).

4.2.1.2. PPAR γ ve Pro12Ala Polimorfizminin Kansere İlişkisi

Tümör gelişimine neden olan birçok faktör vardır. Bu faktörlerden en önemlisi hücre döngüsündeki bozulmalardır (Massagué, 2004). DNA tamir mekanizmasında meydana gelen polimorfizmler (Goode ve ark., 2002) ve apoptozisin engellenmesi de bu faktörler içerisinde yer almaktadır (Ekmekçi, 2008).

Hücre büyümesinin durdurulmasında görev alan adiposit farklılaşması, PPAR γ tarafından programlanabilir (Tontonoz ve Spiegelman, 2008). PPAR γ tümör inhibisyonunu durdurmada rol alabilmektedir (Hou ve ark., 2014, Hou ve ark., 2012). Yapılan bir çalışmada PPAR γ 'nın p65'e bağlandığı ve NFkB'nin aşırı aktivasyonunu engelleyebileceği bulunmuştur. Bu durumla bağlantılı olarak PPAR γ 'nın kanseri önleyebilecek fonksiyonunun olabileceği düşünülmektedir (Hou ve ark., 2012).

Çin popülasyonunda yumurtalık kanseri ile inflamatuvar yanıt genlerindeki polimorfizmler arasındaki inceleyen bir araştırmada, PPAR γ Pro12Ala polimorfizminin Pro/Ala genotipinin yumurtalık kanseri riskini arttırabileceği, Ala/Ala genotipinin ise bu kanser ile ilişkisinin olmadığı bulunmuştur. Bu farklı gözlemin nedeninin PPAR γ 'nın kanserle ilişkili sitokinlerin üretilmesinin düzenlenmesinde çok yönlü bir rolü olabileceği düşünülmektedir (Lu ve ark., 2016).

PPAR γ ligandlarının akciğer kanseri hücrelerinde büyümeyi inhibe ettiği görülmüştür (Tsubouchi ve ark., 2000). Yapılan bir çalışmada prostat kanserinde ise PPAR γ ligandlarının tümör baskılayıcı özelliğinin olabileceği gösterilmiştir (Segawa ve ark., 2002). Bazı polimorfizmlerin prostat kanseri ilişkisini inceleyen bir çalışmada

ise prostat kanseri ile Pro12Ala polimorfizmi arasında ilişki bulunamamıştır (Cui ve ark., 2015; Paltoo ve ark., 2003).

Pankreas kanserinde yapılan bir çalışmada pankreatik karsinoma hücrelerinde PPAR γ 'nın çekirdekte eksprese edildiği ve PPAR γ ligandı olan troglizon ile yapılan PPAR γ aktivasyonunun hücre büyümesinin inhibisyonuna neden olduğu görülmüştür (Motomura ve ark., 2000).

Özafagus kanserinde yapılan bir çalışmada özafagus epitel hücreleri ile özafagus yassı kanser hücreleri karşılaştırılmış ve kanser hücrelerinde normal epitele göre PPAR γ ekspresyon seviyesinin düşük olduğu görülmüştür (Terashita ve ark., 2002).

PPAR γ 'nın kolorektal kanserdeki tam rolü bilinmemesine rağmen kolorektal karsinogenezde rol oynadığı düşünülmektedir (Fredericks ve ark., 2018). PPAR γ 'nın kolorektal kanserde mRNA ekspresyon seviyesinin normale göre değişmediği görülmüştür (Fredericks ve ark., 2018, Zafari ve ark., 2017). Yapılan bir çalışmada ise PPAR γ ligandı olan pioglitazon, rosiglitazon, troglitazon fareler üzerinde kolon kanserindeki etkisi incelenmiş ve sonucunda PPAR γ ligandlarının kolon kanserini baskılayıcı etkisinin olabileceği görülmüştür (Osawa ve ark., 2003). Kolorektal kanser ile Pro12Ala polimorfizmi ilişkisini inceleyen 2003-2012 yılları arasında yapılmış bir çalışmada 17 makaleyi içeren meta-analiz sonucunda Pro12Ala'nın kolorektal kanserini azaltabileceği görülmüştür. Populasyon bazında incelendiğinde Pro12Ala polimorfizminin varlığında ise Kafkas ırkında kolorektal kanser riskinde azalma görülürken Asya popülasyonunda önemli bir fark görülmemiştir. Kolorektal kanserin alt grupları olan rektal kanser ve kolon kanserinde azalma görülmüştür. Populasyon bazında incelendiğinde ise kolorektal kanser ile benzer şekilde Kafkas ırkında riskte düşüş varken, Asya halkında etki görülememiştir (Liang ve ark., 2018). Aynı çalışmada Asya popülasyonunda net fark görülememesinin Asya popülasyonunda yapılan çalışma sayısının azlığından da kaynaklanabileceği vurgulanmıştır.

Mide kanseri ile Pro12Ala ilişkisini inceleyen bir meta-analiz çalışmasında ise Asyalılar üzerinde 2, Kafkasyalılar üzerinde 3 olmak üzere 5 vaka analizi kapsamında 546 olgu ve 827 kontrol çalışılmıştır. Bu çalışma sonucunda G alleli taşıyanlarda mide kanseri görülme olasılığının taşımayanlara göre 2,31 kat daha yüksek olduğu

görülmüştür. Çalışmadaki farklı populasyonlar ele alındığında ise G allelini taşıyanlar G alleli taşımayanlara göre Asyalılarda 2,56 kat, Kafkasyalılarda 2,20 kat mide kanseri riski görülmüştür. Mide kanserinin ana sebeplerinden biri olan *Helicobacter pylori* (*H. Pylori*) ile Pro12Ala ilişkisi incelendiğinde ise her iki populasyonda G alleli taşıyan ve *H. Pylori* enfeksiyonu görülen hastalarda mide kanseri riskinin daha yüksek olduğu görülmüştür. (Zhao ve ark., 2015). Mide kanseri ile Pro12Ala ilişkisini inceleyen bir çalışma da Türkiye'de yapılmıştır. Bu çalışma 86 hasta ve 129 kontrolden oluşmakta olup Pro12Ala polimorfizmi taşıyan bireylerin mide kanseri açısından daha fazla risk altında olduğu görülmüştür. Aynı zamanda G allelinin az diferansiyasyon gösteren ve metastatik süreçte olan mide kanseri hastalarında fazla olduğu görülmüştür (Canbay ve ark., 2012). *H.pylori* ile Pro12Ala polimorfizmi ilişkisine bakılan bir çalışmada ise 98 hasta ile çalışılmış ve polimorfizm yönünden heterozigot olan bireylerde *H.pylori* ve mide kanserinin yaygın olduğu fakat mide kanser hastalarında bu CC genotipine sahip mide kanseri hastası bulunamamıştır (Goudarzi ve ark., 2015).

Pro12Ala polimorfizminin meme kanseri ve benign meme hastalıkları ile ilişkisini inceleyen bir çalışma yapılmıştır. Çalışma 38 meme kanseri hastası, 75 benign meme hastası ve 116 kontrolden oluşmuştur ve çalışma sonucunda bu hastalıklar ile Pro12Ala polimorfizmi arasında ilişki bulunamamıştır (Conceição ve ark., 2016). Meme kanseri ile Pro12Ala polimorfizmi ilişkisini inceleyen bir meta-analizde ise 4 çalışmadaki 2279 vaka ve 2360 kontrolden oluşan analizde G allelinin koruyucu etkisi olabileceğini fakat yeterli çalışma olmadığı ve daha sonraki çalışmalar ile desteklenmesi gerektiği belirtilmiştir (Mao ve ark., 2013). Yapılan bir çalışmada meme kanseri hücre hatlarında PPAR γ transkriptinin normal dokulara göre düşük olduğu görülmüştür (Jiang ve ark., 2003). Başka bir çalışmada ise Tayvan nüfusunda kadınlar ile yapılan çalışmada Pro12Ala polimorfizminin meme kanseri riskini arttırabileceği gösterilmiştir (Wu ve ark., 2011).

4.3. HÜCRE HATLARI VE ÖZELLİKLERİ

Hücre hatları, yapay olarak oluşturulan koşullar altında biyolojik dokunun fonksiyonun incelenmesine olanak sağlar. Hücre hatları kullanımı ile tüm organizmanın incelenmesinde ortaya çıkan etik sorunların da önüne geçilmektedir (Saifullah ve Tsukahara, 2018).

Kanser çalışmalarında tümör dokusu, hayvan modelleri ve hücre kültürü olmak üzere üç farklı şekilde yapılabilmektedir. Tümör dokusu ile kanser hücre hattı karşılaştırıldığında, tümör dokusunun miktarı sınırlıdır ve çeşitli miktarda malign olmayan hücre içerir. Ek olarak tümör dokusunun elde edilmesi, dağıtımı ve kullanımı konusunda zorlukları bulunmaktadır. Bu nedenlerle kanser hücre hatlarının kullanımı daha kolaydır. Fakat kanser hücre hatları stromal ve inflamatuvar hücreler içermemektedir. Stromal hücrelerin bulunmaması tümör hücre karakterizasyonunda önemlidir (Gazdar ve ark., 2010). Kanser hücre hatları, kanserlerle ilişkili olan morfolojik ve büyüme özelliklerini göstermektedir. Tümör hücresi özelliklerinden olan yayılım, şekil, hücre yüzeyi değişiklikleri, yapışkanlık özelliği gibi özelliklerin sitoskeleti ile doğrudan veya dolaylı olarak ilişkili olabilmektedir (Brinkley ve ark., 1980). Fakat stromal ve inflamatuvar hücrelerin tümörün yeri, oluşumu, büyümesi ve dağılımı açısından önemli olması hücre hattı kullanımının dezavantajıdır (Gazdar ve ark., 2010).

Çalışmamız sırasında Pro12A1a polimorfizminin PPAR γ mRNA ekspresyonu ve kanser ile ilişkisini hücresel düzeyde inceleyebilmek için hücre hatları kullanılmıştır. Araştırma sırasında kullanılan hücre hatlarının özellikleri Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu Merkezi (ATCC) ve sigmaaldrich'den yararlanılarak Tablo 4'te verilmiştir.

Tablo 4. Hücre hatları ve özellikleri

Hücre Hattı	Kaynak Doku	Morfoloji	Kaynak Hastalık
Caco-2	Kolon	Epitel benzeri	Kolorektal adenokarsinom
Ishikawa	Uterus	Epitel benzeri	Endometrial adenokarsinom
MCF-7	Plevral efüzyon kaynaklı meme bezi	Epitel	Adenokarsinom
Huvec	Göbek damarı	Endotel	Normal
THP-1	Periferel kan	Monosit	Akut monositik lösemi
MDA-MB-453	Perikardial efüzyon metastatik alanından türemiş meme	Epitel	Metastatik karsinoma
MDA-MB-468	Plevral efüzyon metastatik alanından türemiş meme	Epitel	Adenokarsinoma
MCF-10A	Meme	Epitel	Fibrokistik hastalığı
AGS	Mide	Epitel	Mide adenokarsinom
Caki-1	Deri metastatik alanından türemiş böbrek	Epitel	Berrak hücreli adenokarsinom
HeLa	Rahim ağzı	Epitel	Adenokarsinom
SK-BR-3	Plevral efüzyon metastatik alandan türemiş meme	Epitel	Adenokarsinoma
Jurkat	Periferel kan	Lenfoblast	Akut T hücreli lösemi

5. GEREÇ VE YÖNTEM :

5.1. GEREÇLER

5.1.1. Çalışmada Kullanılan Laboratuvar Gereçleri

+4° C Buzdolabı	(Arçelik)
15 ml Tüp	(Nest, Falcon)
-20°C Buzdolabı	(Vestel, Arçelik)
50 ml Tüp	(CAPP Denmark)
-80°C Buzdolabı	(Haier-Biomedikal)
Agaroz Jel Güç Kaynağı	(Consort)
Beher	(Borucam)
CFX Connect Real-Time System	(Biorad)
CO ₂ İnkübatörü	(Sanyo)
Distile Su Cihazı	(Smart 2 Pure Thermo Scientific)
Dry Block	(Thermolyne)
Elektroforez Jel Sistemi	(Midicell Primo EC330)
Elektronik Pipet	(Thermo Scientific)
Erlen	(Isolab)
Filtre	(Millipore Corporation SCIOLOGEX)
Filtreli uç (10µl, 120µl,200µl 1000µl)	(Isolab)
Flask (25 cm ²)	(Sigma-Aldrich)
Flask (25cm ²) (Corning)	Sigma
Görüntüleme Cihazı	(Vilber Lourmat)
Hassas Terazi	(Shimadzu)
Inverted Mikroskop	(Olympus)
Kriyotüp (2ml)	(GreinerBio-one)

Laminar Flow Kabin	(Faster Safe Fast Classic)
Buz Cihazı	(AF 80 Scotsman)
Manyetik Karıştırıcı	(MR3001 K Heidolph)
Mezür (100 ml, 250ml, 1000 ml)	(Isolab)
Mikrodalga Fırın	(Arçelik)
Mikropipet	(Axygen, Eppendorf Research Plus, Kaimin)
MultiSkan GO µDrop	(Thermo Scientific)
Otoklav	(Nuve)
Parafilm	(BEMIS)
Parafilm	(Isolab)
PCR tüpü (0.2 ml)	(Axygen)
pH Metre	(ISOLAB)
Pipet uçları (10µl, 200µl 1000µl)	(Isolab)
Rack	(Isolab)
Santrifüj	(Nüve NF400, Heraeus Biofuge Pico, Sorvall Super T21)
Serolojik Pipet (10ml)	(Capp Harmony)
Sıvı Nitrojen Tankı	(Thermo Scientific)
Su banyosu	(Clever)
Su Banyosu	(Memmert WNB 14)
Thermalcycler T100 PCR	(Biorad T100)
Tüp (0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml)	(Eppendorf, Axygen)
Vorteks	(Janke & Kunkel VF2, Labnet)

