



İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI

**TMEM97'nin (Transmembran Protein 97) Kanseri
Hücrelerinde Kolesterol Metabolizmasının
Düzenlenmesindeki Rolünün Araştırılması**

Yüksek Lisans Tezi

Yahya Yozbatıran

Mayıs 2023



İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI

**TMEM97'nin (Transmembran Protein 97) Kansere
Hücrelerinde Kolesterol Metabolizmasının
Düzenlenmesindeki Rolünün Araştırılması**

Yüksek Lisans Tezi

Yahya Yozbatıran

Danışman

Doç. Dr. Burcu Yücel

Mayıs 2023

TEZ JÜRİSİ ONAYI

Yahya YOZBATIRAN tarafından hazırlanan "TMEM97'nin (Transmembran Protein 97) Kanser Hücrelerinde Kolesterol Metabolizmasının Düzenlenmesindeki Rolünün Araştırılması" başlıklı bu Yüksek Lisans Tezi, Moleküler Tıp Anabilim Dalı'nda hazırlanmış ve jürimiz tarafından kabul edilmiştir.

JÜRİ ÜYELERİ

İMZA

Tez Danışmanı:

Doç. Dr. Burcu YÜCEL
İstanbul Medeniyet Üniversitesi

Üyeler:

Prof. Dr. Berna DEMİRCAN TAN
İstanbul Medeniyet Üniversitesi

Prof. Dr. Uygur Halis TAZEYAY
Gebze Teknik Üniversitesi

Tez Savunma Tarihi: 05/06/2023

BEYANLAR

Yazım ve Kaynak Gösterme Kılavuzu Beyanı

Danışmanlığımda yazılan bu tezin Vancouver yazım ve kaynak gösterme kılavuzunda belirtilen kurallara uygun olarak yapılandırıldığı ve bu kılavuzun Vancouver kaynak gösterme standartlarının bu tezde tutarlı olarak uygulandığı tarafımdan incelenerek teyit edilmiştir.

Doç. Dr. Burcu Yücel

Etik İlkeler Sadakat Beyanı

Hazırladığım bu tezin tamamen kendi çalışmam olduğunu, akademik ve etik kuralları gözeterek çalıştığımı ve her alıntıya kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

Yahya Yozbatıran

ÖZET

TMEM97'nin (Transmembran Protein 97) Kansere Hücresinde Kolesterol Metabolizmasının Düzenlenmesindeki Rolünün Araştırılması

Yozbatıran, Yahya

Yüksek Lisans Tezi, Moleküler Tıp Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Burcu Yücel

Mayıs 2023

Kanser hücrelerinde metabolik yollar enerji (ATP) üretimini artıracak şekilde yeniden düzenlenir. Hücrelerdeki bu metabolik değişiklikler tümör çevresi tarafından uyarılmaktadır. Kanser hücreleri yaşamaları ve çoğalmaları için bu metabolik değişikliklere bağımlıdır. Metabolizmada pek çok yolağın temel bileşenleri çok iyi tanımlanmasına rağmen, tümör besin çevresine bağlı olarak hücre içerisinde metabolitlerin akışının nasıl düzenlendiği henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Ayrıca kanser hücrelerinin düşük besin miktarlarında gösterdikleri metabolik değişiklikler çok iyi bilinmemektedir.

Kolesterol bir non-esansiyel metabolittir. Kolesterol biyosentezi, enerji gerektiren bir anabolik olay olduğundan hücre içi kolesterol seviyesindeki değişikliğe bağlı olarak aktive edilir. Yeni gelişen genomik/proteomik araçlarla yapılan sistematik çalışmalar regülasyonunda rolü olabilecek yeni proteinlerin tanımlanmasına yardımcı olmuştur. TMEM97 (Transmembran protein 97) geni bu genlerden biri olup, kolesterol metabolizmasında rol alan genler ile birlikte eksprese olduğu gösterilmiştir.

Çalışmamızda, literatür ve veri tabanları analizi doğrultusunda TMEM97'nin kanser kolesterol metabolizmasının düzenlenmesindeki rolünü araştırmak amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda TMEM97'nin kanser hücrelerinin kolesterol yokluğuna verdikleri yanıtta rolünü, kolesterol metabolizmasının düzenlenmesindeki fonksiyonunu hem in vivo hem de in vitro inceledik.

Bulgularımız TMEM97 KO (susturulmuş) yapılmış HGC27 hücrelerinde kolesterol regülasyonunda rol alan düşük yoğunluklu lipoprotein (LDLR), skualen epoksidaz (SQLE) ve 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A (HMG-KoA) redüktaz (HMGCR) ekspresyon seviyelerinin lipoprotein içermeyen besiyerinde değiştiğini gösterdi. TMEM97 eksprese etmeyen hücrelerin kolesterol içermeyen besiyerinde eksprese eden hücrelere kıyasla daha az çoğaldığını gösterdi. Ayrıca TMEM97 baskılanmış hücrelerde, lipoprotein içermeyen ortamda kolesterol alımının daha çok olduğu gösterildi. TMEM97 KO hücrelerde lipoprotein içermeyen besiyerinde toplam hücresel kolesterol miktarının düştüğünü

belirledik. Xenograft deneyinde TMEM97 baskılanmış hücrelerden gelişen tümörlerin daha küçük hacime ve ağırlığa sahip olduğu gözlemlendi. Tümörlerde yapılan immünohistokimyasal analizler TMEM97 baskılanmış hücrelerde apoptozun daha yüksek olduğunu, proliferasyon belirteci Ki67 skorunun ve nekrozun ise daha düşük olduğunu gösterdi. Ayrıca immün boyamalar sterol düzenleyici element bağlayıcı protein 1 (SREBP1), sterol düzenleyici element bağlayıcı protein 2 (SREBP2) proteinleri TMEM97 susturulmuş tümör gruplarında daha düşük oranda, LDLR ve SQLE proteinlerinin ise daha yüksek oranda bulunduğunu gösterdi. Sonuç olarak TMEM97'nin kolesterol metabolizmasının düzenlenmesinde rolü olduğunu ve mide kanseri hücrelerinde onkojenik aktiviteye sahip olduğunu gösterdik.

Anahtar Sözcükler: Kanser metabolizması, TUNEL, Dil-LDL, Kolesterol, TMEM97

ABSTRACT

Investigation of the Role of TMEM97 (Transmembrane Protein 97) in the Regulation of Cholesterol Metabolism in Cancer Cells

Yozbatıran, Yahya

Master's Thesis, Department of Molecular Medicine

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Burcu Yücel

May 2023

Metabolic pathways are rewired in cancer cells toward fueling biosynthetic processes while maintaining sufficient ATP production to support cell proliferation and survival. Many cancer cells are dependent on these changes in metabolism. While the core components of most pathways of intermediary metabolism have long been described, it remains poorly understood how the flow of metabolites is rewired in cancer cells in the tumor microenvironment. Particularly, the metabolic dependencies of cancer cells to low nutrient levels is not well understood as it requires systematic approaches.

Cholesterol is a non-essential metabolite. The biosynthesis of cholesterol is an energy-consuming anabolic process that is activated in response to changes in cellular cholesterol levels. Systematic studies employing novel genomic/proteomic tools have aided in the identification of new proteins that may play a role in its regulation. Among these genes is TMEM97 (Transmembrane protein 97), which has been shown to be co-expressed with genes involved in cholesterol metabolism.

The objective of our study was to investigate the role of TMEM97 in regulating cancer cholesterol metabolism through literature review and database analysis. To accomplish this goal, we examined the role of TMEM97 in the response of cancer cells to cholesterol depletion and its function in the regulation of cholesterol metabolism, both in vivo and in vitro.

Our findings demonstrated that the expression levels of low-density lipoprotein receptor (LDLR), squalene epoxidase (SQLE), and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase (HMGCR), which are involved in cholesterol regulation, were altered in TMEM97 knockout HGC27 cells cultured in lipoprotein-deficient medium. TMEM97-deficient cells exhibited reduced proliferation compared to cells expressing TMEM97 in lipoprotein-deficient medium. TMEM97 knockout cells exhibited reduced proliferation compared to cells expressing TMEM97 in a lipoprotein-deficient medium. Furthermore, TMEM97 knockout cells showed increased cholesterol uptake in the absence of

lipoproteins. We determined that the total cellular cholesterol content decreased in TMEM97 knockout cells cultured in the lipoprotein-deficient medium. In xenograft experiments, tumors derived from TMEM97 knockout cells displayed smaller volume and weight. Immunohistochemical analysis of the tumors revealed increased apoptosis and decreased Ki67 score and necrosis in TMEM97 knockout cells. Additionally, immunostaining showed lower levels of sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP1) and sterol regulatory element-binding protein 2 (SREBP2) proteins and higher levels of LDLR and SQLE proteins in TMEM97 knockout tumor groups. We have demonstrated that TMEM97 plays a role in the regulation of cholesterol metabolism and exhibits oncogenic activity in gastric cancer cells.

Keywords: Cancer Metabolism, TUNEL, Dil-LDL, Cholesterol, TMEM97

TEŞEKKÜR

Lisans eğitiminden itibaren yanında çalıştığım, bilgi ve tecrübeleriyle bana daima yol gösteren, beni hem bilimsel hem de akademik anlamda yetiştiren, bana ne kadar düşsem de yeniden kalkmayı ve asla pes etmemeyi öğreten ve çalışmalarım için iyi bir laboratuvar ortamı sunan danışmanım Doç. Dr. Burcu YÜCEL'e

Laboratuvarda çalışmaya başladığım günden itibaren bana her konuda yardımcı ve destek olan yüksek lisans süresince hem ders hem de tez dönemimde motivasyonumu toplamamı sağlayan, çalışmalarımda tökezlediğimde pozitif kalmama yardımcı olan Tıbbi Biyokimya ABD. Arş. Gör. Saniye KOÇ ADA'ya

Hayvan çalışmalarında benden engin tecrübesini esirgemeyen gerek yaptığım deneylerde gerekse uluslararası staj başvurularımda her daim yanımda olan, öğretme konusundaki cömertliğiyle ve vizyonunun genişliği ile kendimi geliştirmemde büyük etkisi olan Öğr. Gör. Andaç KILIÇKAP'a

Yüksek lisansa başladığım günden beri benden yardımlarını esirgemeyen, yaptığım çalışmalarda çok yönlü düşünmemi sağlayan, bana örnek olan Dr. Serkan YAMAN'a

Deneylerimde ve çalışmalarımda benden yardımlarını ve anlayışını esirgemeyen Ahsen Merve BAYRAK'a

Yüksek lisans hayatım boyunca benden manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen umutsuzluğa kapıldığım anlarda, kötü günlerimde her zaman yanımda olan Hale POLAT'a

Bu tez kapsamında yapılan in vivo deneylerin immünohistokimyasal analizleri aşamasında verdiği desteklerden ötürü hocalarım Dr. Öğr. Üyesi Elif GELENLİ DOLANBAY ve Arş. Gör. Halil İbrahim SAYGI'ya

Bu tez kapsamında yaptığım deneylerde, gerekli cihazların kullanımı konusunda kolaylık sağladıkları ve bu cihazları kullanımda verdikleri destek için İstanbul

Medeniyet Üniversitesi Bilim ve İleri Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi
(BİLTAM) yönetim kadrosuna

Eğitim hayatım boyunca benden maddi ve manevi desteklerini hiç esirgemeyen,
tökezlediğim anlarda bana yol gösteren annem Müzeyyen YOZBATIRAN'a,
attığım her adımda yanımda olan ve bana her türlü imkânı sunan babam
Mehmet YOZBATIRAN'a, bana hem dost hem de yoldaş olan ağabeyim
Muhammet YOZBATIRAN'a ve her zaman desteklerini hissettiğim Hümeysra ve
Reyyan YOZBATIRAN'a tüm kalbimle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	i
SİMGELER VE KISALTMALAR	iv
TABLO LİSTESİ	viii
ŞEKİL LİSTESİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kanser	3
2.2. Kolesterol Metabolizması	3
2.3. Kolesterol Metabolizmasının Düzenlenmesi	5
2.4. TMEM97	7
2.5. TMEM97'nin Karsinogenezdeki Rolü	8
2.6. TMEM97'nin İlaç Geliştirilmesindeki Rolü	9
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	10
3.1. Gereçler	10
3.1.1. Kimyasallar	10
3.1.2. Kitler	13
3.1.3. Cihazlar	15
3.1.4. Sarf Malzemeler	17
3.1.5. Solüsyonlar	18
3.1.5.1. Western Blotlama Solüsyonları	18
3.2. Yöntem	21
3.2.1. Hücre Kültürü	21
3.2.2. Hücre Sayımı	22
3.2.3. Kolesterol Deplesyonu.....	22
3.2.4. Hücre Canlılığının ATP Seviyesinin Ölçülmesi ile Belirlenmesi	22
3.2.5. Kolesterol Uptake Assay.....	23
3.2.5.1. Dil-LDL Assay.....	23
3.2.5.2. NBD-Kolesterol Uptake Assay	23
3.2.6. RNA İzolasyonu	24
3.2.7. cDNA Sentezi.....	24
3.2.8. qRT-PCR.....	25

3.2.9.	Protein İzolasyonu	26
3.2.10.	Western Blotlama	27
3.2.11.	TMEM97 Susturulmuş Hücre Hatlarının Eldesi	27
3.2.11.1.	TMEM97 KO için CRISPR/Cas9 Plazmitlerinin Hazırlanması	27
3.2.11.2.	Virüs Üretimi ve Transfeksiyon	30
3.2.11.3.	Tek Hücre Klonlama Yöntemiyle TMEM97 KO Hücrelerin Tespiti	31
3.2.12.	Plazmid izolasyonu (Miniprep)	31
3.2.13.	Hücrelerde Total Kolesterol Ölçümü.....	32
3.2.14.	Xenograft.....	32
3.2.15.	Tümör Dokularının Toplanması	33
3.2.16.	Hematoksilen & eozin ve İmmunohistokimya	33
3.2.17.	TUNEL Assay	34
3.2.18.	İstatistiksel Hesaplamalar.....	35
4.	BULGULAR	35
4.1.	TMEM97 Geninin HGC27 Hücrelerinde CRISPR/Cas9 ile Susturulması	35
4.2.	TMEM97 Ekspresyon Düzeyi Farklı Hücrelerde Kolesterol Biyosentezinde Rol Alan Anahtar Genlerin Ekspresyonlarının qRT-PCR ile Belirlenmesi	36
4.3.	Kolesterol Uptake'in Belirlenmesi	38
4.3.1.	Dil-LDL Assay	38
4.3.2.	NBD-Kolesterol Assay	38
4.4.	LPDS'li Besiyerinde TMEM97 KO Hücrelerin Proliferasyonunun Belirlenmesi	39
4.5.	TMEM97 KO Hücrelerde Amplex Red Kolesterol Assay ile Total Kolesterol Ölçümü	40
4.6.	Xenograft.....	41
4.6.1.	TMEM97'nin Tümör Gelişimindeki Etkisi	41
4.6.2.	Tümör Kesitlerinde Nekrotik Alan Tespiti	42
4.6.3.	TMEM97'nin Apoptoz Üzerindeki Etkisi.....	43
4.6.4.	Tümör Kesitlerinde İmmunohistokimyasal Analiz.....	44
5.	TARTIŞMA	50
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER	55

KAYNAKÇA	57
----------------	----

SİMGELER VE KISALTMALAR

AGS	Adenokarsinom mide hücresi
AKT	Protein kinaz B
APS	Amonyum persülfat
ATP	Adenozin trifosfat
ATPaz	Adenozin trifosfataz
BCA	Bikinkoninik asit
CCLE	Kanser hücre hattı ansiklopedisi
cDNA	Tamamlayıcı DNA
CO₂	Karbondioksit
CRISPR	Düzenli aralıklı bölünmüş palindromik tekrar kümeleri
CTRL	Kontrol
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
dH₂O	Distile su
DiI-LDL	3,3'-Dioktadesilindokarbosiyanin-LDL
DMEM	Dulbecco'nun modifiye edilmiş Eagle medyumunu
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
dUTP	2'-deoksiüridin, 5'-trifosfat
EBP	Emopamil bağlayıcı protein
ECL	Artırılmış kemilüminesans
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
ER	Endoplazmik retikulum
EXPERA	Genişletilmiş EBP süperailesi
FBS	Fetal bovin serum
FITC	Floresein izotiyosiyanat

Gp78	Glikoprotein 78
gRNA	Rehber RNA
H&E	Hematoksilen & Eozin
H₂O	Su
HCl	Hidroklorik asit
HDL	Yüksek yoğunluklu lipoprotein
HEK293	İnsen embriyonik böbrek hücresi
HEPES	Hidroksietilpiperazin etan sülfonik asit
HGC27	İnsan gastrik karsinom hücresi
HMG-CoA	3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A
HMGCR	HMG-CoA redüktaz
HRP	Yabanturpu peroksidaz enzimi
IHC	İmmünohistokimya
INSIG	İnsülin ile indüklenen gen
INSIG-1	İnsülin ile indüklenen gen 1
INSIG-2	İnsülin ile indüklenen gen 2
KO	Susturulmuş
L	Litre
LB	Luria sıvı besiyeri
LDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein
LDLR	LDL reseptörü
LPDS	Lipoprotein eksik serum
MAC30	Meninjiyom ilişkili protein
ml	Mililitre
mM	Milimolar
mTOR	Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi
MVA	Mevalonat
NaCl	Sodyum klorür

NaOH	Sodyum hidroksit
NBD	Nitrobenzoxadiazole
NP40	Nonyl phenoksipoliethoksiletanol
NPC1	Niemann Pick hastalığı tip c 1 proteini
OH	Hidroksil
PBS	Fosfat tamponlu salin
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
Pen/Strep	Penisilin/Streptomisin
pH	Hidrojen potansiyeli
PI3K	Fosfatidilinositol 3-kinaz
PNK	Polinükleotit kinaz
PVDF	Polivinilidin florür
qRT-PCR	Kantitatif gerçek zamanlı ters transkripsiyon PCR
RIPA	Radyo immünopresipitasyon tayini
RNA	Ribonükleik asit
RNAseq	RNA dizileme
RPLP0	60S asidik ribozomal protein P0
RPM	Dakikadaki devir sayısı
SCAP	SREBP kesimini aktive eden protein
SD	Standart sapma
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	SDS- poliakrilamid jel elektroforezi
SEM	Standart hata
sgRNA	Tek kılavuzlu RNA
siRNA	Küçük engelleyici RNA
SMO	Smoothened
SOC	Süper optimal broth
SQLE	Skualen epoksidaz

SRE-1	Sterol düzenleyici element bağlayıcı protein 1
SREBP	Sterol düzenleyici element bağlayıcı protein
SREBP1	Sterol düzenleyici element bağlayıcı protein 1
SREBP2	Sterol düzenleyici element bağlayıcı protein 2
TBS-T	%0,1 Tween'li tris tamponlu salin
TdT	Terminal deoksinükleotidil transferaz
TEMED	Tetrametiletildiamin
TMEM97	Transmembran protein 97
TP53	Tümör protein 53
TUNEL	TdT dUTP Nick uç etiketleme
U	Enzim ünitesi
UBC7	E2 ubikitin konjuge enzim
UDG	Urasil DNA glikozilaz
UV	Ultraviyole
VCP	Valosin içeren protein
VLDL	Çok düşük yoğunluklu lipoprotein
xg	Bağıl merkezkaç kuvveti
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar
µm	Mikron
18FDG-PET	Florodeoksiglukoz pozitron emisyon tomografisi

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Çalışmada kullanılan Kimyasallar.....	10
Tablo 2. Çalışmada kullanılan Kitler.....	13
Tablo 3. Çalışmada kullanılan Cihazlar.....	15
Tablo 4. Çalışmada kullanılan Sarf Malzemeler.....	17
Tablo 5. 5x Protein yükleme boyası (22.5 ml, pH 6,8).....	18
Tablo 6. %10 IGEPAL CA-630 (100 ml).....	18
Tablo 7. 0,5 M EDTA (100 ml, pH 8,0).....	18
Tablo 8. 0,5 M HEPES (500 ml, pH 7,4).....	19
Tablo 9. RIPA protein izolasyonu lizis solüsyonu (250 ml).....	19
Tablo 10. 10X SDS jel yürütme solüsyonu (1 L).....	19
Tablo 11. 10X TBS-T yıkama solüsyonu (1 L, pH 7,6).....	20
Tablo 12. Transfer tampon solüsyonu (1,5 L).....	20
Tablo 13. Bloklama & antikor dilüsyon solüsyonu (100 ml).....	20
Tablo 14. Membran yeniden kazanım solüsyonu (50 ml).....	21
Tablo 15. Çalışmada kullanılan Hücre hatları.....	21
Tablo 16. Deney ve kontrol gruplarının besiyeri içeriği.....	22
Tablo 17. cDNA sentezi için kullanılan kitin protokolü.....	25
Tablo 18. qRT-PCR için kullanılan kitin protokolü.....	25
Tablo 19. qRT-PCR Koşulları.....	26
Tablo 20. qRT-PCR primer listesi.....	26
Tablo 21. sgRNA'ler için sipariş verilen oligonükleotid dizileri.....	28
Tablo 22. BsmBI restriksiyon endonükleazı ile kesim protokolü.....	28
Tablo 23. sgRNA'ların bağlanması (annealing).....	29
Tablo 24. sgRNA'ların bağlanma koşulları.....	29
Tablo 25. sgRNA'lar ile vektörün ligasyon protokolü.....	29
Tablo 26. 6 well plate için XtremeGene 9 transfeksiyon karışımı.....	30
Tablo 27. Tek bir preparat için FITC labeling working solüsyon içeriği.....	35

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Kolesterol Biyosentezi ara basamakları [21].	4
Şekil 2. SREBP aracılı kolesterol Biyosentezi regülasyonu [20].	5
Şekil 3. HMGCR'nin INSIG aracılı degradasyonu. İlk adımda lanosterol, HMGCR'nin INSIG1 veya INSIG2'ye bağlanmasını tetiklemektedir. INSIG, membrana gömülü bir E3 ubiquitin ligazı olan glikoprotein (gp78) ile bir kompleks halinde bulunur. Gp78 de, E2 ubiquitin konjuge enzime (Ubc7) ve membranlardan ubiquitinleştirilmiş proteinleri çıkarmada rol oynayan bir adenozin trifosfataz (ATPaz) olan valosin içeren proteine (VCP) bağlıdır. İkinci adımda, gp78'in E3 aktivitesi HMGCR ubiquitinleştirir. Üçüncü adımda, ubiquitinleştirilmiş HMGCR VCP tarafından membrandan çıkarılır ve degradasyonu için proteazoma yönlendirilir. Bu post-ubikitinasyon adımı, Rab proteinlerinden biri gibi geranilgeranilenmiş bir proteini içeren henüz aydınlatılamamış bir mekanizma aracılığıyla geranilgeraniol tarafından uyarılır [25].	6
Şekil 4. TMEM97'nin korunmuşluk analizi.	7
Şekil 5. Durgun ve proliferen olan tümör hücrelerinde LDL alım mekanizması [30].	9
Şekil 6. AGS, HGC27, MKN45, HEK 293, MCF7, HELA hücrelerinde TMEM97 ekspresyonu. AGS son kuyucuğa yeniden yüklendi.	35
Şekil 7. CRISPR/Cas9 ile TMEM97 susturulması. HGC27 hücre hatlarında viral enfeksiyon sonrası seçilen kolonilerin tamamen KO olup olmadıkları western blot ile doğrulandı. İki basamaklı ifadelerde ilk rakam sgRNA numarası, ikinci rakam seçilen koloni numarasıdır.	36
Şekil 8. HGC27 TMEM97 KO hücrelerde LDLR, SQLE ve HMGCR gen ekspresyonlarının belirlenmesi. (Data mean±SEM olarak sunuldu, * p<0.05, ** p<0.01.).	37
Şekil 9. TMEM97 KO hücrelerde Dil-LDL alımı. A) 1 µg protein başına düşen floresan ölçüm spektrofotometrik olarak belirlendi (Data mean±SD olarak sunuldu, * p<0.05.). B, C ve D Dil-LDL alımının reprezentatif mikroskopik görüntüleri B) TMEM97 KO1 HGC27, C) TMEM97 KO2 HGC27, D) Kontrol HGC27. 20X magnifikasyon.	38
Şekil 10. TMEM97 KO HGC27 hücrelerinde NBD-kolesterol alımı. A) 1 µg protein başına düşen floresan ölçüm spektrofotometrik olarak belirlendi (Data mean±SEM olarak sunuldu, * p<0.05, ** p<0.01). B, C ve D NBD-kolesterol alımının reprezentatif mikroskopik görüntüleri. Yeşil NBD-kolesterolü temsil ederken mavi DAPI çekirdek boyamasını göstermektedir. B) TMEM97 KO1 HGC27, C) TMEM97 KO2 HGC27, D) Kontrol HGC27. 20X magnifikasyon.	39
Şekil 11. HGC27 hücrelerinden elde edilen TMEM97 KO izojenik hücrelerin FBS'li, LPDS'li ve LPDS+LDL içeren besiyerinde çoğalma grafiği. (Data mean±SEM olarak sunuldu, * p<0.05.).	40
Şekil 12. TMEM97 KO hücrelerde kolesterol ölçümü. (Data mean±SD olarak sunuldu, * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.).	41

