

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



**KOLON KANSERİ HÜCRE HATTINDA NORMOKSİ VE HİPOKSİ
KOŞULLARINDA TGF- β SİTOKİNİNİN ADAMTS-5 GEN
İFADESİNE OLAN ETKİSİNİN BELİRLENMESİ**

HATİCE ERDOĞAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Jüri Üyeleri : Dr.Öğr.Üyesi Sümeyye AYDOĞAN TÜRKÖĞLU (Tez Danışmanı)

Doç. Dr. Hatice YILDIRIM

Dr.Öğr.Üyesi Görkem DENİZ SÖNMEZ

BALIKESİR, ŞUBAT - 2021

ETİK BEYAN

Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak tarafımda hazırlanan “**Kolon Kanseri Hücre Hattında Normoksi ve Hipoksi Koşullarında TGF- β Sitokininin ADAMTS-5 Gen İfadesine Olan 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.

Hatice ERDOĞAN

(İmza)



**Bu tez çalışması Balıkesir Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
(2019 -26) nolu proje ile desteklenmiştir.**

ÖZET

**KOLON KANSERİ HÜCRE HATTINDA NORMOKSİ VE HİPOKSİ
KOŞULLARINDA TGF-BETA SİTOKİNİN ADAMTS-5 GEN İFADESİNE OLAN
ETKİSİNİN BELİRLENMESİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
HATİCE ERDOĞAN
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
(TEZ DANIŞMANI: DR. ÖĞR. ÜY. SÜMEYYE AYDOĞAN TÜRKÖĞLU)**

BALIKESİR, ŞUBAT - 2021

Kolorektal kanser (CRC), farklı genetik ve epigenetik değişikliklere sahip heterojen bir hastalıktır. CRC gelişimi, ilerlemesi ve nüksüne yol açan mekanizmalar karmaşıktır. Kolon kanseri ile ilişkili sinyal iletim yollarının moleküler mekanizmasının aydınlatılması ve tedavi edici ajanların geliştirilmesi hedeflenmektedir. TGF- β ailesi, tümör gelişimini kontrol eden büyük bir hücre dışı büyüme faktörü grubudur. Kolon karsinomunun farklı evrelerinde anormal TGF- β ekspresyonu gözlenmektedir. TGF- β sinyal yolu yeni tedaviler için ilginç bir hedef haline gelmiştir, bu nedenle TGF- β 'dan etkilenen genlerin tespiti ve bu genlerin ayrıntılı analizi çok önemlidir. ADAMTS (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs) genleri matriks bozulması, kan pıhtılaşması ve anjiyogenez dahil olmak üzere çeşitli fonksiyonlara aracılık eden hücre dışı metalloproteinaz ailesidir. Çalışmamızda kolon kanserinde TGF- β sitokininin ve hipoksinin ADAMTS-5 gen ifadesi üzerindeki etkisi hem normal hem de hipoksik koşullarda araştırılmıştır. Çalışmamızda hipoksik ortamın oluşturulmasında CoCl₂ ile indüklenmiş kimyasal hipoksik model tercih edilmiştir. Öncelikle kolon kanseri hücre hattı (HT-29) hücreleri %10 Fetal Buzağı Serum ve 2 mM L-Glutamin eklenmiş DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) içinde kültürlenmiştir. Hücreler %5 CO₂ içeren nemlendirilmiş bir inkübatörde 37°C'de kültürlenmiştir. Hücre canlılığı, tripan mavi boyaması ile belirlenmiştir. Çalışmamızda öncelikle hipoksik durumun ve sitokin muamelesinin hücreler üzerindeki etkisi MTT testi ile belirlenmiştir. Daha sonra TGF- β ve hipoksinin hem ayrı ayrı hem de birlikte ADAMTS-5 mRNA seviyesine etkisi Real Time PZR ile belirlenmiştir. 24 saatte 500U TGF- β uygulanan hücrelerde ADAMTS-5 mRNA ifadesinin baskılandığı tespit edilmiştir. Ayrıca etkinin protein seviyesinde tespiti için western blot çalışmaları yapılmıştır. 72 saat hipoksizde ise TGF- β uygulanan hücrelerde ADAMTS-5'in protein seviyesinde artış tespit edilmiştir.

ANAHTAR KELİMELELER: ADAMTS-5, kolon kanseri, TGF- β , real time PZR.

Bilim Kod / Kodları : 20606, 20610

Sayfa Sayısı : 57

ABSTRACT

DETERMINATION OF THE EFFECT OF TGF-BETA CYTOKINE ON ADAMTS-5 GENE EXPRESSION IN COLON CANCER CELL LINE UNDER NORMOXIC AND HYPOXIC CONDITIONS

MSC THESIS

HATİCE ERDOĞAN

BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

(SUPERVISOR: ASSIST. PROF. DR. SÜMEYYE AYDOĞAN TÜRKÖĞLU)

BALIKESİR, FEBRUARY - 2021

Colorectal cancer (CRC) is a heterogeneous disease with distinct genetic and epigenetic alterations. The mechanisms leading to CRC development, progression and recurrence are complex. The main focus of colon cancer research has been the elucidation of the molecular mechanism of signal transduction pathways and the development of therapeutic drugs for these key molecules. The TGF- β family constitutes a large group of extracellular growth factors that control tumor development. Abnormal TGF- β expression was observed in colon carcinoma. The TGF- β pathway has become an interesting target for novel therapies, and detailed analysis of TGF- β affected genes are very important. ADAMTS (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs) genes are an extracellular family of metalloproteinases that mediate various functions, including matrix disruption, blood clotting, and angiogenesis. In our study, the effect of TGF- β cytokine and hypoxia on ADAMTS-5 gene expression in colon cancer was investigated. HT-29 cells were cultured in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) supplemented with 10 % heat inactivated FCS (Fetal Calf Serum) and 2 mM L-glutamin. The cultures were maintained at 37°C in a humidified incubator containing 5% (v/v) CO₂ in air. Firstly, the effect of hypoxia and cytokine treatment on cells was determined by the MTT test. ADAMTS-5 mRNA level was determined by Real Time PZR in both normoxic and hypoxic cytokine treated groups. 500U TGF- β decreased the ADAMTS-5 mRNA level in normoxia. We analyzed the protein expression level of ADAMTS-5 by western blot. We found that ADAMTS-5 protein level was increased by TGF- β in hypoxia at 72h.

KEYWORDS: ADAMTS-5, colon cancer, TGF- β , real time PZR.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ	v
TABLO LİSTESİ	vi
SEMBOL LİSTESİ	vii
ÖNSÖZ	viii
1. GİRİŞ	1
1.1 Kanser.....	1
1.1.1 Kolorektal Kanser.....	1
1.1.1.1 Hipoksi ve Kolorektal Kanser.....	1
1.2 ADAMTS Ailesi.....	2
1.2.1 ADAMTS Ailesinin Özellikleri.....	3
1.2.2 ADAMTS Ailesi ve Anjiyogenez.....	5
1.2.3 ADAMTS-5 Genel Özellikleri.....	6
1.2.3.1 ADAMTS-5 Regülasyonu.....	7
1.3 Sitokinler.....	12
1.3.1 Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta (TGF- β) Ailesi.....	13
2. TEZİN AMACI	14
3. MATERYAL VE METOT	16
3.1 Materyal.....	16
3.1.1 Çalışmalarda Kullanılan Kimyasallar.....	16
3.1.2 Çalışmalarda Kullanılan Araç ve Gereçler.....	18
3.2 Metot.....	19
3.2.1 Deney Ortamının ve Deneylerde Kullanılan Maddelerin Sterilizasyonu.....	19
3.2.2 Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılan Metotlar.....	19
3.2.2.1 Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılan Malzemeler.....	19
3.2.2.2 Hücre Hattının Büyütülmesi.....	20
3.2.2.3 Hücre Hattının Pasajlanması.....	20
3.2.2.4 Hücrelerin Dondurulması.....	20
3.2.2.5 Canlı Hücrelerin Sayılması.....	21
3.2.3 MTT.....	22
3.2.4 RNA Çalışmalarında Kullanılan Metotlar.....	22
3.2.4.1 Sitokin Uygulama ve Hipoksi Deneyinin Kurulması.....	22
3.2.4.2 RNA İzolasyonu.....	22
3.2.4.3 RNA Miktarlarının Ölçülmesi.....	22
3.2.4.4 RNA Jel Elektroforezi.....	23
3.2.4.5 cDNA Sentezi.....	23
3.2.4.6 Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	24
3.2.4.7 Agaroz Jel Elektroforezi.....	25
3.2.4.8 Real Time PZR.....	25
3.2.5 Protein Çalışmalarında Kullanılan Metotlar.....	27
3.2.5.1 Ripa Buffer İle Pelletlerin Eldesi.....	27

3.2.5.2	Bradford Yöntemi İle Protein Miktar Tayini.....	27
3.2.5.3	Western Blot Tekniğinde Kullanılmış Olan Solüsyonlar	28
3.2.5.4	SDS Page Jel Elektroföresi	28
3.2.5.5	Protein Örneklerinin Membrana Transferi.....	29
3.2.5.6	Protein Örneklerinin Tespit Edilmesi ve Görüntülenmesi	30
4.	BULGULAR.....	31
4.1	ADAMTS-5 Geninin Biyoinformatik Analizi ve Primer Dizaynı	31
4.2	MTT Analizi	38
4.3	mRNA Seviyesi İle İlgili Çalışmalar	40
4.3.1	Kimyasal Hipoksinin Doğrulanması	40
4.3.2	TGF- β ve Hipoksinin HT-29 Hücre Hattında ADAMTS-5 mRNA Seviyesine Etkisi	40
4.4	ADAMTS-5 Protein Seviyesinin Belirlenmesi	42
5.	SONUÇ VE TARTIŞMA	45
6.	KAYNAKLAR.....	48
EKLER	55
ÖZGEÇMİŞ	57

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: ADAMTS proteinlerinin domain yapıları.	3
Şekil 1.2: ADAMTS metaloproteazalarının aracılık ettiği antitümör etkilerin şematik gösterimi.....	5
Şekil 1.3: ADAMTS-5 motifi	6
Şekil 2.1: Tez çalışma basamağını özetleyen akış diyagramı.	15
Şekil 3.1: Hemisitometre	21
Şekil 4.1: İnsan ADAMTS-5 geni NCBI dizisinden belirlenen primer bölgeleri (exon1: sarı, exon2: açık yeşil, exon3: turkuaz, exon4: kırmızı, exon5: pembe, exon6: gri, exon7: yeşil, exon8: deniz mavisi)	31
Şekil 4.2: ADAMTS-5 forward primer 25 baz uzunluğunda %40 GC içeriğine ve 64.1°C Tm sıcaklığına sahiptir.	34
Şekil 4.3: ADAMTS-5 forward primeri hairpin yapıları.	35
Şekil 4.4: ADAMTS-5 reverse primer 21 baz uzunluğunda %47.6 GC içeriğine ve 63.2°C Tm sıcaklığına sahiptir.	35
Şekil 4.5: ADAMTS-5 reverse primeri hairpin yapıları.....	36
Şekil 4.6: HT-29 RNA jel görüntüsü. (1: 72 saat TGF- β + CoCl ₂ , 2: 72 saat CoCl ₂ , 3: 72 saat TGF- β , 4: 72 saat Kontrol, 5: 48 saat TGF- β + CoCl ₂ , 6: 48 saat CoCl ₂ , 7: 72 saat TGF- β , 8: 48 saat Kontrol, 9: 24 saat TGF- β + CoCl ₂ , 10: 24 saat CoCl ₂ , 11: 24 saat TGF- β , 12: 24 saat Kontrol, 13: Marker.)	37
Şekil 4.7: ADAMTS-5 spesifik primerler ile optimizasyon çalışması agaroz jel elektroforez görüntüsü. (1: 1 kb Marker, 2: ADAMTS-5 pozitif kontrol 1 mM, 3: ADAMTS-5 pozitif kontrol 2 mM, 4: ADAMTS-5 negatif kontrol.)	37
Şekil 4.8: HT-29 cDNA'larının H β ₂ jel görüntüsü. (1: 24 saat Kontrol, 2: 24 saat TGF- β , 3: 24 saat CoCl ₂ , 4: 24 saat TGF- β + CoCl ₂ , 5: 48 saat Kontrol, 6: 48 saat TGF- β , 7: 48 saat CoCl ₂ , 8: 48 saat TGF- β + CoCl ₂ , 9: 72 saat CoCl ₂ , 10: 72 saat TGF- β + CoCl ₂ , 11: H β ₂ negatif kontrol, 12: 1 kb Marker.).....	37
Şekil 4.9: HT-29 hücre hattında BSA'lı medyumda TGF- β 'nın normal koşullarda hücreler üzerindeki etkisi(MTT testi).	38
Şekil 4.10: HT-29 hücre hattında BSA'lı medyumda TGF- β 'nın hipoksik koşullarda hücreler üzerindeki etkisi(MTT testi).....	39
Şekil 4.11: HT-29 hücre hattında CoCl ₂ ve TGF- β 'nın sitotoksik etkisinin BSA'lı medyumda MTT testi ile belirlenmesi.	39
Şekil 4.12: HT-29 hücre hattında normal koşullarda TGF- β 'nın ADAMTS-5 mRNA seviyesine etkisi-Real Time PZR.	41
Şekil 4.13: HT-29 hücre hattında hipoksik koşullarda TGF- β 'nın ADAMTS-5 mRNA seviyesine etkisi-Real Time PZR.	42
Şekil 4.14: HT-29 hücre hattında ADAMTS-5 protein seviyesinin 48 saatte belirlenmesi.43	
Şekil 4.15: HT-29 hücre hattında ADAMTS-5 protein seviyesinin 72 saatte belirlenmesi.44	
Şekil A.1: Fermentas 1 kb DNA büyüklük belirteci.	55
Şekil A.2: PageRuler Prestained Protein büyüklük belirteci.	56

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan kimyasallar.	16
Tablo 3.2: Laboratuvarda kullanılan cihazlar ve markaları	18
Tablo 3.3: RNA jeli	23
Tablo 3.4: cDNA sentezi 1. basamak	23
Tablo 3.5: cDNA sentezi 2. basamak	24
Tablo 3.6: Polimeraz zincir bileşenleri ve miktarı.	24
Tablo 3.7: Çalışmada kullanılan İnsan- β -2 Mikroglobulin ($H\beta_2$) primerleri ile kurulan PZR.	25
Tablo 3.8: Çalışmada kullanılan ADAMTS-5 ekspresyon primerleri ile kurulan PZR.	25
Tablo 3.9: qRT-PZR bileşenleri.	26
Tablo 3.10: qRT-PZR koşulları	26
Tablo 3.11: Çalışmada kullanılan ekspresyon primerleri.	26
Tablo 3.12: Western Blot stok solüsyonları.	28
Tablo 3.13: SDS Page ayırma ve yığıma jelleri bileşenleri.	29
Tablo 4.1: Primer dizaynı için kullanılan diziyeye ait ekzonlar ve karşılık geldikleri baz aralıkları.	34

SEMBOL LİSTESİ

ATP	: Adenozin trifosfat
CoCl₂	: Kobalt klorür
CRC	: Kolorektal Kanser
DEPC	: Dietil Pirokarbonat
dH₂O	: Distile su
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagles Medium
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
dNTP	: Deoksiribonükleotit trifosfat
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
EtBr	: Etidyum bromür
FCS	: Fetal sığır serum
HIF-1	: Hipoksi ile indüklenen faktör 1
Hβ2	: İnsan- β -2 Mikroglobulin
MgCl₂	: Magnezyum Klorür
PAGE	: Poliakrilamid Jel Elektroforezi
PBS	: Fosfat buffer salin
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
TBE	: Tris Borik Asit EDTA
TE	: Tripsin EDTA
TGF-β	: Transforme edici büyüme faktörü β

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitim sürecimin deneysel aşamaları Balıkesir Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Araştırma Laboratuvarlarında, Balıkesir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi öğretim üyesi ve tez danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Sümeyye AYDOĞAN TÜRKOĞLU yönetiminde gerçekleştirilmiştir.

Tez çalışmamın her basamağında bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren, sonsuz sabır ve sevgisiyle her zaman yanımda hissettiğim canım hocam Dr. Öğr. Üyesi Sümeyye AYDOĞAN TÜRKOĞLU'na,

Tez çalışmalarım boyunca engin bilgi ve tecrübesiyle desteğini esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Feray KÖÇKAR'a ve bölümümüzün değerli tüm hocalarıma,

Laboratuvar çalışmaları ve makale toplantılarında bilgi ve tecrübelerini paylaşarak her zaman yanımda olan, sevgi ve içtenlikleriyle keyifli zamanlar geçirdiğim değerli hocalarım Doç. Dr. Hatice YILDIRIM, canım hocam Dr. Öğr. Üyesi Derya OKUYAN BABACAN, Dr. Esra TOKAY, Araş. Gör. Dr. Nelin HACIOĞLU'na,

Zorlu laboratuvar günlerinde sevgi ve desteklerini her zaman üzerimde hissettiğim değerli hocam Fatma POYRAZLI, canım arkadaşım Merve ERCEVAHİR'e ve laboratuvarında çalıştığım ve birlikte vakit geçirdiğim hocam Burcu EFE, canım arkadaşım Tunzale YILMAZ ve tüm diğer grup arkadaşlarıma,

Bu zorlu süreçte bana inanan, güvenen ve her zaman destek olan sevgili annem Ümmü ERDOĞAN ve canım babam Muhsin ERDOĞAN'a hem maddi hem manevi olarak her zaman arkamda duram canım abim Uğur ERDOĞAN'a, çocukluğumdan beri üzerimden emeklerini ve sevgilerini eksik etmeyen canım ablalarım Ayşe Gül ve Lale ERDOĞAN'a ve tüm yakınlarıma,

Ve vefatından önce bana gönderdiği mektupta benim bilim insanı olmamı isteyip, bunun gerçekleşmesini dileyen sevgili ilkokul öğretmenim Mehmet DİNÇER'i rahmetle anıyor

Teşekkürlerimi sunuyorum.

Balıkesir, 2021

HATİCE ERDOĞAN

1. GİRİŞ

1.1 Kanser

Kanser, hücrelerin kontrolsüzce çoğalmasıyla oluşan bir hastalıktır [1]. Bu hastalık dünya çapında önemli bir ölüm nedenidir [2]. Kanserin metastaz yapması kanser ölümlerinin başlıca nedenidir [3]. Metastaz, kanser hücrelerinin primer tümörden çevre dokulara ve uzak organlara yayılmasını tanımlamak için kullanılan genel bir terimdir [4]. Metastatik yayılma kanserlerin, kötü huylu karakterlerinin gerçek nedenini temsil eder [5].

1.1.1 Kolorektal Kanser

Kolon kanseri insanlarda en sık görülen, kolon ve rektumda ortaya çıkan bir malign tümördür ve tümör metastazı mortalitenin başlıca nedenidir [6], [7]. Her yıl 1 milyondan fazla hastaya kolorektal kanser (CRC) teşhisi konulmakta ve hastaların 600.000'den fazlası ölmektedir [8]. Bu kanser gelişmiş ülkelerde, gelişmekte olan ülkelere daha yaygındır [9]. Kolon kanseri, tümör baskılayıcı genlerin etkisiz hale getirilmesi ve onkojenik genlerin mutasyonlar yoluyla aktivasyonu, adenomatöz poliplerin oluşumuyla sonuçlanır [7]. CRC'nin geliştiği iki tip polip vardır, bunlar; adenomlar ve SSP (Sessile Serrated Polyp)'lerdir [10]. Tipik olarak, gelişen ilk mutasyonlar, hücre bölünmesi sırasında kromozom segregasyonunu etkileyen APC (Adenomatous Polyposis Coli) geni içindedir [10]. Daha sonra hücre büyümesi, farklılaşması ve hayatta kalması üzerinde aşağı yönde etkileri olan KRAS (Kirsten Rat Sarcoma) onkogeninde müteakip mutasyonlar gelişir ve buna karşılık, SSP'lerin gelişimi BRAF (v-RAF murine sarcoma viral oncogene homolog B) genindeki mutasyonlarla başlar, bu da büyüme sinyalinin değişmesine ve apoptoz kaybına neden olur [10].