5.1.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

2-merkaptetanol	(Merck)
2X Taq Master Mix	(Hibrigen)
Agaroz	(Sigma-Aldrich)

Borik Asit	(Sigma-Aldrich)
Bst-UI	(Biolabs)
Dimetil Sülfoksit (DMSO)	(Sigma-Aldrich)
Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12)	(Thermo Fisher Scientific)
1x Phosphate Buffered Salin (PBS)	(PAN Biotech)
EDTA	(Sigma-Aldrich)
Fetal Bovin Serum (FBS)	(Thermo Fisher Scientific)
Gel Loading Dye, Purple (6X), no SDS	(Biolabs)
GeneRuler™ 100 bp DNA ladder	(Thermo-Fisher Scientific)
Geri primer	(Sentromer)
Hidroklorik Asit (HCl)	(Riedel-de-Haen)
HI Horse Serum	(Thermo Fisher Scientific)
İleri primer	(Sentromer)
İnsülin	(Lantus SoloStar 100U/ml)
Nuclease-Free Water	(Thermo-Fisher Scientific)
Penisilin/Streptomisin	(Thermo Fisher Scientific)
Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium (RPMI 1640 Medyum)	(PAN Biotech)
SensiFAST SYBR® No-ROX Kit	(Bioline)
Tris-baz	(Sigma-Aldrich)
Trypsin	(Thermo-Fisher Scientific)
Trypsin / EDTA	(PAN Biotech)
UltraPure™ Etidyum Bromid (10 mg/ml)	(Thermo-Fisher Scientific)

5.1.3. Çalışmada Kullanılan Kitler

Quick-DNA Miniprep Plus Kit	(Zymo Research)
SensiFAST™ cDNA Synthesis Kit	(Bioline)
NucleoSpin® RNA	(Machery-Nagel)

5.2 YÖNTEM

Bu çalışma Demiroğlu Bilim Üniversitesi Multidisipliner Araştırma Laboratuvarı'nda yapıldı. Çalışmada ATCC'den temin edilen 13 adet hücre hattı kullanıldı.

5.2.1. Hücre Kültürü

5.2.1.1. Hücre Kültüründe Kullanılacak Hücrelerin Besiyerleri

Çalışmamızda HUVEC (ATCC® CRL-1730™), MCF10A (ATCC® CRL-10317™), Caki-I (ATCC® HTB-46™), Jurkat (ATCC® TIB152™), SK-BR-3 (ATCC® HTB-30™), HeLa (ATCC® CRM-CCL-2™), MCF7 (ATCC® HTB-22™), Ishikawa (Aydın Üniversitesi, İstanbul, Türkiye), THP-1 (ATCC® TIB-202™), Caco-2 (ATCC® HTB-37™), AGS (ATCC® CRL1739™), MDA-MB-468 (ATCC® HTB-132™) ve MDA-MB-453 (ATCC® HTB-131™) hücre hatları kullanıldı. Hücreler için kullanılan besiyerleri ve besiyerine eklenen ek malzemeleri Tablo 5'da verilmiştir.

Hücreler 37°C'de, %5 CO₂ ve 1 atm basınç koşullarını sağlayan etüvde inkübe edildi.

Çalışmada kullanılan DMEM F-12-Ham (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham), RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640), EGF (Epidermal Growth Factor), Hidrokortizon, İnsulin, PBS (1x Phosphate Buffered Salin), FBS (Fetal Bovine Serum), Horse Serum, Penicilin-Streptomycin ve

Tripsin-EDTA (Ethylenediaminetetraacetic Acid), DMSO (Dimethyl Sulfoxide) ticari olarak kullanıma hazır biçimde temin edildi.

Kültür devamlılığını sağlamak amacı ile yeterli sayıya ulaşan hücrelerin pasajları yapıldı. Bu işlem sırasında medyumları uzaklaştırılan hücreler PBS ile yıkandı. Flask yüzeyinden yapışan hücreleri kaldırmak için 25 cm²'lik flask için 1 ml Tripsin-EDTA kullanıldı. Hücreler tutundukları yerden kalktıktan sonra Tripsin-EDTA'nın etkisi FBS ile ortadan kaldırıldı. Yüzeyden kalkan hücreler santrifüj tüpüne alındı, 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Tripsin-EDTA-FBS içeren süpernatant hücrelerden uzaklaştırıldı. Pellet 3 kere daha PBS ile 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek yıkandı. Süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet deney aşamasında kullanılmak üzere -20 °C'ye kaldırıldı.

Tablo 5. Hücrelerin büyümesi için kullanılan besiyerleri ve eklenen diğer malzemeler

Hücre	Besiyeri	Besiyerine eklenen ek malzemeler
HUVEC	DMEM F12-Ham	%10 FBS %1 Antibiyotik
MCF10A	100ml besiyeri için; %95 DMEM F12-Ham, EGF 20µl, Hydrokortizon 0,5µl, İnsulin 274µl	%5 Horse Serum %1 Antibiyotik
Caki-1	DMEM F12	%10 FBS %1 Antibiyotik
Jurkat	RPMI-1640 Medium	%10 FBS %1 Antibiyotik
SK-BR-3	DMEM F12	%10 FBS %1 Antibiyotik
HeLa	DMEM F12	%10 FBS %1 Antibiyotik
MCF7	DMEM F12	%10 FBS %1 Antibiyotik
Ishikawa	RPMI-1640 Medium	%10 FBS %1 Antibiyotik
THP-1	RPMI-1640 Medium	%10 FBS %1 Antibiyotik
Caco-2	DMEM F12	%10 FBS %1 Antibiyotik
AGS	DMEM F12	%10 FBS %1 Antibiyotik
MDA-MB-468	DMEM F12	%10 FBS %1 Antibiyotik
MDA-MB-453	DMEM F12	%10 FBS %1 Antibiyotik

5.2.2. Hücre Kültürü Teknikleri

5.2.2.1 Hücre Hattının Açılması

Sıvı azot tankındaki kriyo-tüplerden hücreler alındı ve 37°C'lik su banyosunda 1-2 dakika bekletildi. Gerekli görüldüğünde, çözünen hücre süspansiyonun içinde bulunduğu %10 DMSO'lu dondurma medyumunu uzaklaştırmak için hücre süspansiyonu santrifüj edildi. Çözünen hücre süspansiyonu serumlu medyum içeren flaska eklendi. Hücre eklenen flask, 37°C'de, %5 CO₂ ve 1 atm basınç altında etüvde inkübasyona bırakıldı.

5.2.2.2. Hücrelerin Çoğaltılması

Hücreler 25cm²'lik flasklarda kendi özel medyumları içerisinde çoğaltıldı (Tablo 5). %80-90 yoğunluğa geldiklerinde pasajlandı.

5.2.2.3. Hücrelerin Pasajlanması

Flaskta bulunan hücreler yeterli yoğunluğa ulaştığında ortamdaki medyum uzaklaştırdı ve kalan eser miktarda medyumun da uzaklaştırılması için hücreler PBS ile yıkandı. Flaskta bulunan hücrelerin üzerine Tripsin-EDTA eklendi ve 2 dakika bekletildi. Tripsinin hücreler üzerindeki etkisini kaldırmak için tripsin ile aynı miktarda FBS eklendi. Hücreler süspansiyon halinde santrifüj tüpüne toplandıktan sonra 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet üzerine 1 ml medyum eklendi ve süspansiyon edildi. Hücreler 37°C'de %5'lik CO₂ etüve kaldırıldı.

5.2.2.4. Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması

Hücreleri yüzeyden kaldırmak için Tripsin-EDTA uygulaması kullanıldı. Kalkan hücreler üzerine Tripsin-EDTA ile aynı miktarda FBS eklenerek Tripsin-EDTA etkisi ortadan kaldırıldı. Oluşan süspansiyon santrifüj tüpüne alındı ve 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet üzerine %90 FBS

ve %10 DMSO içeren medyum eklendi ve pellet homojen hale getirildi. Hücre içeriği kriyo tüpe alınarak 1 gece -20°C’de bekletildikten sonra -80°C dondurucuya kaldırıldı. 1 hafta sonunda -196 °C azot tankına kaldırıldı.

5.2.3. DNA İzolasyonu

Hücre hatlarından DNA izolasyonu için Quick-DNA Miniprep Plus Kitin protokolüne uygun olarak aşağıdaki protokol izlendi.

- 20mg Proteinaz K tüpüne 1040 µl Proteinase K Storage Buffer eklendi.
 1. Hücre sayısı 1×10^6 ’den fazla olduğu için hücre pelletlerinin üzerine 200 µl PBS eklendi.
 2. 200µl örnek üzerine 200 µl BioFluid & Cell Buffer ve 20 µl Proteinase K eklendi.
 3. Örnek 10-15 saniye vorteks yapıldı ve 10 dk 55°C’de inkübe edildi.
 4. Örnek üzerine 420µl (1 hacim) Genomic Binding Buffer eklendi. Tekrar 10-15 saniye vorteks yapıldı.
 5. Toplama tüpü içine yerleştirilen Zymo-Spin™ IIC-XL kolonuna karışım aktarıldı.
 6. 13000 rcf’de 1dk’lık santrifüj yapıldı ve işlem sonunda içinde sıvı bulunan toplama tüpü atıldı.
 7. Kolon, yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi. Kolonun içine 400µl DNA Pre-Wash Buffer eklendi. Tüp 13 000 rcf’de 1dk santrifüj edildi ve toplama tüpü boşaltıldı.
 8. Kolona tekrardan 700µl g-DNA Wash Buffer eklendi. Tüp 13 000 rcf’de 1dk santrifüj edildi ve toplama tüpü boşaltıldı.
 9. Ardından kolona 200µl g-DNA Wash Buffer eklendi. Tüp 13 000 rcf’de 1dk santrifüj edildi ve toplama tüpü içindeki sıvı ile birlikte atıldı.
 10. Kolon yeni bir 1,5 ml tüpe yerleştirildi. Kolona 35µl DNA Elution Buffer eklendi ve 5 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. İşlemin ardından 1 dk 13 000 rcf’de santrifüj edildi. Kolon atıldı.
 11. Tüpte kalan örnekler -20°C buzdolabına kaldırıldı.

5.2.4. Total RNA İzolasyonu

Hücre hatlarından RNA izolasyonu için NucleoSpin RNA Kiti kullanılarak aşağıdaki protokol izlendi.

1. Hücre hattından elde edilen pelletin üzerine 350 µL Buffer RA1 ve 3.5 µl β-mercaptoethanol eklendi ve vortekslendi.
2. Mor renkli kolon, toplama tüpüne yerleştirildi. Birinci adımda elde edilen örnek kolonda bulunan filtrenin üzerine eklendi ve 11 000 rcf'de 1 dk santifüj edildi.
3. Kolon atıldı. Toplama tüpündeki örneğin üzerine 350 µl %70'lik ethanol eklendi ve vortekslendi.
4. Yeni bir toplama tüpüne açık mavi renkteki kolon yerleştirildi. Pipetaj ile karıştırılan lizat mavi kolona eklendi ve 11 000 rcf'de 30 sn santifüj edildi. Kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi.
5. Kolonun üzerine 350 µl MDB (Membrane Desalting Buffer) eklendi ve 11 000 rcf'de 1 dk santifüj edildi.
- DNase reaksiyon karışımı hazırlamak için 90 µl Reaction Buffer for rDNase ve 10 µl reconstituted rDNase 1,5 ml'lik steril tüpte konuldu. Tüpe hafifçe vurularak karıştırıldı.
6. Kolonun silika membranına 95 µl DNase reaksiyon karışımı konuldu. Oda sıcaklığında 15 dk inkübe edildi.
7. Kolona 200 µl Buffer RAW2 eklendi ve 11 000 rcf'de 30 sn santifüj edildi. Kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi.
8. Kolona 600 µl Buffer RA3 eklendi ve 11 000 rcf'de 30 sn santifüj edildi. Toplama tüpü boşaltılıp aynı kolon tekrardan toplama tüpüne yerleştirildi.
9. Kolona 250 µl Buffer RA3 eklendi ve membranın tamamen kuruması için 11 000 rcf'de 2 dk santifüj edildi. Kolon nuclease-free toplama tüpüne (1,5 ml) yerleştirildi.
10. Kolona 60 µl RNase-free H₂O eklendi ve 11 000 rcf'de 1 dk santifüj edildi. Kolon atıldı ve toplama tüpü direk buza alındı ve -80 °C'ye kaldırıldı.

5.2.5. Spektrofotometre ile Saflık Ölçümü

Nanodrop cihazında DNA ve RNA örneklerinden 2 µl alınarak ölçüm yapıldı. Bu işlem ile DNA ve RNA konsantrasyonu, A260/A280 ve A260/A230 hesaplamaları ile saflık oranları tespit edildi.

5.2.6. PZR-RFLP Yöntemi

Çoğaltılmış DNA'ların kesilmesine dayalı analiz yöntemi RFLP yöntemi olarak isimlendirilmektedir. Bu yöntem sayesinde farklı SNP'ler belirlebilir. Bir SNP bölgesinde farklı nükleotit içeren örnekler varsa farklılık bölgelerine spesifik restriksiyon endonükleaz ile kesildiğinde farklı uzunluklardaki DNA parçaları oluşabilir. Bu parçalar jel elektroforezi ile ayrılabilir (Chuang ve ark., 2008).

Bu yöntem aşağıdaki basamaklardan oluşmaktadır.

5.2.6.1. PZR Yöntemi

PZR işleminde daha önceden literatürde kullanılmış olan PPAR γ spesifik primer dizileri kullanıldı (Tablo 6) (Xita ve ark., 2009; Yang ve ark., 2013).