Şekil 13. Xenograft sonrası toplanan tümörlerin her gruptan bir temsili fotoğrafı. A) HGC27 kontrol grubunu, B) TMEM97 KO1 HGC27 grubunu ve C) TMEM97 KO2 HGC27 grubunu göstermektedir.....	41
Şekil 14. HGC27 TMEM97 KO ve kontrol hücrelerinden kökenlenen tümörlerin hacimleri ve ağırlıkları. A) Tümör hacimlerini gösterirken, B) sakrifikasyon sonrası toplanan tümörlerin ağırlıklarını göstermektedir. (Data mean±SEM olarak sunuldu, * p<0.05).....	42
Şekil 15. Tümör kesitlerinde nekrotik alan. A) HGC27 kontrol hücrelerini, B) TMEM97 KO1 HGC27 hücrelerini ve C) TMEM97 KO2 HGC27 hücrelerini göstermektedir. 40X magnifikasyon.	42
Şekil 16. Tümör gruplarında nekrotik alanlar. (Data mean±SEM olarak sunuldu, * p<0.05, ** p<0.01.).	43
Şekil 17. TUNEL assay kullanılarak tümör kesitlerindeki apoptotik hücrelerin gösterimi. Mavi DAPI ile boyanmış hücre çekirdeğini gösterirken, yeşil TUNEL-pozitif apoptotik hücreleri göstermektedir. A) HGC27 kontrol hücrelerini, B) TMEM97 KO1 HGC27 hücrelerini ve C) TMEM97 KO2 HGC27 hücrelerini göstermektedir. 40X magnifikasyon.	43
Şekil 18. Tümör kesitlerinde apoptotik indeksin yüzdesel ifadesi. (Data mean±SEM olarak sunuldu, ** p<0.01, *** p<0.001.).	44
Şekil 19. Tümör kesitlerinde Ki67 immün boyama. A) HGC27 kontrol hücrelerini, B) TMEM97 KO1 HGC27 hücrelerini ve C) TMEM97 KO2 HGC27 hücrelerini göstermektedir. 40X magnifikasyon.....	44
Şekil 20. Tümör dokularında Ki67 skoru. (Data mean±SEM olarak sunuldu, **** p<0.0001.).	45
Şekil 21. SREBF1 immünohistokimyasal değerlendirilmesi. A) Tümör gruplarında SREBF1 pozitiflik oranı, B) HGC27 kontrol hücrelerini, C) TMEM97 KO1 HGC27 hücrelerini ve D) TMEM97 KO2 HGC27 hücrelerini göstermektedir. 40X magnifikasyon. (Data mean±SEM olarak sunuldu, **** p<0.0001.).	46
Şekil 22. SREBF2 immünohistokimyasal değerlendirilmesi. A) Tümör gruplarında SREBF2 pozitiflik oranı, B) HGC27 kontrol hücrelerini, C) TMEM97 KO1 HGC27 hücrelerini ve D) TMEM97 KO2 HGC27 hücrelerini göstermektedir. 40X magnifikasyon. (Data mean±SEM olarak sunuldu, **** p<0.0001.).	47
Şekil 23. SQLE immünohistokimyasal değerlendirilmesi. A) Tümör gruplarında SQLE pozitiflik oranı, B) HGC27 kontrol hücrelerini, C) TMEM97 KO1 HGC27 hücrelerini ve D) TMEM97 KO2 HGC27 hücrelerini göstermektedir. 40X magnifikasyon. (Data mean±SEM olarak sunuldu, **** p<0.0001.).	48
Şekil 24. LDLR immünohistokimyasal değerlendirilmesi. A) Tümör gruplarında LDLR pozitiflik oranı, B) HGC27 kontrol hücrelerini, C) TMEM97 KO1 HGC27 hücrelerini ve D) TMEM97 KO2 HGC27 hücrelerini göstermektedir. 40X magnifikasyon. (Data mean±SEM olarak sunuldu, **** p<0.0001.).	49

1. GİRİŞ

Kanser hücrelerinde metabolik yollar enerji (ATP) üretimini artıracak şekilde yeniden düzenlenir. Hücrelerdeki bu metabolik değişiklikler tümör çevresi tarafından uyarılmaktadır. Kanser hücreleri yaşamları ve çoğalabilmeleri için bu metabolik değişikliklere bağımlıdır [1]. Metabolizmada pek çok yolağın temel bileşenleri çok iyi tanımlanmasına rağmen, tümör besin çevresine bağlı olarak hücre içerisinde metabolitlerin akışının nasıl düzenlendiği henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Ayrıca kanser hücrelerinin düşük besin miktarlarında gösterdikleri metabolik değişiklikler çok iyi bilinmemektedir [2]. Çünkü bu tür çalışmalar sistematik yaklaşımlar gerektirmektedir.

Çoğalan hücrelerde yeni membranların yapılabilmesi ve hücre sinyal ileti sisteminin aktif bir şekilde devam edebilmesi için kolesterole gereksinim vardır [3]. Kolesterol bir non-esansiyel metabolittir. Dışarıdan alınan kolesterolün %75' i düşük yoğunluklu lipoproteinden (LDL) kaynaklanmaktadır [4]. Hücre içi düşük sterol seviyelerinde LDL' in reseptör aracılı endositozla hücre içerisine alınması artmaktadır [5]. Kolesterol dışarıdan besinlerle alınabildiği gibi Asetil KoA'dan 3-hidroksi-3-metil-glutaril-koenzim A (HMG-KoA) redüktaz (HMGCR) enzimi ile mevalonat (MVA) oluşmasını takip eden bir seri enzimatik reaksiyonlarla de novo olarak da sentezlenmektedir. Kolesterol biyosentezi, enerji gerektiren bir anabolik olay olduğundan hücre içi kolesterol seviyesindeki değişikliğe bağlı olarak aktive edilir [6]. Kolesterol biyosentezinin regülasyonu iyi bilinmekle birlikte yeni gelişen genomik/proteomik araçlarla yapılan sistematik çalışmalar fonksiyonları tam olarak bilinmese de regülasyonunda rolü olabilecek yeni proteinlerin tanımlanmasına yardımcı olmuştur. TMEM97 (Transmembran protein 97) geni bu genlerden biri olup, kolesterol metabolizmasında rol alan genler ile birlikte eksprese olduğu gösterilmiştir [7].

Kolesterolün karsinogenez, tümör büyümesi, kemoterapiye direnç, migrasyon ve sinyal iletimi gibi hücresel olaylarda rol aldığı gösterilmiştir [8]. Ancak kanser hücrelerinin kolesterol yokluğuna gösterdikleri hücresel yanıt bilinmemektedir [9]. Ayrıca, kanser hücrelerinde kolesterol metabolizmasının nasıl düzenlendiğine dair veriler ise oldukça kısıtlıdır. Daha önce yapmış olduğumuz ön deneylerde bazı kanser hücrelerinin kolesterol yokluğunda yaşayamadığını belirledik. Bu grup kanserlerde kolesterol biyosentezinde görevli skualen epoksidaz enzimini kodlayan SQLE gen ekspresyonunun düşük olduğunu tespit ettik. Cancer cell line encyclopedia (CCLE) veri tabanından yararlanarak yaptığımız analizlerde ise SQLE ekspresyonu düşük olan bu grup hücrelerde aynı zamanda TMEM97 gen ekspresyonunun düşük olduğunu gördük.

Bu tez çalışmasının amacı literatür ve veri tabanları analizi doğrultusunda TMEM97'nin kanser kolesterol metabolizmasının düzenlenmesindeki rolünü araştırmaktır. Bu amaç doğrultusunda, TMEM97'nin kanser hücrelerinin kolesterol yokluğuna verdikleri yanıtındaki rolünü, kolesterol metabolizmasının düzenlenmesindeki fonksiyonu incelenmiştir. Bu amaçla TMEM97 ekspresyon değişimine bağlı olarak kolesterol metabolizmasında meydana gelen değişimler kantitatif gerçek zamanlı ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) ile ve hücre canlılığı ise CellTiter Glo assay ile tespit edilmiştir. Ayrıca TMEM97'nin tümör gelişiminde ve agresifliğindeki rolü ise terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) 2'-deoksiüridin, 5'-trifosfat (dUTP) Nick uç etikleme (TUNEL) assay ve Ki67 immünohistokimyasal boyama ile gösterilmiştir. Parafine gömülü tümör dokusu kesitlerinde kolesterol metabolizmasında rol oynayan sterol düzenleyici element bağlayıcı protein 1 (SREBP1), sterol düzenleyici element bağlayıcı protein 2 (SREBP2), skualen epoksidaz (SQLE) ve LDL reseptörü (LDLR) anahtar faktörleri de immünohistokimyasal boyama ile gösterilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

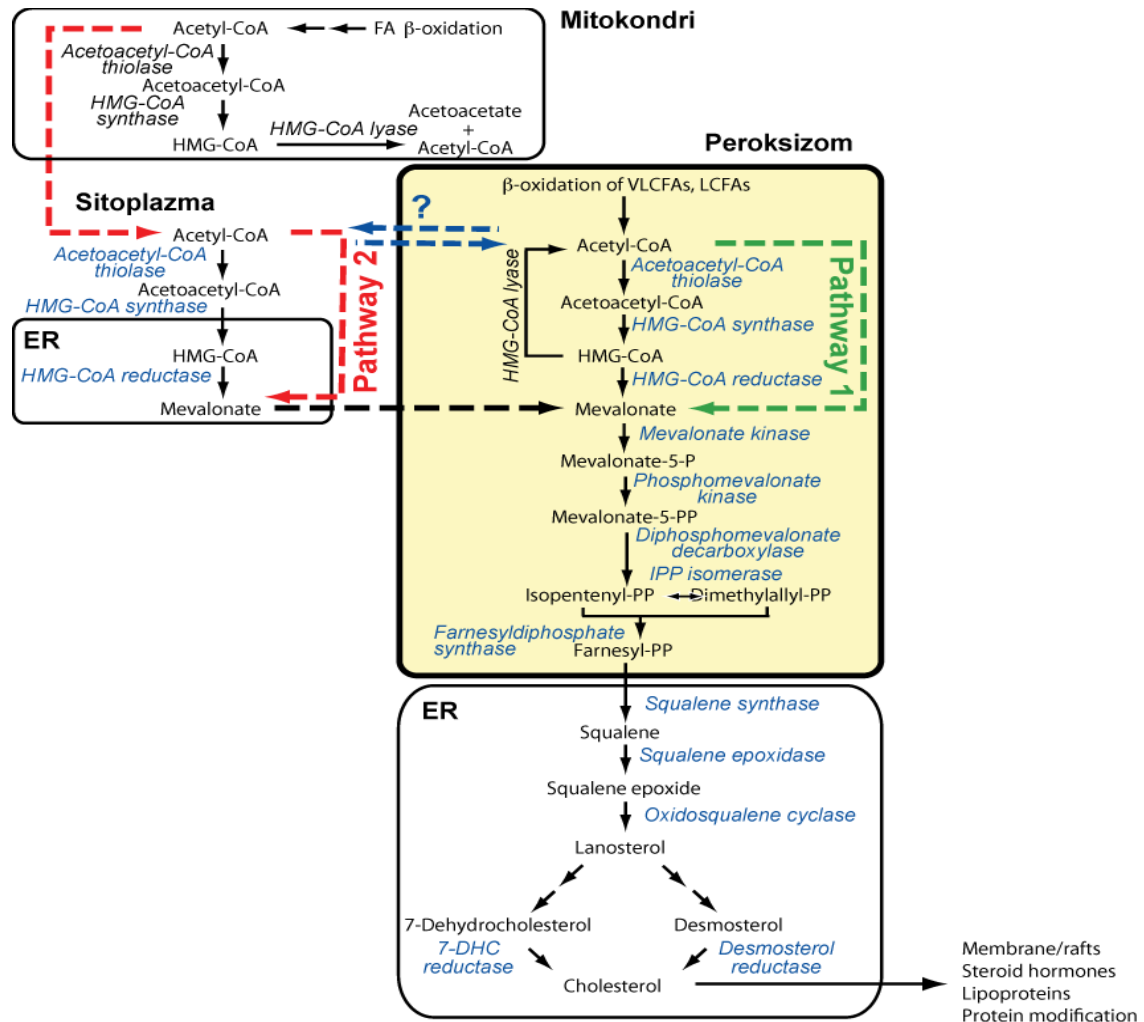
Kanser, normal büyüme ve farklılaşmayı sağlayan mekanizmalardaki kontrolün kaybolması sonucu değişime uğramış bir hücrenin kontrolsüz çoğalması sonucu gelişen bir hastalıktır [10]. En sık ölüm nedenleri arasında kanser, kalp krizinden sonra ikinci sırada yer almaktadır [11]. Kanserli hücreler sahip oldukları genetik mutasyonlar nedeniyle hücre döngüsü kontrol mekanizmalarına yakalanmazlar ve apoptozdan kurtularak kontrolsüz biçimde çoğalırlar [12]. Bu nedenle kanser, hücrelerin genetik bir hastalığı olarak da tanımlanır.

Hızla çoğalan kanser hücreleri metabolizmalarında önemli problemlerle karşılaşır. Çünkü her bir hücre döngüsü sonunda iki yavru hücre oluşur ve bunun için gereken toplam biyokütle (protein, lipid ve nükleik asit) miktarı iki kattır [13]. Bu durum çoğalma uyarısı alan ve buna yanıt veren hücre için metabolik yük oluşturmaktadır. Hücreler artmış biyoenerji ihtiyaçlarını karşılamak için daha fazla besin kullanırlar. Elde edilen metabolitler ise biyosentez yollarına yönlendirilirler. Hücre çoğalmasını uyaran sinyaller aynı zamanda hücrenin metabolik aktivitesinin yeniden düzenlenmesini de sağlar. Kanser hücreleri ile 'normal' hücreler arasındaki bu metabolik farklılıklar kanserde yeni yaklaşımların sağlanması açısından daha detaylı araştırılmaya başlanmıştır [14]. Tümör görüntülemeye bu metabolik farklılıktan yararlanılmaktadır. Kanser hastalarında hastalığın evrelendirilmesinde kullanılan florodeoksiglukoz pozitron emisyon tomografisi (18FDG-PET) ve 1H manyetik rezonans görüntüleme yöntemleri kanser hücrelerinin artmış glukoz alımı ve laktat üretimi esasına dayalıdır [15]. Metabolizmada pek çok yolağın temel bileşenleri (binlerce ortak metabolitler ile birleşen farklı yollarlarda organize olan ~ 3000 metabolik gen) çok iyi tanımlanmasına rağmen, tümör besin çevresine bağlı olarak hücre içerisinde metabolitlerin akışının nasıl düzenlendiği henüz tam olarak anlaşılamamıştır [16]. Ayrıca kanser hücrelerinin düşük besin miktarlarında gösterdikleri metabolik değişiklikler çok iyi bilinmemektedir, çünkü bu tür çalışmalar sistematik yaklaşımlar gerektirmektedir. Yapılan az sayıdaki geniş kapsamlı sistematik analizler kanser hücrelerinin bulundukları çevre ile ilişkisinin birden fazla etkileşim ile olduğunu göstermiştir [17].

2.2. Kolesterol Metabolizması

Kolesterol normal hücre büyümesi ve çoğalması için gerekli olan bir non-esansiyel metabolittir. Çoğalan hücrelerde yeni membranların yapılabilmesi, hücre sinyal ileti sisteminin aktif bir şekilde devam edebilmesi için endojen kolesterol sentezine ve dışarıdan lipid partiküllerinin alınmasına ihtiyaç vardır

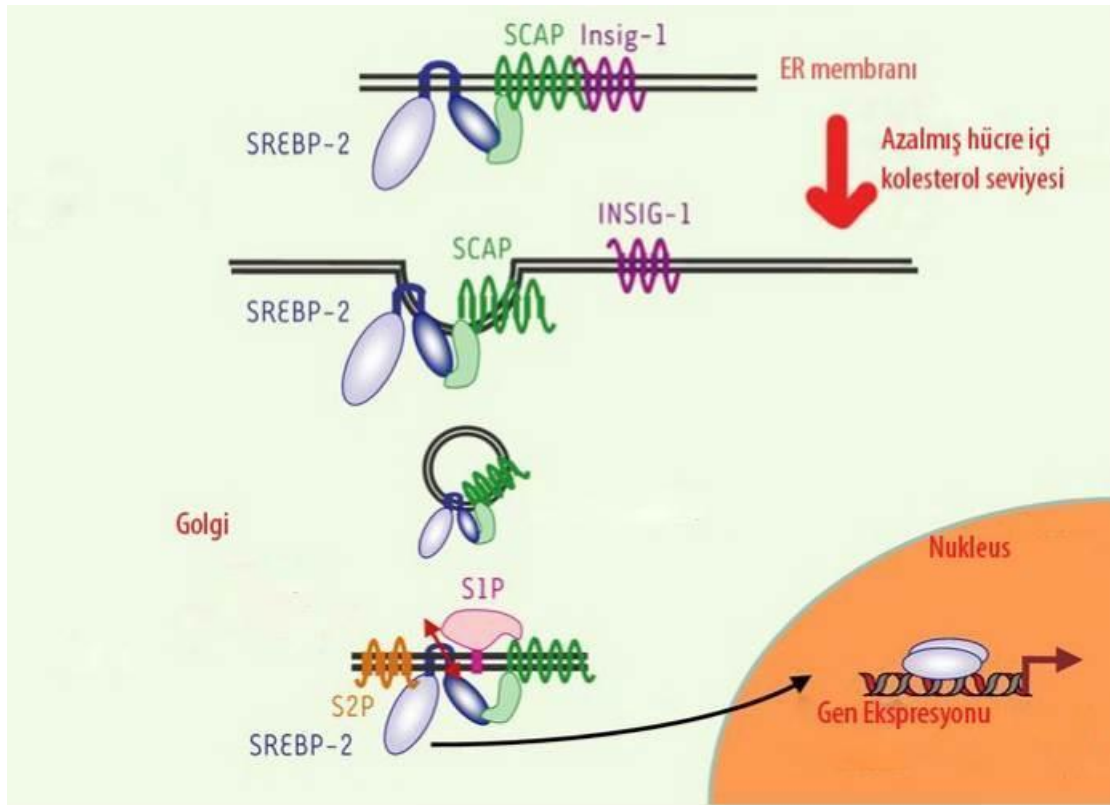
[18]. Dışarıdan alınan kolesterolün %75'i düşük yoğunluklu lipoproteinden (LDL) kaynaklanmaktadır. LDL hücre içerisine LDL reseptörü (LDLR) aracılı endositoz ile alınmaktadır. LDLR'nın endositozla hücre içerisine alınması hücre içi düşük sterol seviyelerinde artmaktadır [19]. LDLR gen transkripsiyonu endoplazmik retikulum (ER) membranlarındaki kolesterol konsantrasyonu değişikliğine göre düzenlenir. Kolesterol biyosentezi sitoplazma ve endoplazmik retikulum membranında gerçekleşir, sentezlenen kolesterol ER'dan plazma membranı ve diğer organellere dağıtılır [20]. Ana basamaklardan birisi üç molekül Asetil KoA' nın yoğunlaşması ile mevalonat (MVA) oluşmasıdır. Bu basamak 3-hidroksi-3-metil-glutaril-koenzim A (HMG-KoA) redüktaz (HMGCR) enzimi aracılığı ile olmaktadır ve kolesterol biyosentezinin regülatör reaksiyonlarından biridir. MVA 30 karbonlu lineer bir yapıya sahip skualene dönüştürülür, skualen ise lanosterole dönüştürülür (Şekil 1.) [21]. Lanosterolden 3 karbonun uzaklaştırılması ile kolesterol oluşturulur [22, 23, 19].



Şekil 1. Kolesterol Biyosentezi ara basamakları [21].

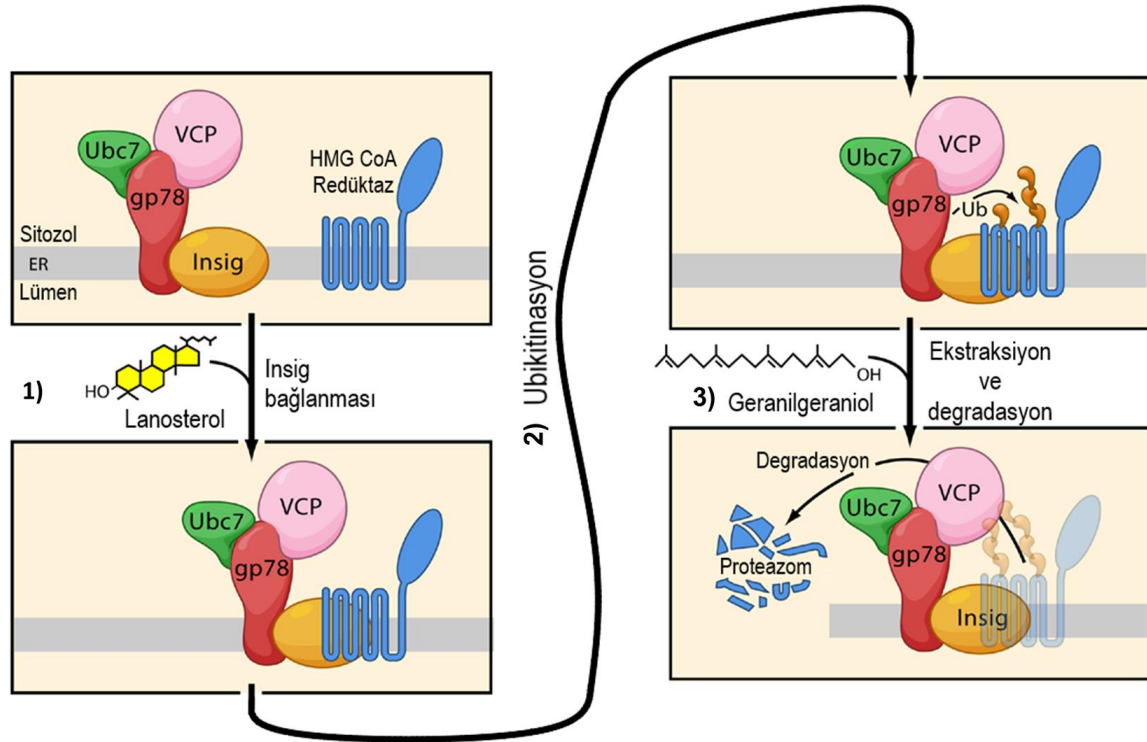
2.3. Kolesterol Metabolizmasının Düzenlenmesi

Enerji gerektiren kolesterol biyosentezi hücrelerde iyi bir kolesterol algılama 'sensing' mekanizması ile kontrol altında tutulur ve sadece dışardan alınan kolesterol az olduğunda ve/veya hücre içinde miktarı yetersiz olduğunda aktive edilir. Hücrelerde kolesterol algılama mekanizması kolesterol biyosentez yolağına oldukça yakın gerçekleşir. Kolesterol algılayıcı protein ve kolesterol biyosentezinde rol alan genlerin ekspresyonunu uyaran transkripsiyon faktör ER membranında bir arada dururlar (Şekil 2.) [20]. Kolesterol algılayıcı protein sterol düzenleyici element bağlayıcı protein (SREBP) kesimini aktive eden protein (SCAP) beş membran geçişli bir transmembran protein olup transmembran domaini sterol sensing domain olarak tanımlanır ve buradan kolesterole bağlanır. Hücre içi kolesterol seviyesi yüksek olduğunda ise kolesterol bağlı SCAP konformasyonel değişikliğe gider ve ER membranında insülin ile indüklenen gen (INSIG) adı verilen, SREBP ile SCAP arasında bağlayıcı olan proteine afinitesi artar [24]. Kolesterol miktarı azaldığında ise kolesterol bağlı olmayan SCAP/SREBP kompleksi INSIG'den ayrılır ve golgiye hareket eder. Golgideki proteazlar tarafından SREBP'nin sitoplazmik N terminal ucu yarıklanır ve salınır. SREBP'nin ayrılan sitoplazmik fragmenti nukleusa geçerek kolesterol biyosentezinde görevli genlerin ekspresyonunu uyarır. Kolesterol seviyesinin yükselmesini takiben negatif feedback ile SREBP'nin yarıklanması engellenir [21].



Şekil 2. SREBP aracılı kolesterol Biyosentezi regülasyonu [20].

Kolesterol algılayıcı bir diğer mekanizma ise ER membranında HMGCR enzimi aracılığı ile olur [24]. HMGCR düşük kolesterol konsantrasyonlarında SREBP'nin transkripsiyonel hedefidir. HMGCR'nin sitoplazmaya açılan C terminal ucu katalitik aktiviteye sahip olup, transmembran domaini SCAP gibi sterol algılayıcıdır. Kolesterol sentezi ara metabolitlerinin yüksek seviyesi HMGCR'nin INSIG proteinine bağlanmasını tetikler. INSIG' e bağlı olan ubiquitin kompleks HMGCR'nin degradasyonunu sağlar (Şekil 3.) [18, 25].



