

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



IL-6 SİTOKİNİNİN ADAMTS-14 GENİNE ETKİSİNİN
BELİRLENMESİ

RÜMEYSA NUR VAPUR ÖNDÜL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Jüri Üyeleri : **Dr. Öğr. Üyesi Nelin HACIOĞLU** (Tez Danışmanı)
Prof. Dr. Feray KÖÇKAR (Eş Danışman)
Doç. Dr. Esra TOKAY
Doç. Dr. Meltem ALPER

BALIKESİR, ŞUBAT- 2026

ETİK BEYAN

Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak tarafımda hazırlanan “**IL-6 Sitokinin Adamts-14 Genine Etkisinin Belirlenmesi**” başlıklı tezde;

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

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

Rümeysa Nur VAPUR ÖNDÜL

ÖZET

IL-6 SİTOKİNİNİN ADAMTS-14 GENİNE ETKİSİNİN BELİRLENMESİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
RÜMEYSA NUR VAPUR ÖNDÜL
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
(TEZ DANIŞMANI: DR. ÖĞR. ÜY. NELİN HACIOĞLU)

BALIKESİR, ŞUBAT - 2026

ADAMTS (Trombospondin Motifli A Disintegrin ve Metalloproteinaz) gen ailesi, hücre dışı matriksin yeniden düzenlenmesi, doku gelişimi ve inflamasyonla ilişkili patolojik süreçlerde rol alan çinko bağımlı metalloproteinazlardan oluşmaktadır. Bu aile üyelerinden biri olan ADAMTS-14, prokolajen N-proteinaz aktivitesi aracılığıyla kollajen olgunlaşması ve ekstraselüler matriks organizasyonunda görev almaktadır. ADAMTS-14'ün farklı kanser türlerinde bağlama ve doku tipine bağlı olarak değişen roller gösterebildiği bildirilmiş olsa da, inflamatuvar sitokinler tarafından nasıl düzenlendiğine ilişkin moleküler mekanizmalar yeterince açıklığa kavuşmamıştır.

Bu tez çalışmasında, pro-inflamatuvar bir sitokin olan interlökin-6'nın (IL-6), ADAMTS-14 geninin ekspresyonu üzerindeki etkileri kolorektal kanser hücre modeli olarak kullanılan SW480 hücrelerinde incelenmiştir. ADAMTS-14 genine ait farklı promotor bölgeleri hücrelere geçici olarak transfekte edilmiş ve bazal ile IL-6 uyarımı sonrası transkripsiyonel aktiviteler luciferaz raporlayıcı gen analizleri ile değerlendirilmiştir. IL-6 ve yolak inhibitörlerinin ADAMTS-14 geninin mRNA düzeyleri üzerindeki etkileri kantitatif gerçek zamanlı PCR yöntemi ile analiz edilmiş; protein ekspresyonundaki değişimler Western blot yöntemi ile belirlenmiştir. Ayrıca, ADAMTS-14 proteininin hücresel lokalizasyonu immünfloresan sitokimya yöntemi ile incelenmiştir.

Elde edilen bulgular, IL-6 uygulamasının ADAMTS-14 geninin transkripsiyonel aktivitesini artırdığını ve bu etkinin mRNA ve protein düzeylerine yansıdığını göstermiştir. İnhibitör çalışmaları, bu düzenlemenin birden fazla hücre içi sinyal yolunun katkısıyla gerçekleştiğini ortaya koymuştur. Sonuç olarak, bu çalışma IL-6 aracılı inflamatuvar sinyalizasyonun ADAMTS-14 geninin çok düzeyli regülasyonunda önemli bir rol oynadığını göstermekte ve ADAMTS-14'ün kolorektal kanserde potansiyel bir biyobelirteç veya terapötik hedef olabileceğine işaret etmektedir.

ANAHTAR KELİMELELER: ADAMTS-14, Gen ekspresyonu, İnterlökin-6, Kolorektal kanser, qRT-PCR, Transfeksiyon, Western blot

Bilim Kod / Kodları : 20610, 20606

Sayfa Sayısı : 67

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF IL-6 CYTOKINE ON ADAMTS-14 GENE

MSC THESIS

RÜMEYSA NUR VAPUR ÖNDÜL

BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

(SUPERVISOR: ASST. PROF. DR. NELİN HACIOĞLU)

BALIKESİR, FEBRUARY- 2026

The ADAMTS (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs) gene family consists of zinc-dependent metalloproteinases involved in extracellular matrix remodeling, tissue development, and inflammatory pathological processes. As a member of this family, ADAMTS-14 functions in collagen maturation and extracellular matrix organization through its procollagen N-proteinase activity. Although ADAMTS-14 has been reported to exhibit context-dependent and tissue-specific roles in various cancer types, the molecular mechanisms underlying its regulation by inflammatory cytokines remain poorly understood.

In this thesis, the effects of interleukin-6 (IL-6), a pro-inflammatory cytokine, on the expression of the ADAMTS-14 gene were investigated in SW480 cells used as a colorectal cancer cell model. Different promoter regions of the ADAMTS-14 gene were transiently transfected into cells, and transcriptional activities under basal conditions and following IL-6 stimulation were evaluated using luciferase reporter gene assays. The effects of IL-6 and its pathway inhibitors on the mRNA levels of the ADAMTS-14 gene were analyzed by quantitative real-time PCR (qRT-PCR), and changes in protein expression were determined by Western blot analysis. Furthermore, the cellular localization of the ADAMTS-14 protein was examined using immunofluorescence cytochemistry.

Our findings demonstrated that IL-6 treatment increased the transcriptional activity of the ADAMTS-14 gene, which was subsequently reflected at both mRNA and protein levels. Inhibitor studies revealed that this regulation occurs through the contribution of multiple intracellular signaling pathways. In conclusion, this study indicates that IL-6-mediated inflammatory signaling plays a crucial role in the multi-level regulation of the ADAMTS-14 gene and suggests that ADAMTS-14 could serve as a potential biomarker or therapeutic target in colorectal cancer.

KEYWORDS: ADAMTS-14, Gene expression, Interlökin-6, Colorectal cancer, qRT-PCR, Transfection, Western blot

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLO LİSTESİ	vii
ŞEKİL LİSTESİ	v
SEMBOL LİSTESİ	viii
ÖNSÖZ	ix
1. GİRİŞ	1
1.1 Kolon Kanseri	1
1.1.1 Kolon Kanseri Risk Faktörleri	1
1.1.2 Kolon Kanseri Genetik Mekanizmaları	3
1.2 Sitokinler	5
1.2.1 Sitokinlerin Sınıflandırılması	6
1.2.2 Interlökin 6 (IL-6)	6
1.2.3 IL-6 Sinyal Mekanizması	7
1.3 ADAMTS Gen Ailesi	10
1.3.1 ADAMTS-14	12
1.3.2 ADAMTS Ailesi ve Kanser	13
1.3.3 ADAMTS-14 ve Kanser	14
2. TEZİN HEDEFLERİ ve ÇALIŞMA KAPSAMI	16
3. MATERYAL METOD	18
3.1 Materyaller	18
3.1.1 Kullanılan Makine ve Teçhizat	18
3.1.2 Kullanılan Kimyasallar	20
3.1.3 Çalışmada Kullanılan Hücre Soyları	22
3.2 Metod	23
3.2.1 Tez Çalışması Esnasında Kullanılan Ortamın, Malzemenin Temizliği ve Sterilizasyonu	23
3.2.2 DNA Tabanlı Araştırmalarda Kullanılan Teknikler	23
3.2.2.1 Transkripsiyonel Aktivite Çalışmaları	23
3.2.2.2 Kalsiyum-Fosfat Yöntemi ile Geçici Transfeksiyon	23
3.2.2.3 Lusiferaz Aktivitesinin ve SEAP Aktivitesinin Ölçümü	24
3.2.3 Hücre Kültüründe Kullanılan Teknikler	25
3.2.3.1 Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılacak Malzemelerin Hazırlanması	25
3.2.3.2 Çalışmada Kullanılacak Olan Hücre Kültürünün Başlatılması	26
3.2.3.3 Hücrelerin Pasajlanması	27
3.2.3.4 Hücrelerin Dondurulması	27
3.2.3.5 Tripan Mavi Boyası ile Canlı Hücrelerin Belirlenmesi ve Sayımı	27
3.2.3.6 IL-6 Sitokin Deneylerinin Kurulması	28
3.2.4 RNA Tabanlı Teknikler	29
3.2.4.1 RNA İzolasyonu	29
3.2.4.2 RNA Miktarının Belirlenmesi	29
3.2.4.3 Reverse Transkripsiyon Reaksiyonu ile RNA'dan cDNA Sentezi	30

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.2.4.4 Polimeraz Zincir Reaksiyonu PCR ile cDNA Kalitesinin Kontrol Edilmesi.....	30
3.2.4.5 Real-Time PCR (qRT-PCR).....	31
3.3 Protein Çalışmaları.....	32
3.3.1 Western Blott Yöntemiyle Proteinlerin Tayin Edilmesi.....	32
3.3.1.1 IL-6 Sitokin Çalışmaları için Hücre Ekstraktlarının Hazırlanması.....	32
3.3.1.2 İnhibitör Çalışmaları için Hücre Ekstraktlarının Hazırlanması.....	32
3.3.1.3 Bradford Yöntemi ile Proteinlerin Miktarının Belirlenmesi.....	34
3.3.1.4 SDS-PAGE Yöntemi.....	35
3.3.1.5 Proteinlerin SDS-PAGE Jelinden PVDF Western Blot Membranına Transferi ...	37
3.3.1.6 Proteinlerin Antikorlarla Etkileşiminin İmmüno blot Tekniği ile Tespiti.....	37
3.3.1.7 Görüntüleme ve Analiz.....	38
3.3.2 İmmüno floresan Yöntemi.....	39
4. BULGULAR.....	41
4.1 ADAMTS-14 Promotor Parçalarının SW480 Hücrelerine Geçici Transfeksiyonu ve Bazal Aktivitenin Belirlenmesi.....	41
4.2 IL-6 Sitokin ADAMTS-14 Geninin Promotor Parçalarının Transkripsiyonel Aktivitesinin Belirlenmesi.....	43
4.3 ADAMTS-14 İfadesinin Belirlenmesi.....	52
4.3.1 IL-6 Sitokin ADAMTS-14 Geninin mRNA Seviyesine Etkisinin qRT-PCR ile Belirlenmesi.....	52
4.4 ADAMTS-14 Protein Ekspresyonunun Western Blotting Yöntemi Belirlenmesi.....	56
4.5 İmmüno floresan Metodu ile Protein Düzeyinde İfadenin Gösterilmesi.....	59
5.SONUÇ VE TARTIŞMA.....	61
6. KAYNAKLAR.....	63
ÖZGEÇMİŞ.....	67

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: Klasik IL-6 sinyallemesi.....	8
Şekil 1.2: ADAMTS ailesi üyelerinin yapısal domainleri (Kelwick et al, 2015).	11
Şekil 1.3: ADAMTS-14 geninin kromozom konumu.....	12
Şekil 2.1: Tez kapsamında yapılan çalışma basamaklarını özetleyen diyagram	17
Şekil 3.1: SW480 Hücre Hattının 20x Büyütme ile mikroskop altında görünümü	22
Şekil 3.2: Bradford eğrisi ve formülü	35
Şekil 4.1: 48 saatlik ve 72 saatlik Pmetluc kontrol ve Pmetluc reporter karşılaştırması. ...	41
Şekil 4.2: ADAMTS-14 fragmanlarının (720 bp, 470 bp, 390 bp) 24 saat ve 48 saat bazal aktivite karşılaştırması.	42
Şekil 4.3: 24 saat IL-6 uyarısı sonrasında 6 saat PD169 uygulamasının ADAMTS-14 promotor aktivitesi üzerindeki etkisi.	43
Şekil 4.4: 48 saat IL-6 uyarısı sonrasında 6 saat PD169 uygulamasının ADAMTS-14 promotor aktivitesi üzerindeki etkisi.	44
Şekil 4.5: 24 saat IL-6 uyarısı sonrasında 6 saat PD98059 uygulamasının ADAMTS-14 promotor aktivitesi üzerindeki etkisi.	45
Şekil 4.6: 48 saat IL-6 uyarısı sonrasında 6 saat PD98059 uygulamasının ADAMTS-14 promotor aktivitesi üzerindeki etkisi.....	45
Şekil 4.7: 24 saat IL-6 uyarısı sonrasında 6 saat SP600125 uygulamasının ADAMTS-14 promotor aktivitesi üzerindeki etkisi.....	46
Şekil 4.8: 48 saat IL-6 uyarısı sonrasında 6 saat SP600125 uygulamasının ADAMTS-14 promotor aktivitesi üzerindeki etkisi.	47
Şekil 4.9: 24 saat IL-6 uyarısı sonrasında 6 saat NF-κB uygulamasının ADAMTS-14 promotor aktivitesi üzerindeki etkisi.	48
Şekil 4.10: 48 saat IL-6 uyarısı sonrasında 6 saat NF-κB uygulamasının ADAMTS-14 promotor aktivitesi üzerindeki etkisi.....	48
Şekil 4.11: 24 saat IL-6 uyarısı sonrasında 6 saat Wort uygulamasının ADAMTS-14 promotor aktivitesi üzerindeki etkisi.....	49
Şekil 4.12: 48 saat IL-6 uyarısı sonrasında 6 saat Wort uygulamasının ADAMTS-14 promotor aktivitesi üzerindeki etkisi.....	50
Şekil 4.13: IL-6'nın normoksik koşullarda ADAMTS-14 gen ekspresyonuna zaman bağımlı etkisi.	52
Şekil 4.14: Hipoksik koşullarda IL-6 uygulamasının ADAMTS-14 gen ekspresyonuna etkisi.....	53
Şekil 4.15:IL-6 ile uyarılan ADAMTS-14 gen ekspresyonuna yolak inhibitörlerinin etkisi	54
Şekil 4.16: SW480 hücrelerinde IL-6 Sitokin ADAMTS-14 protein bantları.....	55
Şekil 4.17: IL-6 uygulanan SW480 hücre hattında ADAMTS-14 protein ifadesinin zaman bağımlı etkisi	56
Şekil 4.18: SW480 hücrelerinde IL-6 ve çeşitli inhibitör uygulamalarına ait ADAMTS-14 protein bantlarının Western blot analizi	57
Şekil 4.19: IL-6 ile uyarılan ADAMTS-14 protein ifadesine yolak inhibitörlerinin etkisi	57
Şekil 4.20: SW480 kolorektal kanser hücrelerinde normoksik koşullarda IL-6 uygulaması sonrası ADAMTS-14 protein ekspresyonunun immünofloresan görüntüleri (100x).....	59

ŞEKİL LİSTESİ (devam)

Sayfa

- Şekil 4.21** : SW480 kolorektal kanser hücrelerinde hipoksik koşullarda IL-6 uygulaması sonrası ADAMTS-14 protein ekspresyonunun immünofloresan görüntüleri. (100x)..... 59
- Şekil 4.22** : SW480 kolorektal kanser hücrelerinde HIF-1 α ile ilişkili koşullarda IL-6 uygulamasının ADAMTS-14 protein ekspresyonu üzerindeki etkisinin immünofloresan görüntüleri. (100x)..... 60

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 3.1: Kullanılan cihazlar ve markaları	18
Tablo 3.2: Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan malzemeler.....	20
Tablo 3.3: RNA çalışmalarında kullanılan kimyasallar ve firmaları.....	21
Tablo 3.4: Protein deneylerinde kullanılan kimyasallar	21
Tablo 3.5: Sitokin ve yolak çalışmalarında Kullanılan malzemeler ve alındıkları firmalar.....	22
Tablo 3.6: Çalışmada kullanılan yolak inhibitörleri	29
Tablo 3.7: H β -2-M genine ait primer dizileri	30
Tablo 3.8: ADAMTS-14 genine ait primer dizileri	31
Tablo 3.9: H β -2-M genine yönelik PCR deneyinde yer alan reaksiyon bileşenleri	31
Tablo 3.10: Western Blot Sisteminde Kullanılan Kimyasal Listesi	33

SEMBOL LİSTESİ

ADAMTS	: Trombospondin motifli bir disintegrin ve metalloproteinaz
ADAMTS14	: Tip 14 trombospondin motifli bir disintegrin ve metalloproteinaz
cDNA	: Tamamlayıcı DNA
COCl₂	: Kobalt klorür
DEPC	: Di-etilpirokarbonat
DMSO	: Dimetli sülfoksit
DNA	: Deoksi Ribonükleik Asit
dNTP	: Deoksinükleoid Trifosfat
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagles Medium
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
EDTA	: Etilen Diamin Tetraasetik Asit
Et-Br	: Etidyum Bromür
FBS	: Fetal Bovine Serum
Hβ-2	: Human-Beta-2 Microglobulin
KCC	: Kolorektal Karsinom
HIF-1α	: Hipoksiyle İndüklenen Faktör – I
Kb	: Kilo Baz
lncRNA	: Uzun Kodlanmayan RNA
M	: Molar
Ma	: Moleküler Ağırlık
miRNA	: Küçük Kodlanmayan RNA
mg	: Miligram
mM	: Milimolar
mRNA	: Mesajcı RNA
NCBI	: National Center for Biotechnology Information
Ng	: Nanogram
nm	: Nanometre
OD	: Optik Dansite
PBS	: Phosphate Buffered Saline
RNA	: Ribonükleik Asit
Rpm	: Revolution Per Minutes
SEAP	: Secreted Alkaline Phosphatase
TE	: Tripsin EDTA
UV	: Ultra Viyole
μg	: Mikrogram
μL	: Mikrolitre
μm	: Mikrometre
μM	: Mikromolar
IL	: İnterlökin
IL-6	: İnterlökin 6

ÖNSÖZ

Çalışmalarım sırasında öğretilerinden azami derecede istifade ettiğim ve öğretilerinin hayatıma kattığı önemi asla unutmayacağım saygıdeğer danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Nelin HACIOĞLU başta olmak üzere eş danışmanım Prof. Dr. Feray KÖÇKAR'a, çalışmalarım süresince deneyimlerini esirgemeyen değerli hocalarım Doç. Dr. Esra TOKAY'a, ve Arş. Gör. Serhad ONAT'a teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında aynı laboratuvarı paylaştığım ekip arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Akademik yolculuğum boyunca her zaman yanımda olan hem adaşım hem öğretmenim hem de en büyük destekçim olan Rümeyya ALAÇAM'a gönülden teşekkür ederim. Bu yolculukta yanımda oluşu benim için tarifsiz bir değerdir. Diliyorum ki bir gün bu günleri sevgiyle hatırlayıp çocuklarımızın mezuniyetlerini de yan yana aynı gurur ve mutlulukla kutlayalım.

Lise yıllarımdan beri yanımda olan bana bilimi sevdiren, karakteri ve duruşuyla her zaman örnek aldığım bazen bir öğretmen bazen bir abla olan, kalbindeki güzellikleri bütün çevresine yansıtan canım hocam Yüksek Biyolog Aysun ÇAKIR'a içten teşekkürlerimi sunarım.

Üniversiteye giriş aşamamdan bu zamana her süreçte yanımda olan benimle gülen benimle ağlayan tüm yolları beraber aştığımız canım arkadaşım Fatma ŞAHİN'e desteği ve sonsuz sevgisi için çok teşekkür ediyorum.

Hayatım boyunca ellerini omzumdan hiç eksik etmeyen maddi ve manevi olarak her zaman beni destekleyen canım ailem başta sevgili annem Emine VAPUR ve bu dünyada sahip olabileceğim en iyi kardeşler, canım ablam Nurefşan VAPUR ve canım abim Furkan VAPUR'a hayatımdaki sonsuz sevgileri ve ilgileri için çok teşekkür ederim.

Kalbine ve merhametine hayran olduğum, el ele verdiğimizde her zorluğu birlikte aşabildiğimiz, hayatıma anlam katan meslektaşım ve sevgili eşim Burak ÖNDÜL'e bu yolculuğu benimle birlikte özel ve anlamlı kıldığı ve varlığıyla her aşamada yanımda olduğu için en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bugün sahip olduğum birçok değerini temelinin atan, emekleriyle her zaman bizi kendinden çok düşünen ve eğitim hayatımız için elinden geleni yapan biricik babam Nurettin VAPUR'a .. Hayatım boyunca verdiği destek, gösterdiği sabır ve sağladığı güven için ona minnettarım. Bu çalışma onun fedakarlıklarına ve pamuk kalbine duyduğum derin sevginin bir ifadesidir.

Balıkesir, 2026

Rümeyya Nur VAPUR ÖNDÜL

1. GİRİŞ

1.1 Kolon Kanseri

Kolon ve rektumda ortaya çıkan maligniteleri kapsayan kolorektal kanser, dünya genelinde en yaygın kanser türlerinden biri olup, kansere bağlı ölüm oranları açısından ikinci sırada yer almakta ve bu nedenle ciddi bir küresel sağlık sorunu olarak değerlendirilmektedir (Hossain et al.,2022).

Kolorektal kanser (KRK), dünya genelindeki kanser vakalarının yaklaşık %10'unu oluşturması nedeniyle önemli bir sağlık sorunu olarak öne çıkmaktadır (Garcia-Etxebarria et al., 2021).

2012 yılında kolorektal kanser nedeniyle dünya genelinde yaklaşık 1,4 milyon yeni vaka ve 700.000'e yakın ölüm gerçekleşmiştir. Birçok ülkede bu kanser türünün görülme sıklığında artışlar rapor edilmiştir. Demografik değişiklikler ve nüfus artışının etkisiyle, kolorektal kanserin küresel yükünün 2030 yılına kadar %60 oranında artarak, yıllık yeni vaka sayısının 2,2 milyonu, ölüm sayısının ise 1,1 milyona ulaşması beklenmektedir (Goodarzi et al., 2019).

Kolorektal kanserin dünya genelindeki dağılımı ülkeler arasında önemli farklılıklar göstermektedir; vakaların büyük bir kısmı ile ölümlerin yaklaşık %60'ı, yüksek veya çok yüksek İnsan Gelişim Endeksi (HDI) seviyesine sahip ülkelerde meydana gelmektedir (Arnold et al.,2017).

Kolorektal kanser insidansı dünya genelinde bölgelere göre farklılık göstermekte ve son yıllarda ekonomik gelişme, Batılı yaşam tarzı (yüksek yağ, kırmızı/işlenmiş et tüketimi, düşük lif alımı, obezite ve hareketsizlik) ile artmaktadır. Bu değişimler, göçmenlik ve epidemiyolojik çalışmalarla desteklenmiştir. (Murphy et al.,2019).

1.1.1 Kolon Kanseri Risk Faktörleri

Kolorektal kanserin gelişiminde çok sayıda faktörün rol oynadığı bilinmektedir. Bireyin kendisinde veya birinci derece akrabalarında daha önce kanser öyküsü bulunması, kolon polipleri, inflamatuvar bağırsak hastalıkları, diyabet mellitus ya da kolesistektomi geçmişi olması, kolorektal kanser riskini artıran önemli klinik etmenler arasında yer almaktadır.

Bununla birlikte, yaşam tarzı ile ilişkili faktörler de hastalığın etiolojisinde belirleyici rol oynamaktadır. (Sawicki et al., 2021).

Yüksek sebze veya lif alımının kolon kanseri riskinde yaklaşık %40 ila %50'lik bir azalma ile ilişkili olduğunu bulunmuştur. (Trock et al.,1990). Kırmızı etin etkileri birçok epidemiyolojik çalışmada incelenmiştir. kırmızı et tüketiminin artmasıyla kolon kanseri veya adenom riskinde artış arasında bir ilişki olduğunu bildirilmiştir. (Giovannucci and Willett, 1994).2010'da gerçekleştirilen bir çalışma, sigara kullanımının kolon kanseri riskini artırıcı bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Bu araştırma aynı zamanda, sigara maruziyetinin kolon kanseri patogenezinde epigenetik modifikasyonlar aracılığıyla rol oynayabileceği sonucunu ortaya koymuştur (Limsui et al.,2010).

2020 yılında yapılan bir çalışmaya göre, sigara kullanımının kolorektal kanser (KRK) riskini cinsiyete ve tümörün anatomik konumuna göre farklı şekillerde etkilediği belirlenmiştir. Araştırma, erkeklerde sol kolon kanseri riskinde artış gözlemlerken, kadınlarda ise sağ kolon kanseri riskinin yükseldiğini ortaya koymuştur. Ayrıca, kadınlarda rektal kanser riskinin sigara içme miktarıyla daha güçlü bir ilişki gösterdiği bulunmuştur. Bu bulgular, sigara ve KRK arasındaki ilişkinin genel olmaktan ziyade, tümörün yerleşim yerine ve bireyin cinsiyetine göre özelleştiğini vurgulamaktadır (Leslie and Chan, 2020).

Yapılan kapsamlı bir değerlendirmeye göre, vücut yağ fazlalığı ile kolon kanseri riski arasında anlamlı bir ilişki bulunmaktadır. Bu ilişki, özellikle beden kitle indeksi yükseldikçe artmakta ve hem epidemiyolojik hem de biyolojik verilerle desteklenmektedir (Lauby-Secretan et al.,2016). İran merkezli bir kohort çalışması, bel–kalça oranı gibi merkezi obezite ölçütlerinin, özellikle kadın bireylerde kolon kanseri riskini anlamlı derecede artırdığını göstermiştir (Hashemi Madani et al.,2021). 2022 yılında yayımlanan bir çalışmada, obezitenin kolon kanseri gelişiminde leptin hormonunun önemli bir rol oynadığı belirtilmiştir. Obezite ile artan leptin seviyelerinin, kolon kanseri hücrelerinde büyüme ve çoğalmayı tetikleyen sinyal yollarını aktive ettiği gösterilmiştir. Bu bulgular, leptin sinyal yollarının kolon kanserinde potansiyel bir tedavi hedefi olabileceğini düşündürmektedir. (Socol et al.,2022).

Kolorektal kanserin ortaya çıkışında beslenme, yaşam tarzı ve çevresel faktörlerin etkileri geniş ölçüde belgelenmiş olsa da hastalığın etiolojisinde genetik faktörler de vazgeçilmez

bir rol oynamaktadır. Kolorektal kanserin kalıtsal formlarında en sık görülen genetik bozukluklar, APC geninde görülen germline mutasyonlar (familial adenomatöz polipozis) ve DNA tamir genlerindeki mutasyonlar (Lynch sendromu) ile ilişkilidir (Rao and Yamada,2023).

1.1.2 Kolon Kanseri Genetik Mekanizmaları

Kolorektal kanser vakalarının yaklaşık %20'si, bireylerin taşıdığı ailesel veya doğuştan gelen genetik mutasyonlar nedeniyle ortaya çıkmakta ve bu tip kanserler genellikle daha erken yaşlarda teşhis edilmektedir. Kalan %80'lik büyük kesim ise, belirgin bir kalıtsal yatkınlık olmaksızın gelişen sporadik vakalardan oluşur. Sporadik KRK'lerin yaşamın ileri evrelerinde gözlenmesi, hastalığın gelişiminde çevresel faktörlerin, zamanın ve zamanla biriken çok sayıda spesifik genetik ve/veya epigenetik değişikliğin önemli bir rol oynadığına işaret etmektedir (Roshandel at al.,2024).

Kolorektal kanserler (KRK'ler), temelde kromozomal instabilite (CIN), CpG adacık metilatör fenotipi (CIMP) ve mikrosatellit instabilite (MSI) olmak üzere üç farklı moleküler mekanizmanın tek başına veya bir kombinasyonu sonucunda ortaya çıkabilir. Bu mekanizmalar, KRK'nin moleküler heterojenitesini anlamak ve hastalığın gelişim yollarını sınıflandırmak için kritik bir temel oluşturmaktadır (Pino and Chung, 2010).