Tablo 6. PZR işlemi için kullanılan primer dizileri

Primer	Dizisi (5' → 3')
İleri Primer	GCC AAT TCA AGC CCA GTC
Geri Primer	GAT ATG TTT GCA GAC AGT GTA TCA GTG AAG GAA TCG CTT TCC G

Hücre hatlarından izole edilen DNA, PZR yöntemi ile çoğaltıldı. PZR yöntemi için Tablo 7'de belirtilen malzemeler, her örnek başına düşen miktarlarında kullanıldı. Negatif kontrol olarak DNA miktarı kadar ddH₂O eklendi ve Tablo 8'deki PZR döngü sıcaklıkları ve süreleri kullanıldı.

Tablo 7. PZR işleminde kullanılan malzemeler ve miktarları

Malzeme	Miktar (µl)
2X Master Mix	7,5
İleri Primer (10µM)	1
Geri Primer (10µM)	1
DNA	1
ddH ₂ O	4,5
Toplam	15

Tablo 8. PZR döngü sıcaklıkları ve süreleri

Aşama	Sıcaklık	Zaman	Döngü Sayısı
Başlangıç Denatürasyonu	94°C	8 dk	1
Denatürasyon	94°C	50 sn	35
Bağlanma	59°C	50 sn	35
Uzama	72°C	1 dk	35
Son Uzama	72°C	5 dk	1

5.2.6.2. Restriksiyon Enzimi ile Kesim

PZR işleminin ardından Tablo 9'daki malzemeler yanında belirtilen miktarlarda kullanılarak PZR ürünlerinin BstUI restriksiyon enzimi ile kesimi yapıldı. Malzemeler eklendikten sonra 15 dk, 60°C'de dryblock'ta inkübe edildi.

Tablo 9: PZR ürününün enzim ile kesimi sırasında kullanılan malzemeler ve miktarları

Malzeme	Miktar (µl)
BstUI	1
BstUI buffer (10X)	5
PZR ürünü (1µg)	5
dH ₂ O	39
Toplam	50

5.2.6.3. Agaroz Jel Elektroforezi ve Görüntüleme

Agaroz jelde kullanılmak üzere 5X TBE hazırlamak için Tablo 10'daki malzemeler ve yanında belirtilen miktarlar kullanıldı. Agaroz jelde kullanılmak üzere 1L 0,5X TBE hazırlamak için 5X TBE'den 100ml alındı ve üzerine 900ml distile su eklendi. pH'ı 8,3'e düşürmek için HCl eklendi ve 1L'ye tamamlanacak şekilde distile su eklendi.

Tablo 10: 5X TBE hazırlamak için kullanılan malzemeler ve miktarları

Kimyasal	Kullanılan Miktar
Tris	54 g
Borik Asit	27,5 g
EDTA	20 ml
Distile su	1 L'ye tamamlanıncaya kadar

% 2,5'lük agaroz jel hazırlamak için 2,5g agaroz tartıldı ve erlene alındı. Erlene alınan agarozun üzerine 100ml 0,5X TBE eklendi. Hafifçe karıştırıldıktan sonra erlen mikrodalga fırına konularak erlendeki agaroz eriyene kadar kaynatıldı. Erlenin içindeki karışıma %3'lük Etidyum bromür eklenerek hafifçe karıştırıldı. Hazırlanan karışım tarak ve kenarlıkları takılmış olan jel tabağına döküldü. Agaroz jel elektroforezi tankına 0,5X TBE eklendi. Jel tabağında bulunan jel donduktan sonra jel tabağı elektroforez tankına yerleştirildi.

PZR ürününün tespiti için jelde ilk kuyucuğa 5µl 100bç marker DNA, diğer kuyucuklara 5µl PZR ürünü ve 1µl Gel Loading Dye ile karıştırılıp yüklendi. Kesim ürününün tespiti için jelde ilk kuyucuğa 10µl 100bç marker DNA, diğer kuyucuklara 25µl PZR ürünü ve 5µl Gel Loading Dye ile karıştırılıp yüklendi. DNA olan bölge negatif (-) elektrota bağlı olacak şekilde pozitif (+) ve negatif (-) uçlu elektrotlar güç kaynağına bağlandı. Jel, 100V, 300mA ve 1 saat yürütüldü. Yürüyen jel tanktan çıkarıldıktan sonra Ultra-viyole (UV) ışık altında görüntüledi.

5.2.7. Sanger Sekanslama

Sanger sekanslamasının alt yapısını oluşturan dizi sonlandırma tekniğinde ddNTP'ler 3' hidroksil grubu taşımamaları nedeni ile gelecek dNTP'lerin 5' fosfat grupları ile fosfodiester bağı oluşturamayacağından DNA zinciri uzamaz. DNA uzama reaksiyonuna sınırlı konsantrasyonda etiketlenmiş ddNTP'ler ve standart dNTP'ler karıştırılır. Reaksiyona rastgele ddNTP katılması reaksiyonu durdurur ve mümkün olan bütün kombinasyonlarda ürün elde edilir. Klasik Sanger reaksiyonunda, her bir ddNTP bazı içeren dört paralel reaksiyon poliakrilamid jelde çalışılır ve nükleotid sekansını anlayabilmek için radyoaktif ddNTP işaretlemesi yapılmış reaksiyonlarda otoradyografi kullanılır (Heather ve Chain, 2016; Darcan ve Türkyılmaz, 2018).

RFLP sonuçları, ABI 3100 dizileycisi kullanılarak Sanger sekanslama ile doğrulandı. Primer dizisi olarak 5'-GCC AAT TCA AGC CCA GTC-3' kullanıldı ve veriler SnapGene yazılımı ile analiz edildi.

5.2.8. cDNA Sentezi

Bu işlem için Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu Yöntemi (RT-PZR) kullanılır. RT-PZR işleminde RNA'yı şablon olarak kullanan ters transkriptaz enzimi ile tek zincirli komplementer DNA (cDNA) sentezlenir (Bluth ve Bluth, 2018; Myers ve Gelfand, 1991).

SensiFAST™ cDNA Synthesis Kit'i ile cDNA sentezi gerçekleştirmek için aşağıdaki protokol uygulandı. Her bir tüp için 1 µg RNA, 4µl 5X TransAmp Buffer, 1 µl Reverse Transcriptase eklendi ve ddH₂O ile toplam hacim 20'ye tamamlandı. Ürünler PZR cihazına konuldu ve Tablo 11'deki döngü ve sıcaklıklar kullanıldı.

Tablo 11. cDNA sentezinde kullanılan döngü ve sıcaklıklar

Sıcaklık	Zaman
25°C	10 dk
42°C	15 dk
85°C	5 dk

5.2.9. Gerçek zamanlı PZR (GZ-PZR) Yöntemi

Çalışmamızda gen ekspresyonunun kantitatif tayini için gerçek zamanlı PZR (GZ-PZR) yöntemi kullanıldı. GZ-PZR, floresan boya ya da probaların kullanımı yardımı ile PZR işlemini gerçek zamanlı şekile görünür hale getirebilen ve DNA miktarının artışı gösteren bir yöntemdir. Çalışmamızda SYBR Green I ile gerçek zamanlı PZR (GZ-PZR) yöntemi kullanıldı. SYBR Green I boyasının kullanıldığı bu yöntemde, uzama aşamasında SYBR Green boyası çift zincirli DNA molekülünün arasına girerek floresan yayılımı gerçekleşir. Bu durum çift zincirli DNA molekülünün artmasıyla birlikte floresan ışımının artmasına neden olur (Günel, 2007).

Bu işlemi için kullanılan ileri ve geri primer dizileri Tablo 12’de, işlemde kullanılan malzemeler ve miktarları Tablo 13’te, PZR döngü sıcakları ve süreleri Tablo 14’te verilmiştir.

Tablo 12. GZ-PZR işleminde kullanılan primerler ve dizileri

Primer	Dizisi (5' → 3')
PPAR γ İleri Primer	TGAAGTGTGACGTGGACATC
PPAR γ Geri Primer	GGAGGAGCAATGATCTTGAT
β -actin İleri Primer	AATCAAAGTGGAGCCTGCAT
β -actin Geri Primer	ACCCTTGATCCTTCACAAG

Tablo 13. GZ-PZR için kullanılan malzemeler ve miktarları

Malzeme	Miktar (μ l)
2X SensiFAST™ SYBR® No-ROX Kit	10
İleri Primer (5 μ M)	1
Geri Primer (5 μ M)	1
cDNA (4 ng/ μ l)	2
ddH ₂ O	6
Toplam	20

Tablo 14. GZ-PZR döngü sıcaklıkları ve süreleri

Aşama	Sıcaklık	Zaman	Döngü Sayısı
Başlangıç Denatürasyonu	95°C	5 dk	1
Denatürasyon	95°C	10 sn	45
Bağlanma	55°C	10 sn	45
Uzama	72°C	30 sn	45
Son Uzama	95°C	10 dk	1

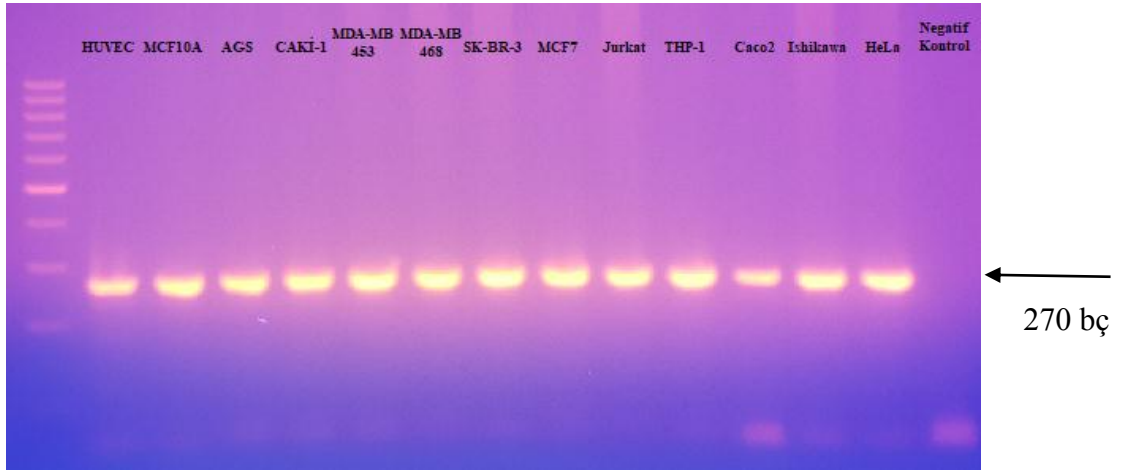
5.2.10. Veri Analizi

GZ-PZR işlemi için iki teknik tekrar yapıldı. Gerçekleştirilen reaksiyon β -aktin geni kullanılarak normalize edildi. Delta siklus eşiği (ΔCt) değerleri kullanılarak $\Delta\Delta Ct$ değerleri hesaplandı ve $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülü kullanılarak ekspresyon değişimi hesaplandı. Error barlar iki tekrarın ortalamasına göre hesaplandı.

6. BULGULAR

6.1 HÜCRE HATLARINDA PPAR γ Pro12Ala POLİMORFİZMİN ARAŞTIRILMASI

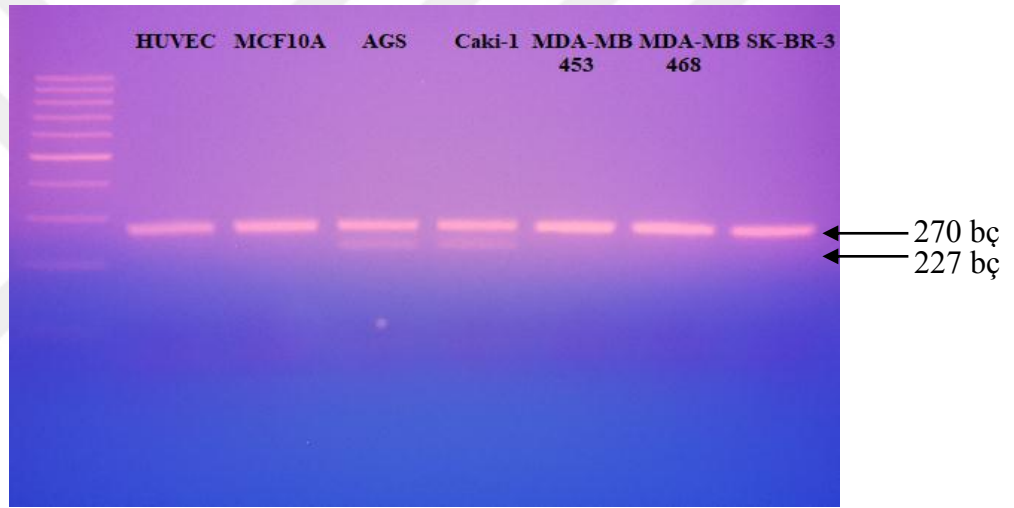
Hücre hatlarından elde edilen tüm DNA örneklerinin saflık oranları (A260/A280) yaklaşık 1,8 olarak tespit edildi. HUVEC, MCF10A, Caki-1, Jurkat, SKBR3, HeLa, MCF7, Ishikawa, THP-1, Caco-2, AGS, MDA-MB-468 ve MDA-MB-453 hücre hatlarından izole edilen DNA örnekleri PPAR γ genine spesifik primerler kullanılarak PZR işlemine tabi tutularak hedef bölge çoğaltıldı. Bu işlem sonucunda doğru bölgenin çoğaltılmasının kontrolünü sağlamak için agaroz jel elektroforezi tekniği kullanıldı. Agaroz jelde PPAR γ geninin 270bç'lik ürün olarak görülmesi beklenmektedir (Chao ve ark., 2015). Çalışmamızda elde edilen agaroz jel sonucu Resim 1'de gösterilmiştir. Kuyucukların üstünde kuyucuklarda örneği bulunan hücre hatlarının isimleri yazılmış olup ilk kuyucuğa marker olarak GeneRulerTM 100 bç DNA ladder yüklenmiştir.