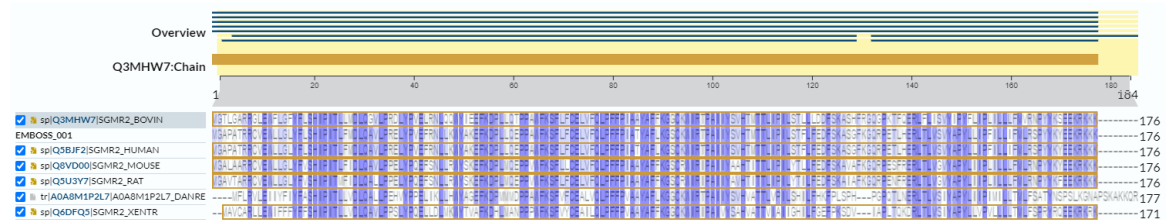
Şekil 3. HMGCR'nin INSIG aracılı degradasyonu. İlk adımda lanosterol, HMGCR'nin INSIG1 veya INSIG2'ye bağlanmasını tetiklemektedir. INSIG, membrana gömülü bir E3 ubiquitin ligazı olan glikoprotein (gp78) ile bir kompleks halinde bulunur. Gp78 de, E2 ubiquitin konjuge enzime (Ubc7) ve membranlardan ubiquitinleştirilmiş proteinleri çıkarmada rol oynayan bir adenozin trifosfataz (ATPaz) olan valosin içeren proteine (VCP) bağlıdır. İkinci adımda, gp78'in E3 aktivitesi HMGCR ubiquitinleştirir. Üçüncü adımda, ubiquitinleştirilmiş HMGCR VCP tarafından membrandan çıkarılır ve degradasyonu için proteazoma yönlendirilir. Bu post-ubikitinasyon adımı, Rab proteinlerinden biri gibi geranilgeranilenmiş bir proteini içeren henüz aydınlatılamamış bir mekanizma aracılığıyla geranilgeraniol tarafından uyarılır [25].

Kolesterol biyosentezi basamakları ve regülasyonu iyi bilinmekle birlikte yeni gelişen genomik/proteomik araçlarla yapılan sistematik çalışmalar özellikle kolesterol metabolizmasının regülasyonunda rolü olduğu düşünülen yeni proteinlerin tanımlanmasına yardımcı olmuştur [26, 27]. Sterol uzaklaştırılmış ortamda çoğaltılan hücrelerde yapılan tüm genom ekspresyon analizinde

TMEM97 (Transmembran protein 97) kolesterol metabolizması regüle eden yeni bir gen olarak önerilmiştir [28].

2.4. TMEM97

TMEM97 plazma membranı ve organel membranları gibi zarlarda yer alan integral TMEM proteinlerinin bir üyesidir [29]. Bir opioid reseptörü olan sigma-2 reseptörü (σ_2R), 2017'de transmembran protein 97 (TMEM97, meninjiyom ilişkili protein (MAC30) olarak da bilinir) olarak tanımlandı [30, 29]. Yapılan korunmuş dizi analizlerinde TMEM97'nin omurgalılarda büyük ölçüde korunduğu gösterilmiştir (Şekil 4.). TMEM97'in TMEM97'nin moleküler fonksiyonu çok iyi bilinmemesine rağmen kolesterol homeostazındaki rolünden ötürü son yıllarda cazibe kazanmıştır. TMEM97'nin kolesterol biyosentezindeki rolüne dair yapılan geniş kapsamlı bir çalışmada kolesterol depleksyonu yapılan hücrelerde TMEM97'nin artmış ekspresyonu gösterilmiş, TMEM97'nin küçük engelleyici RNA (siRNA) baskılanması ile hücrelere LDL girişinin azaldığı belirlenmiştir [28]. 2018'de yapılan bir çalışmada TMEM97'in progesteron reseptör membran komponenti 1 (PGRMC1) ve LDLR ile kompleks oluşturduğu belirlenmiştir ve bu trimerik kompleksin LDL'nin LDLR tarafından hızlı internalizasyonu için gerekli olduğu tespit edilmiştir [31]. Yapılan 'prediction' analizlerinde TMEM97'nin sterol düzenleyici element bağlayıcı protein 1 (SRE 1) konsensus dizisi taşıdığı belirlenmiş ve TMEM97'nin SREBP hedeflerinden biri olduğu öne sürülmüştür. Sterol düzenleyici element bağlayıcı proteinin 2 (SREBP2) siRNA aracılı baskılanması sonucu sterol depleksyonu yapılan hücrelerde TMEM97 ekspresyonunun da baskılandığı gözlemlenmiştir [28]. Ancak SREBP2'nin TMEM97 promoter bölgesine bağlanarak transkripsiyonunu direkt olarak mı yönettiği gösterilmemiştir. Dolayısıyla, TMEM97'nin kolesterol olmayan hücrelerde kolesterol biyosentezi genlerinin ekspresyonunu hangi mekanizmalar ile nasıl düzenlediği ya da artırdığı da henüz bilinmemektedir.



Şekil 4. TMEM97'nin korunmuşluk analizi.

TMEM97'nin hücre içinde ER membranı, nükleus membranında lokalize olduğu, sterol uzaklaştırılmış ortamda ise plazma membranı ve endolizozomal kompartmanlara lokalize olduğu gösterilmiştir [28]. Sterol bulunmayan ortamda TMEM97'nin endolizozoma lokalize olması Niemann Pick hastalığı tip C1 (NPC1) proteini ile etkileşebileceğini düşündürmüş ve ko-lokalizasyon yanı sıra

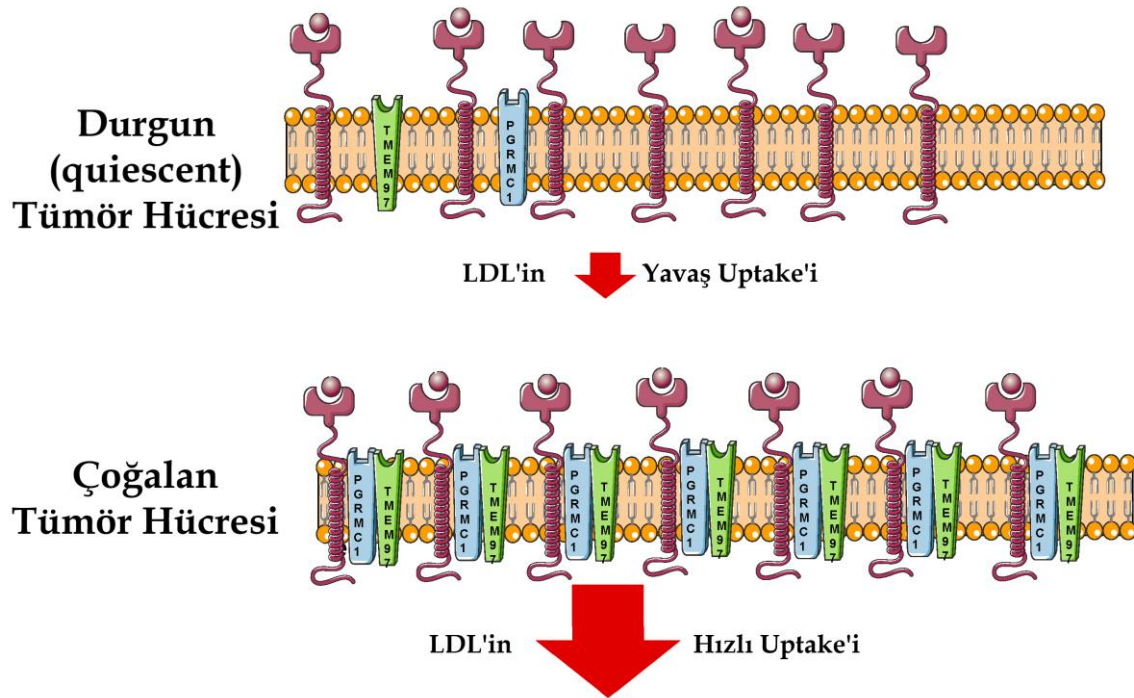
immünopresipitasyon yöntemi ile iki protein arasında etkileşim gösterilmiştir [7]. NPC1 kolesterol bağlayıcı bir integral membran proteini olup lizozomal kolesterolün dışarı salınmasından sorumludur. Bu sonuç kolesterol az olan ortamda TMEM97'nin NPC1 ile etkileşerek hücre içi kolesterol seviyesini artırmak amacıyla lizozomlardan kolesterol salınımını indüklediğini göstermektedir. Ancak TMEM97'nin hangi mekanizmalarla endolizozomal kompartmanlarda yer aldığı bilinmemektedir. Ayrıca TMEM97'nin ER'de lokalize olması hücrelerde ektopik eksprese ettirilmesi ile ilişkili olabilir. Endojen olarak yüksek TMEM97 ekspresyonuna sahip hücrelerde TMEM97 lokalizasyonunun gösterilmesi proteinin fonksiyonuna dair daha aydınlatıcı bilgi edinmemizi sağlayacaktır.

2.5. TMEM97'nin Karsinogenezdeki Rolü

Hücre membranının kolesterol yapısı, hücre bölünmesi için metabolik bir gereksinimdir ve çoğalan hücrelerde artmış kolesterol alımı olduğu gösterilmiştir [18]. Kolesterol biyosentezinin kanser hücreleri gibi genetik modifikasyonlara (mutasyonlara) sahip hücrelerde nasıl düzenlendiğine dair veriler oldukça kısıtlı olup, kanser hücrelerinin kolesterol yokluğuna verdikleri yanıt ve bu yanıtta rol alan sinyal mekanizmaları tanımlanmış değildir [32]. Bununla birlikte kolesterol metabolizmasının deregülasyonunun kanser gelişimine katkısı olduğu öne sürülmektedir. Ayrıca fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K)/ protein kinaz B (AKT)/ rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi (mTOR), RAS, tümör protein 53 (TP53) gibi farklı onkogenik sinyallerin kanser hücrelerinde kolesterol sentezini etkilediği gösterilmiştir [33]. Kolesterolün karsinogenez, tümör büyümesi ve kemoterapiye dirençte rol alan hücre çoğalması, migrasyon ve sinyal iletimi gibi hücresel olaylarda rol aldığı in vitro kanser hücre hatlarından, kanser doku profillerinden ve hayvan modellerinden elde edilen verilerle gösterilmiştir [33, 32]. Kolesterolün kanser gelişimine katkısı olduğunun gösterilmesi pek çok araştırmacının ilgisini kolesterol metabolizmasının manipülasyonunun anti-kanser tedaviler için hedef olup olamayacağı konusuna çekmiştir. Statinler kan kolesterolünü düşürücü ilaçlar olup, HMGCR enzimini inhibe ederek kolesterol sentezinin inhibisyonunu sağlarlar [34]. Pek çok kanser hücre hattında da anti-tümör etkisi çalışılmıştır. Lovastatin, simvastatin gibi statinlerin kolon kanseri hücre hatlarında, tümör xenograftlarında apoptozu indüklediği, farelerde kolit ilişkili kolon kanserini hafiflettiği gösterilmiştir [35, 36].

TMEM97'nin epitelial, akciğer, kolon, yumurtalık ve meme kanserlerinde artmış ekspresyonu bildirilmiştir [37-41]. Bazı kanserlerde artmış ekspresyonu özellikle kötü prognoz ve metastaz ile ilişkilendirilmiştir [37, 38]. Ayrıca TMEM97'nin siRNA aracılı baskılanması sonucu mide [42] ve glioma kanser hücrelerinde hücre proliferasyonunun inhibe olduğu gösterilmiştir [43]. Kanser hücrelerinin

kolesterole metabolik bağımlılığı ve kolesterol metabolitlerinin kanser üzerindeki çeşitli etkileri göz önüne alındığında, TMEM97, kolesterol homeostazına dahil olarak kanserde rol oynayabilir (Şekil 5.) [30].



Şekil 5. Durgun ve proliferen olan tümör hücrelerinde LDL alım mekanizması [30].

Kanser hücrelerinde kolesterol metabolizmasında meydana gelen değişiklikleri araştırmak amacıyla yaptığımız ön çalışmada bir grup kanser hücresinde skualen epoksidaz (SQLE) gen ekspresyonunu düşük bulduk. Skualenden lanosterol sentezini katalizleyen bu enzimin eksikliğinde kanser hücrelerinde kolesterol olmayan ortamda skualen biriktiği ve kolesterol biyosentezinin tamamlanamadığı, hücrelerin çoğalamadığı, SQLE'nin bu hücrelerde ektopik ekspresyonu ile hücrelerin yeniden çoğalabilir hale geldiklerini belirledik. Yaptığımız ileri analizlerde aynı grup hücrelerde SQLE ekspresyonu ile birlikte TMEM97 ekspresyonunun düşük olduğunu tespit ettik.

2.6. TMEM97'nin İlaç Geliştirilmesindeki Rolü

Yapılan bir çalışmada TMEM97'nin bir sterol izomeraz olan emopamil bağlayıcı protein (EBP) ile birlikte genişletilmiş EBP süperailisi (EXPERA) adı verilen bir domaine sahip olduğu, TMEM97'nin de EBP gibi enzimatik fonksiyona sahip olduğu gösterilmiştir [44]. EBP kolesterol biyosentezi, otofaji, oligodendrosit oluşumunda yer alan bir endoplazmik retikulum membran proteinidir [45]. EBP, kolesterol biyosentezinde ara metabolit olan zimosterol ve zimostenol'ün karşılığı olan izomerlerine dönüşümünden sorumludur [45, 46]. Meme kanseri

tedavisinde kullanılan östrojen reseptör antagonisti olan tamoksifen ilacının EBP inhibitörü olduğu bilinmektedir [29].

TMEM97 fonksiyonu tam olarak aydınlatılamasa da oldukça hidrofobik bir membran proteini olması nedeniyle küçük molekül ya da terapötik antikor bağlamasının zor olduğu düşünülen bir proteindir [29]. Ancak yapılan bir çalışmada TMEM97'nin oldukça fazla pek çok farklı küçük molekül kemotipi ligand bağlama kapasitesi olduğunu göstermiştir [47]. Bunlardan biri de Ro 48-8071 olarak adlandırılan lanosterol sentezini inhibe ettiği gösterilen ilaçtır. Düşük mikromolar seviyelerinde Ro 48-8071'nin TMEM97'ye bağlandığı gösterilmiştir. Oldukça yeni bir çalışmada ise Ro 48-8071'nin meme kanseri hücrelerinin büyümesini baskıladığı gösterilmiştir [48]. Ayrıca, kolon ve prostat kanseri hücre hatlarında metastazı baskılamıştır [49].

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Gereçler

3.1.1. Kimyasallar

Tablo 1. Çalışmada kullanılan Kimyasallar

Ürün	Marka
Etidyum bromür	Sigma
Agaroz LE	Genaxxon
İzopropanol (C ₃ H ₈ O)	Merck
Metanol	Merck
Tris Baz	Roche
Tris-HCl	Sigma
Tween 20	Sigma
Triton X-100	Sigma
2-Merkaptoetanol	Sigma
CAPS	Sigma

Amido Black 10B	Fisher
Glisin	Sigma
Bovine Serum Albumin	Merck
NBD-Kolesterol	Invitrogen
Sodyum Klorür (NaCl)	Merck
Süt tozu	Enka
Sodyum Hidroksit (NaOH)	Merck
Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)	Fisher
Amonyum persülfat (APS)	Invitrogen
TEMED	Invitrogen
Resolving Gel Buffer	Invitrogen
Stacking Gel Buffer	Invitrogen
Glasiyel asetik asit	Merck
Paraformaldehit	Sigma
Ponceau S	Fisher
Nonyl phenoksipoliethoksiletanol (NP40)	-
HEPES	Sigma
Antikor HMGCR (ab214018), rabbit	Abcam
cOmplete Tablets, mini, EDTA-free, EASYpack	Roche
Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA)	Fisher
DMSO	Fisher
Tryptone	Sigma

Yeast Extract	Sigma
Agar	Sigma
DAPI	Invitrogen
40% (w/v) Akrilamid	Invitrogen
IGEPAL CA-630	Sigma
Antikor Beta Aktin (8H10D10), mouse	Cell Signaling
Antikor TMEM97 (NBP1-30436), rabbit	NOVUS
Antikor SQLE (12544-1-AP), rabbit	Proteintech
Antikor Beta Tubulin, rabbit	Cell Signaling
Antikor Anti-Rabbit	Cell Signaling
Antikor Anti-Mouse	Cell Signaling
LDL	Lee Biosolution
BCA	Thermo Scientific
Antikor SREBF1 (14088-1-AP), rabbit	Proteintech
Antikor SREBF2 (14508-1-AP), rabbit	Proteintech
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco
RPMI1640	Gibco
LPDS	Capricorn
0.25% Trypsin-EDTA	Gibco
Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) w/o Mg ⁺² Ca ⁺²	Gibco
Fetal Bovin Serum (FBS)	Gibco

Penisilin/Streptomisin	Gibco
L-glutamin	Gibco
PowerUp SYBR® Green PCR Master Mix	Applied Biosystems
Etanol (C ₂ H ₅ O)	Merck
FuGENE transfeksiyon ajanı	Promega
XtremeGene 9 transfeksiyon ajanı	Sigma
Polybrene	Sigma
DAB	-
Antikor LDLR (10785-1-AP), rabbit	Proteintech
Puromisin	-
GeneRuler 1kbp DNA Ladder	Thermo
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	Thermo
Gel Loading Dye Purple (6x)	Biolabs
Formaldehit %37	ISOLAB
Ksilen	Merck
Gliserol	Tekkim
ECL solüsyonu	ThermoScientific,

3.1.2. Kitler

Tablo 2. Çalışmada kullanılan Kitler

Ürün	Marka
Amplex™ Red Cholesterol Assay Kit	Invitrogen
CellTiter-Glo® Lüminesans hücre canlılık kiti	Promega

Nucleospin Gel-PCR cleanup	Macherey-Nagel
One-step TUNEL in situ apoptoz kiti	Elabscience
Nucleospin Plasmid	Macherey-Nagel
RNAasy	Qiagen
High-Capacity RNA-to-Cdna Kit (50)	Applied Biosystems
Pierce BCA Protein miktar tayini kiti	Thermo Scientific
Dil-LDL assay	Invitrogen
HRP Anti-Polyvalent Lab Pack	SensiTek

3.1.3. Cihazlar

Tablo 3. Çalışmada kullanılan Cihazlar

Cihaz	Marka
Distile Su cihazı	Millipore Elix
Cytation 5 Multimode reader	Biotek
Real-Time PCR cihazı	Qiagen Rotor Gene Q
Nanodrop	Denovix DS-11
MultiSkanGo Plate Reader	Thermo Scientific
Kar-Buz makinesi	Brema
Laminer FLOW Kabin Class II	Thermo Scientific
CO ₂ İnkübatör HeraCell150i	Thermo Scientific
CO ₂ İnkübatör C 150	Binder
Etüv	Memmert
Santrifüj Allegra X-15R	Beckman Coulter
Santrifüj MicroCL21R	Thermo Scientific
İnvert Mikroskop	Zeiss
Derin dondurucu -86°	Thermo Scientific
No frost Buzdolabı (+4, -20)	Arçelik
Frost-free Buzdolabı (+4, -20)	Regal
UV Transilluminator	UVP
Vortex	WiseMix
Otoklav	VWR

Su banyosu	VWR
Çalkalayıcı inkübatör	LABWIT
Soğutmalı çalkalayıcı inkübatör	LabART
Mikroplate çalkalayıcı	Thermo Scientific
Su banyosu	Nüve
Hot plate	Thermo Scientific
Orbital çalkalayıcı	IKA
Çalkalayıcı	VWR
Mini çalkalayıcı	VWR
Manyetik karıştırıcı	IKA
pH metre	Thermo Scientific
Microcentrifuge MiniStar	VWR
PipetAid	Eppendorf
Thermal Cyclers	BioRad
Güç kaynağı PowerPac Universal	BioRad
Güç kaynağı PowerPac 300	BioRad

3.1.4. Sarf Malzemeler

Tablo 4. Çalışmada kullanılan Sarf Malzemeler

Malzeme	Marka
Serolojik Pipetler (5, 10, 25 ml)	SPL Life sciences
Falkon Tüpleri (15, 50 ml)	SPL Life sciences
Hücre Kültür Flaskları (T25)	SPL Life sciences
Petri Kapları (100mm)	Firatmed
Cell culture dishes (100mm)	Corning
Well Plate (6,12,96)	SPL Life sciences
Mikropipet Uçları (10, 200, 1000µl)	Axygen
Mikro Santrifüj Tüpleri (1,5 ml)	Axygen
Pudrasız Eldiven (S, M, L)	Dolphin
Solüsyon Rezervuarı (50 ml)	Isolab
Kriyojenik tüp (2ml)	Corning
8-stripli Pcr Tüpleri	Thermo Scientific
Whatmann Kağıtları	BioRad

3.1.5. Solüsyonlar

3.1.5.1. Western Blotlama Solüsyonları

Tablo 5. 5x Protein yükleme boyası (22.5 ml, pH 6,8)

Kimyasal	Miktar	Final Konsantrasyon
%20 SDS	11,25 ml	%10
2-Merkaptoetanol	5,625 ml	%25
Tris-HCl	0,84 g	240 mM
%100 Gliserol	5,625 ml	%25
Bromofenol mavisi	12,5 mg	830 μ M

%20 SDS için 2,25 g SDS dH₂O içerisinde çözüldü ve son hacim dH₂O ile 11,5 ml'e tamamlandı. Hazırlanan SDS solüsyonu içerisine tablo 5'te belirtilen miktarlarda 2-merkaptoetanol, gliserol, Tris-HCl eklendi ve pH 6.8'e ayarlandı. Hazırlanan karışıma en son 12,5 mg bromofenol mavisi eklendi ve nihai karışım laminar air- flow kabini içinde 0,20 μ M por çapına sahip filtreden geçirilerek steril edildi. Sterilizasyonu takiben, solüsyon, 2 ml mikro santrifüj tüplere alikotlanarak -20 °C'de saklandı.

Tablo 6. %10 IGEPAL CA-630 (100 ml)

Kimyasal	Miktar	Final Konsantrasyon
IGEPAL CA-630	10 ml	%10

10 ml IGEPAL CA-630 80 ml dH₂O içerisinde, 42 °C su banyosunda çözüldü ve son hacim 100 ml'e dH₂O ile tamamlandı (Tablo 6). Solüsyon oda sıcaklığında saklandı.

Tablo 7. 0,5 M EDTA (100 ml, pH 8,0)

Kimyasal	Miktar	Final Konsantrasyon
EDTA.2Na.2H ₂ O	18,612 g	0,5 M

Disodyum EDTA 70 ml dH₂O'da 4 saat çalkalanarak çözüldü. Solüsyonun pH'ı 8,0'a ayarlandı ve son hacim distile su ile 100 ml'e tamamlandı (Tablo 7).

Tablo 8. 0,5 M HEPES (500 ml, pH 7,4)

Kimyasal	Miktar	Final Konsantrasyon
HEPES	59,575 g	0,5 M

400 ml dH₂O içerisine tablo 8'de belirtilen miktarda HEPES eklendi ve pH 7,4'e ayarlandı. Son hacim dH₂O ile 500 ml'e tamamlandı. Solüsyon oda sıcaklığında saklandı.

Tablo 9. RIPA protein izolasyonu lizis solüsyonu (250 ml)

Kimyasal	Miktar	Final Konsantrasyon
HEPES (0.5 M)	25 ml	50 mM
NaCl (2 M)	37,5 ml	150 mM
%10 IGEPAL CA-630	25 ml	%1
%10 SDS	2,5 ml	%0,1
EDTA (0.5 M)	1 ml	2 mM

RIPA lizis solüsyonu için tablo 9'de belirtilen kimyasallar 159 ml dH₂O içerisinde çözüldü. Solüsyon +4 °C'de saklandı.

Tablo 10. 10X SDS jel yürütme solüsyonu (1 L)

Kimyasal	Miktar	Final Konsantrasyon
Tris baz	30 g	250 mM
Glisin	144 g	1.9 M
SDS	10 g	35 mM

SDS-PAGE stok yürütme solüsyonu için tablo 10’da belirtilen kimyasallar 750 ml dH₂O içerisinde çözüldü ve son hacim 1 L’ye dH₂O ile tamamlandı. Solüsyon oda sıcaklığında saklandı.

Tablo 11. 10X TBS-T yıkama solüsyonu (1 L, pH 7,6)

Kimyasal	Miktar	Final Konsantrasyon
NaCl	80,063 g	1,37 M
Tris baz	4,954 g	40 mM
Tris-HCl	25,06 g	159 mM
Tween-20	10 ml	%1

10X TBS-T solüsyonu hazırlamak için tablo 11’da belirtilen kimyasallar 700 ml dH₂O içerisinde çözüldü ve pH 7,6’ya ayarlandı. Son hacim dH₂O ile 1 L’ye tamamlandı. Solüsyon oda sıcaklığında saklandı.

Tablo 12. Transfer tampon solüsyonu (1,5 L)

Kimyasal	Miktar	Final Konsantrasyon
NaOH	1,14 g	19 mM
CAPS	3,32	10 mM
Etanol	150 ml	%10

Yaklaşık 5 tablet NaOH ve tablo 12’de belirtilen miktarda CAPS ile etanol 1,2 L dH₂O içerisinde, manyetik karıştırıcıda çözüldü. Son hacim distile su ile 1,5 L’ye tamamlandı. Solüsyon oda sıcaklığında saklandı.