Kolorektal kanserin (KRK) oluşumunda rol oynayan temel genetik mekanizmalardan biri ve en yaygın olanı kromozomal instabilite (CIN) yoludur. CIN, hücrelerin bölünme süreci sırasında kromozomların sayısında veya yapısında meydana gelen kalıcı bozulmalarla tanımlanır. Bu tür genetik dengesizlikler; anöploid (kromozom sayısının normalden sapması), heterozigotluk kaybı (LOH) ve kromozomal translokasyonlar gibi yapısal değişikliklerin gelişmesine neden olarak, tümör oluşumuna zemin hazırlar (Tariq and Ghias, 2016).

Kromozomal instabilite (CIN) süreci genellikle APC genindeki mutasyonlarla başlar. APC proteini, hücre iskeletinin düzenlenmesinde ve mitoz sırasında kromozomların doğru şekilde ayrılmasında önemli rol oynar. Bu genin işlev kaybı, mikrotübül organizasyonunun bozulmasına ve kromozomların düzgün ayrılamamasına yol açarak genetik materyalin hücreler arasında eşit olmayan dağılımına neden olur. Bu genomik dengesizlik ortamında sıklıkla KRAS proto-onkogeninin aktivasyonu gerçekleşir; bu mutasyon hücre

proliferasyonunu artırır. Sürecin ilerleyen safhalarında ise, TP53 tümör baskılayıcı geninin inaktivasyonu ile apoptoz ve DNA onarımı gibi hücresel kontrol mekanizmaları devre dışı kalır. Bu ardışık genetik değişiklikler, kolorektal kanserin gelişimini tetikleyen temel olaylar arasında yer alır (Pino and Chung, 2010).

CIN tümörleri, spesifik onkogenlerde ve tümör süpresör genlerinde (örn. APC, KRAS, fosfatidilinositol-4,5-bisfosfat 3-kinaz, katalitik alt birim alfa (PIK3CA), B-Raf proto-onkogeni, serin/treonin kinaz (BRAF), SMAD4 ve TP53 mutasyonların birikmesiyle ayırt edilir, bu da karsinogenez için kritik olan yolları aktive eder (Lengauer et al.,1998).

Kromozomal instabilite (CIN), yalnızca genetik yapıdaki mutasyonlarla sınırlı bir durum değildir. Aynı zamanda, hücre döngüsünü kontrol eden önemli noktalar olan kontrol noktalarındaki (checkpoints) bozulmalar ve özellikle TP53 gibi tümör baskılayıcı genlerin işlevini kaybetmesiyle de yakından ilişkilidir. Bu genetik dengesizlik, hücrelerin DNA hasarlı olduğu halde bölünmeye devam etmesine imkân tanır.

CIN yoluyla ortaya çıkan kolorektal kanserlerde sıklıkla yüksek düzeyde genetik heterojenlik gözlemlenir. Bu heterojen durum, tümör hücreleri arasında önemli farklılıkların oluşmasına neden olur. Sonuç olarak, bu durum hem doğru tanı koyma süreçlerini zorlaştırır hem de kanserin tedaviye vereceği yanıtı öngörmeyi güçleştirerek kişiselleştirilmiş tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesinde çeşitli engeller yaratır (Toyota and Issa, 1999).

Kolorektal kanserin gelişiminde yalnızca genetik mutasyonlar değil, aynı zamanda epigenetik değişiklikler, özellikle CpG adacıklarının anormal metilasyonu, önemli rol oynamaktadır. CpG adacıkları, genellikle promotör bölgelerde yer alan ve normalde metillenmemiş halde bulunan DNA dizileridir. Bu bölgelerde meydana gelen hipermetilasyon, başta tümör baskılayıcı genler olmak üzere birçok genin transkripsiyonel olarak susturulmasına yol açabilir (Issa,2004).

Kolorektal kanserde sık görülen CIMP (CpG Island Methylator Phenotype) olarak adlandırılan bir epigenetik alt tip, MLH1, CDKN2A (p16), ve SFRP genleri gibi birçok genin promotör bölgesinde aşırı metilasyonla karakterizedir (Weisenberger et al.,2006). Bu epigenetik silinmeler, hücre döngüsü kontrolünün bozulmasına, DNA tamir yollarının devre dışı kalmasına ve sonuçta tümöral dönüşüme katkı sağlar. Ayrıca CIMP-pozitif tümörler,

sıklıkla mikrosatellit instabilitesi (MSI) ile birlikte bulunur ve genellikle BRAF mutasyonu ile de ilişkilidir (Kany,2019). Bu durum, CpG adacığı metilasyonunun KRK'de sadece erken evrelerde değil, moleküler alt tiplerin tanımlanmasında da önemli bir biyobelirteç olabileceğini göstermektedir.

1.2 Sitokinler

Sitokinler, bağışıklık yanıtını düzenlemek ve etkilemek üzere hemen hemen her hücre tarafından üretilen, 40 kilodaltondan (kDa) küçük boyutlu, salgılanan proteinlerdir ve bağışıklık sistemi hücreleri arasındaki iletişimi sağlamakla görevlidirler. Bununla birlikte, pek çok sitokin bağışıklık sistemi dışında da düzenleyici görevler üstlenirler (Schaper and Rose-John,2015; Liu et al. 2021). Farklı biyolojik sıvılarda (kan, serum, tükürük, dışkı, ter vb.) ölçülen sitokin düzeylerindeki değişiklikler; birçok hastalığın tanısı, prognozu ve tedavi yanıtının izlenmesinde değerli biyobelirteçler olarak kullanılmaktadır. Özellikle aşırı sitokin salınımının gözlemlendiği "sitokin fırtınası" gibi durumlar, organ yetmezliği ve ölümlerle sonuçlanabilecek ciddi klinik tablolara neden olabilmektedir (Bonati and Tang, 2021).

Sitokinler, ortak genetik kökenleri olmasa da benzer yapısal özellikleri paylaşan "süper aileler" halinde gruplandırılır. birden fazla hücre tipi aynı sitokini üretebilir. Bir sitokinin hedef hücreye göre değişen etkiler göstermesi, onların pleiotropik yapısından kaynaklanır (Issa,2004). Ayrıca, farklı sitokinler aynı işlevi görerek yedeklilik (redundancy) sergileyebilir; öte yandan, birlikte hareket ederek sinerjik etkiler de yaratabilirler. Bu moleküller, hücreler arası sinyal kaskatlarını tetikleme potansiyelleri sayesinde, çok düşük konsantrasyonlarda bile hücreler üzerinde güçlü, hatta yıkıcı sonuçlar doğurabilirler. (Schaper and Rose-John, 2015).

Sitokinler, reseptörlerinin konformasyonuna göre kemokinler, interferonlar (IFN'ler), interlökinler (IL'ler) ve tümör nekroz faktörleri (TNF'ler) gibi farklı alt sınıflara ayrılırlar. Sitokinler, spesifik reseptörlere bağlanarak etki gösterirler; bu bağlanma, reseptör dimerizasyonunu veya membran yeniden düzenlenmesini tetikler. Reseptör agregasyonu, reseptörün sitoplazmik bölgelerindeki serin ve tirozin kalıntılarını fosforlayan ve nükleer translokasyon ile gen ekspresyonunun düzenlenmesi için farklı transkripsiyon faktörlerini aktive eden belirli kinazları aktive ederler (O'Shea at al.2019).

Sitokinler tipik olarak birden fazla hücre tipi tarafından yapılan ve yerel olarak etki eden faktörler olarak karakterize edilirken, hormonlar özelleşmiş hücreler tarafından salgılanır ve

kısıtlı bir hedef hücre grubuna uzaktan etki eder. Birçok sitokin otokrin veya parakrin şekilde yerel olarak etki etse de bazıları kan dolaşımına girerek tipik bir endokrin şekilde etki edebilir (Borowczak et al.,2022).

1.2.1 Sitokinlerin Sınıflandırılması

Sitokinler, birden fazla kategoriye ayrılarak incelenebilir; bunlar arasında tümör nekroz faktörleri (TNF'ler), interlökinler (IL'ler), lenfokinler, monokinler, interferonlar (IFN'ler), koloni uyarıcı faktörler (CSF'ler) ve transforme edici büyüme faktörleri (TGF'ler) yer alır. Sitokinler, üstlendikleri role bağlı olarak pro-inflamatuar (iltihap tetikleyici) veya anti-inflamatuar (iltihap önleyici) olarak da sınıflandırılabilir. IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α ve interferonlar gibi pro-inflamatuar sitokinler, iltihabi reaksiyonları kolaylaştırır ve bağışıklık yeteneği olan hücreleri uyarma eğilimindedir. Buna karşılık, IL-4, IL-6, IL-10, IL-11, IL-13, IL-1 reseptör antagonisti (IL-1RA) ve TGF- β gibi anti-inflamatuar sitokinler, iltihabi baskılar ve bağışıklık hücrelerini bastırır. Bazı sitokinler (örneğin IL-6) ise hem pro-inflamatuar hem de anti-inflamatuar özelliklere sahiptir. Bu sitokin sınıflandırmaları, özellikle pro- ve anti-inflamatuar sitokin aileleri, konak yanıtının tetiklediği yolları anlamak için geniş perspektifler sunar. Bir sitokin farklı hücreler tarafından salgılanabilir ve bağlama bağlı olarak hem pro-inflamatuar hem de anti-inflamatuar aktiviteler göstererek çoklu immün yanıtlar oluşturabilir. Sonuç olarak, pro- ve anti-inflamatuar sitokinler arasındaki dinamik ve sürekli değişen denge, iltihabi aracılık ederek ve modüle ederek konak bağışıklık sisteminde önemli bir rol oynar. Pro-inflamatuar sitokinler, otoimmün iltihabın başlamasına ve ilerlemesine katkıda bulunurken, anti-inflamatuar sitokinler iltihabın gerilemesini ve otoimmün hastalığın akut fazlarından iyileşmeyi kolaylaştırır (Bonati and Tang, 2021).

1.2.2 Interlökin 6 (IL-6)

Son yıllarda, tümör mikroçevresinin (TME) patofizyolojisini ve epitelyal-mesensijal geçişin (EMT) başlatılmasının kanser hücrelerinin göçü ve metastazı üzerindeki etkisini anlamada önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Yeni raporlar hâlâ yayınlanıyor olsa da interlökinlerin kanser hücreleri ile bitişik dokular arasındaki karşılıklı iletişimi aracılık ederek karsinogenezi etkilediği zaten bilinmektedir (Wu et al.,2025).

İnterlökin-6 (IL-6), inflamasyon ve bağışıklık yanıtlarında kritik bir rol oynayan pro-inflamatuar bir sitokindir. Son yıllarda IL-6'nın tümör mikroçevresinde (TME) tümör oluşumu ve immünoterapi yanıtı üzerindeki etkileri yoğun olarak araştırılmıştır. Kanser

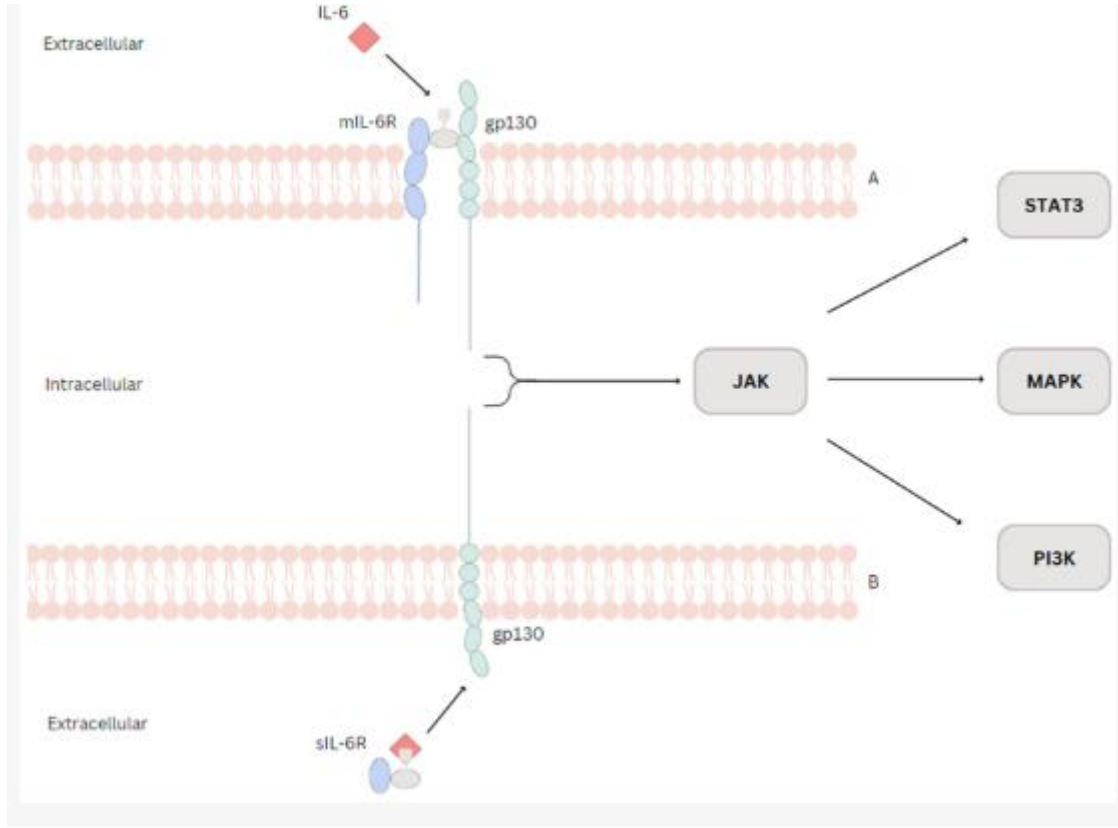
gelişiminde genetik mutasyonlar temel belirleyici olsa da tümör mikroçevresindeki kanser hücreleri ile kanser dışı hücreler arasındaki etkileşimler de hastalığın ilerleyişinde önemli bir yer tutmaktadır. IL-6, inflamatuvar sinyal yollarını aktive ederek tümör hücrelerinin proliferasyonunu, hayatta kalmasını ve metastaz yapmasını desteklemekte ve böylelikle kanser patogenezinde önemli bir rol üstlenmektedir. Ayrıca, makrofajlar, T hücreleri, miyeloid kaynaklı baskılayıcı hücreler, dendritik hücreler ve doğal katil hücreler gibi çeşitli bağışıklık hücreleri IL-6'nın etkisi altında immünosupresif bir tümör mikroçevresinin oluşumuna katkıda bulunmaktadır. Bu bağlamda, IL-6'nın tümör bağışıklığı üzerindeki karmaşık fonksiyonu, kanser tedavisinde hedeflenmesinin zorluklarını da beraberinde getirmektedir (Rašková et al.2022).

İnterlökin-6 (IL-6), ilk olarak 1986 yılında Hirano ve ark. tarafından bağışıklık hücreleri tarafından üretilen pro-inflamatuvar bir sitokin olarak tanımlanmıştır. O tarihten bu yana, IL-6 kronik inflamatuvar hastalıklardan kansere kadar çok çeşitli patolojilerde rol oynamasıyla ilişkilendirilmiştir. Literatürde IL-6 üretiminin sadece bağışıklık hücreleriyle sınırlı olmadığı; deri, bağırsak, düz kas, akciğer gibi çeşitli parankimal dokuların yanı sıra mezenkimal hücreler ve fibroblastlar gibi stromal hücreler tarafından da sentezlenebildiği bildirilmektedir. IL-6 sinyal yollarının anormal aktivasyonunun kanser hastalarında kötü klinik sonuçlarla ilişkili olduğuna işaret etmektedir. Dolayısıyla, IL-6'nın hem stromal hem de parankimal hücrelerdeki etkilerinin tümör invazyonu ve metastazında önemli rol oynadığı kabul edilmektedir (Lacina et al.2019).

1.2.3 IL-6 Sinyal Mekanizması

IL-6, 184 amino asitten oluşan (molekül ağırlığı 23.7 kDa) bir glikoproteindir. IL-6 reseptörü hücre zarında yer alan bir proteindir ve gp130 adlı başka bir transmembran glikoproteinle birleşerek karmaşık bir yapı oluşturur.

IL-6 bu komplekse bağlandığında, gp130'u aktive ederek bir sinyal ileticisi görevi görmesini sağlar. Bir transmembran protein olan IL-6R, gp130 adlı bir glikoproteinle birleşerek bir kompleks oluşturur. IL-6'nın IL-6R'ye bağlanması, bu kompleks içindeki gp130'u etkinleştirerek sinyal iletimini başlatır. IL-6R, bir glikoprotein olan gp130 ile birlikte hücre zarında bir araya gelerek bir kompleks oluşturur. IL-6 bu reseptöre bağlandığında, gp130'u sinyal iletimini başlatacak şekilde tetikler (Nenu et al,2023).



Şekil 1.1: Klasik IL-6 sinyallemesi

IL-6, hücre zarına bağlı IL-6 reseptörünün (mIL-6R) hücre dışı kısmındaki sitokin bağlama bölgesine bağlanarak gp130'ü Janus kinaz (JAK)'ı aktive etmesi için uyarır.

Trans IL-6 sinyallemesi: mIL-6R'nin hücre dışı kısmı kesilerek oluşan çözünebilir IL-6 reseptörü (sIL-6R), IL-6 ile birlikte bir kompleks oluşturur. Bu sIL-6R-IL-6 kompleksi, gp130'ü Janus kinaz (JAK)'ı aktive etmesi için uyarır (Şpanko et al.2021). gp130, hücre içi sinyallemenin başlatıcı bileşeni olarak görev yapar. Bu reseptörün etkinleşmesinden sonra üç ana yol devreye girer:

1. JAK–STAT (Janus kinaz/sinyal ileticisi ve transkripsiyon aktivatörü) yolu,
2. MAPK (mitojenle aktive olan protein kinaz) sinyal kaskadı,
3. PI3K (fosfatidilinozitol-3-kinaz) yolu Bu sinyal yolları arasında karşılıklı bir iletişim ağı (cross-talk) bulunsa da etkileşim mekanizmaları henüz tam olarak aydınlatılamamıştır (Heinrich et al.2003).

Sitokin reseptörlerinin dikkat çekici bir özelliği, kendilerine ait kinaz aktivitesine sahip olmamalarıdır. Bu nedenle, Janus kinaz (JAK) ailesine ait enzimler gp130'un sitoplazmik

kısmına bağlanarak bu eksikliği tamamlar. IL-6'nın IL-6R'ye bağlanmasının ardından JAK proteinleri oto-fosforilasyon ile aktive olur. IL-6 sinyal iletiminde görev alan JAK ailesi üyeleri JAK1, JAK2 ve Tyk2'dir; bunlardan JAK1 ana düzenleyici rol üstlenir. Aktive olan JAK'lar, gp130'un sitoplazmik bölgesinde yer alan belirli tirozin kalıntılarını fosforile eder. Fosforilasyon sonrasında özellikle Y767, Y814, Y905 ve Y915 bölgeleri STAT1 ve STAT3 monomerlerinin bağlanmasına aracılık eder. Bu proteinler, sırasıyla STAT1 için Y701 ve STAT3 için Y705 bölgelerinde fosforilasyon geçirir, ardından dimerleşerek çekirdeğe taşınır ve hedef genlerin transkripsiyonunu başlatır (Heinrich et al.2003).

IL-6 aracılı sinyal iletimi yalnızca JAK/STAT, MAPK ve PI3K/AKT kaskadlarının aktivasyonu ile sınırlı değildir; aynı zamanda hücre içi homeostazı korumak amacıyla çeşitli düzenleyici proteinler tarafından kontrol edilir (Yasukawa et al.2003). Bu düzenleyicilerden en önemlisi, SOCS (Suppressor of Cytokine Signaling) protein ailesidir. Özellikle SOCS3, gp130'un fosforile tirozin bölgelerine bağlanarak JAK aktivitesini inhibe eder ve böylece STAT3'ün aşırı fosforilasyonunu engeller (Alexander,2002). Bu mekanizma, IL-6 sinyaliyle uyarılan negatif geri besleme döngüsü olarak görev yapar (Shuai,2006).

Buna ek olarak, PIAS (Protein Inhibitor of Activated STAT) proteinleri de çekirdek düzeyinde etki göstererek aktive STAT proteinlerinin DNA'ya bağlanmasını engeller (Yuan et al.,2005). IL-6 aracılı STAT3 aktivitesi yalnızca tirozin fosforilasyonu ile değil, aynı zamanda post-translasyonel modifikasyonlar ile de düzenlenir; STAT3'ün Ser727 fosforilasyonu veya Lys685 asetilasyonu, transkripsiyonel aktivitesini artırır (Fischer et al.,2004).

gp130 üzerindeki Tyr-759 kalıntısı, STAT3 ve MAPK sinyal yolları arasındaki dengenin korunmasında kritik rol oynar; bu kalıntının fosforilasyonu STAT3 aktivitesini azaltırken MAPK aktivitesini artırır (Garbers et al,2018). Ayrıca, çözünür gp130 (sgp130), IL-6/sIL-6R kompleksini bağlayarak trans-sinyal yolunu doğal olarak inhibe eder ve böylece aşırı inflamatuvar yanıtları sınırlar (Grivennikov and Karin, 2010). Bu çok katmanlı düzenleme mekanizmaları, IL-6 sinyal yolunun fizyolojik koşullarda kontrollü, patolojik durumlarda ise (örneğin tümör mikroçevresinde) aşırı aktif hale gelmesini önlemeye yöneliktir (Kelwick et al.,2015).

1.3 ADAMTS Gen Ailesi

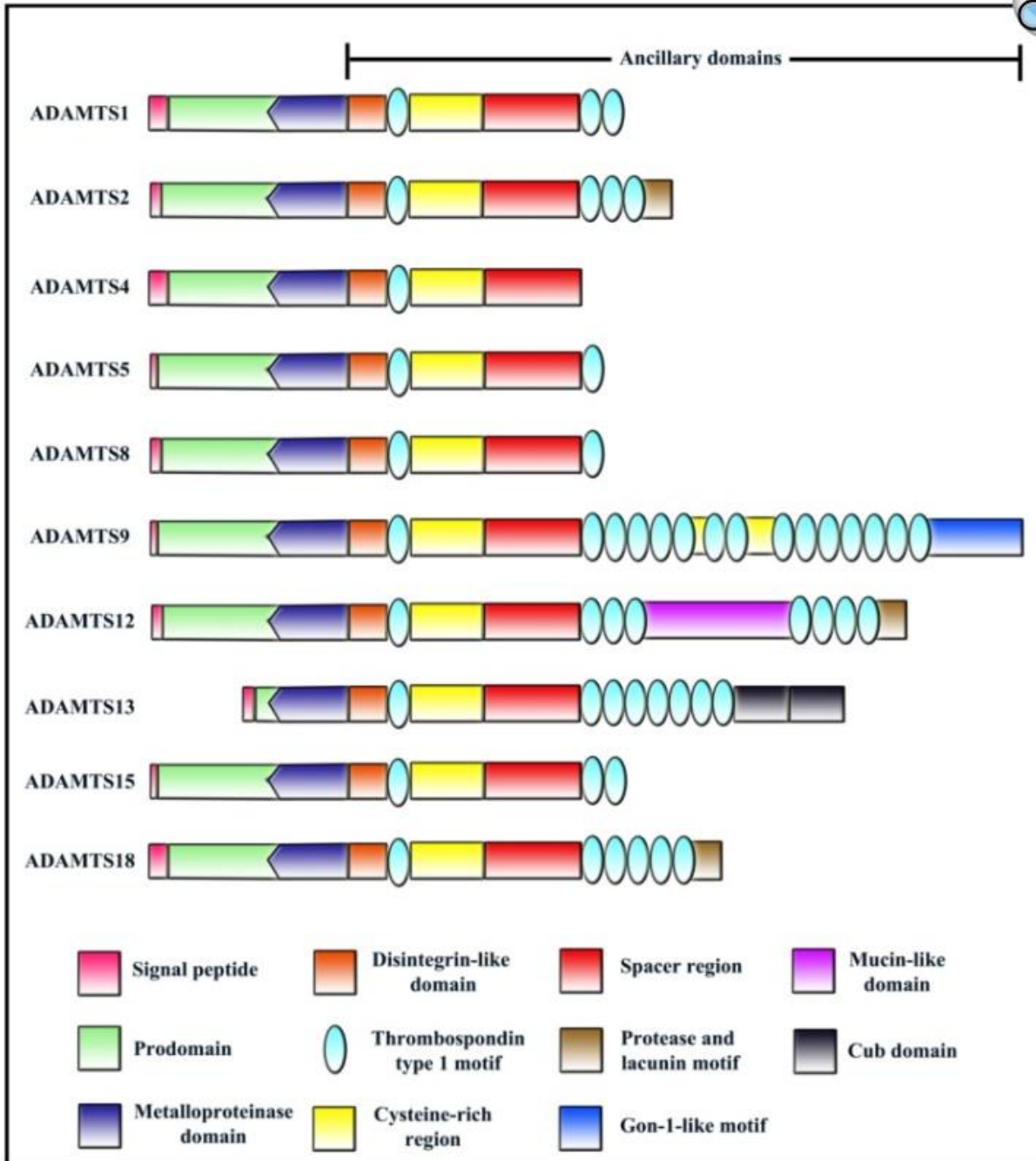
ADAMTS (Trombospondin Motifli A Disintegrin ve Metalloproteinaz) enzimleri, hücre dışı matrise (ECM) bağlı, birden çok alana sahip, salgılanan çinko metalloendopeptidazlar sınıfına aittir. Bu enzimler, doku gelişimi (morfogenez), hastalıklı doku yeniden yapılanması (patofizyolojik remodelling), inflamasyon ve vasküler biyoloji gibi çok çeşitli fizyolojik süreçlerde kritik görevler üstlenir (Kelwick et al, 2015).

İnsan genomunda, ADAMTS ailesi bilinen substratlarına göre aşağıdaki beş ana kategoride gruplanan 19 üyeden oluşur:

- **Proteoglikanazlar (Agrekanazlar):** Ekstraselüler matristeki proteoglikanları parçalamada uzmanlaşmışlardır. Bu gruba ADAMTS1, 4, 5, 8, 9, 15 ve 20 dahildir.
- **Prokolajen N-Propeptidazlar:** Kolajen liflerinin doğru montajı için öncü kolajen moleküllerinin N-terminal propeptitlerini keser. Bu alt grubu ADAMTS2, 3 ve ADAMTS14 oluşturur.
- **COMP İşleyen Enzimler:** Kıkırdak Oligomerik Matris Proteini'ni (COMP) hedefler. Bu gruptaki üyeler ADAMTS7 ve 12'dir.
- **Von-Willebrand Faktör Proteinazı:** Kan pıhtılaşmasında önemli bir rol oynayan Von-Willebrand Faktörü'nü keser ve ADAMTS13 ile temsil edilir.
- **Orfan Enzimler:** Bilinen spesifik fizyolojik substratları henüz net olarak belirlenmemiş olan üyelerdir (ADAMTS6, 10, 16, 17, 18 ve 19) (Jones and Riley, 2005).