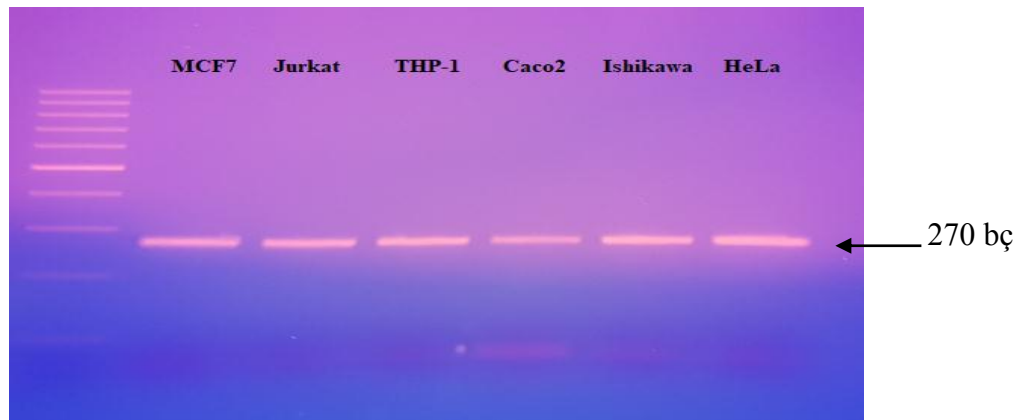
Resim 1. Hücre hatlarının PZR işlemi sonucunu görüntülemek için yapılan agaroz jel elektroforezi sonucunun görüntüsü

Hücre hatlarından elde edilen PZR ürünlerinden Pro12Ala polimorfizmini belirlemek amacı ile yapılan kesim işleminin sonucunda oluşan jel görüntüsü Resim 2 ve Resim 3'te verilmiştir. Kesim ürünü sonucunda Pro12Ala bakımından homozigot olan örneklerde 227bç ve 43 bç'de bant, Pro12Ala bakımından

heterozigot olan örneklerde 270 bç, 227 bç ve 43 bç'de bant, Pro12Ala alleli olmayan örneklerde ise 270bç'de bant oluşması beklenmektedir (Chao ve ark., 2016). Fakat 43 bç'lik bantlar çok küçük olduğundan dolayı primer dimer ile karışmaması için 227 bç'lik bantlar dikkate alınmıştır. Kesim işlemi sonucunda Caki-1 ve AGS hücre hatlarında PZR ürünlerinin kesime uğradığı görülürken, HUVEC, MCF10A, Jurkat, SK-BR-3, HeLa, MCF7, Ishikawa, THP-1, Caco-2, MDA-MB-468 ve MDA-MB-453 hücre hatlarında kesim görülmemiştir. Bunun sonucunda Caki-1 ve AGS hücre hatlarında heterozigot Pro12Ala polimorfizminin olduğu söylenebilirken diğer hücre hatlarında Pro12Ala polimorfizminin olmadığı sonucuna ulaşılabilir.

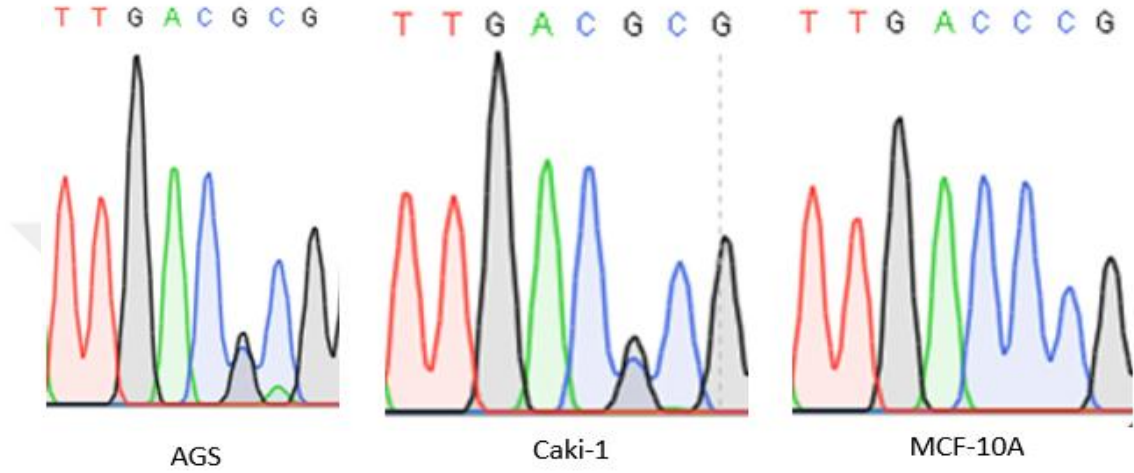


Resim 2. HUVEC, MCF10A, AGS, Caki-1, MDA-MB-453 ve MDA-MB-468 ve SK-BR-3 hücre hatlarından elde edilen PZR ürünlerinin BstUI kesim enzimi sonucunun görüntülenebilmesi için yapılan agaroz jel elektroforezi sonucunun görüntüsü



Resim 3. MCF7, Jurkat, THP-1, Caco-2, Ishikawa ve HeLa hücre hatlarında elde edilen PZR ürünlerinin BstUI kesim enzimi sonucunun görüntülenebilmesi için yapılan agaroz jel elektroforezi sonucunun görüntüsü

Yapılan RFLP işleminin sonuçları sanger sekanslama ile doğrulandı. Sanger sekanslama sonucunda, RFLP analizi sonuçları ile uyumlu olarak, AGS ve Caki-1 hücre hatlarında heterozigot Pro12Ala polimorfizmi bulunurken, diğer hücre hatlarında polimorfizme rastlanmadı. AGS, Caki-1 ve MCF10A hücre hatlarından elde edilen kromotogram sonuçları Şekil 9’da gösterilmiştir.

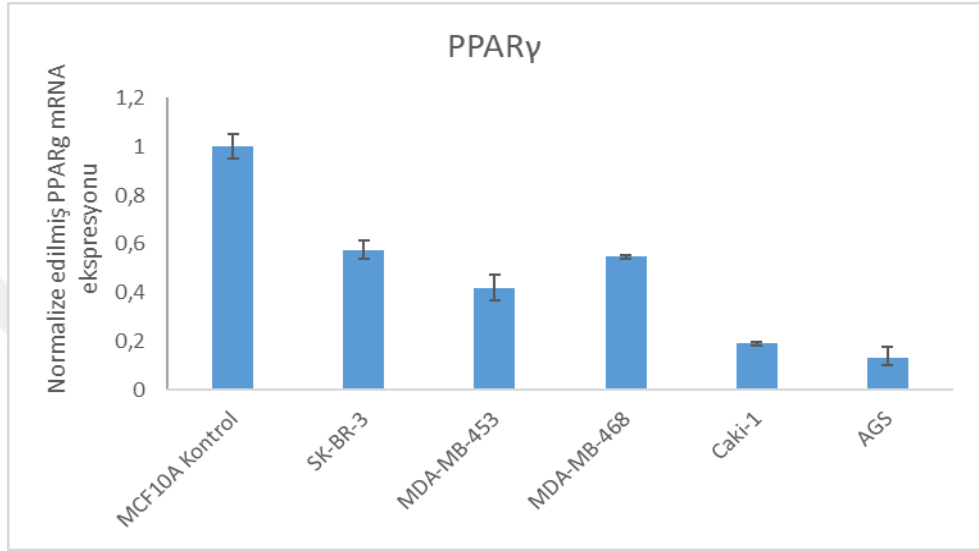


Şekil 9. AGS, Caki-1 ve MCF10A hücre hatlarının sanger sekanslama sonuçlarının kromotogram sonuçları.

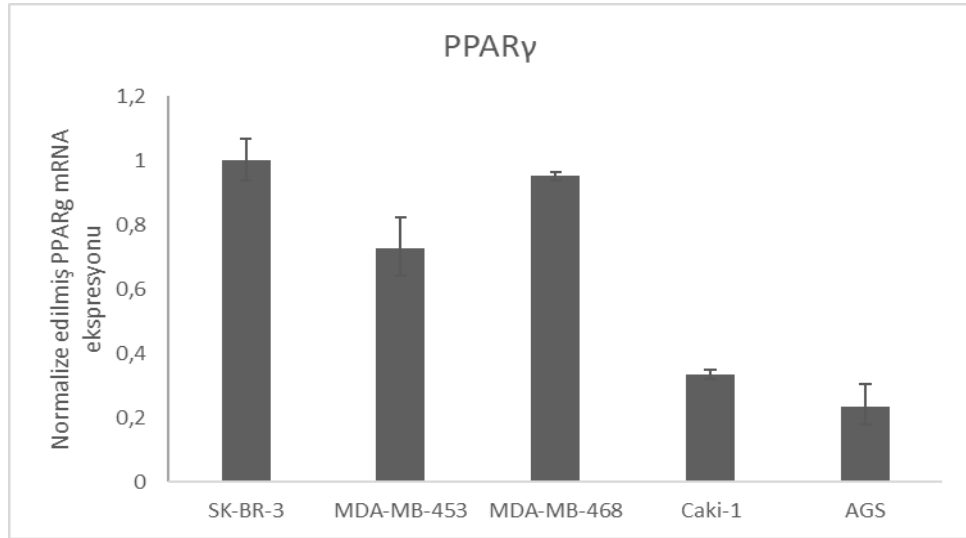
6.2. HÜCRE HATLARINDA PPAR γ EKSPRESYONUNUN ARAŞTIRILMASI

Hücre hatlarından elde edilen tüm RNA örneklerinin saflık oranları (A260/A280) yaklaşık 2 olarak tespit edildi. Hücre hatlarından elde edilen RNA'lar GZ-PZR'de kullanılmak üzere cDNA'ya çevrildikten sonra GZ-PZR işlemi gerçekleştirildi. Bu işlem sonucunda MCF10A (tümörjenik olmayan meme hücre hattı) ve SK-BR-3 (meme kanseri hücre hattı) ile diğer hücre hatlarının karşılaştırmasından elde edilen normalizasyon grafiği, sırasıyla Şekil 10 ve Şekil 11'de gösterilmiştir. İlk grafiğe göre (Şekil 10) hücre hatlarının mRNA ekspresyonları karşılaştırıldığında en fazla PPAR γ mRNA ekspresyonu gösterenden en az PPAR γ mRNA ekspresyonu gösterene göre sıralama MCF10A, SK-BR-3, MDA-MB-468, MDA-MB-453, Caki-1, AGS şeklindedir. Pro12Ala polimorfizmi bulunduran hücre hatları Caki-1 ve AGS'de, MCF-10A ile karşılaştırıldığında PPAR γ mRNA ekspresyonunda belirgin bir düşüş gözlenmiştir. İkinci grafikte (Şekil 11) de patern değişmemiş, mRNA ekspresyonları karşılaştırıldığında en fazla PPAR γ mRNA

ekspresyonu gösterenden en az PPAR γ mRNA ekspresyonu gösterene göre sıralanış sırasıyla SK-BR-3, MDA-MB-468, MDA-MB-453, Caki-1, AGS şeklinde olmuştur. Yine Pro12Ala polimorfizmi bulunduran hücre hatları Caki-1 ve AGS’de, SK-BR-3 ile karşılaştırıldığında PPAR γ mRNA ekspresyonunda belirgin bir düşüş gözlenmiştir.



Şekil 10. Hücre hatlarında PPAR γ mRNA ifadesinin MCF10A’ya göre normalizasyon grafiği



Şekil 11. Hücre hatlarında PPAR γ mRNA ifadesinin SK-BR-3’e göre normalizasyon grafiği

7. TARTIŞMA

PPAR'lar adipogenez ve lipid metabolizmasında görev alan bir nükleer reseptör ailesidir (Gimble ve ark., 1998; Yousefnia ve ark., 2018; Corrales ve ark., 2018a). PPAR'ın üç izoformundan biri olan PPAR γ 'nın adipojenik düzenleyici olmakla birlikte, bir çok farklı görevi vardır. Buna bağlı olarak yağ hücrelerinin yanında diğer hücre ve dokularda da az da olsa eksprese edilmektedir (Giaginis ve ark., 2009; Jain ve ark., 1998; Kliewer ve ark., 1994). PPAR γ 'nın proliferasyonu sınırlayan ve apoptozu ile farklılaşmayı destekleyen özellikleri sebebiyle birçok hücre çeşidinde kanserojen önleyici rolleri oynadığı düşünülmektedir. (Michalik ve ark., 2004) Özellikle hücre bölünmesinin durmasına sebep olan adiposit farklılaşmasının programlanmasında görev alması PPAR γ 'yı tümör büyümesinin kontrolü açısından önemli bir hedef haline getirmiştir. (Tontonoz ve Spiegelman, 2008).

PPAR γ geninin 12. kodonunun 34. nükleotidinde meydana gelen C \rightarrow G dönüşümü ile oluşan prolin amino asitinin alanin amino asitine değişimi sonucunda Pro12Ala polimorfizmi oluşmaktadır. Pro12Ala polimorfizminin obezite, diyabet, bazı kanser türleri gibi birçok hastalık ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir. Hücresel düzeyde ise kanser ile Pro12Ala polimorfizmi ilişkisini inceleyen bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Çalışmamızda PPAR γ genindeki Pro12Ala polimorfizminin hücre hatlarındaki varlığının tespit edilmesi ve bu polimorfizmin hücre hatlarındaki PPAR γ mRNA ekspresyon seviyesine etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Çalışmamız sonucunda Caki-1 ve AGS hücre hatlarında Pro12Ala polimorfizmi tespit edilmiş ve bu hücre hatlarındaki PPAR γ mRNA ekspresyon düzeyi; Pro12Ala polimorfizmi bulunmayan MCF10A, SK-BR-3, MDA-MB-453, MDA-MB-458 hücre hatlarındaki PPAR γ mRNA ekspresyon düzeyinden düşük bulunmuştur.

