

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



**KOLON KANSER MODELİNDE TGF- β 1'İN ADAMTS8 GEN
EKSPRESYONUNA ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

FEYZA NUR SAV

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Jüri Üyeleri: **Prof. Dr. Feray KÖÇKAR (Tez Danışmanı)**
 Prof. Dr. Rahşan ILIKÇI SAĞKAN
 Doç. Dr. Sümeyye AYDOĞAN TÜRKOĞLU

BALIKESİR, TEMMUZ- 2023

ETİK BEYAN

Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak tarafımda hazırlanan **“KOLON KANSER MODELİNDE TGF- β 1'İN ADAMTS8 GEN EKSPRESYONUNA ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ”** 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.

Feyza Nur SAV

Bu tez çalışması TÜBİTAK 1002 Hızlı Destek Programı (122Z754) nolu proje ile desteklenmiştir.

Feyza Nur SAV TÜBİTAK 2210-C Yurt İçi Öncelikli Alanlar Yüksek Lisans Burs Programı ile desteklenmiştir.

ÖZET

KOLON KANSER MODELİNDE TGF- β 1'İN ADAMTS8 GEN EKSPRESYONUNA ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FEYZA NUR SAV

BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. FERAY KÖÇKAR)

(EŞ DANIŞMAN: DR. ÖĞR. ÜYESİ MELTEM ALPER)

BALIKESİR, TEMMUZ - 2023

ADAMTS-8, ADAMTS (A Disintegrin-like And Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs) adı verilen hücreler arası matris proteaz ailesinin bir üyesidir. ADAMTS-1 ve ADAMTS-8, Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF) ve Fibroblast Büyüme Faktörü-2 (FGF-2) tarafından uyarılan, yeni damar oluşumunu engelleyen güçlü anjiyoinhibitörlerdir. TGF- β sitokini tümör oluşumunun erken fazında, tümör baskılayıcı fonksiyonlara sahipken, tümörün geç evresinde tümörün ilerlemesi ve metastazına öncülük ettiği bilinmektedir. ADAMTS-8'in TGF- β sitümülasyonu ile, kolorektal kanserdeki işlevini ortaya koyan herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu tez çalışması, kolorektal kanser modeli (SW480) üzerinde TGF- β 'nin ADAMTS-8'in transkripsiyonel regülasyonuna katkısının belirlenmesini amaçlamaktadır. Bu tez çalışmasının sonucunda, TGF- β 'nin 20 ng/mL'lik dozda SW480 kolon kanseri hücrelerinde proliferatif etkiye sahip olduğu MTT testi ile belirlenmiştir. Ardından, TGF- β sitokinin farklı zaman aralıklarında ADAMTS-8'in mRNA ve protein düzeyinde ifadesinde artışa sebep olduğu Real Time PCR ve Western Blot çalışmalarıyla belirlenmiştir. TGF- β aracılı, ADAMTS-8 promotörünün transkripsiyonel aktivitesi beş farklı uzunlukta promotör parçasının SW480 hücrelerine geçici transfeksiyonu ile araştırılmıştır. Transfeksiyon sonucunda en aktif promotör parçalarının pMet_TS-8[-223/+323], pMet_TS-8[-662/+323] ve pMet_TS-8[-851/+323] olduğu tespit edilmiştir. Yolak inhibisyon çalışmaları sonucunda, TGF- β ile uyarılan ADAMTS-8 regülasyonunun mRNA ve protein düzeyinde p38 MAPK, MEK, JNK, PI3K ve SMAD-3 hücre içi sinyal yolları üzerinden olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, transkripsiyonel aktivitedeki artışın p38 MAPK, MEK, JNK, PI3K ve SMAD-3 yolları üzerinden düzenlendiği transfeksiyon çalışması ile belirlenmiştir. SW480 hücrelerinde TGF- β uygulamasıyla birlikte, SMAD2/3 transkripsiyon faktörünün ADAMTS-8 promotöründeki bazı bölgelere fonksiyonel olarak bağlandığı kromatin immünopresipitasyonu (ChIP) analiziyle doğrulanmıştır.

ANAHTAR KELİMELER: ADAMTS, ADAMTS-8, TGF- β , SW480, kolorektal kanser

Bilim Kodu :20606

Sayfa Sayısı: 96

ABSTRACT

DETERMINATION OF THE EFFECTS OF TGF-B1 ON ADAMTS8 GENE EXPRESSION IN A COLON CANCER MODEL

MSC THESIS

FEYZA NUR SAV

BALIKESIR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

(SUPERVISOR: PROF. DR. FERAY KÖÇKAR)

(CO-SUPERVISOR: ASST. PROF. DR. MELTEM ALPER)

BALIKESİR, JULY - 2023

ADAMTS-8 is a member of the family of intercellular matrix proteases called ADAMTS (A Disintegrin-like And Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs). ADAMTS-1 and ADAMTS-8 are potent angioinhibitors that inhibit new vessel formation induced by vascular endothelial growth factor (VEGF) and fibroblast growth factor-2 (FGF-2). While TGF- β cytokine has tumor suppressor functions in the early phase of tumorigenesis, it is known to lead to tumor progression and metastasis in the late phase of the tumor. No study has been found that demonstrates the function of ADAMTS-8 in colorectal cancer with TGF- β stimulation. This thesis study aims to determine the contribution of TGF- β to the transcriptional regulation of ADAMTS-8 in a colorectal cancer model (SW480). As a result of this thesis, it was determined by the MTT test that TGF- β had a proliferative effect at a dose of 20 ng/mL on SW480 cells. Then, it was determined by Real Time PCR and Western Blot studies that TGF- β cytokine caused an increase in the expression of ADAMTS-8 at mRNA and protein levels at different time intervals. TGF- β -mediated transcriptional activity of the ADAMTS-8 promoter was investigated by transient- transfection of five different lengths of promoter fragments into SW480 cells. As a result of transfection, it was determined that the most active promoter parts were pMet_TS-8[-223/+323], pMet_TS-8[-662/+323] and pMet_TS-8[-851/+323]. As a result of pathway inhibition studies, it was determined that the regulation of ADAMTS-8 induced by TGF- β was via p38 MAPK, MEK, JNK, PI3K and SMAD-3 intracellular signaling pathways at the mRNA and protein level. It was determined by transfection study that the increase in transcriptional activity was regulated via p38 MAPK, MEK, JNK, PI3K and SMAD-3 pathways. With administration of TGF- β in SW480 cells, the functional binding of the SMAD2/3 transcription factor to certain regions in the ADAMTS-8 promoter was confirmed by Chromatin Immunoprecipitation Assay (ChIP) analysis.

KEYWORDS: ADAMTS, ADAMTS-8, TGF- β , SW480, colorectal cancer.

Science Code / Codes : 20606

Page Number : 96

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ	vi
TABLO LİSTESİ	vii
SEMBOL LİSTESİ	viii
ÖNSÖZ	ix
1. GİRİŞ	1
1.1 Kolorektal Kanser	1
1.1.1 Genomik ve Epigenetik Sınıflandırma	2
1.1.2 Transkriptomik Sınıflandırma	3
1.2 Sitokinler	3
1.2.1 TGF- β Süper Ailesi	5
1.2.1.1 TGF- β Ailesi Ligandları Sentezi ve Post-Translasyonel Modifikasyon	6
1.2.2 TGF- β Reseptörleri	9
1.2.2.1 SMAD Bağımlı Sinyalizasyon	10
1.2.2.2 SMAD Proteinlerinin Yapısı	11
1.2.2.3 SMAD Bağımsız TGF- β Sinyali	13
1.3 ADAMTS Gen Ailesi	15
1.3.2 ADAMTS Gen Ailesi ve Kolorektal Kanser	17
1.3.3 ADAMTS Gen Ailesi ve Regülasyonu	18
1.3.4 ADAMTS Proteazlarının Alternatif Splays ve Posttranslasyonel Modifikasyonları	20
1.4 ADAMTS-8	21
1.4.1 ADAMTS-8 ve Agrekanaz Aktivitesi	21
1.4.2 ADAMTS-8 Regülasyonu	22
2. TEZİN HEDEFLERİ VE ÇALIŞMA KAPSAMI	23
3. MATERYAL-YÖNTEM	25
3.1 MATERYALLER	25
3.1.1 Kullanılan Kimyasal	25
3.1.2 Kullanılan Laboratuvar Cihazları	28
3.2 YÖNTEM	29
3.2.1 Hücre Kültüründe Mikrobiyal Kontaminasyonun Önlenmesi ve Sterilizasyon	29
3.2.1.1 Steril Çalışma Alanı Oluşturma	29
3.2.1.2 Ekipman Sterilizasyonu	29
3.2.2 Hücre Tabanlı Teknikler	30
3.2.2.1 Hücre Kültürü İçin Besiyerinin Hazırlanması ve Serum İlavesi	30
3.2.2.2 Hücre Kültüründe Kullanılacak Olan Kimyasal Malzemelerin Hazırlanması	30
3.2.2.3 Donmuş Halde Saklanan Hücrelerin Çözülmesi ve Kültürün Başlaması	31
3.2.2.4 Hücrelerin Pasajlanması	31
3.2.2.5 Tripan Mavi Boyası ile Canlı Hücrelerin Belirlenmesi	32
3.2.2.6 Hücrelerin Dondurulması	32
3.2.2.7 Deney Tasarımı	32
3.2.2.8 Sitotoksite Deneyi	33

3.2.3 RNA Tabanlı Teknikler.....	34
3.2.3.1 RNA İzolasyonu	34
3.2.3.2 RNA İzolasyon Miktarının Belirlenmesi	34
3.2.3.3 RNA Elektrofrezisi: Formaldehit-Agaroz Jel Metodu.....	35
3.2.3.4 RNA'nın reverse transkriptaz enzimi (RT) tarafından komplementer DNA (cDNA) olarak sentezlenmesi	36
3.2.3.5 cDNA'nın Kalitesinin Değerlendirmesi için PCR Yönteminin Kullanımı.....	37
3.2.3.6 Agaroz Jel Elektrofrezisi.....	38
3.2.3.7 Real Time PCR (qPCR)	39
3.2.3.8 Real Time PCR Sonuçlarının Livak Metoduna Göre Değerlendirilmesi.....	40
3.2.4 Protein ile İlgili Teknikler	40
3.2.4.1 Western Blot Yöntemi Kullanarak Proteinlerin Belirlenmesi.....	40
3.2.4.2 RIPA tamponu kullanarak hücrelerin lizisi ve proteinlerin ekstraksiyonu	42
3.2.4.3 Bradford Yöntemiyle Protein Miktarı Tayini.....	43
3.2.4.4 SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE).....	44
3.2.4.5 Proteinlerin SDS-PAGE Jelinden PVDF Western Blot Membranına Transferi ...	45
3.2.4.6 Proteinlerin Antikorlarla Etkileşiminin İmmüno blot Yöntemiyle Tespiti	46
3.2.4.7 Protein Bantlarının Görselleştirilmesi ve Analiz Edilmesi	46
3.2.5 Transfeksiyon Çalışmaları ile İlgili Teknikler	47
3.2.5.1 Transfeksiyon Deneyi.....	48
3.2.5.2 Salınan Sistem Lusiferaz Aktivitesinin Ölçülmesi.....	49
3.2.6 Kromatin İmmüno Presipitasyonu (ChIP)	50
3.2.6.1 Kromatin İmmüno presipitasyonunda Fiksasyon Aşaması	51
3.2.6.2 Kromatin İmmüno presipitasyonunda Çapraz Bağlı Protein/DNA'nın İmmüno presipitasyonu (IP).....	52
3.2.6.3 Kromatin İmmüno presipitasyonunda Protein/DNA Komplekslerinin Elüsyonu....	53
3.2.6.4 Kromatin İmmüno presipitasyonunda Protein/DNA Komplekslerinin Serbest DNA'ya Çevrilmesi	53
3.2.6.5 Kromatin İmmüno presipitasyonunda DNA Saflaştırması.....	54
4. BULGULAR.....	56
4.1 TGF-β'nın SW480 Hücre Proliferasyonuna Olan Etkisinin MTT Analizi ile Belirlenmesi	56
4.2 ADAMTS-8 Geninin TGF-β Sitokini Tarafından Regülasyonu	57
4.2.1 SW480 Hücrelerinde TGF-β Sitokininin ADAMTS-8 mRNA Ekspresyonu Üzerindeki Etkisinin qRT PCR ile Belirlenmesi	57
4.2.2 SW480 Hücrelerinde TGF-β Sitokininin ADAMTS-8 Protein Ekspresyonu Üzerindeki Etkisinin Western Blot ile Belirlenmesi.....	60
4.2.3 TGF-β Sitokininin ADAMTS-8 Geninin Transkripsiyonel Aktivitesi Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi.....	61
4.2.3.1 Geçici Transfeksiyonda Kalsiyum-Fosfat Presipitasyonu Metoduyla Salınan Lusiferaz ve Seap Sisteminin Optimizasyonu.....	61
4.2.3.2 ADAMTS-8 Geni Promotor Parçalarının Bazal Aktivitelerinin Belirlenmesi	63
4.2.3.3 TGF-β Sitokininin ADAMTS-8 Bazal Promotor Aktivitesine Olan Etkisinin Belirlenmesi	64
4.3 ADAMTS-8 Geninin Ekspresyonunda TGF-β Sitokin Cevabından Sorumlu Olan Hücre İçi Yolakların Belirlenmesi	65
4.3.1 mRNA Düzeyinde Yolak İnhibisyon Çalışmaları.....	65
4.3.1.1 TGF-β'nın, ADAMTS-8 İndüksiyonunda SMAD Bağımlılığının mRNA düzeyinde Belirlenmesi	67

4.3.2 Protein Düzeyinde Yolak İnhibisyon Çalışmaları.....	68
4.3.3 TGF- β Sitokinini ve Yolak İnhibitörlerinin ADAMTS-8 Promotor Aktivitesine Olan Etkisinin Belirlenmesi.....	70
4.3.4 TGF- β Sitokininin Aktive Ettiği ADAMTS-8 Promotoruna Bağlanan SMAD2/3 Transkripsiyon Faktörlerinin ChIP Analizi ile Belirlenmesi.....	73
5. SONUÇ VE TARTIŞMA	76
EKLER	82
EK A: Kullanılan Markerler.....	82
ÖZGEÇMİŞ	83
6. KAYNAKLAR	84

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: Hedef hücreler ve sitokinlerin etkileri .	5
Şekil 1.2: TGF- β süper ailesinin şematik temsili.	6
Şekil 1.3: TGF- β ligand olgunlaşması.	9
Şekil 1.4: SMAD proteinlerinin yapısının şematik gösterimi.	12
Şekil 1.5: TGF- β SMAD bağımlı olmayan sinyal yolları	15
Şekil 1.6: ADAMTS-8 geninin kromozom lokasyonu	21
Şekil 2.1: Tez kapsamında olan çalışmalar.	24
Şekil 3.1: MTT testinde gerçekleşen redüksiyon	33
Şekil 3.2: Bradford eğrisi ve formülü	44
Şekil 4.1: Zamana bağlı olarak farklı konsantrasyonlarda uygulanan TGF- β sitokininin SW480 hücre proliferasyonu üzerindeki etkisi.	57
Şekil 4.2: SW480 hücrelerinde formaldehit agaroz jel elektroforezi görüntüsü.	58
Şekil 4.3: Agaroz jel elektroforezi ile H β -2-M PCR'da cDNA kalite kontrolü	59
Şekil 4.4: 20 ng/mL TGF- β uygulanmış SW480 hücrelerinde ADAMTS-8'in mRNA ifadesindeki zamana bağlı etkisi.	59
Şekil 4.5: SW480 hücrelerinde 20 ng/mL TGF- β uygulanmış sitokin deneyi protein bantları.	60
Şekil 4.6: 20 ng/mL TGF- β uygulanmış SW480 hücrelerinde ADAMTS-8 protein düzeyinin zamana bağlı değişimi.	61
Şekil 4.7: pMetLuc-Reporter ve pMetLuc-kontrol vektörleri aracılığıyla transfeksiyon etkinliğinin belirlenmesi.	63
Şekil 4.8: Karşılaştırmalı olarak verilen ADAMTS-8 geninin promotor parçalarının bazal aktiviteleri	64
Şekil 4.9: TGF- β Sitokininin ADAMTS-8 promotor aktivitesine olan etkisini gösteren grafik.	65
Şekil 4.10: Yolak İnhibitörlerinin ADAMTS-8 mRNA düzeyine olan etkisini gösteren grafik.	67
Şekil 4.11: TGF- β sitümlasyonunda, ADAMTS-8 geninin SMAD Bağımlılığının mRNA düzeyinde belirlenmesi.	68
Şekil 4.12: Yolak İnhibitörlerinin ADAMTS-8 protein düzeyine olan etkisini gösteren grafik.	70
Şekil 4.13: pMET_TS-8[-223/+323] promotor parçasının TGF- β sitokini ile regülasyonunda kullandığı yolaklar.	71
Şekil 4.14: pMET_TS-8 [-662/+323] promotor parçasının TGF- β sitokini ile regülasyonunda kullandığı yolaklar.	72
Şekil 4.15: pMET_TS-8[-851/+323] promotor parçasının TGF- β sitokini ile regülasyonunda kullandığı yolaklar.	72
Şekil 4.16: ADAMTS-8 [-856/+323] promotörü üzerinde bulunan TGF-B ile ilişkili transkripsiyon faktörlerinin muhtemel bağlanma bölgeleri.	74
Şekil 4.17: SMAD over ekspresyonu sonucu SMAD2/3 antikoruna ile SMAD-2,-3 ve -4'ün immüno-çökeltme yeteneğinin grafiği.	75
Şekil 4.18: Smad2/3 antikorunun SMAD-2, -3 ve -4 over ekspresyonu ile TGF- β 'ya bağlı immüno-çökeltme yeteneğinin grafiği.	75

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 3.1: Hücre tabanlı çalışmalarda kullanılan kimyasallar ve temin edildikleri ticari firmalar.	25
Tablo 3.2: Sitokin ve yolak inhibisyon çalışmalarında kullanılan kimyasallar ve temin edildikleri ticari firmalar.	25
Tablo 3.3: RNA çalışmalarında kullanılan kimyasallar ve temin edildikleri ticari firmalar.	26
Tablo 3.4: DNA tabanlı çalışmalarda kullanılan kimyasallar ve temin edildikleri ticari firmalar.	26
Tablo 3.5: Protein tabanlı çalışmalarda kullanılan kimyasallar ve temin edildikleri ticari firmalar.	27
Tablo 3.6: Transfeksiyon tabanlı çalışmalarda kullanılan kimyasallar ve temin edildikleri ticari firmalar.	27
Tablo 3.7: Tez çalışması esnasında kullanılan cihazlar ve markaları.....	28
Tablo 3.8: RNA saflığını ve miktarının formülü verilmiştir.	34
Tablo 3.9: Formaldehit jel elektroforezi için gerekli çözeltiler ve hazırlanışı	36
Tablo 3.10: cDNA sentezi basamakları ve gerekli bileşenler.....	37
Tablo 3.11: Kullanılan primerler.	37
Tablo 3.12: cDNA sentezi kontrolü için H β -2 PCR'ında kullanılan malzemeler.	38
Tablo 3.13: H β -2 PCR koşulları	38
Tablo 3.14: Real Time PCR bileşenleri.....	39
Tablo 3.15: Real Time PCR çalışma koşulları	39
Tablo 3.16: Western Blot tekniğinde kullanılan çözeltiler ve hazırlanma prosedürleri	41
Tablo 3.17: SDS-PAGE jellerinin bileşenleri ve hazırlanma oranları 2 jel için verilmiştir.	45
Tablo 3.18: Kalsiyum-Fosfat presipitasyonunda kullanılan çözeltiler.....	47
Tablo 3.19: Kalsiyum-Fosfat presipitasyonunda kullanılan çözeltiler.....	49
Tablo 3.20: CHIP'te amacına uygun kullanılan antikorlar ve miktarları.	52
Tablo 3.21: CHIP'te kullanılan yıkama tamponları ve kaç kez kullanıldıkları.....	53
Tablo 3.22: CHIP Real Time PCR'ında kullanılan primerler ve dizleri.	54

SEMBOL LİSTESİ

ADAM: Disintegrin-benzeri ve Metalloproteaz

ADAMTS: A Disintegrin and Metaloproteinase with Trombosondin type-1 motif

BSA: Sığır Serum Albumin

ChIP: Kromatin İmmuno Prensipasyonu

CIMP: CpG Adası Metilatör Fenotipi

DEPC: Diethyl Pyrocarbonate

DMEM: Dulbecco's Modified Eagles Medium

ERK: Ekstraselüler Sinyal Düzenleyici Kinazı

FBS: Fetal Bovine Serum

KRK: Korolektal Kanser

LAP: Latency Associated Peptides

MAPK: Mitojen-Aktive Protein Kinazlar

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolyum Bromür

PI3K: Fosfatidilinositol-3 Kinazı

SİS3: SMAD-3 İnhibitör

SW480: İnsan Kolorektal Kanser Hücre Hattı

TGF- β : Transforming Growth Factor Beta

TRAF: Tümör Nekroz Faktör Reseptörü ile İlişkili Faktör

T β R: Transforming Growth Factor Beta Receptor

ÖNSÖZ

Akademik ve hayata karşı duruşunu her zaman örnek alacağım değerli danışmanım Prof. Dr. Feray KÖÇKAR'a teşekkürlerimi sunmak istiyorum. İlham kaynağım olan danışman hocam, sadece bir öğrenci olmamın ötesinde anne şevkati ile ve yol yostericiliğiyle her zaman yanımda olduğu için, vicdanımın sesiyle doğruyu bulmanın önemini bana öğrettiği için minnettarlığımı ifade etmek istiyorum.

Çalışkanlığı ve derin bilimsel bakış açısıyla akademik hayatta güçlenmemi ve ileriye odaklanmamı sağlayan çok değerli eş danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Meltem ALPER'e kalpten teşekkürlerimi sunuyorum. Uzaktayken tanıştığımız halde, kendisini her zaman yanımda hissettiğim, akademik hayatımda bana kılavuzluk eden bazen bir danışman bazen de bir abla olduğu için kendisine çok minnettarım.

Bilgi ve tecrübeleriyle yanımda olan kıymetli hocalarım Doç. Dr. Hatice YILDIRIM'a ve Doç. Dr. Sümeyye AYDOĞAN TÜRKÖĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Koşulsuz destekleriyle her zaman yanımda olan, ailelerinin bir ferdi gibi sıcaklık ve içtenlikle Balıkesir'deki yolculuğumda bana verdikleri sevgi ve güç için, ne zaman adım atacağımı bilemediğim anlarda bana rehberlik eden sevgili hocalarım; Doç. Dr. Esra Tokay ve Dr. Öğr. Üyesi Nelin Hacıoğlu'na teşekkür ediyorum.

Akademik hayatımı ve sosyal hayatımı eğlenceli hale getirmiş olan sevgili hocalarım Mesut ACAR'a, Kübra PASPAL EROĞLU'na, Ehed Muhammed AYMAZ'a, Saliha Derya KESKİN'e, Candan ALTUNTAŞ'a teşekkür ediyorum.

Laboratuvar hayatımızı keyifli kılan değerli hocam Arş. Gör. Serhad ONAT'a teşekkür ediyorum.

Hiçbir zaman desteklerini esirgemeyip yanımda olan Hasan ÇAPRAZ'a teşekkür ediyorum.

Yüksek lisans sürecimde birlikte yol aldığım ekip arkadaşlarım Aylin TÜRKÖĞLU'na, Rümeyza ALAÇAM'a, Şevin AVŞAR'a, Ghufraan Haqı Ismael ALBAZI'ye, Merve DEMİR'e, Ufuk MÜLHİM'e, Alper TACAR'a teşekkür ediyorum.

Birlikte üstesinden geldiğimiz zorlukları anlamlı kılan, akademik yolculumdaki yükümü hafifleten, hayatta her zaman birlikte yol almaktan mutluluk duyacağım ev arkadaşım, dostum, sırdaşım sevgili Yasemin KELEŞ'e çok teşekkür ediyorum.

Bu yolda yürümem için bana her zaman destek olan, düştüğümde kaldıran, sevgisiyle tüm sorunlarımı aşmamı sağlayan en değerli varlıklarım, sevgili annem Emine SAV'a ve babam Coşkun SAV'a sonsuz teşekkür ediyorum.