ADAMTS (Trombospondin Motifli A Disintegrin ve Metalloproteinaz) proteinazları, ilk kez 1997 yılında Kuno ve ekibi tarafından farelerde tanımlanarak bilim dünyasına girmiştir. Bu enzimler, kısa süre içinde memeliler ve *Caenorhabditis elegans* gibi çeşitli organizmalarda da belirlenmiştir. Filogenetik açıdan incelendiğinde, ADAMTS ailesi, MEROPS veri tabanında belirtilen metallopeptidazların MA klanı, M12 ailesi altında yer alan adamalizin alt ailesinin (B alt ailesi) bir üyesidir. Bu konumsal yakınlık, ADAMTS enzimlerinin yapısal ve evrimsel olarak aynı alt aileye ait olan ADAM (A Disintegrin ve Metalloproteinaz) enzimleri ile güçlü bir ilişki içinde olduğunu göstermektedir. Öte yandan, Matris Metalloproteinazları (MMP'ler) ile daha uzak bir akrabalık söz konusudur. Bu sınıflandırma,

ADAMTS proteinazlarının ADAM (A Disintegrin and Metalloproteinase) ailesiyle yakın evrimsel ilişkisini, ancak matriks metalloproteinazlar (MMP'ler) ile daha uzak bir bağlantıya sahip olduğunu göstermektedir (Lin et al.,2020).

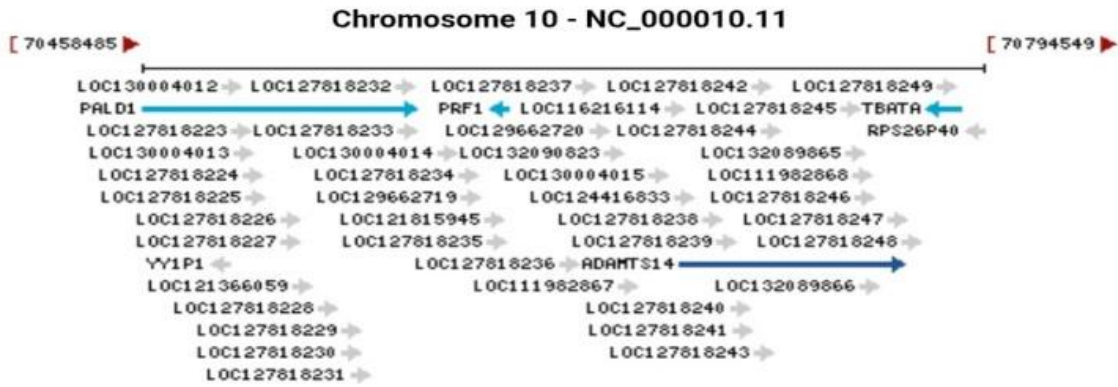


Şekil 1.2: ADAMTS ailesi üyelerinin yapısal domainleri (Kelwick et al, 2015)

1.3.1 ADAMTS-14

ADAMTS14, kromozom 10q22.1 üzerinde yer alan, çinko bağımlı ADAMTS proteaz ailesinin bir üyesidir. Enzimin moleküler yapısı, bir N-terminal katalitik alan ile substrat özgüllüğünü belirleyen bir C-terminal yardımcı alan içerir.

Bu yardımcı alan, trombospondin tip 1 tekrarlarını (TSR) ve prokolajen substratını tanımada kritik bir rol üstlenen benzersiz bir prolin açısından zengin bölgeyi (PRR) barındırır. ADAMTS14, ADAMTS2 ve ADAMTS3 ile hem dizi hem de işlevsel açıdan yüksek oranda homolojiye sahiptir. Bu enzimler, benzer aktiviteleri paylaşır ve karakteristik olarak dört adet TSR1 alanı ile bir proteaz ve lakunin (PLAC) alanını içeren C-terminal prokolajen N-proteinaz (PNP) alanının varlığıyla ayırt edilir (Leduc et al.,2021).



Şekil 1.3:ADAMTS-14 geninin kromozom konumu

Ancak, bu yapısal benzerliklere rağmen, rollerinde ayrışmalar mevcuttur. Örneğin, ADAMTS2, tümör içi vaskülarizasyonu kesintiye uğratarak anti-anjiyogenik özelliklere aracılık eden potansiyel bir reseptör olarak tanımlanmıştır. Buna karşın, ADAMTS14'ün, Tip I kollajen açısından zengin bağ dokularında ADAMTS2 ile birlikte düşük seviyelerde ifade edilmesine rağmen, Ekstraselüler Matriksin (ECM) yeniden şekillenmesi için bir tetikleyici görevi gördüğü bilinmektedir (Leduc et al.,2021).

Ekstraselüler matriks (ECM), kollajenler, elastin, proteoglikanlar ve matris metalloproteinazlar gibi çok sayıda bileşenden oluşan ve doku mimarisinin hem yapısal hem de işlevsel olarak korunmasında kritik rol oynayan dinamik bir yapıdır. Bu bağlamda, metalloproteinaz ailesi üyesi olan ADAMTS14 proteazının özellikle fibriler kollajenlerin

aminopro-peptidlerinin işlenmesinde yer aldığı ve collagen fibril organizasyonunu etkilediği gösterilmiştir (Leduc et al.,2021). Öte yandan, pro-inflamatuvar sitokin olan IL-6'nın doku onarımı ve remodelingi sırasında ECM gen ekspresyonunu aktifleştirdiği; tendon kök hücrelerinde IL-6 uygulaması sonrası COL1A1, COL3A1 ve ACAN gibi ECM genlerinde anlamlı artış gözleendiği çalışmalarda bildirilmiştir (Altmann et al.,2023).

1.3.2 ADAMTS Ailesi ve Kanser

Ekstraselüler matrisin düzenlenmesinde kritik rol oynayan ADAMTS (A Disintegrin and Metalloprotease with ThromboSpondin motifs) metalloproteaz ailesi hem fizyolojik hem de patolojik süreçlerin merkezinde yer alırlar. ADAMTS'lerin tümör karşıtı (antitumor) etkiler göstererek anjiyogenezi inhibe edebildiği bilirse de ailenin ilk üyesi olan ADAMTS1'in kanser hücre çoğalmasını ve metastazı teşvik eden pro-tümörijenik roller üstlendiği, özellikle de tümör çevresindeki ECM'nin yeniden yapılanmasını kolaylaştırdığı çalışmalarda gösterilmiştir (Kumar and Ge, 2012).

ADAMTS-4 ekspresyonunun, meme, baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomu ve insan glioblastoması gibi çeşitli insan kanserlerinde arttığı gözlemlenmiştir. ADAMTS4'ün kanserdeki rolünün, enzimin katalitik aktivitesine ve farklı izoformlarının oranına bağlı olarak hem pro- hem de anti-tümörijenik yönde seyredebileceği gösterilmekte olup, bu metalloproteazın kanser tedavisi potansiyeli açısından mekanizmasının detaylı şekilde aydınlatılması gerekmektedir (Przemyslaw et al,2013).

ADAMTS-5 metalloproteazı, kanser biyolojisinde baskın olarak tümör büyümesini baskılayıcı bir role sahiptir. Bu fonksiyon, enzimin birincil olarak anjiyogenezi (yeni damar oluşumunu) inhibe etme yeteneğinden kaynaklanmaktadır. Deneysel çalışmalarda, ADAMTS5'in tümör içindeki VEGF gibi anjiyojenik faktörleri azaltarak ve tümör damarlanmasını baskılayarak tümör büyümesini durdurduğu gösterilmiştir. Çoğu kanser türünde (meme ve prostat gibi) ADAMTS5 ekspresyonunun azalması veya epigenetik olarak susturulması, bu tümör baskılayıcı rolü desteklemektedir (Przemyslaw et al,2013).

ADAMTS9 proteini, damar oluşumunu kısıtlayıcı (anti-anjiyojenik) bir fonksiyon sergilemektedir; nitekim farelerde bu genin kısmen susturulması, spontan neovaskülarizasyona yol açarak söz konusu aktiviteyi kanıtlamıştır. Bu güçlü anti-anjiyojenik etkinin bir sonucu olarak, mevcut literatür ADAMTS9 geninin potansiyel olarak

yeni bir tümör baskılayıcı (suppressor) olarak değerlendirilmesi gerektiğini öne sürmektedir. Bu hipotez, genin susturulmasının veya delesyonunun özofagus kanseri vakalarının yaklaşık %50'sinde tespit edilmesiyle güçlü bir şekilde desteklenmektedir (Chen et al., 2025).

ADAMTS12, proteolitik aktivitesi ile VEGF ve HGF gibi büyüme faktörlerini keserek (shedding), tümör ilerlemesinde kilit rol oynayan Ras-MAPK sinyal yolunu bloke etme yeteneğine sahiptir. Bu sinyal düzenleyici rolü ve kanser hücrelerinde gözlemlenen epigenetik susturulması, ADAMTS12'nin potansiyel bir tümör baskılayıcı gen (gene suppressor) olabileceğini düşündürmektedir. Nitekim, Adamts12 geni susturulmuş farelerde kanser hücrelerinin daha hızlı çoğalması ve gelişmiş bir neovaskülarite sergilemesi, ADAMTS12'nin tümör büyümesini engellemedeki kritik rolünü in vivo olarak desteklemektedir (Chen et al., 2025). Bir çalışmada ADAMTS-7'nin mide kanserinde NF-kB sinyal yolunu aktive etmesiyle birlikte kötü prognosis ve yüksek metastaz ile sonuçlandığı bildirilmiştir (Chen et al., 2017).

Kolorektal kanserde (KRK), ADAMTS9 ekspresyonunun sıklıkla promotor metilasyonu nedeniyle azaldığı veya susturulduğu; ADAMTS9'un ekzojen ekspresyonunun ise çoğalmayı ve göçü Akt sinyal yolu aktivasyonunu engelleyerek inhibe ettiği tespit edilmiş, bu da ADAMTS9'un KRK'da bir tümör baskılayıcı gen (TSG) olarak işlev gördüğünü desteklemektedir (Chen et al., 2017).

Yapılan bir çalışmada ADAMTS-8'in meme kanserinde tümör baskılayıcı bir gen olduğu hücre çoğalmasını göçünü invazyonunu inhibe ettiğini gösterilmiştir (Zhang et al.,2023). ADAMTS-12 mide kanserinde (GC) aşırı eksprese olmakla birlikte hücre çoğalmasını ve invazyonunu teşvik ederek kötü prognosisla ilişkilendirilen bir tümör ilerletici ve prognostik biyobelirteç olarak işlev görmektedir. (Gao et al.,2024)

1.3.3 ADAMTS-14 ve Kanser

Oral Skuamöz Hücreli Karsinom (OSCC) dokularında ADAMTS14'ün sitoplazmik ekspresyonunun sağlıklı dokulara göre daha düşük olduğu ve negatif ekspresyonun yüksek lenf nodu metastazı ile ileri tümör evreleriyle anlamlı düzeyde ilişkilendirildiği gösterilmiştir. Dolayısıyla, bu sonuçlar ADAMTS14'ün OSCC için bağımsız bir prognostik

faktör olabileceğini ve tümör ilerlemesinde baskılayıcı bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir (Lin et al.,2020).

ADAMTS14'ün Berrak Hücreli Böbrek Hücreli Karsinomda (ccRCC) sağlıklı dokuya göre yüksek ekspresyonu; kötü genel sağkalım, immünoterapiye düşük yanıt ve aktif MTOR sinyal yolları ile ilişkilendirilerek, bu proteini ccRCC için bağımsız bir prognostik faktör ve tümör destekleyici rol oynayan önemli bir hedef haline getirmektedir (Chen et al.,2022).

Wang ve ark. (2021) tarafından yapılan bir çalışmada, kolorektal kanserli hastalarda ADAMTS14 promotör metilasyonu ve düşük gen ekspresyonu tespit edilmiştir. Ancak tümör invaziv cephelerinde protein düzeyinin artmış olduğu gözlenmiş ve yüksek ADAMTS14 düzeyi kötü prognostik faktör olarak tanımlanmıştır. Bu durum, ADAMTS14'ün kanser progresyonunda çift yönlü bir rol oynayabileceğini göstermektedir (Wang et al.,2022).

Oral Skuamöz Hücreli Karsinomda (OSCC) ADAMTS14'ün düşük ekspresyonu kötü prognozla ilişkilendirilerek enzime tümör baskılayıcı bir görev atfedilirken, Berrak Hücreli Böbrek Hücreli Karsinom (ccRCC) ve Kolorektal Kanserdeki (KRK) bazı çalışmalar, yüksek ekspresyonun kötü sağkalım ve artmış metastaz ile ilişkilendirilerek tümör destekleyici bir rolü işaret etmektedir. Ayrıca, ADAMTS14'ün aynı kanser tipinde (KRK) hem epigenetik olarak susturulması hem de invaziv alanda artması gibi zıt durumların varlığı, proteinin işlevinin doku tipine ve hücresel bağlama göre radikal bir değişim gösterdiğini kanıtlamaktadır. Bu bağlama bağımlı ikili rolün altında yatan kesin moleküler mekanizmalar (özellikle hedef substratları ve sinyal yolu etkileşimleri), literatürde hâlâ büyük bir boşluk teşkil etmekte ve ADAMTS14'ü güvenli bir terapötik hedef olarak belirlemek için konunun aydınlatılmasına ihtiyaç vardır.

2. Tezin Hedefleri ve Çalışma Kapsamı

ADAMTS-14 geninin, ekstrasellüler matriks yeniden düzenlenmesi ve tümör mikroşevresinin şekillenmesinde rol oynadığı; inflamatuvar sitokinler aracılığıyla regülasyonunun ise kolorektal kanser gibi solid tümörlerde önem taşıdığı düşünülmektedir. Özellikle IL-6 sitokini, STAT3 başta olmak üzere çeşitli hücre içi sinyal yollarını aktive ederek tümör hücrelerinde proliferasyon, invazyon ve gen ekspresyonunu düzenleyebilmektedir. Ancak IL-6'nın ADAMTS-14 geninin transkripsiyonel ve translasyonel regülasyonu üzerindeki etkileri ve bu sürecin altında yatan moleküler mekanizmalar henüz yeterince aydınlatılamamıştır.

Bu çalışma, kolorektal kanser hücre modeli olan SW480 hücrelerinde IL-6 sitokininin ADAMTS-14 geni üzerindeki düzenleyici etkilerinin moleküler düzeyde ortaya konulmasını amaçlamaktadır. Bu amaç doğrultusunda, IL-6'nın ADAMTS-14 geninin ekspresyonunu mRNA, protein ve promotor aktivitesi düzeylerinde nasıl etkilediği kapsamlı bir yaklaşımla incelenecektir. Ayrıca, IL-6 aracılı hücre içi sinyal yollarının bu regülasyondaki rolü inhibitör çalışmaları ile değerlendirilecektir. Bu tez çalışması kapsamında aşağıda belirtilen deneysel aşamalar gerçekleştirilmiştir:

- ✓ ADAMTS-14 genine ait promotor parçalarının SW480 hücrelerine geçici transfeksiyonu yapılarak bazal transkripsiyonel aktivitelerinin belirlenmesi.
- ✓ IL-6 sitokininin, ADAMTS-14 genine ait promotorların transkripsiyonel aktivitesi üzerindeki etkisinin luciferaz raporlayıcı gen analizi ile değerlendirilmesi.
- ✓ IL-6 inhibitörlerinin, ADAMTS-14 promotorlarının transkripsiyonel aktivitesi üzerindeki etkisinin luciferaz analizi ile belirlenmesi.
- ✓ IL-6 sitokininin, ADAMTS-14 geninin mRNA düzeyindeki ifadesine etkisinin qRT-PCR yöntemi ile belirlenmesi.
- ✓ IL-6 inhibitörlerinin, ADAMTS-14 geninin mRNA ekspresyonu üzerindeki etkisinin qRT-PCR yöntemi ile analiz edilmesi.

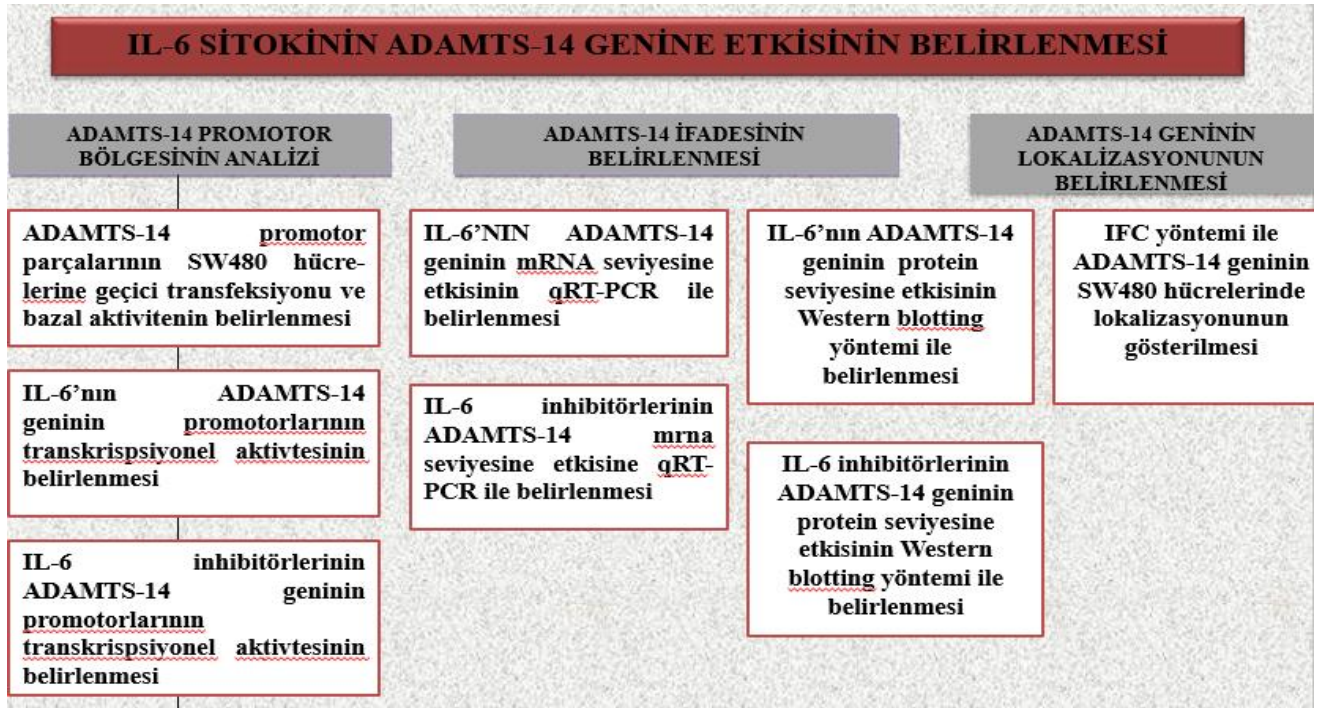
✓ IL-6 sitokininin, ADAMTS-14 geninin protein düzeyindeki ifadesine etkisinin Western blot yöntemi ile belirlenmesi.

✓ IL-6 inhibitörlerinin, ADAMTS-14 geninin protein ekspresyonu üzerindeki etkisinin Western blot yöntemi ile değerlendirilmesi.

✓ IL-6 uygulaması sonrası, ADAMTS-14 proteininin SW480 hücrelerindeki hücresel lokalizasyonunun immünfloresan sitokimya (IFC) yöntemi ile gösterilmesi.

Bu tez çalışmasından elde edilecek bulguların, IL-6 aracılı inflamatuvar sinyalizasyonun ADAMTS-14 geninin transkripsiyonel ve translasyonel regülasyonundaki rolünü ortaya koyarak, kolorektal kanser patogenezinin daha iyi anlaşılmasına katkı sağlaması beklenmektedir. Ayrıca, ADAMTS-14 geninin inflamasyon-kanser eksenindeki potansiyel biyobelirteç veya terapötik hedef olma özelliğine ışık tutulması hedeflenmektedir.

Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen deneysel aşamalar Şekil 2’de şematik olarak özetlenmiştir.



Şekil 2.1: Tez kapsamında yapılan çalışma basamaklarını özetleyen diyagram

3. MATERYAL METOD

3.1 Materyaller

3.1.1 Kullanılan Makine ve Teçhizat

Tez çalışması kapsamında yapılan çalışmalar esnasında kullanılan cihazlar ve markaları Tablo 3.1 'de belirtilmiştir. Cihazların kalibrasyonları ve bakımları düzenli olarak yapılmıştır.

Tablo 3.1 Kullanılan cihazlar ve markaları

Kullanılan Cihazlar	Markaları
%5 CO ₂ İnkübatör	Nuaire / ABD
Laminar Kabin	Telstar Bio II / İspanya
Inverted Mikroskop,Floresan Mikroskobu	Nikon / Japonya
Santrifüj	Thermo /ABD
UV Görüntüleme Sistemi	Vilber Lourmat
Otoklav	Hirayama / Japonya
Manyetik Karıştırıcı	Velp Scientifica
Buzdolabı (+4 °C / -20°C), Mikrodalga	Arçelik / Türkiye
-80°C Dondurucu	Nikon / Japonya
Yatay Çalkalayıcı	GFL / Almanya
pH Metre	pH Metre Hanna / ABD
Etüv	WTB / Almanya
Real Time PCR Cihazı (Light-Cycler 480)	Roche Life Science
Saf Su Cihazı	Human Corporation
Otomatik Pipetler	Thermo
Luminometre	Thermo/ ABD
Buz Makinesi	Hoshizaki/ Japonya

Tablo 3.1 (devam)

Kullanılan Cihazlar	Markaları
Hassas Terazî	Sartorius / Almanya
Spektrofotometre	Multiskango
Ultrasonik Su Banyosu	PlusLab
Tank- Blot Sistemi	BioRad
Elektroforez Güç Kaynađı	Thermo Scientific / ABD
UVP Jel Görüntüleme Sistemi	BioSpectrum

3.1.2 Kullanılan Kimyasallar

Tez çalışması sırasında kullanılan kimyasallar ve bu kimyasalların temin edildiği firmalar Tablo 3.2, Tablo 3.3, Tablo 3.4, Tablo 3.5, Tablo 3.6 ve Tablo 3.7 'de listelenmiştir.

Tablo 3.2: Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan malzemeler.

Kullanılan Malzeme	Firma
Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco
DMSO	Thermo Scientific
RPMI Medium	Gibco
Sığır Serum Albumini (BSA)	Sigma
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Merek
Kobalt Klorür (CoC₂)	Sigma
HEPES	Sigma
EDTA	Sigma
0,22 Mikron Filtre	Sartorius
Luciferaz ve Seap Substratları	Takara
Ready-To-Glow Secreted Luciferase Rep.Assay	Takara
100 mm'lik Steril Petri	EuroClone
1,5 mL/2 mL Ependorf	IsoLab
6, 12, 24, 48 ve 96 Kuyulu Hücre Plakası	Jetbiofil
Pastör Pipeti	IsoLab
Kristal Viyole	Carlo Erba
Antibiyotik- Antimiyotik Solüsyon	Gibco
15 mL ve 50 mL Santrifüj Tüpü	IsoLab

Tablo 3.3: RNA çalışmalarında kullanılan kimyasallar ve firmaları

Kullanılan Malzeme	Firma
Etanol	Merck
DEPC (Dietyl Pirokarbonat)	Sigma
Steril Enjektör	Micro-Fine
Oligo dT	Thermo Scientific
Ribolock İnhibitörü	Thermo Scientific
5X Reaksiyon Tamponu	Thermo Scientific
İnnuPREB RNA Kiti	Analytik-jena
SYBR® Green PCR Master Karışımı	Sigma
Reverse Transkriptaz Enzimi	Thermo Scientific

Tablo 3.4: Protein deneylerinde kullanılan kimyasallar

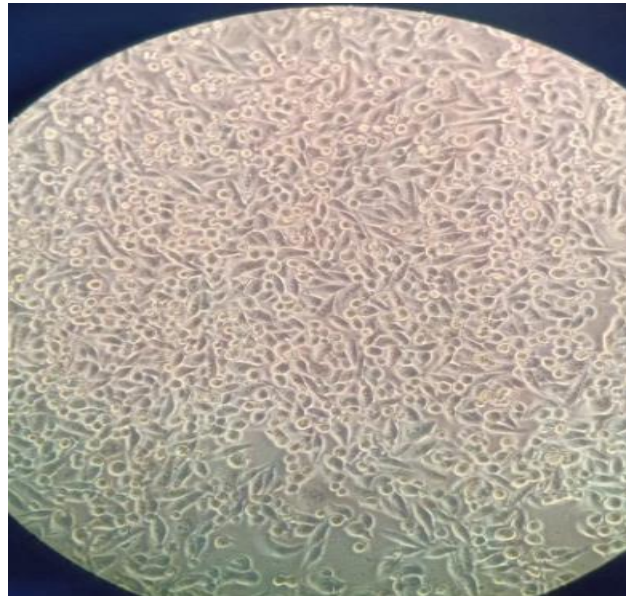
Kullanılan Malzeme	Firma
Proteaz İnhibitörleri	Roche
Yağsız Süt Tozu	Santa Cruz
Pierce™ ECL	Thermo Scientific
Tween-20	Sigma
ADAMTS-14 Mouse Monoklonal Antikor	Santa Cruz
Sekonder Antikor	Santa Cruz
Protein Ladder	Thermo
SDS	Sigma
Tetrametiletildiamin (TEMED)	Sigma
Akrilamid/Bisakrilamid (%40)	Merck
PVDF Membranı	Millipore
4X Laemli Örnek Tamponu	BioRad
Coomassie Brilliant Blue G-250	Sigma

Tablo 3.5: Sitokin ve yolak çalışmalarında Kullanılan malzemeler ve alındıkları firmalar

Kullanılan Malzeme	Firma
IL-6	PeptoTech
Wortmannin (PI3K inhibitörü)	BioVision
PD169316 (p38 MAP kinaz inhibitörü)	BioVision
SP600125 (JNK inhibitörü)	BioVision
PD98059 (MEKI inhibitörü)	BioVision

3.1.3 Çalışmada Kullanılan Hücre Soyları

Tez çalışması kapsamında hücre kültürü deneylerinde SW480 hücre hattı kullanılmıştır. SW480 hücre hattı kolon karsinoma hücre soyudur. Tez çalışmamızda YÖKTEZ’de 827593 numaralı tezde öncül çalışmalardan elde edilen bilgiler doğrultusunda kolon kanserinde fazla ekspresyon gösterdiği belirlenmiş olan bu hücre hattı üzerinde deneylerin yürütülmesi uygun bulunmuştur.



Şekil 3.1: SW480 Hücre Hattının 20x Büyütme ile mikroskop altında görünümü

3.2 Metod

3.2.1 Tez Çalışması Esnasında Kullanılan Ortamın, Malzemenin Temizliği ve Sterilizasyonu

Hücre kültürü laboratuvarında bulunan bütün malzemelerin sterilizasyonu özenle yapılmıştır. Hücre kültürü laboratuvarında deney yapılmadan önce kullanılacak malzemeler %70'lik alkol ile steril edilip laminar flow içerisine alınmıştır. Olası bir kontaminasyonun önüne geçebilmek adına laboratuvar UV ışınları ile haftada bir kez steril edilmiştir. Bunun yanı sıra haftalık temizliklerle birlikte laboratuvar yüzeyleri, kullanılan cihazlar ve ortam %70'lik alkol ve Virkon ve çamaşır suyu gibi temizleyicilerle beraber rutin olarak temizlenmiştir. Hücre kültürü odası düşük sıcaklıkta tutulmuştur. Bunun yanı sıra RNA çalışmalarında RNAaz enzimi inhibitörü olan DEPC kullanılmıştır. Isıya dayanıklı malzemeler otoklav edilmiştir ve sonrasında etüvde bekletilmiştir.