Genetik varyantların hastalıklarla ilişkisinin araştırılmasında yaygın olarak popülasyondaki hasta ve normal bireylere ait kan örnekleri kullanılmaktadır. Fakat bu varyantların hücresel düzeydeki etkilerini görmek için hücre hatlarında çalışmak daha yararlı bir yol olacaktır. Etik açıdan kullanım kolaylığı sağlamanın yanında,

hücre hatlarının sürdürülmesinin kolaylığı ve hücre dışındaki değişkenler sabit tutularak hücreye özgü bir sonuç verilme olanağı hücre hatlarını uygun bir çalışma modeli haline getirmektedir. Literatüre bakıldığında hücre hatlarında yapılmış polimorfizm çalışmalarına çok sık rastlanmasa da belirli hücre hatlarının genomunda bulunan SNP'lere bakıldığı görülmektedir (Saifullah ve Tsukahara, 2018). Oysa ki bu çalışmalar, genlerin farklı varyantlarının genin mRNA/protein ekspresyonu, protein lokalizasyonu, gen ürününün fonksiyonu gibi hücresel fenotipe etkilerini anlamak açısından çok önemlidir. Ayrıca hücre hatlarında yeni varyantlar tespiti COSMIC(Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) gibi veri tabanlarına ve bu gibi kaynakları birleştiren GEMICCL (Gene Expression and Mutations in Cancer Cell Lines) gibi ortak veri tabanlarına katkı sağlayacaktır. Buna bağlı olarak hücre hatlarının varyantları ve bu varyantların hastalıkla ilişkisi hakkında fikir edinilmesinin önü açılacaktır.

GEMiCCL veritabanı, insan hücre hatlarındaki mutasyon, gen ekspresyonu ve kopya sayısı değişikliklerini (copy number variation; CNV) üç farklı veri tabanı olan CCLE (Cancer Cell Line Encyclopedia), COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) ve NCI60'dan veri toplayarak, deneysel olarak doğru hücre hattı seçiminde araştırmacılara kaynak sağlamayı amaçlamaktadır. Araştırmamız kapsamında, GEMiCCL veri tabanında bulunan ve araştırmada kullandığımız hücre hatlarında PPAR γ 'daki mutasyonları inceledi. Bu inceleme sonucunda Jurkat hücre hattında Chr3:12393133-12393133 pozisyonunda sessiz bir mutasyon(c.42C>T) olduğu görüldü. Bu mutasyon dışında ve diğer hücre hatlarında ise PPAR γ 'da mutasyona rastlanmadı. Çalışmamız sonucunda Caki-1 ve AGS hücre hatlarında Pro12Ala polimorfizmi tespit ettik. Daha önce bu hücre hatlarında Pro12Ala polimorfizmi çalışılmadığından ve bahsedilen hücre hatlarında tespit ettiğimiz Pro12Ala polimorfizminin veri tabanlarına yeni bir veri ekleme imkanı sunacağını düşünmekteyiz.

Polimorfizmlerin genlerin mRNA ekspresyonunu etkileyebileceği bilinmektedir. Berhouma ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada obezite hastalarından alınan doku örneklerinde Pro12 alelinin PPAR γ mRNA'sının aşırı ekspresyonu ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir (Berhouma ve ark., 2013). Fakat

Pro12A1a polimorfizminin kanser hücre hatlarında PPAR γ mRNA ekspresyonuna etkisi üzerine bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bizim çalışmamız da genlerdeki polimorfizmlerin mRNA ekspresyonunu etkileyebileceğini destekleyici sonuçlar sunmaktadır. Özellikle yapılan çalışmalarda farklı kanser hücre hatlarında farklı oranda PPAR γ mRNA ekspresyonu görülmektedir. Elnemr ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada pankreas kanseri hücre hatları olan AsPC-1, MIA PaCa-2, PANC-1 ve BxPC-3'ün PPAR γ protein ekspresyonu, pozitif kontrol olarak kullanılan kolon kanseri hücre hattı HT-29'a kıyasla daha yüksek çıkmıştır (Elnemr ve ark., 2000). Takahashi ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada mide kanseri hücre hattı olan MKN45'de PPAR γ ekspresyonu kolon kanseri hücre hattı HT-29 ile karşılaştırılmıştır. Yapılan bu çalışmada HT-29'un PPAR γ mRNA ekspresyonunun, MKN45'deki PPAR γ mRNA ekspresyonu ile eşit düzeylerde olduğu saptanmıştır. Bunun yanında PPAR γ protein ekspresyonuna bakıldığında, MKN45'deki PPAR γ protein ekspresyonunun HT-29'daki ekspresyona eşit hatta ondan yüksek olduğu bulunmuştur (Takahashi ve ark., 1999). Farklı kanser hücre hatlarındaki farklı düzeyde PPAR γ mRNA/protein ekspresyonu, kanser hücre hatlarının farklı karsinogenez mekanizmalarına bağlı olabileceği gibi PPAR γ 'daki polimorfizmlerine de olabilir.

Çalışmamızda PPAR γ Pro12A1a polimorfizminin mRNA ekspresyonunun üzerindeki etkisini analiz etmek için iki farklı yol kullanılmıştır. Bu yollardan birincisinde gen ekspresyon analizi normal meme hücre hattı olan MCF10A kontrol olarak kabul edilerek yapılmıştır. Kontrol MCF10A ile karşılaştırılan diğer hücre hatları kanser hücre hatları olduğundan karşılaştırma hem Pro12A1a polimorfizminin hem de kanser-normal hücre arasındaki PPAR γ mRNA ekspresyonu hakkında bilgi almak için kullanılmıştır. Bu analizde MDA-MB-453, MDA-MB-468, SK-BR-3 olmak üzere 3 meme kanseri hücre hattı, normal meme hattı MCF10A ile karşılaştırılmış ve Pro12A1a polimorfizmi tespit edilmeyen bu hücrelerin PPAR γ mRNA ekspresyonunda normale göre düşüş görülmüştür. Pro12A1a polimorfizmi tespit edilen Caki-1 ve AGS hücre hatlarında ise PPAR γ mRNA ekspresyonunda Pro12A1a polimorfizmi bulunmayan hücre hatlarına göre daha büyük bir düşüş tespit edilmiştir. Bu düşüş hem kanser hücresi ile normal hücre arasındaki ekspresyon farkına, hem de polimorfizmin etkisine bağlanabilir. Kanser ve normal hücre hatları

arasındaki farklılıkları dışlamak ve kanserdeki polimorfizmden etkisini daha iyi görmek için ikinci analiz diğer bir kanser hücre hattı olan SK-BR-3'ü kontrol olarak yapılmıştır. Bu analizde Pro12Ala polimorfizmi tespit edilmemiş hücre hatlarında mRNA ekspresyonu çok fazla değişmezken, Pro12Ala polimorfizmi tespit edilmiş olan Caki-1 ve AGS hücre hatlarında PPAR γ mRNA ekspresyonunda belirgin bir düşüş görülmüştür. Bu nedenle bu analizde mRNA ekspresyonundaki düşüşün Pro12Ala polimorfizmi kaynaklı olabileceği sonucuna varılmıştır. Bundan sonraki adım bu ekspresyon farkının kanser türleri arasındaki farktan kaynaklanma ihtimalini dışlamak için karşılaştırmayı Pro12Ala polimorfizmi tespit edilmiş olan Caki-1 ve AGS hücre hatları ile aynı tümör türünü kaynak alan ve Pro12Ala polimorfizmi tespit edilmeyen kanser hücre hatları ile tekrarlamak olacaktır. Ayrıca aynı etkinin protein düzeyinde gerçekleşip gerçekleşmediğini görmek için Caki-1 ve AGS hücre hatlarında Pro12Ala polimorfizminin protein ekspresyonu üzerindeki etkisi de incelenecektir.

PPAR γ 'nın; kolon, prostat, akciğer, deri, meme kanseri, mesane kanseri gibi çeşitli tümör dokularında ekspresyonu vardır (Yun ve ark., 2018; Mansure ve ark., 2009; Ban ve ark., 2010; Eastham ve ark., 2008; Freudlsperger ve ark., 2008). PPAR γ 'nın ligandı tarafından aktive edilmesinin hücre çoğalmasını durdurulmasına ya da apoptosisi uyarılmasına sebep olduğu gözlenmiştir. Bu mekanizması, Fosfataz ve Tensin Homolog (PTEN), B Hücreli Lenfoma (BCL)-2, BCL2 İlişkili X (Bax) ve fosfatazların yüksek ekspresyonlarını ve survivin, Apoptoz Proteininin X Bağlantılı İnhibitörü (XIAP), Siklin Bağımlı Kinaz (CDK), Siklin D1, Siklooksijenaz-2 (COX-2) gibi çeşitli genlerin düşük ekspresyonlarını sağlaması ile gerçekleştirdiği düşünülmektedir (Yun ve ark., 2018; Ban ve ark., 2010; Ma ve ark., 2019). Ayrıca kanser hücrelerinin büyümesinin kontrolünde önemli rolü vardır (Lee ve ark., 2013; Seifabadi ve ark., 2019). PPAR γ 'nın ligandı bazı kanser türlerinde tümör oluşumunu baskıladığı bu sebeple antinoplastik ilaçlar olarak kullanım potansiyelleri olduğu düşünülmektedir. (Tachibana ve ark., 2008)

Meme kanseri ve Pro12Ala polimorfizmi ilişkisini inceleyen birçok farklı çalışma yapılmıştır. Mao ve arkadaşlarının meme kanserinde Pro12Ala ilişkisini inceleyen meta-analiz sonucunda G allelinin meme kanseri üzerinde koruyucu etkisi

olabileceği gösterilmiştir (Mao ve ark., 2013). Vogel ve arkadaşlarının Danimarkalılar üzerinde yapılan meme kanseri ile Pro12Ala polimorfizmi arasındaki ilişkisini inceleyen çalışmaları sonucunda Ala allelinin meme kanseri riskini düşürebileceği görülmüştür (Vogel ve ark., 2007). Wu ve arkadaşlarının tarafından Tayvan nüfusunda kadınlar ile yapılan çalışmada meme kanseri ile Pro12Ala polimorfizmi ilişkisinin incelenmesi sonucunda Pro12Ala polimorfizminin kanser riskini arttırabileceği gösterilmiştir (Wu ve ark., 2011). Yapılan PPAR γ ekspresyon analizlerinde ise; Elstner ve arkadaşlarının yaptığı çalışma meme kanseri üzerinde PPAR γ ekspresyonuna bakılmış olup bu çalışmada hastaların meme adenokarsinom hücrelerinde yüksek PPAR γ protein ekspresyon görülürken bireylerin epitel hücrelerinde ise düşük PPAR γ protein ekspresyonu görülmüştür (Elstner ve ark., 1998).

Bizim çalışmamızda ise MCF-7, MDA-MB-453, MDA-MB-468, MCF-10A, SK-BR-3 olmak üzere 5 ayrı meme kanseri hücre hattı ile çalışılmıştır. Bu çalışmanın sonucunda bu 5 ayrı hücre hattında da Pro12Ala polimorfizmi tespit edilememiştir. Bu sebeple meme kanserinde Pro12Ala polimorfizminin etkisi ile ilgili bir sonuca ulaşamamıştır. Bu çalışmada kullanılan meme kanseri hücre hatları PPAR γ mRNA ekspresyonu açısından değerlendirildiklerinde kanser hücre hatlarında PPAR γ mRNA ekspresyonunun normal meme hücre hattına göre düşüş gösterdiği görülmüştür. Bu sonuçlar Elstner ve arkadaşlarının PPAR γ protein datasıyla ters görünse de bizim çalışmamızda protein düzeyinde ekspresyona bakılmadığı için tam bir karşılaştırma yapılamamaktadır (Elstner ve ark., 1998).

Goudarzi ve arkadaşlarının İran popülasyonunda mide kanseri ve mide kanserinin sebeplerinden biri olan *H.pylori* ile Pro12Ala inceleyen çalışmanın sonucunda heterozigot Pro12Ala'nın *H.pylori* ve mide kanseri hastalarında yaygın olduğu ve CC genotipine sahip mide kanseri hastasına rastlanılmadığı gösterilmiştir (Goudarzi ve ark., 2015). Zhao ve arkadaşlarının mide kanserinde Pro12Ala ilişkisini inceleyen meta-analizde G allelini taşıyan bireylerde mide kanserinde görülme sıklığının 2,31 kat yüksek olduğu ve *H.pylori* taşıma durumunda riskin daha yüksek olabileceği gösterilmiştir. Popülasyon tabanlı bakıldığında Asya popülasyonunda 2,56 kat, Kafkasya popülasyonunda ise 2,20 kat yüksek olduğu sonucuna varılmıştır

(Zhao ve ark., 2015). Canbay ve arkadaşları Türk popülasyonunda mide kanseri ile Pro12Ala polimorfizmini incelemesi sonucunda Pro12Ala polimorfizminin mide kanseri riskini arttırdığı ve G allelinin az diferensiyasyon ve metastatik süreç ile ilişkili olabileceği sonucuna varılmıştır (Canbay ve ark., 2012).