Balıkesir, 2023

Feyza Nur SAV

1. GİRİŞ

1.1 Kolorektal Kanser

Kolorektal kanser (KRK), dünya çapında kansere bağlı ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yer almaktadır [1]. 2030 yılına kadar, dünya çapında 2,2 milyondan fazla yeni KRK vakası ve KRK'den kaynaklanan 1,1 milyon ölüm ol+acağı tahmin edilmektedir [2]. Genetik, yaşam tarzı, obezite ve çevresel faktörlerin KRK ile ilişkisi olsa da, bu artışın kesin nedenleri tam olarak anlaşılamamıştır [3]. KRK, dünya çapında en çok teşhis konulan üçüncü kanser türüdür. Teşhis edilme sıklığında erkekler üçüncü, kadınlar ikinci sırada yer almaktadır [1]. KRK'deki bu cinsiyet farklılıklarını açıklayabilecek birkaç faktör vardır. Bunlardan biri, kadınların KRK taramasına erkeklerden daha iyi katılmasıdır. Kadınlarda, cinsiyet steroid hormonlarının koruyucu etkileri olduğu ve cinsiyetler arasında karsinojenlere karşı farklı tepkiler oluşturdukları düşünülmektedir. Bu gibi sebepler KRK insidansındaki cinsiyet farklılıklarını açıklayabilir [4]. Bunun yanı sıra, proksimal ve distal KRK'lerde epidemiyolojik ve histolojik farklılıklar gözlenmiştir: sağ taraflı KRK'leri olan hastaların, sol taraflı KRK'leri olanlarla karşılaştırıldığında kadın olma, daha yaşlı olma ve müsinöze sahip olma, farklılaşmamış veya halka şeklinde hücre histolojisine sahip olma olasılığı daha yüksektir [5]. Ayrıca farklı organlara farklı metastaz sıklıkları vardır; sağ taraflı KRK'lerin peritona metastaz yapma olasılığı daha yüksek iken, sol taraflı KRK'lerin ise, göğüs kafesine veya daha az sıklıkla kemiğe metastaz yapma olasılığı daha yüksektir [6].

Kolorektal kanserin kesin nedeni bilinmemekle birlikte, yaş, ailede kolorektal kanser öyküsü olması, kişisel sebepler ve diyet gibi çeşitli risk faktörleri ile ilişkilendirilebilir [7]. Hem kalıtsal hem de çevresel risk faktörleri, kolorektal kanser gelişiminde rol oynamaktadır [8]. KRK'lı hastaların yaklaşık %75'inde, hastalığın kalıtsal olduğuna dair belirgin bir kanıt yoktur. Hastalık sporadik şekilde gelişmiştir [9]. Hastaların geri kalan %10-%30'unda kalıtsal faktörlerin katkısıyla ortaya çıkan KRK'ya sahiptir. Bu hastaların aile üyeleri arasında ortak maruziyetler, risk faktörleri veya bu ikisinin kombinasyonuna dair bir aile geçmişi bulunabilir. Kolorektal kansere yatkın bazı ailelerde, yüksek penetrasyonlu genlerdeki patojenik varyantlar, kalıtsal kanser riskinin nedeni olarak tanımlanmıştır; bunların genel olarak KRK vakalarının yalnızca %5 ila %6'sını oluşturduğu tahmin edilmektedir [10, 11].

KRK moleküler olarak genetik ve epigenetik sınıflandırma ve transkriptomik sınıflandırma olmak üzere iki gruba ayrılmıştır [12, 13].

1.1.1 Genomik ve Epigenetik Sınıflandırma

Kolorektal kanser patogenezi , kromozomal instabilite (CIN), mikrosatellit instabilite (MSI) ve epigenetik instabilite veya CpG adası metilatör fenotipi (CIMP) patogenezi ile bağlantılı üç moleküler yolak ile ilişkilidir [14].

Kromozomal instabilite, kromozom sayısındaki dengesizlikler ve heterozigotluk kaybı ile karakterize edilir. Bu durum, onkogen ve tümör baskılayıcılarının denge durumunu bozar ve APC, DCC/SMAD4 ve TP53 genlerinin ardışık olarak inaktive olmasını kolaylaştırır. Kromozomal instabilite, DNA somatik kopya sayısı değişikliklerinin (SCNAs) yüksek seviyelerine ve bazı genlerin küçük bir grupta DNA amplifikasyonu/kazanç veya delesyon/kayba neden olur. Bu yol, Familial Adenomatous polipozis (FAP) hastalarının karakteristik özelliğidir [15].

Mikrosatellit instabilitesi, DNA yanlış eşleşme tamiri (MMR) genlerinin inaktivasyonu sonucunda oluşur. Bu MMR genlerinden bazıları mutL homolog 1 (MLH1), MLH3, mutS homolog 2 (MSH2), MSH3, MSH6 veya PMS1 homolog 2 (PMS2) dir. Hatalı DNA eşleşme tamiri olan tümör hücrelerinde, genom hataları birikir ve bu hatalar tekrarlanarak birçok gende hipermutasyona neden olur. Yüksek düzeyde mikrosatellit instabilitesi (MSI-H), Lynch sendromunun karakteristik bir özelliğidir. En yaygın MMR eksikliği paterni, MLH1 defekti nedeniyle, MLH1/PMS2 ifadesinin kaybıdır. Bu durum Lynch sendromuna ait MLH1 mutasyonu yerine, promotor hipermetilasyonu sonucunda meydana gelir. PMS2, MSH2 veya MSH6 ifadesinin kaybı, Lynch sendromu olasılığını artırır [16].

Epigenetik instabilite, CpG adası bölgelerinin (CIMP) hipermetilasyonu ile ilişkilidir. Bu durum, 100'den fazla tümör baskılayıcı ve/veya tümörle ilişkili genin inaktivasyonuna yol açar. Çoğunlukla driver (sürücü) mutasyonları ve kolorektal kanser passenger (mesajcı) mutasyonu ile birçok geni etkileyen yüksek mutasyon hızına (ultramutant) neden olur. DNA'nın CpG hipermetilasyonu, BRAF genini aktive edebilir veya MLH1 geninin ifadesini susturabilir [17].

1.1.2 Transkriptomik Sınıflandırma

2014 yılında, gen ekspresyonuna dayalı olarak, kolorektal kanser dört konsensus moleküler alt tipinde (CMS1-4) sınıflandırılmıştır [18].

CMS1 (Bağımsızlık tipi), karsinom, yüksek mikro uydu kararsızlığı (MSI-H), hipermutasyon, CIMP-pozitif fenotip, BRAF mutasyonu ve bağımsızlık genlerinin aşırı ifadesini gösterir.

CMS2 grubu (Kanonik tip), yüksek kromozomal instabilite (CIN-H), mikrosatellit stabilitesi (MSS), CIMP-negatif fenotipine sahiptir. Bu grup, APC, p53 veya RAS mutasyonları ile ilişkilidir. Epidermal büyüme faktörü reseptörünün (EGFR) yüksek ifadesi ve WNT/MYC sinyalleşme aktivasyonu ile ilişkilidir. Ayrıca, EGFR2'nin aşırı ifadesi ile karakterizedir. Bu tümörler, distal kolon ve rektumda ortaya çıkar, adenomlardan kaynaklanır ve orta derecede bir prognoza sahiptir.

CMS3 (Metabolik tip), yüksek glutaminoliz ve lipidogenez, MSS, CIMP-düşük fenotip ve KRAS ve APC mutasyonları ile metabolik düzensizlik ile karakterizedir. Orta düzeyde bir prognoza sahiptir. Bu tümörler proksimal, distal kolon ve rektum boyunca eşit olarak dağılır.

CMS4 (Mezenkimal tip): MSS, CpG hipermetilasyonu, TGF- β aktivasyonu, stromal infiltrasyon, epitelyal-mezenkimal geçiş aktivasyonu, matris yeniden modellenmesi ve anjiyogenez gibi özellikler sergiler. İleri aşamalarda ortaya çıkar ve kemo-dirençle ilgili olarak daha zayıf genel sağkalım gösterir.

1.2 Sitokinler

Sitokinler, hücreler tarafından salınan küçük glikoproteinlerdir ve çeşitli hücrelerden (lenfositler, makrofajlar, doğal öldürücü (NK) hücreler, mast hücreleri ve stromal hücreler) salgılanan, düşük moleküler ağırlıklı ($\approx 6-70$ kDa) çözünen proteinlerdir. Salgılanan bu proteinlerin; hücreler arasındaki etkileşimler ve iletişim üzerinde spesifik etkilere sahip olduğu bilinmektedir [19, 20]. Sitokin terimi genel bir isimdir; diğer isimleri arasında lenfokin (lenfositler tarafından yapılan sitokinler), monokin (monositler tarafından yapılan sitokinler), kemokin (kemotaktik aktiviteye sahip sitokinler) ve interlökin (bir lökosit tarafından yapılan ve diğer lökositler üzerinde etkili olan sitokinler) bulunur [19].

Sitokinler, immün ve inflammatuar yanıtların anahtar modülatörleri olup, enfeksiyon, doğal ve kazanılmış bağımsızlık, otoimmünite ve iltihaplanma gibi hücresel aktiviteleri uyarır veya

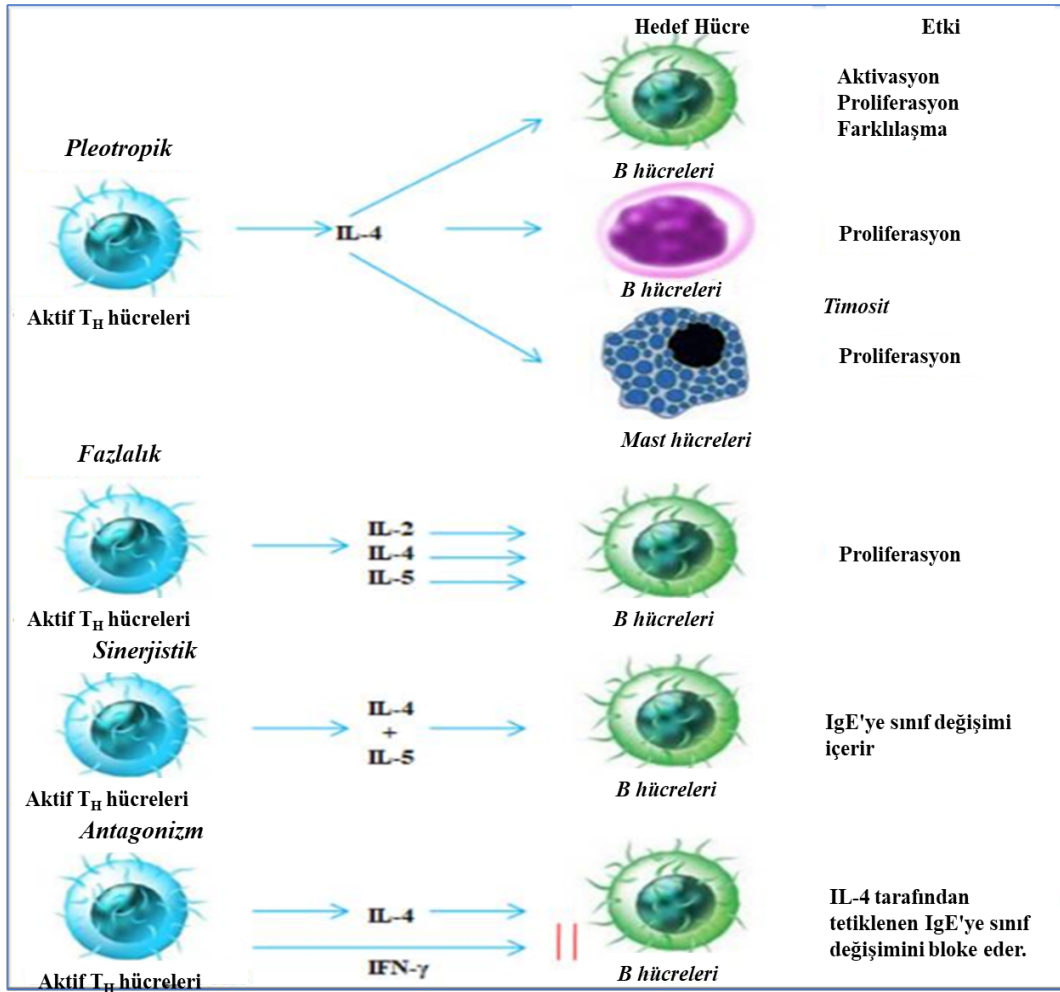
baskırlar. Ayrıca, otokrin, parakrin veya endokrin tarzda işlev görerek hücre içi iletişimi sağlarlar ve malignitede önemli bir rol oynarlar [21]. Hücrel aktiviteyi organize bir şekilde koordine etmeyi ve kontrol etmeyi sağlayan dört farklı özellik gösterir [22]. Bu özellikler şu şekildedir;

Pleotropik aktivite, spesifik bir sitokinin farklı hedef hücreler üzerinde çeşitli biyolojik etkilere sahip olduğu durumu ifade etmektedir.

Fazlalık (Reduncancy) aktivite, iki veya daha fazla sitokin ile ilgili aktiviteyi yönlendirdiğinde varsayılan özelliktir.

Sinerjistik aktivite, İki sitokinin hücre fonksiyonu üzerindeki kollektif etkisi, tek bir sitokinin etkisinden daha faydalı olduğu durumdur.

Antagonizm aktivite; bir sitokinin etkisinin,başka bir sitokinin etkisini inhibe ettiği veya telafi ettiği durumdur [19].

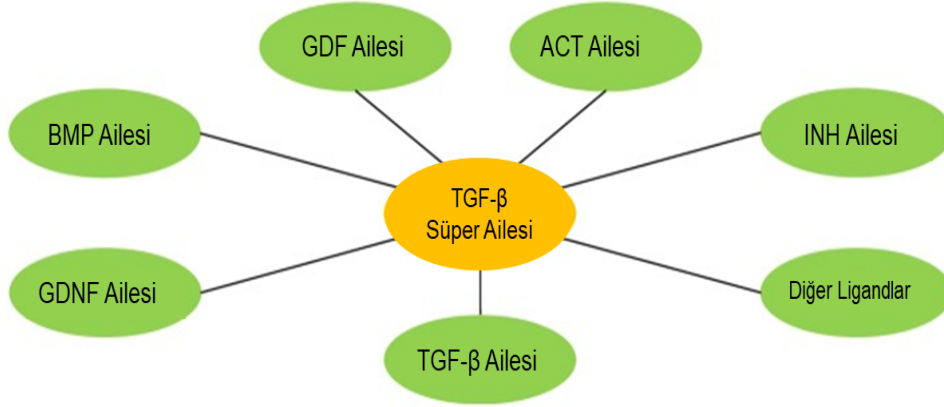


Şekil 1.1: Hedef hücreler ve sitokinlerin etkileri [22].

Sitokinlerin sınıflandırılması oldukça karmaşıktır. Genel olarak hücre kaynaklarına göre, rollerine bağlı olarak ve tümör nekroz faktörleri (TNF'ler), interlökinler (IL'ler), lenfokinler, monokinler, interferonlar (IFN'ler), koloni uyarıcı faktörler (CSF'ler) ve dönüştürücü büyüme faktörleri (TGF'ler) dahil olmak üzere bir dizi kategoride sınıflandırılabilir [23].

1.2.1 TGF-β Süper Ailesi

Omurgalılarda ve omurgasızlarda 33 adet üyesi bulunan homodimerik ya da heterodimerik salgılanan sitokinlerden oluşmaktadır. Aile üyeleri moleküler tanımlarına göre çeşitli isimler almıştır [24].



Şekil 1.2: TGF- β süper ailesinin şematik temsili.

GDF: büyüme ve farklılaşma faktörü; ACT: aktivin; INH: inhibin; diğer ligandlar arasında Müllerian inhibisyon maddesi (MIS) veya anti-Müllerian hormonu (AMH), leftright belirleme faktörü (Lefty) ve nodal büyüme farklılaşma faktörü (Nodal) bulunur; GDNF: gliyal kökenli nörotrofik faktörler; BMP'ler: kemik morfojenetik proteinler [25].

TGF-β süper ailesi, çoğalma, farklılaşma, göç ve apoptoz gibi çok çeşitli biyolojik fonksiyonları düzenler [26]. Tüm büyüme faktörlerine benzer şekilde, TGF- β ailesi, çoğu vücut dokusundaki etkilerini otokrinik, parakrinik ve endokrinik yollarla kontrol eden pleiotropik ve fazlalık etkileri ile karakterize edilir [27]. TGF-β sinyal yollarındaki değişiklikler, çok sayıda patolojik durumu içeren konjenital hastalıklar, fibrotik bozukluklar, immün disfonksiyonu ve tümör oluşumu gibi birçok hastalığa sebep olmaktadır [28, 29]. TGF-β sinyalinin kanserde düzenlenmesi karmaşıktır, çünkü genellikle normal dokularda ve erken tümör gelişiminde tümör baskılayıcı bir rol oynar [30]. TGF-β sinyalinin tümör baskılayıcı moleküllerindeki mutasyonlar/anormallikler ilerlemiş kanserlerde yaygın olarak gözlemlenmiştir [31]. Tümör hücrelerinde bu sitokin, epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT), metastaz, anjiyogenez, otofaji ve immün supresyonunu indükleyerek tümörjenez tetikler [32].

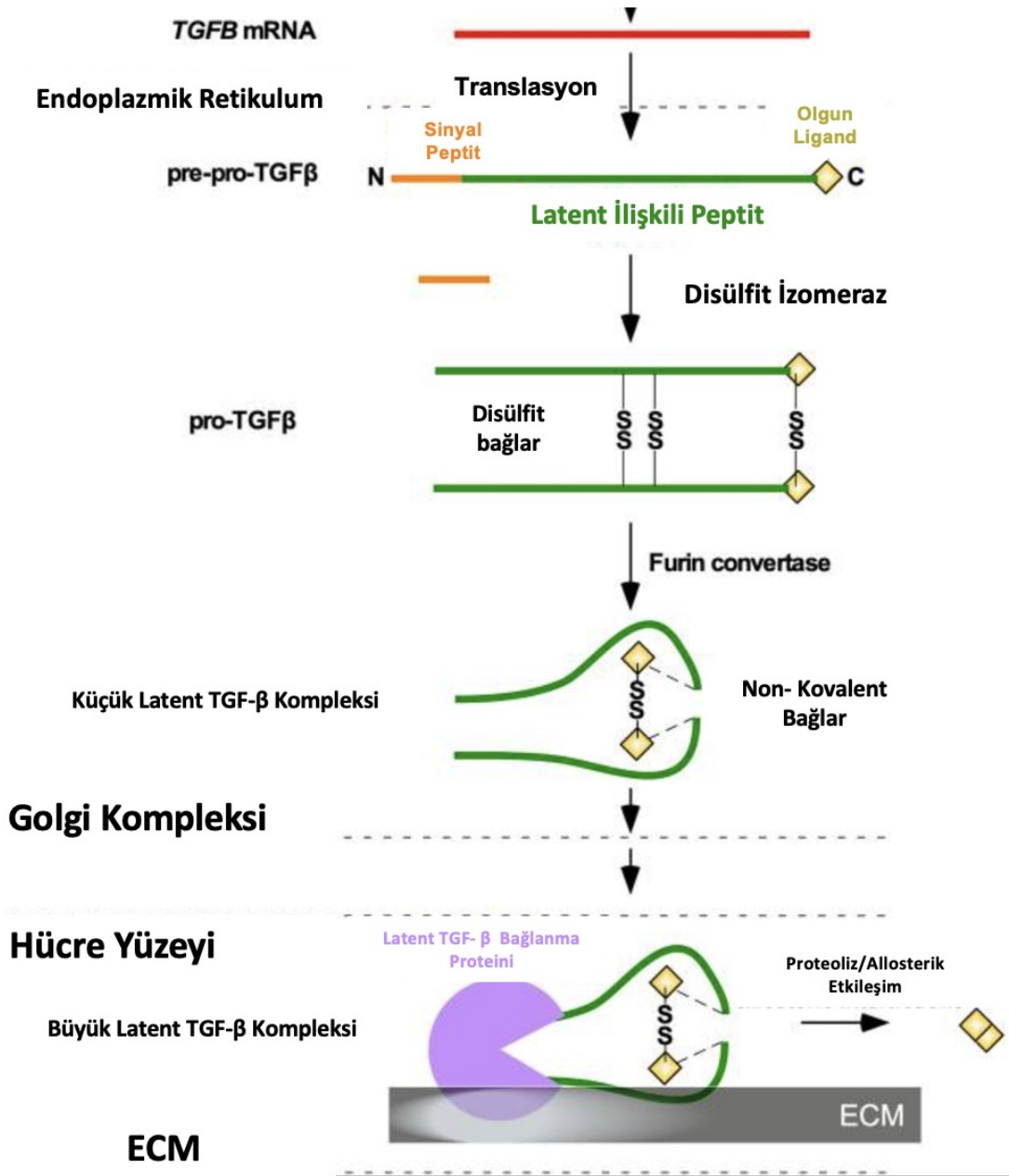
1.2.1.1 TGF-β Ailesi Ligandları Sentezi ve Post-Translasyonel Modifikasyon

Üç farklı gen tarafından kodlanan TGF-β izoformları, TGF-β1, TGF-β2 ve TGF-β3, yapısal olarak neredeyse aynıdır (dokuz korunmuş sistein kalıntısı, %76-80 amino asit homolojisi). Bu izoformlar, makrofajlar, trombositler, tümör hücreleri ve fibroblastlar dahil olmak üzere çok çeşitli hücre tipleri tarafından sentezlenir [33, 34]. Bu izoformlar ilginç şekilde sırasıyla farklı kromozomlarda, 19q13, 1q41 ve 14q24 şeklinde konumlanmıştır; [35]. TGF-β1

promotoru, diğ er izoformların promotorlarından farklıdır. Klasik TATAA kutusunu promotor bölgesindeki çoklu düzenleyici alanlarını değ iştirerek ayırt edilir [36]. Bu özellikler, TGF- β 1 promotorünün, reaktif oksijen türleri (ROS), plazmin ve asit gibi işlem yapan proteinler tarafından doğ rudan aktive edilmesini sağ lar. Doku onarımı, stres, viral aracılı hastalıkların patogenezi, karsinogenez ve organ fibrojenezi sırasında TGF- β 1 izoformunun spesifik olarak aş ırı eksprese edilmesi için mekanik bir temel sağ lar [37, 38].

TGF- β 1, TGF- β 2 ve TGF- β 3 mRNA çevirisi, sırasıyla 390, 412 ve 412 amino asit kalıntısından oluş an pre-pro-TGF- β olarak adlandırılan öncü polipeptitleri üretir [39]. Pre-pro-TGF- β türleri farklı domain yapılarından oluş ur. Bu domainler ř u ş ekildedir; 55 kDa ve 29 amino asitlik N-terminal sinyal peptidi (SP), golgi kompleksi boyunca uygun katlanma ve taş ınmayı sağ layan 249 amino asitlik bir pro bölge olan amino-terminal gecikmeyle ilişkili peptid (LAP) ve 112 amino asitlik bir C-terminal dizisi dahil olmak üzere toplam 390 amino asit kalıntısından oluş ur [40-42]. Sinyal peptidinin çıkarılması ve proteolizi takiben, iki pre-pro-TGF- β monomeri arasında üç disülfid bağ ı oluş ur. Bu disülfid bağ ları, 223, 225 ve 356 pozisyonlarındaki sistein (Cys) kalıntıları arasında oluş ur. Bu bağ ların oluş umu disülfid izomeraz (PDI) adı verilen bir enzim tarafından katalize edilir ve bu ş ekilde, pro-TGF- β homodimeri oluş ur [43, 44]. Bu homodimerik yapı, 110 kDa moleküler ağ ırlığ ında iki LAP zinciri ve iki olgun TGF- β zincirinden oluş ur [44, 45]. Pro-TGF- β , golgi cisimcikleri içerisinde bol miktarda bulunan zar ile ilişkili kalsiyum bağ ımlı serin endoproteaz olan furin (PACE) tarafından proteolize uğ rar. Bu süreçte, ikiside bağ lı ş ekilde bulunan LAP zincirileri ve TGF- β zincirlerinin, 278 ve 279. amino asit kalıntıları arasındaki bağ kesilerek ayrılır [46, 47]. Proteoliz sonucunda, iki LAP zinciri ile iki TGF- β zinciri arasındaki bağ , kovalent olmayan bağ larla korunarak küçük bir latent TGF- β kompleksi (SLC) oluşturur [48]. Ayrıca, LAP zincirleri, konformasyon değ işiklikleri ve kovalent olmayan bağ lar aracılığ ıyla özel bir koruma ş ekli oluşturarak (ş aperon benzeri aktivite), TGF- β 'yı etkin olmayan formunda tutarak reseptörle etkileş imini engeller [49]. SLC daha sonra, latent TGF- β bağ layıcı proteinin (LTBP) dört sistein-zengin alanından üçüncüsündeki bir sistein kalıntısı (8-Cys3) ile 33. konumda yer alan bir sistein kalıntısı arasında oluş an disülfid bağ ı ile birleş ir [50]. Oluş an bu protein, 120-160 kDa moleköl ağ ırlığ ına sahip olan ve dört sistein-zengin alanı ile birlikte on sekiz EGF-benzeri alanı içeren büyük bir latent TGF- β 1 kompleksi (LLC) olarak adlandırılır [51]. Hücreden salgılandıktan sonra, küçük latent TGF- β kompleksleri, latent TGF- β bağ layıcı proteinlere (LTBP'ler) bağ lı olarak büyük latent TGF- β kompleksleri

oluşturmak için hücre dışı matriste (ECM) tutulur [30, 52]. TGF-β dimerleri daha sonra çeşitli enzimatik reaksiyonlar veya allosterik mekanizmalar yoluyla büyük latent TGF-β komplekslerinden salgılanabilir [53, 54]. LCC kompleksinden TGF-β'nın salgılanması için, matris metaloproteinazlar (MMP'ler), plazmin ve diğer proteazların proteoliz yoluyla enzimatik aktivasyonunu gerektirir [55]. MMP2 ve MMP9, Ca²⁺ bağımlı Zn⁺² içeren endopeptidazlardır ve LTBPlerin LAP bağlayıcı bölgelerine yönelerek büyük latent TGF-β komplekslerinden TGF-β'nın salgılanmasını sağlar. Hücre yüzeyinde plazminojenin urokinaz plazminojen tarafından parçalanması sonucu oluşan plazmin de LAP'lardan TGF-β salgılanmasına katkıda bulunur [56, 57]. Bunlara ek olarak TGF-β'nın aktivitesini, trombospondin 1 (THBS1) ve fibroblast büyüme faktörü 2 (FGF2) gibi proteazlar etkilemektedir [58-60]. Ayrıca reaktif oksijen türleri (ROS) ve düşük ECM pH değerini TGF-β aktivitesini etkileyebilir [61, 62].