3.2.2 DNA Tabanlı Araştırmalarda Kullanılan Teknikler

3.2.2.1 Transkripsiyonel Aktivite Çalışmaları

Yöktez'de bulunan 827593 yüksek lisans tez numaralı Haqı Ismael Albazı "ADAMTS14 promotorunun klonlanması ve karakterizasyonu" konu başlıklı tez çalışması kapsamında yapılan ADAMTS-14 geni klonlanmıştır ve klonlanan parçalar bu tez çalışmasında kullanılarak transfeksiyon çalışmaları için kullanılmak üzere deneyler tasarlanmıştır. Kalsiyum fosfat metodu ile ADAMTS-14 geninin promotör parçaları SW480 hücrelerine aktararak transkripsiyonel aktivasyon belirlenecektir. Bu deneyler sırasında önceden tez kapsamında (Yöktez No:827593) klonlanan promotör parçaları kullanıldı.

3.2.2.2 Kalsiyum-Fosfat Yöntemi ile Geçici Transfeksiyon

ADAMTS-14 genine ait 5'ucu kısaltılarak oluşturulmuş olan 720 bç , 470 bç ve 390 bç 'lik 3 promotör parçası için pasaj 3 aşamasına gelen büyüttüğümüz SW480 hücreleri %80 doluluk oranına geldiği zaman deney kuruldu. İlk olarak üç petri kabına promotör parçalarımızdan her biri için kalsiyum fosfat presipitasyonu metodu ile bazal aktivite belirlendi.

Transfeksiyon öncesinde kullanılacak çözeltiler oda sıcaklığına getirildi ve çökme meydana geldi. Çözelti A (~10 µg DNA ve 2,5 M CaCl₂) ve Çözelti B (2X HePES) hazırlandı (Tablo 3.9). Çözelti A, Çözelti B'ye damla damla eklenerek DNA: Kalsiyum fosfat presipitasyon kompleksi oluşturuldu ve inkübasyon sonrasında hücrelere eklenerek 37

°C'deki %5 CO₂ içeren inkübatörde 8-16 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından transfeksiyon ortamı uzaklaştırıldı, hücreler 2 kez 1X PBS ile yıkanarak flasklara tam besiyeri eklenip, 37 °C'deki %5 CO₂ içeren inkübatörde transfeksiyonun 72. saatinde kadar inkübasyona devam edildi.

ADAMTS-14 genine ait promotor bölgelerinin transfeksiyonu amacıyla, hücreler 25 cm²'lik flasklara 2 × 10⁶ hücre/flask olacak şekilde ekildi ve bir gece inkübe edildi. Ertesi gün, hipoksik koşullar uygulanacak flasklara son konsantrasyonu 200 µl olacak şekilde 60 µL CoCl₂ ilave edilerek kimyasal hipoksi oluşturuldu. Transfeksiyon için 2 µg DNA, 60 µL 2 M CaCl₂ çözeltisi ile karıştırıldı ve bu karışım, 515 µL 2X HEPES üzerine damla damla eklenerek presipitasyon oluşması için 1 saat bekletildi. Oluşan DNA: kalsiyum fosfat presipitasyonu flasklara damla damla eklenip hafifçe sallanarak dağıtıldı. Hücreler, 37 °C ve %5 CO₂ içeren etüvde bir gece inkübe edildikten sonra transfeksiyon medyumunu değiştirildi, PBS ile yıkandı ve taze %10 FCS içeren medyum eklenerek 1-2 saat bekletildi. Daha sonra hücreler Tripsin-EDTA ile yüzeyden kaldırıldı, sayıldı ve 96 kuyucuklu plakaya 30.000 hücre/kuyu olacak şekilde dağıtıldı. Hücreler 48 saat boyunca 37 °C ve %5 CO₂'li etüvde inkübe edildi. Ardından besiyeri %0,1 BSA içeren DMEM ile değiştirildi. Yolak inhibisyonu deneylerinde, 45 dakika sonra inhibitörler (JNK 20 µM, PD169 20 µM, worthmanın 2 µM, MEK 20 µM) eklendi ve 1 saatlik inkübasyonun ardından 20 ng/mL IL-6 Sitokini uygulandı. Sadece sitokinin etkisi incelenecek deneylerde inhibitör uygulanmadan besiyeri %0,1 BSA içeren DMEM ile değiştirildi, 1 saat beklenip ardından 20 ng/mL IL-6 sitokini eklendi. Deneylerin 6 saatlik inkübasyonunun ardından, her kuyudan 100 µL medyum alınarak -20 °C'de saklandı ve daha sonra lüsiferaz ve SEAP aktiviteleri ölçüldü.

3.2.2.3 Lusiferaz Aktivitesinin ve SEAP Aktivitesinin Ölçümü

ADAMTS-14 geninin promotor konstraktlarının ve IL-6 ile çeşitli inhibitörlerin transkripsiyonel aktiviteye etkilerini değerlendirmek için transfekte edilen hücrelerden elde edilen medyumlar -20 °C'de saklandıktan sonra oda sıcaklığında çözündürülerek hazırlandı. Luciferase aktivitesinin ölçümü amacıyla kit içerisindeki 10X substrat tamponu, 1:10 oranında reaksiyon tamponu ile seyreltilerek 1X çözeltisi elde edildi. Bu çözeltiden transfeksiyon medyumundan 9 µL, 384 kuyucuklu plakalara aktarıldı ve üzerine 1 µL 1X Substrat/Reaksiyon tamponu ilave edilerek luminometrede hızlıca ölçümler alındı. Benzer şekilde, SEAP aktivitesinin belirlenmesi için transfeksiyon medyumundan 5 µL, 96 kuyucuklu plakalara konuldu ve üzerine 15 µL 1X seyreltme tamponu eklendi. Plakalar sıvı

kaybını önlemek amacıyla kapatıldı; ardından 65 °C’de 30 dakika inkübe edilerek substrat reaksiyonunun tamamlanması sağlandı. Inkübasyon sonrasında plakalar buz üzerinde kısa süre bekletildi ve oda sıcaklığına getirildi. Her örneğe 20 µL SEAP substrat solüsyonu eklendi ve 30 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. Son olarak, luminometre ile ölçümler alındı ve elde edilen veriler Microsoft Excel veya GraphPad Prism programları kullanılarak analiz edildi.

3.2.3 Hücre Kültüründe Kullanılan Teknikler

3.2.3.1 Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılacak Malzemelerin Hazırlanması

Laboratuvarımızda SW480 hücre hattına uygun olarak hücre kültürü besiyeri için içerisinde gerekli takviyeleri sağlayan Fetal Bovine Serum (FBS) kullanılmıştır. Ticari olarak Euro-Line firmasından tedarik edilmiştir. Stok -20 de saklanılmıştır. Deneylerde kullanılmadan 3-4 saat önce +4 ‘e alınmıştır ve çözünmesi tamamlandıktan sonra deneylerde kullanılmak üzere steril hücre kültürüne alınmıştır. SW480 hücre hattının büyümesi için gerekli olan ortam %10’luk FBS içeren DMEM çözeltisi içinde sağlanmıştır. Hücre kültüründe gelişebilecek kontaminasyon olaylarını en aza indirmek için 100X penisilin-streptomisin steril hücre antibiyotiği son hacimde 1x olacak şekilde bu karışıma eklenmiştir.

Phosphate buffered saline (PBS) çözeltisinin hazırlanması için Sigma firmasının ürettiği PBS tabletleri kullanıldı. 100 Ml deiyonize su içerisinde her bir tablet tamamen çözünene kadar karıştırıldı ve 121°C’de 20 dakika boyunca otoklav işlemi yapılarak bu çözeltinin sterilizasyon işlemi tamamlandı. Daha sonra steril edilen bu çözelti steril 50 ml ‘lik hücre falkonlarına paylaştırıldı ve oluşturulan stok -20°C’de derecede saklandı. Deneylerde kullanılmadan önce -20°C’den çıkarılarak oda sıcaklığında çözüldükten sonra steril laminar flow içerisine deneylerde kullanılmak üzere alındı. Daha sonra +4°C’de saklanılarak deneylerde kullanıldı.

Tripsin-EDTA çözeltisinin hazırlanmasında 0.5 mM EDTA ve %0.05 Tripsin kullanıldı. Gerekli miktarlar tartıldıktan sonra 1X steril PBS içerisinde çözüldürülerek homojen bir çözelti elde edildi. Hazırlanan karışım, sterilizasyonun sağlanması amacıyla 0.22 µm gözenek çapına sahip filtrelerden geçirilerek sterilize edildi. Filtrelenen çözelti, kontaminasyon riskinin azaltılması için laminar akış kabininde 50 mL’lik steril falkon tüplerine bölüştürüldü. Çözeltinin uzun süreli saklanabilmesi için tüpler -20°C’de depolandı. Kullanımdan önce çözelti +4°C’de çözdürüldü ve işlem tamamlandıktan sonra stabilitesinin

korunması amacıyla tekrar +4°C’de muhafaza edildi. Tezde kullanılan hücre hattı yapışarak çoğalan hücreler olduğundan, bu hücrelerin çoğaltılması ve deneylerin yürütülebilmesi için kültürde büyütüldükleri flask yüzeyinden ayrılmaları gerekmektedir. Tripsin- EDTA çözeltisi hücrelere zarar vermeden onları yüzeyden kaldırmamıza yardımcı olduğu için yukarıda anlatıldığı gibi çözelti hazırlandı.

Tripan mavisi çözeltisini hazırlamak amacıyla 0.4 g tripan mavisi tartıldı ve 1X PBS (phosphate-buffered saline) içerisine eklendi. Boyanın tamamen çözünmesi sağlanıncaya kadar karışım ısıtılarak kaynatıldı. Çözünme işlemi tamamlandıktan sonra çözelti oda sıcaklığına inene kadar soğumaya bırakıldı. Soğuyan karışımın hacmi, üzerine ilave edilen 1X PBS ile 100 mL’ye tamamlandı ve böylece %0,4 (w/v) derişiminde tripan mavisi çözeltisi elde edilmiş oldu. Hazırlanan boya çözeltisi, hücre boyama çalışmaları için kullanılmak üzere oda sıcaklığında muhafaza edildi ve gerektiğinde kullanım için hazır hâlde tutuldu.

3.2.3.2 Çalışmada Kullanılacak Olan Hücre Kültürünün Başlatılması

SW480 hücreleri -80°C’deki stoktan çıkarıldıktan sonra, hücre bütünlüğünün zarar görmemesi için tüp herhangi bir titreşim veya sarsıntıya maruz bırakılmadan hücre kültürü laboratuvarına taşındı. Hücreler 37°C’deki su banyosunda tamamen çözüldükten sonra laminar flow kabinine alındı. Daha önce hazırlanmış olan %10 FBS içeren medyum üzerine çözünen hücre süspansiyonu eklendi ve steril pipet kullanılarak homojen bir karışım elde edildi. Ardından süspansiyon 1000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Bu işlem sonucunda canlı hücreler tüpün tabanında pellet şeklinde toplandı ve üstte kalan süpernatant atıldı.

Elde edilen hücre pelletinin üzerine taze hazırlanmış %10 FBS içeren medyumdan 2 mL ilave edildi ve pipetaj yapılarak hücrelerin medyum içerisinde eşit şekilde dağılması sağlandı. Steril 10 mL hacmindeki petri kaplarına 8 mL taze medyum eklendi ve hazırlanan hücre süspansiyonundan 2 mL, pipet yardımıyla petri kaplarına aktarıldı. Hücrelerin yüzeye eşit bir biçimde yayılmasını sağlamak için petri kapları hafifçe yanlara doğru hareket ettirildi. Son olarak petri kaplarının üzerine hücre soyu, tarih ve gerekli tanımlayıcı bilgiler yazıldı ve kültürler %5 CO₂ içeren inkübatörde 37°C’de inkübasyona bırakıldı.

3.2.3.3 Hücrelerin Pasajlanması

İnkübatörde bulunan petri kapları çıkarıldıktan sonra, hücrelerin büyüme durumları ters ışık mikroskobu altında değerlendirildi. Hücre yoğunluğu yaklaşık olarak %80–90 seviyelerine ulaştığında pasajlama işlemine geçildi. Bu aşamada, ortam uzaklaştırıldı ve hücrelerin yüzeyde kalan artıklarından arındırılması için PBS ile yıkama yapıldı. Ardından hücrelerin yüzeyden ayrılmasını sağlamak amacıyla uygun miktarda Tripsin-EDTA çözeltisi eklenerek inkübatörde kısa bir süre bekletildi. Hücreler yüzeyden ayrıldıktan sonra, kullanılan çözeltinin etkisini durdurmak için serum içeren taze besiyeri ilave edildi ve karışım hafifçe hareket ettirilerek homojen hâle getirildi.

Yüzeyden ayrılan hücre süspansiyonu steril tüplere alındı ve santrifüj işlemi tamamlandıktan sonra oluşan hücre pelletinin üzerindeki sıvı dikkatlice uzaklaştırıldı. Pelletteki hücreler taze besiyerinde yeniden süspanse edildi ve elde edilen hücre süspansiyonu, yeni petri kaplarına eşit miktarda dağıtıldı. Kapların son hacimleri uygun seviyeye tamamlandıktan sonra üzerine pasaj numarası ve tanımlayıcı bilgiler yazıldı ve hücreler tekrar inkübatöre yerleştirilerek büyümeye bırakıldı.

3.2.3.4 Hücrelerin Dondurulması

Hücre soyunun devamlılığını sağlamak amacıyla, belirli bir yoğunluğa ulaşan pasajlanmış hücrelerden dondurma işlemi yapıldı. Öncelikle, hücrelerin kültür medyumunu petriden alındı ve hücreler iki kez PBS ile yıkandı. Ardından, hücrelerin yüzey bağlantılarını zayıflatmak için Tripsin-EDTA çözeltisi eklendi ve belirli bir süre inkübatörde bekletildi. Hücreler yüzeyden ayrıldıktan sonra, Tripzin'in etkisini durdurmak amacıyla %10 FBS içeren taze kültür medyumunu eklendi. Ayrılan hücreler bir falcon tüpünde toplandı ve 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında üstte kalan süpernatant uzaklaştırıldı ve altta oluşan hücre pellet'i 1 ml DMSO içeren FBS ile karıştırılarak 2 ml'lik ependorflara aktarıldı. Ependorflar parafilm ile sarıldı, gerekli etiketler yapıldı ve uzun süreli saklama amacıyla -80 °C'de muhafaza edildi.

3.2.3.5 Tripkan Mavi Boyası ile Canlı Hücrelerin Belirlenmesi ve Sayımı

Hücre kültürü çalışmalarında deneylerin güvenilirliği ve tekrarlanabilirliği için, hücrelerin canlılığı ve yoğunluğu önceden belirlendi. Hücreler tripan mavisi ile boyanarak canlı ve ölü hücreler ayrıştırıldı; böylece deneylerde kullanılacak canlı hücre sayısı belirlendi. Öncelikle hücreler tripsin-EDTA ile yüzeyden ayrıldı ve 1000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenerek pellet

hâline getirildi. Oluşan pellet, taze besiyeri ile homojen bir süspansiyon hâline getirildi ve bu süspansiyondan 1 mL'lik örnek tripan mavisi ile 1:1 oranında karıştırıldı. Karışımdan 10 µL'lik örnek Thoma lamına aktarılıp mikroskop altında incelendi ve canlı ile ölü hücreler sayıldı. 1 mL'deki hücre yoğunluğu, "ortalama hücre sayısı $\times 2 \times 10^4$ " formülü kullanılarak hesaplandı. Bu şekilde belirlenen hücre sayısı, deneylerde hücrelerin eşit koşullarda kullanılmasını sağlayarak sonuçların güvenilirliğini artırdı.

3.2.3.6 IL-6 Sitokin Deneylerinin Kurulması

Pasajlama işlemleri tamamlanarak deneysel uygulamalara uygun duruma getirilen SW480 hücrelerinin canlı hücre yoğunluğu, Thoma lamı ile gerçekleştirilen sayım sonucu saptandı. Belirlenen hücre miktarı doğrultusunda, hücreler 12'li well plate'e well başına 2×10^6 hücre düşecek biçimde dağıtıldı. Adezyonun gerçekleşebilmesi için kültür plâkası 37 °C ve %5 CO₂ koşullarını sağlayan inkübatöre yerleştirildi.

Bir sonraki gün, hücrelerin yüzeye tutunma düzeyleri inverted mikroskop aracılığıyla değerlendirildi ve tutunma oranı yaklaşık %70–80'e ulaştığında kültür ortamı uzaklaştırıldı. Ardından hücreler, iki kez 1X PBS ile yıkanarak yüzeydeki artık bileşenlerden arındırıldı ve well'lere %0,1 (w/v) BSA içeren DMEM ortamı uygulandı. Plâka aynı inkübasyon koşullarında bir saat süreyle dengeye bırakıldı.

İnkübasyon sürecinin ardından, kontrol grubu dışındaki tüm well'lere 20 ng/mL son konsantrasyonda IL-6 uygulanarak hücreler uyarıldı. Uyarımın ardından plâkalar tekrar inkübatöre alındı ve 1., 3., 6., 24. ve 48. saatlerde hücreler toplanarak pellet hâline getirildi. Toplanan pelletler, daha sonra yürütülecek RNA izolasyonu ve protein ekstraksiyonu analizlerinde kullanılmak üzere -80 °C'de saklandı.

3.2.3.7 İnhibitör Deneylerinin Kurulması

Birkaç kez pasajlanarak çoğaltılan hücre hattının hücre yoğunluğu belirlendi. Hücreler, deney tasarımına uygun kültür kaplarına aktarıldı ve yüzeye tutunmalarının sağlanması amacıyla standart inkübasyon koşullarında bir gece bekletildi. Ertesi gün, hücrelerin hedeflenen tutunma düzeyine ulaştığı gözlemlendi ve kültür ortamı yenilendi.

Hücreler, deney öncesi koşullandırma amacıyla %0,1 (w/v) BSA içeren DMEM ile kısa süreli inkübasyona alındı. Daha sonra, deney gruplarına göre ilgili inhibitörler uygulandı ve

inhibitör maruziyet süresi (30-45dk) tamamlandıktan sonra kontrol dışındaki örneklere IL-6 ile sitokin uyarımı yapıldı. Planlanan inkübasyon süresi sonunda (6 saat) hücreler toplandı ve elde edilen pellet, ileride RNA veya protein analizlerinde kullanılmak üzere uygun koşullarda saklandı.

Tablo 3.6 Çalışmada kullanılan yolak inhibitörleri

Çalışmada kullanılan inhibitörler
PD169316 (P38 MAP kinaz inhibitörü)
SP600125 (JNK inhibitörü)
PD98059 (MEK inhibitörü)
Wortmannin (PI3K inhibitörü)
NFKB

3.2.4 RNA Tabanlı Teknikler

3.2.4.1 RNA İzolasyonu

SW480 hücrelerinden mRNA düzeyinde gen ekspresyonunu belirlemek amacıyla deneyler yürütüldü. Bu kapsamda, hücreler tripsinizasyon yöntemiyle yüzeyden ayrıldı ve ardından 1.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenerek pellet haline getirildi. Elde edilen hücre pelletlerinden RNA izolasyonu, GeneJET RNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific) kullanılarak gerçekleştirildi ve izole edilen RNA örnekleri, RNA stabilitesinin korunması amacıyla -80 °C'de saklanarak ileri analizler için hazırlandı.

3.2.4.2 RNA Miktarının Belirlenmesi

RNA izolasyonunun ardından örneklerin derişim ve saflık analizleri, Thermo Multiskan Go μ Drop™ Plate Reader kullanılarak gerçekleştirildi. Analiz için her bir RNA örneğinden 2 μ L alınarak cihazda ölçüm yapıldı; referans değeri oluşturmak üzere aynı hacimde dH₂O kullanıldı. Ölçümlerde 260 nm ve 280 nm dalga boylarında elde edilen absorbans değerleri kaydedildi ve bu verilerden A₂₆₀/A₂₈₀ oranı hesaplanarak örneklerin saflığı değerlendirildi. RNA miktarının hesaplanmasında, absorbans değerine dayalı RNA derişimi (μ g/mL) = A₂₆₀ \times 40 μ g/mL \times (10 mm / 0.49 mm) formülü uygulandı ve bu formül

doğrultusunda her örneğin derişimi hesaplanarak sonraki analizlerde kullanılacak uygun RNA miktarı belirlendi.

3.2.4.3 Reverse Transkripsiyon Reaksiyonu ile RNA'dan cDNA Sentezi

Saflık ve miktar ölçümleri tamamlanan RNA örneklerinden cDNA sentezi hazırlandı. cDNA sentezi için her örneğe 1 µg RNA şablonu ve 1 µL oligo dT primer eklendi ve toplam hacim 12,5 µL olacak şekilde dH₂O ile tamamlandı. Karışım, 65 °C'de 5 dakika ön inkübasyona tabi tutuldu, böylece RNA şablonunun primer ile bağlanması sağlandı. Ardından reaksiyonlara 1X reaksiyon tamponu, 20 U/µL dNTP karışımı, 1 mM Ribolock RNaz inhibitörü ve 10 U/µL Reverse Transkriptaz eklendi. Örnekler, 42 °C'de 60 dakika inkübe edilerek cDNA sentezi gerçekleştirildi ve 70 °C'de 10 dakika ile reaksiyon sonlandırıldı. Sentezlenen cDNA'ların kalitesi, insan beta-2-mikroglobulin (Hβ-2-M) genine özgü primerler kullanılarak Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile değerlendirildi. Hazırlanan cDNA örnekleri etiketlendi ve -20 °C'de saklanarak sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere koruma altına alındı.

3.2.4.4 Polimeraz Zincir Reaksiyonu PCR ile cDNA Kalitesinin Kontrol Edilmesi

Sentezlenen cDNA'ların kalitesinin incelenmesi için, Reverse Transkripsiyon (RT) reaksiyonu ile üretilen cDNA'lar ve insan beta-2-mikroglobulin (Hβ-2-M) genine özgü primerler üzerinden testler uygulandı. Hβ-2-M genine yönelik PCR reaksiyonu üç aşamada yürütüldü. Birinci aşamada, 1 döngü uygulanarak örnekler 94 °C'de 2 dakika tutuldu. İkinci aşamada, toplam 30 döngü boyunca denatürasyon, primerlerin annealing'i ve DNA uzaması gerçekleştirildi; her döngüde 94 °C'de 1 dakika denatürasyon, 58 °C'de 30 saniye annealing ve 72 °C'de 30 saniye uzama uygulandı. Son aşamada, reaksiyon 72 °C'de 10 dakika inkübe edilerek PCR tamamlandı.

Tablo 3.7 Hβ-2-M genine ait primer dizileri

Primer	Nükleotid Dizisi (5' - 3')
Hβ-2-M İleri	TTTCTGGCCTGGAGGCTATC
Hβ-2-M Geri	CATGTCTCGATCCCACTTAACT

Tablo 3.8 ADAMTS-14 genine ait primer dizileri

Primer	Nükleotid Dizisi (5'- 3')
ADAMTS-14 İleri	
ADAMTS-14 Geri	

Tablo 3.9 H β -2-M genine yönelik PCR deneyinde yer alan reaksiyon bileşenleri

Bileşenler
Taq Tamponu (10X)
MgCl ₂ (25 mM)
İleri Primer (100 pmol/ μ L)
Geri Primer (100 pmol/ μ L)
dNTP karışım (10mM)
cDNA
Taq Polimeraz (5 U/ μ L)
dH ₂ O

3.2.4.5 Real-Time PCR (qRT-PCR)

Pasajlanmış ve deney için hazır hale getirilen hücrelerden RNA izole edilmiş ve elde edilen RNA şablonları kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. cDNA sentezi sırasında, RNA şablonu, oligo dT primerleri, dNTP'ler, revers transkriptaz ve RNaz inhibitörü içeren reaksiyon karışımı hazırlanmış ve ön inkübasyon ile izleyen uygun sıcaklık adımlarında reaksiyon tamamlanmıştır. Hazırlanan cDNA'lar daha sonra Real Time PCR analizlerinde kullanılmıştır.

Her deney setinde üç tekrarlı olarak Real Time PCR uygulandı. Reaksiyonlar toplam 12,5 μ L hacimde hazırlandı; her bir tüpe 6,25 μ L SYBR® Green PCR Master Karışım, 1 μ L cDNA, 0,5 μ L forward ve 0,5 μ L reverse primer (10 pmol/ μ L stoktan) ile 4,25 μ L dH₂O katıldı. Hazırlanan karışımlar, termal döngüleyici üzerinde denatürasyon, annealing ve uzama aşamalarından geçirildi; her döngü sonunda floresan sinyali kaydedildi ve amplicon

miktarındaki değişim izlendi. Hedef genlerin (ADAMTS-14 ve HIF-1 α) Ct değerleri üçlü tekrarlarında belirlendi; H β 2 kontrol geninin ortalama Ct değeri kullanılarak normalize edildi. Göreli gen ekspresyonları Livak yöntemi ile hesaplandı; deney gruplarına ait değerler aynı zaman noktasındaki kontrol gruplarına bölünerek 1'in katları şeklinde ifade edildi ve sonuçlar sütun grafiklerle sunuldu.

3.3 Protein Çalışmaları

3.3.1 Western Blott Yöntemiyle Proteinlerin Tayin Edilmesi

3.3.1.1 IL-6 Sitokin Çalışmaları için Hücre Ekstraktlarının Hazırlanması

SW480 hücreleri pasajlanarak deney için uygun yoğunluğa getirildi. Hücreler, 6'lık well plate'e her bir kuyuya 250.000 hücre düşecek şekilde dağıtıldı ve yüzeye tutunmaları için inkübasyona bırakıldı. Hücrelerin yaklaşık 3–4 saat içerisinde yüzeye tutunduğu gözlemlendi. Tutunmanın doğrulanmasının ardından bir adet kontrol grubu oluşturuldu ve diğer gruplar için 1, 3, 6, 24 ve 48 saatlik uygulama zamanları belirlendi.

Tüm deney grupları %1 BSA içeren besiyerine aktarılıp 1 saat inkübe edildi. Bu sürenin sonunda, zaman noktasına uygun olarak, 48. saatten başlanmak üzere hücrelere 20 ng/mL IL-6 sitokini uygulandı. Belirlenen inkübasyon süreleri (1., 3., 6., 24. ve 48. saatler) tamamlandığında, ilgili kuyulardaki besiyerleri uzaklaştırıldı ve hücreler iki kez 1X PBS ile geçirilerek arındırıldı. Daha sonra hücreler kazıma yöntemiyle toplandı ve mikro santrifüj tüplerine aktarımı yapıldı. Bu örnekler, 13500 rpm'de 15 dakika döndürülerek hücre pelletlerinin oluşması sağlandı. Elde edilen pelletler, sonraki RNA izolasyonu veya protein ekstraksiyonu aşamalarında kullanılmak üzere –80 °C'de buzdolabına alındı.