1.1.1.1 Hipoksi ve Kolorektal Kanser

Çoğu katı tümörde hipoksik bir ortam vardır [11]. Hipoksi durumunda, HIF (Hipoksi İndüklenebilir Faktör)'nin çeşitli kanser hücrelerinde aşırı eksprese edildiği ve kolorektal kanser de dahil olmak üzere birçok farklı tümör varlığının ilerlemesi ve olumsuz klinik sonucu ile ilişkili olduğu bildirilmektedir [12]. Hipoksi, mikro çevrede değişiklikler başlatarak, onkojenik genleri ve metabolizmayı değiştirerek, fonksiyonel olmayan kan damarları şeklinde ve orada metastazı indükleyerek kanserde önemli bir rol oynar [7]. Hipoksik koşullar altında kanser hücreleri, hayatta kalmak ve olumsuz ortamı bırakmak

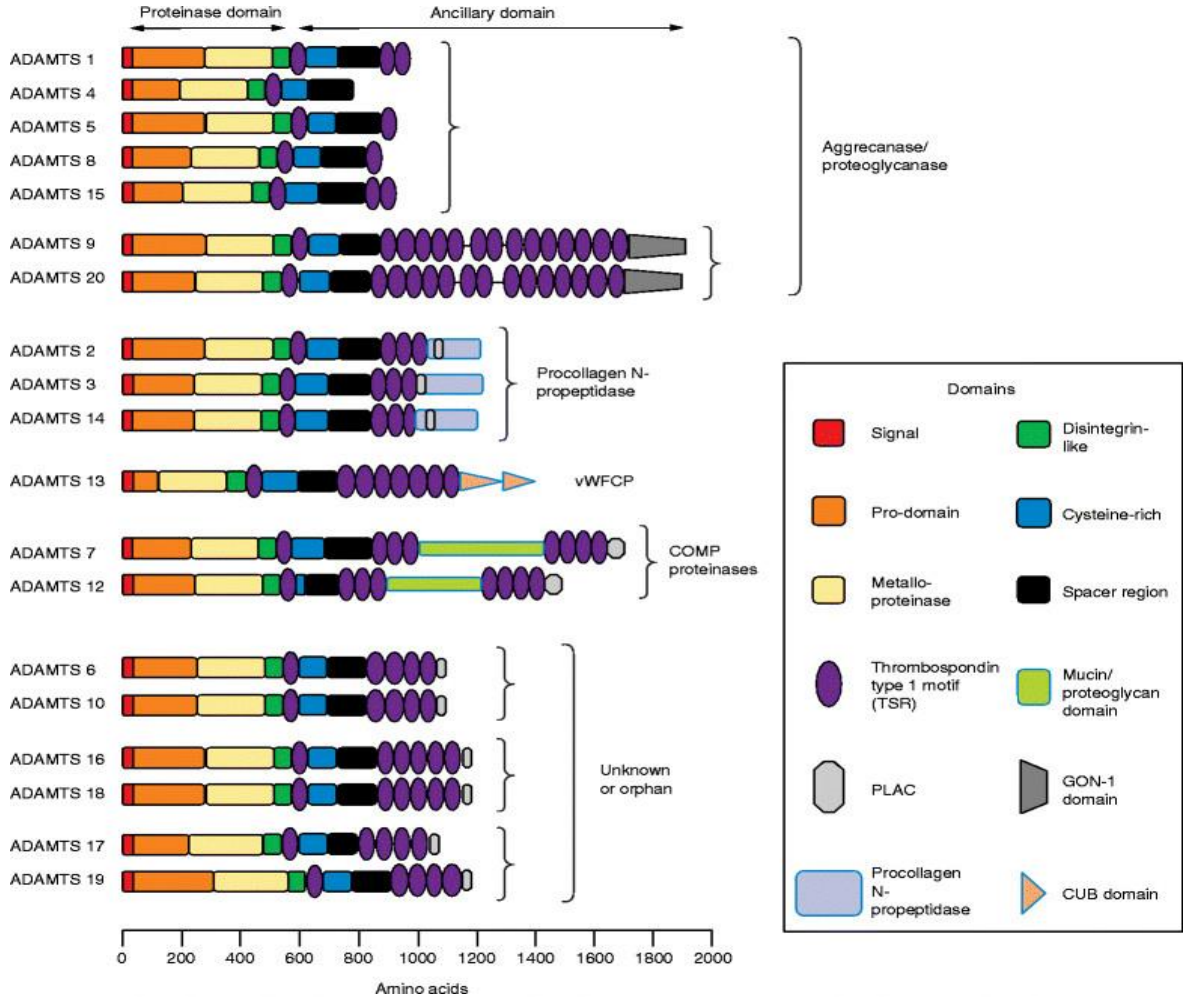
için kaçış mekanizmaları geliştirir. Sonuç olarak, yerel işgal için artan potansiyel ve uzak organlara kaçma yeteneği kazanırlar [11]. Tümördeki bu özellik, kanser gelişimini ve ilaç direncini uyardığı için önemli bir faktördür. Hipoksi ilaç direnci, anjiyogenez, invazivlik, metastaz, hücre ölüm direnci, metabolizma değişikliği ve genom instabilitesindeki önemli rolü nedeniyle, hipoksi en doğrulanmış hedef olarak kabul edilebilir [7].

1.2 ADAMTS Ailesi

Bir disintegrin ve metalloproteinaz (ADAM), metalloproteinaz alanını, matriks metalloproteinazları (MMP'ler) ile paylaşan yılan venomazlarının reprotizin ailesi ile sekans benzerliğine sahip bir protein ailesidir [13]. ADAM'lar yapısal olarak iki gruba ayrılırlar;

- i) Membran ankrajlı ADAM
- ii) Trombospondin motifli ADAM (ADAMTS)

ADAMTS (trombospondin motifli bir disintegrin benzeri ve metalloproteinaz), 1997'de Kuno ve arkadaşları tarafından tanımlanmış olan bir hücre dışı metalloproteinaz ailesidir [14]. Kuno ve arkadaşları kolon kanseri kaşeksisinden elde ettikleri bu enzimi ADAMTS-1 olarak adlandırmışlardır. Çoğu ADAMTS fonksiyonu ilk olarak spontan insan ve hayvan mutasyonlarının ve genetik olarak yapılandırılmış hayvanların analizinden ortaya çıkmıştır [15]. Bugüne kadar 19 ADAMTS aile üyesi tespit edilmiştir. Bu sıralı numaralandırmalarla giden ADAMTS ailesinin içinde ne yazık ki ADAMTS-11 bulunmamaktadır çünkü ADAMTS-11 olarak adlandırılan gen ismi, ADAMTS-5 olarak belirlenen bir gene hata ile verilmiştir [15]. ADAMTS'ler, yardımcı bölgelerinde bir veya daha fazla Trombospondin Tip 1 tekrar (TSR) domenine sahip olarak karakterize edilir [16]. Merkezi TSR'nin akış yönünün aşağısındaki tüm karboksi terminal bölgesi, yardımcı alan olarak adlandırılır ve ADAMTS aile üyelerinin arasındaki en büyük farkların ortaya çıktığı yerdir [17]. ADAMTS'lerin çoğu N-terminalden, C- terminaline doğru şekil 1.1 de gösterilen alan yapısını içerir.



Şekil 1.1: ADAMTS proteinlerinin domain yapıları [17].

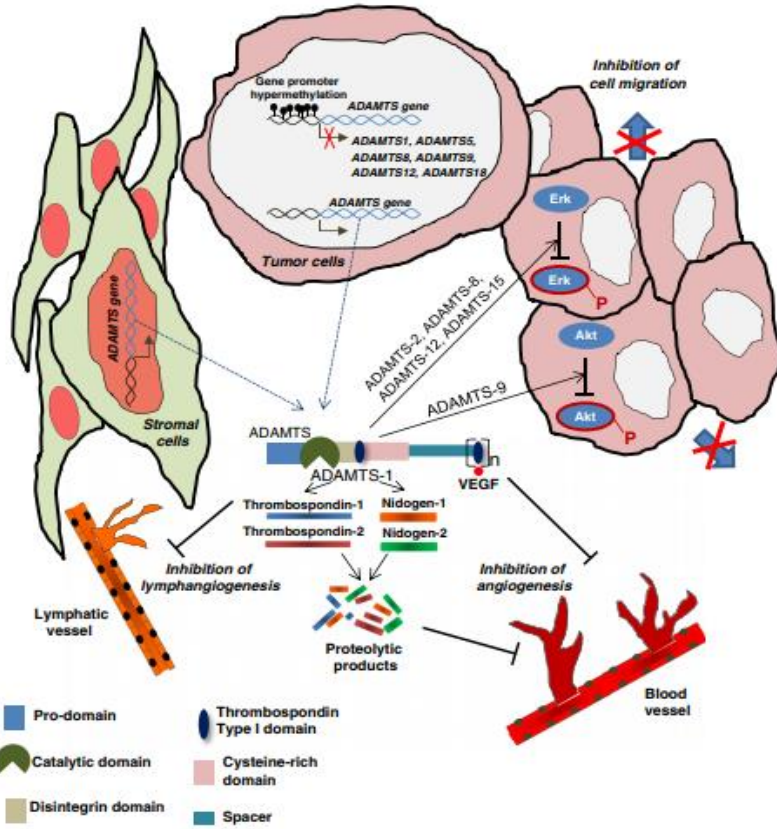
- 1) Sinyal peptidi; ADAMTS'i salgı yoluna yönlendirir.
- 2) Prodomain; enzim gecikmesini muhafaza eder (ADAMTS-9 ve ADAMTS-13 hariç) [16].
- 3) Metalloproteinaz alanı; çinko bağlar.
- 4) Trombospondin motif ; hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimini sağlar (ADAMTS'ler membrana bağlı değildirler, ancak salgılanmadan sonra heparin ve heparin sülfat gibi hücre dışı matris bileşenlerine bağlanırlar. Bu bağlanma TSR1 motifleri aracılığıyla gerçekleşir [18].
- 5) Değişken bölge; enzime spesifiklik katar [17].

1.2.1 ADAMTS Ailesinin Özellikleri

ADAMTS proteinazlar başlangıçta kanser ve kaşeksi ile ilişkili gen olarak tanımlanmıştır [19]. ADAMTS üyeleri; kollajen işleme (ADAMTS-2, ADAMTS-3 ve ADAMTS-14), oligomerik matris proteini (COMP) yıkımı (ADAMTS-7 ve ADAMTS-12), proteoglikan

degradasyonu (ADAMTS-1, ADAMTS-4, ADAMTS-5, ADAMTS-8, ADAMTS-9, ADAMTS-15 ve ADAMTS-20), kan pıhtılaşması (ADAMTS-13) ve kırıkta yıkımı gibi fonksiyonlarına göre alt gruplara ayrılabilirler [16]. ADAMTS alt tiplerinin çoğunluğu yapısal düzeyde karakterize edilmiştir ve bunların ifadeleri prenatal ve postnatal büyüme, kanser, artrit, Alzheimer hastalığının başlangıcı ve ilerlemesi ile ilişkilidir [20]. ADAMTS-1, -4, -5, -8, -9 ve -15 gibi bazı ADAMTS alt türleri, ECM organizasyonu için geniş bir iskele sağlayan kondrotin sülfat ayırma yetenekleri nedeniyle agrekanazlar olarak alt sınıflara ayrılmıştır. Agrekanazlar, agrekan parçalayıcılarıdır. Agrekan, eklem kırıkdağının önemli bir bileşenidir ve bu dokunun, sülfatlanmış glikozaminoglikan (GAG) zincirlerinin hidratlanması yoluyla dokunun yüksek ozmolaritesini oluşturarak, sıkıştırıcı yüklere direnme kabiliyeti sağlar [21].

ADAMTS agrekanazlarının birkaç üyesinin, çeşitli kanserlerde antianjiyogenik işlevlerinin olduğu keşfedilmiştir. Bir agrekanaz olan ADAMTS-1'in, bazik fibroblast büyüme faktörü ve vasküler endotelial büyüme faktörü inhibisyonu yoluyla antianjiyogenik fonksiyona sahip olduğu gösterilmiştir. Benzer şekilde, ADAMTS-8'in anjiyogenezin güçlü bir inhibitörü olduğu bulunmuştur. ADAMTS'ler, Matriks Metalloproteinazların (MMP) yapılarına benzerlik göstermelerine rağmen dar substrat spesifiteleriyle onlardan ayrılırlar. Bu özellik de diğer proteinazlara kıyasla kanser veya diğer patojenlerin tedavisinde ADAMTS inhibitörleri için bir avantaj sağlayabilir [19].



Şekil 1.2: ADAMTS metaloproteazalarının aracılık ettiği antitümör etkilerin şematik gösterimi [14].

ADAMTS'ler stromal veya tümör hücreleri tarafından üretilebilir ve anjiyogenik veya lenf-anjiyogenik süreçleri inhibe eder, tümör hücrelerinde tümör destekleyici sinyal yollarını bloke edebilir. Bu etkiler hem bağımlı olabilir (trombospondin-1 ve -2 gibi hücre dışı bileşenlerin bozulması) ya da katalitik katalitik aktiviteden bağımsız (VEGF sekestrasyonu) olabilir. Çeşitli ADAMTS genleri, farklı kökenlerden gelen tümörlerde epigenetik modifikasyonla susturulur [14].

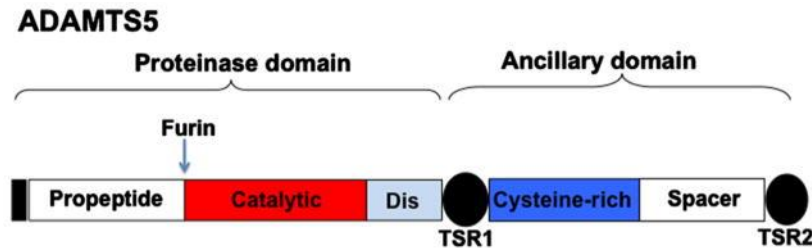
1.2.2 ADAMTS Ailesi ve Anjiyogenez

ADAMTS'ler birçok biyolojik süreçte rol oynarlar, bunlardan bir tanesi de anjiyogenezdir [22]. Anjiyogenez; var olan kan damarlarından yeni kan damarlarının oluşmasıdır. Bu olay, embriyonik gelişim, yara iyileşmesi, tümör büyümesi ve metastazı gibi çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçler için önem taşır [23]. Yetişkinlikte, fizyolojik anjiyogenez sıkı bir şekilde düzenlenir ve sadece geçici olarak gerçekleşir, oysa patolojik durumlarda bu olay sürekli olarak gerçekleşir [24]. Anjiyogenez oluşurken birçok olay basamaklar şeklinde birbirini izleyerek ortaya çıkmaktadır. İlk olarak anjiyogeneze neden olan bir uyarının oluşması (hipoksi,

iskemi), daha sonra bu etkenden dolayı anjiyogenik bir faktörün salınması ve ilgili faktör ya da faktörlerin de bazal membranı parçalaması (matriks metalloproteinaz enzimi aracılığıyla) söz konusudur. Bunu sırasıyla endotel hücrelerinin aktivasyonu, adezyonu, migrasyonu, proliferasyonu ve tüp oluşumu takip eder. Tüm bunların sonucunda yeni kan damarlarının var olan kan damarlarından çoğalması gerçekleşir. Yeni tüp yapıda bazal membranın oluşması ve buna perisitlerin de katılmasıyla fonksiyonel kapiller oluşum tamamlanmış olur [25]. Anjiyogenezi başlatan ve sürdüren sinyaller çoklu ve karmaşıktır [26]. Pro-anjiyogenik sitokinler ve büyüme faktörleri; vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF), anjiyopöietinler, transforme edici büyüme faktörü beta (TGF- β), epidermal büyüme faktörü (EGF), tümör nekroz faktör alfa (TNF- α), interlökin-8 (IL-8) ile inflamatuvar hücreler (makrofajlar, mast hücreleri), perisitler ve keratinositler tümör hücreleri tarafından sentezlenen anjiyogenezi ile ilgili genlerdir. Bu faktörlerden bazıları endotelial hücreler üzerindeki reseptörlerine bağlanarak proliferasyon ve/veya migrasyonu indüklemek üzere direkt etki ederken, bazıları lokal stromal veya inflamatuvar hücreler üzerine etki ederek anjiyogenezi stimüle ederler [27].

1.2.3 ADAMTS-5 Genel Özellikleri

ADAMTS-5 21. Kromozomda (21q21.3) yer alır. Bilinen isimleri; ADMP-2; ADAM-TS5; ADAMTS-11, agrekanaz 2' dir [28].



Şekil 1.3: ADAMTS-5 motifi [29].

Keşfedilen ilk agrekanazlardan olan ADAMTS-5; çinko katalitik domain, parçalanma domaini, trombospondin domaini (TSR1 ve TSR2) olmak üzere çeşitli domainlere sahiptir [30]. Diğer tüm ADAMTS üyeleri gibi, ADAMTS-5 de N-terminal sinyal peptidinden dolayı salgılanır. Enzim gecikmesi, hücre dışı olarak parçalanan prodomain ile korunur. Bu işlem trans-golgi ağında gerçekleşen ADAMTS-1 ve ADAMTS-4'ten farklıdır. Bununla birlikte, işlem aynı zamanda ADAMTS-9 durumunda olduğu gibi hücre yüzeyinde değildir. ProADAMTS-5, furin ve PC7 gibi pro-protein konvertörleri tarafından aktive

edilir. ADAMTS-5'in C-terminal bölgesinde otokatalitik parçalanmaya maruz kaldığı bilinmektedir, bu da 45 ve 60 kDa'lık iki kısa N-terminal fragman izoformu ile sonuçlanır. Bu çok alanlı proteinazın yardımcı alanlarının, lokalizasyon ve substrat spesifitesinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Agrekanaz aktivitesine göre, tam uzunlukta proteinazın, sadece disintegrin alanı ile katalitik fonksiyonunu yitirdiği maksimum aktivite ve metalloproteinaz domainine sahip olduğu bulunmuştur. Diğer C-terminal yardımcı alanlarının kaybı, agrekanaz aktivitesini önemli ölçüde azaltmıştır [16].

ADAMTS-5, agrekan degradasyon aktivitesi nedeniyle agrekanaz-2 olarak adlandırılmıştır. Hücre dışı matriks (ECM) degrades edici enzimlerin bir üyesi olarak da bilinen ADAMTS-5 aynı zamanda proteoglikanların bölünmesi, anjiyogenezin inhibisyonu ve embriyonik morfogenez dahil olmak üzere çeşitli hücrel olaylarda rol oynar [31].

1.2.3.1 ADAMTS-5 Regülasyonu

Echtermeyer ve arkadaşları 2009 yılında yaptığı çalışmada doku onarımı sırasında mezankimal hücre fonkiyonunu düzenleyip integrinlerle birlikte protein kinaz C, fokal adezyon kinaz ve RhoA aktivasyonunu modüle ettiği için sindekan-4'ün fonksiyonel olarak osteoartrit sırasında kırıkdağın yeniden şekillenip şekillenmeyeceğindeki rolünü sorgulamışlardır. Cerrahi olarak indüklenen osteoarriti olan yabani tip farelerin diz eklemine, sindekan-4'e özgü antikoları enjekte etmişler ve bu eklemlerin tipik osteoartritik değişikliklerden korunmuş olduğunu bulmuşlar. Dahası sindekan-4'e özgü antikor tedavisi kırıkdağın inceltilmesini önlemiştir. Bu da Echtermeyer ve arkadaşlarının akıllarına yeni bir soru getirmiştir; "ADAMTS-5 ve sindekan-4 arasında doğrudan bir etkileşme mi vardır?" Yaptıkları çalışmalar sonucunda sindekan-4'ün ADAMTS-5'in ifadesini doğrudan düzenlemek yerine MMP-3'ün salınmasını kontrol ederek ADAMTS-5 aktivasyonunu modüle ettiğini ortaya çıkarmışlardır [32].

Ashlin ve arkadaşları 2013 yılında İnsan makrofajlarında ADAMTS-1, -4 ve -5 ifadesinin düzenlenmesi ve aterosklerozda rol oynayan anahtar sitokinler ile ilgili bir çalışma yapmışlardır. Çalışmalarında ADAMTS -1, -4 ve -5'in THP-1 makrofajlarında eksprese edildiğini ve durumun monosit-makrofaj farklılaşması sırasında önemli ölçüde arttığını göstermişlerdir. Klasik sitokinler IFN- γ ve TGF- β nın bu 3 ADAMTS üyesinin üzerinde farklı etkiler gösterdiklerini bizlere aktarmışlardır. IFN- γ , ADAMTS-1 ekspresyonunu zayıflatmış, ADAMTS-4 ve ADAMTS-5'in ekspresyonuna etki etmemiştir. TGF- β ise

ADAMTS-4 ekspresyonunu zayıflatmış ve ADAMTS-1 ve ADAMTS-5'in ekspresyonunu arttırmıştır. Öte yandan, daha yeni tanımlanmış olan sitokinler TL1A ve IL-17A'nın tek başına bu üç elemanın ekspresyonu üzerinde hiçbir etkisi yoktur, fakat birlikte olduklarında sinerjistik olarak seviyelerini indüklerler. Çalışmalar, bu önemli proteazların düzenlenmesine aterosklerozda rol oynayan kilit sitokinlerle yeni bir bakış açısı kazandırmaktadır [33].

Yu ve arkadaşları 2016 yılında kolorektal kanserle ilgili bir çalışma yapmışlardır. Bu çalışmada microRNA-140 5p kullanarak ADAMTS-5 ve IGFBP5 hedef alınmıştır. Kolorektal kanser, en sık görülen malignitelerden biridir ve dünya genelinde kanser ölümlerinin ikinci en sık nedenidir. CRC'nin gelişimi, hücre proliferasyonu, apoptoz, invazyon ve metastaz gibi CRC'nin tümörijenitesinin tüm yönlerini etkileyecek olan onkojenlerin aktivasyonunu ve tümör süpresör genlerinin inaktivasyonunu içeren çok adımlı bir ilerlemedir. Yu ve arkadaşları bu çalışmada, miR-140 kullanarak ADAMTS-5 ve IGFBP5 hedefleme yoluyla CRC ilerlemesinde miR-140 inhibisyonu için yeni bir mekanizma ortaya çıkarmışlardır. Özet olarak, miR-140'ın ADAMTS-5 ve IGFBP5'i aşağı yönde düzenledikten sonra CRC hücre göçünü ve invazyonu inhibe ettiğini deneysel olarak kanıtlamışlardır [34].

Morgan ve arkadaşlarının 2018 yılında yaptıkları çalışma eklem sinoviyumu ile ilgilidir. Eklem sinoviyumu esas olarak makrofajlardan ve FLS (Fibroblast benzeri sinoviyum)den oluşan heterojen bir hücre popülasyonundan oluşur. Bu hücrelerin arasındaki etkileşimleri incelemek için Morgan ve arkadaşları çalışmalarında at fibroblast benzeri sinoviyosit (EFLS) ve köpek makrofaj hattı DH82 kullanılarak, in vitro bir ortak kültür sistemi oluşturmuştur. Bu hücre hatları floresan markerları ile etiketlenmiş ve hücre tipinde IL-1 β , IL-6, ADAMTS-4 ve ADAMTS-5'in transkript ifadesi türe özgü qPZR testleri kullanılarak belirlenmiştir. EFLS'nin lipopolisakkarid (LPS) stimülasyonu sonucunda IL-1 β , IL-6, ADAMTS-4 ve ADAMTS-5 mRNA'larının hızla arttığı DH82 hücreleriyle kültürlendiğinde ise ADAMTS-5'in indüksiyonun önemli ölçüde azaldığı gözlemlenmiştir. Ayrıca EFLS'nin koşullandırılmış denatüre bir ortama maruz bırakılması da ADAMTS-5 indüksiyonunu önemli ölçüde azaltmıştır. Morgan ve arkadaşları bu çalışmalarının sonucunda, makrofajların çözülebilir bir aracı vasıtasıyla FLS gen ekspresyonunu etkileyebileceğini ve inflamatuvar stimülasyon sırasında osteoartrit patolojisinde kritik olan bir enzimin ekspresyonunu modüle edebileceğini göstermişlerdir [35].