Tablo 13. Bloklama & antikör dilüsyon solüsyonu (100 ml)

Kimyasal	Miktar	Final Konsantrasyon
Süt tozu	5 g	%5

Bloklama ve çalışmada kullanılan antikorların dilüsyonu için tablo 13'te belirtildiği gibi 5 g süt tozu 100 ml 1X TBS-T içerisinde çözöldü. Solösyon +4 °C'de saklandı.

Tablo 14. Membran yeniden kazanım solösyonu (50 ml)

Kimyasal	Miktar	Final Konsantrasyon
2-Merkaptoetanol	350	%0.7
%20 SDS	5 ml	%2
1 M Tris pH 6,8	3,125 ml	62,5 mM

Stripping solösyonu hazırlamak için 2-merkaptetanol, %20 SDS ve 1 M Tris pH 6,8 50 ml distile suda çözöldü. Solösyon oda sıcaklığında saklandı (Tablo 14).

3.2. Yöntem

3.2.1. Hücre Kültürü

Çalışmada kullanılan MCF7, HGC27, HELA, HEK293, HEK293-T hücre hatları için, %10 FBS (Gibco), %1 penisilin/streptomisin (Gibco), 2mM L-glutamin içeren, high glucose DMEM (Gibco) besiyeri kullanılmıştır. MKN45 hücre hattı için %10 FBS (Gibco), %1 penisilin/streptomisin (Gibco), 2mM L-glutamin içeren RPMI 1640 (Gibco) besiyeri kullanılmıştır. AGS hücre hattı için %10 FBS (Gibco), %1 penisilin/streptomisin (Gibco), 2mM L-glutamin içeren DMEM-F12 (Gibco) besiyeri kullanılmıştır. Hücreler 37°C'de %5 CO₂'li ortamda kültüre edilmiştir. Çalışmada kullanılan hücre hatları listesi tablo 15'de verilmiştir.

Tablo 15. Çalışmada kullanılan Hücre hatları

Hücre Hattı	Hücre Tipi
MKN45	Mide kanseri
HGC27	Mide kanseri
AGS	Mide kanseri
MCF7	Meme kanseri
HEK293	İnsan embriyonik böbrek

3.2.2. Hücre Sayımı

Xenograft, hücre canlılık, Dil-LDL kolesterol uptake ve kolesterol ölçümü deneylerinde hücre miktarının ayarlanması için manuel olarak Thoma lamı ile hücre sayımı yapıldı. Hücrelerden sayım için homojen şekilde 50 µL alındı, hücreler çok yoğunsa dilüsyon yapıldı ve 20 µL hacim Thoma lamına yüklenerek sayıldı. Alınan partikül sayısından mililitredeki hücre sayısı aşağıdaki gibi hesaplandı.

Hücre sayısı (ml)= Sayılan partikül sayısı $\times 10^4 \times$ (dilüsyon kat sayısı)

3.2.3. Kolesterol Deplesyonu

Hücre hatları, lipoprotein içermeyen, Lipoprotein Deficient Serum (LPDS) kullanılarak hazırlanan DMEM (% 10 LPDS, %1 pen/strep, % 1 L-glutamin, 10 mM Glukoz) besiyeri içerisinde çoğaltılırken, deneylerde kontrol grupları LPDS+ 50 µg/ml LDL veya %10 FBS (normal şartlar) içeren besiyerlerinde çoğaltıldı. İlgili koşullarda 37°C'de %5 CO₂'li etüvde 4 gün çoğaltılan hücrelerde hücre canlılığı belirlendi. LPDS'li deney grubu ve FBS'li kontrol grubu tablo 16'da gösterilmiştir.

Tablo 16. Deney ve kontrol gruplarının besiyeri içeriği

Hücre Hatları	Deney Grupları		
HGC27 TMEM97 KO1	%10 FBS	%10 LPDS	%10 LPDS+LDL
HGC27 TMEM97 KO2	%10 FBS	%10 LPDS	%10 LPDS+LDL
HGC27 KONTROL	%10 FBS	%10 LPDS	%10 LPDS+LDL

3.2.4. Hücre Canlılığının ATP Seviyesinin Ölçülmesi ile Belirlenmesi

Hücre canlılık deneyinde CellTiter GLO Luminescent Reagent (Promega) kit kullanıldı. Bunun için 25000 hücre/ml konsantrasyonda 200 µL hücre süspansiyonu 96 kuyucuklu platelere yukarıda belirtilen koşullarda dörtlü

tekrarlar halinde ekildi. Deney süresinin sonunda plate inkübatörden alındı ve oda sıcaklığına gelmesi için 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Her bir kuyucuğa oda sıcaklığına getirilmiş 40 µL Cell Titer GLO solüsyonu eklenip, plateler oda sıcaklığında 5 dakika, 800 rpm'de mikrolaka çalkalayıcıda çalkalandı. Plate 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Açığa çıkan lüminesans miktarı çok modlu mikrolaka okuyucuda belirlendi. %10 FBS (normal şartlar) içeren kültürde büyüyen hücreler referans alınarak, diğer deney koşullarındaki hücre canlılığı rölatif olarak Microsoft Office Excel programında hesaplandı. Grafikler GraphPad Prism 9 (GraphPAD software inc, ABD) programında oluşturuldu.

3.2.5. Kolesterol Uptake Assay

3.2.5.1. Dil-LDL Assay

Hücrelerin TMEM97 ekspresyonundaki değişikliğe bağlı olarak LDL uptake'leri immünofloresan görüntüleme ile belirlendi. 12 well platede kuyulara, üç tekrarlı olmak üzere, 2 ml %10 FBS'li besiyerinde 150000 hücre ekildi ve 24 saat 37°C'de %5 CO₂'li etüvde inkübe edildi. Hücreler 500 µL PBS ile yıkandı ve %10 LPDS içeren 500 µL DMEM besiyerinde 6 saat 37°C'de %5 CO₂'li etüvde inkübe edildi. Ardından hücrelere 5 µg/ml Dil LDL eklendi. Hücrelerdeki LDL uptake floresan mikroskop altında görüntülendi. Hücreler 500 µL soğuk PBS ile yıkandı. Kuyulara 120 µL, proteaz inhibitörü eklenmiş RIPA lizis buffer eklendi ve plate 10 dakika buz içerisinde inkübe edildi. Plate'in zemini kazınarak hücreler eppendorf tüplere toplandı. Tüpler 12000 rpm'de 4 dakika +4°C'de santrifüj edildi. Süpernatant toplandı, 20 µL'si protein konsantrasyonunun belirlenmesi için BCA kit ile kullanıldı. Süpernatanttan 100 µL şeffaf 96 well plate'e eklendi ve çoklu mod plate okuyucuda 520 uyarılma/580 emisyon değerlerinde floresan ışıma miktarı ölçüldü.

3.2.5.2. NBD-Kolesterol Uptake Assay

Hücrelerin, kolesterol açlığına bırakıldığında, TMEM97 ekspresyonundaki değişime göre kolesterol alımındaki farklılığı saptamak için NBD-Kolesterol (22-(N-(7-Nitrobenz-2-Oxa-1,3-Diazol-4-yl)Amino)-23,24-Bisnor-5-Cholen-3β-Ol) (Thermo Fisher Scientific) assay uygulandı. HGC27 TMEM97 KO1,2 ve kontrol HGC27 hücreleri, 96 well-plate içerisine 4 tekrarlı olarak 15000 hücre/ml olacak şekilde % 10 LPDS, %1 pen/strep, % 1 L-glutamin, 10 mM glikoz içeren fenol kırmızısı içermeyen 200 µl DMEM F-12 besiyerinde ekildi. Hücreler mikrolaka çalkayıcıda 800 rpm'de 5 dakika çalkalandı ve 4 gün 37°C'de %5 CO₂'li etüvde inkübe edildi. 4. Günü sonunda hücrelere 2 mM NBD-Kolesterol'den 1 µl eklenerek final konsantrasyon 10 µM'a ayarlandı. Plate mikrolaka çalkalayıcıda

800 rpm'de 5 dakika çalkalandı ve 37°C'de %5 CO₂'li etüvde 6 saat inkübe edildi. Hücreler Zeiss invert mikroskopta yeşil floresan filtre kullanılarak fotoğraflandı. İnkübasyondan sonra platedeki floresan ışım miktarı, çoklu mod mikropilaka okuyucuda 469 uyarılma/537 emisyon nm'de ölçüldü.

3.2.6. RNA İzolasyonu

TMEM97 baskılanmış HGC27 ve HGC27 hücre hatlarından RNA izolasyonu RNeasy Plus Mini Kit'in protokolüne uygun yapıldı. İlk aşamada Hücreler toplandı ve 1250 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında, fazla besiyerleri atıldı. Elde edilen hücre pelleti PBS ile resüspanse edildi ve 1250 rpm'de 5 dakika daha santrifüj edildi. Bu işlemde sonra PBS tamamen uzaklaştırıldı. Pellet 350 µl RLT lizis solüsyonu ve 350 µl %70 etanol ile resüspanse edildi. Süspansiyon, kitin içerisinde yer alan filtreli kolonların takılı olduğu toplama tüplerine aktarıldı ve 9000 xg'de 15 saniye santrifüj edildi. Kolonlar yeni toplama tüplerine takıldı ve üzerlerine 700 µl RW1 yıkama solüsyonu eklendi. Tekrardan 9000 xg'de 15 saniye santrifüj yapıldı. Toplama tüplerindeki sıvı uzaklaştırıldı. Kolonlar yeniden aynı toplama tüplerine yerleştirildi ve filtreye 500 µl RPE solüsyonu eklendi. Tüpler tekrar 9000 xg'de 15 saniye santrifüj edildi. Toplama tüpünde biriken sıvı atıldı ve kolonlar aynı tüplere takıldı. Üzerlerine 500 µl RPE solüsyonu eklendi ve 9000 xg'de 2 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpündeki sıvı atıldı ve kolonlar yeni toplama tüplerine yerleştirildi. Kolondaki filtrenin kuruması için 14000 xg'de 1 dakika santrifüj yapıldı. Kolonlar RNase-free mikrosantrifüj tüplerine takıldı ve üzerlerine 30 µl RNase-free su eklendi. Tüpler 9000 xg'de 1 dakika santrifüj edildi. Kolonlar atıldı. Elde edilen RNA'ların konsantrasyonları nanodrop spektrofotometre cihazında ölçüldü ve daha sonra cDNA sentezi için kullanılmak üzere -80°C'ye kaldırıldı.

3.2.7. cDNA Sentezi

Elde edilen RNA'lardan cDNA eldesi High-Capacity RNA-to-cDNA Kit kullanılarak protokole uygun yapıldı (Tablo 17). Bütün işlemler buz üzerinde gerçekleştirildi. Tüp hacimleri dH₂O ile 20 µl'ye tamamlanarak Thermal Cycler'da önce 37°C'de 60 dakika, sonra 95°C'de 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyon tamamlanınca cDNA'lar 1:8 oranında nükleaz içermeyen su ile dilüe edilerek qRT-PCR için kullanılmak üzere -20°C'ye kaldırıldı.

Tablo 17. cDNA sentezi için kullanılan kitin protokolü

Karışım Bileşenleri	1X (Hacim)
RNA	1 µg
2x RT buffer mix	10 µl
20x RT enzim mix	1 µl
dH ₂ O	- µl
Total	20 µl

3.2.8. qRT-PCR

Kolesterol metabolizmasında rol oynayan TMEM97, LDLR, SQLE ve HMGCR ile house-keeping gen olarak RPLP0 için primerler Primer3 programı ile tasarlandı. HGC27-TMEM97 KO ve HGC27 hücreleri normal DMEM, %10 LPDS'li DMEM ve %10 LPDS'li DMEM +50 µg/ml LDL içeren besiyerinde 4 gün 37°C'de %5 CO₂'li etüvde inkübe edildi. Hücreler toplandı ve PowerUp SYBR® Green PCR Master Mix protokolü uygulanarak (Tablo 18) Qiagen Rotor Gene Q cihazında tablo 19'da belirtilen koşullar ayarlanarak gen ekspresyonları tespit edildi. Çalışmada kullanılan primerler tablo 20'de verilmiştir.

Tablo 18. qRT-PCR için kullanılan kitin protokolü

Karışım Bileşenleri	1X (Hacim)
PowerUp SYBR® Green PCR Master Mix	10 µl
Primer Forward (10 µm)	0,5 µl
Primer Reverse (10 µm)	0,5 µl
cDNA	2 µl
dH ₂ O	7 µl
Total	20 µl

Tablo 19. qRT-PCR Koşulları

qPCR Koşulları		
UDG aktivasyonu	50 °C	2 dk
Başlangıç denatürasyonu	95 °C	2 dk
Denatürasyon	95 °C	15 sn
Bağlanma	60 °C	15 sn
Sentez	72 °C	60 sn
Bekleme	4 °C	∞

40 Döngü

Tablo 20. qRT-PCR primer listesi

Gen	1X (Hacim)	Primer dizisi
RPLP0	Forward	AGCATCTACAACCCTGAAGTG
	Reverse	AGCAAGTGGGAAGGTGTAATC
HMGCR	Forward	GCCATTTTGCCCGAGTTT TAG
	Reverse	TGCCAGAGGGAAACACTTG
SQLE	Forward	GATGCAGCTATTTTCGAGGC
	Reverse	AGGGTTAGGAGACAATACAGAAAG
LDLR	Forward	ACATCTACTGGACCGACTCTG
	Reverse	TGTTTTTCAGTCACCAGCGAG

3.2.9. Protein İzolasyonu

Hücreler 1×10^6 olacak şekilde T25 flaska 5 ml %10 FBS %1 pen/strep %1 L-glutamin içeren DMEM besiyeri içerisine ekildi. Flask gece boyunca 37 °C, %5 CO₂ sağlayan inkübatörde inkübe edildi. İnkübasyonu takiben hücreler, 1 ml %0,25 Trypsin-EDTA yardımıyla 15 mL falkona toplandı. Falkon 3000 rpm'de 2 dakika + 4 °C'de santrifüj edildi. Pellet buzda soğutulmuş 500 µL PBS ile resüspanse edilip mikrosantrifüj tüplere alındı. Tekrar 3000 rpm'de 2 dakika + 4 °C'de santrifüj edildi. PBS pelleti bozmadan ortamdan uzaklaştırıldı. Pelletin

üzerine 200 µL (100000-300000 hücre için) , proteaz inhibitörü eklenmiş, RIPA lizis solüsyonu eklenip birkaç kez pipetlendi. 10 dakika buzda lizis için bekletildi. Tüpler 12000 rpm'de 4 dakika +4 °C'de santrifüj edildi. Protein konsantrasyonları Bicinchoninic Acid (BCA) Assay kullanılarak üretici firmanın önerdiği protokol uygulanarak ölçüldü. Örneklerdeki protein miktarları lizis solüsyonu kullanılarak eşitlendi.

3.2.10. Western Blotlama

Western Blotlama için protein örneklerinin konsantrasyonları 1000 µg/ml'ye son hacim 160 µL olacak şekilde ayarlandı. Üzerlerine 5X protein yükleme tamponundan 40 µL eklendi. Örneklerden 20 µL %4-12'lik Tris-Glisin jellere yüklenerek SDS-PAGE jel elektroforezi yapıldı. Elektroforez sonrası jeller ıslak transfer yöntemi ile 0,45 µm pore çapına sahip PVDF membrana transfer edildi. Transfer sonrası membran 1 saat %5 yağsız süt tozu/1X TBS-T solüsyonu içerisinde çalkalayıcı üzerinde bloklandı. Bloklanan membranlar 1:1000 konsantrasyonda primer antikor ile bir gece +4 °C'de blotlandı. Ertesi gün 3 kere 1X TBS-T ile yıkanıp 1:2000 konsantrasyonda sekonder antikor ile oda ısında 1 saat blotlandı. Proteinlerin kemilüminesan görüntülenebilmesi için membran 3 dakika, ECL solüsyonu ile muamele edildi. Görüntüler Azure C300 cihazında alındı. Housekeeping proteinlerin tespiti için membranlara yeniden kazanım (stripping) yapıldı. Membranlar 5 ml stripping solüsyonunda 30 dakika 60 °C su banyosunda inkübe edildi. Ardından 3 kez 5'er dakika dH₂O içerisinde oda sıcaklığında çalkalayıcı da inkübe edildi. Bloklama, blotlama, yıkama ve diğer aşamalar tekrar edilerek görüntü elde edildi.

3.2.11. TMEM97 Susturulmuş Hücre Hatlarının Eldesi

3.2.11.1. TMEM97 KO için CRISPR/Cas9 Plazmitlerinin Hazırlanması

TMEM97 geni için 5 farklı guideRNA (gRNA) UCSC genome browser ve crispr.mit.edu web sayfaları kullanılarak belirlendi (Tablo 21.). gRNA'lar LentiCRISPR V2 vektörüne klonlandı. Klonlama için öncelikle LentiCRISPR V2 vektörü BsmBI restriksiyon endonükleazı ile 30 dakika 37 °C'de kesildi (Tablo 22.). Aynı zamanda tablo 21'deki sgRNA'lar T4 PNK (NEB) enzimi ile fosforillendi ve bağlandı (Tablo 23.). Bağlanma thermal cycler cihazında gerçekleştirilmiştir ve koşullar tablo 24'te belirtilmiştir. Bağlanmış sgRNA'lar 1:200 oranında dH₂O ile sulandırıldı. Klonlama için sulandırılmış sgRNA'lar ile kesilmiş vektör T4 DNA ligaz (NEB) enzimi kullanılarak 37 °C'de 30 dakika inkübasyon koşullarında bağlandı (Tablo 25.). Transformasyon için ligasyon ürünlerinden 5 µl alındı ve 50 µl E. coli STBL3 suşu içerisine aktarıldı. Mikrosantrifüj tüpündeki bakteri ve plazmid karışımı 10 dakika buz içerisinde

inkübe edildi. İnkübasyon sonrası tüp, 30 saniye 42 °C su banyosunda bekletilerek, bakteri ısı şokuna uğratıldı. Ardından tüp 2 dakika buzda inkübe edildi. Karışım 300 µl zenginleştirilmiş LB (SOC) besiyerine aktarıldı ve 45 dakika çalkalayıcıda inkübe edildi. Kültür, 3000 rpm'de 3 dakika santrifüj yapıldı. Supernatant atıldı ve bakteri pelleti 30 µl SOC besiyerinde resüspanse edilerek 1:1000 oranında ampisilinli petriye ekildi. Petri 30 °C'de 20 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası petriden tek koloni seçildi ve 5 ml ampisilinli LB içerisine aktarılarak gece boyu 37 °C'de kültürlendi. Kültürden MN plazmid izolasyonu protokolüne uygun olarak DNA izole edildi. Klonlama, %1'lik agaroz jel ile gerçekleştirilen agaroz jel elektroforezde doğrulandı.

Tablo 21. sgRNA'ler için sipariş verilen oligonükleotid dizileri

TMEM97 sgRNA_1F	caccGAGGAAGGCATACGTTGCAA
TMEM97 sgRNA_1R	aaacTTGCAACGTATGCCTTCCTC
TMEM97 sgRNA_2F	caccGCGCGAGCTCTACCCAGTCG
TMEM97 sgRNA_2R	aaacCGACTGGGTAGAGCTCGCGC
TMEM97 sgRNA_3F	caccGGGCGCCCCTCACCTCGACT
TMEM97 sgRNA_3R	aaacAGTCGAGGTGAGGGGCGCCC
TMEM97 sgRNA_4F	caccgCCTGCTGAAGTGGTATGCTA
TMEM97 sgRNA_4R	aaacTAGCATACCACTTCAGCAGGC
TMEM97 sgRNA_5F	caccgCATTTACCAACCTTTGAGGA
TMEM97 sgRNA_5R	aaacTCCTCAAAGGTTGGTAAATGC
control sgRNA_2F	caccgATTATACCTCTTCACAGCTG
control sgRNA_2R	aaacCAGCTGTGAAGAGGTATAATC

Tablo 22. BsmBI restriksiyon endonükleazı ile kesim protokolü

Karışım Bileşenleri	Miktar
LentiCRISPR V2 plazmid	5 µg
FastDigest BsmBI enzim	3 µl
FastAP alkalın fosfataz	3 µl
10X FastDigest buffer	6 µl

dH ₂ O	- µl
Total	60 µl

Tablo 23. sgRNA'ların bağlanması (annealing)

Karışım Bileşenleri	Miktar
sgRNA Forward primer	1 µl
sgRNA Reverse primer	1 µl
10X T4 ligasyon buffer	1 µl
T4 PNK	0,5 µl
dH ₂ O	6,5 µl
Total	10 µl

Tablo 24. sgRNA'ların bağlanma koşulları

Derece	Dakika
37 °C	30
95 °C	5
5 °C	1
25 °C	∞

Tablo 25. sgRNA'lar ile vektörün ligasyon protokolü

Karışım Bileşenleri	Miktar
Bağlanmış sgRNA	1 µl
Kesilmiş LentiCRISPR V2 plazmid	2 µl (50 ng)
10X T4 ligasyon buffer	1 µl
dH ₂ O	6 µl
T4 DNA ligaz	1 µl

3.2.11.2. Virüs Üretimi ve Transfeksiyon

Virüs üretimi XtremeGene 9 transfeksiyon ajanı protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi. Protokole göre ilk önce 6 well plate'in 5 kuyusuna 5×10^5 sayıda Hek293T hücresi 1,9 ml %5 FBS %1 L-glutamin içeren DMEM besiyeri içerisine ekildi ve plate 37 °C %5 CO₂ etüvde gece boyu, hücrelerin kuyuların %80-%90'ını kaplaması için inkübe edildi. Transfeksiyon karışımı için sgRNA'ları içeren rekombinant vektör ile paketleme ve kılıf DNA'ları (pVSV-G, pLP1 ve pLP2) ve transfeksiyon ajanı tablo 26'da belirtilen miktarlarda 100 µl serum ve antibiyotik içermeyen DMEM besiyeri içerisine eklendi. Karışım oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi. Ardından 1 gün önce ekilen Hek293T hücrelerine damla damla damlatıldı. Plate 24 saat 37 °C %5 CO₂ etüvde inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücrelerin besiyeri %10 FBS %1 pen/strep %1 L-glutamin içeren 3 ml DMEM besiyeri ile değiştirildi. Plate 24 saat 37 °C %5 CO₂ etüvde inkübe edildi. İnkübasyon sonrası virüs içeren besiyerleri 15 ml'lik falkon tüplere toplandı ve 0,45 µm por çapına sahip filtreden, enjeksiyon yardımıyla, geçirildi. Elde edilen virüsler -80 °C'ye kaldırıldı. Transfeksiyon için 3×10^5 HGC27 hücreleri 6 well plate'in 5 kuyusuna 2 ml %10 FBS %1 L-glutamin içeren DMEM besiyeri içerisine ekildi ve plate gece boyu, kuyuların %60-%70'inin kaplanması için, 37 °C %5 CO₂ etüvde inkübe edildi. Virüsler -80 °C dolabından çıkarıldı ve 37 °C su banyosunda çözüldü. İnkübasyondan çıkan hücrelere 8 µg/ml olacak şekilde polybrene ve 1'er ml virüs damla damla eklendi. Plate elle hafifçe çalkalandı ve 1 saat 2200 rpm 30 °C'de santrifüj edildi. Santrifüjden sonra plate 37 °C %5 CO₂ etüvde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonu takiben hücrelerin besiyeri %10 FBS %1 pen/strep %1 L-glutamin içeren 3 ml DMEM besiyeri ile değiştirildi ve hücreler 24 saat 37 °C %5 CO₂ etüvde inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün hücrelere final konsantrasyonu 2 µg/ml şeklinde puromisin eklendi ve plate 3 gün 37 °C %5 CO₂ etüvde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra hücreler mikroskopta kontrol edildi ve kontrol hücrelerinin tamamen öldüğü gözlenirken deney gruplarındaki hücrelerde yüksek hücre popülasyonu saptandı.