3.3.1.2 İnhibitör Çalışmaları için Hücre Ekstraktlarının Hazırlanması

SW480 hücrelerinde IL-6'ya verilen yanıt ile IL-6 ve çeşitli hücre içi yolak inhibitörlerinin birlikte oluşturduğu etkilerin karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi amaçlandı. Bu doğrultuda aynı hücre grupları, kontrol, PD169316, PD98059, SP600125, Wortmannin ve NF- κ B inhibitörü olmak üzere altı farklı deney koluna ayrıldı. Tüm gruplara ilk olarak 20 ng/mL IL-6 uygulanarak sitokin yanıtı başlatıldı. IL-6 uygulamasının ardından 6 saatlik bir inkübasyon süresi tamamlandıktan sonra, inhibitör grubuna ayrılan kuyulara ilgili inhibitörler ilave edildi. Böylece inhibitörlerin IL-6 tarafından aktive edilen sinyal yolları üzerindeki düzenleyici etkileri, IL-6'nın tek başına oluşturduğu yanıtla karşılaştırılarak analiz edilebildi. Altıncı saatin sonunda kuyulardaki besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler 1X

PBS ile yıkandı. Her kuyuya RIPA lizis tamponu eklenerek hücrelerin buz üzerinde 5 dakika beklemesi sağlandı. Hücreler daha sonra uygun hücre kazıyıcı ile nazikçe kazınarak Eppendorf tüplerine aktarıldı. Tüpler, buzla doldurulmuş sonikasyon cihazında 2 dakika sonike edildi, ardından 2 dakika buz üzerinde bekletildi; bu işlem toplam 3 döngü olacak şekilde tekrarlandı. Bu adımların buz üzerinde gerçekleştirilmesi, proteaz aktivitesini azaltarak proteinlerin bozulmasını önlemek, yapısal stabilitelelerini korumak ve sonikasyon sırasında oluşabilecek ısıyı dengelemek amacıyla yapılmıştır. Sonikasyonun ardından örnekler 13.500 rpm’de, 15 dakika, +4 °C’de santrifüj edildi. Santrifüj sonucunda alt kısımda çöken materyal atılırken, üstte kalan supernatan dikkatlice toplanarak temiz tüplere aktarıldı. Bu süpernatant, proteinlerin büyük kısmını içerdiği için protein konsantrasyonu Bradford yöntemi ile belirlendi.

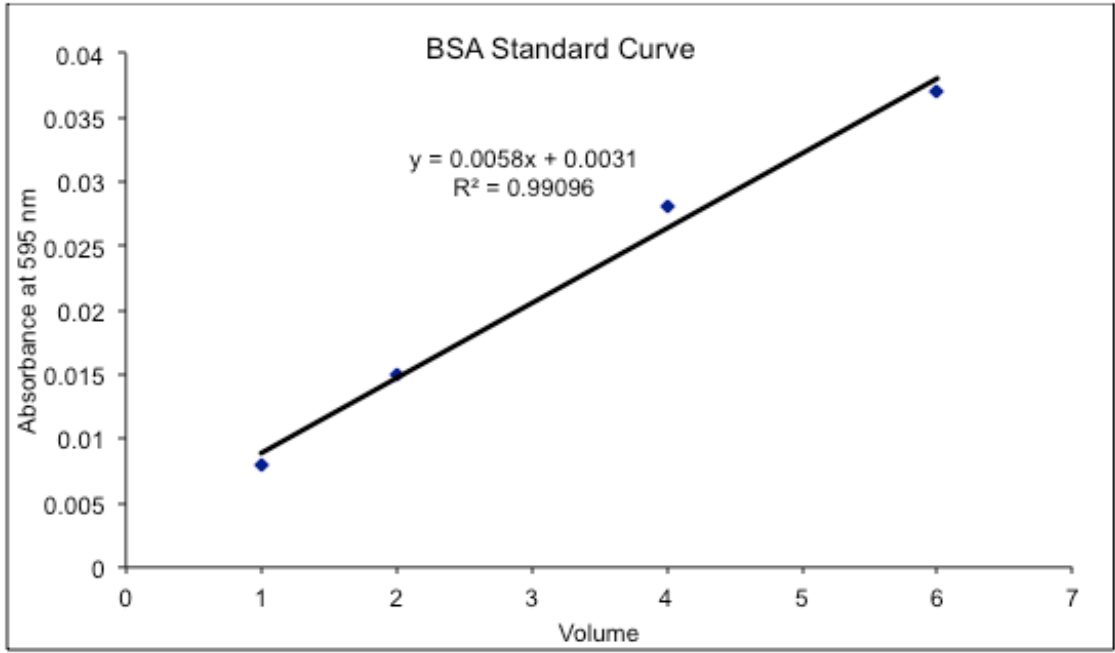
Tablo 3.10 Western Blot Sisteminde Kullanılan Kimyasal Listesi

Çözelti	Hazırlama
Yığıma (Üst) Jel Tamponu	6 g Tris-base ile 0.4 g SDS yaklaşık 80 mL deiyonize su içinde dağıtılarak homojen hâle getirildi. Ardından çözeltinin pH değeri 6,8 seviyesine getirildi ve toplam hacim 100 mL’ye ayarlandı. Elde edilen tampon çözelti +4 °C’de korunmak üzere kaldırıldı.
RIPA Hücre Lizis Tamponu	10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, %1 Triton X-100, %0.1 SDS ve %0.1 sodyum deoksikolat yer aldı. Proteaz inhibitörü eklenip homojenliği sağlandıktan sonra tampon 15 mL’lik tüplere dağıtılarak saklama için –20 °C’ye kaldırıldı.
Yığıma (Stacking) Jeli Tamponu	6 g Tris-base ile 0.4 g SDS, 80 mL saf su içinde çözündürüldü. pH 6.8 olacak şekilde ayarlandıktan sonra hacim 100 mL olarak tamamlandı ve çözelti +4 °C’de korunmak üzere kaldırıldı.
10X Yürütme (Running) Tamponu	Yürütme tamponunun stok çözeltisi hazırlanırken 30.3 g Tris-base ve 144.4 g glisin, 700 mL saf su içinde tamamen çözülerek karışım hazırlandı.
Transfer Tamponu	Transfer işlemleri için gereken tamponu hazırlamak üzere 100 mL 10X running tamponu, 200 mL metanol ile karıştırıldı. Üzerine saf su eklenerek hacim 1 L’ye tamamlandı ve çözeltiye ek olarak 500 µL %10 SDS ilave edildi.
10X TBS (Tris Buffered Saline)	TBS stok çözeltisini elde etmek için 24.22 g Tris-base ve 87.66 g NaCl, yaklaşık 700 mL saf su içinde çözündürüldü. pH değeri 7.5’e getirildikten sonra toplam hacim 1 L olacak şekilde tamamlandı ve çözeltinin stabil kalması için +4 °C’de saklandı.

3.3.1.3 Bradford Yöntemi ile Proteinlerin Miktarının Belirlenmesi

Örneklerdeki toplam protein miktarının belirlenmesi amacıyla Bradford kolorimetrik yöntemi uygulandı. Bu yöntemde, proteinlerin asidik ortamda Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasıyla etkileşerek mavi renk oluşturması esas alındı ve ortaya çıkan renk yoğunluğu protein derişimi ile ilişkilendirildi.

Analize başlanmadan önce, hesaplamaların güvenilir bir şekilde yapılabilmesi için 100–1000 µg/mL aralığında hazırlanan BSA standart çözeltileri kullanılarak bir kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. Bu standartlar ve kör olarak kullanılan saf sudan 5 µL'lik hacimler, her biri üç tekrarlı olacak şekilde 96 kuyucuklu mikrolakaya dağıtıldı. Plakadaki tüm kuyucuklara 250 µL Bradford reaktifi ilave edilmesinin ardından, reaksiyonun gerçekleşmesi için plakalar 10 dakika boyunca karanlık koşullarda bekletildi. Bu inkübasyon süresi, boya ile protein arasındaki bağlanmanın tamamlanması ve renk değişiminin stabil hâle gelmesi açısından önem taşıdı. Süre dolduktan sonra, kuyucuklara ait absorbans değerleri 595 nm dalga boyunda ölçüldü. Plakadaki tüm kuyucuklara 250 µL Bradford reaktifi ilave edilmesinin ardından, reaksiyonun gerçekleşmesi için plakalar 10 dakika boyunca karanlık koşullarda bekletildi. Bu inkübasyon süresi, boya ile protein arasındaki bağlanmanın tamamlanması ve renk değişiminin stabil hâle gelmesi açısından önem taşıdı. Süre dolduktan sonra, kuyucuklara ait absorbans değerleri 595 nm dalga boyunda ölçüldü. Standart çözeltilerden elde edilen absorbans sonuçları protein derişimleri ile karşılaştırılarak kalibrasyon eğrisi oluşturuldu (Şekil 3.8). Bu eğri, deney numunelerine ait absorbans ölçümlerinin protein miktarına dönüştürülmesinde temel referans olarak kullanıldı. Böylece örneklerdeki protein konsantrasyonları hem doğru hem de tekrarlanabilir bir şekilde nicel olarak hesaplandı.



Şekil 3.2: Bradford eğrisi ve formülü

3.3.1.4 SDS-PAGE Yöntemi

Hücre ekstraktlarından elde edilen proteinler, moleküler ağırlıklarına göre ayırmak amacıyla Sodyum Dodesil Sülfat–Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) yöntemi ile incelendi. SDS ile kaplanan proteinlerin, jel içerisinde yalnızca moleküler boyutlarına bağlı olarak ayrışması prensibiyle; proteinler moleküler ağırlıklarına göre analiz edilme imkânı sağlandı. Çalışmada yer alan tüm cam malzemeler ve ekipmanlar, protein kontaminasyonunu önlemek amacıyla önce deiyonize su ile yıkandı, ardından %70 etanol ile dezenfekte edildi. Cam levhalar kurutulduktan sonra jel dökme aparatına düzgün bir biçimde yerleştirilerek döküm için hazır hâle getirildi. Hazırlık sırasında, jel kalitesini olumsuz etkileyebilecek hava kabarcıklarının oluşmaması ve yüzeylerin temiz kalması için özel önlemler alındı.

SDS-PAGE uygulamasında iki katmanlı bir jel sistemi tercih edildi. Ayırma jelinin %10, yığma jelinin ise %4 akrilamid oranına sahip olacak şekilde kesintili jel oluşturuldu. Öncelikle, %10'luk ayırma jeli bileşenleri cam levhalar arasına aktarılırken yüzeyde boşluk bırakılmamasına dikkat edildi ve üst kısmında yığma jelinin yerleştirilmesi için yaklaşık 2–3 cm'lik alan boş bırakıldı. Jel yüzeyinin düzgün bir şekilde polimerize olabilmesi için üzerine dikkatlice izopropanol eklendi; bu işlem jelin oksijenle temasını azaltarak polimerizasyonun etkin şekilde tamamlanmasını sağladı.

Ayırma jelinin polimerizasyon süresi yaklaşık 30 dakika sürdü. Süre bitiminde, üstteki izopropanol tamamen uzaklaştırıldı ve jel yüzeyi kurutma kâğıdıyla temizlenerek alkol kalıntısından arındırıldı. Bu adım, yığılma jelinin homojen şekilde bağlanabilmesi için kritik öneme sahipti. Hazırlık işlemlerinin tamamlanmasının ardından, yığılma jel dökülerek kuyucukların oluşturulması sağlandı ve elektroforez sistemi çalışmaya hazır hâle getirildi.

Deneyde kullanılacak protein örnekleri hazırlanırken, ilk olarak tüm tüpler arasındaki protein miktarlarının eşitlenebilmesi için bir referans değeri belirlendi. Bu amaçla, protein içeriği en düşük olan örnek başlangıç noktası olarak kabul edildi ve diğer tüm örneklerin miktarları bu değere göre yeniden hesaplanarak standart hale getirildi. Böylece jel üzerinde her örneğin eşdeğer protein yüküyle ilerlemesi sağlandı.

Her örneğe, elektroforez öncesinde gerekli renk ve yoğunluk takibini mümkün kılmak için 5 µL yükleme boyası ilave edildi. Kullanılan yükleme boyası, ticari olarak temin edilen 4X Laemmli örnek tamponu (90 µL) ile β-merkaptoetanol (10 µL) bir araya getirilerek hazırlandı. Bu karışım, proteinlerin indirgenmesini ve elektroforez sırasında düzgün hareket etmelerini sağlayan standart bir tampon niteliği taşır. Hazırlanan boya eklendikten sonra, her bir örneğin toplam hacmi yığılma jel tamponu kullanılarak 25 µL'ye tamamlandı, böylece tüm örneklerin jel kuyularına eşit hacimde uygulanması mümkün hale getirildi. Proteinlerin tamamen denatüre olabilmesi için örnekler, kapakları kapatılmış şekilde 95°C'de 5 dakika boyunca ısıtıldı. Bu işlem sırasında proteinlerin üç boyutlu yapıları bozularak doğrusal hale gelmeleri ve elektroforezde yalnızca moleküler ağırlıklarına göre ayrılmaları sağlandı.

Jel yükleme aşamasında, ilk kuyucuk moleküler ağırlık belirleme amacıyla 5 µL PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo) ile dolduruldu. Bu belirteç, jel yürütme sürecinde bantların hangi kütle aralığında olduğunu takip etmek için referans görevi gördü. Kalan kuyulara ise her biri önceden standart hale getirilmiş 25 µL protein örneği dikkatlice uygulandı. Tüm yükleme işlemleri tamamlandıktan sonra jel elektroforez cihazına yerleştirildi ve yürütme tamponu ile doldurularak çalıştırıldı. Jel, düşük miliamperde olacak şekilde ayarlanan sistemde 80 V gerilim altında yaklaşık 3.5–4 saat boyunca çalıştırıldı. Bu süre boyunca proteinler, yığılma jelinden ayrılma jelinin içerisine doğru ilerleyerek moleküler büyüklüklerine göre ayrıştı ve analiz için gerekli bant yapıları ortaya çıktı.

3.3.1.5 Proteinlerin SDS-PAGE Jelinden PVDF Western Blot Membranına Transferi

SDS-PAGE’de ayrıştırılan proteinler, daha sonra analiz edilebilmesi için Bio-Rad Trans-Blot cihazı kullanılarak PVDF membran üzerine aktarıldı. Jel elektroforezden çıkarıldıktan sonra, transfer aşamasına geçmeden önce yapısal uyumun sağlanması amacıyla kısa bir süre soğutulmuş transfer tamponu içerisinde bekletildi. Böylece jel hem ısı dengeye getirildi hem de tamponla tam temas etmesi sağlandı. Bu işlemden sonra jel kalıpta bulunan cam plakalar yavaşça ayrıldı ve üstte yer alan stacking bölümü kesilerek uzaklaştırıldı. Transfer sisteminin diğer bileşenleri de aynı anda hazırlanarak, 3 MM filtre kâğıtlarının ve sünger pedlerin transfer tamponu ile tamamen ıslanmaları sağlandı.

Kullanılacak PVDF membran transfer öncesi aktive edilmek zorunda olduğundan, membran 8×6 cm boyutlarında kesildi ve aktif yüzeyi aşağı bakacak şekilde yaklaşık 2 dakika metanolde tutuldu. Metanolde tamamen ıslandıktan sonra membran soğuk transfer tamponuna alınarak kısa bir süre burada da bekletildi. Transfer kasetinin hazırlanmasında, klasik sandviç düzeni takip edildi. Kasetin negatif kutup yönüne denk gelen kısmından başlanarak sırasıyla sünger – üç kat filtre kâğıdı – jel – PVDF membran – üç kat filtre kâğıdı – sünger dizilimi oluşturuldu. Katmanlar üst üste yerleştirilirken aktarımı engelleyebilecek hava boşlukları, kaset silindiri kullanılarak tamamen uzaklaştırıldı. Bu adım transfer kalitesi için kritik olduğundan dikkatli biçimde uygulandı.

Kaset kapatıldıktan sonra doğrultu kontrol edilerek sistem transfer tankına yerleştirildi; membranın proteini çekebilmesi için pozitif kutba bakması sağlandı. Tank soğuk transfer tamponu ile doldurulduktan sonra cihaz çalıştırıldı. Transfer süreci, protein kaybını en aza indirmek amacıyla düşük akımda (35 mA) ve +4 °C’de gece boyunca sürdürüldü. Bu koşullar, bantların PVDF yüzeyine düzgün ve keskin şekilde aktarılmasını kolaylaştırdı.

3.3.1.6 Proteinlerin Antikorlarla Etkileşiminin İmmüno blot Tekniği ile Tespiti

Proteinlerin PVDF membrana aktarılmasının ardından, membran üzerinde meydana gelebilecek spesifik olmayan bağlanmaların engellenmesi amacıyla bloklama aşamasına geçildi. Transfer işlemi bitmiş membran, aktif yüzeyi üste gelecek biçimde temiz bir kaba yerleştirildi ve üzerine 20 mL bloklama tamponu eklendi. Bu adım boyunca membran oda sıcaklığında çalışan yatay çalkalayıcı üzerinde yaklaşık 1,5 saat boyunca nazikçe hareket ettirilerek inkübe edildi. Böylece membran yüzeyi tamamen bloklanarak arka plan sinyali azaltıldı. Bloklamanın tamamlanmasından sonra membran, 1X TBST ile üç defa yıkanarak

fazla tampon uzaklaştırıldı. Her yıkama yaklaşık 5 dakika sürdürülerek yatay çalkalayıcıda gerçekleştirildi. ADAMTS-14 ve β -aktin bantlarının ayrı ayrı incelenebilmesi için membran, bant bölgelerine göre dikkatlice kesilerek iki parçaya ayrıldı. Böylece her bir membran parçası kendi primer antikoru ile işlenebildi.

Primer inkübasyonu sırasında, ADAMTS-14 proteininin tespiti için 1/400 oranında seyreltilmiş ADAMTS-14 primer antikoru; yükleme kontrolü olan β -aktin için ise 1/5000 oranında seyreltilmiş β -aktin primer antikoru kullanıldı. Membran parçaları bu antikor çözeltilerinin içine tamamen daldırılarak 4 °C'de gece boyunca, döner çalkalayıcı üzerinde sürekli hareket ettirilerek inkübasyona bırakıldı. Bu uzun inkübasyon süresi antikorların hedef proteinlere yüksek özgüllükle bağlanmasını sağladı.

Ertesi gün primerlerin ortandan tamamen uzaklaştırılması amacıyla membranlar yeniden 1X TBST ile üç defa, her biri 5 dakika olacak şekilde yıkandı. Ardından sekonder antikor inkübasyonuna geçildi. β -aktin için 1/10.000 oranında seyreltilmiş mouse sekonder antikoru; ADAMTS-14 için ise 1/10.000 oranında seyreltilmiş rabbit sekonder antikoru hazırlandı. Membran bölümleri bu çözeltilere alınarak oda sıcaklığında 1 saat süreyle dönen çalkalayıcıda inkübe edildi.

3.3.1.7 Görüntüleme ve Analiz

İnkübasyonun tamamlanmasını takiben membranlar, serbest halde kalan sekonder antikorları uzaklaştırmak için TBST ile üç kez, 5'er dakika boyunca yıkandı. Bu işlemlerin ardından membranlar görüntüleme aşamasına hazır hale getirildi ve ADAMTS-14 ile β -aktin bantları uygun sistemle tespit edildi. Antikor inkübasyon adımlarının tamamlanmasından sonra proteinlerin görüntülenmesi için membrana Pierce™ ECL kemilüminesans substratı uygulandı. Sekonder antikora bağlı HRP (Horseradish Peroxidase) enziminin substratı aktive etmesi sonucu membran üzerinde ışık oluştu ve bu ışık ADAMTS-14 ile β -aktin bantlarının belirginleşmesini sağladı. Oluşan kemilüminesans sinyalleri, yüksek duyarlılığa sahip Fusion FX görüntüleme sistemi tarafından yakalanarak farklı pozlama ayarlarında dijital olarak kaydedildi. Böylece hem güçlü hem zayıf bantların okunabilir olduğu net görüntüler elde edildi. Kaydedilen görüntüler analiz için ImageJ yazılımına aktarıldı. Programın yoğunluk ölçüm araçları kullanılarak bantların piksel değerleri hesaplandı ve arka plan düzeltilmesi yapıldı. ADAMTS-14 seviyeleri, örnek yükleme farklılıklarını ortadan kaldırmak amacıyla β -aktin bantları üzerinden normalize edildi. Son aşamada, normalize

edilmiş ADAMTS-14/ β -aktin oranları GraphPad Prism yazılımına aktarılarak grafikler oluşturuldu ve örnekler arasındaki ifade düzeyleri görsel olarak karşılaştırıldı.

3.3.2 İmmünofloresan Yöntemi

İmmünofloresan metodu kullanılarak, SW480 kolorektal kanser hücrelerinde ADAMTS-14 proteininin hücre içi dağılımı ve değişen çevresel koşullara verdiği yanıt değerlendirildi. Çalışmada, hücrelerin IL-6 ile uyarılması ve belirli bir süre hipoksik koşullara maruz bırakılmasıyla ADAMTS-14 ekspresyonunun nasıl etkilendiği araştırıldı. Bu yöntem, floresan işaretli antikorların yalnızca hedef antijenle etkileşime girmesi prensibi üzerine kurulu olduğundan, proteinlerin hem hücre içindeki lokalizasyonu hem de ifade düzeyleri mikroskopik olarak ayrıntılı biçimde görüntülenebildi.

Deneylere geçilmeden önce kültürde çoğaltılmış SW480 hücreleri sayılarak, tabanında steril yuvarlak lamel bulunan 24 kuyucuklu plakalara her kuyucuğa 5×10^4 hücre gelecek şekilde dağıtıldı. Adezyonun sağlanabilmesi amacıyla plakalar 37°C , %5 CO_2 içeren inkübatörde bir gece süreyle bekletildi. ADAMTS-14 yanıtını ortaya koymak amacıyla bazı kuyulara 300 μL IL-6 (20 ng/mL) ilave edildi; ayrı bir deney grubunda ise hücreler kimyasal indüklenmiş hipoksi koşulları oluşturuldu. Uygulamalar toplam 48 saat sürdürüldü ve hücrelerin verilen uyarıyı sürdürebilmesi için 24. saatte 300 μL taze medyum değişimi yapıldı. İnkübasyon sonunda medyum uzaklaştırıldı ve hücreler iki kez $1 \times$ PBS (300 μL /kuyu) ile yıkandı. Hücresel yapıların korunması ve antikor bağlanma bölgelerinin sabitlenmesi için, her kuyucuğa 250 μL %4 paraformaldehit eklenerek hücreler 15 dakika fiksasyonda tutuldu. Daha sonra paraformaldehit kaldırılarak hücreler yeniden PBS ile yıkandı.

Antikorların hücre içi yapılarla erişebilmeleri için membranın kontrollü şekilde geçirgenleştirilmesi gerektiğinden, kuyulara 250 μL %0.25 Triton X-100 içeren PBS eklendi ve hücreler 10 dakika permeabilizasyona bırakıldı. Bu işlem, antikorların hem sitoplazmik hem de çekirdek içindeki hedeflere ulaşmasını sağladı. Permeabilizasyonu takiben özgül olmayan bağlanmaları azaltmak için her kuyucuğa 250 μL %1 BSA içeren PBS eklendi ve 90 dakika boyunca bloklama gerçekleştirildi. Daha sonra ADAMTS-14 proteinine karşı geliştirilmiş primer antikor, %1 BSA içeren PBS içinde 1:300 oranında seyreltilerek 250 μL hacminde kuyulara eklendi ve antikor-antijen etkileşiminin optimal düzeye ulaşması amacıyla plakalar 4°C 'de bir gece inkübasyonda tutuldu.

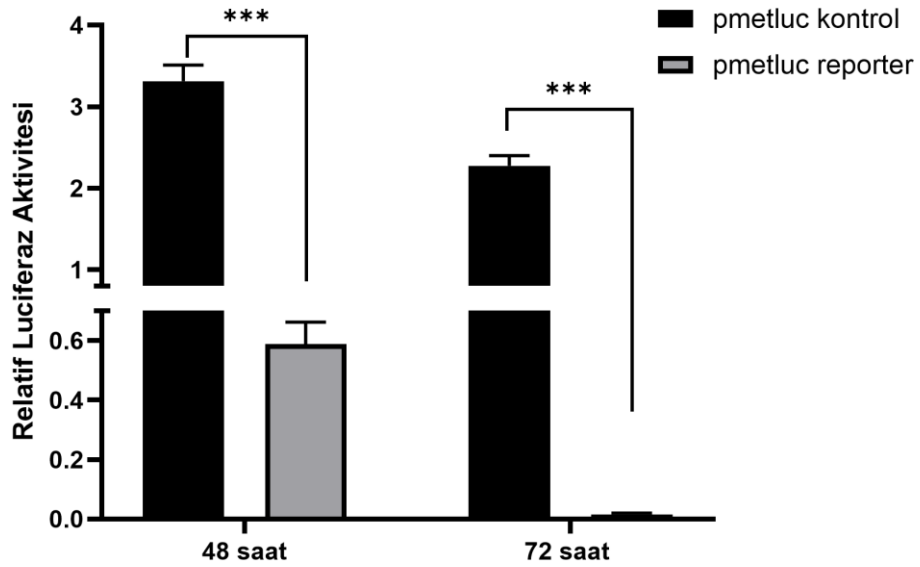
Ertesi gün primer antikor çözeltileri uzaklaştırıldı ve hücreler 300 µL PBS ile üç kez yıkandı. Bundan sonraki adımlar floresan işaretli moleküllerin ışığa duyarlılığı nedeniyle tamamen karanlık ortamda yürütüldü. Primer antikoru tanıyan Alexa Fluor 488 konjugeli ikincil antikor, %1 BSA'lı PBS içinde 1:400 oranında seyreltilerek 150 µL hacminde hücrelere uygulandı ve 45 dakika inkübe edildi. İkincil antikor uzaklaştırıldıktan sonra hücreler 300 µL PBS ile üç kez yıkandı. Çekirdeklerin görüntülenebilmesi için DNA'ya bağlanan DAPI (1 µg/mL; 150 µL/kuyu) eklendi ve 10 dakika inkübasyonda bırakıldı. Ardından hücreler dört kez 1× PBS (300 µL/kuyu) ile yıkandı.

Görüntüleme aşamasından önce lameller dikkatlice çıkarılarak lam üzerine %90 gliserolden 20–30 µL damlatıldı ve lamel gliserol üzerine kapatıldı. Kenarlar sabitlenerek preparatlar karanlık ortamda bir gece boyunca dinlendirildi. Hazırlanan örnekler floresan mikroskobu ile incelendi. ADAMTS-14'e ait floresan sinyalleri kaydedildi ve görüntüler ImageJ yazılımı kullanılarak CTCF yöntemi ile kantitatif olarak analiz edildi. Böylece IL-6 uyarısının ve hipoksinin ADAMTS-14 düzeyleri üzerindeki etkileri karşılaştırmalı şekilde ortaya kondu.