Fontanil ve arkadaşları 2017 yılında yaptıkları çalışmada ADAMTS-4 ve ADAMTS-5'in Fibulin-2'yi sindirme kabiliyetini araştırmıştır. Fibulin-2, çoklu ligandlarla etkileşimler yoluyla hücre dışı matris bileşenlerinin birleştirilmesine katılır, hücreler ve çevredeki ortamlar arasındaki iletişimi teşvik eder. Fibulin-2'nin bozulması, T47D, MCF-7 ve SK-BR-3 hücrelerinin invaziv potansiyelinin artırılması ile ilişkilidir. Aynı zamanda, Fibulin-2 ve ADAMTS-5'i aynı anda aşırı eksprese eden MCF-7 hücrelerinden koşullandırılmış ortamın, 3D kolajen matrisleri kullanarak normal meme fibroblastlarının göç ve invaziv yeteneğini önemli ölçüde indüklediğini de bulmuşlardır. Yapılan immünohistokimyasal analiz, meme tümörü örneklerinde hem Fibulin-2'nin hem de ADAMTS-5'in yakın ve kısmi örtüşmesini vurgulamaktadır. Ek olarak, bu örneklerde Fibulin-2'nin ADAMTS-5 ile potansiyel bir bozulmasından türetilen proteolitik ürünler de tanımlanmıştır. Sonuç olarak, bu çalışmada elde edilen bulgular Fibulin-2'nin ADAMTS-5'in yeni bir substratı olduğunu ve bu proteolizin hem Fibulin-2 hem de ADAMTS metaloproteazlarıyla ilişkili proteaz ve antitümör etkileri arasındaki dengeyi etkileyen hücrel mikroçevreyi değiştirebileceğine dair doğrudan kanıt sağlar [36].

Hamamura ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada bir sistem biyolojisi yaklaşımı kullanmışlar ve osteoartrit kıkırdağında yüksek oranda eksprese edilen majör agrekanaz olan ADAMTS-5'in kondrositlerin transkripsiyonunda Lrp5'in rolünü incelemişlerdir [37]. C28 / I2 insan kondrosit hücrelerini kullanarak bunları Lrp5 ile transfekte etmişlerdir. Daha önceki bir çalışmada ADAMTS-5'in ekspresyonunun p38 mitojen ile aktive olan protein kinaz (p38 MAPK) tarafından düzenlendiği bildirilmiştir ancak Lrp5 aracılı sinyalizasyon ve p38 MAPK aktivasyonu arasında herhangi bir bağlantı olup olmadığı gösterilmemiştir. Hamamura ve arkadaşları bu çalışmada ADAMTS-5'in transkripsiyonunun Lrp5 aracılı düzenleyici mekanizmasını tanımlamak için, Lrp5 kullanarak genom çapında bir mRNA ekspresyon analizi gerçekleştirmişlerdir. Daha sonra Lrp5 aracılı sinyallemenin p38 MAPK sinyallemesinin ve interlökin cevaplarının azaltılmasında rol oynadığını gösteren susturma deneyleri yapılmıştır. Bu deneyler sonucunda Lrp5 susturulması, p-p38 MAPK'yı yükseltir ve Lrp5 siRNA tarafından indüklenen ADAMTS-5'in yukarı regülasyonunu baskılamaktadır. Bu, ADAMTS-5'in Lrp5 aracılı düzenlemesinde p38 için bir aracı rolü olduğunu düşündürmektedir. Benzer şekilde, IL1 β ve Lrp5'in birlikte susturulması, ADAMTS-5 mRNA seviyesindeki artışı hafifletir. Bununla birlikte, p38 MAPK'nın aksine, tek bir IL1 β delesyonu, p38 MAPK ve IL1 β 'nin farklı etki gösterdiğine işaret eden

ADAMTS-5 mRNA seviyesinde anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır. Özetlemek gerekirse Hamamura ve arkadaşları bu çalışmada ADAMTS-5'in transkripsiyonu için yeni bir Lrp5 aracılı ağ modeli sunmuştur. Bu model, Wnd3a, Lrp5, IL1 β ve p38 MAPK gibi Wnt ligandları arasında kondrositlerde ADAMTS-5'in mRNA ekspresyonunu baskılayan ve Lrp5 aracılı Wnt sinyalinin önemli rolünü vurgulamaktadır [37].

Polikistik over sendromu (PKOS), üreme çağındaki kadınlarda en sık görülen endokrin bozukluklardan biridir. Karaköse ve arkadaşlarının 2016 yılında yaptıkları bu çalışmadaki amacı, ADAMTS-1, ADAMTS-5, ADAMTS-9, IL-17, IL-23, IL-33 serum düzeylerini değerlendirmek ve PKOS hastalarında bu inflamatuvar sitokinler ve ADAMTS'ler arasındaki ilişkiyi araştırmaktır. Ekip, ADAMTS-5 ve ADAMTS-9'un yumurtalıklarda ve aynı zamanda ADAMTS-5 ve ADAMTS-1'in yumurtlamada önemli fonksiyonları olduğunu göstermişlerdir. Burada PKOS hastalarının hs-CRP (yüksek hassasiyetli C-reaktif protein) düzeyinin daha yüksek olduğunu, ancak aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığını bildirmişler ayrıca PCOS hastalarında IL-17A, IL-23 ve IL-33'ün anlamlı olarak arttığını da ifade etmişlerdir. Özetlemek gerekirse bu çalışmadan elde edilen sonuçlar ADAMTS ve IL moleküllerinin PKOS patogenezinde rol oynadığını düşündürmektedir [38].

Held-Feindt ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, insan glioblastomlarındaki ADAMTS-4 ve ADAMTS-5 gibi sekretuar proteazların mRNA ve protein seviyelerinde ifadesini araştırmışlardır. Glioma hücreleri ile yaptıkları çalışmalarda, ADAMTS-5'in TGF- β tarafından düzenlenmesi artmış ancak ADAMTS-4 değişmemiştir. ADAMTS-5, IL-1 β tarafından indüklenmiştir. EGF ve TNF-a'nın neredeyse hiçbir etkisi yoktur. Sonuç olarak, ADAMTS-4 ve -5 salgılanan proteazlar beyin tümörlerinde, özellikle de *in-situ* glioblastomlarda upregüle edilmiştir. ADAMTS-5, hücre dışı matriks proteoglikan brevicanını bozabilir ve bu nedenle glioblastoma hücrelerinin invaziv potansiyeline katkıda bulunur [39].

Kumar ve arkadaşlarının 2012 yılında yaptıkları çalışmada ADAMTS-5'in anti-anjiyogenik/anti-tümörijenik protein olarak işlev gördüğünü göstermişlerdir. Bu anjiyo-inhibe edici fonksiyon, proteoglikanaz aktivitesinden bağımsızdır ve merkezi TSR1 alanı ile aracılık eder. Çalışmada B16 fare melanoması kullanılmıştır. ADAMTS-5; VEGF,

PIGF, PD-ECGF, IGFBP3 ve PAI-1 gibi anjiyogenik uyarıcıları inhibe ederek tümör anjiyogenezinin aşağı regülasyonu yoluyla B16 fare melanomasını baskılamıştır [40].

Haraguchi ve arkadaşları yaptıkları çalışmada ADAMTS-5'in kolorektal kanser tiplerinde ki ekspresyonuna odaklanmışlardır. ADAMTS-5'in ifadesi, 143 kolorektal kanser numunesinde değerlendirilmiştir. ADAMTS-5 düşük de olsa 143 numunenin hepsinde ifade olmuştur. Ayrıca TNM (tümör düğüm metastazı) evresi denilen safha ADAMTS-5'in artışı ile doğru orantı göstermiştir [31].

Gu ve arkadaşları çalışmalarında NSCLC (non small cell lung cancer) hücrelerine, akciğer kanserine odaklanmışlardır. Bu çalışmada A549, H1299 ve Spca-1 hücre hatlarını kullanılmışlar ve ADAMTS-5'in ifadesinin bu üç hücre hattında yüksek olduğunu bulmuşlardır. Ardından ADAMTS-5'i kısa saç tokası RNA (shRNA) ile susturduklarında ADAMTS-5'in düşük ekspresyonunun, NSCLC hücre hatlarında metastazı ve istilayı azalttığı sonucuna ulaşmışlardır [41].

Huang ve Sun yaptıkları çalışmada; ADAMTS-5'in insan mide kanserinde azalmış olduğunu ve düşük ADAMTS-5 ekspresyonunun mide kanserli hastaların daha kötü bir genel sağkalımı ile korele olduğunu göstermişlerdir [42].

ADAMTS'ler (trombospondin motiflerine sahip bir disintegrin ve metaloproteaz), en az bir trombospondin tip 1 tekrarına (TSR) sahip olan bir proteaz ailesidir. ADAMTS-5 TSR1 ve TSR2 olmak üzere TSR domenine sahiptir. Sharghi-Namini ve arkadaşları bu çalışmalarında, ADAMTS-5'in TSR2'sinin değil, TSR1'in yeni bir anti-anjiyogenik peptid olduğunu göstermişlerdir ve TS5-TSR1'inin, kanser dahil anjiyogenezle ilgili hastalıklar için ilaçların daha da geliştirilmesi için yeni bir prototip görevi görebileceğini öne sürmüşlerdir [43].

Li ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmadaki amaçları ADAMTS-5'in kolorektal karsinogenez üzerindeki klinik önemini ve biyolojik etkisini araştırmaktır. Bu çalışmada HCT116, DLD1, HT29, Lovo, CaCo2, SW480 ve LS174T hücre hatları kullanılmıştır. Yaptıkları çalışmada Li ve arkadaşları bu metaloproteinazın aşırı ekspresyonunun tümör istilası ve göç kabiliyetini önemli ölçüde bastırıldığını tespit etmişlerdir [44].

Filou ve arkadaşları ise ADAMTS'lerin CRC'deki olası etkilerini araştırmak için ekspresyonlarını RNA ve protein düzeyinde üç kolon kanseri hücre hattında incelemişlerdir. Caco-2, DLD-1 ve HT-29 kolon kanseri hücre hatlarını kullanmışlardır. Caco-2 hücrelerinde ADAMTS-5 ifadesi bulunmazken, esasen HT-29 hücrelerinde gözlenmiştir. ADAMTS-1 ve -4'ten farklı olarak, ADAMTS-5 ekspresyonunun serum varlığında kültürlenen hücrelerde aşağı regüle edildiği bulunmuştur. Bu çalışmanın sonuçları, ADAMTS-4 ve -5'in CRC'de aşırı ifade edildiği fikrini desteklemektedir [45].

Demircan ve arkadaşları baş ve boyun kanserindeki 6 ADAMTS agrekanaz üyesinin (-1, -4, -5, -8, -9 ve -15) mRNA ekspresyon paternini incelemişlerdir. ADAMTS mRNA'larının ekspresyon seviyeleri, primer tümörlerin çoğunda kontrollere kıyasla düşük çıkmıştır. Öte yandan, ADAMTS-4 dışında tüm ADAMTS üyeleri mRNA'larının ekspresyon seviyeleri, metastatik odaklarda, karşılık gelen birincil tümörlerinden daha yüksekti; bu, kanser hücresi popülasyonunun özelliklerinin, birincil tümör ve metastatik odakta farklı olduğunu göstermektedir [19].

Nakada ve arkadaşları 2005 yılında yaptıkları çalışmalarında, ADAMTS-1, ADAMTS-4 ve ADAMTS-5'in brevican-bozucu aktivitelerini hücresele düzeyde ve bunların insan glioma dokularında ekspresyon ve lokalizasyonlarını incelemişlerdir. Yaptıkları bu çalışmada ilk kez ADAMTS-5'in brevicanı parçalayabildiğini ve glioblastoma hücrelerinde aşırı eksprese edilebildiğini ve ADAMTS-5'in, brevicanın bölünmesi yoluyla glioma hücresi istilasında rol oynayabileceğini göstermişlerdir [46].

1.3 Sitokinler

Sitokinler, hücreler arası sinyalleşme ve iletişim amacıyla hücreler tarafından salgılanan çeşitli küçük protein grubudur [47]. Bu protein grubu kemokinler, interlökinler (IL'ler), interferonlar (IFN'ler) ve TGF- β gibi bazı büyüme faktörlerini içerir [48]. Sitokinlerin salınımı bir uyarana yanıt olarak belirli bir süre boyunca gerçekteşir, dolaşımdaki sınırlı yarı ömürleri nedeniyle eylemlerinin kapsamı kısa ömürlüdür [49]. Bu nedenle de sitokinler otokrin veya parakrin etkisi uygularlar [49]. Sitokinlerin birçok işlevi arasında, hücre proliferasyonu, hücre farklılaşmasının kontrolü ve anjiyogenez ile immün ve inflamatuvar yanıtların düzenlenmesi yer alır [47]. Ek olarak sitokinler normal hücrelerin yanı sıra kanser hücreleri tarafından da salgılanmaktadır [48]. Çok sayıda kanıt,

sitokinlerin kanserin başlaması, yükselmesi, istilası ve metastazına yol açan olaylara katılımını destekler [50].

1.3.1 Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta (TGF- β) Ailesi

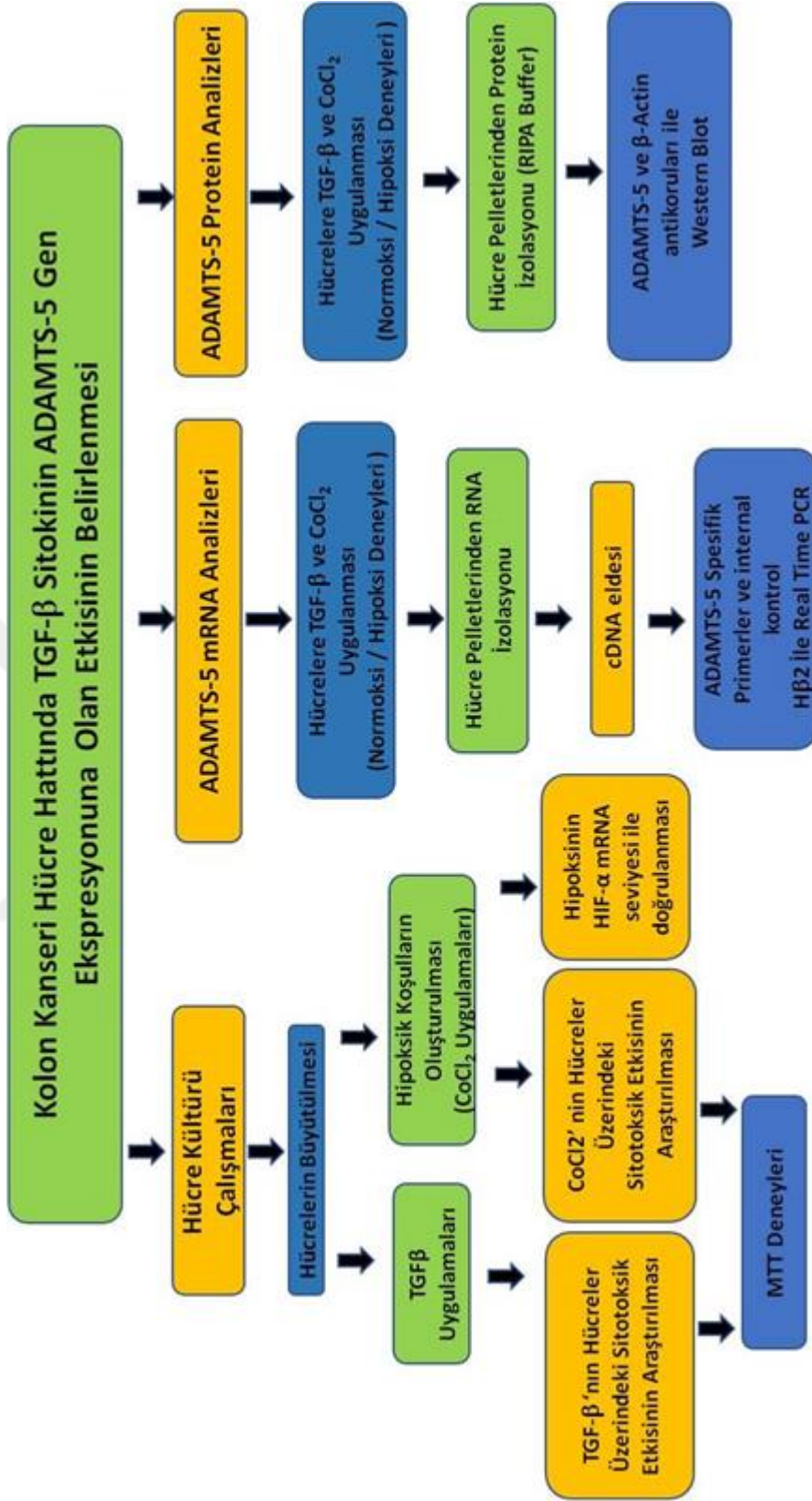
TGF- β , sitokinlerin TGF- β üst ailesine aittir [51]. Embriyonik ve yetişkin dokularda hücrel davranışı kontrol eder [52]. 30'dan fazla memeli geni, büyüme faktörlerinin TGF üst ailesini içerir ve hem yetişkin organizmasında hem de embriyogenezde hücrel fonksiyonların düzenlenmesinde, anjiyogenez, yara iyileşmesi, fibrozis, apoptozun düzenlenmesi, kanser biyolojisi ve immün sistemin düzenlenmesi gibi son derece önemli süreçlerde de rol oynarlar [53- 54]. TGF- β 'nın üç izoformu vardır. Bunlar; TGF- β 1, TGF- β 2, ve TGF- β 3'dür [55]. Pratik olarak tüm hücrelerin TGF- β için reseptör taşıdıkları ve bütün dokularda en az bir izoformunun sentezlendiği kabul edilir. Örneğin immün sistem hücreleri birincil olarak TGF- β 1 sentezlerler [54]. TGF- β -1 kanda bulunan baskın izoformdur [56]. TGF- β sitokini birçok epitel hücre tipinde sitostatik bir etkiye neden olur ve ayrıca çoğu diğer hücre tiplerinde proliferasyon, farklılaşma ve programlanmış hücre ölümünü de kontrol edebilir [54]. Hücre döngüsünün G1 fazındaki hücreleri durdurarak büyüme inhibisyonunu indükler, bazı durumlarda apoptozun terminal farklılaşmasına veya indüklenmesine yol açar [57].

2. TEZİN AMACI

Bu çalışmada kolon kanseri modeli olan HT-29 hücre hattında TGF- β ve hipoksi koşullarının (normoksi, TGF- β , hipoksi, TGF- β ve hipoksi) ADAMTS-5 genine mRNA ve protein düzeyinde etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu bağlamda gerçekleştirilen tez çalışma basamakları aşağıdaki şekilde sıralanmıştır;

- 1) İnsan kolon kanseri hücre hattı olan HT-29 hücreleri büyütülmüş ve belirli zaman aralıklarında belirlenen dozlarla TGF- β ve CoCl₂ uygulanmıştır. Hem TGF- β sitokininin hem de CoCl₂ ile oluşturulan hipoksik koşulların hücreler üzerindeki sitotoksik etkisinin MTT ile belirlenmesi.
- 2) HT-29 hücrelerinde TGF- β ve kimyasal hipoksinin ADAMTS-5 mRNA seviyesinde olan etkisinin qRT-PZR ile belirlenmesi.
- 3) HT-29 hücrelerinde TGF- β ve kimyasal hipoksinin ADAMTS-5 protein seviyesinde olan etkisinin western blot ile belirlenmesi.



Şekil 2.1: Tez çalışma basamaklarını özetleyen akış diyagramı.

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Materyal

3.1.1 Çalışmalarda Kullanılan Kimyasallar

Bu tez çalışmasında, RNA, DNA ve Protein konstrasyonunun belirlenmesinde, RT-PZR çalışmalarında, qRT-PZR çalışmalarında kullanılan kimyasallar ve enzimler; Fermantas, Thermo Scientific ve LightCycler 480 Roche Life Science firmalarından alınmıştır.

Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan kimyasallar.

Kimyasallar	Üretici
Akrilamid-Bisakrilamid	Merck
Ampicilin	Sigma
APS (Amonyum persülfat)	Fisher Chemicals
Agaroz	Sigma
Beta-merkaptotanol	Merck
BSA (Bovin Serum Albumin)	Sigma
Goat-Anti Rabbit IgG-HRP	Santa Cruz
$C_2H_3NaO_2$ (Sodyum Asetat)	Sigma
$CaCl_2$ (Kalsiyum klorür)	Borasan Kimya
DEPC (Dietyl pirokarbonat)	Sigma
DMEM	EuroClone, Gibco
DMSO (Dimetil sulfoksit)	Sigma
Dntp	Thermo
ECL (Electrochemiluminescence) Kit	Thermo
EDTA	Riedel
Etanol	Sigma
Etidyum Bromür	Sigma
FCS (Fetal Calf Serum)	Gibco
Formaldehit	Sigma
GeneJET™ RNA saflaştırma kiti	Thermo Scientific

Tablo 3.1 (devam).

Gliserol	Merck
Goat anti-mouse IgG-HRP	Sigma
Hepes	Sigma
MOPS	Merck
3-(N-morfolino) propansulfonik asit	
MTT	Clontech
MgCl ₂ (Magnezyum klorür)	Thermo
Metanol	Sigma-Aldrich
NaCl ₂ (Sodyum klorür)	Sigma
NaOH (Sodyum hidroksit)	Sigma
Oligo DT, Ribolock İnhibitör	Thermo
PBS	Sigma
Pierce ECL (Western Blotting substrat)	Thermo
PVDF Membran	Millipore
Page Ruler Prest	Thermo
Reverse Transkriptaz	Thermo
SDS (Sodyum dodecyl sulfat)	Sigma-Aldrich
Süt tozu	Santa Cruz
SYBR® Green PZR Master Mix ve su	Roche
Taq Buffer (5x)	Thermo
Taq Polimeraz	Thermo
Tripsin	Sigma
Tris Base	Sigma
TGF-β (Lot# 1352669B)	İnvitrogen-Gibco
Tween 20	Sigma-Aldrich
TEMED (Tetrametiletilendiamin)	Sigma
Tripan mavi boyası	Sigma
Tripsin-EDTA	Sigma
β-aktin Antikor (Lot #039M4768V)	Sigma
6X Yükleme Boyası	Thermo
1 kb DNA Marker	Thermo

3.1.2 Çalışmalarda Kullanılan Araç ve Gereçler

Deney süresi boyunca kullanılan araç ve gereçler markalarıyla beraber tablo 3.2 de verilmiştir.

Tablo 3.2: Laboratuvarında kullanılan cihazlar ve markaları.