Şekil 1.3: TGF-β ligand olgunlaşması.

Transforming Growth Factor-β (TGF-B) geninin (kırmızı) transkripsiyonu ve TGF-B mRNA'nın çevirisi çekirdekte ve endoplazmik retikulumda sırasıyla gerçekleşir [40].

1.2.2 TGF-β Reseptörleri

TGF-β reseptörlerinin üç ana türü bulunmaktadır. Bunlar, transmembran serin/treonin kinaz reseptörleri olan tip I TGF-β reseptörleri (TBRIs), tip II TGF-β reseptörleri (TBRiIs) ve ko-reseptörler olarak bilinen tip III TGF-β reseptörleri (TBRiIIs) şeklindedir. Şu ana kadar yedi farklı tipte TBRIs (aktivin benzeri reseptör kinazlar olarak da adlandırılır) tanımlanmıştır:

ALK1-7. Beş adet TBRIIs (TGF-B R2, BMPR2, ACVR2, ACVR2B ve AMHR2) ve iki adet TBRIIs (betaglikan ve endoglin) belirlenmiştir [63, 64]. TGF- β 1 öncelikle TBRII'ye (TGFB2) bağlanır ve bunun sonucunda TBRI (ALK5) heteromerik komplekslerin oluşumu başlar. TBRII, TGF- β 1'e kendi başına bağlanabilme özelliğine sahip olan sürekli aktif bir serin/treonin kinazdır. TBRI kinaz ise kompleks oluştuktan sonra TBRII tarafından TBRI'nin glis'in/serin zengin alanının transfosforilasyonu ile aktive edilir. TBRIII'ler, tip I integral membran proteinler olarak bilinen endoglin veya betaglikan adıyla da anılan yapıdadır. Büyük ekstraselüler bölgeleri ve kinaz sinyalleme motiflerini içermeyen kısa sitoplazmik bölgeleri vardır. TBRIIs, TGF- β 1 kinaz reseptörlerinin aktivasyon sürecinde aksesuar reseptör olarak görev alır [65]. Betaglikan, hemen hemen tüm hücre tiplerinde eksprese edilir ve TBRI'ler ve TBRII'lere kıyasla en bol bulunan TGF- β reseptörüdür [66-68]. Betaglikanın TGF- β 1 ile bağlanması, TGF- β 1'in TBRI/TBRII komplekslerine daha güçlü bağlanarak intraselüler sinyalleşmelerini tetiklediği gösterilmiştir. Ayrıca, insan vasküler endotel hücrelerinde, TBRI ve TBRII ile birlikte ekspresyon gösteren endoglinin de TGF- β 1'e bağlandığı gözlemlenmiştir. Bu durum, TBRIII'lerin TGF- β 'nin TBRI/TBRII ile etkileşimini modüle eden bir rol oynadığını düşündürmektedir [63, 65].

1.2.2.1 SMAD Bağımlı Sinyalizasyon

Omurgalılarda SMAD 1-8 olarak adlandırılan sekiz SMAD proteini tespit edilmiştir. SMAD 1, 2, 3, 5 ve 8, reseptör ile ilişkili SMAD'lar veya R-SMAD'ler olarak adlandırılır. BMP veya GDF aktivasyonuna yanıt olarak, R-SMAD1/5/8, ALK1/2/3/6 tarafından fosforile edilir. R-SMAD2/3 ise TGF- β , NODAL veya aktivin sinyaliyle etkinleşir ve ALK4/5/7 tarafından fosforile edilir [69]. Aktivasyonun ardından, TGF- β , T β RII'ye bağlanır, bu da ALK5'i aktive eder. Aktive olan ALK5, R-SMAD2/3'ü fosforile eder. Fosforilasyonun ardından, R-SMAD2/3, SMAD4 ile heterodimerik bir kompleks oluşturur (ortak aracı SMAD veya ko-SMAD olarak bilinir) ve daha sonra çekirdeğe taşınır [70]. SMAD kompleksi, çekirdekte, yapısal değişikliklere neden olmak için kromatine bağlanabilen bir transkripsiyon faktörü olarak işlev görür SMAD kompleksi, TGF- β hedef genlerinin promotor bölgelerindeki SMAD bağlanma bölgelerine güçlü bir şekilde bağlanma yeteneğine sahip olmak için diğer transkripsiyon faktörleriyle birleşir [71]. Bu SMAD bağlanma ortakları, AP1 (FOS ve JUN), forkhead (FoxH1, FoxO1, FoxO3 ve FoxO4), homeobox, çinko parmak ve temel sarmal-loop-sarmal gibi çeşitli transkripsiyon faktörü ailelerini içermektedir. Ayrıca, SMAD kompleksi, gen transkripsiyonunu düzenlemek için p300 ve CREB-bağlayıcı protein gibi

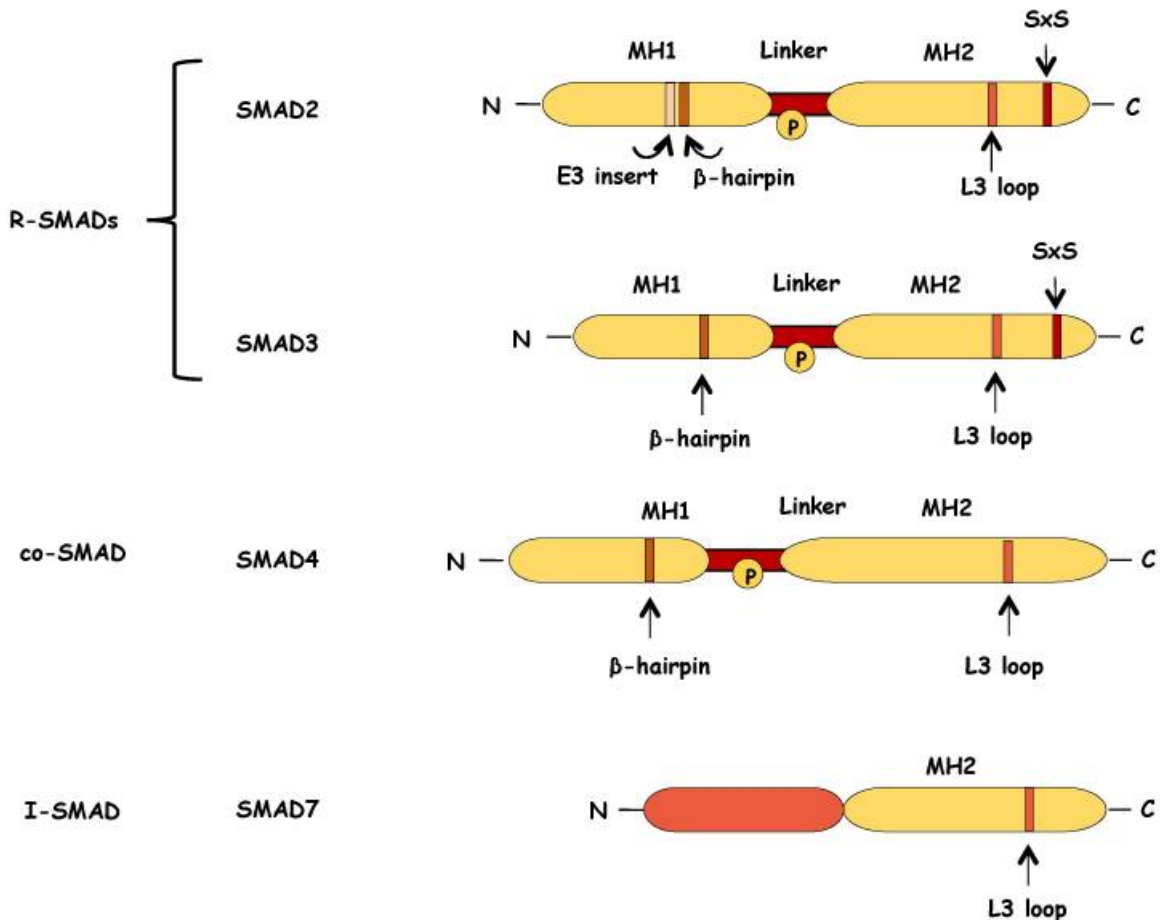
ko-aktivatörleri ile veya retinoblastoma benzeri 1 protein gibi ko-baskılayıcılarıyla da etkileşime girmektedir [70, 72, 73].

TGF- β sinyali, çeşitli mekanizmalar aracılığıyla düzenlenir. I-SMAD'ler, fiziksel olarak TGF- β tip I reseptörü ile birleşir ve TGF- β kaynaklı fosforilasyonu ve R-SMAD'lerin aktivasyonunu inhibe ederek TGF- β sinyalini antagonize eder [74-76]. R-SMAD'lerin kararlılığı da fosforilasyon tarafından düzenlenmektedir. Ayrıca, SMAD ubiquitinasyon düzenleyici faktörü (Smurf) aracılığıyla T β RI'nın parçalanması, TGF- β sinyallemesini dinamik olarak düzenleyebilir [77].

1.2.2.2 SMAD Proteinlerinin Yapısı

SMAD proteinlerinin Mad Homoloji 1 (MH1) alanı, esnek bir bağlayıcı bölge ile Mad Homoloji 2 (MH2) alanından ayrılmıştır [78]. MH1 alanları, çekirdeğe yönelik lokalizasyon sinyali ve DNA üzerindeki glisin-sistein açısından zengin SMAD bağlanma elementleri ile etkileşim sağlayan bir β -saç tokası döngüsü içerir. [79, 80]. MH2 alanları ise, TGF- β reseptörleri ile etkileşime girer ve diğer SMAD proteinleri, transkripsiyon faktörlerini ve transkripsiyonun ko-aktivatörlerini veya ko-represörlerini bağlamada aracılık eder [81]. Üç bölge arasında en büyük değişkenlik bağlayıcı bölgede gözlenir. R-SMAD'lerin bağlayıcı bölgesi, CDK'lar ve mitojen-aktive protein kinazlar (MAPK'lar) gibi çeşitli kinazlar için fosforilasyon bölgeleri içerir [82]. Ayrıca, bağlayıcı bölge içinde, R-SMAD'ler ve I-SMAD'ler, ancak SMAD4 değil, E3 übikitin ligazlarına bağlanmak için prolin-prolin-x-tirozin (PPXY) motifine sahiptir [78, 83]. MH1 ve MH2 alanları yüksek derecede korunmuş olsa da, bazı belirgin farklılıklar bulunmaktadır [84]. R-SMAD'lerin MH2 alanları, β 1-dizisi, L3 döngüsü ve α -helix beş yapısına sahiptir ve birlikte TGF- β RI veya SARA'ya bağlanmayı sağlar [78]. SMAD2 ve SMAD3'ün yapıları benzer olmasına rağmen, dikkate değer farklılıklar bulunmaktadır [80]. Örneğin, SMAD2'nin MH1 alanında iki eklemesi bulunmaktadır. Bunlardan biri olan E3 eklemesi, SMAD2'nin β -saç tokası döngüsünü bozarak DNA'ya bağlanmasını engellediğine inanılıyordu. Fakat, daha ileri analizler, E3 eklemesinin farklı şekillerde düzenlendiği ve MH1 alanının yapısını etkilediği göstermiştir. Bu bulgu, SMAD2'nin DNA bağlanma yeteneğinin E3 konformasyonuna bağlı olarak bazı durumlarda DNA'ya bağlanabildiğini açıklar [85-87].

SMAD4, birçok TGF- β 'ye bağımlı gen ifadesinde önemli bir rol oynamasına rağmen, R-SMAD'ların çekirdeğe taşınması için zorunlu değildir. Bazı TGF- β 'ya bağımlı transkripsiyonel fonksiyonlar için gereklilik arz etmez [88]. SMAD4 ayrıca TGF- β 'ya bağımsız işlevler de gerçekleştirir. Bu işlevlere örnek, T-lenfositlerinde (T-hücreleri) TGF- β hedef genlerinin ifadesini baskılayabilir, doğal öldürücü (NK) hücre olgunlaşmasını teşvik eden genlerin aktive edebilir [89, 90]. SMAD4'ün rolleri tam olarak anlaşılammış olsa da, SMAD4, bağlayıcı bölgesinde bir nükleer dışa aktarma sinyali ve bir SMAD aktivasyon alanı (SAD) olan tek SMAD proteindir. SAD bölgesi, p300 kromatin değiştiricileri ve CREB bağlayıcı protein ko-aktivatörleri tarafından tanınır [91]. SMAD4 SAD silme hücreleri p300 ve CREB ko-aktivatörlerini bağlayabilmesine rağmen, bu SMAD4-p300 ve SMAD4-CREB kompleksleri transkripsiyonu aktive edemez. Bu şekilde SMAD4, p300 ve CREB bağlayıcı protein ko-aktivatör kompleksleri aracılığıyla gen ekspresyonunun düzenlenmesine katkıda bulunur [92].



Şekil 1.4: SMAD proteinlerinin yapısının şematik gösterimi [93].

1.2.2.3 SMAD Bağımsız TGF-β Sinyali

TGF-β ligand reseptör kompleksi, kanonik olmayan TGF-β sinyali olarak kabul edilen diğer hücre içi efektörler aracılığıyla sinyali iletebilir. Bu sinyaller SMAD'lardan bağımsızdır. TGF-β'nin non-kanonik sinyalleşme yoluyla hücre içi efektörler arasında mitojen-aktif protein kinazları (JNK proteinleri, p38 ve ERK proteinleri), IκB kinazı (IKK), fosfatidilinositol-3 kinazı (PI3K), Akt, Rho ailesi GTPazlar ve c-Abl tirozin kinazı bulunur. Efektörlerin kimliği, hücre tipine ve fizyolojik/patolojik koşullara bağlıdır [94-96]. Bu SMAD bağımlı olmayan yollar, TGF-β sinyal aktivitesini modüle etmek için tek başına veya kanonik SMAD yolu ile işbirliği içinde sinyal iletimine aracılık edebilir [12].

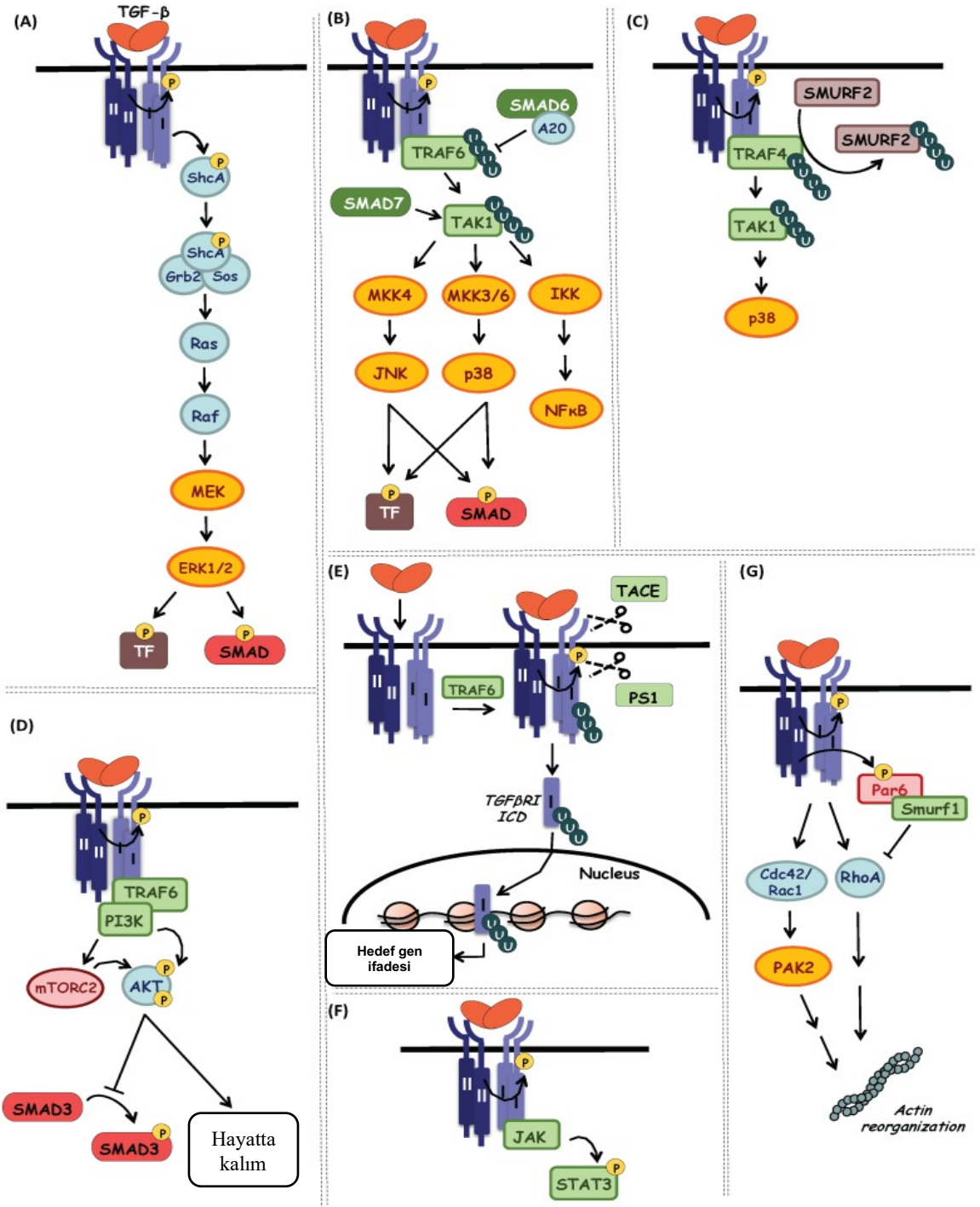
Bu bağımsız yollardan biri, tümör nekroz faktör reseptörü ile ilişkili faktör 6 (TRAF6) aracılığıyla MAPK kaskadını içermektedir. TGF-β tarafından uyarıldığında, TGF-βRI TRAF6 ile ilişkilendirilir ve bu proteinin lizin (K)63 poliübikitinasyonuna yol açar. K63 bağlı poliübikitinasyon daha sonra TGF-β-aktif edilmiş kinaz 1 (TAK1) ve TAK1 bağlayıcı proteinleri çeker. TAK1 bağımlı fosforilasyondan sonra, MAPK kinaz 3/6 c-Jun aminoterminal kinaz (JNK) ve p38 MAPK'yı fosforile eder. JNK ve p38 MAPK, çekirdeğe taşınır ve p53, aktivatör protein 1 (AP1), ELK1, aktif edici transkripsiyon faktör 2 (ATF2) ve c-Jun dahil olmak üzere birkaç hedefi fosforile eder [97]. Bu transkripsiyon faktörleri apoptoz, inflamasyon, hareketlilik, gelişme, hücre-hücre bağları, hücre-dışı matriks bağları ve proliferasyonda yer alan genlerin ifadesini düzenler [98].

TGF-βRI tarafından src homoloji alanı içeren protein A (ShcA) üzerindeki tirozin kalıntılarının da fosforile olduğu bildirilmiştir [99]. ShcA, Grb2 reseptörü ve Sos içeren bir kompleks oluşturarak Ras'ı aktive eder. Sonraki adımda, Ras, ekstraselüler sinyal düzenleyici kinazı (ERK) fosforile eden aşağı akım MAPK kaskadlarını başlatır [100]. ERK, AP1 ve ELK1 gibi transkripsiyon faktörlerini fosforile eder, bu da hücre-hücre bağları, hücre-dışı matriks bağları, hareketlilik, farklılaşma, proliferasyon ve apoptoz için önemli olan genlerin ifadesini düzenler.

TGF-β, p85 alt biriminin TGF-β reseptörleri ile doğrudan etkileşimi yoluyla PI3K/AKT aktivasyonunu teşvik eder. TGF-β'nin neden olduğu TRAF6'nın oto-ubikuitinasyonu,

AKT'nin çekilmesi ve fosforile edilmesine yol açar [101]. PI3K aracılığıyla TGF- β , mTORC2'nin de aktive edilmesini sağlar; bunun sonucunda AKT fosforile edilir ve hücrenin hayatta kalmasını teşvik eder [102]. Ayrıca aktive olan AKT, SMAD-3'ün fosforilasyonunu engeller, böylece SMAD-3 bağımlı sinyalleşmeyi zayıflatır. TRAF4 ise, TGF- β reseptör kompleksiyle ligandan bağımlı bir şekilde etkileşime giren başka bir E3 ligazdır ve TAK1 Lys63 bağılı poliübikuitinasyonunu tetiklemek için kullanılır. Ancak, TRAF6'ya kıyasla, TRAF4, TGF- β reseptör düzeylerini stabilize ederek SMAD sinyalleşmesini artırabilir [103].

TGF- β ve BMP, RhoA, Rho-ilişkili protein kinaz (ROCK), Cdc42 ve Rac1 dahil olmak üzere küçük GTPazların Rho ailesini hücre tipine bağılı şekilde aktive edebilir [94]. Epitel hücrelerinde, TGF- β ligand-reseptör kompleksi RhoA'yı aktive eder; mezenkimal hücrelerde, BMP ligand-reseptör kompleksi, RhoA ve ROCK aktivasyonunu indükler ve TGF- β ligand-reseptör kompleksi, Rac1 ve Cdc42'yi alır ve ardından aşağı akış kinaz PAK2'yi aktive eder. Ek olarak, TGF- β R2, bozulma için RhoA'yı hedefleyen Smurf1'i alır. Ayrıca, epitel hücreleri ve aksonlardaki sıkı bağlantıları çözerek polarite proteini Par6'yı doğrudan fosforile edebilir [104].



Şekil 1.5: TGF- β SMAD bağımlı olmayan sinyal yolları [93].

1.3 ADAMTS Gen Ailesi

ADAM (Disintegrin-benzeri ve Metalloproteaz) ailesi, memelilerde bulunan ve hücrel işlevlerde önemli rol oynayan bir grup transmembran proteinidir [105]. Bu aile, hücre dışı matriks proteini parçalayabilen ve sinyal iletimine katkıda bulunan çeşitli enzimleri

içermektedir [106]. ADAM proteazları, hücre yapışması, hücre migrasyonu, hücre sinyal iletimi ve doku homeostazı gibi bir dizi biyolojik sürecin düzenlenmesinde kritik bir rol oynamaktadır [107]. Kuno ve arkadaşları, ADAM proteazlarından, trombospondin 1 motifine sahip olmalarıyla farklılaşan ADAMTS-1 olarak isimlendirdikleri proteinini keşfederek 19 üyelik ADAMTS (A Disintegrin-like and Metalloprotease with Thrombospondin motifs) ailesinin keşfine ilk adımı atmıştır [108].

ADAMTS ailesi üyeleri ortak domain yapılarına sahiptir ve bu yapılar çeşitli fonksiyonel bölgeleri içermektedir. Bu ailedeki en temel domain yapısı ADAMTS-4'te bulunur. Domain yapısı sırasıyla sinyal peptid dizisi, prodomain bölgesi, metalloproteaz domaini, Disintegrin benzeri domain, trombospondin motifleri, Sistein bakımından zengin domain ve ayırıcı bölgeden oluşmaktadır [109].