4. BULGULAR

4.1 ADAMTS-14 Promotor Parçalarının SW480 Hücrelerine Geçici Transfeksiyonu ve Bazal Aktivitenin Belirlenmesi

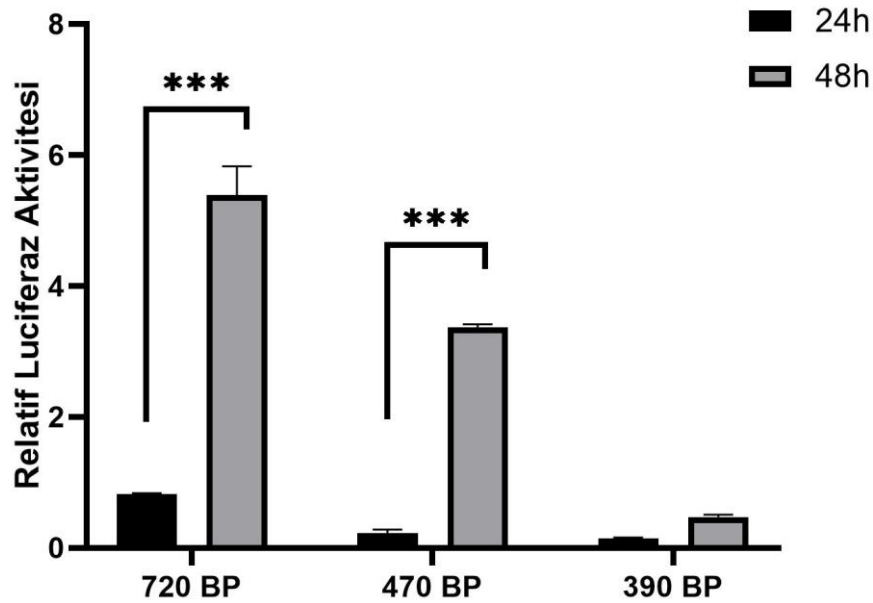
Bu çalışmada ADAMTS-14 genine ait 720 bp, 470 bp ve 390 bp uzunluğundaki promotör fragmanlarının transkripsiyonel aktivitesi değerlendirilmiştir. Söz konusu DNA parçaları, daha önce gerçekleştirilen klonlama çalışmaları sonucunda elde edilen konstrüksiyonlardan yararlanılarak SW480 hücrelerine aktarılmıştır. Promotör yapılarının hücrelere iletilmesi, tezde ayrıntıları verilen kalsiyum–fosfat temelli geçici transfeksiyon protokolü doğrultusunda yürütülmüştür. Bu yöntemin uygulama adımları, “Kalsiyum-Fosfat Yöntemi ile Geçici Transfeksiyon” başlıklı 3.2.2.2 numaralı bölümde ayrıntılı biçimde açıklanan prensiplere dayanmaktadır. Hücrelerin uygun yoğunluğa ulaşmasının ardından DNA-CaCl₂-HEPES kompleksinin hazırlanması ve hücrelere eklenmesi ile transfeksiyon gerçekleştirilmiş; SW480 hücreleri 24., 48. ve 72. saatlerde hem bazal koşullarda hem de IL-6 ile uyarılmış durumda değerlendirilmiştir. Zaman noktalarına ulaşıldığında kültür ortamından alınan medyum örneklerinin lüsiferaz ve SEAP analizi ise yine tezde “Lüsiferaz Aktivitesinin ve SEAP Aktivitesinin Ölçümü” başlığı altında verilen 3.2.2.3 numaralı bölümde tanımlanan yöntem izlenerek yapılmıştır.



Şekil 4.1: 48 saatlik ve 72 saatlik Pmetluc kontrol ve Pmetluc reporter karşılaştırması

Hücrelere transfekte edilen Pmetluc kontrol plazmidi yüksek promoter aktivitesi gösterirken, Pmetluc reporter yapısında luciferaz sinyali belirgin şekilde düşüktür. 48. saatte reporter grubunda gözlenen düşük aktivite, ilgili promoter bölgesinin bazal koşullarda zayıf çalıştığını göstermektedir.

72.saat verileri, kontrol grubundaki luciferaz sinyalinin korunmasına rağmen reporter grubunda aktivitenin neredeyse tamamen kaybolduğunu göstermektedir. Bu durum, reporter yapısının zamanla susturulduğunu ve promotorun uzun süreli kültürde minimal aktivite gösterdiğini ortaya koymaktadır.



Şekil 4.2: ADAMTS-14 fragmanlarının (720 bp, 470 bp, 390 bp) 24 saat ve 48 saat bazal aktivite karşılaştırması

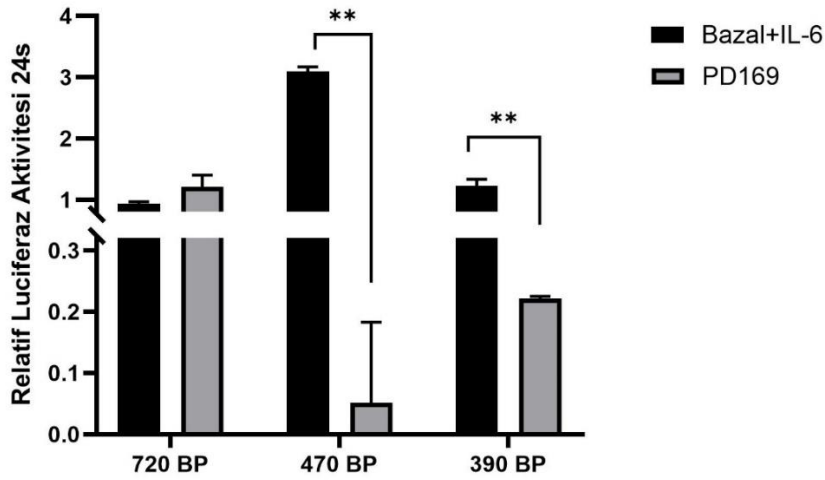
Üç fragmanın tümünde zaman bağımlı bir artış gözlenmiştir. 720 ve 470 bp fragmanları 48. saatte belirgin derecede yükselmiş olup, 470 bp bölgesi en yüksek aktivite artışını göstermiştir. Bu durum, ADAMTS-14 geninin belirli düzenleyici bölgelerinin zamanla daha güçlü şekilde transkripsiyonel olarak aktive olduğunu düşündürmektedir.

Analiz sonuçları, ADAMTS-14 promotör fragmanlarının zaman bağımlı olarak artan bir transkripsiyonel aktivite gösterdiğini ortaya koymuştur. Özellikle 720 bp ve 470 bp fragmanlarının 48. saatte en yüksek seviyelerine ulaştığı, 24. saat ile karşılaştırıldığında bu

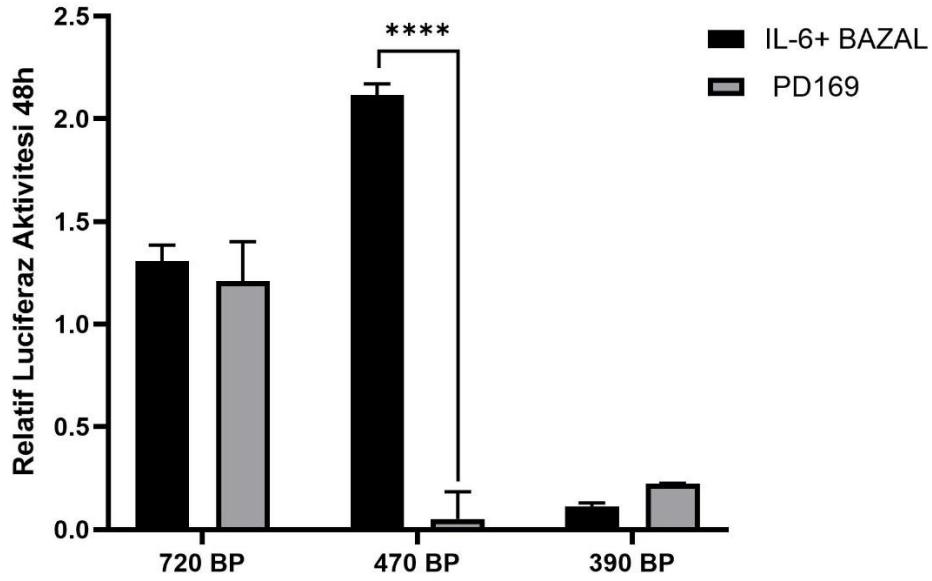
iki fragmanda sırasıyla yaklaşık 6–7 kat ve 12 kata ulaşan bir artış meydana geldiği belirlenmiştir. 390 bp fragmanı daha düşük aktivite düzeyine sahip olmakla birlikte zaman ilerledikçe artış gösteren bir profil izlemektedir. Bu farklı yanıtlar, promotörün çeşitli bölgelerinde yer alan düzenleyici elementlerin transkripsiyonel kontrolü farklı güçlerde etkilediğine işaret etmektedir.

4.2 IL-6 Sitokinin ADAMTS-14 Geninin Promotor Parçalarının Transkripsiyonel Aktivitesinin Belirlenmesi

Bu çalışmada IL-6 uygulaması, 3.2.2.2 numaralı bölümde aktarılan transfeksiyon protokolü izlenerek yürütülmüştür. Transfeksiyon işlemi tamamlandıktan sonra SW480 hücreleri 96 kuyucuklu plakalara yeniden dağıtılmış ve hücrelerin kültür yüzeyine yerleşebilmesi için 48 saat boyunca standart etüv koşullarında tutulmuştur. Bu sürenin ardından, sitokine verilecek yanıtın serumdan etkilenmemesi amacıyla kültür ortamı %0,1 BSA içeren DMEM ile değiştirilmiş ve hücreler bir saat süreyle bu ortamda bekletilmiştir. Hazırlık aşaması tamamlandıktan sonra kuyucuklara son konsantrasyonu 20 ng/mL olacak şekilde IL-6 eklenmiş; sitokinin hedef promotör bölgeleri üzerindeki erken dönem düzenleyici etkisinin oluşabilmesi için hücreler altı saat boyunca bu koşullarda bırakılmıştır. Süreç sonunda kültür ortamı dikkatlice toplanmış, -20 °C’de saklanmış ve lüsiferaz ile SEAP aktivitelerinin ölçümü için kullanılmak üzere hazır hâle getirilmiştir. Bu şekilde IL-6’nın ADAMTS-14 promotör fragmanları üzerindeki transkripsiyonel etkilerini incelemeye yönelik deneysel aşamalar eksiksiz olarak tamamlanmıştır.

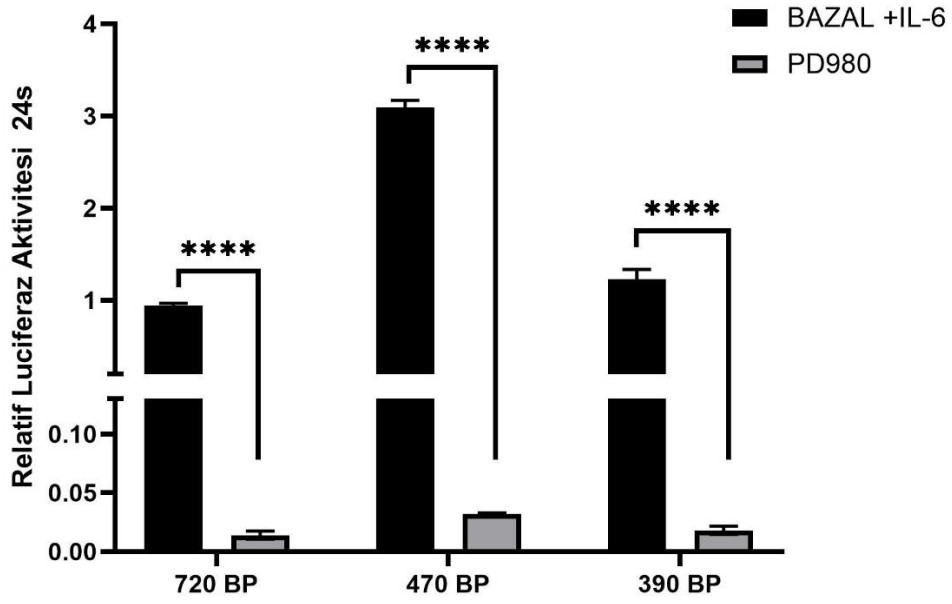


Şekil 4.3: 24 saat IL-6 uyarısı sonrasında 6 saat PD169 uygulamasının ADAMTS-14 promotör aktivitesi üzerindeki etkisi

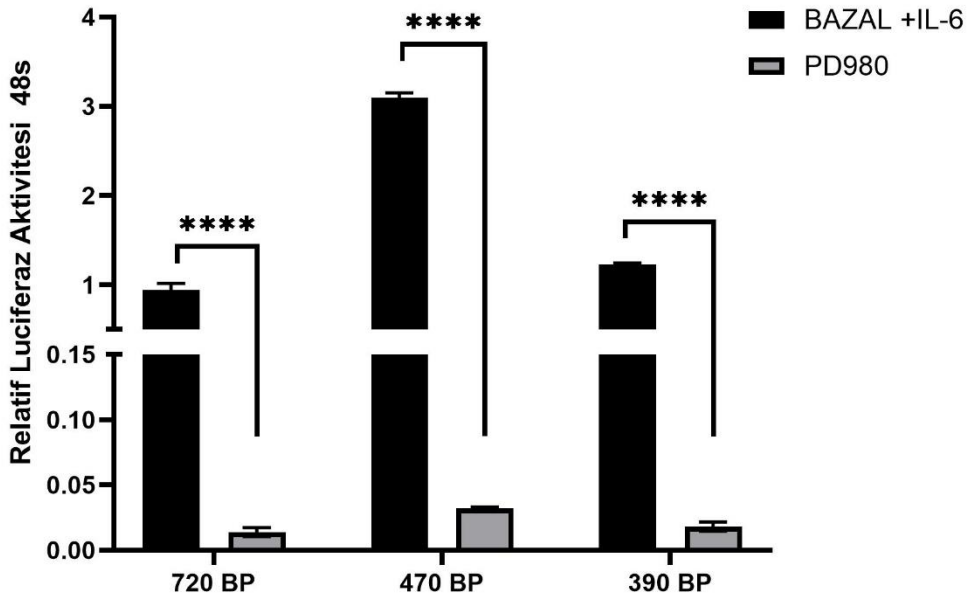


Şekil 4.4: 48 saat IL-6 uyarısı sonrasında 6 saat PD169 uygulamasının ADAMTS-14 promotor aktivitesi üzerindeki etkisi

ADAMTS-14 promotörüne ait farklı uzunluktaki üç fragmanın, IL-6 uyarısı altında PD169 inhibitörüne verdiği yanıt zaman açısından incelendiğinde bölgeler arasında belirgin bir farklılık saptanmıştır. 720 bp'lik fragmanda IL-6'nın oluşturduğu aktivasyon, hem 24 saat hem de 48 saatlik koşullarda PD169 uygulanmasına rağmen anlamlı bir azalma göstermemiş ve her iki sürede de iki grubun değerleri birbirine yakın seyretmiştir. Buna karşılık 470 bp fragmenti, her iki zaman noktasında da IL-6 ile en yüksek düzeyde aktivasyon sergileyen bölge olmasına rağmen, PD169 uygulandığında aktivitenin neredeyse tamamen baskılandığı görülmüştür. En kısa fragman olan 390 bp bölgesinde ise IL-6'nın 24 saatlik uygulamada belirgin bir artış oluşturduğu, ancak 48 saatte bu etkinin belirgin şekilde zayıfladığı dikkat çekmiştir. Bu fragmanda PD169'un uygulanması, her iki zaman noktasında da IL-6 grubuna kıyasla daha düşük aktivite ile sonuçlanmıştır. Bu bulgular, ADAMTS-14 promotörünün IL-6 tarafından aktive edilme biçiminin fragman uzunluğuna bağlı olarak değiştiğini ve PD169 inhibitörünün bu aktiviteyi zaman ve bölgeye özgü şekilde modüle ettiğini ortaya koymaktadır.

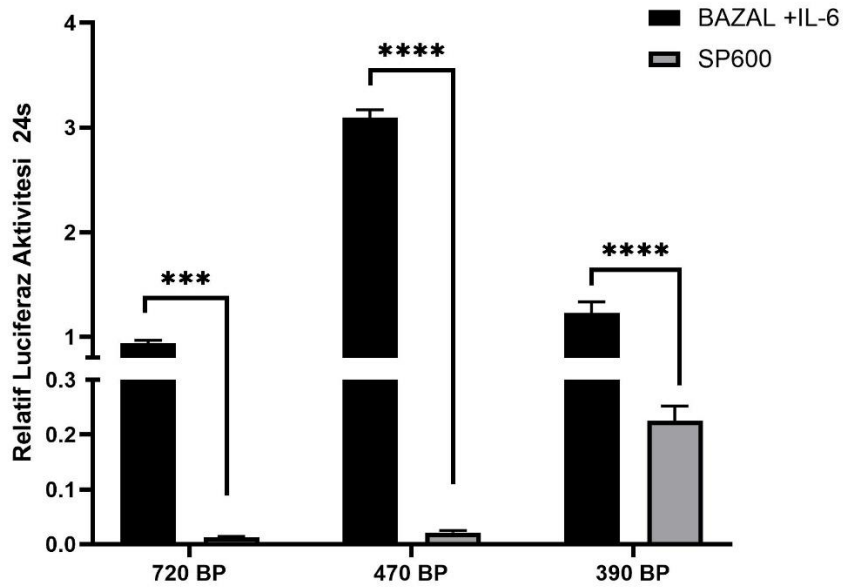


Şekil 4.5: 24 saat IL-6 uyarısı sonrasında 6 saat PD98059 uygulamasının ADAMTS-14 promotor aktivitesi üzerindeki etkisi

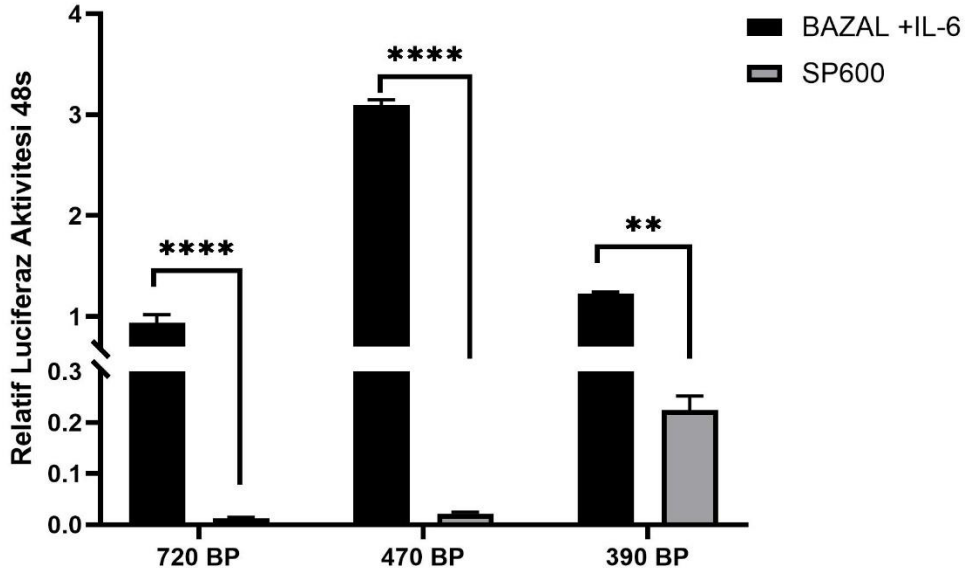


Şekil 4.6: 48 saat IL-6 uyarısı sonrasında 6 saat PD98059 uygulamasının ADAMTS-14 promotor aktivitesi üzerindeki etkisi

PD98059'un ADAMTS-14 promotör aktivitesi üzerindeki etkisi hem 24 hem de 48 saatlik IL-6 uyarımı sonrasında değerlendirildiğinde, inhibitörün üç promotör fragmanında da güçlü ve belirgin bir baskılama oluşturduğu görülmüştür. 720 bp uzunluğundaki fragmanda IL-6 her iki zaman noktasında benzer düzeylerde aktivasyon sağlamış olsa da PD98059 uygulandığında bu aktivite tamamen ortadan kalkmıştır. IL-6'ya en yüksek yanıtı veren 470 bp fragmanı, hem 24 saat hem de 48 saatlik koşullarda yüksek aktivite göstermiş; ancak PD98059 eklendiğinde aktivite düzeyi her iki sürede de neredeyse sıfır seviyesine gerilemiştir. En kısa bölge olan 390 bp fragmanında IL-6 ile oluşan aktivasyon her iki zaman noktasında da tutarlı şekilde gözlemlenmiş, fakat PD98059 uygulaması bu aktiviteyi tamamen baskılamıştır. Bulgular genel olarak değerlendirildiğinde, PD98059'un IL-6 tarafından uyarılan promotör aktivitesini tüm fragmanlarda güçlü biçimde inhibe ettiği ve bu etkinin zaman bağımlı değişiklik göstermediği anlaşılmaktadır.

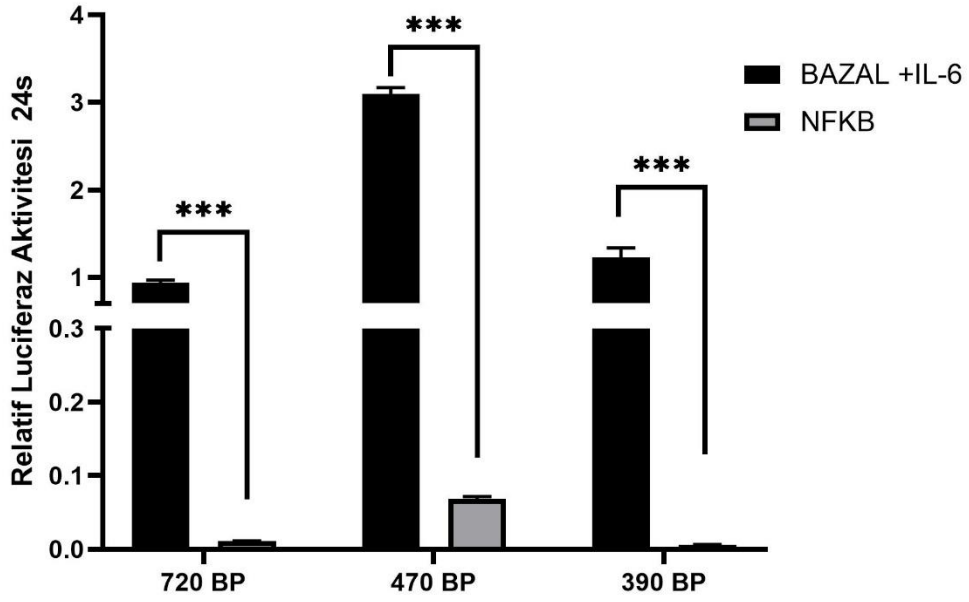


Şekil 4.7: 24 saat IL-6 uyarısı sonrasında 6 saat SP600125 uygulamasının ADAMTS-14 promotör aktivitesi üzerindeki etkisi

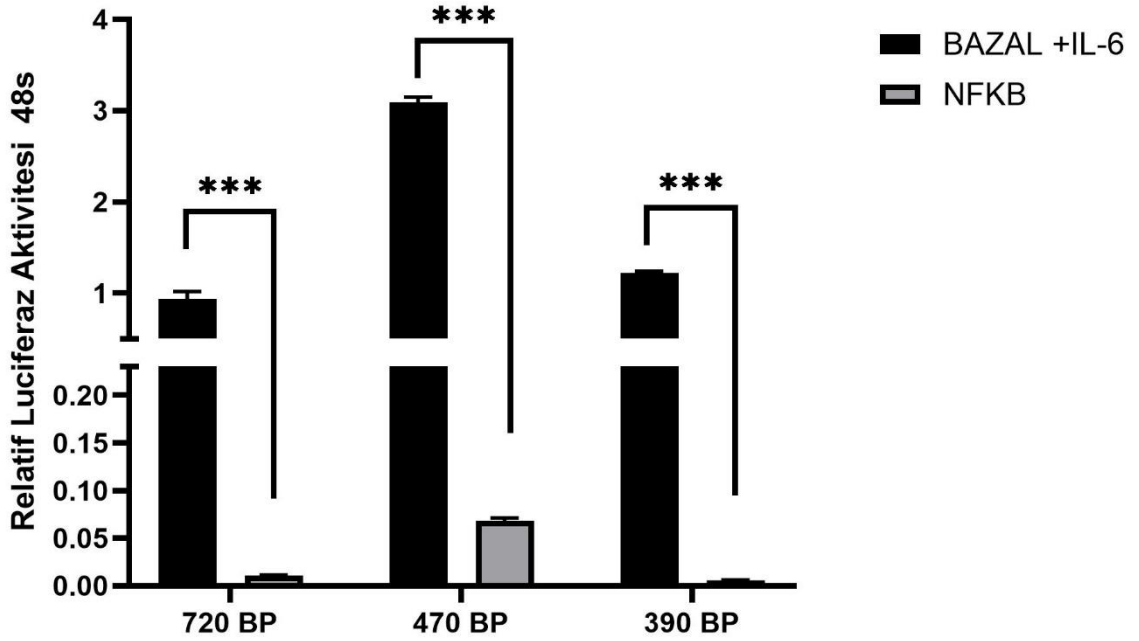


Şekil 4.8: 48 saat IL-6 uyarısı sonrasında 6 saat SP600125 uygulamasının ADAMTS-14 promotör aktivitesi üzerindeki etkisi

IL-6 ile uyarılan ADAMTS-14 promotör fragmanlarının SP600125 inhibitörüne verdiği yanıt incelendiğinde, her iki zaman noktasında da fragmanlar genel olarak benzer bir baskılanma eğilimi göstermiştir. 720 bp'lik fragmanda IL-6'nın oluşturduğu aktivasyon hem 24 hem 48 saatlik değerlendirmelerde yaklaşık aynı seviyelerde kalmış; ancak SP600125 uygulanmasıyla bu aktivasyon tamamen ortadan kalkmıştır. IL-6'ya en yüksek cevabı veren 470 bp bölgesinde, hem 24 saat hem de 48 saat sonunda belirgin bir aktivite artışı izlenmiş, fakat inhibitör uygulandığında her iki sürede de bu aktivite sifira yakın değerlere gerilemiştir. En kısa bölge olan 390 bp fragmentinde IL-6 ile benzer güçte bir aktivasyon elde edilmiş; ancak SP600125 varlığında bu yanıt her iki zaman noktasında da düşük seviyelere inmiştir. Elde edilen veriler, ADAMTS-14 promotörüne ait üç fragmanın da IL-6 ile aktive edildiğini, ancak SP600125 inhibitörünün bu aktivasyonu süre bağımsız şekilde güçlü biçimde bastırdığını göstermektedir.