Laboratuvar Araç-Gereç İsimleri	Firma Adı
Otomatik Pipetler	Axygen, Thermo
PZR Cihazı	Bio-rad
Vorteks	Elektromag
pH Metre	WTW
DNA Elektroforez Sistemi	Minicell Primo
RNA Elektroforez Sistemi	Apelex
Elektroforez Güç Kaynağı	Elektromag
Jel Görüntüleme Sistemi	Bioimaging Systems
Santrifüj Cihazı	Hettich Zentrifugen
Soğutmalı Santrifüj Cihazı	Sigma
Saf Su Cihazı	Thermo, Comecta Sa
Termal Block Cihazı	FALC
Spektrofotometre Cihazı	Thermo
SDS Page Aparatları	Bio-rad
Inkübator	WTB, German, Nüve
Hassas Terazı	Sartorius
Manyetik Karıştırıcı (Isıtmalı)	Velp Scietifica
Dikey Çalkalayıcı	Thermo
Yatay Çalkalayıcı	GFL
qRT-PZR	Roche
Laminar Air Flow	Telstar BIOII
Inverted Mikroskop Cihazı	Nikon
Buz Makinesi	Fiochetti Frigoriferi Scientifici
Buz Dolabı	Arçelik
-80°C Derin Dondurucu	Thermo

3.2 Metot

3.2.1 Dene Ortamının ve Deneilerde Kullanılan Maddelerin Sterilizasyonu

Çalışmalarda kullanılacak olan pipet uçları, PZR tüpü, ependorf, erlen gibi yüksek sıcaklıklara dayanıklı malzemelerin ve solüsyonların sterilizasyonu 121°C’de 20 dk otoklavlama işlemi ile gerçekleştirilmiştir. Cihazdan çıkan solüsyonlar ılıdıktan sonra ihtiyaç duyulan sıcaklıktaki saklama koşullarına alınmış, diğer malzemeler ise 80 °C ‘deki etüve konularak kurutulmaya bırakılmıştır.

RNA izolasyon laboratuvarında çalışma alanları ve kullanılacak pipetler önce %70 lik etil alkol ile ardından DEPC ile temizlenerek ortamın sterilizasyonu sağlanmıştır. Proteom laboratuvarında çalışma alanları ve kullanılacak pipetler %70 lik etil alkol ile temizlenerek ortam steril edilmiştir.

Hücre kültürü laboratuvarında, kullanılan laminar flow çalışma öncesi içerisinde bulunan UV lamba belirli bir müddet açık bırakılarak ortamın steril hale gelmesi sağlanmış, ardından virkonlu su, çamaşır suyu ve %70’lik etil alkol ile silinerek temizlenmiştir. Hücre kültürü laboratuvarında hücrelerin muhafaza edildiği inkübatöre bağlı bulunan CO₂ tüpü düzenli olarak kontrol edilmiştir. İnkübatörün içerisinde bulunan, ortamının nemli kalmasını sağlayan su tablasına herhangi bir kontaminasyona sebebiyet vermemek için otoklavlanmış saf su konulmuş ve bu su düzenli olarak değiştirilmiştir.

3.2.2 Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılan Metotlar

3.2.2.1 Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılan Malzemeler

Soğuk zincirle gelen steril FCS +4°C’de 1 gece tutularak eritilmiş, ardından 56°C sıcaklığındaki su banyosunda 60 dakika bekletilerek malzemenin inaktivasyonu sağlanmıştır. Bu işlemin ardından inaktif FCS hücre kültüründe 50 mL’lik steril falkonlara alikot edilerek ilerleyen kültür çalışmalarında kullanılmak üzere -20°C’de muhafaza altına alınmıştır.

Çalışmada kullanılan hücre hattı için yüksek glikoz içeren DMEM (Dulbecco’s Modified Eagles Medium) temin edilmiştir. Daha sonra DMEM içerisine %10’luk FCS ve son hacmin %1’i olacak şekilde streptomisin-kanamisin antibiyotiği eklenerek kültür medyumu hazırlanmıştır.

Hücrelerin flask kaplarından kaldırılmasından sorumlu Tripsin-EDTA solüsyonu; %0,05 Tripsin ve 0,5 mM EDTA malzemelerini, otoklavlanmış (1X) PBS içerisinde çözündürülerek hazırlanmıştır. Ardından 0,22 µm'luk filtreden geçirilerek -20°C'de muhafaza altına alınmıştır.

3.2.2.2 Hücre Hattının Büyütülmesi

-80°C'de muhafaza edilen hücreler alınarak, 37°C sıcaklıktaki su banyosu içerisinde eritildi. Çözünen hücreler 5 mL %10'luk FCS-DMEM ve %1'lik antibiyotik içeren besiyerinin bulunduğu falkona aktarıldı. 1000 rpm'de 5 dakikalık santrifüj işlemine tabi tutularak hücre pelletinin elde edilmesi sağlandı. Santrifüj sonrası üstte kalan süpernatant kısım falcondan uzaklaştırıldı. Hücre pelleti 2 mL'lik besiyeri ile çözündürülüp 75 cm² lik flaska aktarıldı ve flaskın içerisine son hacim 15 mL olacak şekilde besiyeri ilavesi yapıldı. Flask, gerekli etiketlemeler yapıldıktan sonra %5 CO₂ içeren 37°C'lik inkübatöre kaldırıldı.

3.2.2.3 Hücre Hattının Pasajlanması

Hücrelerin büyümesi mikroskopta günlük olarak takip edildi. Hücreler flask yüzeyini %80 ila %90 oranlarında doldurduğunda pasajlama işlemine geçildi. Flaskın içerisinde bulunan eski medyum uzaklaştırıldı ve hücreler PBS ile yıkandı. Ardından hücreleri buldukları yüzeyden kaldırmak için tripsinizasyon işlemine geçildi. Hücrelerin bulunduğu 75 cm² 'lik flaska 3 mL tripsin EDTA uygulandı ve hücreler 3 ila 4 dakika arası inkübatörde bekletildi. Yüzeyden ayrılan hücrelere, uygulanan tripsin EDTA'nın iki katı kadar besiyeri eklenerek enzimin inaktivasyonu sağlandı. Toplam sıvı 15 mL'lik falcona aktarılarak 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant falcondan uzaklaştırılıp pellet uygun miktarda besiyeri ile çözündürüldü. Flasklara ekim yapıldıktan sonra gerekli etiketlemeler tamamlanarak hücreler, inkübatöre kaldırıldı.

3.2.2.4 Hücrelerin Dondurulması

Bölüm 3.2.2.3' de yer alan süpernatantın uzaklaştırılması işleminden sonra hücre pelleti 1 mL'de %10 DMSO içeren FCS ile çözündürülerek özel cryovial tüpe aktarılıp, uygun etiketlemelerin ardından -80°C' de muhafaza altına alındı.

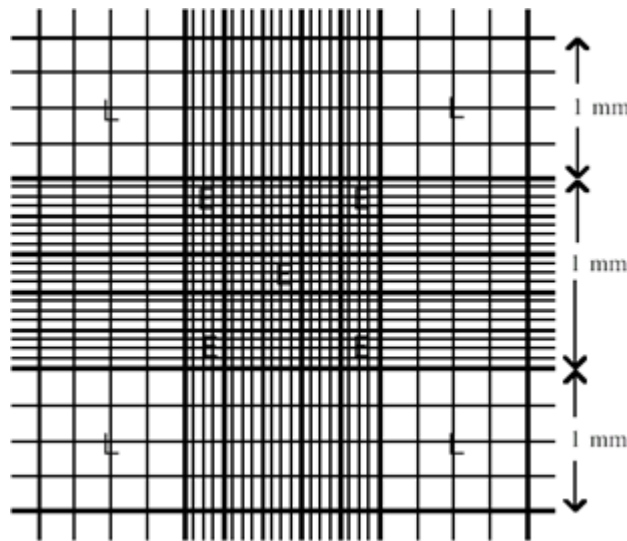
3.2.2.5 Canlı Hücrelerin Sayılması

Canlı hücrelerin belirlenmesi ve hücrelerin sayılması için tripan mavi solüsyonu ile hücre boyama tekniği kullanılmıştır. Toplamdaki hücre süspansiyonunun bir mililitresinde bulunan hücre miktarını hesaplamak için, Thoma lamı kullanıldı. Thoma lamı, üzeri 25 küçük kareden oluşan, 1 mm² alan barındıran ve 0,1 mm derinliği olan hücre sayımında tercih edilen bir malzemedir.

Flasklardan tripsin EDTA uygulanarak kaldırılan hücreler 5 dakika boyunca 1000 rpm' de santrifüj edildi. 6 ml %10 FCS içeren medyumda çözüldü. Canlı ve ölü hücreleri ayırt etmek için 10 µl hücre süspansiyonu eşit hacimde tripan mavisi solüsyonu (dilüsyon oranı 1:1) ile 4'er dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon işlemi boyunca ölü hücreler mavi renge boyanırken canlı hücrelerde ise herhangi bir renk değişimine uğramadı. Boyanmayan yani canlı olan hücreler mikroskopta dikkatlice sayıldı. Bu işlemde aynı hücre süspansiyonundan 10'ar µl hacminde üçer örnek alınmıştır, tekrarlı olarak tripan mavisi ile boyanma işlemine tabi tutulmuştur ve her boyamada 2 kez sayım yapılarak toplam 6 sonucun ortalaması ile aşağıdaki formül kullanılarak ml'deki hücre sayısı hesaplanmıştır.

Süspansiyonun 1 mililitresinde bulunan toplam hücre sayısı:

$$\text{Toplam canlı hücre sayısı/ml} = \text{Hemositometre sayım sonucu} \times 2 \times 10^4$$



Şekil 3.1: Hemositometre.

3.2.3 MTT

Hücreler 96 kuyulu kültür kaplarına her bir kuyu için 15.000 hücre olarak paylaştırıldı. Kuyular, kontrol, TGF- β , CoCl₂, TGF- β + CoCl₂ grubu olarak ayrıldı. Gerekli uygulamaların ardından kuyular 200 μ l besi yeri ile tamamlandı. Hücreler inkübatöre alındı. 24 saatlik inkübasyonun ardından her bir kuyuya 20 μ l MTT solüsyonu uygulandı. Hücreler 4 saat inkübasyonun ardından besiyerlerinden uzaklaştırıldılar. Kuyular izoproponal (0,004 M HCl içeren) ile çözdürüldü. Spektrometrede 550 nm dalga boyunda ölçüm alındı. 48 ve 72 saat grupları için de aynı işlem uygulandı.

3.2.4 RNA Çalışmalarında Kullanılan Metotlar

3.2.4.1 Sitokin Uygulama ve Hipoksi Deneyinin Kurulması

Hücreler pasajlanıp bölüm 3.2.2.5'te anlatıldığı gibi sayıldıktan sonra 5 mL besiyeri (%10 FCS + DMEM + %1 antibiyotik) içeren 25 cm² 'lik flasklara iki milyon hücre olacak şekilde aktarıldı. Hücreler 1 gece inkübe edildi. Ertesi gün eski medyum uzaklaştırıldı. Flasklara %0,1 BSA + DMEM içeren yeni besi yeri eklendi. Hücreler 1 saat inkübe edildi. Ardından hücrelere sırasıyla 500 U/mL TGF- β , 150 μ M CoCl₂ ayrı ayrı ve 500 U/mL TGF- β , 150 μ M CoCl₂ beraber olacak şekilde uygulandı. Kontrol gruplarına herhangi bir uygulama yapılmadı. Bu işlem 24, 48 ve 72 saat olmak üzere üç deney grubuna uygulandı. Tüm gruplar gerekli inkübasyon süreleri sonunda besi yerlerinden uzaklaştırıldı. Hücreler 1 mL tripsin EDTA ile flask yüzeylerinden kaldırılıp, 2 mL besiyeri ile T.E inaktivasyonu sağlanarak hücreler 15 mL'lik falconlara aktarıldı. 1000 rpm de 5 dakika santrifüj edilen hücreler, süpernatantlarından uzaklaştırıldı. Uygun etiketlemelerin ardından -80°C'de muhafaza altına alındı.

3.2.4.2 RNA İzolasyonu

Deney grupları bölüm 3.2.4.1 de bahsedilen işlemlerin ardından -80°C'den çıkarıldı. Thermo firmasının kitinde bulunan malzemeler ve talimatlar doğrultusunda RNA'lar izole edildi. İzole edilen RNA'lar ölçümleri alındıktan sonra -80°C'de muhafaza altına alındı.

3.2.4.3 RNA Miktarlarının Ölçülmesi

RNA ölçümü için spektrofotometre cihazı kullanıldı. 96 kuyulu kuvarz plate'e kör için 200 μ l, örnekler için 5 μ l rna, 195 μ l dH₂O oranında örnekler yüklendi. 260 nm ile 280 nm arasında ölçüm alındı. Miktar tayini ve örneklerin saflık analizi aşağıda belirtilen formüllerle yapıldı.

$$\text{RNA miktarı} = A_{260} \times \text{sulandırma katsayısı} \times 40 \text{ ng}/\mu\text{L}$$

$$\text{Saflık} = A_{260} / A_{280}$$

3.2.4.4 RNA Jel Elektroforezi

İzolasyonu gerçekleştirilen RNA'ların görüntülenme işlemi için Formaldehit RNA Jel Elektroforezi kullanıldı. Jelin yürütüleceği tank ve kullanılacak diğer aparatlar DEPC'li su ve etanol (%100) ile temizlenerek malzemelerin sterilizasyonu sağlandı.

Tablo 3.3: RNA jeli.

JEL	50 mL DEPC'li su 5 mL 10X FA jel tamponu 0,5 gram agaroz	10 X FA jel tamponu; 0,2 M EDTA ph:8, 1 M MOPS ph:7, 1 M NaAc	10 X FA tampon, DEPC'li su ile ph:7 olacak şekilde hazırlandı.
TANK	1X FA yürütme tamponu	1 X FA yürütme tamponu; 20 ml %37'lik 12,3 M formaldehit, 100 ml 10X FA jel tampon	1 X FA yürütme tampon DEPC'li su ile 1000 mL ye tamamlandı.

Tablo 3.3 de bahsedilen jel malzemeleri erlene aktarılıp tamamlandıktan sonra mikrodalgada kaynatıldı. Jel ılıması için beklemeye bırakıldı. Buharlaşıma kesilince jele 900 µl formaldehit ve 1 µl etidyum bromür eklendi. Ardından jel, donması için kasete döküldü. RNA örnekleri 5 µl örnek 3 µl 2X yükleme boyası oranında birleştirilerek jel kuyularına yüklendi ve 90 V'da yürümeye bırakıldı. Yürütme işleminin ardından UV de görüntüleme alındı.

3.2.4.5 cDNA Sentezi

Elde edilen RNA'lar bölüm 3.2.4.3'de belirtildiği gibi hesaplandı, son konsantrasyonları 1000ng olacak şekilde PZR tüplerine hesaplanarak uygun hacimlerde alındı. Kitteki protokol ve malzemeler gerektiği gibi uygulanarak, cDNA sentezi gerçekleştirildi.

Tablo 3.4: cDNA sentezi 1. basamak.

Malzemeler	Konsantrasyon
Kalıp RNA	1 µg
Oligo dT	200 pmol
dH ₂ O	X mL
Toplam hacim	12.5 µg

cDNA sentezinin birinci basamağında tablo 3.4’de verilen oranlar kullanıldı. İşlem 65° C’de 5 dakikaya ayarlanmış PZR cihazına konularak tamamlandı. Sentez basamağının ikinci kısmında ise tablo 3.5’de verilen oranlar kullanıldı. Cihaz 42° C’de 60 dakika, 70° C’de 10 dakika olarak ayarlanarak sentezin son basamağı tamamlandı.

Tablo 3.5: cDNA sentezi 2. basamak.

Malzemeler	Konsantrasyon
dNTP	1 mM
5X Reaction Buffer	1X
Ribolock RNAz İnhibitör	20 U/μL
Revers Transkriptaz	10 U/μL
Toplam hacim	20μL

3.2.4.6 Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

HT-29 hücrelerinden elde edilen cDNA’ların Hβ2 ekspresyon primerleri ile polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirildi. Daha sonra aynı cDNA’lar, spesifik olarak tasarlanan ADAMTS-5 ekspresyon primerleri ile PZR işlemine tabi tutuldu. PZR koşulları tablo 3.6’da gösterilmiştir.

Tablo 3.6: Polimeraz Zincir Reaksiyon bileşenleri ve miktarı.

Malzemeler	Pozitif Kontrol	Negatif Kontrol
cDNA	1 μl	-
10X Taq Buffer	5 μl	5 μl
MgCl ₂ (25mM)	2 μl	2 μl
dNTP mix (10mM)	1 μl	1 μl
Forward primer(100 pmol/uL)	1 μl	1 μl
Reverse primer(100 pmol/uL)	1 μl	1 μl
Taq Polimeraz (5U/μl)	0,5 μl	0,5 μl
dH ₂ O	38,5 μl	39,5 μl
Toplam hacim	50μL	50μL

Tablo 3.7: Çalışmada kullanılan İnsan- β -2 Mikroglobulin ($H\beta_2$) primerleri ile kurulan PZR.

Sıcaklık	Süre	Döngü
95°C	5 dakika	1 döngü
95°C	30 saniye	
60°C	1 dakika	35 döngü
72°C	2 dakika	
72°C	8 dakika	1 döngü

Tablo 3.8: Çalışmada kullanılan ADAMTS-5 ekspresyon primerleri ile kurulan PZR.

Sıcaklık	Süre	Döngü
94°C	5 dakika	1 döngü
94°C	45 saniye	
55°C	45 saniye	35 döngü
72°C	45 saniye	
72°C	10 dakika	1 döngü

3.2.4.7 Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz jel elektroforezi yöntemi kullanılarak PZR ürünlerinin görüntülenmesi sağlandı. %0,8 agaroz içeren jel için gerekli miktarda agaroz tartılarak 0,5 X TBE ile karıştırıldı. Karışım, mikrodalgada kaynatılarak homojenizasyon sağlandı. Jelin ısı oda sıcaklığına ulaştığında etidyum bromür (son konsantrasyon 0,5 μ g/mL) eklenerek gerekli mekanizmalara sahip olan jel kasedine döküldü. Donma işleminin ardından mekanizmadaki taraklar çıkartıldı. Jel 0,5 X TBE tamponu ile doldurulmuş olan elektroferez tankına yerleştirildi. Örnekler 6X loading dye ile boyanma işleminin ardından jele yüklenerek, 90 Volt da 35 dakika yürütüldü. Yürütülmesi tamamlanan jel görüntüleme cihazında fotoğraflandı.

3.2.4.8 Real Time PZR

Real Time PZR, Roche Diagnostic (Light Cycler 485) markalı cihaz kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 96'lık well plate'e her bir kuyucuk son hacimde 10 μ l olacak şekilde yükleme yapılmıştır. Kuyularda baloncuk oluşmaması için yükleme işlemi buna uygun bir biçimde yapılmıştır. Cihaza verilmeden önce plate'in üzerine seal kapatılarak, uygun bir aparat yardımı ile plate ve sealın düzgün bir biçimde birbirine yapışması sağlanmıştır.

ADAMTS-5 ve H β 2 (İnsan beta-2 mikroglobulin) primerleri 3 tekrarlı, HIF1- α primeri 2 tekrarlı olarak çalışmaya alınmıştır. Her çalışma birbirinden bağımsız en az 2 kez tekrarlanmıştır. qRT-PZR’da kullanılan bileşenler ve koşullar sırasıyla tablo 3.9 ve 3.10’da belirtilmiştir.

Tablo 3.9: qRT-PZR bileşenleri.

PZR Bileşenleri	Hacim
dH ₂ O	3 μ l
SYBR® Green PZR Master Mix	5 μ l
Forward Primer (100 ng/ μ L)	0,5 μ l
Reverse Primer (100 ng/ μ L)	0,5 μ l
cDNA	1 μ l
Toplam hacim	10 μ l

Tablo 3.10: qRT-PZR koşulları.

	Sıcaklık	Zaman	Döngü sayısı
Denatürasyon	94 °C	5 dk	1 döngü
Denatürasyon	94 °C	45 sn	
Bağlanma	55 °C	45 sn	40 döngü
Uzama	72 °C	45 sn	
final uzama	72 °C	10 dk	1 döngü
	65 °C	1 dk	

Tablo 3.11: Çalışmada kullanılan ekspresyon primerleri.

Gen	Primer Dizi	T _m (°C)
ADAMTS-5	Forward Primer: 5’- TATTATTCAACGTCAAGCCATGGCA- 3’	57.1
	Reverse Primer: 5’-TGGCAGGACACCTGCATATTT-3’	56.9
H β 2	Forward Primer: 5’-TTTCTGGCCTGGAGGCTATC-3’	60
	Reverse Primer: 5’-CATGTCTCCATCCCACTTAACT-3’	60

Tablo 3.11: (devam).

HIF-1α	Forward Primer: 5'-CCACCTATGACCTGCTTGGT-3'	56.9
	Reverse Primer: 5'-TGTCCTGTGGTGACTIONGTCC-3'	56.9

Livak metodu kullanılarak Real Time PZR sonuç değerlendirmesi yapıldı. ADAMTS-5 ve HIF1- α için elde edilen Ct (cycle threshold) değerleri, internal kontrol olarak kullanılan H β 2' nin Ct değerinden çıkarılarak elde edilen sonucun 2 tabanında kuvveti alındı. Kontrol grubu olarak adlandırılan gruplar kendi değerlerine bölünerek "1" birim olarak değerlendirildi. Her bir deney grubunun değeri kendi kontrol grubunun değerine bölünerek 1'in bir katı olacak şekilde sonuçlar elde edildi. MiniTab programı ile değerlerin istatistiksel analizleri yapıldı. $p \leq 0,05$ olarak ulaşılan durumlar istatistiki olarak anlamlı kabul edildi.

3.2.5 Protein Çalışmalarında Kullanılan Metotlar

3.2.5.1 Ripa Buffer İle Pelletlerin Eldesi

-80°C'de muhafaza edilen hücre pelletleri çıkartılarak pelletlerin (buz üzerinde) erimesi sağlandı. Eriyen pelletlerin üzerine 100 μ l RIPA tamponu eklenerek, pelletlerin süspanse hale getirilmesi sağlandı. Pelletler 45 dakika boyunca buz üzerinde beklemeye bırakıldı. Bu sürenin ardından örnekler pipetaj yapılarak eppendorflara aktarıldı. Bu işlemin ardından eppendorflar +4°C'de Sigma marka soğutmalı santrifüj cihazına alınarak 1200 g de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatantlar temiz eppendorflara alındı. Örneklerin bir kısmı konsantrasyonlarının belirlenmesi için ayrılırken kalan miktar muhafaza edilmek üzere -80'e kaldırıldı.