- ADAMTS ailesi üyelerinin yapısı ilk olarak sinyal peptid dizisi ile başlamaktadır. Peptid dizisi, proteinin hücre içinden hücre dışına doğru taşınmasını sağlamaktadır. Diziler genellikle 200-300 baz çiftinden oluşmakta ve uzunlukları değişmektedir. [110].
- Prodomain bölgesi, ADAMTS proteaz enziminin aktif hale gelmeden önce inhibisyonunu sağlamakta ve olgunlaşma sürecinde proteolitik olarak çıkartılmaktadır. Domain, enzimin doğru şekilde katlanmasına ve stabilitesine katkıda bulunmaktadır. Böylece enzimin aktivasyonundan önce bir koruyucu mekanizma olarak işlev görmektedir [111].
- Metalloproteaz domaini, ADAMTS ailesinin en temel ve belirgin domainidir. Domain, enzimin aktif bölgesini içermekte ve substratların parçalanmasını gerçekleştiren katalitik aktiviteyi sağlamaktadır. Katalitik aktivite domain yapısında bulunan çinko iyonunu bağlamak için kritik amino asitler sayesinde gerçekleştirilmektedir [112].
- Disintegrin domaini, ADAMTS aile üyelerinin hücre-matriks etkileşimlerini düzenlediği bir domaindir. Domain, hücre yapışmasını etkileyebilen ve hücre

migrasyonu gibi süreçlere katkıda bulunabilen protein-protein etkileşim bölgelerini içermektedir [113].

- ADAMTS ailesinin adını aldığı trombospondin motifleri (TSP-1), hücre migrasyonu, doku onarımı ve doku morfolojisi gibi süreçlerde rol oynayan protein-protein etkileşim bölgeleridir. Bu motifler, substrat bağlanmasını ve protein-protein etkileşimlerini düzenlemeye katkıda bulunmaktadır [114].
- Sistein bakımından zengin domain, içerdikleri sistein amino asitleri ile disülfid bağlarını oluşturma yeteneğine sahiptir. ADAMTS aile üyelerindeki sistein bakımından zengin domainler, TSP-1 motifleriyle birleşerek ekstraselüler matriks bileşenlerine bağlanmayı sağlamaktadır. Bu bağlanma, ADAMTS proteazlarının ekstraselüler matriksin parçalanmasında ve yeniden düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır [115].
- Ayırıcı bölge, substratların tanınmasında, proteolitik aktivitenin düzenlenmesinde ve substrat spesifitesinin sağlanmasında kritik bir role sahiptir [116].

1.3.2 ADAMTS Gen Ailesi ve Kolorektal Kanser

KRK ve adenom hastalarından elde edilen veriler, ADAMTS-1 geninin promotor bölgesindeki hipermetilasyonun hem kolorektal kanser hem de adenom vakalarında, normal dokuya kıyasla daha fazla görüldüğünü belirlenmiştir. Promotor bölgesinin hipermetile olması, genin genellikle sessiz hale getirilmesine yol açar. Yani, bu bulgular ADAMTS-1 geninin kanser ve adenom gelişiminde olası bir baskılayıcı etkisini göstermektedir [117, 118]. Son araştırmalar, ADAMTS-5 geninin promotor bölgesinde metilasyonun arttığını doğrulamak için metilat boncuk-çip tabanlı teknolojiden faydalanmıştır. Ayrıca, mikroçip yöntemi ile, tümör dokusunda bu genin mRNA ifadesi miktarının azaldığını ortaya koymuştur [119]. HRM (yüksek çözünürlü erime) yöntemi kullanılarak daha geniş bir kolorektal kanser grubunda yapılan araştırmada, ADAMTS-9 geni promotor metilasyonunda artış olduğunu ortaya çıkarmıştır [120]. Ayrıca, ADAMTS-12 geninin promotor bölgesinin normal bir dokuya kıyasla belirgin şekilde hipermetillendiği bulundu [121]. Hastalardan elde edilen doku örnekleri üzerinde gerçekleştirilen in vitro ve in vivo araştırmalar, ADAMTS-15 geni promotorünün hipermetilasyonunu ve bu durumun

ADAMTS-15 protein ifadesinin azalmasıyla ilişkili olduğunu göstermiştir [122]. Bunun yanı sıra, kolorektal kanserde ADAMTS-18 geninin epigenetik olarak baskılandığı, bu durumun HRM yöntemiyle belirginleştirildiği, ancak henüz immünohistokimyasal çalışmalarla kanıtlanmadığı ifade edilmiştir [123]. ADAMTS-15 ve ADAMTS-18 genlerinin kolorektal kanser hücrelerinde sık mutasyonlara uğradığı gözlenmiştir. Ancak, bu mutasyonların ne tür olduğu ve bu mutasyonların yeni oluşan proteinlerin ifadesi ve işlevi üzerindeki etkisi henüz tam olarak anlaşılamamıştır [124].

1.3.3 ADAMTS Gen Ailesi ve Regülasyonu

ADAMTS proteazları, salgı yoluyla taşınan bir sinyal peptidi tarafından yönlendirilir ve bu sinyal peptidi eş zamanlı olarak çıkarılır [125]. Birçok ADAMTS geni, sitokinler, büyüme faktörleri, hormonlar ve inflamatuvar araçlar tarafından transkripsiyonel olarak düzenlenir [126, 127].

Literatüre bakıldığında pro-inflamatuvar sitokinler ile artrit ilişkili bulunan ADAMTS-4 ve ADAMTS-5 gen ekspresyonları incelenmiştir. Örneğin, interlökin (IL)-1 β 'ye maruz kaldığında, ADAMTS-4 ve matriks metalloproteinaz (MMP) 13 gen ekspresyonu ve proteaz aktivitesinin arttığı bulunmuştur [128]. IL-1 β sinyali, ERK1/2, JAK3-STAT1/3, PI3 kinaz ve Akt sinyal iletiminin bir kombinasyonu şeklinde iletilir. ADAMTS proteazlarının bu iki üyesi, kondrositlere özgü bir sinyal iletim ağı varlığını göstermektedir ve bu ağ ADAMTS-4'ün indüksiyonuna yol açmaktadır. Diğer pro-inflamatuvar sitokinler olan tümör nekroz faktörü (TNF) α ve IL-6'da eklem kapsülünün iç yüzeyinde bulunan ve eklem sıvısı (sinovyum) hücrelerinde ADAMTS-4 ve ADAMTS-5 mRNA ekspresyonunu indükleyebileceği bulunmuştur [129, 130]. TNF- α 'nın sinovyal hücrelerdeki sinyal iletimi, birkaç sitokin kaynağından gelen sinyalleri iletebilen bir MAP kinaz (MAPK) olan TAK1 tarafından yönlendirilir [131]. IL-6 sinyali ise MAPK, ERK1/2 ve MEK aracılığıyla iletilir. ADAMTS-4 ve ADAMTS-5 gen ekspresyonunun pro-enflamatuvar sitokinler tarafından düzenlenmesi sadece artritte sınırlı değildir, aynı zamanda kalp ve intervertebral diskte de tanımlanmıştır. TNF- α ve IL-1 β ile uyarıldığında, ADAMTS-4 ve ADAMTS-8 mRNA ekspresyonundaki artış, yeni doğmuş bebeklerde bulunan kalp kası hücresi olan neonatal kardiyomyositlerde ve kardiyak fibroblastlarda gözlemlenmiştir [132].

Enflamatuvar düzenleyicilerin dışında, ADAMTS-1'in ovulasyon sırasında progesteron ve luteinizan hormonları tarafından düzenlendiğine dair kanıtlar bulunmaktadır. Bu durumda ADAMTS-1, kümülüs-oosit kompleksi çevresindeki ekstrasellüler matriks içinde versikannın yeniden şekillenmesinde rol oynayabilir [133]. ADAMTS-1 geni baskılanmış farelerde anormal overler ve azalmış üreme yeteneği gözlenmiştir [134]. ADAMTS-16'nın düzenlemesi aynı zamanda ürogenital sisteminde de tanımlanmıştır. Folikül uyarıcı hormon ve adenilat siklaz aktivatörü olan forskolin, olgunlaşmış granüloza hücrelerinde ADAMTS-16 ekspresyonunu uyarır. Bu hücreler, oositleri çevreleyen kümülüs kompleksinin bir parçasıdır ve muhtemelen cAMP yolunun uyarılması yoluyla etkilendiği düşünülmektedir [135]. Böbreklerde, ADAMTS-16 doğrudan çinko parmak transkripsiyon faktörü WT1 (Wilms Tumor 1) tarafından düzenlenir [136]. ADAMTS-16, böbreklerin dallanma morfogenezinde (hücrelerin çoğalması, göç etmesi ve belirli sinyal yolları tarafından yönlendirilmesi vb. süreçler), muhtemelen fibronektin proteolizi yoluyla rol oynar [137]. Ek olarak, ADAMTS-16, kıkırdak hücre hatlarında EGR1 ve SP1 transkripsiyon faktörleri ile birlikte ve dönüşüm büyüme faktörü (TGF) β tarafından olumlu olarak düzenlenir [138]. ADAMTS-2, IL-6 ile muamele edilen MG63 ve Saos-2 gibi osteoblastik hücre hatlarında aşırı ifade edildiği bulunmuştur. Ayrıca bu çalışmada, JNK sinyalleri, IL-6 aracılığıyla ADAMTS-2 ifadesinin aşırı ifadesinde önemli bir rol üstlenmiştir [139].

Birçok kanser hücre hattında, ADAMTS proteazlarının ifadesi epigenetik mekanizmalar aracılığıyla baskılanmıştır [140]. ADAMTS-1, -5 ve -8 dahil olmak üzere çoğu durumda, epigenetik düzenleme ilgili promotor bölgelerin artan metilasyonu yoluyla sağlanmıştır [119, 141, 142]. ADAMTS-12, kolon kanseri hücrelerinde promotor hipermetilasyonu aracılığıyla baskılanırken, çevreleyen stromal hücrelerde transkripsiyonel olarak aktive edildiği bulunmuştur [121]. A549 hücre hattında (akciğer kanser modeli) ADAMTS-12 ifadesinin azalmasının, artmış proliferasyon ve invazyona yol açtığı ve ADAMTS-12 nakavt farelerin üretan maruziyetinden sonra akciğer tümör yükünde 5 kat artış olduğu gösterilmiştir [143].

1.3.4 ADAMTS Proteazlarının Alternatif Splays ve Posttranslasyonel

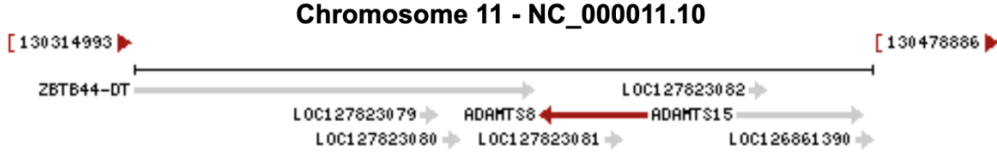
Modifikasyonları

Alternatif splicing olayları, protein kodlayan gen sayısına kıyasla bireysel protein türlerinin sayısını arttırabilir [144]. ADAMTS proteazlarının alternatif splicing yoluyla oluşan gen ürünlerinin işlevleri hakkında sınırlı sayıda bilgi mevcuttur. ADAMTS-2, -4, -6, -7, -9, -13 ve 17 için alternatif splays ve ADAMTS izoformlarının varlığı bildirilmiş olmasına rağmen işlevleri konusunda bilgi henüz net değildir [126]. Romatoid artrit hastalarının sinovyumunda, ara bölge alanının çıkarılması ve benzersiz bir C-ucu dahil edilmesiyle sonuçlanan ADAMTS-4'ün bir splays varyantı tespit edilmiştir [145]. ADAMTS-4'ün alternatif splicing izoformunun, romatoid artrit eklemlerde kıkırdak erozyonuna katkıda bulunabileceği öne sürülmüştür [146]. ADAMTS-4 ve ADAMTS-5'in ara bölge alanının hedefe yönelik delesyona uğratılması, *in vitro* olarak aggreganaz ve versikanaz aktivitesini azaltmıştır, bu da ara bölge alanının aggregan ve versican'ın kesilmesi için gerekli olduğunu göstermiştir [147, 148]. ADAMTS-17 için rapor edilen alternatif splays olayları da ara bölge alanında meydana gelmiş ve tamamen alanın kaldırılması yerine daha kısa peptitlerin delesyonu ve insersiyon işlemleriyle alanın yapısını değiştirmiştir [149].

ADAMTS enzimleri glikozile edilir ve yardımcı bölgeleri proteolitik olarak işlenebilir, her iki modifikasyon da enzimlerin salgılanması, lokalizasyonu, aktivasyonu veya katalitik fonksiyonlarını etkileyebilir. ADAMTS-4 dışındaki tüm ADAMTS'ler N_xS/T bölgelerinde N-glikozile edilir, ADAMTS-9'un pro-dönemindeki N-glikozilasyonu salgılanması için gereklidir [111]. ADAMTS-7'nin musin alanı, CS (kondroitin sülfat) GAG zincirlerinin eklenmesiyle modifiye edilir. Ek olarak, pro-domain'in N-glikozilasyonu ile birlikte enzimin hücre yüzeyi ilişkisini ve furin tarafından ardışık işlenmesini düzenleyebilir [150]. Başka bir örnek vermek gerekirse, VWF endoplazmik retikulumda sinyal peptidi kesilir ve her VWF molekülüne 12 adet yüksek-mannoz içeren N-bağlı oligosakkarit zinciri eklenir. Glikozilasyonun ardından monomerik VWF'nin dimerizasyonu, alt birimler arası C-terminal disülfid bağlarının oluşumuyla gerçekleşir [151]. Golgide, VWF'nin N-bağlı oligosakkarit zincirleri bir dizi glikozidaz ve glikoziltransferaz tarafından daha fazla değiştirilerek kompleks karbonhidrat çeşitleri oluşturulur. Bunun yanı sıra, her monomere 10 adet O-bağlı oligosakkarit zinciri eklenir. Son olarak, VWF dimerlerinin multimerizasyonu post-Golgi'de başka bir disülfid bağları oluşumu ile gerçekleşir [152].

1.4 ADAMTS-8

ADAMTS-8 ‘‘METH-2’’ ya da ‘‘A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs 8’’ olarak da bilinen anti-anjiyogenik özelliklere sahip bir proteindir. ADAMTS-8 geni; İnsan 11. kromozomunun q kolunun 24.3 lokusunda bulunmaktadır [153].



Şekil 1.6: ADAMTS-8 geninin kromozom lokasyonu

Tek kopyalı bir genidir ve proteolitik olarak işlenmiş 889 aminoasitten oluşan 96,5 kDa ağırlığa sahip bir proteini kodlamaktadır. Bu gen ailesi, yılan zehiri metalloproteaz ve disintegrin ile önemli dizi benzerliği göstermektedir [154].

ADAMTS-8, orta ila yüksek seviyeler gösteren sağlıklı dokularda dar bir doku dağılımına sahiptir. Yetişkin ve fetal akciğer, aort, beyin, fetal kalp, fetal böbrek, ek ve mesanede ifade edilir [116]. Bu durumun aksine ADAMTS-8'in, beyin, meme ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, skuamöz hücreli baş-boyun kanseri, pankreas kanseri, mide kanseri gibi birçok kanser türünde epigenetik olarak (promotor metilasyonu ya da histon modifikasyonu ile) susturulduğu tespit edilmiştir [155].

1.4.1 ADAMTS-8 ve Agrekanaz Aktivitesi

ADAMTS-8, ADAMTS proteaz ailesine ait bir enzim ve agrekanaz aktivitesine sahip bir proteindir. Agrekanaz aktivitesi, ADAMTS-8'nin spesifik bir substrat olan agrekan proteininin Glu373-ALA374 peptid bağına etki ederek agrekanı parçalayabilme yeteneğini ifade etmektedir [156]. Agrekan, ekstrasellüler matriksin bir bileşeni olan ve proteoglikan adı verilen proteinlerin bir türüdür. Özellikle kırık dokusunda bulunan agrekan, matriksin dayanıklılığını ve kırık dokusunun mekanik özelliklerini sağlamaktadır [157].

ADAMTS-8, agrekan proteinini parçalayarak ekstrasellüler matriksin düzenlenmesine katkıda bulunmaktadır [158].

ADAMTS-8'nin agrekanaz aktivitesi, proteazın metalloproteinaz domainlerine ve trombospondin tip 1 motiflerine sahip olmasından kaynaklanmaktadır. Bu yapısal özellikler, ADAMTS-8'nin agrekan molekülünün spesifik bölgelerine bağlanmasını ve onu proteolitik olarak kesmesini sağlamaktadır. Böylece agrekan molekülü parçalanmakta ve ekstrasellüler matriksin yapısal bütünlüğü değişmektedir [159].

1.4.2 ADAMTS-8 Regülasyonu

ADAMTS-8 proteini, kompleks bir regülasyon ağıyla kontrol edilen bir enzimdir. Regülasyon mekanizmaları, ADAMTS-8 gen ekspresyonunu, protein düzeylerini ve aktivitesini hassas bir şekilde modüle etmektedir. Bu mekanizmalar arasında hücrel sinyal yolları, sitokinler, büyüme faktörleri ve diğer çevresel faktörler yer almaktadır. ADAMTS-8'in regülasyonu, ekstrasellüler matriksin yapısal ve fonksiyonel yenilenmesi, dokusal homeostaz ve patolojik durumlar gibi çeşitli biyolojik süreçlerde önemli bir rol oynamaktadır [160, 161].

ADAMTS enzimleri, sitokinlerin düzeylerini etkileyebilen ve sitokin sinyal yollarıyla ilişkili olan önemli regülatörlerdir. ADAMTS ailesinin sitokinlerle regülasyonuna örnek verecek olursak Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- α), enflamasyon ve immün yanıtların düzenlenmesinde kritik bir rol oynayan bir sitokindir ve TNF- α 'nın varlığında ADAMTS-1 ve ADAMTS-4 gen ekspresyonunu arttırmaktadır [162]. Interleukin-1 (IL-1), enflamatuvar süreçlerin düzenlenmesinde önemli bir sitokindir ve IL-1 β 'nin varlığı, ADAMTS-4 ve ADAMTS-5 gen ekspresyonunu artırarak eklem kıkırdağının yıkımına katkıda bulunmaktadır [163]. Interleukin-6 (IL-6), immün yanıtların düzenlenmesi ve akut faz reaksiyonlarında önemli bir rol oynayan bir sitokindir. IL-6'nın varlığı, ADAMTS-1 ekspresyonunu artırarak ateroskleroz gelişiminde etkili olmaktadır [164]. Transforming Growth Factor-beta (TGF- β) ise hücre büyümesi, doku yenilenmesi ve immünolojik yanıtların düzenlenmesinde kritik bir rol oynayan önemli bir sitokindir. TGF- β , ADAMTS-1 ve ADAMTS-5 gen ekspresyonunu düzenleme yeteneğine sahiptir [165].

2. TEZİN HEDEFLERİ VE ÇALIŞMA KAPSAMI

ADAMTS-8 geni, kolorektal kanserde tümör baskılayıcı bir rol oynayabileceği düşünülmektedir. Araştırmalar, *ADAMTS-8*'in kolorektal kanser hücrelerinin büyümesini, invazyonunu, angiogenez sürecini ve metastazını inhibe edebileceğini göstermiştir. Bununla birlikte, *ADAMTS-8* geninin TGF- β ile kolorektal kanserdeki regülasyon mekanizmaları hakkında henüz yeterli bilgi bulunmamaktadır.

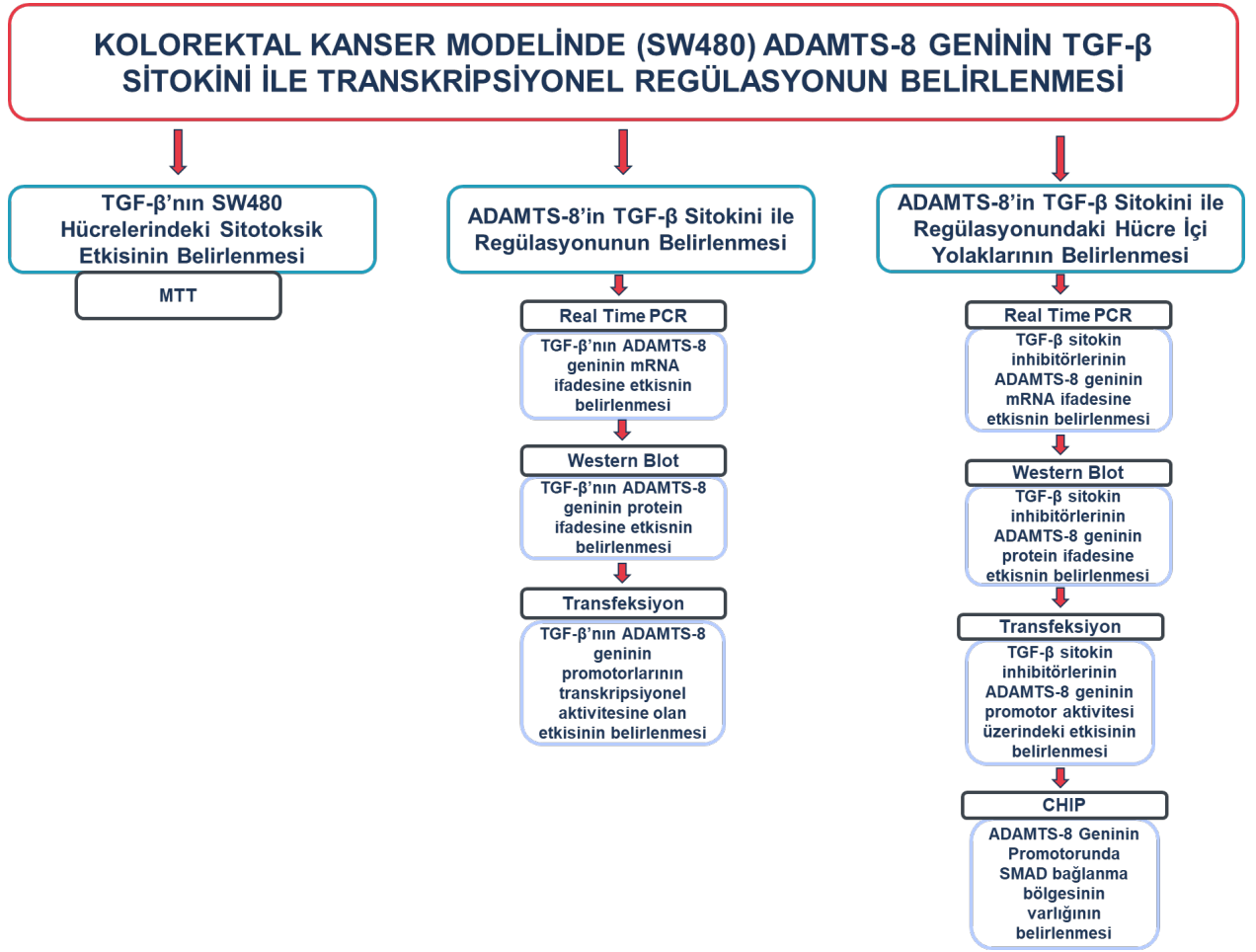
Bu çalışma, *ADAMTS-8*'in kolorektal kanserde TGF- β sitokini ile transkripsiyonel regülasyon mekanizmalarını aydınlatmayı hedeflemiştir. Bu amaç doğrultusunda, ilk olarak TGF- β 'nın SW480 hücrelerinde proliferatif etkisi belirlenmiştir. Ardından TGF- β sitokini *ADAMTS-8* regülasyonuna olan katkısı mRNA, protein ve promotor düzeyinde belirlenmiştir. Ayrıca, *ADAMTS-8*'in TGF- β yanıtının hücre içi hangi yollar ile regüle olduğu mRNA, protein ve promotor düzeyinde Real Time PCR, Westen Blot ve transfeksiyon çalışmaları ile belirlenip incelenen cevabın SMAD bağımlı bir yol üzerinden gerçekleşip gerçekleşmediğini belirlemek için potansiyel SMAD bağlanma bölgelerinin doğrulanması amacıyla ChIP (Chromatin Immunoprecipitation) deneyleri gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmanın sonuçları, *ADAMTS-8* geninin TGF- β sitokini ile etkileşimini ve transkripsiyonel regülasyonunu aydınlatarak, kolorektal kanser patogenezi üzerindeki rolünün daha iyi anlaşılmasına katkı sağlayacaktır.

Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen araştırmalar Şekil 2.1'de verilmiştir. Bu kapsamda;

- ✓ TGF- β 'nın kolorektal kanser modeli olan SW480 hücre hattında proliferatif etkisinin MTT testi ile belirlenmesi.
- ✓ TGF- β sitokininin *ADAMTS-8* geninin mRNA düzeyindeki ifadesini doz ve zamana bağlı değişikliğini belirlemek için qRT-PCR analizinin yapılması.
- ✓ TGF- β sitokininin *ADAMTS-8* geninin doz ve zamana bağlı protein seviyesine etkisini belirlemek için western blot analizinin yapılması.
- ✓ TGF- β sitokininin varlığında, *ADAMTS-8* geninin 5 farklı promotor bölgesinin transkripsiyonel aktivitesini kalsiyum fosfat transfeksiyonu metodu ile belirlenmesi.

- ✓ *ADAMTS-8* geninin TGF- β aracılı hücre içi sinyal iletim yolları üzerindeki etkisinin mRNA düzeyindeki regülasyonunun qRT-PCR analizi ile belirlenmesi.
- ✓ *ADAMTS-8* geninin TGF- β aracılı hücre içi sinyal iletim yolları üzerindeki etkisinin protein düzeyindeki regülasyonunun western blot analizi ile belirlenmesi.
- ✓ TGF- β sitokini varlığında *ADAMTS-8* geninin promotor parçalarının transkripsiyonel aktivitesine etki eden hücre içi sinyal yollarının kalsiyum fostat transfeksiyon metodu kullanılarak belirlenmesi.
- ✓ TGF- β varlığında *ADAMTS-8* promotorlarının SMAD muhtemel bağlanma bölgelerinin CHIP deneyleriyle belirlenmesi.



Şekil 2.1: Tez kapsamında olan çalışmalar.

3. MATERYAL-YÖNTEM

3.1 MATERYALLER

3.1.1 Kullanılan Kimyasal

Tablo 3.1, Tablo3.2, Tablo 3.3, Tablo 3.4, Tablo 3.5 ve Tablo 3.6’da tez çalışması süresince RNA, protein, yolak inhibisyon ve transkripsiyonel aktivite çalışmalarında kullanılan kimyasal maddeler detaylı şekilde sunulmuştur.

Tablo 3.1: Hücre tabanlı çalışmalarda kullanılan kimyasallar ve temin edildikleri ticari firmalar.

KULLANILAN MADDE	TEDARİK EDİLEN FİRMA
Fetal Bovine Serum	Gibco
DMEM	EuroClone
PBS	VWR Life Science
BSA (Sığır Serum Albumin)	Sigma
Tripan Mavisi	Sigma
CaCl ₂	Sigma
DMSO	Thermo
0,22 µm, 0,45 µm Filtre	Sartorius
15 mL ve 50 mL Satrifüj Tüpü	IsoLab
Tek Kullanımlık Serolojik Pipet	Sarstedt
100 mm’lik kültür petrisi	
1,5 mL ve 2 mL ependorf	IsoLab
Tripsin-EDTA	Sigma

Tablo 3.2: Sitokin ve yolak inhibisyon çalışmalarında kullanılan kimyasallar ve temin edildikleri ticari firmalar.

KULLANILAN MADDE	TEDARİK EDİLEN FİRMA
TGF-β1	PeptoTech
PD169316 (p38 MAP kinaz inhibitörü)	BioVision
SP600125 (JNK inhibitörü)	BioVision
PD98059 (MEKI inhibitörü)	BioVision

Tablo 3.2: (devam)

KULLANILAN MADDE	TEDARİK EDİLEN FİRMA
Wortmannin (PI3K inhibitörü)	BioVision
SİS3 (SMAD3 inhibitörü)	Santa Cruz
NFKB	Santa Cruz

Tablo 3.3: RNA çalışmalarında kullanılan kimyasallar ve temin edildikleri ticari firmalar.

KULLANILAN MADDE	TEDARİK EDİLEN FİRMA
innuPREB RNA Mini Kit 2.0	analytik-jena
DEPC (Diethylpyrocarbonate)	Sigma
3-(N-morpholino) propansülfonik asit (MOPS)	Merck
Formaldehit (%99)	Sigma
β -Merkaptoetanol	Sigma
SYBR® Green PCR Master Karışımı	Sigma
Reverse Transkriptaz	Thermo
Ribolock İnhibitörü	Thermo
5X Reaksiyon Tambonu	Thermo
Oligo dT	Thermo

Tablo 3.4: DNA tabanlı çalışmalarda kullanılan kimyasallar ve temin edildikleri ticari firmalar.

KULLANILAN MADDE	TEDARİK EDİLEN FİRMA
Taq DNA Polimeraz Enzimi (5 U/mL)	Thermo
10X Taq Polimeraz Tamponu	Thermo
dNTP Karışımı (10 mM)	Thermo
MgCl ₂ (25 mM)	Thermo
Agaroz	Sigma
Etidyum Bromür (Et-Br)	Sigma
1 kb DNA Ladder, 6X Yükleme Boyası	Thermo
Tris Base, Borik Asit	Sigma

Tablo 3.5: Protein tabanlı çalışmalarda kullanılan kimyasallar ve temin edildikleri ticari firmalar.

KULLANILAN MADDE	TEDARİK EDİLEN FİRMA
Tris, Borik Asid, EDTA	Sigma
Amonyum Persülfat	Merck
Tetrametiletilendiamin (TEMED)	Sigma
β -aktin Mouse mAb	Santa Cruz
m-IgG κ BP-HRP (Sekonder Antikor)	Santa Cruz
Coomassie Brilliant Blue G-250	Sigma
Proteaz İnhibitör Tabletleri	Roche
Akrilamid/Bisakrilamid (37.5/1)	Sigma
APS (Amonyum Persülfat)	Merck
TEMED (Tetrametiletilendiamin)	Sigma
4X Laemli Örnek Tamponu	BoRad
EGTA, SDS, Glisin, NaCl	Sigma
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Thermo
PVDF Membranı	Millipore
Pierce™ ECL	Thermo
ADAMTS-8 Mouse Monoklonal Antikor	İnvitrogen
Etanol ve Metanol	Merck
Tween®-20	Thermo

Tablo 3.6: Transfeksiyon tabanlı çalışmalarda kullanılan kimyasallar ve temin edildikleri ticari firmalar.

KULLANILAN MADDE	TEDARİK EDİLEN FİRMA
HEPES	Sigma
NaCl, Na ₂ HPO ₄ , CaCl ₂	Sigma
Ready-To-Glow™ Secreted Luciferase	Takara Clontech
SEAP ve Lusiferaz Substratları	Takara Clontech

3.1.2 Kullanılan Laboratuvar Cihazları

Tez deneylerini gerçekleştirirken laboratuvarında bulunan cihaz ve aletlerden yararlanıldı. Bu alet ve cihazlar Tablo 3.7’de listelenmiştir.

Tablo 3.7: Tez çalışması esnasında kullanılan cihazlar ve markaları

KULLANILAN CİHAZ	MARKASI
Laminar Air Flow	Telstar Bio II / İspanya
CO2’li İnkübatör	Nuaire / ABD
Inverted Mikroskop, Floresan Mikroskobu	Nikon / Japonya
-80°C Derin Dondurucu	Nikon / Japonya
Buzdolabı (+4 °C / -20°C), Mikrodalga Fırın	Arçelik / Türkiye
Buz Makinesi	Hoshizaki / Japonya
pH Metre	Hanna / ABD
Su Banyosu	Elektromag / Türkiye
Ultrasonik Su Banyosu	PlusLab
Vorteks, Isıtmalı Manyetik Karıştırıcı	Velp Scientifica
Hassas Terazi	Sartorius / Almanya
Otoklav	Hirayama / Japonya
Etüv	WTB / Almanya
Soğutmalı Santrifüj	Sigma / Almanya
Mikro Santrifüj	Thermo / ABD
Horizontal Çalkalayıcı	GFL / Almanya
Saf Su Cihazı	Human Corporation
UV Görüntüleme Sistemi	Vilber Lourmat
Görüntüleme Sistemi	UVP BioSpectrum
Otomatik Pipetler	Thermo, Eppendorf
Elektrikli Pipet Pompası	IsoLab
DNA Elektroforez Sistemi	Minicell Primo
RNA Elektroforez Sistemi	Apelex / İngiltere
SDS PAGE Aparatları	BioRad
PCR Cihaz	Techne Progene / İngiltere
Real Time PCR Cihazı (Light-Cycler 480)	Roche Life Science

Tablo 3.7 (devam)

KULLANILAN CİHAZ	MARKASI
Elektroforez Güç Kaynağı	Thermo Scientific
Luminometre (Luminoskan™ Microplate)	Thermo / ABD
Spektrofotometre, µDrop™ Plate	Multiskango, Thermo

3.2 YÖNTEM

3.2.1 Hücre Kültüründe Mikrobiyal Kontaminasyonun Önlenmesi ve Sterilizasyon

3.2.1.1 Steril Çalışma Alanı Oluşturma

Hücre kültürü laboratuvarının rutin olarak haftalık temizliğinde çamaşır suyu, %70'lik alkol ve Virkon gibi temizleyiciler kullanıldı. Çamaşır suyu, laboratuvar yüzeylerinin temizliği ve dezenfeksiyon amacıyla kullanıldı. Bakteri, virüs, mantarlar ve sporlar üzerinde etkili olan %70' lik alkol mikroorganizmaların inaktivasyonunu sağlamak için kullanıldı. Virkon ise geniş spektrumlu bir dezenfektandır ve laboratuvar yüzeyleri ile ekipmanların dezenfeksiyonu amacıyla kullanıldı. Bu temizleyicilerin kullanımı, laboratuvarın temizlik protokollerine ve üretici firmaların talimatlarına uygun olarak gerçekleştirildi.

Çalışma öncesinde, hücre kültürü laboratuvarında kullanılan ekipmanların ve yüzeylerin sterilizasyonu için laboratuvar UV ışığı ve Laminar Flow kabininin UV ışığı kullanılarak sterilizasyon işlemi gerçekleştirildi. Çalışma sırasında kullanılan malzemeler ise, kabinin içerisine %70'lik alkol ile silinerek steril bir şekilde alındı. RNA çalışmaları için, %70'lik alkol ile sterilizasyona ek olarak %0,1'lik DEPC'li su kullanılarak RNaz enziminin inaktivasyonu gerçekleştirildi. Buna ek olarak çalışmalarda nitril eldivenler tek sefer olacak şekilde kullanıldı.

3.2.1.2 Ekipman Sterilizasyonu

Hücre kültüründe kullanılan 50 mL ve 15 mL falkonlar, hücre büyütme petrileri ticari olarak steril şekilde temin edildi. 1,5 mL'lik ve 2 mL'lik epondorf tüplerinin, şişelerin, pipet uçlarının, ısıya dayanıklı tamponların/solüsyonların sterilizasyonu 121°C'de 20 dk boyunca yüksek sıcaklık ve basınç altında otovlav cihazında gerçekleştirildi. Otoklavdan sonra malzemeler 80°C'de kurutma etüvünde kurutularak steril malzeme dolabına yerleştirildi.

Isıya dayanıklı olmayan bazı solüsyonlar, laminar flow kabini içerisinde 0,22 µm'lık filtreden geçirilerek steril hale getirildi.

3.2.2 Hücre Tabanlı Teknikler

3.2.2.1 Hücre Kültürü İçin Besiyerinin Hazırlanması ve Serum İlavesi

SW480 hücrelerinin çoğalması için Fetal Bovine Serum (FBS) kullanıldı. FBS, Euro-Lone firmasından ticari olarak temin edildi. Ana stok, -20°C'de saklandı ve kullanıma hazır hale getirmek için gece boyunca +4°C'lik bir buz dolabında çözülmesi sağlandı. Ardından, çözünen FBS inaktivasyon işlemine tabi tutuldu. İnaktivasyon için FBS, 56°C'de 1 saat boyunca ısı ile işlem gördü. İnaktive edilen FBS, steril laminal flow kabini içinde bulunan 50 mL steril falkon tüplerine paylaştırılıp -20°C'de saklandı.

Hücrelerin büyütülmesi için gerekli olan tam besi ortamı, DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium, Gibco) içerisine %10 FBS eklenerek sağlandı. Bu FBS/DMEM karışımın içerisine gerek duyulan şartlarda 100X penisilin-streptomisin antibiyotik ana stoğundan, son konsantrasyon 1X olacak şekilde antibiyotik eklenerek hücreler için uygun büyüme medyumunu hazırlandı.

3.2.2.2 Hücre Kültüründe Kullanılacak Olan Kimyasal Malzemelerin Hazırlanması

PBS'in Hazırlanması

Phosphate buffered saline (PBS) tamponu için, Sigma üretici firmasından ticari olarak temin edilen PBS tabletleri kullanıldı. PBS tabletlerinin her biri, üretici firmanın prosedürüne uygun olacak şekilde 100 mL dH₂O (deiyonize su) içinde çözüldü. Çözelti daha sonra 121°C'de otoklav işleminden geçirilerek sterilizasyonu sağlandı. Elde edilen steril PBS çözeltisi, 50 mL'lik falkon tüplere bölünerek paylaştırıldı ve +4°C'de saklandı.

Tripsin EDTA

1X PBS içine 0,53 mM EDTA ve %0,25 (w/v) tripsin eklenerek çözelti hazırlandı. Hazırlanan çözelti, steril laminar flow kabini içinde, 0,22 µm'lik filtre kullanılarak sterilize edildi. Sterilize edilen çözelti, -20°C'de saklanmak üzere 50 mL'lik steril falkonlara bölündü.

Tripan Mavisi

0,4 g tripan mavisi, 1X PBS çözeltisi ile kaynatılarak çözüldü. Çözelti oda sıcaklığında soğutuldu ve ardından 1X PBS ile 100 mL'lik son hacime tamamlandı. Sonuç olarak, %0,4 (w/v) tripan mavisi 1X PBS içinde çözülmüş oldu. Hazırlanan boya, hücreleri boyamak için kullanılmak üzere oda sıcaklığında muhafaza edildi.

3.2.2.3 Donmuş Halde Saklanan Hücrelerin Çözülmesi ve Kültürün Başlaması

Cryoviyal tüpler içerisinde -80°C'de saklanmış olan SW480 hücreleri 37°C'deki su banyosunda hızlıca çözülerek %10 FBS içeren DMEM ortamına alındı. Ardından hücre ve DMEM karışımı 1000 rpm'de 5 dk boyunca santrifüjleme işlemine tabi tutuldu. Bu işlem sonunda canlı halde olan hücreler pellet haline geldi, DMSO kalıntıları ve ölü hücreler ise süpernatant dediğimiz sıvı kısımda kalmış oldu. Bu işlemden sonra hemen süpernatant kısımdan kurtularak hücre pelleti taze medyum (2 mL'de) ile çözüldü. Çözünen pelletin, içerisinde %10 FBS'li medyum bulunan (~8 mL, 56 mm) petrilere ekimi gerçekleştirildi. Petride son hacim 10 mL'ye tamamlanmış oldu. Ardından, petri üzerine etiketleme işlemi gerçekleştirilip, 37°C'de tutulan %0,5 CO₂ içeren etüv cihazında inkübasyona bırakılarak hücrelerin tutunması sağlandı.

3.2.2.4 Hücrelerin Pasajlanması

İnverted mikroskopta, petri yüzeyinin %80-%90'ını kaplayan SW480 hücreleri tespit edildi. Daha sonra hücreler laminar flow kabini içerisinde besiyerinden uzaklaştırılıp steril PBS ile yıkandı. Ardından, yüzeye tutunmuş halde bulunan SW480 hücrelerinin yüzeyden enzimatik yolla ayrılabilmesi için 2 mL Tripsin-EDTA solüsyonu eklendi. Enzim aktivasyonu için bu aşamanın ardından petri kabı inkübatörde yaklaşık 2-3 dk inkübe edildi. İnkübasyon süresinin ardından hücrelerin yüzeyden kalktığı göz ile gözlemlendi. Kalkan hücrelerin toplanması için eklenen Tripsin-EDTA solüsyonunun iki katı olacak şekilde %10 FBS'li DMEM eklendi. Bu şekilde, FBS yardımıyla Tripsin-EDTA'nın inaktivasyonu sağlandı. Hücreler 15 mL'lik falkona alınarak 1000 rpm'de 5 dk santrifüjlendi. Daha sonra, laminar kabinin içerisine falkonlar, %70'lik alkol ile silinerek sterilasyonu sağlanarak alındı. Santrifüj sonunda oluşan sıvı kısım dökülerek pellet kısmı 6 mL taze besiyeri ile çözüldü. Çözülen pellet 2 mL olacak şekilde üç eşit miktarda petri kaplarına alındı. Petri kaplarına 8 mL taze besiyeri eklenerek total hacim 10 mL'ye tamamlandı. Daha sonra petrilerin üzerine

pasajlama sayısı yazılarak etiketleme işlemi yapıldı. Bu işlemin sonunda hücreler sağlıklı şekilde büyüebilmeleri için gerekli olan 37°C’de sabit tutulan ve %0,5 CO₂ içeren inkübatöre kaldırıldı.

3.2.2.5 Tripan Mavi Boyası ile Canlı Hücrelerin Belirlemesi

Deneilerin optimize şartlarda gerçekleşebilmesi için hücrelerin, sayılarak eşit şekilde bölünmesi gerekmektedir. Bu amaçla tripan mavi boyasını kullanıldı. Tripsinizasyon ile kaldırılmış hücreler 1000 rpm’de 5 dk santrifüj edilerek pellet haline getirildi. Daha sonra pellet 5 mL ile çözülerek hücre süspansiyonu elde edildi. Hücre süspansiyonundan steril ependorfa 1 mL alınarak oluşturulan süspansiyonda bulunan hücrenin sayısı belirlendi. Bu amaçla, 1:1 oran olacak şekilde tripan mavi boyası ile hücre süspansiyonu karıştırılıp homojen hale getirildi. İçerisinden 10 µL alınarak 25 kareden oluşan thoma lamına yüklendi. İnverted mikroskopta, mavi ile boyanmamış hücreler sayıldı. Aşağıda bulunan formül ile süspansiyonda bulunan hücrele sayısı belirlenerek deneyler dizayn edildi.

1 mL süspansiyon hücrenin toplam sayısı aşağıdaki yöntem ile bulunur:

$$\text{Toplam canlı hücre sayısı/mL} = \text{Thoma lamı sayım sonucu} \times 2 \times 10^4$$

3.2.2.6 Hücrelerin Dondurulması

Hücre pelleti Bölüm 3.2.2.4’de belirtildiği şekilde elde edildi. Besiyeri tamamen uzaklaştırılmış olan pelletin üzerine 900 µL FBS eklenip çözülmesi sağlandı. Çözünen hücrelere, -80°C’de osmos basıncından koruyabilmesi için yavaş şekilde 100 µL DMSO eklendi. Bu karışım cryoviyal tüpe aktarılarak -80°C buz dolabında muhafaza edildi.

3.2.2.7 Deney Tasarımı

Hücreler, pasaj 2 ve daha fazla pasaj sayısına ulaştıktan sonra, yeterli doluluğa ulaştıklarında deneyler kuruldu. Bunun için hücre sayımı Bölüm 3.2.2.5’de belirtildiği şekilde gerçekleştirildi ve 6 kuyucuklu plakalara 5×10^5 (hücre/kuyu) olacak şekilde paylaştırıldı.

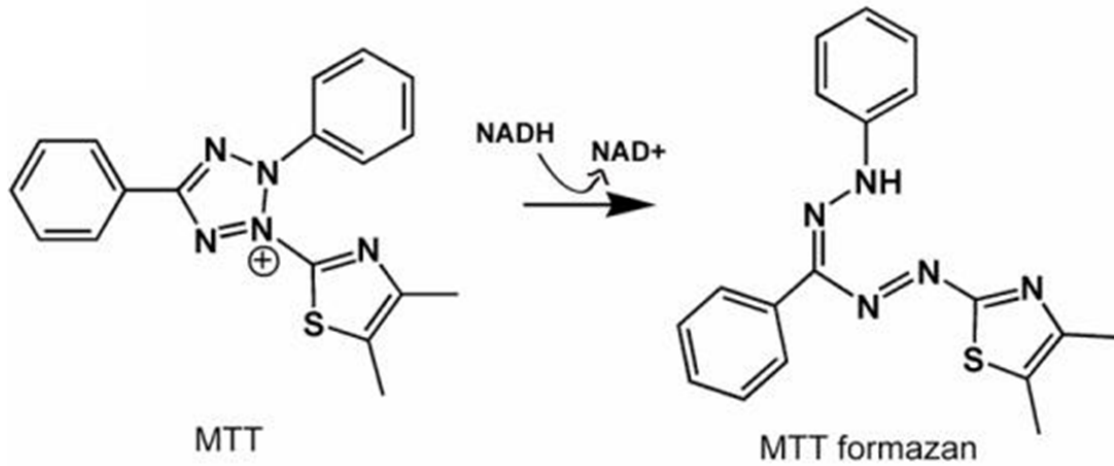
Sitokin çalışmaları için, hücrelerinin eşit şekilde paylaştırılmasının ardından, hücreler tutunmaları için gece boyu inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda tutunan hücreler serum açlığı yaratmak için %0,1’lik BSA ortamına alınarak 1 saat boyunca inkübe

edildi. Ardında 20 ng/mL olacak şekilde TGF- β sitokini uygulandı. TGF- β uygulanan hücrelerden, 1., 3., 6., 24. ve 48. saat sürelerinin sonunda hücreler pellet haline getirildi. RNA çalışmaları için pellet eldesi tripsinizasyon işlemi ile gerçekleşirken, protein çalışmaları için RIPA tamponu ile hücre ekstraktı elde edildi.

Yolak inhibisyon çalışmaları için ise eşit şekilde bölünen hücrelerin gece boyu inkübasyonunun ardından, hücreler %0,1'lik BSA ortamına alınıp 1 saat inkübe edildi. Sonrasında inhibitörler (12,5 μ M PD169316, 10 μ M PD98059, 20 μ M SP600125, 1 μ M Wortmannin, 1 μ M SİS3) uygulandı. Bu uygulama işleminin ardından hücreler 45 dk süresince inkübatöre kaldırıldı. Bu sürenin sonunda 20 ng/mL TGF- β uygulaması yapılarak 6 saat inkübe edildi. Pelletler RNA için tripsinizasyon ile, protein için ise RIPA ile elde edildi.

3.2.2.8 Sitotoksite Deneyi

Hücrelerin metabolik aktivitelerini ölçmek için MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) testi kullanılmaktadır. Bu kolorimetrik yöntem, canlı hücrelerin metabolik aktivitesiyle ilişkili olan sarı renkli MTT tuzunun mor renkli formazan kristallerine indirgenmesine dayanmaktadır (bkz. Şekil 3.1). MTT testi, hücre canlılığı, proliferasyon ve sitotoksisite gibi hücresel özelliklerin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır.



Şekil 3.1: MTT testinde gerçekleşen redüksüyon [166].

MTT uygulaması yapabilmek amacıyla SW480 hücreleri 96 kuyulu plakalara 3×10^4 (hücre/kuyu) olacak şekilde paylaştırıldı. Bu işlemin ardında %0,5 CO₂ içeren, 37°C'de sabit

tutulan inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün sitokin uygulaması için %0,1 BSA içeren DMEM ortamına alınıp 1 saat inkübe edildi. Serum açlığı oluşan hücelere 10, 20 ve 40 ng/mL son konsantrasyon olacak şekilde TGF-β sitokini uygulandı. 24., 48., 72. saat dilimlerinde MTT uygulaması gerçekleştirildi. MTT solüsyonu her bir kuyuya 0,5 mg/mL son konsantrasyon olacak şekilde uygulandı. MTT uygulamasının ardında hücrelerin bulunduğu plaka %0,5 CO₂ içeren 37°C’de sabit tutulan inkübatörde 4 saat süresince inkübe edildi. Daha sonra kuyularda bulunan besiyerlerinden uzaklaşarak formazan kristalleri 4 mM HCl içeren izopropanol (200 µL) ile çözüldü. Formazan kristallerinin yoğunluğu spektrofotometre (OD=550 nm absorbans) kullanılarak ölçüldü. Hücre canlılığı aşağıdaki formül ile hesaplanarak GraphPad programı ile grafikleri çizildi.

$$\text{Hücre canlılığı (\%)} = \frac{\text{Örnek hücrelerin absorbansı}}{\text{Kontrol hücrelerin absorbansı}} \times 10$$

3.2.3 RNA Tabanlı Teknikler

3.2.3.1 RNA İzolasyonu

-80°C’de saklanan hücre pelletlerinin buz içerisine alınarak çözünmesi sağlandı. İzolasyona başlamadan önce deney yapılacak beç, pipet kutuları, otomatik pipetler %70’lik alkol ile silindikten sonra %0,1’lik DEPC’li su ile silindi. Sterilizasyon gerçekleştirildikten sonra total RNA’nın izolasyonu innuPREP RNA 2.0 kiti kullanılarak, önerilen prosedüre uygun şekilde gerçekleştirildi. RNA’lar daha sonra kullanılmak üzere -80°C’ye kaldırıldı.