Tablo 26. 6 well plate için XtremeGene 9 transfeksiyon karışımı

Karışım Bileşenleri	Miktar
sgRNA içeren LentiCRISPR V2 plazmid	1,5 µg
pVSVG	1,5 µg
pLP1	1,5 µg

pLP2	1,5 µg
XtremeGene 9 transfeksiyon ajanı	18 µl
Serumsuz ve antibiyotiksiz DMEM	100 µl

3.2.11.3. Tek Hücre Klonlama Yöntemiyle TMEM97 KO Hücrelerin Tespiti

Tek hücre klonlama yöntemi için hücreler tripsin ile kaldırıldı ve 15 ml falkonlara toplanarak 1250 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Hücre pelleti 2 ml %10 FBS %1 pen/strep %1 L-glutamin içeren DMEM besiyeri ile resüspanse edildi ve hücre sayımı yapıldı. Her bir hücre grubu için 96 şeffaf well plate'lere ilk sütunun ilk kuyusunda 6000 hücre olacak şekilde 200 µl %10 FBS %1 pen/strep %1 L-glutaminli DMEM besiyeri içerisine ekildi. Bu yöntemde içerikleri aynı DMEM besiyeri kullanıldı. İlk sütunun 1. kuyusu hariç diğer kuyulara aynı besiyerinden 100'er µl eklendi. İlk kuyudan 100 µl hücre, pipetleme yapılarak, alındı ve 1. sütunun 2. kuyusuna eklendi. Ardından 2. kuyudan 100 µl hücre alınarak 3. kuyuya eklendi. Bu işlem ilk sütunun son kuyusuna kadar devam etti. Son kuyuya da 100 µl hücre eklenince ilk sütunun diğer kuyularına 100 µl besiyeri eklendi ve bütün kuyularda son hacim 200 µl oldu. Rezervuara 20 ml besiyeri döküldü ve çoklu mod pipet ile 100 µl alınarak 1. sütun hariç tüm kuyulara 100 µl eklendi. Ardından 1. sütundaki hücrelerden, pipetleme yapılarak, 100 µl alınarak 2. sütuna aktarıldı. Sonra 2. sütundaki hücrelerden 100 µl alınarak 3. sütuna aktarıldı. Bu işlem son sütuna kadar devam etti. Son sütun da tamamlanınca, son sütun hariç diğer tüm kuyulara 100 µl besiyeri eklenerek son hacim 200 µl'ye tamamlandı. Plate 1 ay boyunca, haftada 1 besiyeri tazelenerek, 37 °C %5 CO₂ etüvde inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonrası hücreler mikroskopta kontrol edili ve tek hücre kolonileri saptandı. Gözlenen koloniler tripsin ile kaldırıldı ve mikrosantrifüj tüplerinde 1250 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Pellet besiyerinde süspanse edildi ve hücreler 6 well plate'lere ekildi. Plate 37 °C %5 CO₂ etüvde 1 hafta inkübe edildi. Inkübasyondan sonra hücre aynı şekilde toplanarak bu sefer T25 flaska ekildi ve aynı süre etüvde inkübe edildi. Inkübasyon sonrası hücrelerden protein izolasyonu yapılarak TMEM97 protein ekspresyon seviyesi Western Blotlama ile kontrol edildi. TMEM97 ekspresyonu gözlenmeyen hücreler etiketlendi sonraki deneylere bu hücreler ile devam edildi.

3.2.12. Plazmid izolasyonu (Miniprep)

Petri kabındaki tek koloniler, 10 mikrolitrelik pipet uçlarıyla alınarak, 1:1000 oranında ampisilin içeren 15 ml falkon tüplerdeki 4 ml LB besiyerine aktarıldı. Bu kültür 250 rpm'de 37 °C'de bir gece boyunca çalkalandı. Falkon tüpteki kültürler 4000 xg'de 10 dk santrifüj yapıldı. Nucleospin miniprep kit protokolüne uygun olarak süpernatant uzaklaştırıldı ve bakteri pelletleri 250 µl A1 solüsyonu ile

vortex ve pipetleme yardımıyla resüspanse edildi. Süspansiyonlar 1.5 ml mikrosantrifüj tüplerine alındı ve üzerine 250 µl A2 solüsyonu ilave edildi. Tüpler 8 kez yavaşça ters yüz edilerek karıştırıldı ve 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Ardından üzerine 300 µl A3 solüsyonu eklendi ve tüpler tekrar 8 kez yavaşça ters yüz edildi. Süspansiyon 11000 xg'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant, kitin içeriğinde bulunan, filtreli kolona aktarıldı ve kolon 11000 xg'de 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpündeki sıvı atıldı ve kolona 500 µl 50 °C'de ısıtılmış AW yıkama solüsyonu eklendi. Kolon 11000 xg'de 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpündeki atık uzaklaştırıldı. Filtreye 600 µl A4 yıkama solüsyonu eklendi ve kolon 11000 xg'de 1 dakika santrifüj edildi. Kolon yeni bir toplama tüpüne takıldı ve 11000 xg'de 2 dakika santrifüj edildi. Kolon 1,5 ml mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi ve filtreye yapışan DNA'yı çöktürmek için 50 µl AE elüsyon solüsyonu eklendi. Kolon 3 dakika oda sıcaklığında bekletildi ve ardından 11000 xg'de 1 dakika santrifüj edildi. Kolon atıldı ve mikrosantrifüj tüpüne çöktürülen plazmid DNA'sının konsantrasyonu nanodrop'ta ölçüldü.

3.2.13. Hücrelerde Total Kolesterol Ölçümü

Ölçüm, Amplex Red Cholesterol Assay kit kullanılarak, kitin önerdiği protokol doğrultusunda yapıldı. Deney için TMEM97 KO HGC27 hücreleri ve kontrol grubu için de TMEM97 eksprese eden HGC27 hücreleri 20000 cells/ml konsantrasyonda 72 saat boyunca DMEM+FBS, DMEM+LPDS, DMEM+LPDS+50 µg/ml LDL içeren besiyerlerinde 12 well-plate'de 37°C %5 CO₂ etüvde çoğaltıldılar. Aynı deney TMEM97 overeksprese MKN45 hücre hattında da uygulanmıştır. Hücrelerden total protein izolasyonu yapıldı ve total kolesterol miktarı total protein miktarına bölünerek normalize edildi.

3.2.14. Xenograft

TMEM97 geninin tümör gelişimi üzerindeki etkisinin gözlenmesi ve tümörün histolojik analizlerinin gerçekleştirilmesi amacıyla TMEM97 baskılanmış ve eksprese eden HGC27 hücre hatları ile xenograft deneyi yapıldı. Deneyde her bir hücre hattı için 8 tane olmak üzere toplam 24 nude fare kullanıldı. Enjeksiyon, farelerin sağ böğür bölgesine matrijel içerisinde 1 milyon hücre enjekte edilerek gerçekleştirildi. Deney, Corning® Matrigel® Matrix (Cat. Nos. 354234) protokolü doğrultusunda yapıldı. Deneye başlamadan 4 saat önce R&D Systems™ Cultrex Basement Membrane Extract (Type 3, Pathclear (363200102)) matrijel -20 °C'den +4 °C'ye alındı. Ayrıca deneyde kullanılacak pipet uçları, mikrosantrifüj tüpleri ve 26 G'lik insülin şırıngaları -20 °C'ye alındı. İlk aşamada HGC27 TMEM97 KO 1, KO 2 ve kontrol hücreleri 10 mm³ hücre kültürü şişlerine 1x10⁶ hücre 10 ml fenol kırmızısı içermeyen %10 FBS %1 pen/strep %1 L-glutaminli DMEM içerisine ekildi ve gece boyu 37 °C %5 CO₂ etüvde inkübe edildi. Ertesi gün

platedeki hücreler tripsinle kaldırıldı ve 15 ml falkon tüplere toplanarak 1250 rpm'de 5 dakika +4 °C'de santrifüjlendi. Supernatant tamamen uzaklaştırıldı. Falkonlar ve PBS buza yerleştirildi. Pellet 2 ml soğuk PBS'de çözüldü ve hücre sayımı yapıldı. Enjeksiyon 100 µl hacimde gerçekleştirileceği ve 1:1 hücre:matrijel konsantrasyonu olacağı için süspansiyondan her hücre grubu için 8 milyon hücre miktarı alınarak yeni falkon tüplere aktararak 1250 rpm'de 5 dakika +4 °C'de santrifüj edildi. Süpernatant tamamen uzaklaştırıldı ve pellet 400 µl %10 FBS %1 pen/strep %1 L-glutaminli fenol kırmızısı içermeyen DMEM besiyeri ile çözüldü. Matrijel +4 °C'den, diğer materyaller ise -20 °C'den alınarak buza yerleştirildi. Soğuk matrijel'den 50'şer µl, soğuk pipet ucu aracılığı ile, 24 tane mikrosantrifüj tüpüne eklendi. Bu sırada matrijelin köpürtülmemesine dikkat edildi. Hücrelere fazlaca pipetleme yapıldı ve ilgili mikrosantrifüj tüplerine 50'şer µl dağıtıldı. Karışımın homojen olması için 3-4 kez pipetleme yapıldı. Karışım hazır olunca hızlıca enjeksiyon aşamasına geçildi. Fareler şeffaf indüksiyon kutusuna alındı, ilk etapta %3 konsantrasyonda izofluran ile indüksiyon sağlandıktan sonra maske ile %2 konsantrasyonda anestezi devam ettirildi. 26 G'lik enjektörün iğnesi çıkarıldı ve matrijel karışımı 1-2 kez karıştırılarak çekildi ve enjektöre iğnesi takıldı. Hayvanın sağ böğür bölgesindeki deri metal pens yardımıyla kaldırıldı, bölge %70 etanol püskürtülmüş peçete ile silindi ve karışım oluşan deri altı boşluğa enjekte edildi. Subkutan enjeksiyon sonrası fareler hassas terazide tartılarak ağırlıkları, tarih, ağırlık (g) ve hayvan grubu (TMEM97 KO 1, TMEM97 KO 2 ve kontrol) şeklinde not edildi. Ayrıca hayvanlar, kulak zımbası kullanılarak etiketlendi. Prosedürden sonra matrijel degradasyonu için 1 hafta beklendi. Ardından haftada 2 kez hayvanlar tartıldı ve tümör oluşumu kaliper yardımıyla ölçüldü. Deney 52 gün sonra durduruldu. Hayvanlar şeffaf pleksiglas CO₂ solutma kutusuna 2'şerli gruplar halinde alındı ve hipoksik şok ile sakrifiye edildi.

3.2.15. Tümör Dokularının Toplanması

Xenograft deneyi sonlandırıldıktan, tüm hayvanlar sakrifiye edildikten, sonra subkutan tümörler farelerden aseptik koşullarda, makas ve penset yardımıyla, yağ dokusu alınmadan, toplandı. Farelerin ve tümörlerin boyutu cetvel yardımıyla ölçüldü. Ayrıca elde edilen tümörler tartıldı. Tartım işleminden sonra tümörler, 50 ml falkon tüplerde %10 formalin tamponlu nötral fiksatif içinde 1 hafta +4 °C'de saklandı.

3.2.16. Hematoksilen & eozin ve İmmunohistokimya

Dokular nötral fiksatifinde fiksasyon sonrasında alkol serisinden geçirilerek dehidre edildi ve parafine gömüldü. Parafine gömülü dokulardan 4 µm'lik kesitler alındı ve 60 °C'de ısıtıldı. Ksilenle deparafinizasyon yapıldı ve kesitler

yeniden hidratlandı. Örnekler hematoxilen eozin (H&E) boyamasına veya immunohistokimyaya (IHC) tabi tutuldu. Slaytlar Olympus BX61 mikroskopu altında görüntülendi ve Olympus DP72 kamera ile fotoğraflandı. Fotoğraflar Fiji kullanılarak değerlendirildi.

IHC boyaması SensiTek HRP Anti-Polyvalent Lab Pack kullanılarak yapıldı. Kısaca endojen peroksidaz aktivitesini bloke etmek için kesitler %3'lük hidrojen peroksitte 20 dakika inkübe edildi. Antijen geri kazanımı, slaytların Tris-EDTA tamponunda ısıtılması ve 20 dakika boyunca 95 °C'ye kadar ısıtılmasıyla elde edildi. Bloklama sonrası kesitler Ki-67 (orb389335), SQLE (Proteintech, 12544-1-AP), SREBF1 (Proteintech, 14088-1-AP), SREBF2 (Proteintech, 14508-1-AP) antikorları ile 4 °C'de gece boyunca inkübe edildi. Biyotinlenmiş sekonder antikor ve streptavidin/HRP, oda sıcaklığında 20 dakika süreyle uygulandı. Son aşamada kromojen olarak DAB (diaminobenzidin) kullanıldı ve çekirdekler hematoxilen ile zıt boyandı.

3.2.17. TUNEL Assay

Apoptoz tespiti için One-step TUNEL In Situ Apoptosis Kit (Elabscience, E-CK-A320) kullanıldı. Slaytlar 1 gece 60 °C'de inkübe edildi. Deparafinizasyon aşaması için slaytlar oda sıcaklığında sırasıyla 2 dakika 1 kez ve 10 dakika 2 kez saf ksilende inkübe edildi. İnkübasyonu takiben slaytlar sırasıyla, her aşamada 3 dakika inkübe edilerek, %100, %96, %90, %80 ve %70'lik etanol serisinden geçirildi. Slaytlar 2 kez 5'er dakika PBS ile yıkandı. Örnekler nemlendirilmiş kutuya yerleştirildi. Dokulardan PBS tamamen uzaklaştırıldı ve üzerlerine Proteinaz K eklenerek 37 °C'de 20 dakika inkübasyon yapıldı. Ardından 3 kez 5'er dakika PBS ile yıkama yapıldı. Slaytlardaki pozitif ve negatif kontrol gruplarına DNaz I tampon solüsyonu eklendi ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. Ardından solüsyonların tamamı uzaklaştırıldı ve pozitif kontrole DNaz I (200 U/ml) enzimi eklenirken negatif kontrol ve deney grubuna DNaz I tampon solüsyonu eklenerek 37 °C'de 30 dakika inkübasyon yapıldı. Slaytlar 3 kez 5'er dakika PBS ile yıkandı. Tüm örneklerle TdT equilibration solüsyonu eklendi ve 37 °C'de 30 dakika inkübasyon yapıldı. Solüsyon tamamen uzaklaştırıldı ve etiketleme için FITC labeling working (Tablo 27.) solüsyonu pozitif kontrol ve deney grubuna eklenirken, TdT enzimi içermeyen labeling working solüsyonu negatif kontrole eklendi. Slaytlar 37 °C'de 60 dakika inkübe edildi. Ardından 3 kez 5'er dakika PBS ile yıkama yapıldı. Zıt boyama için tüm örneklerle DAPI solüsyonu eklendi ve 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyon yapıldı. Slaytlar 4 kez 5'er dakika PBS ile yıkandı. Görüntüleme işlemi için slaytlara entellan eklendi ve lamel kullanılarak kapatma işlemi yapıldı. Olympus BX61 mikroskop kullanılarak örnekler görüntülendi ve Olympus DP72 kamera

kullanılarak fotoğraflandı. Apoptotik indeks, fotoğrafların Fiji uygulamasında değerlendirilmesiyle, apoptotik hücre sayısının toplam hücre sayısına bölünmesiyle hesaplandı.

Tablo 27. Tek bir preparat için FITC labeling working solüsyon içeriği

Karışım Bileşenleri	Miktar
TdT equilibration solüsyonu	49 µl
TdT enzim	7 µl
FITC labeling solüsyonu	14 µl
Total	70 µl

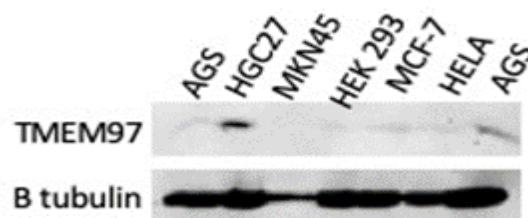
3.2.18. İstatistiksel Hesaplamalar

Elde edilen veriler için istatistiksel hesaplamalar Ortalama $\pm$ Standart Sapma veya Ortalama $\pm$ Standart Hata şeklinde yapılmıştır. Farklı gruplar arasındaki ve içindeki anlamlı fark olup olmadığını değerlendirmek için Student's t-test yöntemi kullanıldı. Verilerin analizi ve görselleştirilmesi için GraphPad PrismV9 yazılımı kullanıldı.

4. BULGULAR

4.1. TMEM97 Geninin HGC27 Hücrelerinde CRISPR/Cas9 ile Susturulması

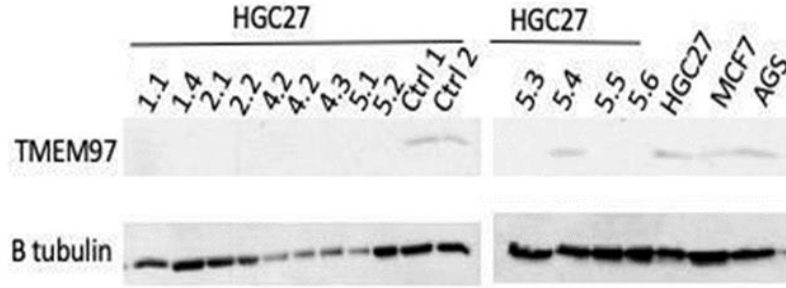
Laboratuvarda bulunan farklı hücre hatlarında TMEM97 protein ekspresyonu kontrol edildi (Şekil 6.). MCF7, HGC27, MKN45, HEK293, HELA ve AGS hücrelerinde TMEM97 ekspresyonu yüksek bulunan hücrelerden mide kanser hücre hattı HGC27 CRISPR/Cas9 yöntemi ile susturulmasına karar verildi.



Şekil 6. AGS, HGC27, MKN45, HEK 293, MCF7, HELA hücrelerinde TMEM97 ekspresyonu. AGS son kuyucuğa yeniden yüklendi.

TMEM97 ekspresyonu fazla olduğu belirlenen HGC27 hücre hatlarında CRISPR/Cas9 ile TMEM97 geni susturuldu. Tablo 21'deki sgRNA'lar ile transfeksiyon sonrası tek koloniler seçildi ve çoğaltıldı. Hücrelerden protein

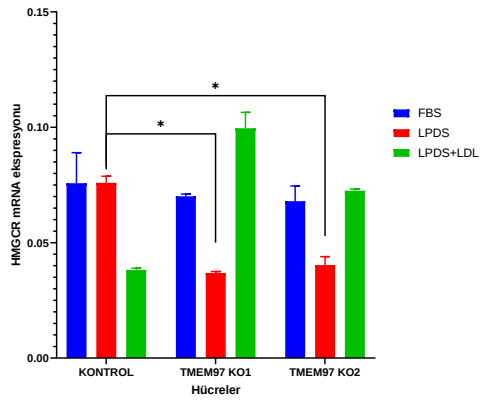
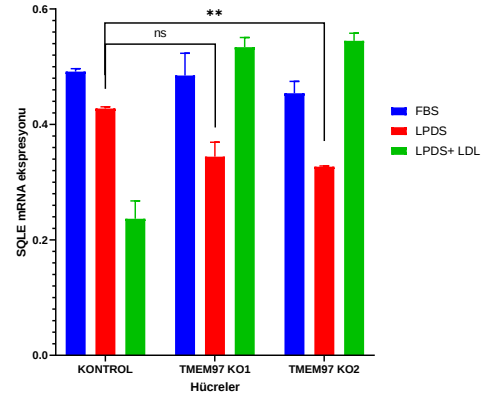
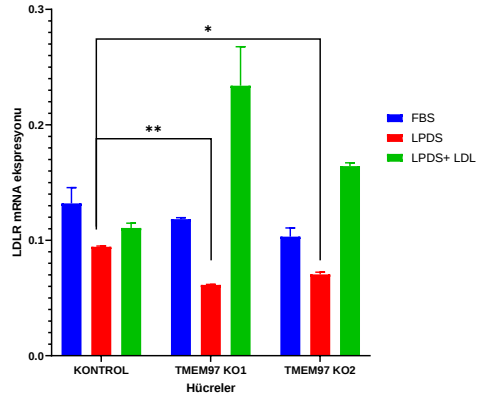
izolasyonu yapıldı ve TMEM97 proteinini eksprese etmeyen koloniler, western blot yöntemi ile tespit edildi (Şekil 7.). HGC27 sgRNA5-koloni 4'te TMEM97 ekspresyonu gözlemlendi. Diğer hücre hatlarında TMEM97 ekspresyonu olmadığı gözlemlenmiştir.



Şekil 7. CRISPR/Cas9 ile TMEM97 susturulması. HGC27 hücre hatlarında viral enfeksiyon sonrası seçilen kolonilerin tamamen KO olup olmadıkları western blot ile doğrulandı. İki basamaklı ifadelerde ilk rakam sgRNA numarası, ikinci rakam seçilen koloni numarasıdır.

4.2. TMEM97 Ekspresyon Düzeyi Farklı Hücrelerde Kolesterol Biyosentezinde Rol Alan Anahtar Genlerin Ekspresyonlarının qRT-PCR ile Belirlenmesi

Normal besiyeri, LPDS'li besiyeri ve LPDS+LDL içeren besiyerinde çoğaltılan HGC27-TMEM97 KO hücrelerden RNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen RNA'lar ile qRT-PCR'da LDLR, SQLE ve HMGCR gen ekspresyonları belirlendi. TMEM97 KO LPDS'li besiyerinde çoğalan hücrelerde her üç genin de ekspresyon seviyesinin kontrol grubuna kıyasla azaldığı gözlemlendi (Şekil 8.).

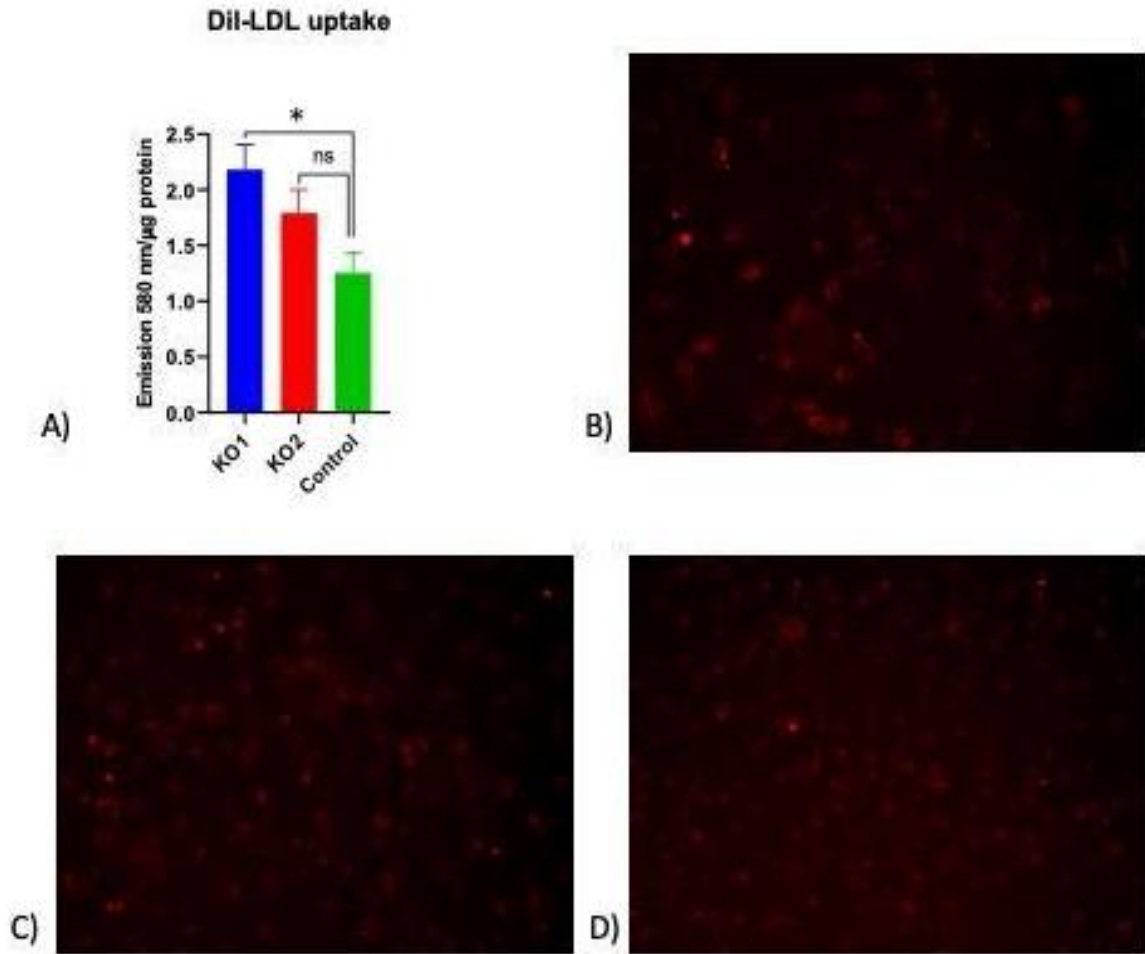


Şekil 8. HGC27 TMEM97 KO hücrelerde LDLR, SQLE ve HMGCR gen ekspresyonlarının belirlenmesi. (Data mean $\pm$ SEM olarak sunuldu, * p<0.05, ** p<0.01.).