Xu ve arkadaşlarının metazanalizinde mide kanseri ile Pro12Ala ilişkisine bakıldığında G alleli taşıyıcılarında 2,31 kat daha fazla mide kanseri riski olabileceği gösterilmiştir (Xu ve ark., 2010). İnsan mide kanseri hücreleri (MKN-45) üzerinde yapılan bir çalışmada ise PPAR γ / α 'nın agonisti olan TZD18 kullanılmıştır. TZD18, PPAR γ ve PPAR α aktivasyonları üzerinden anti-proliferasyonu gerçekleştirmektedir. Deney sonuçlarında, kanserli hücrenin çoğalması azalmış ve apoptoz gerçekleşmiştir (Ma ve ark., 2019). Yapılan bu çalışmalar Pro12Ala polimorfizminin mide kanser riskini arttırabileceğini göstermektedir.

Sato ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada ise aynı kansere ait hücre hatlarını karşılaştırmıştır. Mide kanseri hücre hatları olan dört dokuda, MKN-7, MKN-28, MKN-45 ve AGS'de, PPAR γ mRNA ekspresyonu ve protein seviyelerine bakılmıştır. Bu çalışmada MKN-7 ve MKN-45 hücre hatlarında mRNA ekspresyon seviyeleri MKN-28 ve AGS hücre hatlarına oranla daha yüksek bulunmuştur. Yine protein seviyeleri karşılaştırılmış ve görece en düşük protein seviyesine sahip olan hücre hattı ise AGS olarak belirlenmiştir (Sato ve ark., 2000). Yapılan bu çalışmaya ek olarak bizim çalışmamızda da AGS mRNA ekspresyonunu diğer farklı kanser hücre hatları ile kıyaslandığında da çok düşük bir mRNA ekspresyonuna sahip olduğu görülmüştür. Bu durum düşük PPAR γ protein ekspresyonuna da neden olabilir. Sonucun Pro12Ala polimorfizminden kaynaklanıp kaynaklanmadığını incelemek için bahsedilen hücre hatlarının Pro12Ala polimorfizm taşıyıp taşımadıklarını tespit etmek gerekmektedir.

Sonuç olarak bizim çalışmamızda mide kanseri hücre hattı olan AGS hücre hattında ve deri metastatik alanından türemiş böbrek hücre hattı olan Caki-1 hücre hattında heterozigot Pro12Ala polimorfizmi bulunmuştur. Çalışmamızda kullanılan HUVEC, MCF10A, Jurkat, SK-BR-3, HeLa, MCF7, Ishikawa, THP-I, Caco-2, MDA-MB-468 ve MDA-MB-453 hücre hatlarında Pro12Ala polimorfizmine

rastlanmamıştır. Pro12Ala polimorfizmlerine sahip olan Caki-1 ve AGS hücre hatlarının mRNA ifadesi, Pro12Ala polimorfizmi bulunmayan MCF10A, SKBR3, MDA-MB-453, MDA-MB-458 hücre hatlarının mRNA ifadesinden düşük bulunmuştur. Bu farklılığın polimorfizmden kaynaklanıp kaynaklanmadığı tespit etmek ve olası etkinin karsinogenez mekanizmasındaki yerini araştırmak için daha kapsamlı analizler gerekmektedir.



8. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamız sonucunda incelenen 13 farklı hücre hattı içerisinde yalnızca AGS ve Caki-1 hücre hatlarında PPAR γ geni Pro12Ala polimorfizmi tespit edilmiştir. Pro12Ala polimorfizmi tespit edilen bu hücre hatlarında, Pro12Ala polimorfizmi bulunmayan SK-BR-3, MDA-MB-453, MDA-MB-458 kanser hücre hatlarına göre PPAR γ mRNA ekspresyonunun düşük olduğu bulunmuştur. Bu durum kanserde hücresel düzeyde Pro12Ala polimorfizminin varlığının PPAR γ mRNA ekspresyonunu azaltabileceğini göstermektedir. Bu polimorfizmin karsinogenez mekanizmasındaki etkisini anlamak için, daha kapsamlı araştırmalar yapılması gerekmektedir.

Çalışmamız hücre kültürü ve popülasyon çalışmalarında polimorfizmlerin etkisinin anlaşılması açısından önemli bir temel oluşturmaktadır. Sonuçlar değerlendirilirken Pro12Ala polimorfizmi taşıyan örnek sayısının düşük olması göz önünde bulundurulmalıdır.

Yapılacak çalışmalarda hücre hatlarındaki polimorfizm dışındaki özellikler eşitlenerek daha net bir şekilde yorumlanabilir. Örnek olarak polimorfizm içermeyen hücre hattı olan MCF10A'da Pro12Ala polimorfizmi oluşturmak normal hücre hattında Pro12Ala polimorfizminin etkisini incelemeye olanak sağlar. Aynı zamanda, Pro12Ala polimorfizmi içermeyen ve kanser hücre hattı olan SK-BR-3 hücre hattında Pro12Ala polimorfizmi oluşturularak kanser hücre hattında Pro12Ala polimorfizminin etkisi gözlemlenebilir. Bu sonuçlar karşılaştırılarak ise normal ve kanser hücre hatlarındaki farklılık gözlenebilir. Bu hücrelerde mRNA ekspresyonunun yanı sıra protein ekspresyonuna da bakılarak polimorfizmin protein düzeyindeki etkisi incelenebilir. Daha sonraki çalışmalarda ise polimorfizm kaynaklı farklılık durumu gözlenmesi durumunda bu farklılığın pro-apoptotik etkiden mi ya da hücre çoğalmasına olan etkiden mi kaynaklanıp kaynaklanmadığı araştırılabilir.

Çalışmamız genetik varyasyonların hücre fenotiplere etkisini göstermesi açısından önem taşımaktadır. Bu çalışma hücre hatları kullanılarak yapılan deneylerde, çeşitli koşullar altında genlerin ekspresyon farkları ya da hücresel

fonksiyonları araştırılırken araştırılan genin farklı hücre hatlarında bulunan farklı varyantlarının etkisinin göz önünde bulundurulması gerektiğinin altını çizmiştir.



9. KAYNAKLAR :

Aksoy ZB, Soydemir E. Polimorfizm. *Güncel Gastroentoloji*. 2017; 21(1): 9-13.

Agarwal AK, Garg A. A Novel Heterozygous Mutation in Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ Gene in a Patient with Familial Partial Lipodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(1):408–411.

Agostini M, Schoenmakers E, Mitchell C, Szatmari I, Savage D, Smith A, Rajanayagam O, Semple R, Luan J, Bath L, Zalin A, Labib M, Kumar S, Simpson H, Blom D, Marais D, Schwabe J, Barroso I, Trembath R, Wareham N, Nagy L, Gurnell M, O’Rahilly S, Chatterjee K. Non-DNA Binding, Dominant-Negative, Human PPAR γ Mutations Cause Lipodystrophic Insulin Resistance. *Cell Metab*. 2006; 4(4): 303–311.

Aguayo-Armendáriz J, Montalvo-Corral M, González-Martínez KA., Grijalva-Haro MI., Ballesteros-Vásquez MN., Caire-Juvera G, Moya-Camarena SY. Central Obesity and Body Fat, But Not Body Mass Index, Are Associated with the Pro12Ala Polymorphism in the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Gene in a Population with a High Consumption of Saturated and Trans-Fatty Acids. *Nutr Res*. 2018, 57:28-35.

Aprile M, Ambrosio MR, D’Esposito V, Beguinot F, Formisano P, Costa V, Ciccodicola A. PPARG in Human Adipogenesis: Differential Contribution of Canonical Transcripts and Dominant Negative Isoforms. *PPAR Res*. 2014, 2014:1-11.

Ban JO, Kwak DH, Oh JH, Park EJ, Cho MC, Song HS, Song MJ, Han SB, Moon DC, Kang KW, Hong JT. Suppression of NF-kappaB and GSK-3beta Is Involved in Colon Cancer Cell Growth Inhibition by the PPAR Agonist Troglitazone. *Chem Biol Interact*. 2010; 188(1):75-85.

Barroso I, Gurnell M, Crowley VE, Agostini M, Schwabe JW, Soos MA, Maslen GL, Williams TD, Lewis H, Schafer AJ, Chatterjee VK, O'Rahilly S. Dominant Negative Mutations in Human PPAR γ Associated with Severe Insulin Resistance, Diabetes Mellitus and Hypertension. *Nature*. 1999; 402 (6764):880-883.

Belvisi MG, Hele DJ, Birrell MA. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Agonists as Therapy for Chronic Airway Inflammation. *Eur J Pharmacol*. 2006; 533(1-3):101–109.

Becer E, Çırakoğlu A. Effect of the Pro12Ala Polymorphism of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ 2 Gene on Lipid Profile and Adipokines Levels in Obese Subjects. *Balkan J Med Genet*. 2017; 20(1):71-80.

Beekun OV, Fleskens V, Kalkhoven E. Posttranslational modifications of PPAR-gamma: fine-tuning the metabolic master regulator. *Obesity (Silver Spring)*. 2009; 17(2):213-219.

Berger J, Moller DE. The Mechanisms of Action of PPARs. *Annu Rev Med*. 2002, 53:409–435.

Berhouma R, Kouidhi S, Ammar M, Abid H, Ennafaa H, Benammar-Elgaaied A. Correlation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR- γ) mRNA Expression with Pro12Ala Polymorphism in Obesity. *Biochem Genet*. 2013; 51(3-4):256–263.

Bluth MJ, Bluth MH. Molecular Pathology Techniques: Advances in 2018. *Clin Lab Med*. 2018; 38(2):215-236.

Brinkley BR, Beall PT, Wible LJ, Mace ML, Turner DS, Cailleau RM. Variations in Cell Form and Cytoskeleton in Human Breast Carcinoma Cells in Vitro. *Cancer Res*. 1980; 40(9):3118-3129.

Broekema MF, Savage DB, Monajemi H, Kalkhoven E. Gene-Gene and Gene-Environment Interactions in Lipodystrophy: Lessons Learned from Natural PPAR γ Mutants. *BBA - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2019; 1864(5):715-732.

Brown JD, Plutzky J. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors as Transcriptional Nodal Points and Therapeutic Targets. *Circulation*. 2007; 115(4):518-533.

Brunmeir R, Xu F. Functional Regulation of PPARs through Post-Translational Modifications. *Int J Mol Sci*. 2018;19(6): 1-16.

Canbay E, Kurnaz O, Canbay B, Bugra D, Cakmakoglu B, Bulut T, Yamaner S, Sokucu N, Buyukuncu Y, Yilmaz-Aydogan H. PPAR-Gamma Pro12Ala Polymorphism and Gastric Cancer Risk in a Turkish Population. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012; 13(11):5875-5878.

Chao CT, Chen YC, Chiang CK, Huang JW, Fang CC, Chang CC, Yen CJ. Interplay between Superoxide Dismutase, Glutathione Peroxidase, and Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma Polymorphisms on the Risk of End-Stage Renal Disease among Han Chinese Patients. *Oxid Med Cell Longev*. 2016; 2016:1-7.

Chawla A, Schwarz EJ, Dimaculangan DD, Lazar MA. Peroxisome Proliferatoractivated Receptor (PPAR) Gamma: Adipose-Predominant Expression and Induction Early in Adipocyte Differentiation. *Endocrinology*. 1994; 135(2):798–800.

Chuang L-Y, Yang C. H, Tsui K.-H, Cheng Y-H, Chang P-L, Wen C-H, Chang H-W. Restriction Enzyme Mining for SNPs in Genomes. *Anticancer Res*. 2008, 28:2001-2007.

Corrales P, Vidal-Puig A, Medina-Gómez G. PPARs and Metabolic Disorders Associated with Challenged Adipose Tissue Plasticity. *Int J Mol Sci*. 2018a; 19(7):1-16.

Corrales P, Izquierdo-Lahuerta A, Medina-Gómez G. Maintenance of Kidney Metabolic Homeostasis by PPAR Gamma. *Int J Mol Sci.* 2018b;19(7):2-12.

Conceição LL, Dias MM, Pesseo MC, Pena GD, Mendes MC, Neves CV, Hermsdorff HH, Freitas RN, Peluzio MD. Difference in Fatty Acids Composition of Breast Adipose Tissue in Women with Breast Cancer and Benign Breast Disease. *Nutr Hosp.* 2016; 33(6):1354-1360.

Condit CM, Achter PJ, Lauer I, Sefcovic E. The Changing Meanings of Mutation: A Contextualized Study of Public Discourse. *Hum Mutat.* 2002, 19:69-75.

Cui X, Yan H, Ou TW, Jia CS, Wang Q, Xu JJ. Genetic Variations in Inflammatory Response Genes and Their Association with the Risk of Prostate Cancer. *Biomed Res Int.* 2015; 2015: 1-7.

Darcan C, Türkyılmaz O. Yeni Nesil Dizileme Teknolojisine Genel Bakış. *Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi.* 2018; 5(1): 41-49.

Daly AK, Day CP. Candidate Gene Case-Control Association Studies: Advantages and Potential Pitfalls. *Br J Clin Pharmacol.* 2001; 52(5):489-499.

Deeb SS, Fajas L, Nemoto M, Pihlajamäki J, Mykkänen L, Kuusisto J, Laakso M, Fujimoto W, Auwerx J. A Pro12Ala Substitution in PPAR γ 2 Associated with Decreased Receptor Activity, Lower Body Mass Index and Improved Insulin Sensitivity. *Nat Genet.* 1998;20(3):284–287

Dhaini HR, Daher Z. Genetic Polymorphisms of PPAR Genes and Human Cancers: Evidence for Gene-Environment Interactions. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.* 2019 May 2:1-34.

Ding S, Liu L, Zhuge QC, Yu Z, Zhang X, Xie J, Hong W, Wang S, Yang Y, Chen B. The Meta-Analysis of the Association of PPARG P12A, C161T Polymorphism and Coronary Heart Disease. *Wien Klin Wochenschr.* 2012; 124(19-20):671-677.