3.2.3.2 RNA İzolasyon Miktarının Belirlenmesi

µDrop™ Plate Cihazı ile RNA izolasyonu sonucunda elde edilen RNA’nın konsantrasyonu ve saflığı belirlendi. Bu aşamada µDrop™ plate’e, elde edilen RNA örneğinden 2 µL ve kör olarak 2 µL dH₂O konuldu. Daha sonra cihazda 260 nm ve 280 nm’de ölçüm alınarak RNA miktarı ve saflığı belirlendi. Tablo 3.8’deki formüllerle saflık ve RNA miktarları hesaplandı.

Tablo 3.8: RNA saflığını ve miktarının formülü verilmiştir.

Formülün Kapsamı	Formül
RNA miktarı (ng/µL)	$A_{260} \times 40 \text{ ng}/\mu\text{L} \times (10 \text{ mm}/0,49 \text{ mm})$
Saflık	A_{260} / A_{280}

3.2.3.3 RNA Elektrofrez: Formaldehit-Agaroz Jel Metodu

Elde edilen total RNA'nın alt birimlere ayrılması ve herhangi bir bozulma veya degradasyon olup olmadığını, saf olarak RNA elde edilip edilmediğini belirlemek amacıyla formaldehit agaroz jeli döküldü. Jel dökülmeden önce kullanılacak tüm malzemeler RNaz'dan (Ribonükleaz) arındırmak için uygun sterilizasyon işlemlerine tabi tutuldu. Örneğin, cam malzemeler otoklavlanmadan önce %0,1'lik DEPC'li suda 12 saat bekletildi. Elektrofrez tankı ve aparatları sırasıyla aşağıdaki basamaklara tabi tutuldu.

- %0,5 (w/v) SDS solüsyonu kullanılarak tank ve aparatlar yıkandı. SDS (Sodyum Dodecil Sülfat), güçlü bir yüzey aktif madde olduğundan, yüksek lipid içeren RNaz enzimlerini çözerek inaktive eder ve protein yapılarını denatüre eder. Bu işlem, tank ve aparatların temizlenmesini ve RNaz enzimlerinin etkinliğini azaltmayı amaçlar.
- Durulama işlemi: SDS solüsyonundan sonra, tank ve aparatlar %0,1'lik DEPC'li suyla durulandı. DEPC (Diethyl pyrocarbonate), RNaz enzimlerini inaktive etme özelliği olan bir bileşiktir. DEPC'li su, RNaz enzimlerinin etkisini ortadan kaldırmak ve su ile temas halinde RNaz aktivitesini azaltmak için kullanılır.
- Etanol işlemi: Tank ve aparatlar, saf etanol ile işleme tabi tutuldu. Saf etanol, potansiyel olarak kalan RNaz enzimlerini inaktive eder ve RNaz aktivitesini azaltmaya yardımcı olur.
- Kurutma işlemi: Son olarak, tank ve aparatlar etüvde kurumaya bırakıldı. Bu işlem, etanolün buharlaşması ve malzemelerin tamamen kurumasını sağlar. Kuruma süreci, kalan RNaz enziminin aktivitesini etkisiz hale getirir.

Bu aşamalar tamamlandıktan sonra jel dökme basamağına geçildi. Bu basamakta öncelikle 0,5 g agaroz tartıldı ve 10X FA (5 mL) tamponu içerisinde çözüldü. Bu çözeltinin DEPC'li su ile total hacmi 50 mL'ye tamamlandı. Ardından, karışımın iyice çözülebilmesi için mikro dalgada birkaç dk süreyle kaynamaya bırakıldı. Homojenize olmuş bu çözeltinin 50°C sıcaklığa soğuması beklendi ve ardından RNA-protein etkileşimlerini çözmek ve RNA'nın yapısını korumak için %37'lik (12,3 M) formaldehit çözeltisinden 900 µL eklendi. Son olarak RNA örneklerini görebilmek amacıyla Et-Br, son konsantrasyon 0,5 µg/mL olacak şekilde jel karışımına eklenerek elektrofrez tankına dökülüp burada polimerleşmesi sağlandı. Polimerleşen jel, 0,25 M formaldehit içeren 1X FA tamponuyla dolu elektrofrez tankına yerleştirildi. Artık jel örnek yüklemek için hazır hale geldi. Bunun için hemen örnekler 2X örnek yükleme boyası ile boyanıp 70°C'de 10 dk süresince ısı ile denatüre

edildi. Örneklerin denatürasyonundan sonra örnekler buzun üzerine alınıp soğutuldu ve soğuyan örnekler jele yüklendi. Örnekler 80 V'da 40 dk boyunca yürütülüp, alt birimlere ayrılan RNA örnekleri UV görüntüleme sisteminde fotoğraflandı. %1'lik formaldehit agaroz jel hazırlamak amacıyla kullanılan çözeltiler Tablo 3.9'da verilmiştir.

Tablo 3.9: Formaldehit jel elektroforezi için gerekli çözeltiler ve hazırlanışı

Çözelti	Bileşim ve Hazırlanışı
<u>10X FA Tamponu</u> -0,2 M MOPS -0,01 M EDTA (pH 7,0) -0,05 M NaAc	41,9 g MOPS (MW:209,26), 6,8 g NaAc (MW: 136,08) ve 20 mL 0,5 M'lük EDTA (pH 8,0) çözeltisi ~900 mL %0,1'lik DEPC'li suda çözüldü. pH'ı 7,0'ye ayarlandı ve ardından DEPC'li suyla son hacim 1 L'ye tamamlandı. Bu çözelti ışık almayacak şekilde oda sıcaklığında saklandı.
<u>0,25 M FA içeren 1X FA Tamponu</u>	100 mL 10X FA tamponu ve 20 mL %37'lik (12,3 M) FA karıştırıldı ve son hacim DEPC'li suyla 1 L'ye tamamlandı.

3.2.3.4 RNA'nın reverse transkriptaz enzimi (RT) tarafından komplementer DNA (cDNA) olarak sentezlenmesi

Kaliteli ve miktarı belirlenmiş olan RNA örneklerinden 1 µg kalıp RNA kullanılarak cDNA sentezi iki basamakta gerçekleştirildi.

- Primer bağlanma basamağı: Bu basamakta oligo-dT primeri mRNA molekülünün poly(A) kuyruğuna bağlanır. Bu primer, mRNA molekülünün 3' uç kısmına komplementer olarak bağlanarak kalıp olarak kullanılacak bölgeyi belirler.
- Revers transkriptaz enzimi (Thermo scientific) ile cDNA sentezi: mRNA molekülünün 3' uç kısmından başlayarak, RNA zincirini okunur ve DNA zinciri sentezlenir. Bu süreçte, ribonükleotidlerin yerine deoksiribonükleotidler (dNTP'ler) kullanılır.

Elde edilen cDNA'lar Real Time PCR'da kullanılana kadar -20°C'de muhafaza edildi. Sentez aşamasında kullanılan bileşenler Thermo Scientific firmasından temin edilip Tablo 3.10'da basamaklarıyla birlikte verilmiştir.

Tablo 3.10: cDNA sentezi basamakları ve gerekli bileşenler.

Bileşenler	Miktarları
Kalıp olarak kullanılan RNA	1 µL
Oligo-dT primer (5 µg/mL)	1 µL
dH ₂ O	Son hacim 12,5
65°C'de 5 dk süresince inkübasyona tabi tutuldu.	
Reaksiyon tampon (5X)	4 µL
RiboLock RNaz inhibitor (20 U/µL)	0,5 µL
10 mM dNTP mix	2 µL
Reverse transkriptaz (200 U/µL)	1 µL
Toplam hacim	20 µL
42 °C'de 60 dk. ve 72 °C'de 10 dk. inkübasyon yapıldı.	

3.2.3.5 cDNA'nın Kalitesinin Değerlendirmesi için PCR Yönteminin Kullanımı

Çeşitli hücre tiplerinde ve doku örneklerinde genellikle sabit bir ifade düzeyine sahip olan, iç normalizatör gen olarak Tablo 3.11'de dizisi verilmiş olan H β -2-M genin ekspresyon primerleri kullanılarak PCR yapıldı. PCR'da kullanılmış olan malzemeler ve koşulları sırasıyla Tablo 3.12 ve Tablo 3.13'te verilmiştir.

Tablo 3.11: Kullanılan primerler.

Primer Adı	Nükleotit Dizisi (5'→3')
H β -2-M ileri	TTTCTGGCCTGGAGGCTATC
H β -2-M geri	CATGTCTCGATCCCACTTAACT
ADAMTS-8 ileri	GATGCGTCCATGGCTGCCTTCTA
ADAMTS-8 geri	TGCCAGTTGCAGAAGTTACGCAG
SMAD-2 ileri	CGCCAGTTGTGAAGAGACTGCTGG
SMAD-2 geri	GGGATACCTGGAGACGACCATCAA
SMAD-3 ileri	GTGAAGCGCCTG CTGGGCTGGAA
SMAD-3 geri	ATTGAAGGCGAACTCACACAGCTCC
SMAD-4 ileri	TGAAAGTTTGGTAAAGAAGCTGAAG
SMAD-4 geri	TCACCATCATACT TGATGGAGCAT

Tablo 3.12: cDNA sentezi kontrolü için H β -2 PCR'ında kullanılan malzemeler.

Bileşenler	Miktar
cDNA	1 μ L
dNTP karışım (10 mM)	1 μ L
MgCl ₂ (25 mM)	2 μ L
Taq tamponu (10X)	5 μ L
İleri primer	1 μ L
Geri primer	1 μ L
dH ₂ O	38,5 μ L
Taq polimeraz (5 U/ μ L)	0,5 μ L
Toplam	50 μ L

Tablo 3.13: H β -2 PCR koşulları

Segment	Döngü Sayısı	Sıcaklık (°C)	Süre
1	1	94°C	2 dk
		94°C	1 dk
2	30	58°C	30 sn
		72°C	30 sn
3	1	72 °C	10 dk

3.2.3.6 Agaroz Jel Elektroforezi

1 g agaroz tartılıp, 100 mL 0,5X TBE tamponunda çözüldü ve mikro dalga fırında çözelti homojen olana kadar kaynatıldı. Ardında çeker ocağın içinde 50°C'ye kadar soğumaya bırakıldı. Soğuyan jele son konsantrasyonu 0.5 μ g/mL olacak biçimde Et-Br eklendi. Hafifçe karıştırılarak elektroforez tankına dökülüp jelin polimerleşmesi beklendi. Polimerleşen jel 0,5X TBE dolu elektroforez cihazına yerleştirildi. Ardından, örnekler hazırlanmaya başladı. Örnekler 6X yükleme boyasıyla boyanıp tankın içinde bulunan jele yüklendi. Jel 90 Volтта 40 dk süresince yürütülüp UV görüntüleme cihazı ile görüntü alındı.

3.2.3.7 Real Time PCR (qPCR)

ADAMTS-8 geninin mRNA düzeyindeki ekspresyon seviyelerini kantitatif olarak belirlemek için Roche Life Science tarafından geliştirilen LightCycler® 480 Sistemi kullanıldı. Bu sistem, real-time PCR (qPCR) temelli bir yöntemdir ve gen ifadesinin nicel olarak ölçülmesini sağlar. RNA'dan DNA eldesinin sonucunda, kaliteli olduğu belirlenen 1 µg cDNA'dan 1 µL kullanıldı. Bu cDNA'lar kontrol, sitokin ve yolak inhibisyon çalışmalarından elde edilen cDNA'lardır. Real Time PCR çalışmasında, ADAMTS-8 ekspresyon primerleri ve bu genin normalizatörü olarak Hβ-2-M ekspresyon primerleri kullanıldı. cDNA'ların her biri üç tekrar olacak şekilde Tablo 3.14'te verilen Real Time PCR bileşenlerinin bulunduğu karışıma hava kabarcığı oluşturulmadan konuldu. LightCycler® 480 cihazında Tablo 3.15'te belirtilen koşullarda PCR reaksiyonu gerçekleştirildi.

Tablo 3.14: Real Time PCR bileşenleri

Bileşenler	Miktar
cDNA	1 µL
RealQ Plus 2X Master Mix Green	6,25 µL
İleri primer (10 pmol/µL)	0,5 µL
Geri primer (10 pmol/µL)	0,5 µL
dH ₂ O	4,25 µL
Toplam	12,5 µL

Tablo 3.15: Real Time PCR çalışma koşulları

Segment	Döngü sayısı	Sıcaklık	Süre
Ön İnkübasyon	1	95°C	10 dk
		95°C	30 sn
Amplifikasyon	40	55°C	30 sn
		72°C	30 sn
Erime Eğrisi	1	95°C	5 sn
		65°C	1 sn
Soğutma	1	40°C	30 sn

3.2.3.8 Real Time PCR Sonuçlarının Livak Metoduna Göre Değerlendirilmesi

Her bir cDNA için, H β -2-M geninin Ct değerlerinin ortalaması, ADAMTS-8 geninin Ct değerlerinden çıkarıldı. Çıkan sonucun 2 tabanında kuvveti alınıp, kontrol grupları kendine bölünerek kat olarak 1 kabul edildi. Çalışma grupları, kontrol grubuna bölünerek 1'in katları şeklinde değerler elde edildi. Bu oranlar, çalışma gruplarının kontrol grubuna kıyasla ne kadar arttığını veya azaldığını göstermektedir. Değerler, analiz için GraphPad programında grafiklendirildi ve sonuçlar bu grafikler üzerinden değerlendirildi.

3.2.4 Protein ile İlgili Teknikler

3.2.4.1 Western Blot Yöntemi Kullanarak Proteinlerin Belirlenmesi

SW480 hücrelerinde ADAMTS-8 geninin protein düzeyindeki ifadesini belirleyebilmek için western blot yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde kullanılan çözeltiler Tablo 3.16'da belirtilmiştir. Bu yöntemin temel basamakları özetle şu şekildedir;

- Protein Ekstraksiyonu: SW480 hücrelerinden RIPA tamponu ile protein ekstraktının çıkarılmasını sağlandı. Bu adımda, hedef proteinlerin örnekteki diğer bileşenlerden ayrılması sağlanır.
- Protein Ayırma: Proteinlerin boyutlarına göre ayrılması adımıdır. Poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) yöntemi kullanıldı.
- Transfer İşlemi: Proteinlerin jel üzerinden bir membrana aktarılması, daha sonra hedef proteinin tespiti için antikorlarla reaksiyona girebileceği bir yüzeyin oluşturulmasını sağlamak amacıyla boyutlarına göre ayrılan proteinlerin jel üzerinden bir PVDF membrana transfer işlemidir.
- Bloklama: Non-spesifik bağlanmayı önlemek ve antikorların hedef proteinlere spesifik olarak bağlanmasını sağlamak için yapıldı.
- Antikor İnkübasyonu: Hedef proteinleri belirlemek ve antikorlar aracılığıyla bu proteinlere spesifik olarak bağlanmayı sağlamak için gerçekleştirildi.
- Sinyal Tespiti: İkincil antikorun bağlanmasıyla birlikte hedef proteinin tespit edildiği adımdır.

Tablo 3.16: Western Blot tekniğinde kullanılan çözeltiler ve hazırlanma prosedürleri

Çözelti	Hazırlanışı ve İçeriği
RIPA Tamponu	-20°C'de saklanmak üzere 15 mL'lik falkonlara paylaştırılan çözelti, 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, %0,1 (w/v) sodyum deoksikolat, %0,1 (w/v) SDS ve %1 (v/v) Triton X-100 içerir. Proteaz inhibitörü eklenerek son hacmi tamamlandıktan sonra paylaştırıldı.
Bradford Reaktifi	50 mL %95'lik etil alkol içinde, 0,1 g Coomassie brilliant blue (G-250) çözüldü. Daha sonra, 100 mL %85 (w/v) fosforik asit eklenerek homojenleştirildi. Son hacim dH ₂ O ile 1 L'ye tamamlanıp çözelti ışık almayan bir şişeye alınıp iki kez filtre kağıdından geçirildi. +4°C'de saklandı
Ayırma (Alt) Jel Tamponu	1,5 M Tris-base (pH 8,8) içeren bir çözelti elde edildi. Bunun için 18,17 g Tris-base (moleküler ağırlık: 121,14) ve 0,4 g SDS, yaklaşık 80 mL dH ₂ O içinde çözüldürüldü. Sonrasında, pH değeri 8,8'e ayarlandı ve hacim 100 mL olarak tamamlandı. Elde edilen çözelti, +4°C'de saklandı.
Yığıma (Üst) Jel Tamponu	%0,4 (w/v) SDS içeren 0,5 M Tris-base (pH 6,8) içeren bir çözelti hazırlandı. Bunu yapmak için 6 g Tris-base (moleküler ağırlık: 121,14) ve 0,4 g SDS, yaklaşık 80 mL dH ₂ O içinde çözüldürüldü. Ardından pH değeri 6,8'e ayarlandı ve hacim 100 mL olarak tamamlandı. Elde edilen çözelti, +4°C'de saklandı.
Yürütme Stok Tamponu (10X)	pH 8,3'e ayarlanmış 0,25 M Tris-base ve 1,92 M glisin içeren bir çözelti hazırlandı. Bu için 30,3 g Tris-base (moleküler ağırlık: 121,14) ve 144,4 g glisin (moleküler ağırlık: 75,07) yaklaşık 700 mL dH ₂ O içinde çözüldürüldü. Ardından, çözeltinin pH değeri ayarlandı ve hacim 1 L'ye tamamlandı.
%10 (w/v) SDS Çözeltisi	10 g SDS dH ₂ O içinde çözüldürülerek son hacim 100 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti oda sıcaklığında saklandı.
Yürütme Tamponu (1X)	Son hacim 1 L'ye tamamlanarak, 100 mL 10X yürütme stok tamponu ve 10 mL %10 (w/v) SDS çözeltisi ile karıştırıldı. Son konsantrasyon: 25 mM Tris base, 92 mM glisin ve %0,1 SDS (w/v). pH değeri 8,3 olarak ayarlandı.

Tablo 3.16 (devam)

Transfer Tamponu	1 L'lik çözelti elde etmek için, 100 mL 10X yürütme stok tamponu ve 200 mL metanol birleştirildi ve son hacim dH ₂ O ile 1 L'ye tamamlandı. Elde edilen çözeltiye 500 µL %10 (w/v) SDS eklenerek karıştırıldı. Çözelti -20°C'de soğutularak kullanıma hazır hale getirildi.
10X Stok TBS (Tris-Buffered Saline)	0,2 M Tris-base ve 1,5 M NaCl içeren bir çözelti hazırlandı. Bunu elde etmek için, 24,22 g Tris-base (moleküler ağırlık: 121,14) ve 87,66 g NaCl (moleküler ağırlık: 58,44) yaklaşık 700 mL dH ₂ O içinde çözüldü. Sonrasında pH değeri 7,5 olarak ayarlandı ve hacim 1 L'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti, +4°C'de uygun şekilde saklandı.
1X TBST Çözeltisi	%0,1 (v/v) Tween-20 içeren 1X TBS çözeltisi hazırlandı. Bunun için, 100 mL 10X stok TBS çözeltisine 1 mL Tween-20 eklenerek karıştırıldı. Elde edilen çözelti, son hacmi 1 L'ye tamamlamak için dH ₂ O ile düzeltilmiştir.
Bloklama Tamponu	%5 (w/v) yağsız süt tozu içeren 1X TBST çözeltisi hazırlandı. Bunu gerçekleştirmek için, 50 mL 1X TBST çözeltisi içerisine 2,5 g yağsız süt tozu eklenerek homojen bir karışım elde edildi. Elde edilen çözelti, uygun sıcaklık olan +4°C'de saklandı.
Ponceau Boyası	ponceau-S'in 0,1 g, %5 (v/v) asetik asit çözeltisi içinde 100 mL olarak çözüldü.
Jelden Boya Giderici Çözelti	Hacim bazında, çözelti şu oranlarda hazırlandı: %5 metanol, %7,5 asetik asit ve %87,5 dH ₂ O.
Jel Boyama Çözeltisi	Coomassie brilliant blue R-250'in 0,1 g, 50 mL metanol içinde çözüldü. Ardından, karışıma 10 mL asetik asit eklenerek homojen çözelti elde edildi. dH ₂ O kullanılarak çözelti hacmi 100 mL'ye tamamlandı.

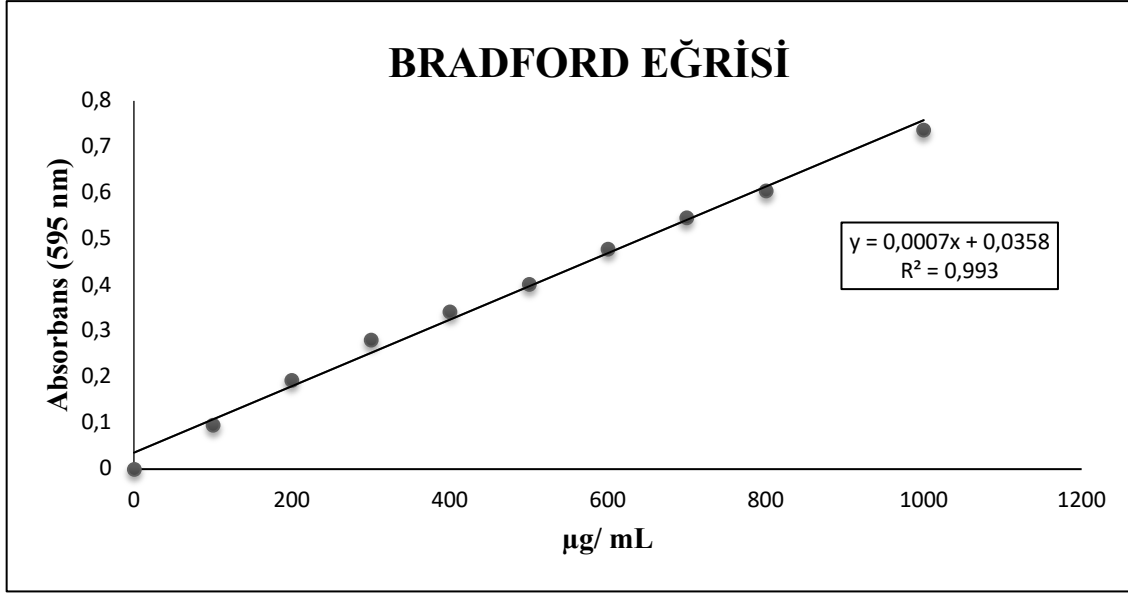
3.2.4.2 RIPA tamponu kullanarak hücrelerin lizisi ve proteinlerin ekstraksiyonu

Protein kazımaya başlamadan önce ependorflar etiketlenip buz üzerine alınarak soğutuldu. Ardından Bölüm 3.2.2.7'de belirtildiği şekilde kurulan protein deneyi kontrol, 1., 3., 6., 24., 48. saatlerinin sonunda besiyerinden uzaklaştırıldı. Daha sonra hücreler 2 kez soğuk PBS ile yıkandı. Ardında buz üzerinde eritilen RIPA tamponundan (*bk.* Tablo 3.16) 6 kuyucuklu plakanın her bir kuyusuna optimize edilmiş miktar olan 120 µL eklendi. RIPA tamponu eklenmiş olan plaka 5 dk süresince buz üzerinde bekletildi. Ardından kuyulardan hücre kazıyıcı ile hücrelerin yüzeyden ayrılması ve mekanik şekilde parçalanması sağlandı.

Kazınan hücreler soğuk ependorfa alınarak lizize devam etmek için sonikasyona tabi tutuldu. Sonikasyon işlemi 2 dk buz gibi soğutulmuş sonikasyon cihazında 2 dk buz üzerinde olmak üzere 3 kez tekrarlandı. Daha sonra buz kabınının içinde horizontal çalkalayıcıda 15 dk süresince inkübe edildi. Bu işlemin ardından +4°C’de 15 dk süresince 13.500 rpm’de santrifüjlendi. Hücre atıklarından kurtulup süpernatat kısmı soğuk ependorflara alındı. Örneklerin Bradford yöntemi ile miktarı belirlenip -80°C’ye kaldırıldı.