4.3. Kolesterol Uptake'in Belirlenmesi

4.3.1. Dil-LDL Assay

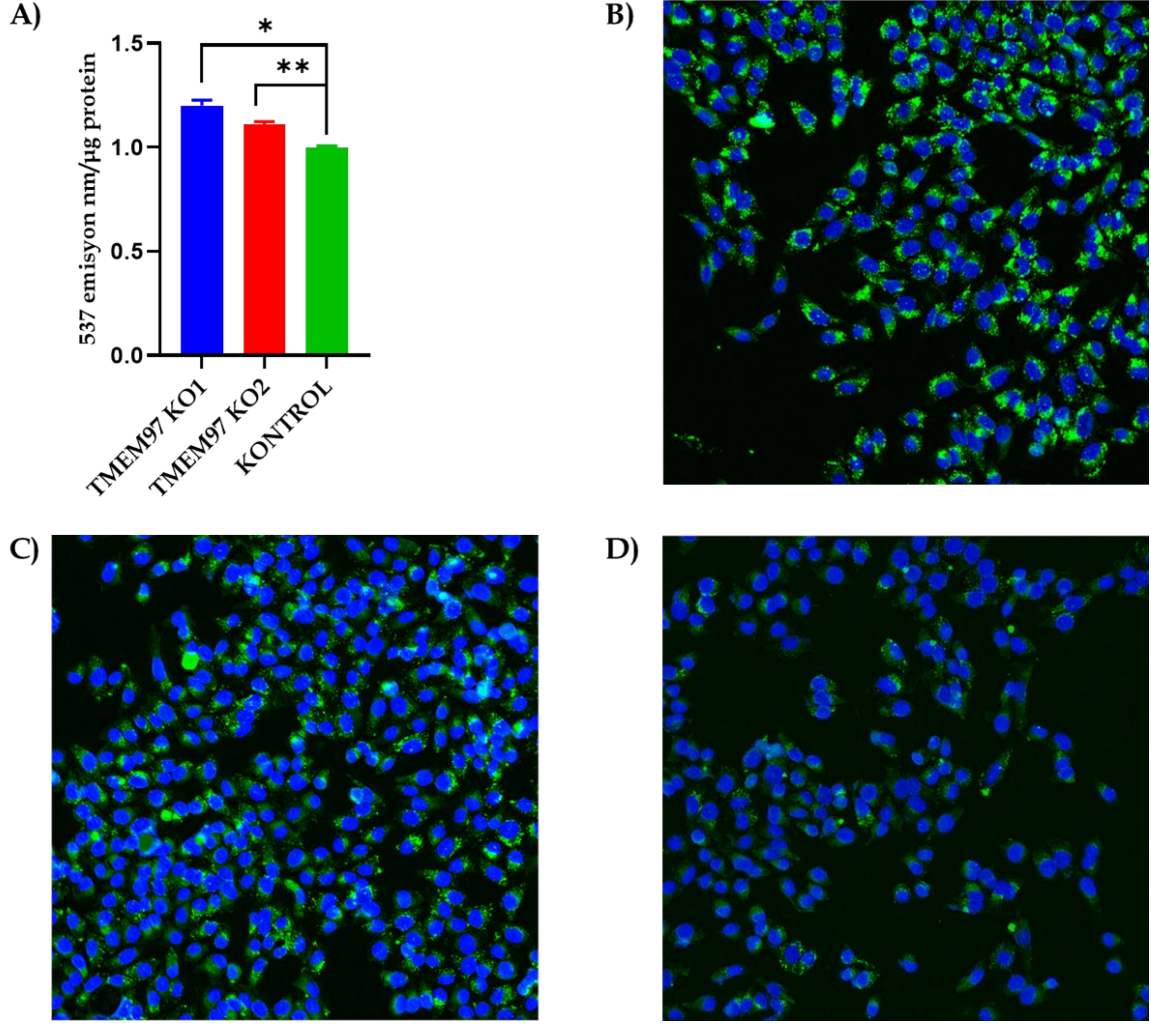
Hücre dışı işaretli kolesterol alımı TMEM97 KO yapılmış HGC27 hücre hatlarında belirlendi. LPDS'li besiyerinde çoğaltılan TMEM97 susturulmuş hücre hatlarında, kontrol hücrelerine kıyasla, kolesterol alımında artış gözlemlendi (Şekil 9.). Hücrelerdeki Dil-LDL alımı floresan mikroskop ile görüntülendi.



Şekil 9. TMEM97 KO hücrelerde Dil-LDL alımı. A) 1 μ g protein başına düşen floresan ölçüm spektrofotometrik olarak belirlendi (Data mean $\pm$ SD olarak sunuldu, * $p < 0.05$). B, C ve D Dil-LDL alımının representatif mikroskopik görüntüleri B) TMEM97 KO1 HGC27, C) TMEM97 KO2 HGC27, D) Kontrol HGC27. 20X magnifikasyon.

4.3.2. NBD-Kolesterol Assay

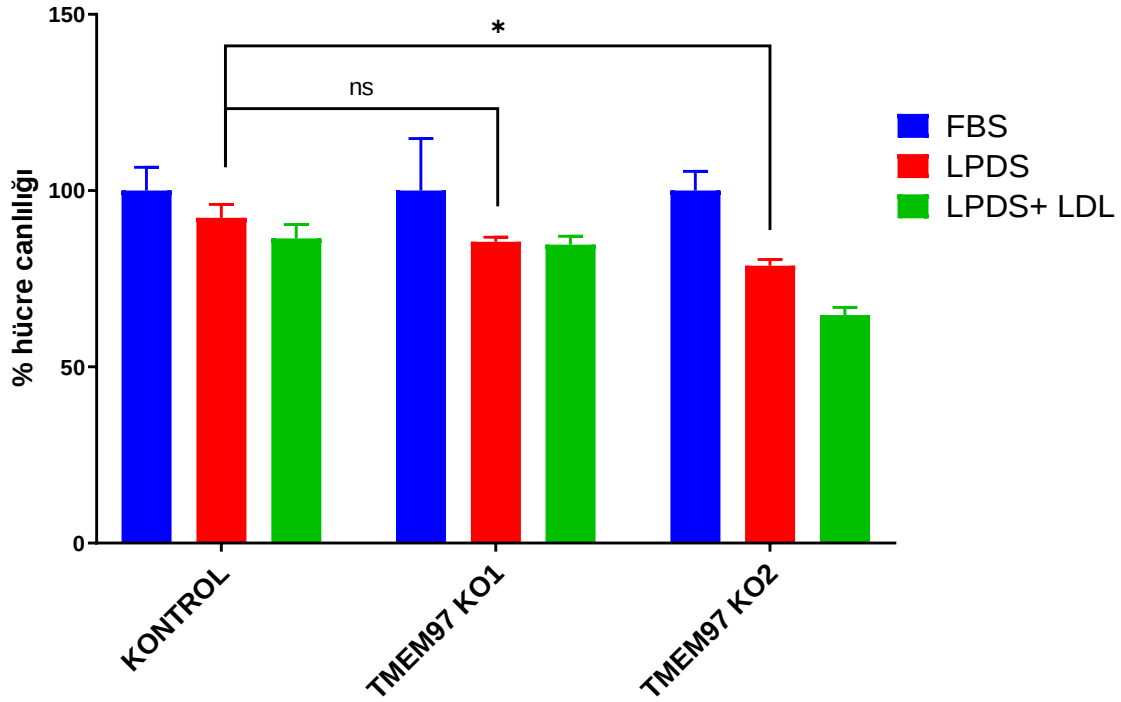
Lipoprotein içermeyen besiyerinde 4 gün boyunca kolesterol açlığına bırakılan TMEM97 KO HGC27 hücrelerinde hücre dışı kolesterol alımındaki oranı göstermek için hücreler 10 μ M NBD etiketli kolesterol ile muamele edilmiştir. TMEM97 baskılanmış hücreler kontrol hücrelerine kıyasla hücre dışı kolesterole daha çok rağbet göstermiştir (Şekil 10.).



Şekil 10. TMEM97 KO HGC27 hücrelerinde NBD-kolesterol alımı. A) 1 µg protein başına düşen floresan ölçüm spektrofotometrik olarak belirlendi (Data mean±SEM olarak sunuldu, * $p<0.05$, ** $p<0.01$). B, C ve D NBD-kolesterol alımının representatif mikroskopik görüntüleri. Yeşil NBD-kolesterolü temsil ederken mavi DAPI çekirdek boyamasını göstermektedir. B) TMEM97 KO1 HGC27, C) TMEM97 KO2 HGC27, D) Kontrol HGC27. 20X magnifikasyon.

4.4. LPDS'li Besiyerinde TMEM97 KO Hücrelerin Proliferasyonunun Belirlenmesi

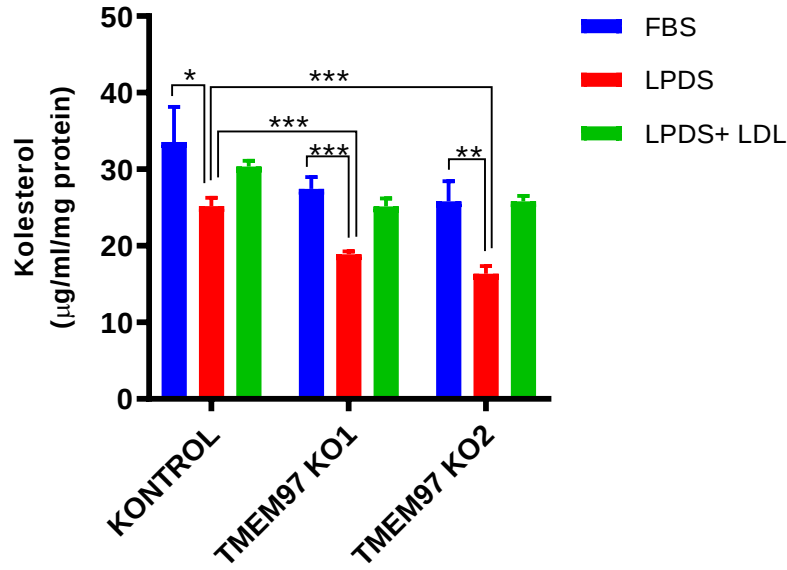
Lipoprotein içermeyen serumlu besiyerinde kültürlenmiş TMEM97 KO HGC27 hücrelerinde hücre canlılığı CellTiter kullanılarak belirlendi. Hücrelerde kontrol grubuna (sgRNA ctrl) göre anlamlı bir değişiklik gözlenmedi (Şekil 11.).



Şekil 11. HGC27 hücrelerinden elde edilen TMEM97 KO izojenik hücrelerin FBS'li, LPDS'li ve LPDS+LDL içeren besiyerinde çoğalma grafiği. (Data mean±SEM olarak sunuldu, * p<0.05.).

4.5. TMEM97 KO Hücrelerde Amplex Red Cholesterol Assay ile Total Kolesterol Ölçümü

HGC27 TMEM97 KO hücreler normal besiyeri, LPDS'li besiyeri ve LPDS+LDL içeren besiyerinde kültürlendi. Kitin protokolüne uygun olarak farklı besiyerlerinde çoğaltılan hücrelerde total kolesterol miktarı ölçüldü. Ayrıca hücrelerden protein izolasyonu yapıldı ve total kolesterol miktarı, ölçülen protein miktarlarına göre normalize edildi. TMEM97 eksprese eden kontrol hücrelerinde normal besiyerinde kolesterol miktarı yüksek bulundu. Yine aynı şekilde LPDS'li besiyerinde de TMEM97 KO hücrelerine kıyasla kontrol hücrelerinde total kolesterol miktarının fazla olduğu gözlemlendi. TMEM97 eksprese etmeyen hücrelerde hücre içi kolesterol miktarının azaldığı belirlendi (Şekil 12.).



Şekil 12. TMEM97 KO hücrelerde kolesterol ölçümü. (Data mean±SD olarak sunuldu, * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.).

4.6. Xenograft

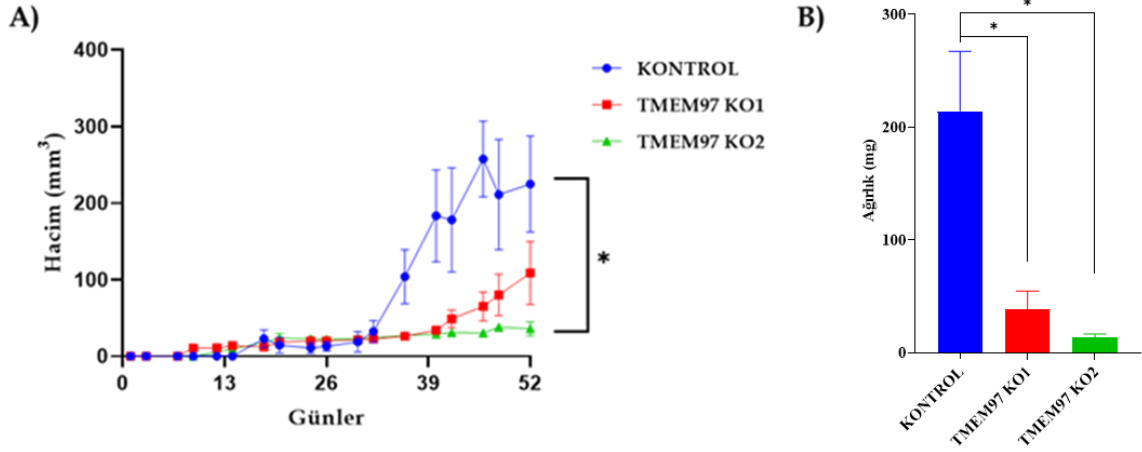
4.6.1. TMEM97'nin Tümör Gelişimindeki Etkisi

TMEM97 KO HGC27 hücrelerinin nude farelere subkutan enjeksiyonu ile tümör gelişimi gerçekleştirildi. Deney sonucunda TMEM97 KO hücrelerden kökenlenen tümörlerin hacimsel olarak daha düşük olduğu gözlemlendi. Farelerin sakrifikasyonunu takiben toplanan tümörler fotoğraflandı (Şekil 13.).



Şekil 13. Xenograft sonrası toplanan tümörlerin her gruptan bir temsili fotoğrafı. A) HGC27 kontrol grubunu, B) TMEM97 KO1 HGC27 grubunu ve C) TMEM97 KO2 HGC27 grubunu göstermektedir.

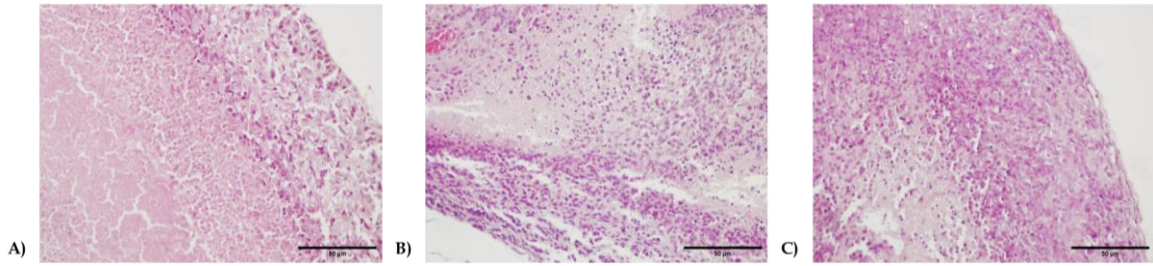
Xenograft deneyinin başlangıcından bittiği güne kadar yapılan ölçümlere göre kontrol grubunda gelişen tümörler hacimsel olarak istikrarlı bir şekilde artarken TMEM97 KO yapılmış gruplarda artış yavaş gerçekleşmiştir. TMEM97 KO hücrelerinden kökenlenen tümörlerin ağırlıklarının da kontrol grubuna kıyasla çok daha düşük olduğu belirlenmiştir (Şekil 14.).



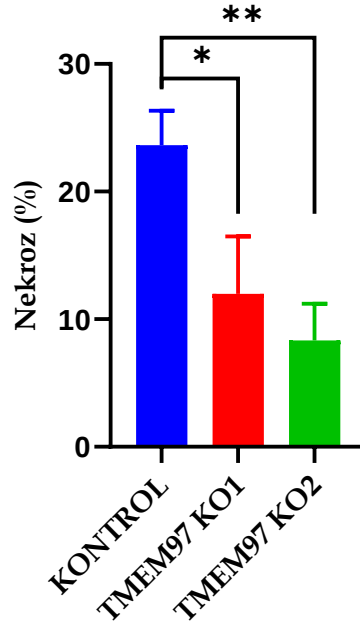
Şekil 14. HGC27 TMEM97 KO ve kontrol hücrelerinden kökenlenen tümörlerin hacimleri ve ağırlıkları. A) Tümör hacimlerini gösterirken, B) sakrifikasyon sonrası toplanan tümörlerin ağırlıklarını göstermektedir. (Data mean±SEM olarak sunuldu, * p<0.05).

4.6.2. Tümör Kesitlerinde Nekrotik Alan Tespiti

TMEM97'nin tümör agresifliği üzerindeki etkisini tespit etmek amacıyla tümör kesitlerinde nekrotik bölgelerin oransal dağılımı incelenmiştir. Tümör kesitlerinde hematoxilen & eozin boyaması yapılmıştır ve koyu pembe renk hücre çekirdeklerini gösterirken açık pembe alanlar nekrotik bölgeleri temsil etmektedir (Şekil 15.). Nekrozun kontrol grubuna kıyasla TMEM97 KO gruplarda daha yüksek bir oranda olduğu saptanmıştır (Şekil 16.).



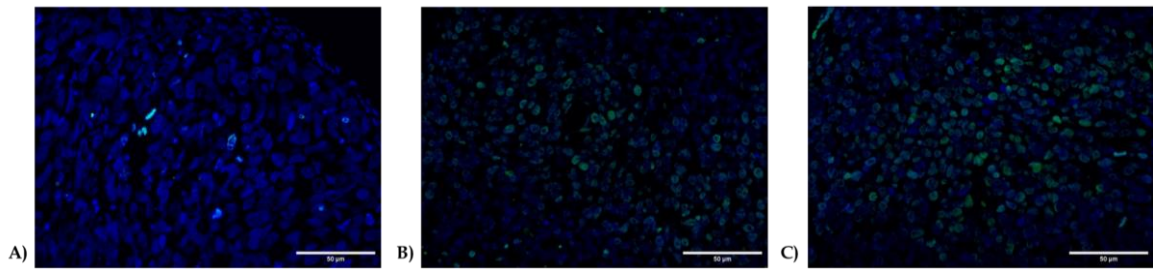
Şekil 15. Tümör kesitlerinde nekrotik alan. A) HGC27 kontrol hücrelerini, B) TMEM97 KO1 HGC27 hücrelerini ve C) TMEM97 KO2 HGC27 hücrelerini göstermektedir. 40X magnifikasyon.



Şekil 16. Tümör gruplarında nekrotik alanlar. (Data mean±SEM olarak sunuldu, * p<0.05, ** p<0.01.).

4.6.3. TMEM97'nin Apoptoz Üzerindeki Etkisi

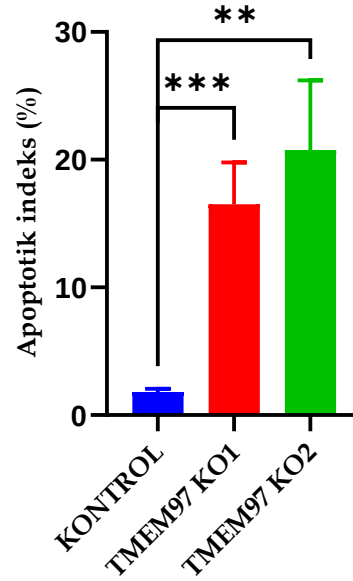
Apoptoz tespiti için One-step TUNEL In Situ Apoptosis Kit (Elabscience, E-CK-A320) kullanıldı. Protokole göre apoptozun geç aşamasında ortaya çıkan parçalanmış DNA'nın 3'-OH bölgesine florokrom (FITC) etiketli dUTP'lerin bağlanmasıyla yeşil floresan ışımaya ortaya çıkmaktadır. Nude farelerden toplanan tümörlerden alınan kesitlerde apoptotik hücreler, TMEM97 KO edilmiş hücrelerde dikkat çekici düzeyde fazlayken kontrol grubunda bu oran çok düşüktür (Şekil 17).



Şekil 17. TUNEL assay kullanılarak tümör kesitlerindeki apoptotik hücrelerin gösterimi. Mavi DAPI ile boyanmış hücre çekirdeğini gösterirken, yeşil TUNEL-pozitif apoptotik hücreleri göstermektedir. A) HGC27 kontrol hücrelerini, B) TMEM97 KO1 HGC27 hücrelerini ve C) TMEM97 KO2 HGC27 hücrelerini göstermektedir. 40X magnifikasyon.

TUNEL assay sonrası fotoğraflar Fiji'de analiz edildi. Hesaplanan apoptotik indeks, TMEM97 geni baskılanmış HGC27 hücrelerinden kökenlenen tümörlerde

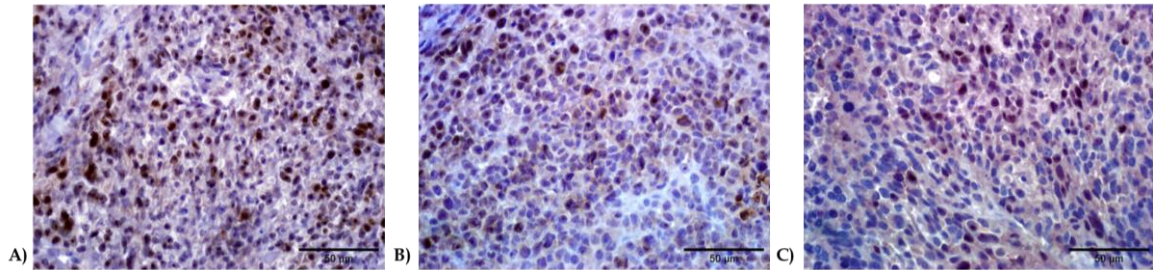
kontrol grubuna kıyasla daha yüksek oranda apoptozun tetiklendiğini göstermiştir (Şekil 18.). Veriler istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.



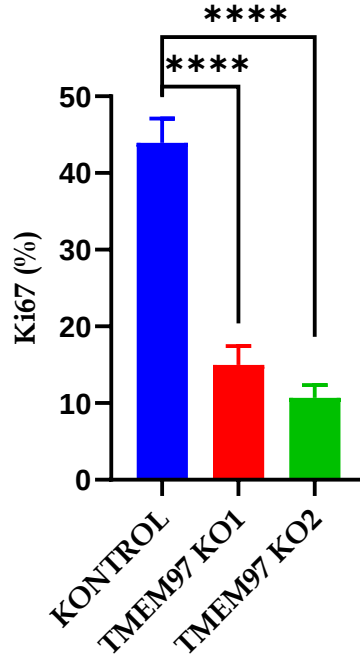
Şekil 18. Tümör kesitlerinde apoptotik indeksin yüzdesel ifadesi. (Data mean±SEM olarak sunuldu, ** p<0.01, *** p<0.001.).

4.6.4. Tümör Kesitlerinde İmmünohistokimyasal Analiz

Tümör kesitlerindeki agresifliği ve proliferasyon aktivitesini ortaya koymak için Ki67 antikoru ile immün boyama gerçekleştirildi. Şekil 19'da Ki67 immün boyama koyu kahverengi ile temsil edilirken zıt çekirdek boyaması açık mavi ile gösterilmiştir. TMEM97 KO gruplardaki Ki67 yoğunluğunun kontrol grubuna kıyasla daha az olduğu saptanmıştır. TMEM97 baskılanmış hücrelerdeki Ki67 skorunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir fark olduğu gözlenmiştir (Şekil 20.).



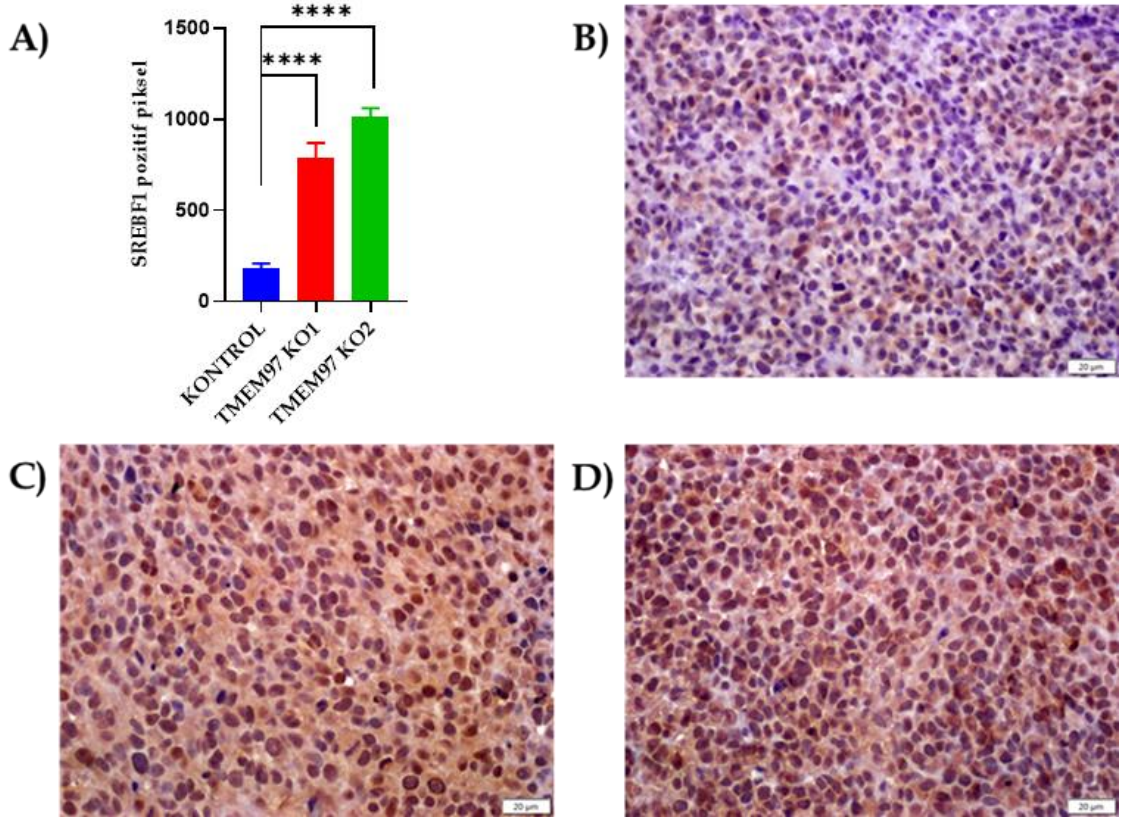
Şekil 19. Tümör kesitlerinde Ki67 immün boyama. A) HGC27 kontrol hücrelerini, B) TMEM97 KO1 HGC27 hücrelerini ve C) TMEM97 KO2 HGC27 hücrelerini göstermektedir. 40X magnifikasyon.