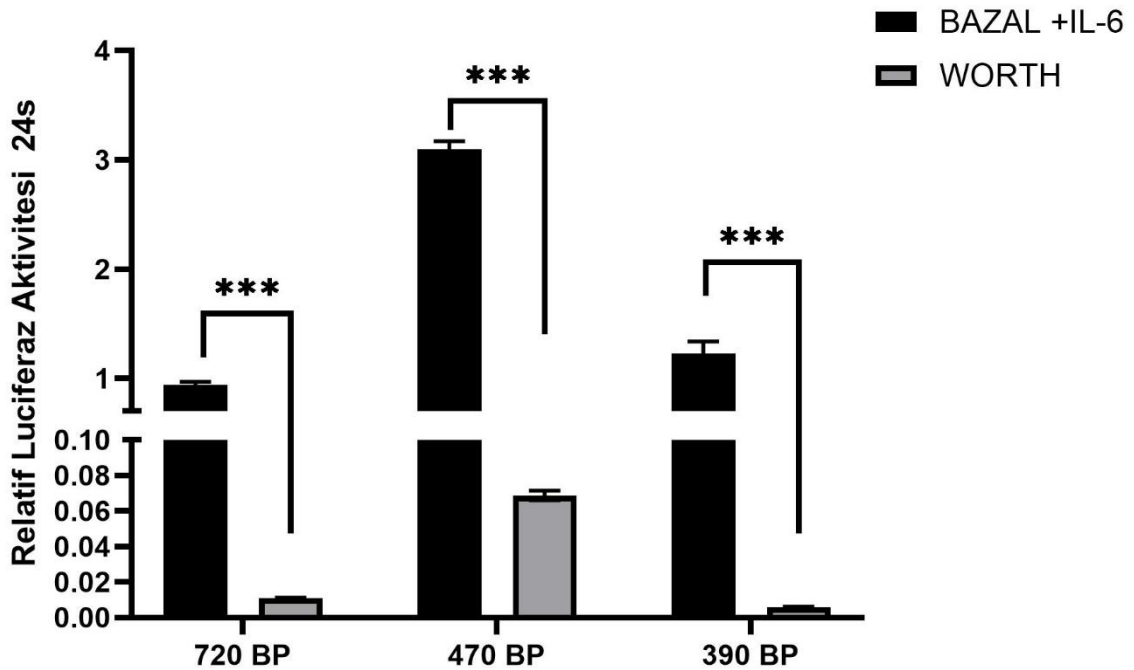


Şekil 4.9: 24 saat IL-6 uyarısı sonrasında 6 saat NF- κ B uygulamasının ADAMTS-14 promotor aktivitesi üzerindeki etkisi

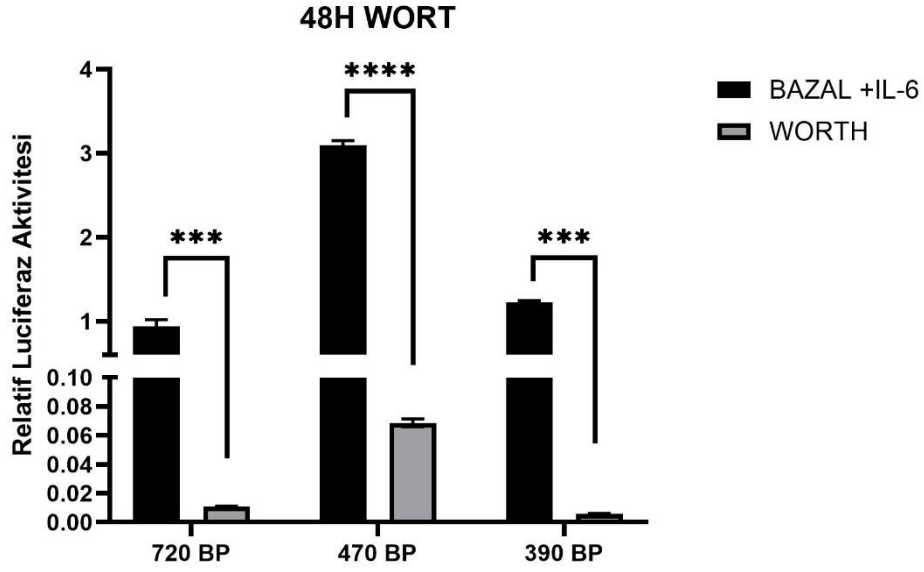


Şekil 4.10: 48 saat IL-6 uyarısı sonrasında 6 saat NF- κ B uygulamasının ADAMTS-14 promotor aktivitesi üzerindeki etkisi

IL-6'ya verilen promotör yanıtının NF-κB inhibitörüyle nasıl değiştiği değerlendirildiğinde, üç farklı ADAMTS-14 promotör fragmanının hem 24 saatlik hem de 48 saatlik uygulamalarda benzer bir inhibisyon eğilimi gösterdiği saptanmıştır. 720 bp uzunluğundaki bölge, IL-6 uygulaması sonrası her iki zaman noktasında da yaklaşık aynı düzeyde aktivasyon göstermiştir; ancak NF-κB inhibitörü eklendiğinde bu aktivasyon her iki sürede de neredeyse tamamen ortadan kalkmıştır. IL-6'ya en yüksek yanıtı veren 470 bp fragmentinde, IL-6 ile ölçülen güçlü aktivite artışı hem 24 hem 48 saatte tekrar görülmüş; fakat inhibitör uygulanmasıyla bu aktivite her iki koşulda da sifıra yakın değerlere gerilemiştir. 390 bp fragmenti, IL-6 uygulamasıyla 24 ve 48 saatlik değerlendirmelerde benzer seviyelerde aktivite üretmiş; ancak NF-κB inhibitörü varlığında ölçülen değerlerin her iki sürede de belirgin biçimde düştüğü görülmüştür. Elde edilen bu sonuçlar, ADAMTS-14 promotör fragmanlarının tamamında IL-6 ile oluşan transkripsiyonel aktivitenin NF-κB yolunun engellenmesiyle belirgin şekilde baskılandığını ve bu baskılanmanın süreye bağlı bir değişiklik göstermediğini ortaya koymaktadır.



Şekil 4.11: 24 saat IL-6 uyarısı sonrasında 6 saat Worthmannin uygulamasının ADAMTS-14 promotör aktivitesi üzerindeki etkisi



Şekil 4.12: 48 saat IL-6 uyarısı sonrasında 6 saat Wort uygulamasının ADAMTS-14 promotör aktivitesi üzerindeki etkisi

IL-6 ile uyarılan ADAMTS-14 promotör fragmanlarının Wortmannin inhibitörüne verdiği yanıt değerlendirildiğinde, üç fragmanda da belirgin ve süreyle değişmeyen bir baskılama eğilimi ortaya çıkmıştır. 720 bp uzunluğundaki promotör bölgesi IL-6 uygulamasıyla hem 24 hem 48 saatlik koşullarda benzer aktivasyon düzeylerine ulaşmış olsa da Wortmannin eklenmesi bu aktivasyonu her iki sürede de tamamen ortadan kaldırmıştır. IL-6'ya en yüksek düzeyde yanıt veren 470 bp fragmanında, IL-6 ile elde edilen güçlü aktivasyon her iki zaman noktasında tekrarlanmış; ancak inhibitör uygulandığında aktivite düzeyi 24 saat ve 48 saatlik analizlerde belirgin şekilde düşmüş ve sifira yakın değerler elde edilmiştir. En kısa bölge olan 390 bp fragmentinde IL-6'nın oluşturduğu aktivasyon hem 24 hem 48 saatlik uygulamalarda yaklaşık aynı seviyelerde gözlenmiş, fakat Wortmannin varlığında bu aktivasyon her iki sürede de tamamen kaybolmuştur. Elde edilen bu sonuçlar, Wortmannin'in ADAMTS-14 promotör aktivitesini fragman uzunluğundan ve uygulama süresinden bağımsız olarak güçlü şekilde baskıladığını göstermektedir.

4.3 ADAMTS-14 İfadesinin Belirlenmesi

4.3.1 IL-6 Sitokininin ADAMTS-14 Geninin mRNA Seviyesine Etkisinin qRT-PCR ile Belirlenmesi

Bu çalışmada SW480 hücrelerinde ADAMTS-14 ve ilişkili genlerin transkripsiyonel düzenlenmesini ortaya koymak amacıyla RNA'ya dayalı analizler uygulanmıştır. Çalışmada izlenen tüm deneysel aşamalar, yöntemler kısmında ayrıntıları verilen protokoller doğrultusunda yürütülmüştür. İlk aşamada hücreler kültür yüzeyinden tripsinizasyon yöntemiyle uzaklaştırılmış, ardından santrifüjle yoğunlaştırılan hücrelerden GeneJET RNA Purification Kit kullanılarak toplam RNA elde edilmiştir. İzolasyon sonrasında RNA örnekleri, bozulmayı engellemek amacıyla -80 °C'de depolanmıştır.

İzole edilen RNA'ların ölçümleri, 3.2.6.2 bölümünde açıklanan değerlendirme adımlarına uygun şekilde gerçekleştirilmiştir. Multiskan Go µDrop platformunda yapılan absorbans ölçümleriyle örneklerin derişimleri belirlenmiş, A260/A280 oranlarının kabul edilebilir aralıklarda olduğu görülerek saflık kriterleri doğrulanmıştır. Bazı örneklerde A260/A230 oranlarının da kontrol edilmesi, izolasyonun kimyasal kalıntılardan arındırılmış olduğunu teyit eden ek bir kalite göstergesi sağlamıştır.

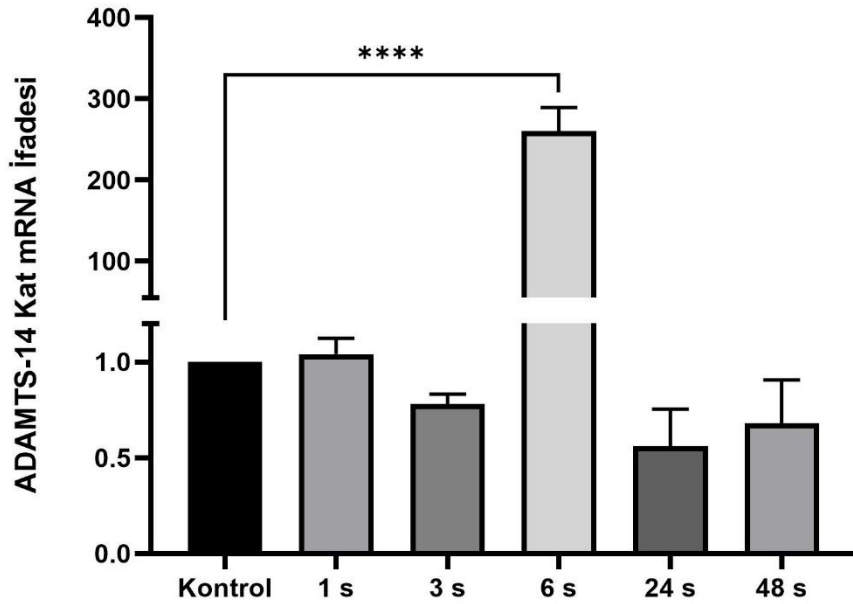
RNA örnekleri daha sonra 3.2.6.3'te tanımlanan prosedür izlenerek cDNA'ya dönüştürülmüştür. Reaksiyon karışımında oligo dT primerleri, revers transkriptaz enzimi, dNTP'ler ve RNaz inhibitörü içeren bir bileşim kullanılmıştır. Kısa süreli ön ısıtma basamağı primerlerin şablona bağlanmasını kolaylaştırmış; ardından belirlenen sıcaklık programı uygulanarak ters transkripsiyon tamamlanmıştır. Elde edilen cDNA örnekleri, daha sonraki analizlerde kullanılmak üzere -20 °C'de saklanmıştır.

Sentezlenen cDNA'ların uygunluğunu doğrulamak amacıyla 3.2.6.4'te açıklanan kalite kontrol PCR aşaması uygulanmıştır. Beta-2-mikroglobulin genine ait primerlerle yürütülen amplifikasyon sonucunda beklenen büyüklükte bantların elde edilmesi hem RNA izolasyonunun hem de cDNA sentezinin başarılı olduğunu ortaya koymuştur. Bu doğrulama adımı, Real-Time PCR çalışmalarına geçmeden önce örneklerin kullanılabilirliğini garanti altına almak adına kritik bir aşamadır.

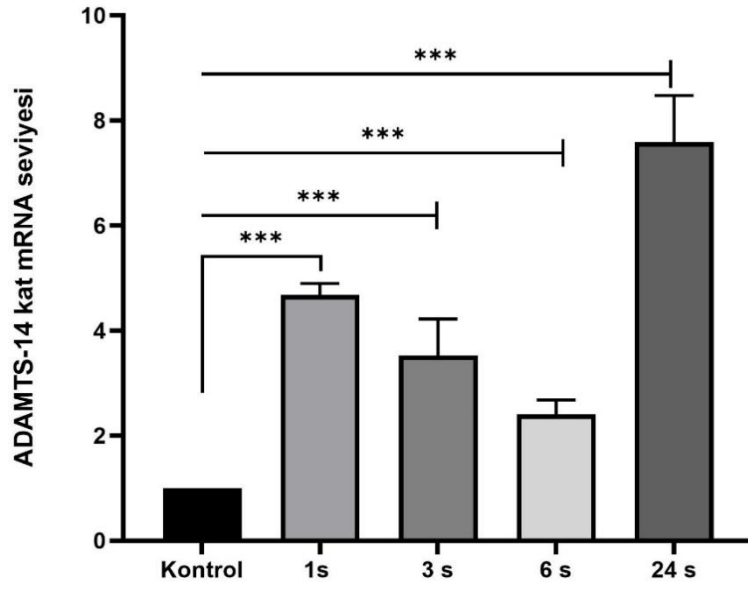
Son aşamada cDNA örnekleri, 3.2.6.5'te belirtilen koşullar doğrultusunda Real-Time PCR analizlerinde kullanılmıştır. SYBR Green içeren reaksiyon karışımları hazırlanmış, her

örnek üç teknik tekrar hâlinde çalışılmış ve erime eğrisi analizleri ile amplifikasyonların özgüllüğü kontrol edilmiştir. Ct değerleri belirlendikten sonra ADAMTS-14 ve HIF-1 α genlerinin ekspresyon seviyeleri H β -2 referans geni kullanılarak normalize edilmiştir. Elde edilen görel ekspresyon düzeyleri hesaplanmış ve sonuçlar kontrol gruplarıyla karşılaştırılarak grafiksel biçimde sunulmuştur.

Uygulanan tüm RNA tabanlı deneyler, yöntemlerde tanımlanan adımların dikkatle takip edilmesiyle gerçekleştirilmiş olup, çalışmanın gen ekspresyon profillerine ilişkin bulgularının temelini oluşturmuştur.

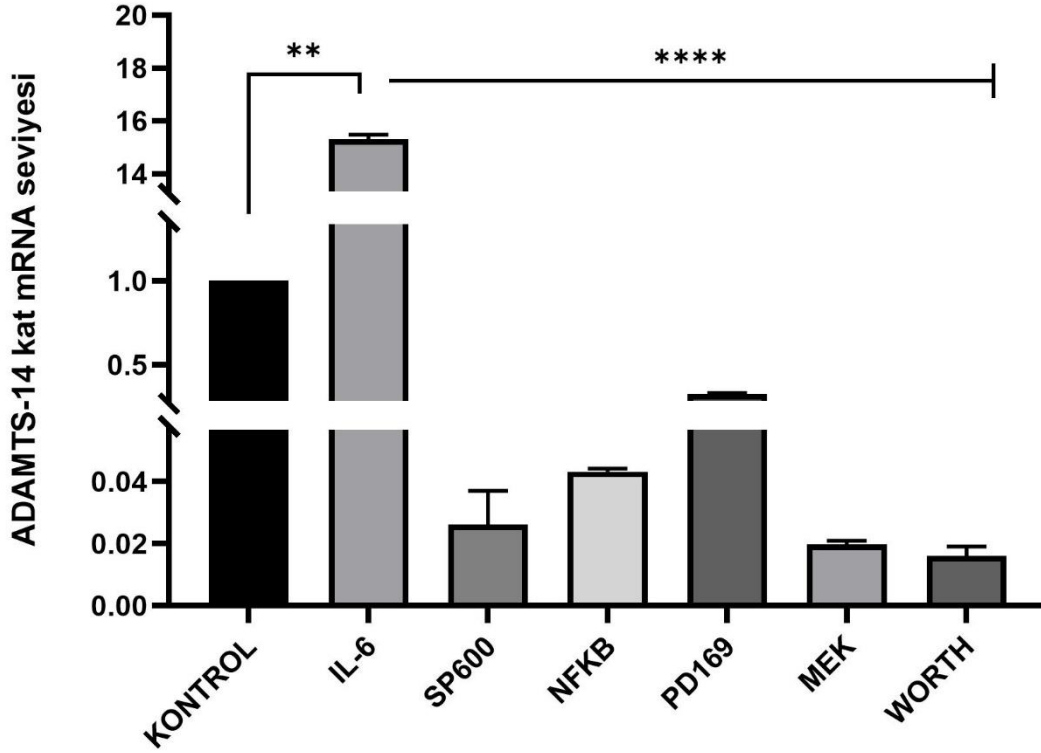


Şekil 4.13: IL-6'nın normoksik koşullarda ADAMTS-14 gen ekspresyonuna zaman bağımlı etkisi



Şekil 4.14: Hipoksik koşullarda IL-6 uygulamasının ADAMTS-14 gen ekspresyonuna etkisi

SW480 hücrelerinde IL-6 uygulamasının ADAMTS-14 gen ekspresyonuna etkisi hem normoksik hem de hipoksik koşullarda zaman serisi boyunca incelendiğinde iki ortam arasında belirgin bir yanıt farkı ortaya çıkmıştır. Normoksik kültürde IL-6'nın oluşturduğu transkripsiyonel yanıt oldukça sınırlı bir zaman aralığında yoğunlaşmış ve özellikle 6. saatte belirgin bir yükselme kaydedilmiştir. Buna karşılık hipoksik şartlarda IL-6'ya verilen yanıt daha süregelen ve kademeli bir artış göstermiş; 1. ve 3. saatlerde başlayan ekspresyon yükselişi zamanla güçlenerek 24. saatte en yüksek seviyesine ulaşmıştır. Bu bulgular, ADAMTS-14 geninin IL-6'ya verdiği yanıtın oksijen düzeyine duyarlı olduğunu ve hipoksinin IL-6 aracılı ekspresyon artışını belirgin şekilde güçlendirdiğini ortaya koymaktadır.



Şekil 4.15: IL-6 ile uyarılan ADAMTS-14 gen ekspresyonuna yolak inhibitörlerinin etkisi

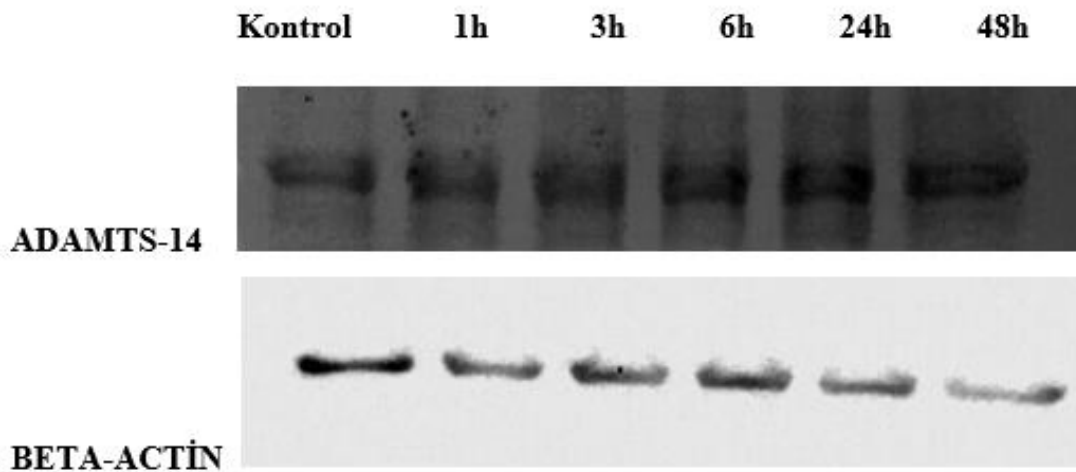
IL-6 uygulamasının SW480 hücrelerinde ADAMTS-14 geninin transkripsiyon düzeyini yükselttiği belirlenmiştir. Kontrolle karşılaştırıldığında IL-6'ya maruz bırakılan hücrelerde gen ifadesinde belirgin bir artış ortaya çıkmıştır. Buna karşın SP600125, Wortmannin, MEK ve NF- κ B inhibitörlerinin eklenmesi, IL-6'nın oluşturduğu bu artışı büyük ölçüde ortadan kaldırmış ve ADAMTS-14 ekspresyonunun neredeyse tamamen bastırılmasına yol açmıştır. PD169 inhibitörü ise diğer inhibitörler kadar güçlü bir baskılama sağlamamış olsa da IL-6 kaynaklı artışı anlamlı seviyede düşürmüştür. Bu bulgular, IL-6'nın ADAMTS-14 genini etkin biçimde aktive ettiğini, ancak bu aktivasyonun birden fazla sinyal yolunun iş birliğine ihtiyaç duyduğunu göstermektedir.

4.4 ADAMTS-14 Protein Ekspresyonunun Western Blotting Yöntemi Belirlenmesi

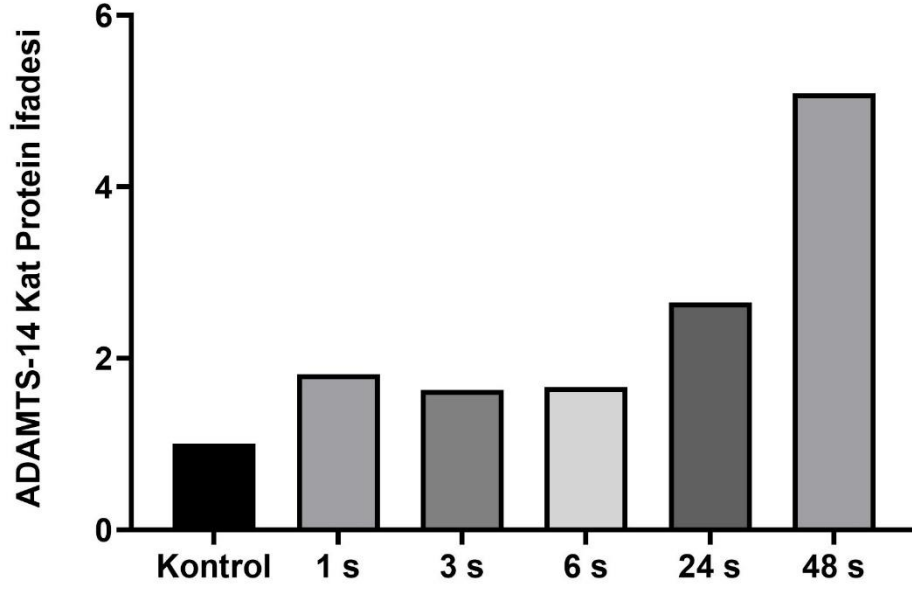
ADAMTS-14 proteininin IL-6 uyarısı ile verdiği yanıtın ve farklı hücre içi sinyal yolak inhibitörlerinin bu yanıt üzerindeki etkisinin belirlenmesi amacıyla Western blot analizleri yapılmıştır. Protein izolasyonundan bant yoğunluklarının ölçülmesine kadar tüm aşamalar, yöntemler bölümünde açıklanan 3.2.8.1–3.2.8.6 numaralı işlem basamaklarına dayanılarak uygulanmıştır.

İlk olarak, IL-6 zaman serisi ve inhibitör deney gruplarına ait SW480 hücrelerinden protein ekstraktlarının hazırlanması gerçekleştirilmiştir. 3.2.8.1’de belirtilen yaklaşım izlenerek hücreler uygun yoğunlukta kültüre edilmiş, inkübasyon süreleri tamamlandıktan sonra RIPA tamponu ile çözümlenmiş ve sonikasyon–santrifüj adımlarıyla proteinler ayrıştırılmıştır. Elde edilen ham ekstraktlarda toplam protein miktarı, 3.2.8.2’de anlatıldığı şekilde Bradford analizine tabi tutulmuş ve eşit protein yüklemesini sağlamak amacıyla tüm örneklerin konsantrasyonları bu sonuçlara göre ayarlanmıştır.

Proteinlerin jel ortamında ayrılması ve membrana aktarılması süreci, 3.2.8.3 ve 3.2.8.4’te tanımlanan SDS-PAGE ve PVDF transfer koşulları temel alınarak yürütülmüştür. Ayrıştırılmış proteinlerin membran üzerine düzenli biçimde geçmesinin ardından, membran yüzeyindeki istenmeyen bağlanmaları engellemek için bloklama uygulanmış ve daha sonra 3.2.8.5’te anlatıldığı gibi ADAMTS-14 ve β -aktin hedeflerine özgü primer antikorlarla inkübasyon yapılmıştır. Bunu sekonder antikor uygulaması ve kemilüminesans substratı ile görüntü alma adımları izlemiştir. Membrana yansıyan bantların yoğunlukları, 3.2.8.6’da açıklandığı şekilde ImageJ yazılımı kullanılarak ölçülmüştür. ADAMTS-14’e ait sinyaller, yükleme kontrolü olan β -aktin bantlarına normalize edilmiş ve gruplar arası karşılaştırma bu normalize değerler üzerinden yapılmıştır. Elde edilen veriler GraphPad Prism programına aktarılmış ve protein seviyelerindeki değişim görsel grafiklere dönüştürülerek değerlendirilmiştir.



Şekil 4.16: SW480 hücrelerinde IL-6 Sitokinin ADAMTS-14 protein bantları

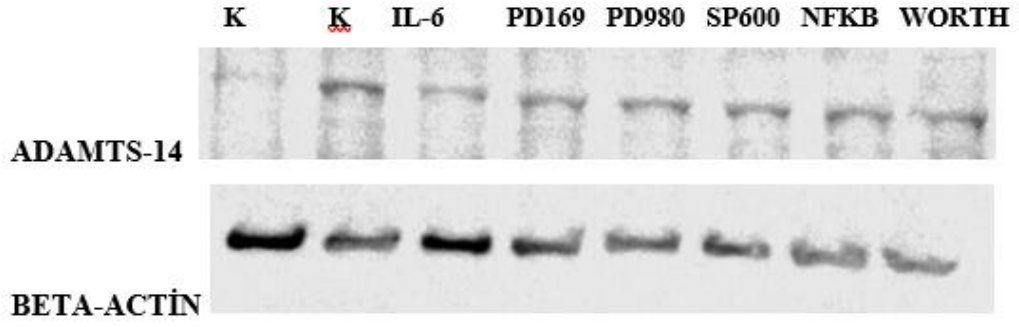


Şekil 4.17: IL-6 uygulanan SW480 hücre hattında ADAMTS-14 protein ifadesinin zaman bağımlı etkisi

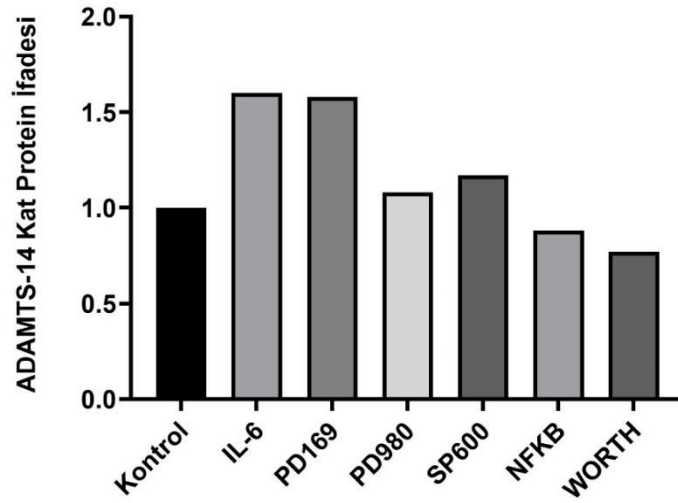
IL-6 uygulamasını takiben ADAMTS-14 protein düzeylerinde zamana bağlı bir artış eğilimi ortaya çıktığı belirlenmiştir. Ham blot görüntülerinde kontrol grubunda oldukça düşük yoğunluklu bir ADAMTS-14 bandı izlenirken, IL-6 ile muamele edilen hücrelerde zaman ilerledikçe bantların giderek koyulaştığı görülmüştür. Özellikle 1., 3. ve 6. saatlerde önceki basamaklara göre belirgin bir yoğunluk artışı kaydedilmiştir; 24. saatte bu artış daha da belirginleşmiş ve 48. saatte en yüksek seviyesine ulaşmıştır.

IL-6 uygulanan SW480 hücre hattında ADAMTS-14 protein ifadesinin zaman bağımlı etkisi Bant yoğunluklarının β -aktin referansına göre normalize edilmesiyle elde edilen nicel veriler, western blot görüntülerindeki bu görsel eğilimi sayısal olarak doğrulamaktadır. Normalize edildiğinde, ADAMTS-14 protein düzeyleri kontrol grubuna göre 1. saatte yaklaşık 1,7 kat, 3. ve 6. saatlerde benzer şekilde 1,6–1,7 katlık bir artış göstermiş; 24. saatte bu artış yaklaşık 2,6 kata, 48. saatte ise yaklaşık 5 kata ulaşmıştır.