3.2.5.2 Bradford Yöntemi İle Protein Miktar Tayini

Proteinlerin konsantrasyonlarının belirlenmesi Bradford metodu ile gerçekleştirildi. Kör için 5 μ l dH₂O, diğer kuyulara 3 μ l protein, 2 μ l dH₂O olacak şekilde ilgili proteinlerin yüklemeleri yapıldı. Ardından karanlık bir odada son hacim 255 μ l olacak şekilde kuyucukların üzerlerine 250 μ l Bradford boyası ilave edilerek proteinler 5 dakikalık inkübasyona bırakıldı. Bu işlemin ardından spektrofotometre cihazında 595 nm dalga

boyunda ölçüm alındı. Elde edilen değerlerle Bradford standart eğrisi oluşturularak denkleme göre (değer-kör, $y=0,0008x - 0,0016$) hesaplamalar yapıldı. Ardından 25 µg, 30 µg ve 50 µg için ayrı ayrı hesaplamalar yapılarak uygun konsantrasyonda protein yüklemesi yapılmıştır.

3.2.5.3 Western Blot Tekniğinde Kullanılmış Olan Solüsyonlar

Kullanılan stok solüsyonlar ve bilgileri aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 3.12: Western Blot stok solüsyonları.

Ayırma Jeli (SDS PAGE) Tamponu	%10 (w/v) SDS, 1.5 M Tris-HCl (pH: 8.8)
Yığıma Jeli (SDS PAGE) Tamponu	%10 (w/v) SDS, 1 M Tris-HCl (pH: 6.8)
Yürütme Tamponu (SDS PAGE)	250 mM Glisin, 25 mM Tris, %0.1 (w/v) SDS
4 X Laemli Tampon	%4 (w/v) SDS, %10 (v/v) Gliserol, 0.125 M Tris-HCl (pH:6.8), %10 (v/v) β-Merkaptoetanol
RIPA Solüsyonu	10 mM Tris-HCl (pH:8), % 1(v/v) Triton X100, %0.1 (v/v) sodyum deoxycholate, 1mM EGTA, 1mM EDTA, 140 mM NaCl, proteaz inhibitörü, %0.1 (v/v) SDS
Western Blot Transfer Tampon	192 mM Glisin, 25 mM Tris, %20 (v/v) Metanol
10X Tris Tampon Tuz (TBS)	20 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH: 7.4
Stripping Tampon	1 M Glycine, %1 SDS, pH: 2.5
Ponceau Boyası	10 ml dH ₂ O, 300 µL glasiyel asetik asit, 0.033 g Ponceau boya karıştırılıp saf su ile 30 mL'ye tamamlandı.

3.2.5.4 SDS Page Jel Elektroforezi

Western Blot için gerekli olan cam malzemeler ve diğer aparatlar öncelikli olarak %70'lik etanol ile temizlenip ardından distile su ile yıkanarak kurumaya bırakıldı. Kullanılacak

camlar birbirlerine yapıştırılıp ilgili düzeneğe yerleştirildi. Daha önceden hazırlanıp otoklavlanmış olan stok solüsyonlar ile ilk olarak ayırma jeli (Tablo 3.13) hazırlandı. Bir pipet yardımıyla camların arasından bırakılan karışımın yüklemesi yapılırken camın üst kısmına doğru 3 cm boşluk bırakılmasına dikkat edildi. Herhangi bir hava kabarcığının oluşumunu önlemek için, boşluk bırakılan kısma %90'lık izoproponal yüklemesi yapılarak istenilen pürüzsüz görünüm sağlandı. Ayırma jeli donduktan sonra üzerinde bulunan izoproponal ortamdan uzaklaştırılarak yerine üst jel olarak da adlandırılan yığma jeli döküldü. Örneklerin yükleneceği kuyucukların oluşması için henüz donmamış olan jele uygun bir tarak yerleştirildi. Yığma jelinin donma işlemi tamamlandıktan sonra tarak dikkatli bir şekilde çıkartıldı, jel tankın içine yerleştirildi. Ayırma ve yığma jelleri tablo 3.10'da belirtildiği gibi hazırlanmıştır. Protein örnekleri son konsantrasyonda 30-50 µg olacak biçimde alınarak beta-merkaptan etanol ve 4X Laemli buffer karışımı ile birleştirildi. Örnekler 95°C'lik su banyosunda 5 dakikalık inkübasyona bırakıldı. Bu işlemin ardından jelin ilk kuyusunda marker devamına ise inkübasyonu tamamlanan protein örnekleri yüklendi. Jelin bulunduğu tank %1 SDS içeren 1 X yürütme tamponu ile dolduruldu. Örnekler 90 V'de 120 dakika yürütüldü.

Tablo 3.13: SDS Page ayırma ve yığma jelleri bileşenleri.

Jel İçerik Bilgisi	%10 Ayırma (Alt) Jeli	%5 Yığma (Üst) Jeli
Ayırma Jeli	2,5 mL	-
Yığma Jeli	-	2,5 mL
Akrilamid-Bisakrilamid (37.5:1)	2,5 mL	1,25 mL
%10 (w/v) Amonyum Per Sülfat (APS)	100 µL	100 µL
ddH ₂ O	5 mL	6,25 mL
TEMED	10 mL	5 mL

3.2.5.5 Protein Örneklerinin Membrana Transferi

Membrana transfer işleminde kullanılacak olan sünger, kurutma kağıdı vb. malzemeler taze olarak hazırlanıp soğutulmuş olan transfer bufferda ıslatıldı. Yürütme işlemi tamamlanan jeller sıkıştırıldıkları cam aparatından ayrıldı. Diğer cam yüzeye yapışık olan jel,

yığma jeli olarak adlandırılan kısımdan temizlenerek, sünger ve kurutma kağıdından oluşan (ıslak) düzeneğin üzerine aktarıldı. Transfer işleminde kullanılacak olan PVDF membran uygun boyutta kesilip 1 dakika metanolde bekletilmesinin ardından jelin üzerine kapatılarak sandviç modeli oluşturuldu. Membranın yerleştirilmesinin ardından üzerine tekrar kurutma kağıdı ve sünger kapatılarak bir sandviç modeli oluşturuldu. Tüm hazırlıkları tamamlanan sandviç, soğuk transfer tamponu ile doldurulan transfer tankına alındı. Örnekler 24 saat boyunca 15 Volt da +4°C’de transfere bırakıldı.

3.2.5.6 Protein Örneklerinin Tespit Edilmesi ve Görüntülenmesi

Membranlar transfer sisteminden çıkartılarak bloklama solüsyonuna (%5 süt tozu içeren 1X TBS ve %1’lik Tween 20) alındı. Oda sıcaklığında 1 saat boyunca horizontal çalkalayıcıda işleme tabi tutuldu. 60 dakika sonra bloklama solüsyonu ortamdan uzaklaştırılarak membranlar 5 dakika boyunca 3’er defa 1X TBS (%0,1 Tween 20 içeren) karışımı ile muamele edildi. Yıkama işleminin ardından PVDF membran, ADAMTS-5 primer antikoru (Thermo Fisher Lot # SC250764) ile 1 gece boyunca +4’de horizontal çalkalayıcıda işleme alındı. Ertesi gün membran gerekli yıkamaların ardından oda sıcaklığında 1 saat boyunca sekonder antikör (Santa-Cruz Biotechnology Lot #02111) ile işleme tabi tutuldu. Süre bitiminde sekonder antikörden alınan membranlar %0,1 Tween20 içeren 1X TBS ile gerekli yıkamalara tabi tutuldu. Ardından 1’e 1 oranında Reagent A ve Reagent B ile ECL solüsyonu (thermo marka) hazırlandı ve membran bu solüsyona en az 3 dakika karanlık bir ortamda tabi tutuldu. Son olarak görüntü alma işlemi UVP görüntüleme cihazında gerçekleştirildi. Aynı işlemler β -actin antikoru(Sigma Lot # 039M4768V) ile de yapılarak elde edilen görüntülerin Image J programı kullanılarak densitometrik analizleri yapıldı. ADAMTS-5 ışıma değerleri, β -actin bant ışıma değerleri ile normalize edildi.

4. BULGULAR

4.1 ADAMTS-5 Geninin Biyoinformatik Analizi ve Primer Dizayını

İnsan ADAMTS-5 geninin accession numarası (NM_007038.5) ile NCBI veri tabanından şekil 4.1’de gösterilen mRNA dizisine ulaşılmıştır. Ekspresyon çalışmaları için ADAMTS-5 geninin Homo sapiens ADAM Metallopeptidase With Thrombospondin Type 1 motif 5 (ADAMTS-5), mRNA dizisine bakılarak (4. ve 5. ekzonlardan) forward ve (6.ekzondan) reverse primerleri tasarlanmıştır. Housekeeping gen olarak human beta mikroglobulin (H β 2) ekspresyon primeri kullanılmıştır.

```
1 acagcgcctcg cgctgctctc ggcgctcgca gctgccgact ggggatgacg gcgggcagga
61 ggagaccgca gccgaaggga cacagacacg ccgcttcacc agctcgccctc aggetgcccc
121 cctgcatthtt tgtthtaatt thttacggctt thttccctct ctttcttccc thctctctgg
181 tcccagcaga gccaaaggaaa cccacaaaat aagaaaggaa gtgggccccg gagcttgaa
241 cctccacagc cggcttgctc agcgcagcgc gggggcggga ggctgcccgc accagttgcc
301 agcccggctg cgggtacctt tccttacttt tcttgaaaca gcgatcgtgc ctgcatthgg
361 tggthththt gththththt thttccttht cccgtattht ctgaatctcc actatccgac
421 ththththth taatctthtc thttcccccc cccccacccc acctctthct ggagcacgaa
481 tccaaacatt thcccaagca acaaagaaaa gttcgcacgc tggcaccgca gcccgacag
541 gctggcgcctg ctgccgggccc cccctccctc cgacacttga ctcaatcctg caagcaagt
601 tgtgtgtgtc cccatcccccc gccccgttaa cttcatagca aataacaaat acccataaag
661 tcccagtcgc gcagcccctc cccgcgggca gcgcactatg ctgetcgggt gggcgtccct
721 gctgctgtgc gcgttccgcc tgcccctggc cgcggtcggc cccgcgcgca cacctgccca
781 ggataaagcc gggcagcctc cgactgctgc agcagccgc cagccccgc gccggcagg
841 ggaggaggtg caggagcag cagcagcctc cggccacccg caccctctgg cgcagcggcg
901 caggagcaag gggctggtgc agaacatcga ccaactctac tccggcggcg gcaaggtgg
961 ctacctcgtc tacgcgggcg gccggaggtt cctcttggtc ctggagcag atggttcggt
1021 gggcattgct ggcttcgtgc ccgcaggagg cgggacgagt gcgccctggc gccaccggag
1081 ccaactgctt tatcggggca cagtggacgg tagtccccgc tctctggctg tctthgacct
1141 ctgtgggggt ctgcagcggc thttcgcggc caagcacgcg cgtacacccc taaagccact
1201 gctgcgcgga ccctgggccc aggaagaaaa ggggcgcgtg tacggggatg ggtccgcacg
1261 gatcctgcac gtctacaccc gcgagggctt cagcttcgag gccctgccgc cgcgcgccag
1321 ctgcgaaacc cccgcgtcca caccggaggc ccacgagcat gctccggcgc acagacccc
1381 gagcggacgc gcagcactgg cctcgcagct cttggaccag tccgctctct cgcctctgg
1441 gggctcagga ccgcagacgt ggtggcggcg cgggcgcgc tccatctccc gggcccgcca
1501 ggtggagctg cttctggtgg ctgacgcgtc catggcggcg ttgtatggc gggcctgca
1561 gcattacctg ctgaccctgg cctccatcgc caataggctg tacagccatg ctgcatcga
1621 gaaccacatc gccttgcccg ttgtgaaggt ggtggtgcta ggcgacaagg acaagagcct
1681 ggaagtgagc aagaacgctg ccaccacact caagaactth tgcaagtggc agcaccaaca
1741 caaccagctg ggagatgacc atgaggagca ctacgatgca gctatcctgt thactcggga
1801 ggatttatgt gggcatcatt catgtgacac cctgggaatg gcagacgttg ggaccatag
1861 thctccagag cgcagctgtg ctgtgattga agacgatggc ctccacgcag cttcactgt
1921 ggctcacgaa atcggacatt tacttgccct ctccatgac gattccaaat tctgtgaaga
1981 gacctthtgg tccacagaag ataagcgtt aatgtcttc atccttacca gcattgatgc
2041 atctaagccc tggthcaaat gcacttcagc caccatcaca gaattcctgg atgatggcca
2101 tggtaactgt thgttgacc taccacgaaa gcagatcctg ggcgccgaag aactcccagg
2161 acagacctac gatgccaccc agcagtgcaa cctgacattc gggcctgagt actcctgtgt
2221 tcccggcatg gatgtctgtg ctgcctgtg gtgtgctgtg gtacgccagg gccagatggt
```

Şekil 4.1: İnsan ADAMTS-5 geni NCBI dizisinden belirlenen primer bölgeleri (exon1: sarı, exon2: açık yeşil, exon3: turkuaz, exon4: kırmızı, exon5: pembe, exon6: gri, exon7: yeşil, exon8: deniz mavisi) [58].

2281 ctgtctgacc aagaagctgc ctgcggtgga agggacgcct tgtggaaagg ggagaatctg
 2341 cctgcagggc aaatgtgtgg acaaaaccaa gaaaaaa **TAT TATTCAACGT CAAGCCATGG**

Forward primer

2401 **CA**actgggga tcttggggat cctggggcca gtgttctcgc tcatgtggag gaggagtgca
 2461 gtttgcctat cgtcactgta ataaccctgc tcccagaaac aacggacgct actgcacagg
 2521 gaagagggcc atctaccgct cctgcagtct catgcctcgc ccaccaatg gtaaatacatt
 2581 tcgtcatgaa cagtgtgagg ccaaaaatgg ctatcagtct gatgcaaaag gagtcaaaac
 2641 ttttgtggaa tgggttccc **A AATATGCAGG TGTCTGCCA** gcggatgtgt gcaagctgac

Reverse primer

2701 ctgcagagcc aagggcactg gctactatgt ggtatthttct ccaaaggtga ccgatggcac
 2761 tgaatgtagg ctgtacagta attccgctctg cgtccggggg aagtgtgtga gaactggctg
 2821 tgacggcatc attggctcaa agctgcagta tgacaagtgc ggagtatgtg gaggagacaa
 2881 ctccagctgt acaaagattg ttggaacctt taataagaaa agtaagggtt acactgacgt
 2941 ggtgaggatt cctgaagggg caaccacat aaaagtctga cagttcaaag ccaaagacca
 3001 gactagattc actgcctatt tagccctgaa aaagaaaaac ggtgagtacc ttatcaatgg
 3061 aaagtacatg atctccactt cagagactat cattgacatc aatggaacag tcatgaacta
 3121 tagcggttgg agccacaggg atgacttcct gcatggcatg ggctactctg ccacgaagga
 3181 aattctaata gtgcagattc ttgcaacaga cccactaaa ccattagatg tccggtatag
 3241 cttttttggt ccaagaagt ccaactcaaa agtaaactct gtcactagtc atggcagcaa
 3301 taaagtggga tcacacactt cgcagccgca gtgggtcacg ggcccatggc tcgctgctc
 3361 taggacctgt gacacagggt ggacacccag aacggtgcag tgccaggatg gaaaccggaa
 3421 gttagcaaaa ggatgtcctc tctccaaaag gccttctgcg ttaagcaat gcttgttgaa
 3481 gaaatgttag cctgtgggta tgatcttatg cacaaagata actggaggat tcagcactga
 3541 tgcagtcgtg gtgaacagga ggtctaccta acgcacagaa agtcatgctt cagtgcatt
 3601 gtcaacagga gtccaattat gggcagaatc tgctctctgt gacaaaaga ggatgtgcac
 3661 tgcttcacgt gacagtggtg accttgcaat atagaaaaac ttgggagtta ttgaactcc
 3721 cctgggctta caagaaacac tgatgaatgt aaaatcaggg gacattgaa gatggcagaa
 3781 ctgtctcccc ctgtcacct acctctgata gaatgtcttt aatggatca taatcatttt
 3841 caccataat acacagtagc ttcttcttac gtgttgtaaa tacattctcc cttggtagt
 3901 cactttatat cccctgggtc tattaaaata tccatatata tttctataaa aaaagtgttt
 3961 gaccaaagta ggtctgcagc tatttcaact tccttccggt tccagaaaga gctgtggata
 4021 ttttactgga aattaagaac ttgctgctgt tttaataaga tgtagtatat tttctgacta
 4081 caggagataa aatttcagtc aaaaaacat tttgacagca agtatcttct gagaaattht
 4141 gaaaagtaaa tagatctcag tgtatctagt cacttaaata catacacggg ttcatttact
 4201 taaacctttg actgcctgta tttttttcag gtagctagcc aaattaatgc ataatttcag
 4261 atgtagaagt aggttttgcg tgtgtgtgtg tgatcact caagagtcta aaaactagtt
 4321 tccttgtgtt ggaaatttaa aaggaaaaaa atcgtatthc actgtgttht caatttatat
 4381 tttcacaact actttctctc tccagagctt tcatctgata tctcacaatg tatgatatac
 4441 gtacaaaaca cacagcaagt tttctatcat gtccaacaca tccaacactg gtatacctcc
 4501 taccagcaag cctttaaaat gcattttgtg ttgcttattt gttttgttca agggttcagt
 4561 aagacctaca atgttttgta tttcttgact tathttatta gaaacattaa agatcacttg
 4621 gtagttagcc acattgagaa gtggttatca ttgttaatgt ggtaaatgcc aaaaagtgg
 4681 taatattaat aagactgttt ccacaccata ggcaataat tcttaattta aaaaacttaa
 4741 gtatattcct attgtactaa atathtttcc caactggaaa gcacttgatt gtaccgtaa
 4801 gtgtttgagt gatgacatgt gatgattttc agaaagtgtg tgtttttgtt tccatagcct
 4861 gtttaagtag gttgtaagtt tgaatagtta gacatggaaa ttathttata agcacacacc
 4921 taaagatata tttttagatg ataaaatgta ccccccca tcaccaacct cacaacttag
 4981 aaaatctaag ttgtttgatt tctttgggat tctttttgtt gtgaaacact gcaaagccaa
 5041 tttttcttta taaaaattca tagtaatcct gccaaatgtg cctattgtta aagatttgca
 5101 tgtgaagatc ttagggaacc actgtttgag ttctacaagc tcatgagagt ttathtttat
 5161 tataagatgt ttttaataata aaagaattat gtaactgatc actatattac atcatttcag
 5221 tgggcccagga aatagatgt cttgctgttt tcagtattht ctaagaaat tgctthttaa
 5281 acaataaatt gttttacaaa accaataat atcctttgaa ttttcataga ctgactttgc
 5341 ttttgacgta gaaatthttt ttctcaataa attatcactt tgagaaatga ggctgtaca

Şekil 4.1 (devamı).

```

5401 aggctgataa cctatatgtg atggagatca cccaatgcc aaggcagaaa gcaaacctag
5461 ttaaatagggt gagaaaaaaaa ataataatcc cagtgccatt tgtctgtgca aagagaatta
5521 ggagagaggt taatgttact tttttccatt ttggaaataa ttttaataca gtaactcaaa
5581 tgtgacaaaa tttatTTTTta ttttttTgtg ttatatccca aacaacatta aaaaatactc
5641 gaggcataaa tgtagtTgtc tctactctcg cttctcttac tatactcata catttttaat
5701 atggtttatc aatgattcat gtttccctca aatagtTgat gtttacacct gtcatggaaa
5761 caatcctaga gagctcagag caattaaacc actattccat gcttttaagt agttttctcc
5821 acctTTTTtct tatgagtctc actagattga ctgaggaatg tatgtctaaa ttctTggaga
5881 agatgatatg gattggaaac tgaaattcag agaaatggag tgttcaatag ataccagaa
5941 ttgtgaacaa agggaaaatt ctatacaact caatctaagt cagtccactt gacttcgta
6001 ctgtctttca cttttccatt gtTgcatctt gaatTTTTta aaatgtctag aattcaggat
6061 gctaggggct acttctttta aaaaaaaaaa aaaaaagaat tctgtctgaaa atgctcaggT
6121 ttgtaagaat ctaatctcac ttacataact aagcactcca taataagttt tattaagTac
6181 aaagggagcc agaaaaaatg acatttattt cttctagatc agaaaaattt aaattaagcc
6241 ctgcctTgtc gtttagaaat atgtgggcat Tgttataatt tattcaataa atttatgttc
6301 ctttgctTtc ctgtggaaac agttttatcc cactaaacta ggaattaggg gataaatcac
6361 aaacaaaaaa aaagttgcag cactgaaaaa aagtaattta ttgtttTgc aactggTatg
6421 tgaattTgtg tgataaaatt atttattctt atttaacaaa aatatgttca aatTTTTcta
6481 tatttaaaat gttttgctgt Tgtcctactt ttaatttat gcttcatgtt Tgtgtataaa
6541 gtacactTtt acactttgtg agtttacata atatacagca ctggTtgctt Tgtattttt
6601 ttacagaaaag ctttctgtgt gaagcaggTg tatatgtata tattcctcat gtattcttat
6661 tctgatacta tcattTTTTtct ttccaaggaa attttaatct gTcatgacca atagtTtca
6721 ttactTgtgc ctatgataat aggtTTTTta catcacatta acactatttt ttccaagtca
6781 caaataagaa aaacacttat tcaatgaaac aagTgcaag ttttaaattt gggTacacaa
6841 atagcctaga agcttccTac agacgctaag acacagccaa taatcagatc ctttacttc
6901 atcgagaaac ttggacaagt cgatattgat gtattagatg aaagTtTgtc acacaaact
6961 tctgagggat acaaacgata ataaaaccaa atgtTgtctg tttctcctt agaaacact
7021 cctaaaaatta atatcattta gtctctagtT tctgtaggat tctacagatg agcacaataa
7081 gattgggttt tgataacaaa TgtctaagtT cataactgtt tctacaaata tgggtTgtcc
7141 attaagagaa Tgtgatgttt tctactgtcT gttgaatccc atgggtTgat tataggactt
7201 gaaataggca gagTcacctc Tgatgacatc agctTgcctc TgtgattTca cagtctgatc
7261 ctggcaacaa gacaaagcac cctTggacac acagccaatc tctggTtTgt atatttcccc
7321 attgattcct tcctTgttaa caagTcatt ttaatggTtc aggtgaggac agcagccaga
7381 ttcaaagtcc agaattTgtg ctgttacata gagTtcacac Tgtcaaataa cattgaattt
7441 aataatgatc aaatTTTTtct agtagctTtt ggcaagTgt ataatctcat Tggcatgatt
7501 ggtgaatatt actaatctct ttataatgaa agatgctTta caaatacctt atattTgcta
7561 acatttcaaa actactaaat aaatgaaata gccatgtgta cagaaatggT catttaaagc
7621 tttaatagaa ccaaattcaa gacaatgtat catttagaca cacagaaaag gaactTgtat
7681 gttttcccta ttattTTTTtct cattTgccaa caatctatag ttttaggtta tcaaacagat
7741 agatcaactt aactggctag tacattgaaa aatcttccca agaatccttT gtagcataa
7801 tctatagaga taatttctca aattatatca tcatgatgca tataaactct ataatgtata
7861 attgtgtTtc atttattTta Tgtatgagaa catattgaaa taaaaacca Tgcattagcc
7921 aaaaaattgg aatacaggta gtgttcagat cagcaaaaca ttcagtctgg taaatgctgT
7981 cctggggcta Tgatatcatt ctcaatgcag gttttatgga aaaactaaaa gaatagtTg
8041 ttagatgatg ttggTTTTga aaaaaaaaaa acattaacat acacattagt tagcccagTt
8101 aattgcattc tactaatata gtTgcacatt agcaataatt ttgctgtctc TggTctttat
8161 tttgtggctt caactaactg gacctgtgg actgTaaagg tcaaatggaa aaaacgagca
8221 gtggccccctc atcctgtaaG gtactgtctac atcagagtga cctaaaagTc taacactgtg
8281 aggaaaactg TgattTgtag gaaaaaaaaa aaaaacaaat aaaaaacagg gcatgctTtt
8341 taatTTTTttt ccactttcct ttggcacacc caatgaacaa ttctaatttt tattgaggTg
8401 ctaacatctt tctgtaccga ctgtcaaatg TggTattttt gagTtactat ttttctacat
8461 gattttacag tttgcaagaa agacctctaa gctttTgtc acggtagggc acaactTgat
8521 actcaaaatt Tgaaaaataa gcacatccaa TgattgtTtt gaccaacagT ggtcagTgac
8581 gTaaactgca Tgtgcatctg aggacattta agggTcatt aaaattTgag gagcatcagg
8641 ccggagtagc agactTTtag atgagTcata tttcagcatt cactaagTcc tcagcattcc
8701 attcaaaactg tctgttatat ttggcctgat ttttttcaa gctttgcaat aatttatgtt
8761 attggTaaac actTggTgac tataTctcag cttttcttt aacaactcac aatatattag
8821 aaacacgtct acctatactg agagtatatt tacaatagaa gaacatactg tatgtgactt
8881 TgTaaagcta gactTTTgat taagaaaatT ataatctctg gatgctattt ttgcattata