Şekil 20. Tümör dokularında Ki67 skoru. (Data mean±SEM olarak sunuldu, **** p<0.0001.).

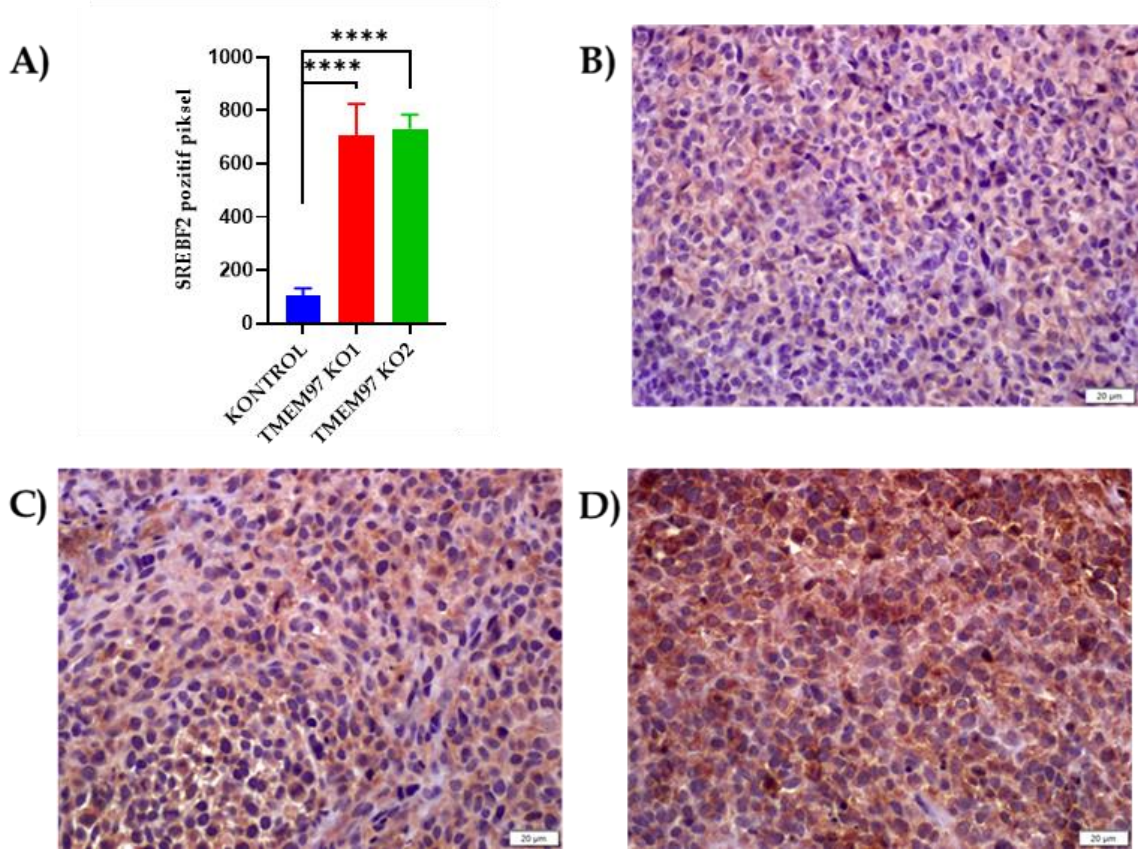
Tümör kesitlerinde SREBF1, SREBF2, skualen ve LDLR antikorları kullanılarak yapılan immünohistokimyasal boyamalar Fiji uygulamasında değerlendirilmiştir. Pozitif bölgelerde DAB kromojeni kahverengi renk oluşturmuştur. Kesitlerdeki hücreler sayılmış ve pozitif piksel toplam piksel miktarına oranlanmıştır. Boyamalardaki koyu kahverengi immün boyamayı gösterirken pembe-kırmızı boyama ise zıt çekirdek boyamasını göstermektedir.

Kolesterolün öncü moleküllerinin sentezinden sorumlu SREBF1 transkripsiyon faktörü TMEM97 KO gruplarda kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek bulundu (Şekil 21.).



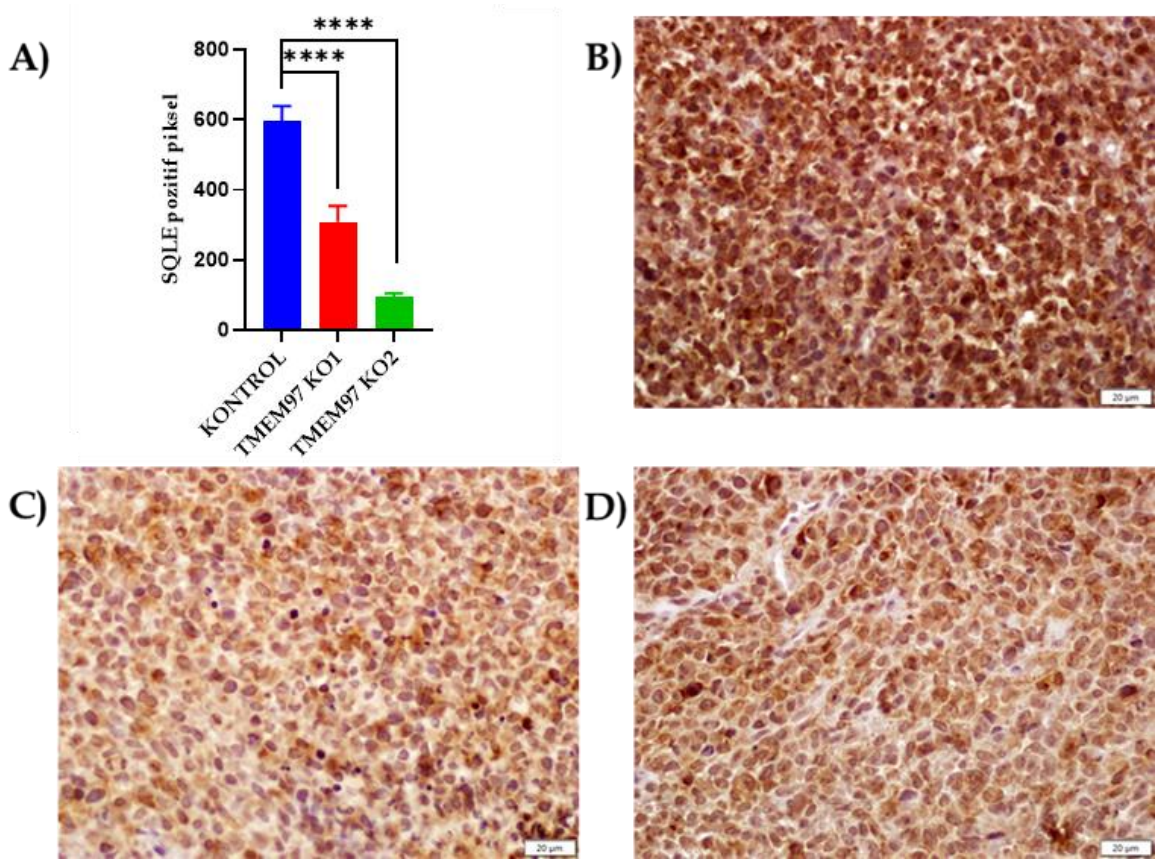
Şekil 21. SREBF1 immünohistokimyasal değerlendirilmesi. A) Tümör gruplarında SREBF1 pozitiflik oranı, B) HGC27 kontrol hücrelerini, C) TMEM97 KO1 HGC27 hücrelerini ve D) TMEM97 KO2 HGC27 hücrelerini göstermektedir. 40X magnifikasyon. (Data mean±SEM olarak sunuldu, **** p<0.0001.).

LDL reseptörü aracılı hücre dışı kolesterol alımını düzenleyen SREBF2 transkripsiyon faktörünün pozitifliği TMEM97 KO gruplarda kontrol grubuna kıyasla çok daha yüksek çıkmıştır (Şekil 22.).



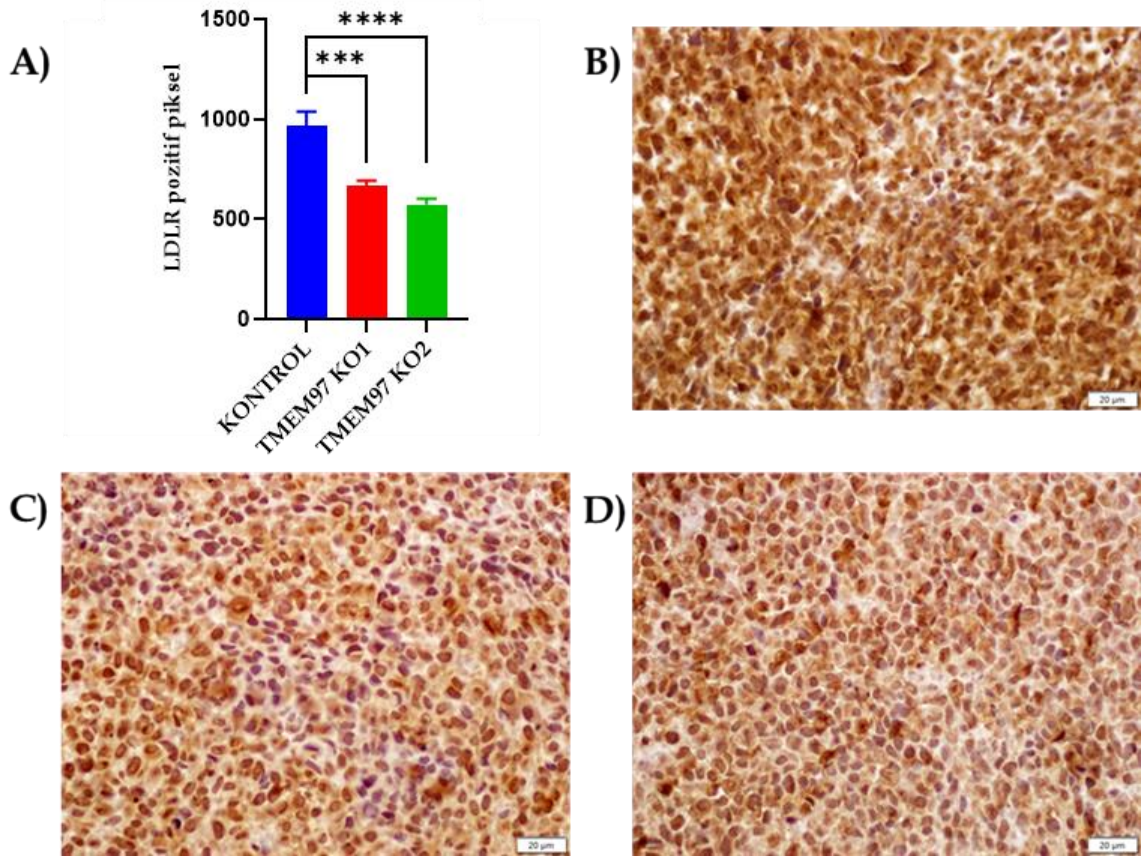
Şekil 22. SREBF2 immünohistokimyasal değerlendirilmesi. A) Tümör gruplarında SREBF2 pozitiflik oranı, B) HGC27 kontrol hücrelerini, C) TMEM97 KO1 HGC27 hücrelerini ve D) TMEM97 KO2 HGC27 hücrelerini göstermektedir. 40X magnifikasyon. (Data mean±SEM olarak sunuldu, **** $p < 0.0001$.).

Kolesterol sentezinde bir ara molekül olan lanosterolün sentezinden sorumlu skualen epoksidaz da TMEM97 KO gruplarda kontrol grubuna kıyasla daha düşük oranda bulunmuştur (Şekil 23.).



Şekil 23. SQLE immünohistokimyasal değerlendirilmesi. A) Tümör gruplarında SQLE pozitiflik oranı, B) HGC27 kontrol hücrelerini, C) TMEM97 KO1 HGC27 hücrelerini ve D) TMEM97 KO2 HGC27 hücrelerini göstermektedir. 40X magnifikasyon. (Data mean±SEM olarak sunuldu, **** p<0.0001.).

İlginç bir şekilde TMEM97 baskılanmış hücrelerde LDL reseptör pozitifliği SREBF2 ile korelasyon göstermemiş ve kontrol grubuna kıyasla daha az bir oran gözlenmiştir (Şekil 24.).



Şekil 24. LDLR immünohistokimyasal değerlendirilmesi. A) Tümör gruplarında LDLR pozitiflik oranı, B) HGC27 kontrol hücrelerini, C) TMEM97 KO1 HGC27 hücrelerini ve D) TMEM97 KO2 HGC27 hücrelerini göstermektedir. 40X magnifikasyon. (Data mean±SEM olarak sunuldu, **** p<0.0001.).

5. TARTIŞMA

Kanser dünya çapında ikinci önde gelen ölüm nedenidir [11]. Kanser, genlerde birbirini izleyen bir dizi mutasyonun birikmesiyle oluşur ve biriken mutasyonlar hücre fonksiyonlarını değiştirir [50]. Bir çok kanser türünde meydana gelen mutasyonlar özellikle hücre döngüsünü kontrol eden, hücre proliferasyonundan ve büyümesinden sorumlu protoonkogenlerin onkogenlere dönüşmesine neden olur [51]. Ayrıca protoonkogenlere zıt yönde etki gösteren, hücre proliferasyonunu baskılayan ve hücre büyümesini kontrol eden tümör baskılayıcı genler de mutasyona uğrayarak kontrolsüz hücre bölünmesine neden olmaktadır. Kanser hücrelerinin kontrolsüz çoğalması beraberinde metabolik faaliyetlerini yerine getirmek için enerji kaynaklarına olan ihtiyacı doğurur. Bunların başında glikoz, glutamin, yağ asitleri ve kolesterol gelmektedir.

Hücrelerdeki kolesterol seviyesi dinamik olarak de novo biyosentez, ekstraselüler alım, depolama ve ekstraselüler transport şeklinde düzenlenir [52]. Kolesterol metabolizması normal hücrelerde sıkı bir şekilde düzenlenir, kontrol edilir. İnsanlarda toplam kolesterolün yaklaşık %80'i vücutta sentezlenir, kalan %20'lik dilim ise diyetle vücuda alınır [9]. Kolesterol, lipoproteinlerin bir parçası olarak kan dolaşıma dahil olur [53]. Plazma lipoproteinlerinin içerisinde şilomikronlar, VLDL, LDL ve HDL yer almaktadır.

Memeli hücreleri, kan dolaşımındaki LDL lipoproteinlerini LDL reseptörleri (LDLR) aracılığı ile absorbe eder. LDL'in LDLR'a bağlanması ile reseptör-ligand kompleksi oluşur ve bu kompleks hücre içersine endositoz aracılığı ile alınır [54]. Endozomda LDL, LDLR'dan ayrılır ve ardından lizozoma transfer olur. Burada LDL içersindeki kolesterol esterleri hidrolizlenir ve serbest kolesterol molekülleri olarak salınır. NPC proteinleri serbest kolesterolün lizozomdan dışarı salınmasında rol alır. Kolesterol, bu sterol transfer proteinlerinin yardımıyla hücre membranına veya endoplazmik retikulum membranına transfer edilir [55].

Kolesterol biyosentezi, asetil-CoA'nın kolesterole dönüşümüyle sonuçlanan yaklaşık 30 enzimatik reaksiyonun bulunduğu, mevalonat (MVA) yolağı ve skualen biyosentezinin de yer aldığı karmaşık bir süreçtir [56, 57]. Tüm bu süreçte 3-hidroksi-3-metil glutaril koenzim-A (HMG-CoA) redüktaz (HMGCR) ve skualen epoksidaz (SQLE) HMG-CoA'yı MVA'a indirgeyen ve skualenin oksidasyonu ile 2,3-epoksi skualene dönüşümünü sağlayan iki anahtar hız limitleyici enzimlerdir [54].

Kolesterol homeostazının sağlanmasında sterol düzenleyici eleman proteinleri (SREBP'ler) anahtar rol oynar. SREBP2 genel olarak kolesterol metabolizmasında rol alan genlerin ekspresyonunu düzenler ve kolesterol sentezinin ve alımının

birincil düzenleyicisidir. Kolesterol sentezini HMGCR'in aktivasyonunda rol alarak, kolesterol alımını ise LDLR genini direkt aktive ederek düzenler [58]. SREBP1 ise yağ asidi sentezinde rol alan ve trigliserit metabolizmasında rol alan genlerin ekspresyonlarını düzenler [59]. Dolaylı olarak da LDLR aktivasyonunda rol alır. ER membranındaki kolesterol seviyesi yükseldiği zaman, bir kolesterol algılayıcı olan SREBP kesimini aktive eden protein (SCAP) konformasyonel değişime gider ve ER membranındaki Insig-1 proteinine bağlanır [24]. Bu durum SCAP/SREBP kompleksinin ER membranında tutulmasıyla sonuçlanır. ER membranındaki kolesterol seviyesi düştüğünde ise Insig-1 SCAP'tan ayrılarak proteazomal degradasyona uğrar. Bunun sonucunda SCAP/SREBP kompleksi golgi'ye hareket eder [54]. Burada SREBP'ler proteolitik olarak aktive olur ve bu proteinlerin N terminal bölgeleri nükleusa giderek yağ asidi sentezinde, kolesterol biyosentezinde ve alımında rol alan genlerin transkripsiyonunu aktive eder [21]. LDLR ve kolesterol sentezinde rol alan özellikle HMGCR ve SQLE gibi anahtar unsurlar SREBP proteinleri tarafından direkt olarak düzenlenir [60].

Kolesterol, memeli hücrelerinin hayatta kalması ve büyümesi için hayati öneme sahiptir. Membran akışkanlığına sahip tüm hücre zarlarının temel bileşenidir [61]. Ayrıca kolon, meme ve prostat kanserlerinin oluşmasını tetikleyebilen veya ilerletebilen safra asitlerinin ve steroid hormonlarının öncü molekülüdür [62]. Hedgehog ve SMO proteinlerinin kovalent modifikasyonunda rol alan kolesterol, tümör oluşumunda ve kanser ilerlemesinde yer alan sinyal yollarını da düzenleyebilir [62]. Kanser hücreleri hızlı çoğalan hücreler olarak, zar biyogenezi ve diğer fonksiyonel ihtiyaçlar için yüksek seviyelerde kolesterole gereksinim duyar [62]. Dahası kolesterolün yapısal ve sinyalizasyondaki rolleri bağışıklık sistemi hücrelerinin aktivasyonu için elzemdir. Dolayısıyla kolesterol ve metabolitlerinin yüksek konsantrasyonu yalnızca malign hücre aktivitesini tetiklemekle kalmaz aynı zamanda kanser hücrelerine karşı verilecek immün yanıtları da engeller [63]. Son yıllarda yapılan çalışmalar kolesterol metabolizmasının kanser gelişiminde ve ilerlemesindeki önemli rollerini ortaya koyarken, tüm bu işlevleri hangi moleküler yollar üzerinden nasıl ve hangi anahtar moleküller üzerinden yönettiği net olarak aydınlatılamamıştır.

TMEM97'yi kodlayan gen kromozom 17q11.2'de lokalizedir. TMEM97, hücrel kolesterol homeostazını düzenleyen integral membran proteindir [64]. ER ve lizozamlar gibi organellerin membranında yer alır [30]. TMEM97 SREBP'in hedef genidir ve LDL alımını, kolesterol trafiğini ve hücrel kolesterol seviyesini düzenler [30]. Wilcox ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada TMEM97 ve kolesterol biyosentez genlerinin birlikte ifadesini hem UCSC Genome Browser'ın Gene Sorter GNF Gene Expression Atlas2 veritabanı kullanarak yaptıkları in

siliko analiz hem de hücrelerde yaptıkları mikrodizi analizler ile desteklemişlerdir [26].

TMEM97 kanserde önemli bir rol oynar [30]. TMEM97'nin hücre proliferasyonunun bir belirteci olduğu ortaya konmuş ve kolon, mide, özofagus, akciğer, yumurtalık, prostat kanserleri gibi çok çeşitli insan tümörlerinde yüksek oranda eksprese edildiği belirlenmiştir [64, 30]. Fakat menenjiyomlar, pankreas ve böbrek kanserinde ekspresyon seviyesinin düştüğü belirlenmiş [65, 66]. Bu bağlamda, TMEM97'nin bazı tümörlerde fazla anlatımı söz konusuysen bazılarında düşük ekspresyon profili göstermesi bu proteinin insan malignitelerinde önemli bir rolü olduğunu göstermektedir.

Ramalho-Carvalho ve ekibi TMEM97'yi prostat kanseri LNCaP hücre hattında CRISPR/Cas9 aracılı baskılamışlar ve hücre proliferasyonunun azaldığını gözlemlemişler [67]. Ayrıca Qu, Qiu ve Xu ve ekiplerinin yaptığı çalışmalarda, meme kanseri, mide kanseri ve glioma hücrelerinde TMEM97'nin siRNA aracılı geçici olarak susturulmasının hücre canlılığını ve invazyon ile göçü azalttığı saptanmıştır [30]. Ek olarak Dong ve arkadaşları kolorektal kanser hücreleri HCT116'da TMEM97'yi siRNA aracılı susturmuşlar ve SW480'da ise overekspresyon yapmışlar ve bunun sonucunda TMEM97'nin susturulması hücre proliferasyonunu azaltırken, overekspresyonu proliferasyonu pozitif yönde etkilediğini göstermiştir [64]. Ayrıca yine aynı grup, TMEM97'nin kolorektal kanser hücre hatlarında hem in vivo hem de in vitro apoptozu inhibe ettiğini göstermiştir [64]. Bu veriler, TMEM97'nin spesifik tümör hücre hatlarında hücre proliferasyonu için gerekli olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda, HGC27 hücre hatlarında CRISPR/Cas9 aracılığı ile TMEM97 geni susturuldu (Şekil 7.). TMEM97 susturulmuş HGC27 hücreleri LPDS'li veya FBS'li serum içeren besiyerinde kültürlendi ve hücrelerde qRT-PCR ile kolesterol metabolizmasında anahtar rol oynayan HMGCR, SQLE ve LDLR gen ekspresyonları incelendi (Şekil 8.). LPDS'li besiyerinde çoğaltılan hücrelerde bu 3 genin ekspresyonunun kontrol grubuna kıyasla daha düşük olduğu gözlemlendi. LPDS'li besiyeri içerisinde kültürlenen HeLa hücreleri ile yapılan bir kolokalizasyon çalışmasında TMEM97 ve LDLR'ın yüksek derecede ortak lokalizasyonu olduğunu gösterilmiştir [31]. Bu veriler TMEM97'nin kolesterol metabolizmasında rol alan proteinlerle bir etkileşim içerisinde olduğunu düşündürdü.

Bu tez kapsamında TMEM97 susturulmuş HGC27 hücre hatlarında normal serumlu, LPDS'li ve LPDS'le inkübasyondan sonra LDL eklenmiş besiyerinde hücre canlılığındaki değişimi göstermek amacıyla hücre canlılık deneyi yapıldı (Şekil 11.). TMEM97 susturulmuş HGC27 hücrelerinin LPDS'li ve LPDS+LDL

besiyesinde kontrol grubuna kıyasla daha çok öldüğü gözlemlendi. Bu sonuçlar TMEM97'nin hücre dışı kolesterol alımında önemli bir rolü olabileceğini düşündürdü. TMEM97'nin kolesterol biyosentezindeki rolünü irdelemek amacıyla TMEM97 susturulmuş HGC27 hücreleri normal serumlu, LPDS'li ve LPDS+LDL'li besiyesinde çoğaltıldı ve bu hücrelerde toplam kolesterol miktarı Amplex Red kolesterol assay ile ölçüldü. LPDS'li besiyesinde kültürlenmiş TMEM97 susturulmuş gruplarda kontrol grubuna kıyasla daha az miktarda kolesterol tespit edildi (Şekil 12.). Ek olarak TMEM97'nin hücre dışı kolesterol alımındaki etkisi Dil-LDL ve NBD-kolesterol assay yapılarak test edildi. TMEM97 KO HGC27 hücreleri lipoprotein içermeyen besiyesinde kolesterol açlığına bırakıldı. Hücrelere etiketli Dil-LDL ve NBD-kolesterol verildiği zaman TMEM97 KO hücrelerde kontrol grubuna kıyasla kolesterol alımında anlamlı bir artış gözlemlendi (Şekil 9., Şekil 10.). Cantanero ve ekibinin yaptığı çalışmada, FBS'li besiyesinde kültürlenmiş TMEM97 ekspresyon seviyesi düşük MCF10A ve TMEM97 ekspresyonu yüksek MDA-MB231 hücre hatlarına TopFluor-kolesterol verildiğinde MCF10A'da MDA-MB231'e kıyasla daha düşük seviyede kolesterol alımı saptanmıştır. Yine aynı çalışmada MDA-MB231'de TMEM97 susturulduğunda kolesterol alımının düştüğü, MCF10A'da TMEM97 overekspresyonu yapıldığında kolesterol alımının arttığı gösterilmiştir [68]. Bu veriler, TMEM97'nin kolesterol alımında önemli bir etkisi olduğunu gösterirken aynı zamanda farklı hücre hatlarında kolesterol alımını zıt yönde etkileyebileceğini de göstermektedir.