3.2.4.3 Bradford Yöntemiyle Protein Miktarı Tayini

Protein miktarının niceliksel olarak belirlenmesi için BSA (Bovine Serum Albumin) standart çözeltilerinden oluşan bir seri kullanıldı. Bu seri, farklı konsantrasyonlarda (100-1000 µg/mL) hazırlanan BSA çözeltilerini içerir ve standart bir eğri oluşturmak için kullanıldı. Standart eğri, örnekteki bilinmeyen protein miktarını belirlemek için kullanılan bir referans noktası sağlar. Deneyde kullanılan 96 kuyucuklu plakaya, standart BSA çözeltilerinden her biri en az 3 tekrar olacak şekilde 5 µL miktarında eklenerek dağıtıldı. Ayrıca, plakada kör denetim için 5 µL dH₂O kullanıldı. Miktarı belirlenecek örneklerden de 5 µL alındı. Ardından her bir kuyucuğa 250 µL Bradford reaktifi eklenerek homojen bir şekilde karıştırıldı ve 10 dakika boyunca karanlık bir ortamda inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda, absorbans ölçümleri spektrofotometre kullanılarak 595 nm dalga boyunda gerçekleştirildi. Standart BSA çözeltilerindeki protein miktarlarıyla ilişkilendirilen absorbans değerleri, standart bir eğri oluşturmak için kullanıldı (*bk.* Şekil 3.2). Örneklerin absorbans değerleri, standart bir eğri kullanılarak protein miktarına dönüştürüldü. Bu şekilde, örneklerin protein konsantrasyonları doğrudan absorbans değerlerine bağlı olarak belirlendi. Bu yöntemle protein miktarının doğru ve hassas bir şekilde belirlenmesi sağlandı.



Şekil 3.2: Bradford eğrisi ve formülü

3.2.4.4 SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE)

Jel hazırlığı, örneklerin hazırlanması, örneklerini jele yüklenmesi, jelin boyanarak görselleştirilmesi şeklinde basamakları içeren SDS jel elektrofrez yöntemi proteinlerin elektrik akımlı alanda dikey yönde molekül ağırlıklarına göre ayrılması temeline dayanmaktadır. Bu işleme geçmeden önce kullanılacak olan cam plakalar ve Bio-Rad sisteminin western aparatları dH₂O ile yıkanıp %70'lik alkol ile silindi. Cam plakalar özenle kurutulduktan sonra jel döküm standına dikkatlice yerleştirildi ve jel dökme işlemi için hazır hale getirildi.

SDS-PAGE çalışması için farklı oranlarda olan, ayırma jeli üzerine yığma jeli olacak şekilde iki farklı jel kesintili şekilde döküldü. Bu amaç için ilk olarak proteinlerin büyüklüklerine göre ayrılması için %10'luk oranda poliakrilamid içeren ayırma jeli Tablo 3.17'de belirtildiği şekilde hazırlanıp hızlıca cam plakaların arasına üst kısımdan 2-3 cm boşluk olacak şekilde döküldü. Üst kısmı %90'lık izopropanol (veya dH₂O) eklenerek düz bir jel elde edildi. Polimerleşmenin sonunda %90'lık izopropanolden (veya dH₂O) uzaklaştırılıp %4'lük oranda poliakrilamid içeren yığma jeli döküldü. Cam plakaların arasına camlara uyum mm'de tarak yerleştirilip polimerleşmeye bırakıldı. Polimerleşen jel'den tarak çıkartılıp 1X yürütme tamponu ile dolu olan elektrofrez tankına yerleştirildi. Örnekler yüklenmeden önce kuyular bu 1X yürütme tamponu ile yıkandı.

Deneyde, en az miktarda protein içeren bir örneğin 20 µL miktarı referans alındı ve diğer örnekler de aynı miktarda olacak şekilde endorf tüplere yerleştirildi. Bu işlem, örnekler arasında protein miktarının standardize edilmesini sağlamak için yapıldı. Her bir örneğin üzerine 5 µL yükleme boyası eklendi. Yükleme boyası, protein örneklerinin jeldeki hareketini takip etmek amacıyla kullanıldı. Yükleme boyası için ticari olarak hazırlanan 4X Laemli örnek tamponu (90 µL) ve β-merkaptoetanol (10 µL) karıştırılarak hazırlandı. Örnekler, 25 µL yığıma jel tamponu ile tamamlanarak karıştırıldı. Daha sonra proteinleri lineer hale getirmek için 95°C’de 5 dk süresince ısı ile denatüre edildi. Yığıma jelinin ilk kuyusuna proteinlerin ayrılma örüntüsünü değerlendirmek ve proteinlerin moleküler ağırlıklarını belirlemek için PageRuler™ Prestained Protein Ladder olarak adlandırılan 5 µL büyüklük belirteci yüklendi. Diğer kuyulara son hacim 25 µL olacak şekilde örnekler yüklendi. Bu işlemden sonra Tablo 3.16’da belirtilen şekilde transfer tamponu hazırlanarak -20°C’ye transfer işlemine kadar kaldırıldı. Jel 80 V’da serbest mA olacak şekilde 2,5-3 saat yürütüldü.

Tablo 3.17: SDS-PAGE jellerinin bileşenleri ve hazırlanma oranları 2 jel için verilmiştir.

Bileşenler	Ayırma Jeli (%10 poliakrilamid)	Yığıma Jeli (%4 Poliakrilamid)
Ayırma (Alt) Jel Tamponu	2,5 mL	-
Yığıma (Üst) Jel Tamponu	-	2,5 mL
Akrilamid/Bisakrilamid (%40 37.5/1)	2,5 mL	625 µL
dH ₂ O	5 mL	3,05 mL
% 10 (w/v) APS	100 µL	50 µL
TEMED	10 µL	5 µL

3.2.4.5 Proteinlerin SDS-PAGE Jelinden PVDF Western Blot Membranına Transferi

Proteinlerin SDS-PAGE jelinden PVDF (Millipore™) membrana transferi, Bio-Rad Trans Blot sistemi kullanılarak gerçekleştirildi. SDS-PAGE işleminin ardından, jel yığıma jeli kısmından kesilerek üst jel uzaklaştırıldı. Ayırma jeli, dengelenmesi için soğuk transfer tamponu içinde oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi (Tablo 3.16). Transfer tamponunda bekletilen transfer aparatı, Whatman 3 MM kâğıdı ve süngerler, transfer süreci için hazır hale getirildi. PVDF membranı, aktiveleştirme için metanolde 2 dakika bekletildi ve ardından

soğuk transfer tamponuna yerleştirildi. Membran, kesilip boyutlandırıldı (8 x 6 cm) ve transfer işlemine hazır hale getirildi. Daha sonra transfer kasedinin (-) kutbundan başlayarak sünger- 3 kâğıt- jel- membran- 3 kâğıt- sünger olacak şekilde yerleştirilip katmalar silindirik aparat ile geçilerek transfer etkinliğini düşerebilecek hava kabarcığı oluşumu engellendi. Transfer kaseti (-) kutbundan (+) kutba doğru kapatılarak soğuk transfer tamponu ile dolu bulunan tankın içine yerleştirildi. +4°C'de gece boyu inkübasyona bırakıldı. Transfer 80 mA'de serbest voltaj olacak şekilde gerçekleştirildi.

3.2.4.6 Proteinlerin Antikorlarla Etkileşiminin İmmüno blot Yöntemiyle Tespiti

PVDF membranda, protein transferi sonrasında spesifik olmayan bağlanmaların önlenmesi ve arka plan gürültüsünü azaltarak özgül bir sinyal elde etmeyi sağlamak amacıyla bloklama işlemi uygulandı. Bu amaçla membran, 20 mL hacmindeki bloklama tamponu (Tablo 3.16'de belirtilen) içinde oda sıcaklığında 1,5 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon horizontal bir çalkalayıcıda gerçekleştirildi. İnkübasyon süresi bittikten sonra membran 1X TBST solüsyonu ile yıkandı. Yıkama işlemi üç kez tekrarlandı ve her bir yıkama 5 dakika süresince gerçekleştirildi. Bu tekrarlı yıkama adımları, membran üzerindeki istenmeyen bileşiklerin ve artıkların tamamen temizlenmesini sağlamak ve aynı zamanda, antikorlarla olası non-spesifik bağlanmaları azaltıp, antikorların hedef proteinlere spesifik olarak bağlanmasını kolaylaştırmak amacıyla gerçekleştirildi. Membran, ADAMTS-8 ve β -aktin proteinlerini içeren bölgeleri ayırmak için ayrı ayrı primer antikorlarla muamele edildi. Bu işlemde, bloklama tamponunda seyreltilen 1/500 oranında ADAMTS-8 antikor ve 1/5000 oranında β -aktin antikor kullanıldı. Membran, +4 °C'de bir gece boyunca döner hareketli çalkalayıcıda inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında membran, 5 dk'lık sürelerle üç kez 1X TBST ile yıkandı. Daha sonra, membran sekonder antikorlarla (1/10000 oranında mouse β -aktin ve ADAMTS-8 antikor) işleme tabi tutuldu. Son olarak, membran 5 dakikalık sürelerle üç kez 1X TBST ile yıkandı ve görüntüleme işlemi yapıldı.

3.2.4.7 Protein Bantlarının Görselleştirilmesi ve Analiz Edilmesi

Proteinlerin belirlenmesi ve görüntülenmesi için, spesifik antikorlarla işaretlenen proteinlerin tespiti amacıyla (Pierce™) ECL Western blot substratı kullanıldı. ECL substratı, membranda bulunan işaretlenmiş proteinleri tanımlayarak ışık emisyonu sağladı. Bu sayede hedef proteinlerin varlığı ve yoğunluğu görüntüledi. UVP BioSpectrum™

görüntüleme sistemi, elde edilen ışık emisyonunu algılayarak görüntü oluşturdu ve fotoğraflama işlemi cihaz yardımıyla gerçekleştirildi.

Protein bantlarının fotoğraflarının analizi için ImageJ programı kullanıldı. Bu analizde, deney ve kontrol gruplarında bulunan protein bantları ölçülerek yoğunluk değerleri elde edildi. Ayrıca, normalizasyon amacıyla β -aktin proteini çalışıldı. ADAMTS-8 ve β -aktin analiz sonuçları, bu iki protein arasındaki oranlar hesaplanarak GraphPad programında grafiklendirildi. Bu değerler, protein ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması ve istatistiksel analiz için kullanıldı.

3.2.5 Transfeksiyon Çalışmaları ile İlgili Teknikler

Plazmid DNA'ları kalsiyum fosfat metoduna göre memeli hücre hattı olan SW480 hücrelerine aktarıldı. Tablo 3.18'da verilmiş malzemeler önceden hazırlandı.

Tablo 3.18: Kalsiyum-Fosfat presipitasyonunda kullanılan çözeltiler.

Çözelti	Bileşim ve Hazırlanışı
<u>2X HEPES-Buffered Saline</u> <u>(2X HeBS)</u> -280 mM NaCl (MW:58,44) - 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ (MW:141,96) - 50 mM HEPES (MW:238,3) (pH 7,05-7,12)	1,19 g HEPES, 1,63 g NaCl ve 0,02 g Na ₂ HPO ₄ 'in yaklaşık 90 mL deiyonize suya çözündürülerek pH 7,05'e ayarlandığı ve hacminin 100 mL'ye tamamlandığı bir çözelti elde edildi. Bu çözelti daha sonra 0,22 μ m'lik bir filtreden geçirilerek steril edildi ve ependorf tüplerine bölünerek -20 °C'de saklandı.

Tablo 3.18 (devam)

Çözelti	Bileşim ve Hazırlanışı
<u>2,5 M CaCl₂</u> (MW: 147,01)	36,75 g CaCl ₂ çözeltisi, 100 mL deiyonize suya eklenerek homojen bir çözelti oluşturuldu. Hazırlanan çözelti, sterilizasyon amacıyla 0,22 µm'lik bir filtre kullanılarak filtrasyon işleminden geçirildi. Sterilize edilen çözelti, -20 °C sıcaklıkta saklamak için ependorf tüplerine dağıtıldı ve bu şekilde muhafaza edildi.

3.2.5.1 Transfeksiyon Deneyi

Hücreler 2 ve ileri pasajlara ulaştığında hücreler sayılarak mL'inde bulunan canlı hücre sayısı belirlendi. Ardından 100 mm alana sahip hücre kültürü petrilere 10⁶ hücre/petri olacak şekilde paylaştırıldı. Gece boyu inkübasyon için 37°C'de %0,5'lik CO₂ içeren inkübatöre kaldırıldı. Ertesi gün transfeksiyon için Tablo 3.18'de verilmiş olan gerekli malzemeler oda sıcaklığına getirildi. 100 mm petri kapları için son hacim 3,9 mL olacak şekilde HEPES içeren çözelti B içerisinde pastör pipetiyle hava kabarcığı oluştururken çözelti A pipet yardımıyla damla damla eklendi. Bu işlemde plazmid Ca⁺² ile çevrilir. Çözelti A ve B'nin karışımı, presipitasyon için oda sıcaklığında 30-60 dk süresince laminar flow içerisinde bekletilir. Bu süre sonunda presipitasyon gözle gözlemlenir haldedir. Transfekte edilecek hücreler inkübatörden çıkarılarak DNA-Kalsiyum kompleksleri hafif şekilde homojen hale getirilip eşit şekilde petrilere paylaştırıldı. Petrilere bu işlemden sonra inkübatöre (37°C'de, %0,5 CO₂) kaldırıldı. Gece boyu inkübasyon süresinin sonunda hücrelerin medyumunu dökülür ve hücreler 1X PBS ile yıkanarak transfeksiyon ortamından uzaklaştırıldı ve 96 kuyucuklu plakalara transfekte edilmiş hücrelerin bölünmesi için Tripsin EDTA ile hücreler kaldırıldı. Tripsin-EDTA inaktivasyonu için %10 FBS içeren DMEM eklenerek 15 mL'lik tüpe alındı. Daha sonra 5 dk boyunca 1000 rpm'de santrifüjlendi ve ardından pelletler 5 mL DMEM ile çözüldü. Çözünen hücreler sayılarak mL'de bulunan hücre sayısı belirlendi ve kuyu başına 3X10⁴ hücre olacak şekilde paylaştırıldı. Hücreler plaka yüzeyine tutunmasının ardından serum açlığı yaratmak için %0,1'lik BSA içeren DMEM ile medyum değişikliği yapıldı. %0,1 BSA içeren DMEM ortamında 1 saat inkübe edildi. Ardından 200 µL'lik plakanın medyumuna PD169316, PD98059, SP600125,

Wortmannin, SİS3 inhibitörleri eklendi ve 45 dk boyunca inkübatörde bekletildi bu işlemin ardından hem sitokin grubuna hem de inhibitör gruplarına 20 ng/mL olacak şekilde TGF- β 1 eklendi ve 6 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresinden sonra 50 μ L medyum çekildi. Çekilen medyumlar daha sonra ölçülmek üzere etiketlenerek -20°C'ye kaldırıldı.

Tablo 3.19: Kalsiyum-Fosfat prespitasyonunda kullanılan çözeltiler.

Deney Kültür Kabı	Çözelti A			Çözelti B	Kültür Hacmi
	DNA	2,5 M CaCl ₂	dH ₂ O	2X HeBS	
96 well	0,1 μ g	0,45 μ L	4,5 μ L	4,5 μ L	200 μ L
6 well	2 μ g	9 μ L	90 μ L	90 μ L	2 mL
100 mm petri kabı	1,5 μ g	63 μ L	630 μ L	630 μ L	10 mL
T25 flask	10 μ g	31,5 μ L	315 μ L	315 μ L	5 mL

3.2.5.2 Salınan Sistem Lusiferaz Aktivitesinin Ölçülmesi

Lusiferaz Aktivitesi'nin ölçümü için "Ready-To-Glow Dual Secreted Luciferase Assay" (Clontech) kiti ile ölçüm alındı. 10 X Lusiferaz Substratı, Reaksiyon Tamponu ile 1 X'e dilüe edildi. 96 kuyucuklu plakalardan transfeksiyonun 48. ve 72. saatlerinin sonunda 50 μ L çekilen medyumlardan 10 μ L alınarak 384 kuyucuklu plakaya konuldu. Ardından, 1 μ L 1X'e dilüe edilen Lusiferaz Substratı karışımından alınarak hemen 10 μ L'lik medyumun üzerine eklendi. Luminometre cihazı yardımıyla ölçümler gerçekleştirildi. Lusiferaz sonuçlarını normalize etmek amacıyla Seap ölçümü alındı. Ölçüme geçmeden önce, kit içerisinde bulunan 5X dilüsyon tamponu 1X'e sulandırılarak kullanıma hazır hale getirildi. Ardından, hazırlanan 1X dilüsyon tamponu kullanılarak ölçümlere başlandı. 50 μ L çekilen medyumlar 96 kuyucuklu plakalara 5 μ L olacak şekilde paylaştırıldı. Üzerine 1X dilüsyon tamponu eklendi ve 65°C'de 30 dk süre boyunca inkübe edildi hızlıca soğuması için 2-3 dk buzda bekletildi. Daha sonra oda sıcaklığına gelene kadar inkübasyona tabi tutuldu. Ardından, oda sıcaklığına gelen örneklerin üzerine 20 μ L Seap eklenip oda sıcaklığında tekrar 30 dk inkübe edildi. Sürenin sonunda luminometrede ölçüm alındı.

3.2.6 Kromatin İmmuno Presipitasyonu (ChIP)

ChIP, belirli bir proteinin genom üzerindeki bağlanma bölgelerini belirlemek için yaygın olarak kullanılan bir moleküler biyoloji tekniğidir. Aşağıda belirtilen basamakları içerir;

1. SW480 hücrelerinin çapraz bağlama için formaldehit ile fiksasyonu: Hücreler, formaldehit gibi bir çapraz bağlayıcı ile fikse edilir. Bu adım, protein-DNA etkileşimlerini sabitleyerek hücrelerin orijinal durumunu korumasını sağlar.
2. Kromatinin hazırlanması: Fikse edilmiş hücreler, hücre zarlarının parçalanması ve çekirdeklerin açılması için uygun tamponlarla muamele edilir. Bu adımda, kromatin kompleksi açığa çıkarılır ve protein-DNA etkileşimleri serbest hale gelir.
3. Kromatin parçalanması: Kromatin, genellikle ultrasonikasyon yöntemiyle uygun boyutlara parçalanır. Bu, DNA parçalarının istenen boyut aralığında olmasını sağlar.
4. Antikor immünopresipitasyonu: SMAD proteininin, protein-DNA komplekslerinin seçici olarak çekilmesi için 2 µg olacak şekilde SMAD2/3 antikorları kullanıldı. Antikorlar, kromatin ile birleşerek hedef protein-DNA komplekslerine bağlanır ve bu komplekslerin izole edilmesini sağlar.
5. Protein-DNA bağlarının ters çevrilmesi ve proteinlerin çözülmesi: İmmunopresipite edilen komplekslerdeki protein-DNA bağları, sıcaklık ve enzimatik sindirim kullanılarak çözülür. Bu adım, proteinlerin ayrılması ve DNA'nın serbestleşmesi için gerçekleştirilir.
6. İzole edilen DNA'nın saflaştırılması ve analizi: Proteinler çözüldükten sonra, DNA izole edilir ve saflaştırılır. Daha sonra, izole edilen DNA'nın, qPCR yöntemi ile analizleri gerçekleştirilip grafikleri GraphPad programı ile çizildi.

ChIP protokolünün basamakları EZChIP™ Milipore kiti kullanılarak gerçekleştirildi.

3.2.6.1 Kromatin İmmunopresipitasyonunda Fiksasyon Aşaması

10 mL büyüme ortamı içeren 100 mm'lik bir kültür kabında yapışık halde bulunan SW480 hücreleri %80-90 yoğunlukta olduğunda deney başlatıldı. Hücrelerde serum açlığı yaratmak için %0,1 BSA'lı medyuma alınıp 1 saat inkübe edildi., TGF- β sitokini son konsantrasyonu 20 ng/mL olacak şekilde uygulandı. 16 saat bekleme süresinden sonra, ChIP prosedürü başlatıldı. İnkübasyon süresinin sonunda ChIP deneylerine başlamak için, 366,6 μ L %37 formaldehiti medyuma eklendi. Oda sıcaklığında horizontal çalkalayıcıda hafifçe çalkalayarak 10 dk süresince inhübe edildi. İnkübe süresinin sonunda reaksiyona girmemiş olan formaldehit kalıntılarını uzaklaştırmak için 1.3 mL 10X Glisin her bir hücre kabının üzerine eklendi. Bu karışım horizontal çalkalayıcıda hafifçe çalkalanarak 5 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Ardından yıkama basamağına geçildi. Öncelikle büyüme kabı buz üzerine yerleştirildi. Medyumu bir pipetle uzaklaşması sağlandı. Üzerine her bir petri için 10 mL soğuk 1X PBS ekleyerek hücreler yıkandı. Bu aşama 3 defa tekrar edildi. Bu aşamadan sonra hücreleri kazıyabilmek için 1 mL 1X PBS'e 3.25 μ L Proteaz İnhibitör Kokteyl II eklendi (Kullanılacak petri hacmine göre kat alınarak hesaplanır) ve tüpleri buz üzerinde soğutuldu. 1X Proteaz İnhibitör Kokteyl II içeren 2 mL soğuk PBS 100 mm'lik hücre kabına eklendi. Hücre kabı 5 dk süresince buz üzerinde inkübe edildi. Ardından, hücreler hücre kazıyıcı yardımıyla kazındı ve 2 mL'lik ependorf tüplerin içerisine alındı. Daha sonra 700 x g'de 4°C'de 8 dk santrifüjlendi. Santrifüjleme sırasında, bir sonraki basamak için gereken lizis tamponu hazırlandı. Bu tampon, her bir petri için gerekli olan 666 μ L SDS Lizis Tampon'a 3.3 μ L Protease Inhibitor Koktail II ekleyerek kullanıma hazır hale getirildi. Santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırıldı. Her hücre pelletini 1X Proteaz İnhibitör Kokteyli II içeren 666 μ L SDS Lizis Tamponunda çözüldü. Çözünen hücreler, her bir santrifüj tüpünde 300-400 μ L arasında olacak şekilde paylaştırıldı. Her bir tüpte 300-400 μ L olacak şekilde paylaştırılmış olan hücre lizatı buz ile dolu ultrasonik sonikasyon cihazı yardımıyla çapraz bağlı DNA'ları 200-1000 bç aralığında parçalandı. Bu amaç için 5 sefer 10 sn sonikasyon 10 sn buzda bekletme şeklinde yapıldı. Sonikasyon işleminin ardında 13 500 x g'de 4°C'de 10 dk boyunca santrifüj yapıldı ve süpernatant 100'er μ L olacak şekilde paylaştırılır. Her 100 μ L'lik süpernatant aslında 1×10^6 'yi eşit olacak şekilde bir immünopresipitasyon yapacak kadar hücre lizatı içermektedir. İstenirse 5 μ L olacak şekilde hücre lizatı sonikasyondan sonra alınabilir ve Bölüm 3.2.3.6'de tarif edildiği şekilde agaroz jel analiziyle DNA'nın parçalanıp parçalanmadığı kontrol edilebilir. Bu aşamada hücre lizatları -80°C'de 2 aya kadar saklanabilmektedir.

3.2.6.2 Kromatin İmmunopresipitasyonunda Çapraz Bağlı Protein/DNA'nın İmmünopresipitasyonu (IP)

Her IP için, 600 µL Dilüsyon Tamponu ve 3 µL Proteaz İnhibitör Kokteyli II eklenmesi gerekir. Dilüsyon tamponu buz üzerinde saklanır. 100 µL hücre lizatı üzerine 600 µL eklendiğinde 700 µL total hacim elde edilir. Pozitif kontrol (Anti-RNA Polimeraz II), negatif kontrol (IgG), ilgilenilen antikor (SMAD2/3) içermelidir. 700 µL hücre lizatının antikor muamelesinden önce ön temizle için her bir IP'a 42 µL Protein G Agaroz eklendi. Bu aşamada, Protein G Agaroz, non-spesifik bağlanabilecek protein parçalarından ayrıştırıldı. Protein G agarozunu koyduktan sonra 4°C'de 1 saat 360° rotasyonlu döndürücüde inkübe edildi. 5000 g'de 1 dk santrifüjlendi. Bu işlemden sonra Protein G Agaroz pellet haline geldi. Protein G agarozu tekrar kullanım için +4°C'ye kaldırıldı. Süpernatant yeni ependorfa alındı. Hiçbir antikor ile muamele olmamış süpernatanttan 7 µL (%10 input) olacak şekilde ileriki basamaklarda kullanılmak üzere bir tüpe ayrıldı. Ardından geride kalan ~700 µL süpernatant örnekleri uygun antikorlar ile muamele edildi (*bk.* Tablo 3.20). Antikor ilavesinden sonra gece boyunca 4°C'de rotasyonla inkübe edildi. Ertesi gün antikor/antijen/DNA kompleksine Protein Agaroz G'nin birleşmesini için her IP'a 42 µL Protein G Agaroz eklendi ve 1 saat 4°C'de rotasyonla inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda 1 dk 5000 g'de santrifüjlendi, Protein G Agaroz pellet haline getirildi. Ardından süpernatant kısmı başka tüpe alındı. Pellet halinde bulunan Protein G Agaroz/Antikor/Kromatin kompleksinin yıkama basamakları gerçekleştirildi. Her bir IP örneği, soğuk olacak şekilde 700 µL tamponda yeniden süspanse edilerek yıkandı. 3-5 dk inkübe edildi, ardından 5000 g'de 1 dk santrifüjlenerek Protein G Agaroz-antikor/kromatin kompleksi yıkandı. Yıkama basamakları Tablo 3.21'de belirtildiği şekildedir.