```

Şekil 4.1 (devamı).

```

8941 cactcaggca caacgtaaac cttgatggct catcttgcta caattacgag ttgaaaaaca
9001 ctacttacgt atttgatga cctattagtc agaggaaatc atacatatgc ttgtaaata
9061 gactttgcag ataactaaat agactgaaga aatatggtgc atttgataga agcaattgca
9121 taaatatttg gtttctatat tagagtctgt gagtaaagtc aagtaataaa cctaagtagg
9181 tataacagat ttttaaacct tgaaacttgc ttgatggta gagaaaatca ttgaagattt
9241 acatactgta tataagatgt aaaatgtacg ctgcttatta cctcaattt tccagaagca
9301 atggtatata atgcagttga aaaacaaaa atcttgaaa actaagacgg gtcttgttta
9361 aaatgtctct cagctttggc aaccttcaaa tcttaatcaa ctatttaaag cattactgtg
9421 tctttagacc tgcattccac aacagctctg ttattcaggt aaaagacttg aactgagccg
9481 ttgggacct atactgtaat attttcattg aggaacaata tcctattttg taaagcattt
9541 ccctatgtgt gactttaaac tgtaaaatta aacactgctt ttgtgggttc agtgggcata
9601 ataaatataa attgtaaact a

```

Şekil 4.1 (devamı).


Tablo 4.1: Primer dizaynı için kullanılan diziye ait ekzonlar ve karşılık geldikleri baz aralıkları.

EKZON	KARŞILIK GELDİĞİ BAZ ARALIĞI
1	1...1801
2	1802...1934
3	1935...2102
4	2103...2386
5	2387...2570
6	2571...2746
7	2747...2922
8	2923...9621

ADAMTS-5 ekspresyon primerinin biyoinformatik analizi için www.idtdna.com adresinde yer alan araçlardan biri olan OligoAnalyzer Tool 'dan yararlanılmıştır.

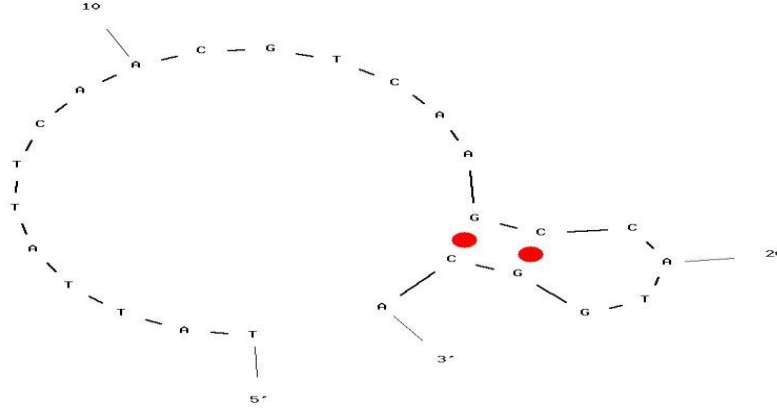
SEQUENCE	5'- TAT TAT TCA ACG TCA AGC CAT GGC A -3'
COMPLEMENT	5'- TGC CAT GGC TTG ACG TTG AAT AAT A -3'
LENGTH	25
GC CONTENT	40 %
MELT TEMP	64.1 °C
MOLECULAR WEIGHT	7625 g/mole
EXTINCTION COEFFICIENT	245000 L/(mole-cm)
nmole/OD ₂₆₀	4.08
µg/OD ₂₆₀	31.12

Şekil 4.2: ADAMTS-5 forward primer 25 baz uzunluğunda %40 GC içeriğine ve 64.1°C T_m sıcaklığına sahiptir.

structure	Image	ΔG (kcal.mole ⁻¹)	T _m (°C)	ΔH (kcal.mole ⁻¹)	ΔS (cal.K ⁻¹ .mole ⁻¹)	Output
1		-1.76	46.3	-26.4	-82.64	<input type="button" value="Ct"/> <input type="button" value="Det"/>

Output of s1r_graph (C)
wFoldUtil 4.5

Created Sun Dec 6 05:46:07 2020




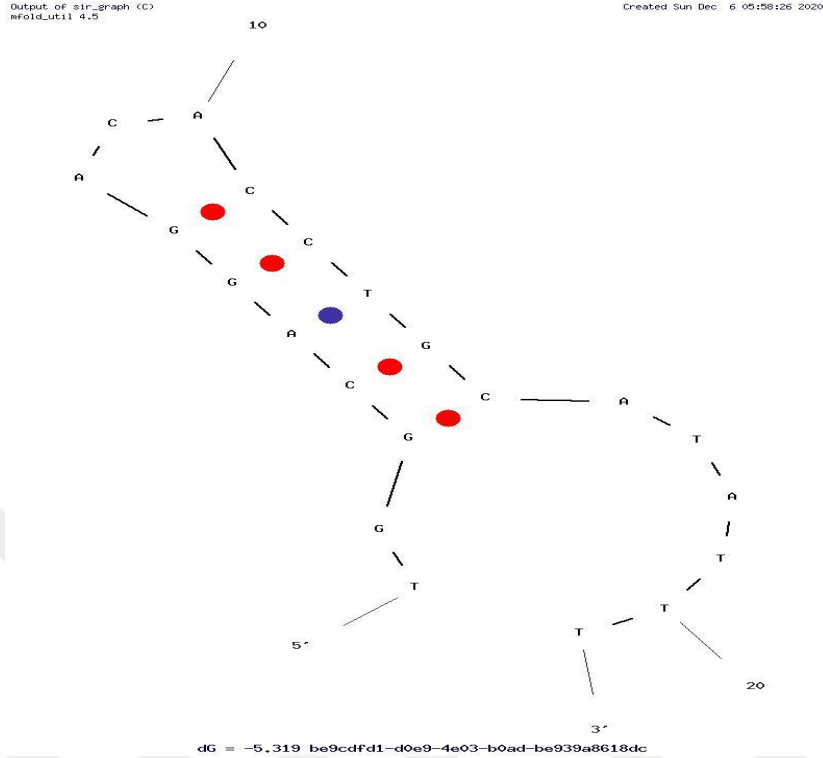
dG = -1.262 f9ee1e46-18ab-44c1-91cb-4991717f35cf

Şekil 4.3: ADAMTS-5 forward primeri hairpin yapıları.

SEQUENCE	5'- TGG CAG GAC ACC TGC ATA TTT -3'
COMPLEMENT	5'- AAA TAT GCA GGT GTC CTG CCA -3'
LENGTH	21
GC CONTENT	47.6 %
MELT TEMP	63.2 °C
MOLECULAR WEIGHT	6421.2 g/mole
EXTINCTION COEFFICIENT	198700 L/(mole-cm)
nmole/OD ₂₆₀ :	5.03
µg/OD ₂₆₀ :	32.32

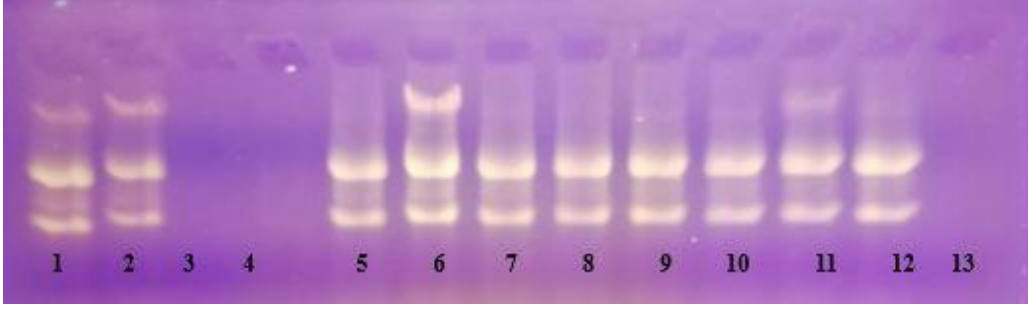
Şekil 4.4: ADAMTS-5 reverse primer 21 baz uzunluğunda %47.6 GC içeriğine ve 63.2°C T_m sıcaklığına sahiptir.

structure	Image	ΔG (kcal.mole ⁻¹)	T _m (°C)	ΔH (kcal.mole ⁻¹)	ΔS (cal.K ⁻¹ .mole ⁻¹)	Output
1		-5.32	66.1	-43.9	-129.4	<input type="button" value="Ct"/> <input type="button" value="Det"/>

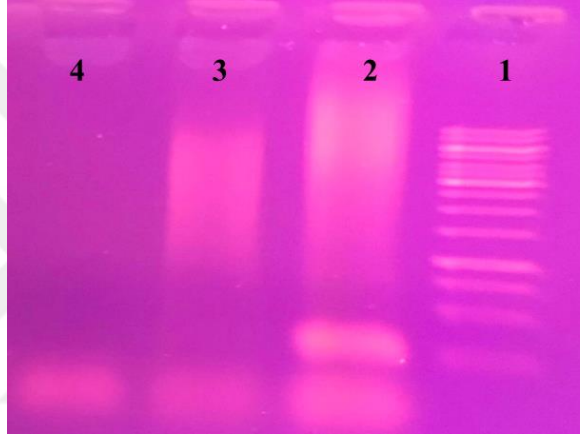


Şekil 4.5: ADAMTS-5 reverse primeri hairpin yapıları.

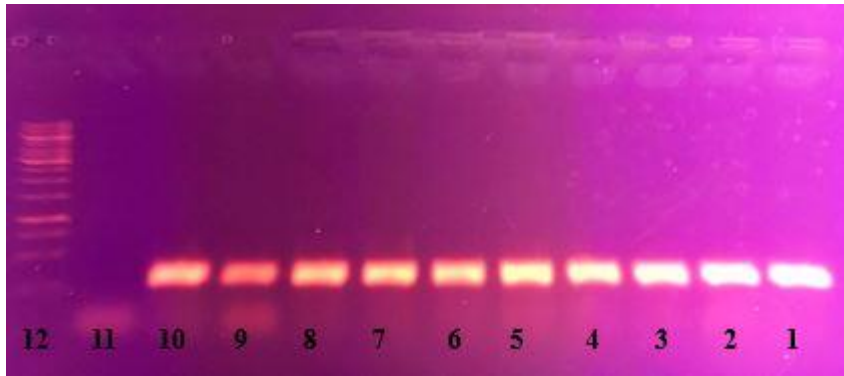
HT-29 hücre hattı bölüm 3.2.2.2'de belirtildiği gibi hücre kültürü ortamında büyütülmüştür. Flask yüzeyi %80-90 doluluk oranına ulaştığında haftada iki defa rutin olarak pasaj işlemine tabi tutulmuştur. Bu hücrelerden bölüm 3.2.4.2'de belirtildiği gibi RNA'lar izole edilip jelde yürütülmüştür. UV görüntüleme sistemi ile görüntülenen RNA'ların (şekil 4.6), absorbans değerleri alınmış ve miktarları hesap edilmiştir. cDNA sentezinde eşit miktarda RNA ile sentez yapılmıştır. Bunun için her bir örnekten 1000ng RNA alınarak cDNA sentezinde kullanılmıştır (bölüm 3.2.4.5). cDNA'ların kalitesi H β 2 ekspresyon primerleri ile yapılan PZR ile kontrol edilmiştir (Şekil 4.8). Laboratuvarımızda kullanılan H β 2 primerlerinin daha önceki çalışmalarda optimizasyonu yapıldığı için tekrar optimizasyon çalışması bu primerler için yapılmamıştır [59]. cDNA'ların çalıştığı tespit edildikten sonra ADAMTS-5 primerlerinin optimizasyon çalışmalarına geçilmiştir. Primer tablo 3.8 de verilen şartlar altında optimum çalışma göstermiştir.



Şekil 4.6: HT-29 RNA jel görüntüsü. (1: 72 saat TGF- β + CoCl₂, 2: 72 saat CoCl₂, 3: 72 saat TGF- β , 4: 72 saat Kontrol, 5: 48 saat TGF- β + CoCl₂, 6: 48 saat CoCl₂, 7: 72 saat TGF- β , 8: 48 saat Kontrol, 9: 24 saat TGF- β + CoCl₂, 10: 24 saat CoCl₂, 11: 24 saat TGF- β , 12: 24 saat Kontrol, 13: Marker.)



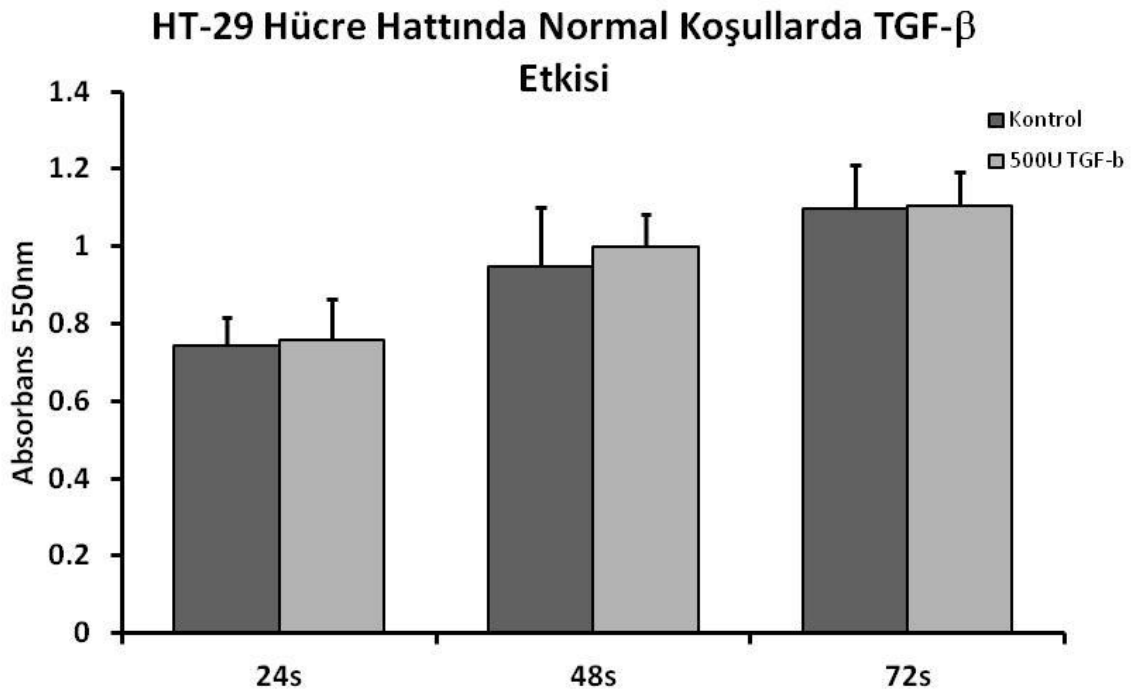
Şekil 4.7: ADAMTS-5 spesifik primerler ile optimizasyon çalışması agaroz jel elektroferez görüntüsü. (1: 1 kb Marker, 2: ADAMTS-5 pozitif kontrol 1mM, 3: ADAMTS-5 pozitif kontrol 2mM, 4: ADAMTS-5 negatif kontrol.)



Şekil 4.8: HT-29 cDNA'larının H β 2 jel görüntüsü. (1: 24 saat Kontrol, 2: 24 saat TGF- β , 3: 24 saat CoCl₂, 4: 24 saat TGF- β + CoCl₂, 5: 48 saat Kontrol, 6: 48 saat TGF- β , 7: 48 saat CoCl₂, 8: 48 saat TGF- β + CoCl₂, 9: 72 saat CoCl₂, 10: 72 saat TGF- β + CoCl₂, 11: H β ₂ negatif kontrol, 12: 1kb Marker.)

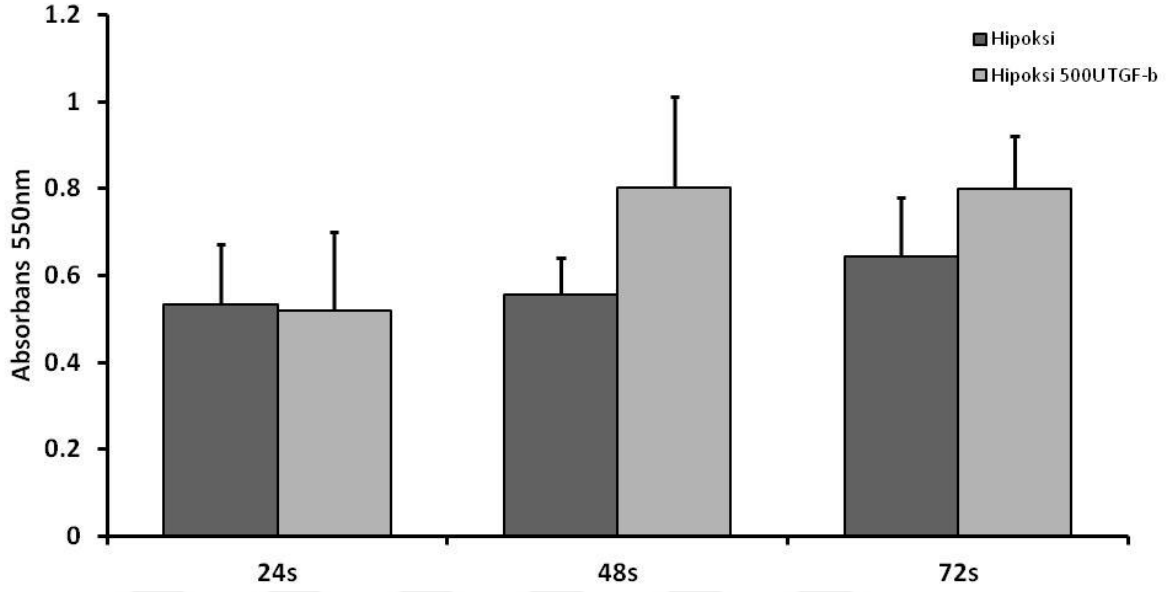
4.2 MTT Analizi

HT-29 hücre hattında çalışmamızda seçtiğimiz sitokin olan TGF- β 'nin ve kimyasal hipoksi ajanı olarak kullandığımız CoCl₂'nin hücre proliferasyonuna etkisi MTT testi ile belirlenmiştir. Hücreler, kültür ortamında bölüm 3.2.3 de belirtildiği gibi büyütülüp, 96 well plate kuyularına kuyu başına 15.000 hücre olacak şekilde sayıldıktan sonra alınmıştır. Sitokin uygulaması yapılan hücreler FCS'li ortam yerine BSA içeren medyuma alınmıştır. 24 saat sonunda 96 kuyulu plakalardaki hücrelere 500 U TGF- β ve hipoksik indüklemeye için 150 μ M CoCl₂ uygulanmıştır. Kontrol gruplarına herhangi bir madde uygulanmamış ve bu hücreler normoksi durum olarak işaretlenmiştir. 24, 48 ve 72 saat sonra MTT testi bölüm 3.2.3'de anlatıldığı gibi uygulanmıştır. 550 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçüm alınarak sonuçlar excel programı üzerinden değerlendirmeye alınmıştır. Sonuçlar şekil 4.9, şekil 4.10 ve şekil 4.11'de gösterilmiştir. Normal koşullarda TGF- β 'nin sitotoksik etkisi gözlenmemiştir (Şekil 4.9). CoCl₂ ile oluşturulan hipoksik koşullarda da istatistiki olarak anlamlı bir sitotoksik etki gözükmemesine rağmen hücreler büyüme eğrileri incelendiğinde normal koşullarda göre hassasiyet kazandıkları ve normal koşullara kıyasla etkilendikleri gözlenmiştir. Bu sebeple her değerlendirme kendi kontrol grubuyla karşılaştırılmıştır (Şekil 4.10 ve 4.11).