Çalışmamızda TMEM97'nin in vivo tümör gelişimindeki ve tümör hücre proliferasyonu üzerindeki etkisini göstermek amacıyla TMEM97 susturulmuş HGC27 hücre hatları nude farelere subkutan enjekte edildi. Deney süresince oluşan tümörlerin hacmi haftada 2 kez ölçüldü ve TMEM97 susturulmuş tümör grubunun kontrol grubuna kıyasla çok daha düşük hacimde olduğu gözlemlendi (Şekil 14.). Ayrıca sakrifikasyondan sonra tümörlerin ağırlıkları da ölçülerek benzer bir netice elde edildi (Şekil 14.). Zhu ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada da TMEM97 KO MDA-MB231 xenograflarının tümör gelişimini hem hacimsel hem de ağırlık olarak negatif yönde etkilediği gösterilmiştir [69]. TMEM97'nin apoptoz ile ilişkisini belirlemek için parafine gömülü tümörlerden kesit alarak TUNEL apoptoz tespit deneyi yaptık. Mikroskopta çektiğimiz fotoğraflarda TMEM97 KO gruplarda kontrol grubuna kıyasla daha yüksek oranda apoptotik hücre popülasyonu olduğunu gösterdik (Şekil 17.). Fiji [70] yazılımında yaptığımız analizde ise apoptotik indeksin TMEM97 KO hücrelerde kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek olduğunu belirledik (Şekil 18.). Wu ve ekibinin 2020'de yaptığı çalışmada BGC-823 mide kanseri hücrelerinde TMEM97'nin RNAi aracılı susturulmasının, Wnt/ β -katenin sinyal yolağı üzerinden, apoptozu indükleyebileceği öne sürüldü [71]. TMEM97'nin kolesterol

metabolizmasında rol alan SREBP1, SREBP2, LDLR ve SQLE anahtar proteinler ile ilişkisini in vivo göstermek amacıyla tümör kesitlerinde immün boyama yapıldı. Bunun sonucunda kontrol grubuna kıyasla, TMEM97 KO gruplarda SREBP1 ve SREBP2 pozitifliğinin anlamlı derecede fazlayken (Şekil 21., Şekil 22.) SQLE ve LDLR pozitifliğinin ise anlamlı derecede düşük olduğunu gösterdik (Şekil 23., Şekil 24.). TMEM97 susturulmuş HGC27 hücrelerinde yaptığımız in vitro qRT-PCR çalışması da in vivo çalışmamızı doğrulamaktadır. TMEM97'nin proliferasyon üzerindeki etkisini de ortaya koymak amacıyla parafine gömdüğümüz tümörlerde proliferasyon markırı Ki67 ile immün boyama yapıldı (Şekil 19.). Bunun sonucunda TMEM97 KO hücrelerdeki Ki67 boyama yoğunluğunu kontrol grubuna kıyasla daha az olduğunu belirledik. Yaptığımız analizde ise Ki67 skorunun TMEM97 susturulmuş gruplarda kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede düşük olduğunu gösterdik (Şekil 20.). Zhu ve ekibinin yaptığı çalışmada, TMEM97 KO MDA-MB231 xenograflarında da benzer bir sonuç ortaya konmuştur [69]. Bu veriler, TMEM97'nin onkogenik potansiyele sahip olabileceğini düşündürmüştür.

TMEM97 susturulmuş tümör kesitlerinde nekrotik alanların kontrol grubuna kıyasla daha az olduğunu gösterdik (Şekil 15.). Fiji [70] programında yapılan analizde ise TMEM97 KO gruplarda nekrozun yüzdesel dağılımının kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede düşük olduğunu gösterdik (Şekil 16.). Tümör hipoksisi agresif kanserlerin önemli bir özelliğidir ve bunun morfolojik belirtici ise nekrozdur [72]. Nekrozun endometriyal kanserde artmış tümör hücre proliferasyonu ile ilişkisi olduğu [72] ve hepatosellüler karsinomda tümör boyutu ve vasküler invazyon ile korelasyonu olduğu tespit edilmiştir [73]. Bu bilgiler bize TMEM97'nin tümör gelişimde apoptozu inhibe ettiği ve nekrozu tetikleyerek hücre proliferasyonunu artırırken, tümör agresifliğini de tetiklediğini düşündürmüştür.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızın sonucunda,

1. TMEM97 KO HGC27 hücrelerinde qRT-PCR ile LDLR, HMGCR ve SQLE'in, kolesterol biyosentezinden ve hücre dışı kolesterol alımında görevli anahtar faktörlerin, gen ekspresyon seviyelerinin lipoprotein içermeyen besiyerinde kontrol grubuna kıyasla daha düşük olduğunu gösterdik. Gen ekspresyon seviyelerinin yanı sıra Western blotlama ile de protein ekspresyon miktarlarının gösterilmesi bulgularımızı güçlendirebilir. Ayrıca yine bu genler sırayla CRISPR/Cas9 aracılı susturulup TMEM97 gen ve protein ekspresyon seviyesi kontrol edilerek ko-ekspresyon daha net gösterilebilir.
2. TMEM97 KO HGC27 hücrelerinde hücre dışı kolesterol alımının kontrol grubuna kıyasla arttığını hem Dil-LDL hem de NBD-kolesterol assay ile gösterdik. Literatürde farklı kanser hücrelerinde farklı sonuçlar alınmıştır. Bu doğrultuda aynı deney farklı tip kanser hücre hatlarında da yapılabilir.
3. TMEM97 KO yaptığımız HGC27 hücreleri ile hücre canlılığı deneyi yaptık. LPDS'li besiyerinde hücre canlılığının TMEM97 susturulmuş gruplarda, kontrole kıyasla, düştüğünü belirledik. Farklı tip kanser hücrelerinin metabolik faaliyetleri de farklı olduğu için bu deneyin farklı tip kanser hücrelerinde de tekrarlanarak daha geniş kapsamlı bir sonuç alınabilir.
4. TMEM97 susturulmuş HGC27 hücreleri ile yaptığımız xenograft deneyinde TMEM97'nin, tümör hücre proliferasyonu, apoptozun inhibisyonu ve artmış nekroz ile ilişkisi olduğunu TUNEL assay ve immün boyamalar ile gösterdik. Ek olarak proliferasyon, apoptoz ve nekroz, tümör dokularından RNA izolasyonu yapılarak qRT-PCR'da veya protein izolasyonu yapılarak Western blotlama'da da gösterilebilir.
5. Yaptığımız in vivo analizlerde TMEM97 susturulmuş tümör kesitlerinde SREBF1 ve SREBF2 transkripsiyon faktörlerinin, kontrole kıyasla, oldukça yüksek miktarda olduğunu gösterdik. Bu anahtar faktörler in vitro qRT-PCR'da ve Western blotlamada da tespit edilerek in vivo ile korelasyonu gösterilebilir. Ayrıca tümör kesitlerinde HMGCR ile immün boyama yapılarak qRT-PCR sonuçlarımız doğrulanabilir.
6. Yaptığımız in vivo ve in vitro analizler TMEM97'nin onkojenik aktiviteye sahip olduğunu ve kanserde kolesterol metabolizmasında net bir rolü olduğunu göstermiştir. Fakat TMEM97'nin kanser hücrelerinde kolesterol metabolizmasında hücre içi veya hücre dışı etki mekanizmasının daha net aydınlatılabilmesi için LPDS'li ve normal besiyerinde kültürlenmiş TMEM97 KO hücrelerinde lipidomiks, proteomiks veya metabolomiks çalışmaları yapılabilir.

7. Bulgularımız TMEM97'nin kanser gelişiminde ve tümör agresifliğindeki rolünü ortaya koymuştur. TMEM97'nin hedeflenebilir bir molekül potansiyeli taşıdığı literatürde belirtilmiştir. Bu bağlamda TMEM97 uygun ligand skoruna sahip moleküller ile hedeflenebilir. Bu moleküller terapötik yaklaşımlar için kullanılabilir.
8. Yaptığımız çalışmada TMEM97 KO HGC27 hücrelerine ek olarak aynı hücrelerde TMEM97 overekspresyonu da yapılarak sonuçlar iki taraflı değerlendirilebilir.

KAYNAKÇA

1. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science*. 2009;324(5930):1029-33. doi:doi:10.1126/science.1160809.
2. Muñoz-Pinedo C, El Mjiyad N, Ricci JE. Cancer metabolism: current perspectives and future directions. *Cell Death & Disease*. 2012;3(1):e248-e. doi:10.1038/cddis.2011.123.
3. Hryniewicz-Jankowska A, Augoff K, Sikorski AF. The role of cholesterol and cholesterol-driven membrane raft domains in prostate cancer. *Exp Biol Med* (Maywood). 2019;244(13):1053-61. doi:10.1177/1535370219870771.
4. Holmes MV, Ala-Korpela M. What is 'LDL cholesterol'? *Nature Reviews Cardiology*. 2019;16(4):197-8. doi:10.1038/s41569-019-0157-6.
5. van de Sluis B, Wijers M, Herz J. News on the molecular regulation and function of hepatic low-density lipoprotein receptor and LDLR-related protein 1. *Curr Opin Lipidol*. 2017;28(3):241-7. doi:10.1097/mol.0000000000000411.
6. Riscal R, Skuli N, Simon MC. Even Cancer Cells Watch Their Cholesterol! *Molecular Cell*. 2019;76(2):220-31. doi:https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.09.008.
7. Ebrahimi-Fakhari D, Wahlster L, Bartz F, Werenbeck-Ueding J, Praggastis M, Zhang J et al. Reduction of TMEM97 increases NPC1 protein levels and restores cholesterol trafficking in Niemann-pick type C1 disease cells. *Hum Mol Genet*. 2016;25(16):3588-99. doi:10.1093/hmg/ddw204.
8. Giacomini I, Gianfanti F, Desbats MA, Orso G, Berretta M, Prayer-Galetti T et al. Cholesterol Metabolic Reprogramming in Cancer and Its Pharmacological Modulation as Therapeutic Strategy. *Front Oncol*. 2021;11:682911. doi:10.3389/fonc.2021.682911.
9. Mayengbam SS, Singh A, Pillai AD, Bhat MK. Influence of cholesterol on cancer progression and therapy. *Transl Oncol*. 2021;14(6):101043. doi:10.1016/j.tranon.2021.101043.
10. Knudson AG. Cancer genetics. *American Journal of Medical Genetics*. 2002;111(1):96-102. doi:https://doi.org/10.1002/ajmg.10320.
11. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin*. 2013;63(1):11-30. doi:10.3322/caac.21166.
12. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
13. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*. 2009;324(5930):1029-33. doi:10.1126/science.1160809.
14. Vander Heiden MG. Targeting cancer metabolism: a therapeutic window opens. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2011;10(9):671-84. doi:10.1038/nrd3504.

15. Birsoy K, Sabatini DM, Possemato R. Untuning the tumor metabolic machine: Targeting cancer metabolism: a bedside lesson. *Nat Med.* 2012;18(7):1022-3. doi:10.1038/nm.2870.
16. Cantor JR, Sabatini DM. Cancer cell metabolism: one hallmark, many faces. *Cancer Discov.* 2012;2(10):881-98. doi:10.1158/2159-8290.Cd-12-0345.
17. Birsoy K, Possemato R, Lorbeer FK, Bayraktar EC, Thiru P, Yucel B et al. Metabolic determinants of cancer cell sensitivity to glucose limitation and biguanides. *Nature.* 2014;508(7494):108-12. doi:10.1038/nature13110.
18. Brown AJ. CHOLESTEROL, STATINS AND CANCER. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology.* 2007;34(3):135-41. doi:https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2007.04565.x.
19. Hu J, Zhang Z, Shen W-J, Azhar S. Cellular cholesterol delivery, intracellular processing and utilization for biosynthesis of steroid hormones. *Nutrition & Metabolism.* 2010;7(1):47. doi:10.1186/1743-7075-7-47.
20. Chang TY, Chang CC, Ohgami N, Yamauchi Y. Cholesterol sensing, trafficking, and esterification. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2006;22:129-57. doi:10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104656.
21. Faust PL, Kovacs WJ. Cholesterol biosynthesis and ER stress in peroxisome deficiency. *Biochimie.* 2014;98:75-85. doi:10.1016/j.biochi.2013.10.019.
22. Pedersen R. Cholesterol biosynthesis, storage, and mobilization in steroidogenic organs. *Biology of cholesterol.* 1988:39-69.
23. Ikonen E. Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2008;9(2):125-38. doi:10.1038/nrm2336.
24. Efeyan A, Comb WC, Sabatini DM. Nutrient-sensing mechanisms and pathways. *Nature.* 2015;517(7534):302-10. doi:10.1038/nature14190.
25. Goldstein JL, DeBose-Boyd RA, Brown MS. Protein sensors for membrane sterols. *Cell.* 2006;124(1):35-46. doi:10.1016/j.cell.2005.12.022.
26. Wilcox CB, Feddes GO, Willett-Brozick JE, Hsu L-C, DeLoia JA, Baysal BE. Coordinate up-regulation of TMEM97 and cholesterol biosynthesis genes in normal ovarian surface epithelial cells treated with progesterone: implications for pathogenesis of ovarian cancer. *BMC Cancer.* 2007;7(1):223. doi:10.1186/1471-2407-7-223.
27. Widenmaier SB, Snyder NA, Nguyen TB, Arduini A, Lee GY, Arruda AP et al. NRF1 Is an ER Membrane Sensor that Is Central to Cholesterol Homeostasis. *Cell.* 2017;171(5):1094-109.e15. doi:10.1016/j.cell.2017.10.003.
28. Bartz F, Kern L, Erz D, Zhu M, Gilbert D, Meinhof T et al. Identification of Cholesterol-Regulating Genes by Targeted RNAi Screening. *Cell Metabolism.* 2009;10(1):63-75. doi:https://doi.org/10.1016/j.cmet.2009.05.009.

29. Alon A, Schmidt HR, Wood MD, Sahn JJ, Martin SF, Kruse AC. Identification of the gene that codes for the $\alpha 2$ receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2017;114(27):7160-5. doi:10.1073/pnas.1705154114.
30. Zeng C, Riad A, Mach RH. The Biological Function of Sigma-2 Receptor/TMEM97 and Its Utility in PET Imaging Studies in Cancer. *Cancers (Basel)*. 2020;12(7). doi:10.3390/cancers12071877.
31. Riad A, Zeng C, Weng CC, Winters H, Xu K, Makvandi M et al. Sigma-2 Receptor/TMEM97 and PGRMC-1 Increase the Rate of Internalization of LDL by LDL Receptor through the Formation of a Ternary Complex. *Sci Rep*. 2018;8(1):16845. doi:10.1038/s41598-018-35430-3.
32. Ribas V, García-Ruiz C, Fernández-Checa JC. Mitochondria, cholesterol and cancer cell metabolism. *Clin Transl Med*. 2016;5(1):22. doi:10.1186/s40169-016-0106-5.
33. Kuzu OF, Noory MA, Robertson GP. The Role of Cholesterol in Cancer. *Cancer Res*. 2016;76(8):2063-70. doi:10.1158/0008-5472.Can-15-2613.
34. Poynter JN, Gruber SB, Higgins PD, Almog R, Bonner JD, Rennert HS et al. Statins and the risk of colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2005;352(21):2184-92. doi:10.1056/NEJMoa043792.
35. Sharpe LJ, Brown AJ. Controlling cholesterol synthesis beyond 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGCR). *J Biol Chem*. 2013;288(26):18707-15. doi:10.1074/jbc.R113.479808.
36. Rao CV, Newmark HL, Reddy BS. Chemopreventive effect of farnesol and lanosterol on colon carcinogenesis. *Cancer Detection and Prevention*. 2002;26(6):419-25. doi:https://doi.org/10.1016/S0361-090X(02)00119-8.
37. Ding H, Gui X, Lin X, Chen R, Ma T, Sheng Y et al. The Prognostic Effect of MAC30 Expression on Patients With Non-Small Cell Lung Cancer Receiving Adjuvant Chemotherapy. *Technol Cancer Res Treat*. 2017;16(5):645-53. doi:10.1177/1533034616670443.
38. Ding H, Gui XH, Lin XB, Chen RH, Cai HR, Fen Y et al. Prognostic Value of MAC30 Expression in Human Pure Squamous Cell Carcinomas of the Lung. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2016;17(5):2705-10.
39. Chen R, Fen Y, Lin X, Ma T, Cai H, Ding H. Overexpression of MAC30 is Resistant to Platinum-Based Chemotherapy in Patients With Non-Small Cell Lung Cancer. *Technology in Cancer Research & Treatment*. 2015;15(6):815-20. doi:10.1177/1533034615605208.
40. Han KY, Gu X, Wang HR, Liu D, Lv FZ, Li JN. Overexpression of MAC30 is associated with poor clinical outcome in human non-small-cell lung cancer. *Tumour Biol*. 2013;34(2):821-5. doi:10.1007/s13277-012-0612-z.
41. Yan BY, Wang DW, Zhu ZL, Yang YH, Wang MW, Cui DS et al. Overexpression of MAC30 in the cytoplasm of oral squamous cell carcinoma

- predicts nodal metastasis and poor differentiation. *Chemotherapy*. 2010;56(6):424-8. doi:10.1159/000317582.
42. Xu XY, Zhang LJ, Yu YQ, Zhang XT, Huang WJ, Nie XC et al. Down-regulated MAC30 expression inhibits proliferation and mobility of human gastric cancer cells. *Cell Physiol Biochem*. 2014;33(5):1359-68. doi:10.1159/000358703.
 43. Qiu G, Sun W, Zou Y, Cai Z, Wang P, Lin X et al. RNA interference against TMEM97 inhibits cell proliferation, migration, and invasion in glioma cells. *Tumour Biol*. 2015;36(10):8231-8. doi:10.1007/s13277-015-3552-6.
 44. Sanchez-Pulido L, Ponting CP. TM6SF2 and MAC30, new enzyme homologs in sterol metabolism and common metabolic disease. *Frontiers in Genetics*. 2014;5.
 45. Long T, Hassan A, Thompson BM, McDonald JG, Wang J, Li X. Structural basis for human sterol isomerase in cholesterol biosynthesis and multidrug recognition. *Nat Commun*. 2019;10(1):2452. doi:10.1038/s41467-019-10279-w.
 46. Hu X, Wang Y, Hao L-Y, Liu X, Lesch CA, Sanchez BM et al. Sterol metabolism controls TH17 differentiation by generating endogenous ROR γ agonists. *Nature Chemical Biology*. 2015;11(2):141-7. doi:10.1038/nchembio.1714.
 47. Niphakis MJ, Lum KM, Cognetta AB, 3rd, Correia BE, Ichu TA, Olucha J et al. A Global Map of Lipid-Binding Proteins and Their Ligandability in Cells. *Cell*. 2015;161(7):1668-80. doi:10.1016/j.cell.2015.05.045.
 48. Liang Y, Goyette S, Hyder SM. Cholesterol biosynthesis inhibitor RO 48-8071 reduces progesterone receptor expression and inhibits progestin-dependent stem cell-like cell growth in hormone-dependent human breast cancer cells. *Breast Cancer (Dove Med Press)*. 2017;9:487-94. doi:10.2147/bctt.S140265.
 49. Maione F, Oliaro-Bosso S, Meda C, Di Nicolantonio F, Bussolino F, Balliano G et al. The cholesterol biosynthesis enzyme oxidosqualene cyclase is a new target to impair tumour angiogenesis and metastasis dissemination. *Sci Rep*. 2015;5:9054. doi:10.1038/srep09054.
 50. Hassanpour SH, Dehghani M. Review of cancer from perspective of molecular. *Journal of Cancer Research and Practice*. 2017;4(4):127-9. doi:https://doi.org/10.1016/j.jcrpr.2017.07.001.
 51. Weinstein IB, Joe AK. Mechanisms of Disease: oncogene addiction—a rationale for molecular targeting in cancer therapy. *Nature Clinical Practice Oncology*. 2006;3(8):448-57. doi:10.1038/ncponc0558.
 52. Shi Q, Chen J, Zou X, Tang X. Intracellular Cholesterol Synthesis and Transport. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2022;10.
 53. Charlton-Menys V, Durrington PN. Human cholesterol metabolism and therapeutic molecules. *Experimental Physiology*. 2008;93(1):27-42. doi:https://doi.org/10.1113/expphysiol.2006.035147.

54. Xu H, Zhou S, Tang Q, Xia H, Bi F. Cholesterol metabolism: New functions and therapeutic approaches in cancer. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2020;1874(1):188394. doi:10.1016/j.bbcan.2020.188394.
55. Lyu J, Yang EJ, Shim JS. Cholesterol Trafficking: An Emerging Therapeutic Target for Angiogenesis and Cancer. *Cells*. 2019;8(5). doi:10.3390/cells8050389.
56. Mullen PJ, Yu R, Longo J, Archer MC, Penn LZ. The interplay between cell signalling and the mevalonate pathway in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2016;16(11):718-31. doi:10.1038/nrc.2016.76.
57. Göbel A, Rauner M, Hofbauer LC, Rachner TD. Cholesterol and beyond - The role of the mevalonate pathway in cancer biology. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2020;1873(2):188351. doi:10.1016/j.bbcan.2020.188351.
58. DeBose-Boyd RA, Ye J. SREBPs in Lipid Metabolism, Insulin Signaling, and Beyond. *Trends Biochem Sci*. 2018;43(5):358-68. doi:10.1016/j.tibs.2018.01.005.
59. Fu Y, Zou T, Shen X, Nelson PJ, Li J, Wu C et al. Lipid metabolism in cancer progression and therapeutic strategies. *MedComm*. 2021;2(1):27-59. doi:https://doi.org/10.1002/mco2.27.
60. Luo J, Yang H, Song BL. Mechanisms and regulation of cholesterol homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2020;21(4):225-45. doi:10.1038/s41580-019-0190-7.
61. Mc Auley MT, Wilkinson DJ, Jones JLL, Kirkwood TBL. A whole-body mathematical model of cholesterol metabolism and its age-associated dysregulation. *BMC Systems Biology*. 2012;6(1):130. doi:10.1186/1752-0509-6-130.
62. Huang B, Song B-l, Xu C. Cholesterol metabolism in cancer: mechanisms and therapeutic opportunities. *Nature Metabolism*. 2020;2(2):132-41. doi:10.1038/s42255-020-0174-0.
63. Halimi H, Farjadian S. Cholesterol: An important actor on the cancer immune scene. *Frontiers in Immunology*. 2022;13.
64. Mao D, Zhang X, Wang Z, Xu G, Zhang Y. TMEM97 is transcriptionally activated by YY1 and promotes colorectal cancer progression via the GSK-3 β / β -catenin signaling pathway. *Human Cell*. 2022;35(5):1535-46. doi:10.1007/s13577-022-00759-5.
65. Murphy M, Pykett MJ, Harnish P, Zang KD, George DL. Identification and characterization of genes differentially expressed in meningiomas. *Cell Growth Differ*. 1993;4(9):715-22.
66. Kaye H, Kleeff J, Ding J, Hammer J, Giese T, Zentgraf H et al. Expression analysis of MAC30 in human pancreatic cancer and tumors of the gastrointestinal tract. *Histol Histopathol*. 2004;19(4):1021-31. doi:10.14670/hh-19.1021.
67. Ramalho-Carvalho J, Gonçalves CS, Graça I, Bidarra D, Pereira-Silva E, Salta S et al. A multiplatform approach identifies miR-152-3p as a common

- epigenetically regulated onco-suppressor in prostate cancer targeting TMEM97. *Clin Epigenetics*. 2018;10:40. doi:10.1186/s13148-018-0475-2.
68. Cantonero C, Camello PJ, Salido GM, Rosado JA, Redondo PC. TMEM97 facilitates the activation of SOCE by downregulating the association of cholesterol to Orai1 in MDA-MB-231 cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2021;1866(6):158906. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2021.158906>.
69. Zhu H, Su Z, Ning J, Zhou L, Tan L, Sayed S et al. Transmembrane protein 97 exhibits oncogenic properties via enhancing LRP6-mediated Wnt signaling in breast cancer. *Cell Death Dis*. 2021;12(10):912. doi:10.1038/s41419-021-04211-8.
70. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*. 2012;9(7):676-82. doi:10.1038/nmeth.2019.
71. Wu X, Zhang Y, Guo J, Yan X, Shen L, Zhou J et al. MAC30 Knockdown Inhibits Proliferation and Enhance Apoptosis of Gastric Cancer by Suppressing Wnt/ β -Catenin signaling Pathway. *Gastroenterol Res Pract*. 2020;2020:6358685. doi:10.1155/2020/6358685.
72. Bredholt G, Mannelqvist M, Stefansson IM, Birkeland E, Bø TH, Øyan AM et al. Tumor necrosis is an important hallmark of aggressive endometrial cancer and associates with hypoxia, angiogenesis and inflammation responses. *Oncotarget*. 2015;6(37):39676-91. doi:10.18632/oncotarget.5344.
73. Ling Y-h, Chen J-w, Wen S-h, Huang C-y, Li P, Lu L-h et al. Tumor necrosis as a poor prognostic predictor on postoperative survival of patients with solitary small hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer*. 2020;20(1):607. doi:10.1186/s12885-020-07097-5.