Ding J, Zhu C, Mei X, Zhou Y, Feng B, Guo Z. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Pro12Ala Polymorphism Decrease the Risk of Diabetic Nephropathy in Type 2 Diabetes: A Meta Analysis. *Int J Clin Exp Med.* 2015; 8(5):7655-7660.

Doney A, Fischer B, Frew D, Cumming A, Flavell DM, World M, Montgomery HE, Boyle D, Morris A, Palmer CN. Haplotype Analysis of the PPAR γ Pro12Ala and C1431T Variants Reveals Opposing Associations with Body Weight. *BMC Genet.* 2002; 3: 1-8.

Dragojević J, Marc J, Mlinar B. Association between Pro12Ala and His477His Polymorphisms in PPARG Gene and Insulin Resistance in Patients with Polycystic Ovary Syndrome. *Biochemia Medica.* 2008;18(3):342–350.

Ekmekçi A, Konaç E, Önen Hİ. Gen Polimorfizmi ve Kansere Yatkınlık. *Marmara Med J.* 2008; 21(3):282-295.

Elnemr A, Ohta T, Iwata K, Ninomia I, Fushida S, Nishimura G, Kitagawa H, Kayahara M, Yamamoto M, Terada T, Miwa K. PPAR γ Ligand (Thiazolidinedione) Induces Growth Arrest and Differentiation Markers of Human Pancreatic Cancer Cells. *Int J Oncol.* 2000; 17(6):1157-1164.

Elstner E, Müller C, Koshizuka K, Williamson EA, Park D, Asou H, Shintaku P, Said JW, Heber D, Koeffler HP. Ligands for Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ and Retinoic Acid Receptor Inhibit Growth and Induce Apoptosis of Human Breast Cancer Cells in Vitro and in BNX Mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95(15):8806-8811.

Eastham LL, Mills CN, Niles RM. PPARalpha/gamma Expression and Activity in Mouse and Human Melanocytes and Melanoma Cells. *Pharm Res.* 2008; 25(6):1327-1333.

Fajas L, Auboeuf D, Raspe E, Schoonjan K, Lefebvre AM, Saladin R, Najib J, Laville M, Fruchart JC, Deebi S, Vidal-Puig A, Flier J, Briggs MR, Staels B, Vidal H, Auwerx J. The Organization, Promoter Analysis, and Expression of the Human PPAR γ Gene. *J Biol Chem.* 1997; 272(30):18779–18789.

Fang L, Zhang M, Li Y, Liu Y, Cui Q, Wang N. PPARgene: A Database of Experimentally Verified and Computationally Predicted PPAR Target Genes. *PPAR Res.* 2016, 2016:1-6.

Fareed M, Afzal M. Single Nucleotide Polymorphism in Genome-Wide Association of Human Population: A Tool for Broad Spectrum Service. *Egypt. J. Hum. Genet.* 2013; 14(2):123–134.

Fredericks E, Dealtry G, Roux S. β -Catenin Regulation in Sporadic Colorectal Carcinogenesis: Not as Simple as APC. *Can J Gastroenterol Hepatol.* 2018, 2018:1-10.

Freudlsperger C, Schumacher U, Reinert S, Hoffmann J. The Critical Role of PPARgamma in Human Malignant Melanoma. *PPAR Res.* 2008; 2008:1-5.

Gazdar AF, Gao B, Minna JD. Lung Cancer Cell Lines: Useless Artifacts or Invaluable Tools for Medical Science?. *Lung Cancer.* 2010, 68(3):309-318.

Giaginis C, Giagini A, Theocharis S. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ (PPAR- γ) Ligands as Potential Therapeutic Agents to Treat Arthritis. *Pharmacol Res.* 2009; 60(3):160–169.

Gimble JM, Pighetti GM, Lerner MR, Wu X, Lightfoot SA, Brackett DJ, Darcy K, Hollingsworth AB. Expression of Peroxisome Proliferator Activated Receptor mRNA in Normal and Tumorigenic Rodent Mammary Glands. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; 253(3):813-817.

Glass CK, Ogawa S. Combinatorial Roles of Nuclear Receptors in Inflammation and Immunity. *Nat Rev Immunol.* 2006; 6(1):44-55.

Gouda HN, Sagoo GS, Harding AH, Yates J, Sandhu MS, Higgins JP. The Association Between the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma2 (PPARG2) Pro12Ala Gene Variant and Type 2 Diabetes Mellitus: A HuGE Review and Meta-Analysis. *Am J Epidemiol.* 2010; 171(6):645–655.

Goudarzi H, Seyedjavadi SS, Fazeli M, Azad M, Goudarzi M. Genotyping of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma in Iranian Patients with Helicobacter pylori Infection. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015;16(13):5219-5223.

Goode EL, Ulrich CM, Potter JD. Polymorphisms in DNA Repair Genes and Associations with Cancer Risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2002; 11(12):1513–1530.

Günel T. Gen Anlatımının Kantitatif Analizi "Real-Time PCR". *Türkiye Klinikleri J Med Sci.* 2007;27(5):763-767.

Grygiel-Górniak B. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors And Their Ligands: Nutritional And Clinical Implications--A Review. *Nutr J.* 2014;13:2-10.

He W. PPAR γ 2 Pro12Ala Polymorphism and Human Health. *PPAR Res.* 2009; 2009:1-15.

He J, Wang L, Liu J, Liu F, Li X. A Meta-Analysis on the Association Between PPAR- γ Pro12Ala Polymorphism and Polycystic Ovary Syndrome. *J Assist Reprod Genet.* 2012; 29(7):669–677.

Heather JM, Chain B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics.* 2016; 107(1):1-8.

Hegele RA, Cao H, Frankowski C, Mathews ST, Leff T. PPARG F388L, A Transactivation-Deficient Mutant, in Familial Partial Lipodystrophy. *Diabetes.* 2002; 51(12):3586-3590.

Heikkinen S, Auwerx J, Argmann CA. PPAR γ in Human and Mouse Physiology. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1771: 999–1013.

Hou Y, Gao J, Xu H, Xu Y, Zhang Z, Xu Q, Zhang C. PPAR γ E3 Ubiquitin Ligase Regulates MUC1-C Oncoprotein Stability. *Oncogene.* 2014; 33(49):5619–5625.

Hou Y, Moreau F, Chadee K. PPAR γ Is an E3 Ligase That Induces the Degradation of NF κ B/p65. *Nat Commun.* 2012, 3:1-11.

Jain S, Pulikuri S, Zhu Y, Qi C, Kanwar YS, Yeldandi AV, Rao MS, Reddy JK. Differential Expression of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma (PPAR γ) and its Coactivators Steroid Receptor Coactivator-1 and PPAR-Binding Protein PBP in the Brown Fat, Urinary Bladder, Colon, and Breast of the Mouse. *Am J Pathol.* 1998;153 (2):349–354.

Jeninga EH, Gurnell M, Kalkhoven E. Functional Implications of Genetic Variation in Human PPAR γ . *Trends Endocrinol Metab.* 2009; 20(8):380-387.

Jiang WG, Douglas-Jones A, Mansel RE. Expression of Peroxisome-Proliferator Activated Receptor-Gamma (PPAR γ) and the PPAR γ Co-Activator,

PGC-1, in Human Breast Cancer Correlates with Clinical Outcomes. *Int J Cancer*. 2003; 106(5):752-757.

Karki R, Pandya D, Elston RC, Ferlini C. Defining “Mutation” and “Polymorphism” in the Era of Personal Genomics. *BMC Medical Genomics*. 2015, 8: 1-7.

Kliewer SA, Forman BM, Blumberg B, Ong ES, Borgmeyer U, Mangelsdorf DJ, Umesono K, Evans RM. Differential Expression and Activation of A Family of Murine Peroxisome Proliferator-Activated Receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91(15):7355–7359.

Kotta-Loizou I, Giaginis C, Theocharis S. The Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ in Breast Cancer. *Anticancer Agents Med Chem*. 2012 Nov;12(9):1025-1044.

Koumanis DJ, Christou NV, Wang XL, Gilfix BM. Pilot Study Examining the Frequency of Several Gene Polymorphisms in a Morbidly Obese Population. *Obes Surg*. 2002; 12(6):759-764.

Kravchenko NA, Iarmysh NV. Role of PPARs and Their Isoforms in Metabolic Disorders Related to Insulin Resistance and Diabetes. *Cytology and Genetics*, 2011; 45(3): 191–199.

Leader JE, Wang C, Fu M, Pestell RG. Epigenetic Regulation of Nuclear Steroid Receptors. *Biochem Pharmacol*. 2006; 72(11):1589-1596.

Lee NJ, Oh JH, Ban JO, Shim JH, Lee HP, Jung JK, Ahn BW, Yoon DY, Han SB, Ham YW, Hong JT. 4-O-Methylhonokiol, a PPAR γ Agonist, Inhibits Prostate Tumour Growth: P21-Mediated Suppression of NF- κ B Activity. *Br J Pharmacol*. 2013 Mar; 168(5): 1133–1145.

Li Y, Zhu J, Ding JQ. Association of the PPAR γ 2 Pro12Ala Polymorphism with Increased Risk of Cardiovascular Diseases. *Genet Mol Res.* 2015; 14(4):18662-18674.

Li YQ, Chen J, Yin JY, Liu ZQ, Li XP. Gene Expression and Single Nucleotide Polymorphism of ATP7B Are Associated with Platinum-Based Chemotherapy Response in Non-Small Cell Lung Cancer Patients. *J Cancer.* 2018; 9(19):3532-3539.

Liang X, Fan X, Tan K, Zhang L, Jian L, Yu L. Peroxisome Proliferators-Activated Receptor Gamma Polymorphisms and Colorectal Cancer Risk. *J Cancer Res Ther.* 2018, 14:306-310.

Lu ZH, Gu XJ, Shi KZ, Li X, Chen DD, Cehn L. Association Between Genetic Polymorphisms of Inflammatory Response Genes and the Risk of Ovarian Cancer. *J Formos Med Assoc.* 2016; 20(1):1-7.

Ma Y, Wang B, Li L, Wang F, Xia X. The Administration of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors A/ γ Agonist TZD18 Inhibits Cell Growth and Induces Apoptosis in Human Gastric Cancer Cell Lines. *J Cancer Res Ther.* 2019; 15(1):120-125.

Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM. The Nuclear Receptor Superfamily: The Second Decade. *Cell.* 1995; 83(6):835–839.

Mansoori A, Amini M, Seyedrezazadeh E, Kolahdooz F. Obesity and Pro12Ala Polymorphism of Receptor-Gamma Gene in Healthy Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Ann Nutr Metab.* 2015; 67(2):104-118.

Mansure JJ, Nassim R, Kassouf W. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma in Bladder Cancer: a Promising Therapeutic Target. *Cancer Biol Ther.* 2009; 8(7):6-15.

Mao Q, Guo H, Gao L, Wang H, Ma X. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ 2 Pro12Ala (rs1801282) Polymorphism and Breast Cancer Susceptibility: A Meta-Analysis. *Mol Med Rep.* 2013; 8(6):1773-1778.

Massagué J. G1 Cell-Cycle Control and Cancer. *Nature.* 2004; 432(7015):298-306.

Masugi J1, Tamori Y, Mori H, Koike T, Kasuga M. Inhibitory Effect of a Proline-To-Alanine Substitution at Codon 12 of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma 2 on Thiazolidinedione-Induced Adipogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 268(1):178-182.

Meirhaeghe A, Amouyel P. Impact of Genetic Variation of PPAR γ in Humans. *Mol Genet Metab.* 2004; 83(1-2):93–102.

Michalik L, Desvergne B, Wahli W. Peroxisome-Proliferator-Activated Receptors and Cancers: Complex Stories. *Nat Rev Cancer.* 2004; 4(1):61-70.

Motomura W, Okumura T, Takahashi N, Obara T, Kohgo Y. Activation of Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ by Troglitazone Inhibits Cell Growth through the Increase of p27Kip1 in Human Pancreatic Carcinoma Cells. *Cancer Res.* 2000; 60(19):5558–5564.

Mueller E, Drori S, Aiyer A, Yie J, Sarraf P, Chen H, Hauser S, Rosen ED, Ge K, Roeder RG, Spiegelman BM. Genetic Analysis of Adipogenesis through Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ Isoforms. *J Biol Chem.* 2002; 277(44): 41925-41930.

Myakishev MV¹, Khripin Y, Hu S, Hamer DH. High-Throughput SNP Genotyping by Allele-Specific PCR with Universal Energy-Transfer-Labeled Primers. *Genome Res.* 2001 Jan;11(1):163-9.

Myers TW, Gelfand DH. Reverse Transcription and DNA Amplification by a *Thermus Thermophilus* DNA Polymerase. *Biochemistry.* 1991; 30(31):7661-7666.

Osawa E, Nakajima A, Wada K, Ishimine S, Fujisawa N, Kawamori T, Matsushita N, Kadowaki T, Ochiai M, Sekihara H, Nakagama H. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Ligands Suppress Colon Carcinogenesis Induced by Azoxymethane in Mice. *Gastroenterology.* 2003; 124(2):361–367.

Paltoo D, Woodson K, Taylor P, Albanes D, Virtamo J, Tangrea J. Pro12Ala Polymorphism In the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma (PPAR-Gamma) Gene and Risk of Prostate Cancer Among Men in a Large Cancer Prevention Study. *Cancer Lett.* 2003; 191(1):67-74.

Ramírez-Bello J, Jiménez-Morales M. Functional Implications of Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) in Protein-Coding and Non-Coding RNA Genes in Multifactorial Diseases. *Gac Med Mex.* 2017; 153(2):218-229.

Ristow M, Müller-Wieland D, Pfeiffer A, Krone A, Kahn CR. Obesity Associated with A Mutation in A Genetic Regulator of Adipocyte Differentiation. *N Engl J Med.* 1998; 339(14):953-959.