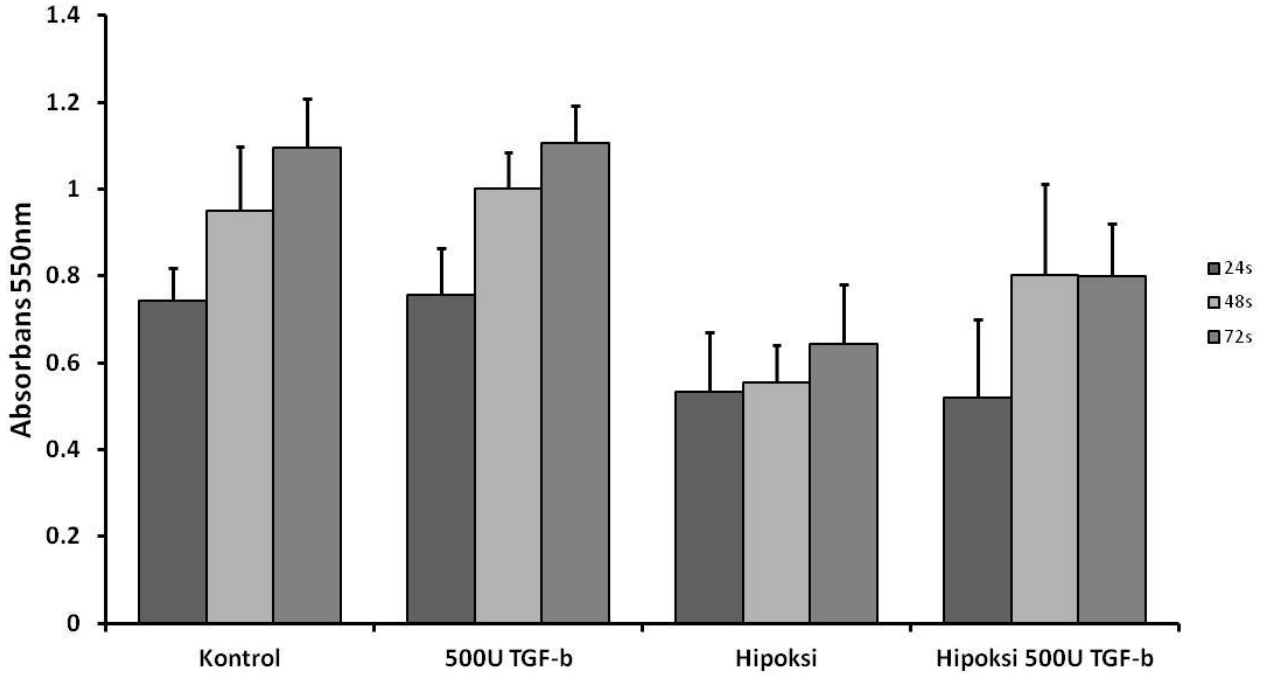
Şekil 4.9: HT-29 hücre hattında BSA'lı medyuma TGF- β 'nin normal koşullarda hücreler üzerindeki etkisi (MTT testi).

HT-29 Hücre Hattında Hipoksik Koşullarda TGF- β 'nin Etkisi



Şekil 4.10: HT-29 hücre hattında BSA'lı medyumda TGF- β 'nin hipoksik koşullarda hücreler üzerindeki etkisi (MTT testi).

HT-29 Hücre Hattında Hipoksi ve TGF- β 'nin Etkisi



Şekil 4.11: HT-29 hücre hattında CoCl₂ ve TGF- β 'nin sitotoksik etkisinin BSA'lı medyumda MTT testi ile belirlenmesi.

4.3 mRNA Seviyesi İle İlgili Çalışmalar

4.3.1 Kimyasal Hipoksinin Doğrulanması

HT-29 hücreleri, kültür ortamında büyütülüp 25 cm²'lik flasklara içerisinde 2 milyon hücre olacak şekilde paylaştırılmıştır. Bir gecelik inkübasyonun ardından 24, 48 ve 72 saat olarak ayrılan flasklara 150 µM CoCl₂ eklenerek hipoksik ortam oluşturulmuştur. Aynı saat gruplarının normoksi için ayrılan flasklarına herhangi bir uygulama yapılmamıştır.

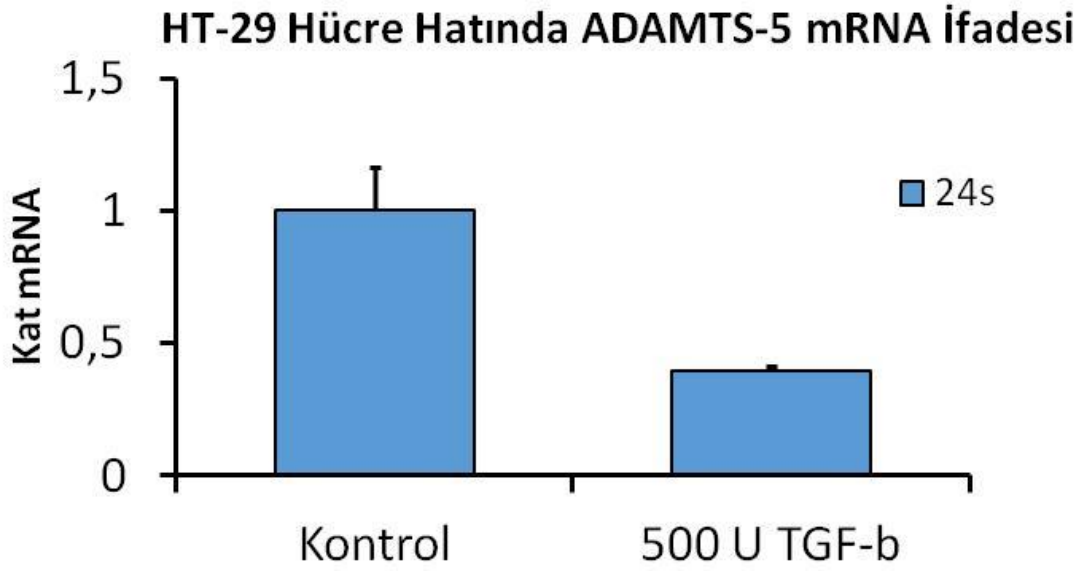
24, 48 ve 72 saat zaman aralıklarında hücreler tripsinizasyon işlemine tabi tutulmuş ve pelletleri elde edilmiştir. Bu pelletlerden bölüm 3.2.4.2'de anlatılan biçimde RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzolasyonu yapılan RNA'lar jel elektroforezinde yürütülüp, görüntülenmiştir.

RNA'lardan 1 µg/mL oranında kalıp RNA kullanılarak bölüm 3.2.4.5 de anlatıldığı gibi cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra bu cDNA'lardan tablo 3.11 de verilen primerlerle tablo 3.10 da belirtilen koşullarda qRT-PZR yapılmıştır. HIF1-α ve Hβ2 sonuçları karşılaştırılarak hipoksiyanın oluşumu doğrulanmıştır (Şekil 4.12).

4.3.2 TGF-β ve Hipoksinin HT-29 Hücre Hattında ADAMTS-5 mRNA Seviyesine Etkisi

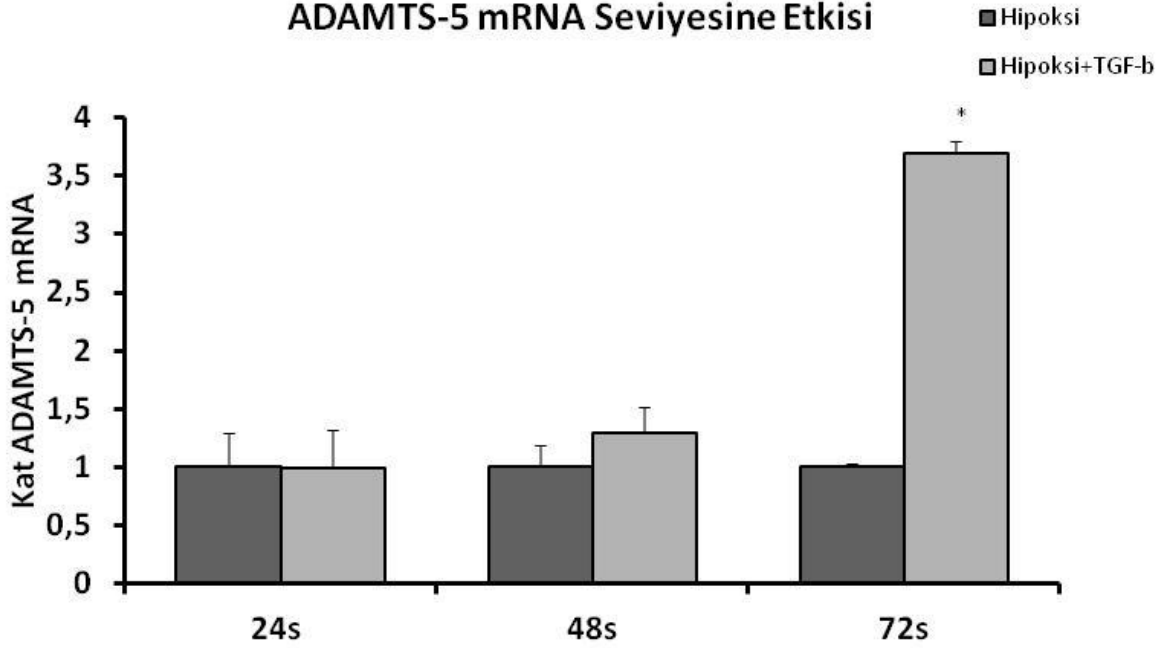
Çalışmamızda TGF-β sitokinin ve hipoksik koşulların ADAMTS-5 mRNA seviyesinin analizi için Real-Time PZR kullanılmıştır. Öncelikle hücreler rutin pasaj ile çoğaltılmıştır. Bölüm 4.3.1 de anlatılan yöntemler ile 500U TGF-β sitokinin farklı zaman aralıklarında hücreler üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Hücreler 2.000.000 hücre sayılarak 25 cm² flasklara aktarılmış ve 1 gün sonra 500U sitokin uygulaması yapılmıştır. Kontrol grubu hücrelerine herhangi bir sitokin uygulaması yapılmamıştır. Ayrıca hipoksik durumun ve hipoksik durumda TGF-β sitokininin etkisi de araştırıldığından hipoksik gruplara 150µM CoCl₂ uygulanmıştır. Her flask kendi zaman aralıklarında, sırasıyla tripsinizasyon, pellet eldesi, RNA izolasyonu ve RNA'ların jelde yürütülmesi işlemlerine tabi tutulmuş ve bu RNA'lardan bölüm 3.2.4.5 de anlatılan yöntemle cDNA eldesi gerçekleştirilmiştir. cDNA eldesinde 1000ng RNA kalıp olarak kullanılmıştır. Öncelikle elde edilen cDNA'ların kontrolü için Hβ2 PZR'ı yapılmıştır. Tüm cDNA'lar kalıp olarak kullanılarak ADAMTS-5, Hβ2 ve HIF1-α mRNA düzeyleri qRT-PZR incelenmiştir. Böylece hem hipoksinin ve hem de TGF-β sitokininin ADAMTS-5 mRNA seviyesi üzerindeki etkisi analiz edilmiştir. Real Time PZR'da elde edilen cT değerleri Livak metodu ile değerlendirilmiştir. Her deney

kendi içerisinde tekrarlı olup ayrıca birbirinden bağımsız olarak en az iki kez çalışılmıştır. Tüm veriler istatistiksel olarak analiz edilmiş ve grafiklendirilmiştir. Şekil 4.13’de görüldüğü gibi HIF1- α mRNA seviyelerine bakılarak hipoksik koşulun oluştuğundan emin olunmuştur. ADAMTS-5 seviyesi hipokside artmıştır. TGF- β ise ADAMTS-5 ekspresyonunu baskılamıştır.



Şekil 4.12: HT-29 hücre hattında normal koşullarda TGF- β 'nin ADAMTS-5 mRNA seviyesine etkisi-Real Time PZR.

HT-29 Hücre Hattında Hipoksik Koşullarda TGF- β 'nin ADAMTS-5 mRNA Seviyesine Etkisi

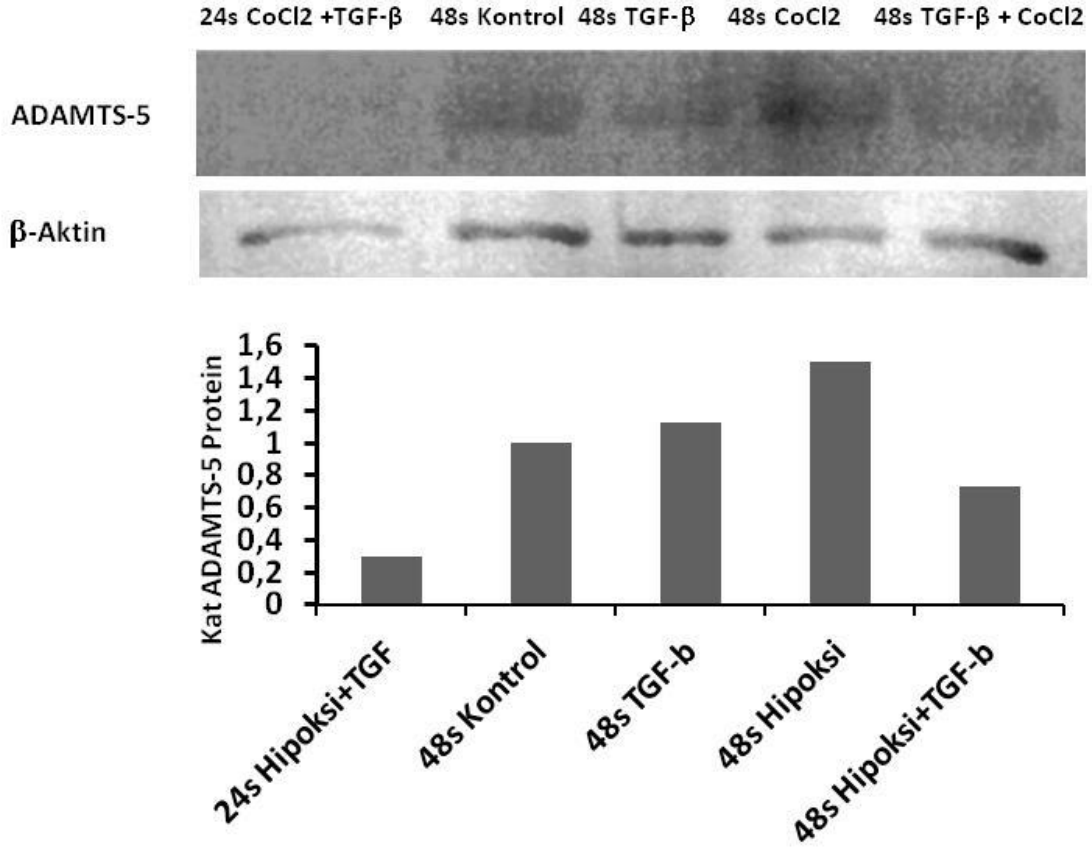


Şekil 4.13: HT-29 hücre hattında hipoksik koşullarda TGF- β 'nin ADAMTS-5 mRNA seviyesine etkisi-Real Time PZR.

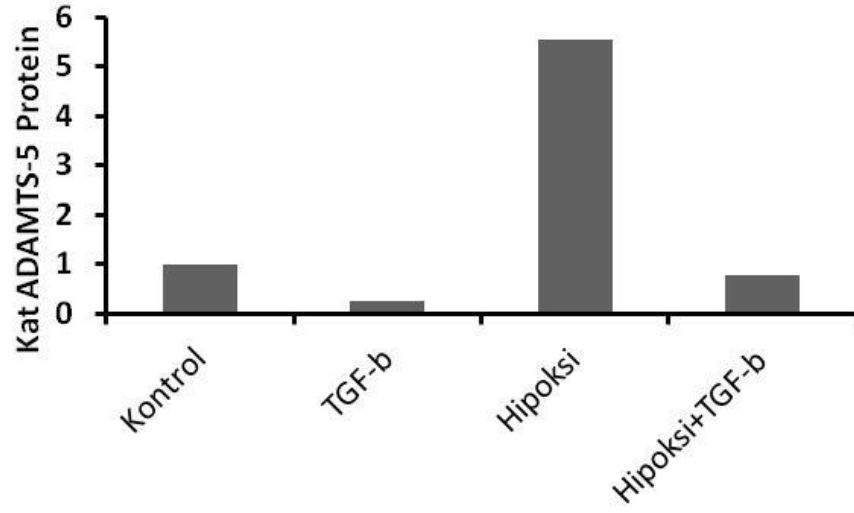
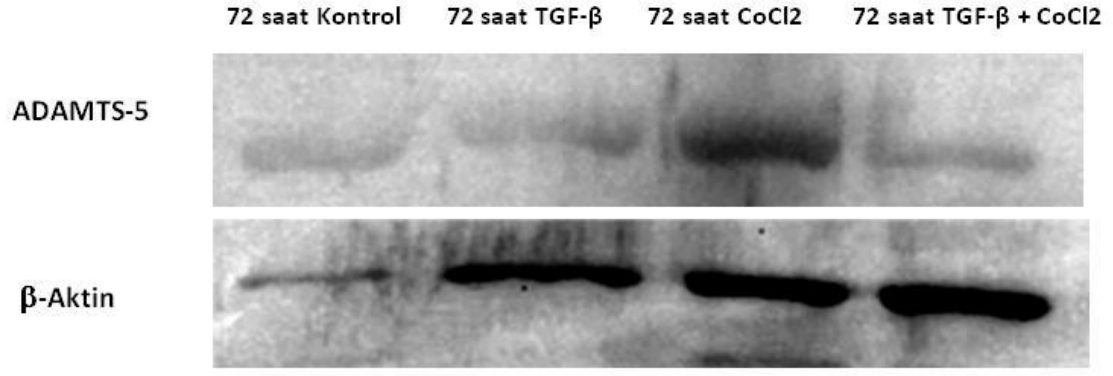
4.4 ADAMTS-5 Protein Seviyesinin Belirlenmesi

HT-29 hücreleri optimum koşullarda büyütülüp hemositometride bölüm 3.2.2.5 de anlatılan yöntemle sayımları yapıldıktan sonra 25cm²'lik flaslara her bir flaskta 2 milyon hücre olacak şekilde paylaştırılmıştır. 24, 48 ve 72 saatlerden oluşan deney grupları kendi içlerinde normoksi, hipoksi, TGF- β , TGF- β + hipoksi olmak üzere 4 gruba ayrılmıştır. Hipoksi ve Hipoksi + TGF- β için ayrılan flaslara 150 μ M CoCl₂, TGF- β ve TGF- β + hipoksi için ayrılan flaslara 500 U/ml TGF- β sitokini uygulanmıştır. Normoksi için ayrılan flaslara herhangi bir madde uygulanmamıştır. Her deney grubunun hücrelerinden, kendi zaman aralıklarında (24, 48 ve 72 saat) pelletleri bölüm 3.2.5.1 de belirtildiği gibi alınmıştır. Elde edilen protein ekstraktlarının miktarı Bradford metodu ile bölüm 3.2.5.2 de belirtildiği gibi ölçülmüştür. SDS PAGE jeli bölüm 3.2.5.4'deki gibi hazırlanmıştır. Protein ekstraktları 30 μ g olacak şekilde hesaplanarak jele yüklenmiş ve 90 V'da 1 saat boyunca yürütülmüştür. Jelde yürütülmesi tamamlanan proteinlere transfer aşaması için PVDF membranla sandviç modeli oluşturulmuştur. Proteinler +4'de 1 gece transfere bırakıldıktan sonra, transferi tamamlanan membranlar, bloklama solüsyonunda 60 dakika işleme tutulmuştur. Bloklama işleminin ardından 3'er defa yıkanan membranlar 1/500 ADAMTS-5 antikor ve 1/5000 sekonder antikor ile 1 gece muamele edilmiştir. UVP

görüntüleme sistemi ile membranlar fotoğraflandırdıktan sonra aynı membranlar 1/10000 β -actin antikoruna ile 1/5000 oranında hazırlanmış sekonder antikor ile 1 gece muamele edilip UVP görüntüleme sistemi ile fotoğraflanmışlardır.



Şekil 4.14: HT-29 hücre hattında ADAMTS-5 protein seviyesinin 48 saatte belirlenmesi.



Şekil 4.15: HT-29 hücre hattında ADAMTS-5 protein seviyesinin 72 saatte belirlenmesi.

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Kanser, hücrelerin kontrolsüzce çoğalmasıyla oluşan bir hastalıktır [1]. Kolon kanseri insanlarda en sık görülen, kolon ve rektumda ortaya çıkan bir malign tümördür ve tümör metastazı mortalitenin başlıca nedenidir [6], [7]. Çoğu katı tümörde hipoksik bir ortam vardır [11]. Hipoksi durumunda, HIF'nin çeşitli kanser hücrelerinde aşırı eksprese edildiği ve kolorektal kanser de dahil olmak üzere birçok farklı tümör varlığının ilerlemesi ve olumsuz klinik sonucu ile ilişkili olduğu bildirilmektedir [12].

Bir disintegrin ve metalloproteinazlar (ADAM), metalloproteinaz alanını, matriks metalloproteinazları (MMP'ler) ile paylaşan yılan venomalarının reprotizin ailesine sekans benzerliğine sahip bir protein ailesidir [13]. ADAMTS (trombospondin motifli bir disintegrin benzeri ve metalloproteinaz), 1997'de Kuno ve arkadaşları tarafından tanımlanmış olan bir hücre dışı metalloproteinaz ailesidir [14]. Kuno ve arkadaşları Kolon kanseri kaşeksisinden elde ettikleri bu enzimi ADAMTS-1 olarak adlandırmışlardır [15]. Bugüne kadar 19 ADAMTS aile üyesi tespit edilmiştir. Keşfedilen ilk agrekanazlardan olan ADAMTS-5 çinko katalitik domain, parçalanma domaini, trombospondin domaini (TSR1 ve TSR2) olmak üzere çeşitli domainlere sahiptir [30]. ADAMTS-5, agrekan degrading aktivitesi nedeniyle agrekanaz-2 olarak adlandırılmıştır. Hücre dışı matriks (ECM) degrade edici enzimlerin bir üyesi olarak da bilinen ADAMTS-5 aynı zamanda proteoglikanların bölünmesi, anjiyogenezin inhibisyonu ve embriyonik morfojeniz dahil olmak üzere çeşitli hücrel olaylarda rol oynar [31].