IL-6'nın SW480 hücrelerinde ADAMTS-14 protein ekspresyonunu hem erken dönemde tetiklediği hem de zaman ilerledikçe bu etkinin güçlendiği anlaşılmaktadır. Sonuç olarak, IL-6'nın ADAMTS-14 üzerinde belirgin ve giderek artan bir zamana bağlı düzenleyici etki oluşturduğu Western blot analizleriyle desteklenmiştir.



Şekil 4.18: SW480 hücrelerinde IL-6 ve çeşitli inhibitör uygulamalarına ait ADAMTS-14 protein bantlarının Western blot analizi



Şekil 4.19: IL-6 ile uyarılan ADAMTS-14 protein ifadesine yolak inhibitörlerinin etkisi

Western blot analizlerinden elde edilen veriler, IL-6 uygulamasının SW480 hücrelerinde ADAMTS-14 protein seviyelerini belirgin ölçüde artırdığını ortaya koymaktadır. Kontrol örnekleriyle kıyaslandığında IL-6 verilen hücrelerde bant yoğunluğunun daha kuvvetli olduğu görülmüş; yoğunluk ölçümleri IL-6'nın ADAMTS-14 düzeyini yaklaşık 1,6 kat yükselttiğini göstermiştir. Bu sonuçlar, IL-6'nın ADAMTS-14 üretimini uyaran bir düzenleyici işlev üstlendiğini göstermektedir.

İnhibitör gruplarına ait değerlendirmeler, IL-6'nın bu etkisinin tek yönlü bir mekanizma ile açıklanamayacağını göstermektedir. PD169316 ve PD98059 kullanılan örneklerde ADAMTS-14 düzeyleri IL-6 grubuna göre bir miktar azalmış olsa da protein sinyalinin tamamen ortadan kalkmadığı gözlenmiştir; bu iki inhibitör daha orta düzeyde bir baskı

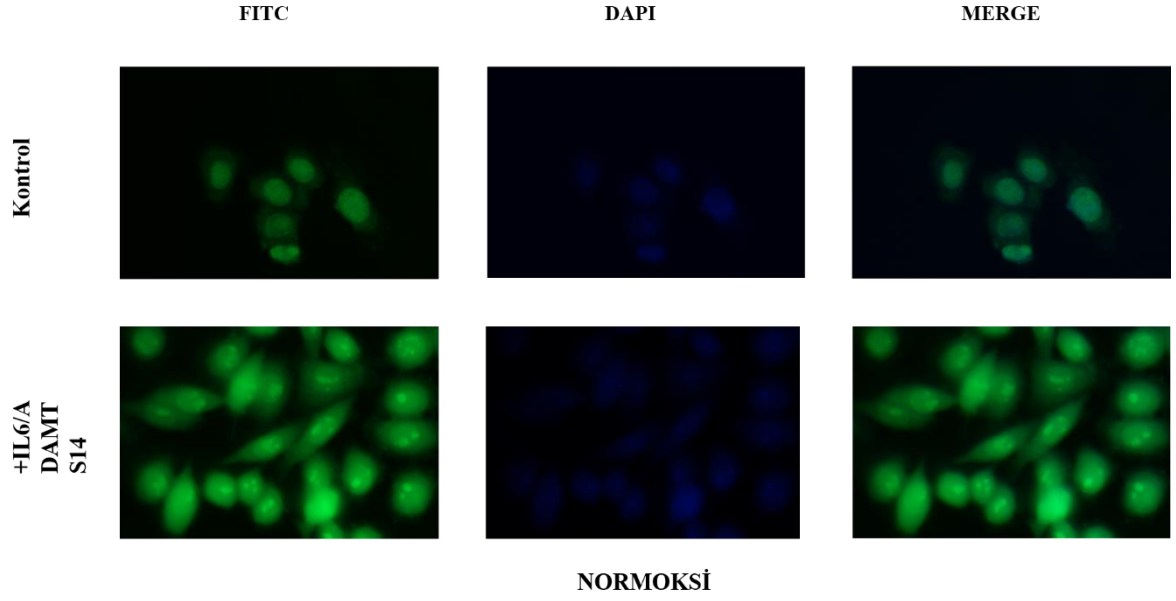
oluşturmuştur. Buna karşılık SP600125 ile NF-κB inhibitörü uygulanan gruplarda ADAMTS-14 bandının gözle görülür biçimde zayıfladığı tespit edilmiştir. En çarpıcı düşüş ise Wortmannin grubunda kaydedilmiş, bu inhibitör ADAMTS-14 düzeylerini tüm deney koşulları arasında en düşük seviyeye indirmiştir.

Bu veriler bir arada değerlendirildiğinde IL-6'nın ADAMTS-14 protein üretimini artırdığı açıkça görülmektedir; ancak bu artışın ortaya çıkışında MAPK, JNK, NF-κB ve PI3K/Akt gibi birden fazla sinyal ağının rol oynadığı anlaşılmaktadır. Dolayısıyla ADAMTS-14'ün IL-6'ya verdiği yanıt, tek bir yolun etkisiyle değil, hücre içindeki farklı sinyal mekanizmalarının birleşik etkisiyle şekillenmektedir.

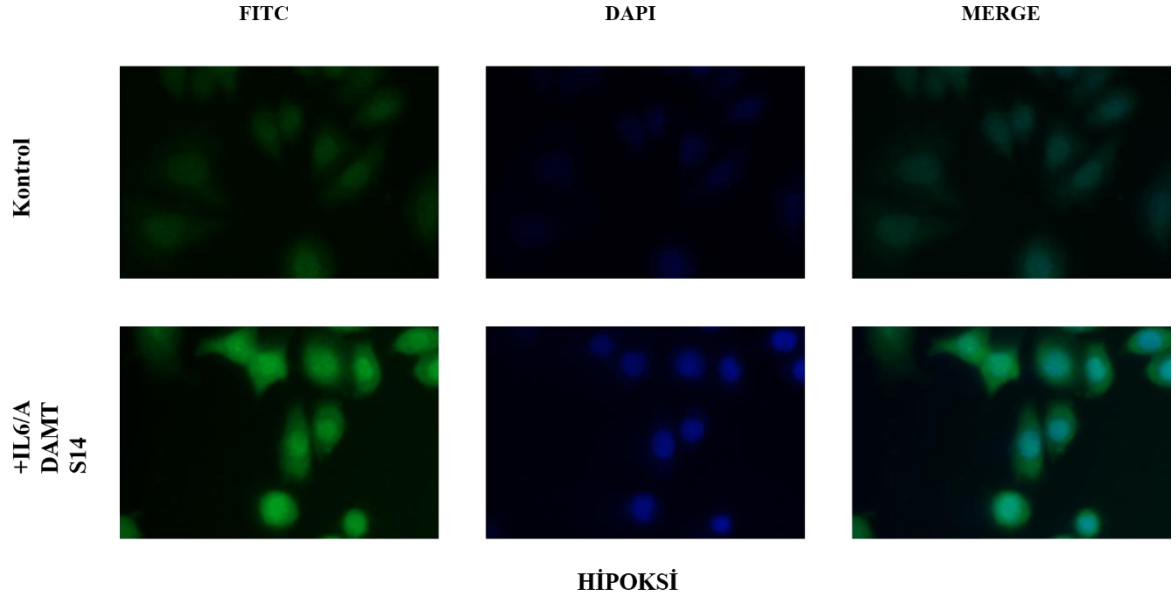
4.5 İmmunfloresan Metodu ile Protein Düzeyinde İfadenin Gösterilmesi

SW480 kolorektal kanser hücrelerinde pro-inflamatuar bir sitokin olan IL-6'nın (20 ng/mL) ve tümör mikroçevresini taklit eden hipoksik (%1 O₂) koşulların ADAMTS-14 proteininin ekspresyon düzeyleri ve hücre içi dağılımı üzerindeki etkileri, Bölüm 3.3.2'de anlatıldığı gibi uygulanan immünofloresan (IFC) boyama protokolü doğrultusunda değerlendirilmiştir. Bu kapsamda, çevresel uyaranlara maruz bırakılan hücrelerde ADAMTS-14 proteinine ait ekspresyon değişimleri ve hücre içi lokalizasyon paternleri hem görsel hem de kantitatif olarak incelenmiştir.

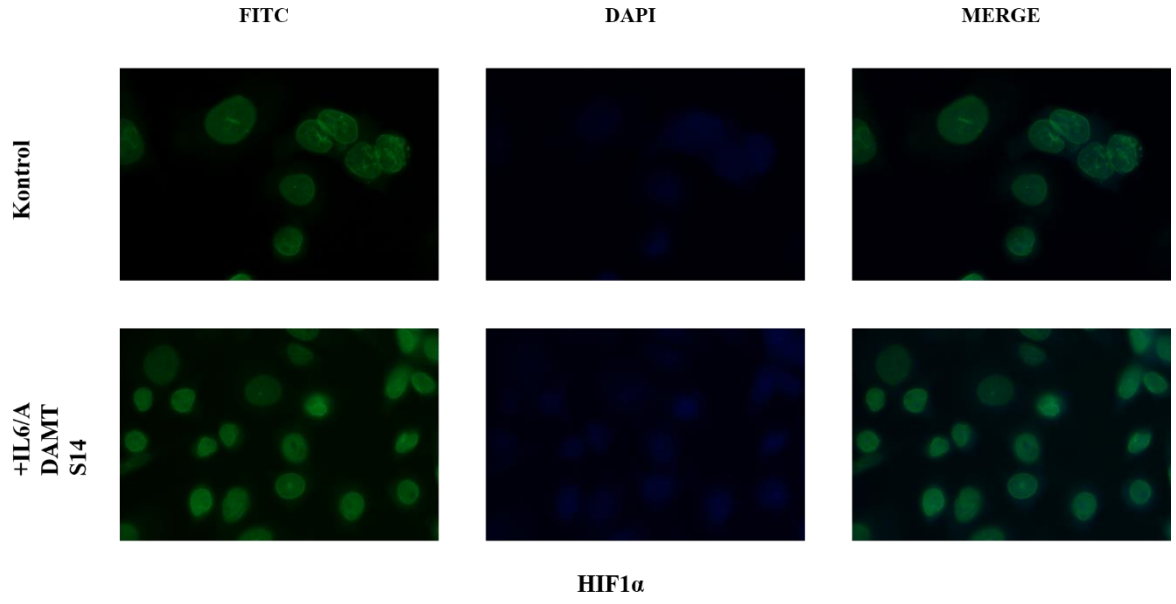
Steril lameller üzerinde kültüre edilen hücreler, belirlenen deneysel koşullar altında inkübe edildikten sonra hücre yapısının korunması amacıyla fikse edilmiş; hücre zarının geçirgenliğinin sağlanmasını ve özgül olmayan antikor bağlanmalarının azaltılmasını takiben ADAMTS-14 proteinine özgü primer antikorlar ile inkübasyona alınmıştır. Hedef proteinin floresan sinyaller aracılığıyla görüntülenebilmesi için floresan etiketli ikincil antikor uygulaması ışığa duyarlı koşullar gözetilerek gerçekleştirilmiş, protein lokalizasyonunun net olarak ayırt edilebilmesi amacıyla çekirdek karşıt boyaması yapılmıştır. Hazırlanan örneklerin floresan mikroskopu altında yapılan incelemelerinde, ADAMTS-14 proteinine ait floresan sinyallerin yoğunluğu ve hücre içerisindeki dağılımı çekirdek bölgeleri ile birlikte değerlendirilmiştir. Elde edilen görüntüler, Bölüm 3.3.2'de anlatıldığı şekilde ImageJ yazılımı kullanılarak CTCF (Corrected Total Cell Fluorescence) yöntemi ile analiz edilmiş ve bu kantitatif değerlendirmeler sonucunda IL-6 uyarımı ile hipoksik koşulların ADAMTS-14 protein düzeyleri ve hücre içi lokalizasyon özellikleri üzerinde kontrol grubuna kıyasla belirgin değişikliklere yol açtığı belirlenmiştir.



Şekil 4.20 : SW480 kolorektal kanser hücrelerinde normoksik koşullarda IL-6 uygulaması sonrası ADAMTS-14 protein ekspresyonunun immüno Floresan görüntüleri (100x)



Şekil 4.21: SW480 kolorektal kanser hücrelerinde hipoksik koşullarda IL-6 uygulaması sonrası ADAMTS-14 protein ekspresyonunun immüno Floresan görüntüleri (100x)



Şekil 4.22 : SW480 kolorektal kanser hücrelerinde HIF-1 α ile ilişkili koşullarda IL-6 uygulamasının ADAMTS-14 protein ekspresyonu üzerindeki etkisinin immünofloresan görüntüleri (100x)

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Ekstraselüler matriks, dokuların yalnızca yapısal bütünlüğünü sağlayan pasif bir iskelet değil, aynı zamanda hücresel davranışları yönlendiren aktif bir bileşen olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle matriksin yeniden düzenlenmesinde görev alan ADAMTS ailesi metalloproteazları, kanser biyolojisi açısından dikkat çeken moleküller arasında yer almaktadır (Przemyslaw et al.,2013; Altman et al.,2023). ADAMTS-14'ün kollajen fibrillerinin olgunlaşması ve organizasyonundaki rolü, bu proteinin doku yeniden yapılanması süreçlerine doğrudan katkı sunduğunu düşündürmektedir (Leduc et al.,2021).

Farklı kanser türlerinde yapılan çalışmalar, ADAMTS-14 ekspresyonunun tek tip bir örüntü sergilemediğini ortaya koymuştur. Bazı tümör modellerinde ADAMTS-14 düzeylerindeki azalmanın agresif fenotiplerle ilişkili olduğu bildirilirken, diğer bazı kanser türlerinde artmış ekspresyonun kötü klinik seyirle bağlantılı olduğu gösterilmiştir (Lin et al.,2020). Kolorektal kanser özelinde Wang ve arkadaşları, ADAMTS-14 geninin promotör bölgesinde metilasyon aracılı baskılanma bulunduğunu; buna rağmen tümörün invaziv bölgelerinde protein düzeylerinin yükseldiğini rapor etmiştir (Wang et al.,2022). Bu gözlem, ADAMTS-14'ün tümör içindeki rolünün sabit bir tanımla açıklanamayacağını ve çevresel sinyallere göre şekillendiğini düşündürmektedir.

Bu tez çalışmasında SW480 kolorektal kanser hücrelerinde elde edilen sonuçlar, ADAMTS-14'ün inflamatuvar uyarılara duyarlı bir gen olduğunu göstermektedir. IL-6 uygulaması sonrası hem promotör aktivitesinde hem de gen ve protein düzeylerinde belirgin artış saptanmıştır. IL-6'nın kanser hücrelerinde proliferasyon, hayatta kalma ve invazyon süreçlerini etkilediği bilinse de bu çalışmada elde edilen veriler sitokinin aynı zamanda ECM ile ilişkili genleri de düzenleyebildiğini ortaya koymaktadır (Lacina et al.2019). Promotör kısaltma analizleri, IL-6'ya verilen yanıtın promotör boyunca homojen dağılmadığını göstermiştir. Özellikle 470 bp uzunluğundaki promotör bölgesinde gözlenen güçlü aktivasyon, bu segmentin sitokin aracılı transkripsiyonel düzenleme açısından kritik diziler barındırabileceğini düşündürmektedir. Daha uzun promotör fragmanlarında yanıtın zayıflaması ise upstream bölgelerde baskılayıcı düzenleyici elemanların yer alabileceğine işaret etmektedir. Bu durum, ADAMTS ailesi genlerinin karmaşık ve çok katmanlı promotör yapılar sergilediğini bildiren önceki çalışmalarla örtüşmektedir.

IL-6 ile tetiklenen ADAMTS-14 artışında görev alan hücre içi yolların inhibitör deneyleriyle ayrıntılı biçimde incelenmiştir. MAPK, JNK, NF- κ B ve PI3K/Akt yollarının her birinin bu düzenlemeye katkı sağladığı görülmüştür. Özellikle PI3K/Akt yolunun inhibisyonu sonrası ADAMTS-14 düzeylerinde gözlenen belirgin düşüş, bu yolun baskın bir düzenleyici olabileceğini düşündürmektedir. Benzer biçimde NF- κ B yolunun baskılanmasıyla ekspresyonun ciddi ölçüde azalması, ADAMTS-14'ün inflamasyonla ilişkili transkripsiyonel mekanizmalarla bağlantısını desteklemektedir. Bu sonuçlar, ADAMTS ailesi üyelerinin NF- κ B ve Akt sinyal ağlarıyla ilişkili olabileceğini bildiren çalışmalarla uyum göstermektedir (Chen et al,2025).

Western blot analizleri, transkripsiyonel düzeyde elde edilen verilerin protein düzeyinde de karşılık bulunduğunu ortaya koymuştur. IL-6 uygulaması sonrasında ADAMTS-14 protein seviyelerinin zamanla artması, bu etkinin geçici bir transkripsiyon yanıtı ile sınırlı olmadığını, fonksiyonel protein üretimiyle sonuçlandığını göstermektedir. Bu bulgu, kolorektal kanser dokularında invaziv alanlarda artmış ADAMTS-14 protein düzeyi bildiren önceki çalışmalarla paralellik göstermektedir.

Bu tez kapsamında elde edilen veriler, ADAMTS-14'ün kolorektal kanserde inflamatuvar mikro çevreye duyarlı, birden fazla sinyal yolunun kesişim noktasında yer alan dinamik bir düzenleyici olduğunu ortaya koymaktadır. Literatürde bildirilen farklı ekspresyon profilleri, bu çalışma ile birlikte değerlendirildiğinde, ADAMTS-14'ün kanserdeki rolünün hücrel bağlam ve çevresel koşullara göre değişebileceği daha net anlaşılmaktadır.

Sonuç olarak, bu çalışma ADAMTS-14'ün IL-6 aracılı inflamatuvar sinyal ağlarının bir çıktısı olduğunu ve kolorektal kanserde ekstraselüler matriks düzenlenmesine katkı sağlayabilecek bir molekül olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir. Bu bulgular, ADAMTS-14'ün gelecekte prognostik bir belirteç ya da hedefe yönelik tedavi stratejileri açısından araştırılmaya değer bir aday olduğunu düşündürmektedir. Bununla birlikte, mekanizmanın in vivo modeller ve klinik örnekler üzerinden doğrulanması, bu proteinin kanser biyolojisindeki yerinin daha net biçimde tanımlanabilmesi açısından gereklidir.

6. KAYNAKLAR

Alexander, W. S. (2002). *Suppressors of cytokine signalling (SOCS) in the immune system. Nature Reviews Immunology*, 2(6), 410–416. <https://doi.org/10.1038/nri818>

Altmann, N., Bowlby, C., Coughlin, H., Belacic, Z., Sullivan, S., & Durgam, S. (2023). *Interleukin-6 upregulates extracellular matrix gene expression and transforming growth factor β 1 activity of tendon progenitor cells. BMC Musculoskeletal Disorders*, 24(1), 907. <https://doi.org/10.1186/s12891-023-07047-9>

Arnold, M., Sierra, M. S., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2017). *Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. Gut*, 66(4), 683–691. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-310912>

Bonati, L., & Tang, L. (2021). *Cytokine engineering for targeted cancer immunotherapy. Current Opinion in Chemical Biology*, 62, 43–52. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2021.01.007>

Borowczak, J., Szczerbowski, K., Maniewski, M., Kowalewski, A., Janiczek-Polewska, M., Szyłberg, A., Marszałek, A., & Szyłberg, Ł. (2022). *The role of inflammatory cytokines in the pathogenesis of colorectal carcinoma—Recent findings and review. Biomedicines*, 10(7), 1670. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10071670>

Chen, L., Tang, J., Feng, Y., Li, S., Xiang, Q., He, X., Ren, G., Peng, W., & Xiang, T. (2017). *ADAMTS9 is silenced by epigenetic disruption in colorectal cancer and inhibits cell growth and metastasis by regulating Akt/p53 signaling. Cellular Physiology and Biochemistry*, 44(4), 1370–1380. <https://doi.org/10.1159/000485534>

Chen, S., He, J., Gao, H., Gao, X., Dai, L., Chen, J., & Sha, Z. (2025). *ADAMTS7 enhances gastric cancer growth and metastasis by triggering the NF- κ B signaling pathway. Journal of Cancer*, 16(3), 1008–1019. <https://doi.org/10.7150/jca.103093>

Chen, Y., Ji, H., Liu, S., Xing, Q., Zhu, B., & Wang, Y. (2022). *Survival prognosis, tumor immune landscape, and immune responses of ADAMTS14 in clear cell renal cell carcinoma and its potential mechanisms. Frontiers in Immunology*, 13, 790608. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.790608>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Fischer, P., Hilfiker-Kleiner, D., Seeland, U., Wietelmann, A., Endo, J., & Schaper, F. (2004). *A critical role for gp130 Tyr-759 in balancing STAT3 and ERK1/2 activation.* *Journal of Biological Chemistry*, 279(39), 40736–40748.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M405720200>

Gao, R., Hu, Y., & Yuan, Q. (2024). *ADAMTS12 serves as a novel prognostic biomarker and promotes proliferation and invasion in gastric cancer.* *Discover Oncology*, 15(1), 837.

<https://doi.org/10.1007/s12672-024-01724-4>

Garbers, C., Rose-John, S., & Scheller, J. (2018). *Interleukin-6 trans-signaling via soluble gp130: A novel therapeutic target.* *Frontiers in Immunology*, 9, 1228.

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01228>

Garcia-Etxebarria, K., Clos-Garcia, M., Telleria, O., Nafria, B., Alonso, C., Iruarrizaga-Lejarreta, M., Franke, A., Crespo, A., Iglesias, A., Cubiella, J., Bujanda, L., & Falcón-Pérez, J. M. (2021). *Interplay between Genome, Metabolome and Microbiome in Colorectal Cancer.* *Cancers*, 13(24), 6216.

<https://doi.org/10.3390/cancers13246216>

Giovannucci, E., & Willett, W. C. (1994). *Dietary factors and risk of colon cancer.* *Annals of Medicine*, 26(6), 443–452. <https://doi.org/10.3109/07853899409148367>

Goodarzi, E., Beiranvand, R., Naemi, H., Momenabadi, V., & Khazaei, Z. (2019). *Worldwide incidence and mortality of colorectal cancer and human development index (HDI): An ecological study.* *World Cancer Research Journal*, 6, 8.

Grivennikov, S. I., & Karin, M. (2010). *Dangerous liaisons: STAT3 and NF-κB collaboration in inflammation and cancer.* *Journal of Clinical Investigation*, 120(5), 1390–1398. <https://doi.org/10.1172/JCI41702>

Heinrich, P. C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H. M., Müller-Newen, G., & Schaper, F. (2003). *Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation.* *Biochemical Journal*, 374(1), 1–20. <https://doi.org/10.1042/BJ20030407>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hossain, M. S., Karuniawati, H., Jairoun, A. A., Urbi, Z., Ooi, J., John, A., Lim, Y. C., Kibria, K. M. K., Mohiuddin, A. K. M., Ming, L. C., Goh, K. W., & Hadi, M. A. (2022). *Colorectal cancer: A review of carcinogenesis, global epidemiology, current challenges, risk factors, preventive and treatment strategies*. *Cancers*, 14(7), 1732. <https://doi.org/10.3390/cancers14071732>
- Issa, J. P. J. (2004). *CpG island methylator phenotype in cancer*. *Nature Reviews Cancer*, 4(12), 988–993. <https://doi.org/10.1038/nrc1507>
- Jones, G. C., & Riley, G. P. (2005). *ADAMTS proteinases: A multi-domain, multi-functional family with roles in extracellular matrix turnover and arthritis*. *Arthritis Research & Therapy*, 7(4), 160–169. <https://doi.org/10.1186/ar1783>
- Kany, S., Vollrath, J. T., & Relja, B. (2019). *Cytokines in inflammatory disease*. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(23), 6008. <https://doi.org/10.3390/ijms20236008>
- Kelwick, R., Desanlis, I., Wheeler, G. N., & Edwards, D. R. (2015). *The ADAMTS (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs) family*. *Genome Biology*, 16(1), 113. <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0676-3>
- Kumar, S., Rao, N., & Ge, R. (2012). *Emerging roles of ADAMTSs in angiogenesis and cancer*. *Cancers*, 4(4), 1252–1299. <https://doi.org/10.3390/cancers4041252>
- Lacina, L., Brábek, J., Král, V., Kodet, O., & Smetana, K., Jr. (2019). *Interleukin-6: A molecule with complex biological impact in cancer*. <https://doi.org/10.14670/HH-18-033>
- Lauby-Secretan, B., Scoccianti, C., Loomis, D., Grosse, Y., Bianchini, F., & Straif, K. (2016). *Body fatness and cancer—Viewpoint of the IARC Working Group*. *New England Journal of Medicine*, 375(8), 794–798. <https://doi.org/10.1056/NEJMs1606602>
- Leduc, C., Dupont, L., Joannes, L., Monseur, C., Baiwir, D., Mazzucchelli, G., Deroanne, C., Colige, A., & Bekhouche, M. (2021). *In vivo N-terminomics highlights novel functions of ADAMTS2 and ADAMTS14 in skin collagen matrix building*. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8, 643178. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.643178>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Lengauer, C., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1998). *Genetic instabilities in human cancers*. *Nature*, 396(6712), 643–649. <https://doi.org/10.1038/25292>

Leslie, H., & Chan, A. T. (2020). *Smoking-related risks of colorectal cancer by anatomical subsite and sex*. *American Journal of Epidemiology*, 189(6), 613–622. <https://doi.org/10.1093/aje/kwaa005>

Lin, Y.-M., Lin, C.-W., Lu, J.-W., Yeh, K.-T., Lin, S.-H., & Yang, S.-F. (2020). *Decreased cytoplasmic expression of ADAMTS14 is correlated with reduced survival rates in oral squamous cell carcinoma patients*. *Diagnostics*, 10(2), 122. <https://doi.org/10.3390/diagnostics10020122>

National Center for Biotechnology Information. (2024). *ADAMTS14 gene, chromosome 10 (NC_000010.11)*. NCBI Gene. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Przemyslaw, L., Boguslaw, H. A., Elzbieta, S., & Malgorzata, S. M. (2013). *ADAM and ADAMTS family proteins and their role in the colorectal cancer etiopathogenesis*. *BMB Reports*, 46(3), 139–150. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2013.46.3.176>

Wang, Y., Zhou, J., Zhang, J., Cao, H., Han, F., Zhang, H., & Xu, E. (2022). *The expression of ADAMTS14 is regulated by promoter DNA methylation and is associated with poor prognosis in colorectal cancer*. *Experimental Cell Research*, 410(1), 112953. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2021.112953>

Yasukawa, H., Sasaki, A., & Yoshimura, A. (2003). *Negative regulation of cytokine signaling pathways*. *Annual Review of Immunology*, 21, 197–231. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.21.120601.141138>

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Rümeysa Nur VAPUR ÖNDÜL

Doğum tarihi : 03.10.2000

Öğrenim Bilgileri

Derece	Okul/Program	Yıl
Y. Lisans	Balıkesir Üniversitesi/ Moleküler Biyoloji ve Genetik	2026
Lisans	Balıkesir Üniversitesi/ Moleküler Biyoloji ve Genetik	2022
Lise	Yahya Kemal Beyatlı Anadolu Lisesi	2018