Saifullah, Tsukahara T. Genotyping of Single Nucleotide Polymorphisms Using the SNP-RFLP Method. *Biosci Trends.* 2018; 12(3):240–246.

Sato H, Ishihara S, Kawashima K, Moriyama N, Suetsugu H, H Kazumori, Okuyama T, MAK Rumi, Fukuda R, Nagasue N ve Kinoshita Y. Expression of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) γ in Gastric Cancer and Inhibitory Effects of PPAR γ Agonists. *Br J Cancer.* 2000; 83(10): 1394–1400.

Savage DB, Agostini M, Barroso I, Gurnell M, Luan J, Meirhaeghe A, Harding AH, Ihrke G, Rajanayagam O, Soos MA, George S, Berger D, Thomas EL, Bell JD, Meeran K, Ross RJ, Vidal-Puig A, Wareham NJ, O'Rahilly S, Chatterjee VK, Schafer AJ. Digenic Inheritance of Severe Insulin Resistance in a Human Pedigree. *Nat Genet.* 2002; 31(4):379-384.

Seçer S, Özden A, Güllüoğlu Ş, Ekinci FY. Diyetle İlişkili Hastalıkların Önlenmesi ve Hayat Kalitesinin İyileştirilmesi için Genotiplemeye Dayalı Kişiyeye Özel Beslenme. *Akademik Gıda.* 2011; 9(4): 51-59.

Segawa Y, Yoshimura R, Hase T, Nakatani T, Wada S, Kawahito Y, Kishimoto T, Sano H. Expression of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) in Human Prostate Cancer, *Prostate.* 2002; 51(2):108-116.

Seifabadi S, Vaseghi G, Ghannadian M, Haghjooy Javanmard S. Standardized Punica Granatum Pericarp Extract, Suppresses Tumor Proliferation and Angiogenesis in a Mouse Model of Melanoma: Possible Involvement of PPAR α and PPAR γ Pathways. *Iran J Pharm Res.* 2019;18(1):348-357.

Tachibana K, Yamasaki D, Ishimoto K, Doi T. The Role of PPARs in Cancer. *PPAR Res.* 2008; 2008: 1-15.

Takahashi N, Okumura T, Motomura W, Fujimoto Y, Kawabata I, Kohgo Y. Activation of PPAR γ Inhibits Cell Growth and Induces Apoptosis in Human Gastric Cancer Cells. *FEBS Lett.* 1999; 455(1-2):135-139.

Tang ST, Wang CJ, Tang HQ, Peng WJ, Wang YM, Zhang Q. Association of Pro12Ala Polymorphism in Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma with Polycystic Ovary Syndrome: A Meta-Analysis. *Mol Biol Rep.* 2012, 39(10):9649–9660.

Terashita Y, Sasaki H, Haruki N, Nishiwaki T, Ishiguro H, Shibata Y, Kudo J, Konishi S, Kato J, Koyama H, Kimura M, Sato A, Shinoda N, Kuwabara Y, Fujii Y. Decreased Peroxisome Proliferator-activated Receptor Gamma Gene Expression is Correlated with Poor Prognosis in Patients with Esophageal Cancer. *Jpn J Clin Oncol*. 2002; 32(7):238–243.

Utine CA, Utine GC. Oftalmolojide Genetik I – Temel Kavramlar. *TJO*. 2012; 42; 5: 370-377.

Thomas K, Sung DY, Chen X, Thompson W, Chen YE, McCarrey J, Walker W, Griswold M. Developmental Patterns of PPAR and RXR Gene Expression During Spermatogenesis. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2011;3:1209-1220.

Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. Stimulation of Adipogenesis in Fibroblasts by PPAR γ 2, a Lipid-Activated Transcription. *Cell*. 1994; 79(7):1147–1156.

Tontonoz P, Spiegelman BM. Fat and Beyond: The Diverse Biology of PPAR γ . *Annu Rev Biochem*. 2008, 77:289-312.

Tsubouchi Y, Sano H, Kawahito Y, Mukai S, Yamada R, Kohno M, Inoue KI, Hla T, Kondo M. Inhibition of Human Lung Cancer Cell Growth by the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ Agonists Through Induction of Apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000; 270(2):400–405.

Varga T, Czimmerer Z, Nagy L. PPARs Are A Unique Set of Fatty Acid Regulated Transcription Factors Controlling Both Lipid Metabolism and Inflammation. *Biochim Biophys Acta*. 2011; 1812(8):1007-1022.

Vogel U, Christensen J, Nexø BA, Wallin H, Friis S, Tjønneland A. Peroxisome Proliferator-Activated [Corrected] Receptor-Gamma2 [Corrected] Pro12Ala, Interaction with Alcohol Intake and NSAID Use, in Relation to Risk of Breast Cancer in A Prospective Study of Danes. *Carcinogenesis*. 2007;28(2):427-434.

Wang CC, Chen CA1, Jong YJ, Kou HS. Specific Gene Capture Combined with Restriction-Fragment Release for Directly Fluorescent Genotyping of Single-Nucleotide Polymorphisms in Diagnosing Spinal Muscular Atrophy. *Anal Chem.* 2018; 90(19):11599-11606.

Wang T, Xu J, Yu X, Yang R, Han ZC. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma in Malignant Diseases. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2006;58(1):1-14.

Wang X, Kilgore MW. Signal Cross-Talk Between Estrogen Receptor Alpha and Beta and the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma1 in MDA -MB-231 and MCF-7 Breast Cancer Cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2002; 194(1-2):123-133.

Wang L, Wenting X, Wang X. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Pro12Ala Polymorphism and the Risks of Gestational Diabetes Mellitus an Updated Meta-Analysis of 12 Studies. *Medicine (Baltimore).* 2016; 95(44):1-7.

Willson TM, Brown PJ, Sternbach DD, Henke BR. The PPARs: From Orphan Receptors to Drug Discovery. *J Med Chem.* 2000; 43(4):527-550.

Wu MH, Chu CH, Chou YC, Chou WY, Yang T, Hsu GC, Yu CP, Yu JC, Sun CA. Joint Effect of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Genetic Polymorphisms and Estrogen-Related Risk Factors on Breast Cancer Risk: Results from a Case-Control Study in Taiwan. *Breast Cancer Res Treat.* 2011;127(3):777-784.

Xita N, Lazaros L, Georgiou I, Tsatsoulis A. The Pro12Ala Polymorphism of the PPAR-gamma Gene Is not Associated with the Polycystic Ovary Syndrome. *Hormones (Athens).* 2009;8(4):267- 272.

Xu W, Li Y, Wang X, Chen B, Liu S, Wang Y, Zhao W, Wu J. PPARgamma Polymorphisms and Cancer Risk: a Meta-analysis Involving 32,138 Subjects. *Oncol Rep.* 2010; 24(2):579-585.

Yang J, Gong H, Liu W, Tao T. The Association of Pro12Ala Polymorphism in the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma2 Gene with the Metabolic Characteristics in Chinese Women with Polycystic Ovary Syndrome. *Int J Clin Exp Pathol*. 2013; 6(9):1894-1902.

Yang W, Wang J, Ye W, Li X. Quantitative Evaluation of PPAR γ 2 Pro12Ala Polymorphism with Hypertension. *Herz*. 2017; 43(8):719-727.

Yen C-J, Beamer BA, Negri C, Silver K, Brown KA, Yarnall DP, Burns DK, Roth J, Shuldiner AR. Molecular Scanning of the Human Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ (hPPAR γ) Gene in Diabetic Caucasians: Identification of a Pro12Ala PPAR γ 2 Missense Mutation. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997; 241(2):270–274.

Yousefnia S, Momenzadeh S, Forootan FS, Ghaedi K, Nasr Esfahani MH. The Influence of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ (PPAR γ) Ligands on Cancer Cell Tumorigenicity. *Gene*. 2018; 649:14-22.

Yun SH, Han SH, Park JI. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ and PGC-1 α in Cancer: Dual Actions as Tumor Promoter and Suppressor. *PPAR Res*. 2018; 1-12.

Zafari V, Hashemzadeh S, Feizi MH, Pouladi N, Zadeh LR, Sakhinia E. mRNA Expression of Nuclear Factor of Activated T-cells, Cytoplasmic 2 (NFATc2) and Peroxisome Proliferator-activated Receptor Gamma (PPARG) Transcription Factors in Colorectal Carcinoma. *Bosn J Basic Med Sci*. 2017; 17(3):255-261.

Zhang C, Liu Y, Ring BZ, Nie K, Yang M, Wang M, Shen H, Wu X, Ma X. A Novel Multiplex Tetra-Primer ARMS-PCR for the Simultaneous Genotyping of Six Single Nucleotide Polymorphisms Associated with Female Cancers. *Plos One*. 2013; 8(4):1-8.

Zhao J, Zhi Z, Song G, Wang J, Wang C, Ma H, Yu X, Sui A, Zhang H. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma Pro12Ala Polymorphism Could be a Risk Factor for Gastric Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015; 16(6):2333-2340.



EKLER

EK 1: ÖZGEÇMİŞ

Adı	Hatice	Soyadı	Kurnaz
Doğum yeri	Erzurum	Doğum Tarihi	29.12.1994
Tel	0507 104 31 29	E-mail	haticekurnz@gmail.com

Eğitim Durumu

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Lisans	Haliç Üniversitesi	2016
Lise	Atilla Uras Lisesi	2012

Yabancı Dil Sınav Puanı

Yökdil
68,750

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	76,72094	76,04932	74,30404

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office Programları (Word, Excel, Power Point, Outlook)	İyi

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
¹ Teknik Akademik Personel	Haliç Üniversitesi	2016-Halen

EK 2: ETİK KURUL ONAYI



T. C.
İSTANBUL BİLİM ÜNİVERSİTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Sayı : 44140529 / 2018- 11497
Konu : Tez çalışması

21.11.2018

Sayın
Dr. Öğr. Üyesi Hande KOÇAK
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Aşağıda belirtilen çalışmanız 20.11.2018 tarihli Üniversitemiz Klinik Araştırmaları Etik Kurulu toplantısında incelenmiş, çalışmanın yapılmasında etik ve bilimsel açıdan bir sakınca olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir. Kurul kararı ilişikte sunulmuştur.

Gereğini bilgilerinize saygularım ile rica ederim.

Prof. Dr. Berrin TELATAR
Başkan

Çalışmanın Adı: "İnsan Kanser Hücre Hatlarında Peroksizom Proliferatör ile Etkileşen Reseptör Gamma Genindeki Pro12A1a Polimorfizminin Araştırılması" başlıklı tez çalışması.

Sorumlu Araştırmacı: Dr. Öğr. Üyesi Hande KOÇAK İstanbul Bilim Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Diğer Araştırmacılar: Hatice KURNAZ İstanbul Bilim Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı Öğrencisi

Proje İle İlgili Temas Kurulacak Kişi: Dr. Öğr. Üyesi Hande KOÇAK İstanbul Bilim Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Merkez sayısı: Tek merkez



T. C.
İSTANBUL BİLİM ÜNİVERSİTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

İstanbul Bilim Üniversitesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu

Karar No: 20.11.2018/2018-16-04

Çalışmanın Adı: "İnsan Kanser Hücre Hatlarında Peroksizom Proliferatör ile Etkileşen Reseptör Gamma Genindeki Pro12Ala Polimorfizminin Araştırılması" başlıklı tez çalışması.

Sorumlu Araştırmacı: Dr. Öğr. Üyesi Hande KOÇAK İstanbul Bilim Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Başkan
Prof. Dr. Berrin TELATAR

Başkan Yardımcısı/Vekili
Doktor Öğretim Üyesi Hande KAYMAKÇALAN ÇELEBİLER

Raportör
Doktor Öğretim Üyesi Bahar ERBAŞ

Üye
Prof. Dr. Reyhan DİZ KÜÇÜKKAYA

Üye
Prof. Dr. Işın BARAN KULAKSIZOĞLU

Üye
Prof. Dr. Tufan PAKER

Üye
Doç. Dr. Hayriye VEHİD

Üye
Doktor Öğretim Üyesi Suzan BOZKURT

Üye
Doç. Dr. Oytun ERBAŞ

Üye
Av. Özlem ÖZTÜRK

Üye
Cafer KILIÇ

Karar Bilgileri: İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.

EK 3: TEZ ÇALIŞMASI İZİN YAZILARI



T. C.
İSTANBUL BİLİM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

SAYI : 50400462/40052
KONU: Tez çalışması hk.

TARİH : 22/10/2018

T.C. İSTANBUL BİLİM ÜNİVERSİTESİ
MULTİDİSİPLİNER ARAŞTIRMA LABORATUVARI SORUMLUSU'NA,

Istanbul Bilim Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Hatice KURNAZ'ın "İnsan Kanseri Hücre Hatlarında Peroksizom Proliferatör ile Etkileşen Reseptör Gamma Genindeki Pro12Ala Polimorfizminin Araştırılması" başlıklı tez çalışmasını gerçekleştirebilmesi için müsaadelerinizi saygılarımla rica ederim.

Prof. Dr. Vildan KARPUZ
Müdür



T. C.
İSTANBUL BİLİM ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

SAYI : 99007275-05
KONU: Hatice KURNAZ'ın Laboratuvar kullanımı hk.

TARİH :22/10/2018

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

22. 10. 2018 tarihli yazıya istinaden Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programında öğrenciniz Hatice KURNAZ'ın "**İnsan Kanseri Hücre Hatlarında Peroksizom Proliferatör ile Etkileşen Reseptör Gamma Genindeki Pro12A1a Polimorfizminin Araştırılması**" başlıklı tez çalışmasını yapabilmesi için Multidisipliner Laboratuvarın tarafından kullanılması için herhangi bir sakınca yoktur.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

Prof. Dr. Canan HURDAĞ
Multidisipliner Laboratuvar sorumlusu