Sitokinler, hücreler arası sinyalleşme ve iletişim amacıyla hücreler tarafından salgılanan çeşitli küçük proteinler grubudur [47]. Bu protein grubu kemokinler, interlökinler, interferonlar ve TGF- β gibi bazı büyüme faktörlerini içerir [48]. Sitokinler normal hücrelerin yanı sıra kanser hücreleri tarafından da salgılanmaktadır [48]. Çok sayıda kanıt, sitokinlerin kanserin başlaması, ilerlemesi, istilası ve metastazına yol açan olaylara katılımını destekler [50].

TGF- β , sitokinlerin TGF- β üst ailesine aittir [51]. Embriyonik ve yetişkin dokularda hücrel davranışı kontrol eder [52]. 30'dan fazla memeli geni, büyüme faktörlerinin TGF üst ailesini içerir ve hem yetişkin organizmasında hem de embriyogenezde hücrel fonksiyonların düzenlenmesinde, anjiyogenez, yara iyileşmesi, fibrozis, apoptozun

düzenlenmesi, kanser biyolojisi ve immün sistemin düzenlenmesi gibi son derece önemli süreçlerde de rol oynarlar [53], [54].

Literatürde ADAMTS-5 ile ilgili yapılan ekspresyon analizlerine bakıldığında agrekanaz aktivitesinin yanında 143 kolorektal kanser türünde, glioblastomda, küçük hücreli akciğer kanseri ve mide kanseri gibi kanser türlerinde ifade edildiği bulunmuştur [31], [40], [41], [42]. Held-Feindt ve arkadaşları insan glioblastomlarındaki çalışmalarında TGF- β , ADAMTS-5 ifadesini arttırmıştır. Kumar ve arkadaşlarının 2012 yılında yaptıkları çalışmada ADAMTS-5'in anti-anjiyogenik/anti-tümörijenik protein olarak işlev gördüğünü göstermişlerdir [40]. Li ve arkadaşları ADAMTS-5'in kolorektal karsinogeneizde ki ifadesini araştırmışlardır. Çalışmalarında HCT116, DLD1, HT-29, Lovo, CaCo2, SW480 ve LS174T hücre hatları kullanılmıştır. Çalışmalarının sonucunda bu metaloproteinazın aşırı ekspresyonunun tümör istilası ve göç kabiliyetini önemli ölçüde bastırdığını tespit etmişlerdir [44].

Yapılan çalışmalardan yola çıkarak bu çalışmada kolon kanseri modeli olan HT-29 hücre hattında TGF- β ve hipoksi koşullarının (normoksi, TGF- β , hipoksi, TGF- β ve hipoksi) ADAMTS-5 genine mRNA ve protein düzeyinde etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda ilk olarak HT-29 hücreleri pasajlamalar yapılarak deney kurulması için hazır bir hale getirilmiştir. Flakslara 2 milyon olarak dağıtılan hücreler daha sonra 500 U/mL TGF- β , 150 μ M CoCl₂ uygulanmış ve belirli inkübasyon zaman aralıklarının ardından hücreler flask yüzeylerinden alınıp protein ve RNA izolasyonu için hazır hale getirmiştir. Ayrıca TGF- β ve CoCl₂ hücreler üzerindeki sitotoksik etkisinin var olup olmadığının belirlenmesi için MTT testi uygulanmıştır. MTT testi sonucuna göre TGF- β sitokini hücreler üzerinde herhangi bir sitotoksik etki oluşturmamıştır. Ancak hipoksik grupların normal koşullardaki hücelere kıyasla hücre proliferasyonlarında düşüş meydana gelmiştir. Bu sebeple her bir grup kendi kontrol grubu ile değerlendirmeye alınmıştır. Normal koşullardaki sitokin cevabı normal koşullardaki kontrol grubu hücreler ile karşılaştırılarak; hipoksik koşullardaki sitokin cevabı da yine hipoksik kontrol grubu ile karşılaştırılarak değerlendirilmeye alınmıştır. Herbir gruptan izole edilen RNA'lar; polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ve gerçek zamanlı PZR çalışmalarında, proteinler ise; Western Blot çalışmalarında kullanılmıştır. Deneylerden elde edilen veriler doğrultusunda TGF- β 'nin ADAMTS-5 mRNA ve protein seviyesini azalttığı hipoksinin ise ADAMTS-5 seviyesini indüklediği belirlenmiştir.

Sonuç olarak bu tez çalışması kapsamında 24 saatte 500 U/mL TGF-β uygulanan hücrelerde ADAMTS-5 mRNA ifadesinin baskılandığı, 72 saat hipokside ise TGF-β uygulanan hücrelerde ADAMTS-5'in protein seviyesinde artış olduğu tespit edilmiştir.



6. KAYNAKLAR

- [1] O. Baykara, "Current modalities in treatment of cancer," *Balıkesir Heal. Sci. J.*, vol. 5, no. 3, pp. 154–165, 2016, doi: 10.5505/bsbd.2016.93823.
- [2] X. Zhang, S. L. Marjani, Z. Hu, S. M. Weissman, X. Pan, and S. Wu, "Single-Cell sequencing for precise cancer research: progress and prospects.," *Cancer Res.*, vol. 76, no. 6, pp. 1305–1312, Mar. 2016, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-1907.
- [3] P. S. Steeg, "Targeting metastasis.," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 16, no. 4, pp. 201–218, Apr. 2016, doi: 10.1038/nrc.2016.25.
- [4] T. N. Seyfried and L. C. Huysentruyt, "On the origin of cancer metastasis," 2013. *Crit. Rev. Oncog.*, vol. 18, pp. 43-73, 2013, doi: 10.1615/CritRevOncog.v18.i1-2.40.
- [5] J. Robert, "[Biology of cancer metastasis].," *Bull. Cancer*, vol. 100, no. 4, pp. 333–342, Apr. 2013, doi: 10.1684/bdc.2013.1724.
- [6] X. Liu *et al.*, "Hypoxia-induced upregulation of Orai1 drives colon cancer invasiveness and angiogenesis.," *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 832, pp. 1–10, Aug. 2018, doi: 10.1016/j.ejphar.2018.05.008.
- [7] R. Vadde, S. Vemula, R. Jinka, N. Merchant, P. V. Bramhachari, and G. P. Nagaraju, "Role of hypoxia-inducible factors (HIF) in the maintenance of stemness and malignancy of colorectal cancer," *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, vol. 113, pp. 22–27, 2017, doi: 10.1016/j.critrevonc.2017.02.025.
- [8] H. Brenner, M. Kloor, and C. P. Pox, "Colorectal cancer," *Lancet*, vol. 383, no. 9927, pp. 1490–1502, 2014, doi: 10.1016/S0140-6736(13)61649-9.
- [9] J. Weitz, M. Koch, J. Debus, T. Höhler, P. R. Galle, and M. W. Büchler, "Colorectal cancer," *Lancet*, vol. 365, no. 9454, pp. 153–165, 2005, doi: 10.1016/S0140-6736(05)17706-X.
- [10] K. Simon, "Colorectal cancer development and advances in screening," *Clin. Interv. Aging*, vol. 11, pp. 967–976, 2016, doi: 10.2147/CIA.S109285.
- [11] K. Hongo *et al.*, "Hypoxia enhances colon cancer migration and invasion through promotion of epithelial-mesenchymal transition," *J. Surg. Res.*, vol. 182, no. 1, pp. 75–84, 2013, doi: 10.1016/j.jss.2012.08.034.
- [12] K. Xu *et al.*, "Hypoxia induces drug resistance in colorectal cancer through the HIF-1 α /miR-338-5p/IL-6 feedback loop," *Mol. Ther.*, vol. 27, no. 10, pp. 1810–1824, 2019, doi: 10.1016/j.ymthe.2019.05.017.

- [13] S. Mochizuki and Y. Okada, “ADAMs in cancer cell proliferation and progression,” *Cancer Sci.*, vol. 98, no. 5, pp. 621–628, 2007, doi: 10.1111/j.1349-7006.2007.00434.x.
- [14] S. Cal and C. López-Otín, “ADAMTS proteases and cancer,” *Matrix Biol.*, vol. 44–46, pp. 77–85, 2015, doi: 10.1016/j.matbio.2015.01.013.
- [15] J. Dubail and S. S. Apte, “Insights on ADAMTS proteases and ADAMTS-like proteins from mammalian genetics,” *Matrix Biol.*, vol. 44–46, pp. 24–37, 2015, doi: 10.1016/j.matbio.2015.03.001.
- [16] S. Kumar, N. Rao, and R. Ge, “Emerging roles of ADAMTSS in angiogenesis and cancer,” *Cancers (Basel)*, vol. 4, no. 4, pp. 1252–1299, 2012, doi: 10.3390/cancers4041252.
- [17] R. Kelwick, I. Desanlis, G. N. Wheeler, and D. R. Edwards, “The ADAMTS (A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs) family,” *Genome Biol.*, vol. 16, no. 1, p. 113, May 2015, doi: 10.1186/s13059-015-0676-3.
- [18] S. Porter *et al.*, “Dysregulated expression of Adamalysin-Thrombospondin genes in human breast carcinoma,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 10, no. 7, pp. 2429–2440, 2004, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-0398-3.
- [19] K. Demircan *et al.*, “Increased mRNA expression of ADAMTS metalloproteinases in metastatic foci of head and neck cancer,” *Head Neck*, vol. 31, no. 6, pp. 793–801, Jun. 2009, doi: 10.1002/hed.21045.
- [20] M. A. Lima *et al.*, “Prognostic value of ADAMTS proteases and their substrates in epithelial ovarian cancer,” *Pathobiology*, vol. 83, no. 6, pp. 316–326, 2016, doi: 10.1159/000446244.
- [21] S. Santamaria *et al.*, “Antibody-based exosite inhibitors of ADAMTS-5 (aggrecanase-2),” *Biochem. J.*, vol. 471, no. 3, pp. 391–401, 2015, doi: 10.1042/BJ20150758.
- [22] Y. Sun, J. Huang, and Z. Yang, “The roles of ADAMTS in angiogenesis and cancer,” *Tumor Biol.*, vol. 36, no. 6, pp. 4039–4051, 2015, doi: 10.1007/s13277-015-3461-8.
- [23] B. Zhou *et al.*, “MicroRNA-503 targets FGF2 and VEGFA and inhibits tumor angiogenesis and growth,” *Cancer Lett.*, vol. 333, no. 2, pp. 159–169, Jun. 2013, doi: 10.1016/j.canlet.2013.01.028.
- [24] L. Nissinen and V.-M. Kähäri, “ADAMTS-5: A new player in the vascular field,” *Am. J. Pathol.*, vol. 181, no. 3, pp. 743–745, Sep. 2012, doi:

- 10.1016/j.ajpath.2012.07.002.
- [25] B. Turgut and T. Demir, “The role of vascular endothelial growth factor in ocular angiogenesis-Oküler Anjiyogenezde Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörünün Rolü,” no. February 2016, 2007.
- [26] R. Hamutoğlu, “The role of angiogenesis in physiological and pathological conditions,” *Istanbul Bilim Univ. Florence Nightingale Transplant. J.*, vol. 2, no. 2, pp. 56–62, 2017, doi: 10.5606/fng.transplantasyon.2017.010.
- [27] L. S. Çelik and U. Ö. Mete, “Overlerde anjiyogenezi etkileyen faktörler,” *Arşiv Kaynak Tarama Derg.*, vol. 26, no. 3, pp. 330–330, 2017, doi: 10.17827/aktd.303589.
- [28] NCBI, *ADAMTS-5 ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 5 [Homo sapiens (human)]*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/11096> (accessed Jan. 14, 2021).
- [29] S. S. Apte, “Anti-ADAMTS-5 monoclonal antibodies: implications for aggrecanase inhibition in osteoarthritis,” *Biochem. J.*, vol. 473, no. 1, pp. e1-4, Jan. 2016, doi: 10.1042/BJ20151072.
- [30] C. Gendron *et al.*, “Proteolytic activities of human ADAMTS-5: comparative studies with ADAMTS-4,” *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 25, pp. 18294–18306, Jun. 2007, doi: 10.1074/jbc.M701523200.
- [31] N. Haraguchi *et al.*, “High expression of ADAMTS-5 is a potent marker for lymphatic invasion and lymph node metastasis in colorectal cancer,” *Mol. Clin. Oncol.*, vol. 6, no. 1, pp. 130–134, 2017, doi: 10.3892/mco.2016.1088.
- [32] F. Echtermeyer *et al.*, “Syndecan-4 regulates ADAMTS-5 activation and cartilage breakdown in osteoarthritis,” *Nat. Med.*, vol. 15, no. 9, pp. 1072–1076, Sep. 2009, doi: 10.1038/nm.1998.
- [33] T. G. Ashlin, A. P. L. Kwan, and D. P. Ramji, “Regulation of ADAMTS-1, -4 and -5 expression in human macrophages: Differential regulation by key cytokines implicated in atherosclerosis and novel synergism between TL1A and IL-17,” *Cytokine*, vol. 64, no. 1, pp. 234–242, 2013, doi: 10.1016/j.cyto.2013.06.315.
- [34] L. Yu *et al.*, “microRNA -140-5p inhibits colorectal cancer invasion and metastasis by targeting ADAMTS-5 and IGFBP5,” *Stem Cell Res. Ther.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–11, 2016, doi: 10.1186/s13287-016-0438-5.
- [35] R. E. Morgan, P. D. Clegg, J. A. Hunt, J. F. Innes, and S. R. Tew, “Interaction with macrophages attenuates equine fibroblast-like synoviocyte ADAMTS-5

- (aggrecanase-2) gene expression following inflammatory stimulation,” *J. Orthop. Res.*, vol. 36, no. 8, pp. 2178–2185, 2018, doi: 10.1002/jor.23891.
- [36] T. Fontanil *et al.*, “Cleavage of Fibulin-2 by the aggrecanases ADAMTS-4 and ADAMTS-5 contributes to the tumorigenic potential of breast cancer cells,” *Oncotarget*, vol. 8, no. 8, pp. 13716–13729, 2017, doi: 10.18632/oncotarget.14627.
- [37] H. Y. Andy Chen, Kazunori Hamamura, Nancy Tanjung, Hui B Sun, “In vitro and in silico analysis of ADAMTS-5 transcription in human chondrocytes,” *J. Arthritis*, vol. 02, no. 01, pp. 1–8, 2013, doi: 10.4172/2167-7921.1000111.
- [38] M. Karakose *et al.*, “Clinical significance of ADAMTS1, ADAMTS-5, ADAMTS9 aggrecanases and IL-17A, IL-23, IL-33 cytokines in polycystic ovary syndrome,” *J. Endocrinol. Invest.*, vol. 39, no. 11, pp. 1269–1275, 2016, doi: 10.1007/s40618-016-0472-2.
- [39] J. Held-Feindt *et al.*, “Matrix-degrading proteases ADAMTS4 and ADAMTS-5 (disintegrins and metalloproteinases with thrombospondin motifs 4 and 5) are expressed in human glioblastomas,” *Int. J. Cancer*, vol. 118, no. 1, pp. 55–61, 2006, doi: 10.1002/ijc.21258.
- [40] S. Kumar, S. Sharghi-Namini, N. Rao, and R. Ge, “ADAMTS-5 functions as an anti-angiogenic and anti-tumorigenic protein independent of its proteoglycanase activity,” *Am. J. Pathol.*, vol. 181, no. 3, pp. 1056–1068, 2012, doi: 10.1016/j.ajpath.2012.05.022.
- [41] J. Gu *et al.*, “Overexpression of ADAMTS-5 can regulate the migration and invasion of non-small cell lung cancer,” *Tumor Biol.*, vol. 37, no. 7, pp. 8681–8689, 2016, doi: 10.1007/s13277-015-4573-x.
- [42] J. Huang *et al.*, “ADAMTS-5 acts as a tumor suppressor by inhibiting migration, invasion and angiogenesis in human gastric cancer,” *Gastric Cancer*, vol. 22, no. 2, pp. 287–301, 2019, doi: 10.1007/s10120-018-0866-2.
- [43] S. Sharghi-Namini *et al.*, “The first but not the second thrombospondin type 1 repeat of ADAMTS-5 functions as an angiogenesis inhibitor,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 371, no. 2, pp. 215–219, Jun. 2008, doi: 10.1016/j.bbrc.2008.04.047.
- [44] J. Li *et al.*, “Epigenetic silencing of ADAMTS-5 is associated with increased invasiveness and poor survival in patients with colorectal cancer,” *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, vol. 144, no. 2, pp. 215–227, 2018, doi: 10.1007/s00432-017-2545-9.
- [45] S. Filou *et al.*, “ADAMTS expression in colorectal cancer,” *PLoS One*, vol. 10, no. 3, pp. 1–15, 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0121209.

- [46] M. Nakada *et al.*, “Human glioblastomas overexpress ADAMTS-5 that degrades brevican.,” *Acta Neuropathol.*, vol. 110, no. 3, pp. 239–246, Sep. 2005, doi: 10.1007/s00401-005-1032-6.
- [47] J. R. Tisoncik *et al.*, “Into the Eye of the Cytokine Storm,” 2012, doi: 10.1128/MMBR.05015-11.
- [48] B. Breznik, H. Motaln, and T. Lah Turnšek, “Proteases and cytokines as mediators of interactions between cancer and stromal cells in tumours.,” *Biol. Chem.*, vol. 398, no. 7, pp. 709–719, Jun. 2017, doi: 10.1515/hsz-2016-0283.
- [49] P. Berraondo *et al.*, “Cytokines in clinical cancer immunotherapy.,” *Br. J. Cancer*, vol. 120, no. 1, pp. 6–15, Jan. 2019, doi: 10.1038/s41416-018-0328-y.
- [50] G. Landskron, M. De La Fuente, P. Thuwajit, C. Thuwajit, and M. A. Hermoso, “Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment,” *J. Immunol. Res.*, vol. 2014, 2014, doi: 10.1155/2014/149185.
- [51] A. M. Band and M. Laiho, “Crosstalk of TGF- β and estrogen receptor signaling in breast cancer.,” *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, vol. 16, no. 2, pp. 109–115, Jun. 2011, doi: 10.1007/s10911-011-9203-7.
- [52] P. Lönn, A. Morén, E. Raja, M. Dahl, and A. Moustakas, “Regulating the stability of TGFbeta receptors and Smads.,” *Cell Res.*, vol. 19, no. 1, pp. 21–35, Jan. 2009, doi: 10.1038/cr.2008.308.
- [53] B. Schmierer and C. S. Hill, “TGFbeta-SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility.,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 8, no. 12, pp. 970–982, Dec. 2007, doi: 10.1038/nrm2297.
- [54] Ç. Ödek *et al.*, “The importance of serum transforming growth factor beta 1 levels in pediatric patients with acute leukemia and malignant lymphoma,” *Turkiye Klin. Pediatr.*, vol. 25, no. 2, pp. 82–88, 2016, doi: 10.5336/pediatr.2015-48592.
- [55] E. Witsch, M. Sela, and Y. Yarden, “Roles for growth factors in cancer progression.,” *Physiology (Bethesda)*, vol. 25, no. 2, pp. 85–101, Apr. 2010, doi: 10.1152/physiol.00045.2009.
- [56] A. M. Grau *et al.*, “Circulating transforming growth factor- β -1 and breast cancer prognosis: results from the Shanghai Breast Cancer Study,” doi: 10.1007/s10549-007-9845-8.
- [57] M. Kretzschmar, “Transforming growth factor- β β and breast cancer Transforming growth factor- β β /SMAD signaling defects and cancer.” [Online]. Available: <http://breast-cancer-research.com/content/2/2/107>.

- [58] NCBI, *Homo sapiens ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 5 (ADAMTS-5), mRNA*. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_007038.5 (accessed Jan. 14, 2021).
- [59] S. Aydoğan Türkoğlu and F. Köçkar, “Expression of GAPDH, β -actin and β -2-microglobulin genes under chemically induced hypoxic conditions in Hep3b and PC3 cells,” *J. Appl. Biol. Sci.*, vol. 6, no. 3, pp. 1–6, 2012.

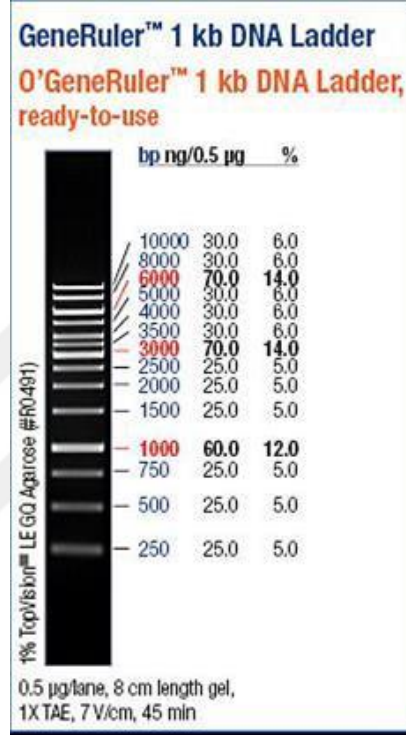




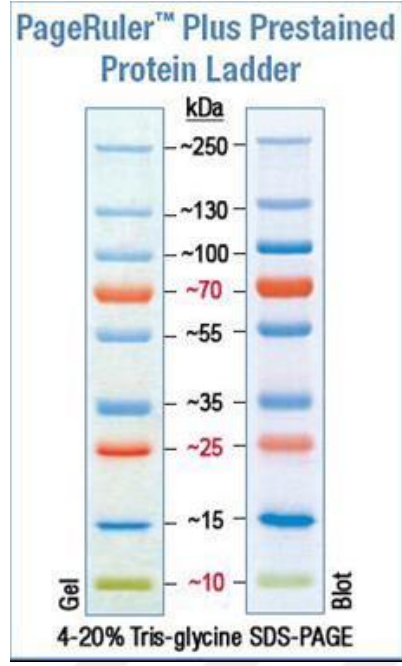
EKLER

EKLER

EK A Kullanılan Büyük Belirteçleri



Şekil A.1: Fermentas 1 kb DNA büyüklük belirteci.



Şekil A.2: PageRuler Prestained Protein büyüklük belirteci.