Tablo 3.20: ChIP'te amacına uygun kullanılan antikorlar ve miktarları.

Kullanım Amacı	Antikor
Pozitif Kontrol	Anti-RNA Polimeraz II (1 µg)
Negatif Kontrol	Normal Mouse IgG (1 µg)
İlgilenilen Antikor (Mouse ise)	SMAD2/3 (mouse) (1 µg)
! İlgilenilen antikor için 1-10 µg olacak şekilde uygulanmalıdır.	
! İlgilenilen antikor Rabbit ise negatif kontrol olarak Normal Rabbit IgG tercih edilmelidir.	

Tablo 3.21: ChIP'te kullanılan yıkama tamponları ve kaç kez kullanıldıkları.

Tampon İsimleri	Uygulama Sayısı
Düşük Tuzlu immün Kompleks Yıkama Tamponu	1 kez
Yüksek Tuzlu immün Kompleks Yıkama Tamponu	1 kez
LiCl Immune kompleks Yıkama Tamponu	1 kez
TE Tamponu	2 kez

3.2.6.3 Kromatin İmmunopresipitasyonunda Protein/DNA Komplekslerinin Elüsyonu

Tüm IP tüplerinin için elüsyon tamponu hazırlandı. Elüsyon tamponu her bir tüp için, 7 µL %20 SDS, 14 µL 1 M NaHCO₃ ve 119 µL steril distile su içermelidir. Bölüm 3.2.6.2'de ayırdığımız input tüpleri için 140 µL Elüsyon Tamponu eklendi ve Bölüm 3.2.6.3'e kadar oda sıcaklığında bir kenara bırakıldı. Antikor/agaroz kompleksi içeren her tüpe ise 70 µL elüsyon tamponu eklendi. Tüpler hafifçe sallanarak karıştırıldı. Oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda 1 dk boyunca 5000 g'de santrifüjlendi. Santrifüj sonunda süpernatant yeni bir tüpe alındı. Elüsyon tamponu eklenip oda sıcaklığında bekletilerek santrifüjlenme basamağı tekrarlandı. Pellet haline gelen agarozlar tekrar kullanım için +4°C'ye kaldırıldı.

3.2.6.4 Kromatin İmmunopresipitasyonunda Protein/DNA Komplekslerinin Serbest DNA'ya Çevrilmesi

Bölüm 3.2.6.3'de elüsyon tamponu ekleyerek oda sıcaklığına bıraktığımız %10 inputları ve IP tüplerine 5.6 µL 5 M NaCl eklendi ve DNA 65°C'de gece boyunca inkübe edildi. Tüm tüplere 0.7 µL RNase eklendi ve 30 dk 37°C'de inkübe edildi. Ardından RNaz A'yı durdurmak için her tüpe 2.8 µL 0,5M EDTA, 5.6 µL 1M Tris-HCl ve 0.7 µL Proteinaz K eklenerek, 45°C'de 1-2 saat inkübe edildi.

3.2.6.5 Kromatin İmmunopresipitasyonunda DNA Saflaştırması

Her numune için kitte bulunan Spin filtre ve toplama tüpü çıkarılır. Her 140 µL DNA numune tüpüne (IP'ler ve Input) 700 µL Bind Reagent “A” eklendi ve iyice karıştırıldı. Her 1 hacim numune için 5 hacim Bind Reagent “A” kullanıldı. Bu aşamada presipitasyon gözlemlendi. 600 µL numune/Bağlama Reaktifi “A” karışımını toplama tüpündeki spin filtresine aktarıldı. En az 13 500 g'de 30 saniye santrifüjleme yapıldıktan sonra spin filtre toplama tüpünden çıkarıldı ve toplama tüpünün içindeki sıvı uzaklaştırıldı. Spin filtre tekrar aynı toplama tüpünün içerisine konuldu. Kalan 600 µL numune/Bağlama Reaktifi “A” karışımını Spin filtresine aktarıldı ve bu basamaklar tekrar edildi. Toplama tüpündeki spin filtresine 350 µL Yıkama Reaktifi “B” eklendi ve 13 500 g'de 30 sn santrifüjlendi. Ardından spin filtresini toplama tüpünden çıkartıldı ve toplama tüpü saklandı. Toplama tüpündeki sıvı atıldı. Boş spin filtresi aynı toplama tüpüne geri konuldu. Ardından, 13 500 g'de 30 saniye santrifüjlendi. Toplama tüpü ve sıvı kısım atıldı ve spin filtresini temiz yeni bir toplama tüpüne konuldu. 35 µL Elüsyon Tamponu “C” doğrudan beyaz spin filtre membranının merkezine eklendi. 5 dk oda sıcaklığında beklendi. Ardından, 13 500 g'de 30 saniye santrifüjlendi. Spin filtresini çıkartıldı ve atıldı. Toplama tüpündeki elüat artık saflaştırılmış DNA'dır. Saflaştırılan DNA Tablo 3.22 'da belirtilen primerler yardımıyla Bölüm 3.2.3.8'de belirtilen koşullarda Real Time PCR kuruldu.

Tablo 3.22: ChIP Real Time PCR'ında kullanılan primerler ve dizleri.

Primer Adı	Nükleotit Dizisi (5'→3')	Bölge	Ürün Büyüklüğü
TS8 ChIP İLERİ 1	GCAACTAGCAGTATCCAGAAGAGA	-687/-792	105 bç
TS8 ChIP GERİ 1	AGTGGTAAGTTACCAGCACTGAG		
TS8 ChIP İLERİ 2	CTTAGGGTTAACCAGGTGGGTTGT	-637/-503	135 bç
TS8 ChIP GERİ 2	GAGAGGAGGAAAAGGTCATGCTAA	-637/-503	
TS8 ChIP İLERİ 3	CTTCGGAAGATGCATCCTGGAC	-353/-234	119 bç
TS8 ChIP GERİ 3	CTCTACGCGTGGACCCACGTTA	-353/-234	
TS8 ChIP İLERİ 4	GGAAACGGGAATAGTGAGAGATCA	-87/+38	126 bç

Tablo 3.22 (devam)

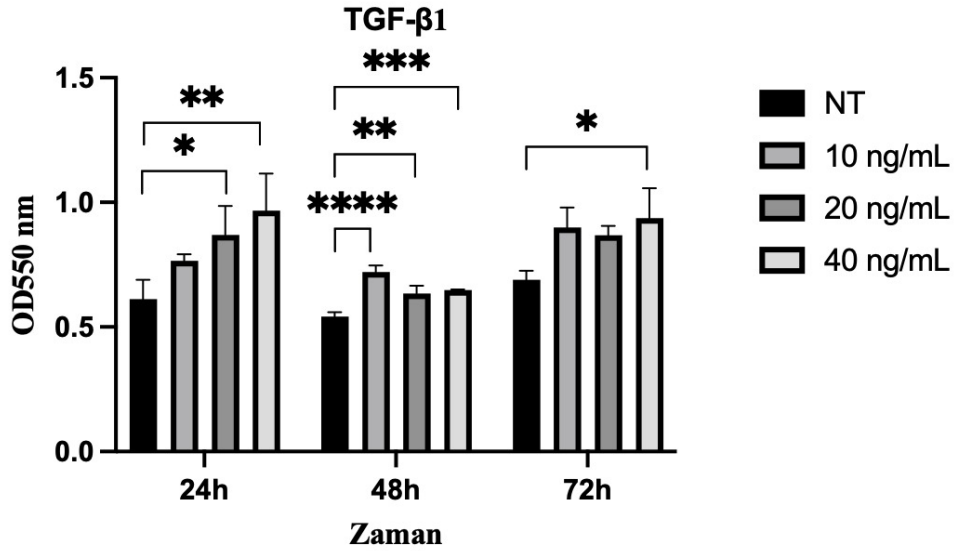
Primer Adı	Nükleotit Dizisi (5'→3')	Bölge	Ürün Büyüküğü
TS8 ChIP GERİ 4	CAGCCGCCTCCTGCCTCCTC	-87/+38	
TS8 ChIP İLERİ 5	AGCTGCTCGCGCTCGGCTCG	+91/+232	141 bç
TS8 ChIP GERİ 5	TCTCCAGGAAAAGCGGAATCAATC	+91/+232	
TS8 ChIP İLERİ 6	GGGCCGAGTCGGCCTTGCAC	+188/+312	124 bç
TS8 ChIP GERİ 6	CGGTGGCTGCGCGCAGGAGA	+188/+312	

4. BULGULAR

4.1 TGF- β 'nın SW480 Hücre Proliferasyonuna Olan Etkisinin MTT Analizi ile Belirlenmesi

TGF- β sitokinini 10, 20 ve 40 ng/mL konsantrasyonlarda SW480 hücrelerine uygulanarak hücre proliferasyonuna olan etkisi 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sürelerinin sonunda Bölüm 3.2.2.8'de bahsedildiği şekilde MTT analizi ile belirlendi.

Kısaca, SW480 hücreleri her bir kuyuda 3×10^4 hücre olacak şekilde, %10 FBS içeren DMEM besiyeri kullanılarak uygun kültür ortamına eklendi. Bu hücreler her bir doz en az üç tekrar olacak şekilde 96 kuyucuklu plakalara dağıtıldı. Hücrelerin tutunması için 37°C'ye ayarlanmış ve %0,5 CO₂ içeren inkübatör ortamında gece boyunca inkübe edildi. Tutunan hücreler, serum açıklığı oluşturulması amacıyla %0,1'lik BSA (w/v) içeren besiyerine alındı ve 1 saat boyunca inkübe edildi. Daha sonra, her bir kuyuya en az üç tekrar olacak şekilde 10, 20 ve 40 ng/mL konsantrasyonlarında TGF- β sitokini uygulandı. İnkübasyon sürelerinin (24, 48 ve 72 saat) sonunda, her bir kuyuya 0,5 mg/mL konsantrasyonda MTT solüsyonu eklendi ve 4 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin sonunda, hücrelerin metabolik aktivitesini yansıtan formazan kristalleri oluştu. Formazan kristalleri 200 μ L izopropanol içeren 4 mM HCl çözeltisi ile çözüldü. Daha sonra 550 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü. Bu ölçümler en az üç tekrar olacak şekilde çalışıldı. Elde edilen veriler, GraphPad programında grafiklendirildi ve one-way ANOVA testiyle istatistiksel analizler yapıldı (Şekil 4.1).



Şekil 4.1: Zamana bağlı olarak farklı konsantrasyonlarda uygulanan TGF-β sitokininin SW480 hücre proliferasyonu üzerindeki etkisi

($p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***) ve $p \leq 0,0001$ (****)).

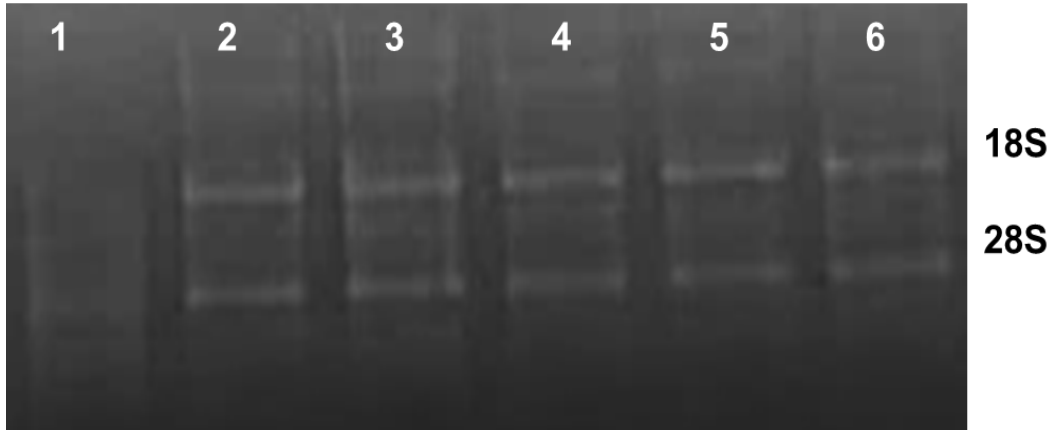
Şekil 4.1’de verilen MTT analizi grafiğine göre SW480 hücrelerinde 24. saatte 20 ve 40 ng/mL sitokin dozlarının proliferatif etkisi ($p \leq 0,05$) olduğu belirlendi. 48. saatte ise uygulanan tüm dozların hücre proliferasyonunu istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttırdığı belirlendi. Fakat 72. saatte yalnızca 40 ng/mL uygulanan dozda proliferatif etkisinin olduğu gözlemlendi.

4.2 ADAMTS-8 Geninin TGF-β Sitokini Tarafından Regülasyonu

4.2.1 SW480 Hücrelerinde TGF-β Sitokininin ADAMTS-8 mRNA Ekspresyonu Üzerindeki Etkisinin qRT PCR ile Belirlenmesi

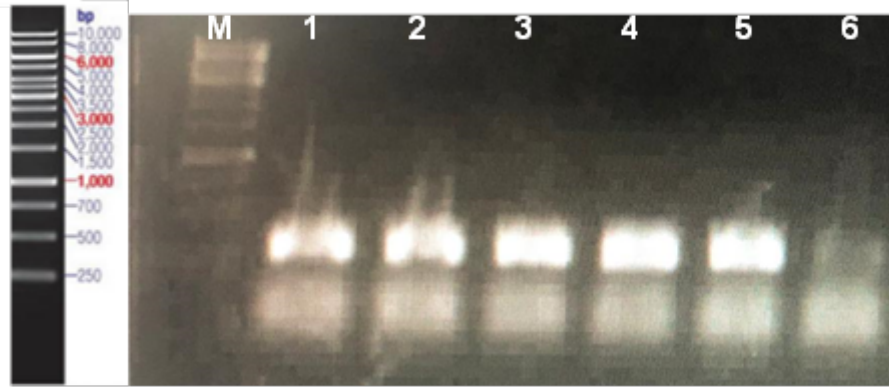
Bölüm 3.2.2.7’de belirtilen protokole uygun olarak, SW480 hücrelerinde TGF-β sitokininin ADAMTS-8 gen ekspresyonundaki mRNA düzeyine etkisini belirlemek için sitokin uygulama çalışması gerçekleştirildi. Bu amaçla, SW480 hücreleri çoğaltılarak birkaç kez pasaj yapıldıktan sonra hücreler Trisin-EDTA ile petri yüzeyinden kaldırıldı. 1000 g’de 5 dk santrüfjlendi ve Bölüm 3.2.2.5’te belirtildiği şekilde canlı hücre sayısı belirlendi. Ardından, hücreler %10 FBS’li DMEM kullanılarak 6 kuyucuklu plakalara (5×10^5 hücre/kuyu) eşit sayıda hücre olacak şekilde ekildi ve bir gece süresince inkübe edildi. Ertesi gün,

besiyerinden arındırılan 6 kuyucuklu plakalardaki hücreler, 1X PBS ile iki kez yıkandı. Yıkama işleminden sonra, %0,1 (w/v) BSA içeren DMEM besiyeri 6 kuyucuklu plakalara eklendi ve hücreler 1 saat boyunca inkübe edildi. Kontrol grubundan farklı olarak diğer kuyulara 20 ng/mL son konsantrasyon olacak şekilde TGF- β sitokini uygulandı. Ardından 6 kuyucuklu plakalar tekrar inkübatöre yerleştirildi ve inkübasyon süresi sonunda (1., 3., 6., 24. ve 48. saatlerde) hücreler tripsinizasyon işlemi ile pellet haline getirildi. Bölüm 3.2.3.1'de belirtildiği gibi, hücre pelletlerinden innuPrep RNA izolasyon kitinin protokolüne uygun şekilde gerçekleştirildi. İzole edilen RNA örneklerinin miktarı ve saflığı, spektrofotometrik yöntemlerle belirlendi. Saf olarak elde edilen RNA örnekleri Bölüm 3.2.3.3'te bahsedildiği şekilde formaldehit agaroz jelde yürütülerek görüntülendi (*bk.* Şekil 4.2). Daha sonra, her bir örnekteki 1 μ g kalıp RNA kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirildi, bu adım Bölüm 3.2.3.4'te ayrıntılı olarak açıklanan protokole göre gerçekleştirildi. Elde edilen cDNA'ların kalitesi RT-PCR yöntemi ile Bölüm 3.2.3.5 bahsedildiği şekilde kontrol edildi (*bk.* Şekil 4.3).



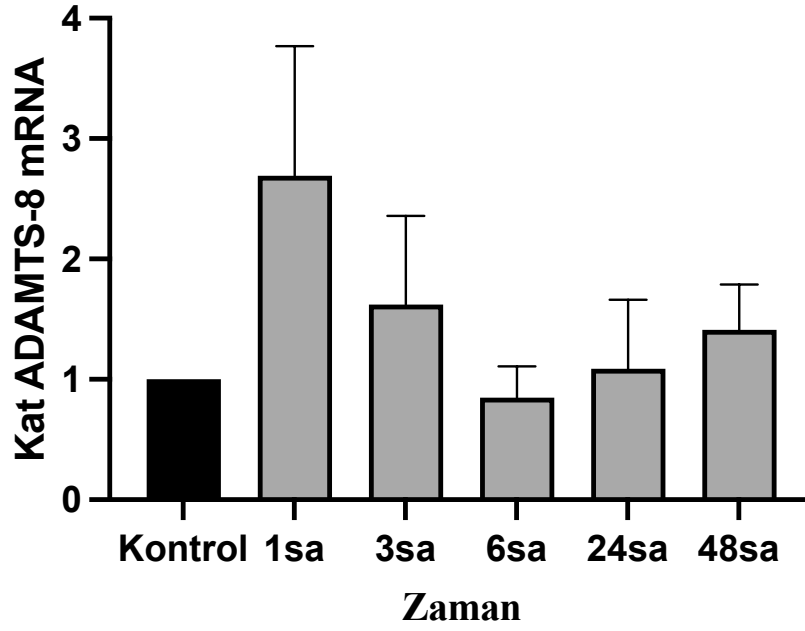
Şekil 4.2: SW480 hücrelerinde formaldehit agaroz jel elektroforezi görüntüsü.

TGF- β uygulanan deney ve kontrol gruplarına ait izole edilen RNA'lar gösterilmiştir: (1: Kontrol grubu RNA'sı; 2: 1 sa. TGF- β uygulanmış RNA, 3: 3 saat TGF- β uygulanmış RNA, 4: 6 sa. TGF- β uygulanmış RNA, 5: 24 sa. TGF- β uygulanmış RNA, 6: 48 sa. TGF- β uygulanmış RNA).



Şekil 4.3: Agaroz jel elektroforezi ile H β -2-M PCR'da cDNA kalite kontrolü

(M: 1 kb DNA belirteci. 1: Kontrol grubu, 2: 1 sa. grubu 3: 3 sa. grubu 4: 6 sa. grubu 5: 24 sa. grubu 6: 48 sa. grubu).



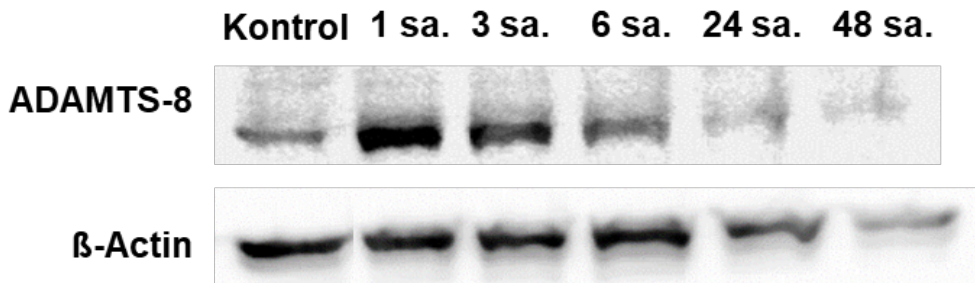
Şekil 4.4: 20 ng/mL TGF- β uygulanmış SW480 hücrelerinde ADAMTS-8'in mRNA ifadesindeki zamana bağlı etkisi.

Kaliteli şekilde cDNA elde edildikten sonra ADAMTS-8 mRNA düzeyindeki ifadesinin belirlenmesi için her bir cDNA örneği, 3 tekrarlı olarak, ADAMTS-8 ve H β -2-M geni ekspresyon primerleri (Tablo 3.11'de belirtilen) kullanılarak Real Time PCR ile analiz edildi. Elde edilen veriler, Livak yöntemi kullanılarak değerlendirildi [167]. Elde edilen Ct değerleri, GraphPad programında grafiklendirildi ve sonuçların istatistiksel analizi için one-

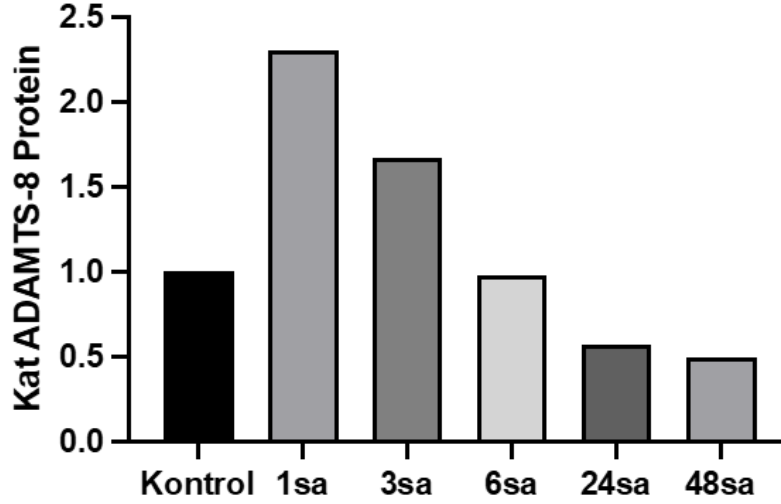
way ANOVA testi kullanılarak yapıldı. Analiz sonucunda, kontrol grubuyla kıyasladığında TGF- β uygulanmış SW480 hücrelerinde 6 saat dışında hem erken saatlerde hem de geç saatlerde mRNA ifadesinde artış gözlemlendi.

4.2.2 SW480 Hücrelerinde TGF- β Sitokininin ADAMTS-8 Protein Ekspresyonu Üzerindeki Etkisinin Western Blot ile Belirlenmesi

6 kuyucuklu plakalara 5×10^5 hücre/kuyu olacak şekilde hücreler paylaştırılarak Bölüm 3.2.2.7’de anlatıldığı şekilde sitokin deneyi kuruldu. Sonrasında Bölüm 3.2.4.2’de belirtildiği şekilde RIPA tamponu ile 1., 3., 6., 24., 48. saatlerin sonunda protein ekstraktları elde edildi. Elde edilen protein ekstraktları Bölüm 3.2.5.4’te belirtildiği şekilde SDS page’ye tabi tutuldu. Molekül büyüklüklerine göre ayrılan protein örnekleri Bölüm 3.2.4.5’te belirtildiği şekilde PDVF membrana transferi gerçekleştirildi. Daha sonra ADAMTS-8 proteinini tespit edebilmek için Bölüm 3.2.4.6 ‘da belirtildiği şekilde primer ve sekonder antikor ile muamele edildi. ECL Western substratı kullanılarak bantlar UVP sisteminde görüntülenip Şekil 4.5’te gösterildiği gibi fotoğraflandı. Görüntülenen bantlar β -aktin’le normalize edilmiş veriler GraphPad programında grafiklendirildi. Bu şekilde, ADAMTS-8 geninin ekspresyon seviyesinin β -aktin’e göre nasıl değiştiği ve gruplar arasındaki farkların değerlendirilmesi Şekil 4.6’da gösterildiği şekilde yapıldı. Bu değerlendirmeye göre, TGF- β ’nın ADAMTS-8 protein ifadesini arttırıcı yönde etki gösterdiği belirlendi. Bu artışın en fazla olduğu zaman diliminin 3. saat olduğu ve takip eden inkübasyon sürelerinde bu artışın zamana bağlı olarak azaldığı gözlemlendi (bk. Şekil 4.6)



Şekil 4.5: SW480 hücrelerinde 20 ng/mL TGF- β uygulanmış sitokin deneyi protein bantları.



Şekil 4.6: 20 ng/mL TGF- β uygulanmış SW480 hücrelerinde ADAMTS-8 protein düzeyinin zamana bağlı değişimi.

4.2.3 TGF- β Sitokininin *ADAMTS-8* Geninin Transkripsiyonel Aktivitesi Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi

ADAMTS-8 promotor parçalarının pMetLuc-Reporter vektörüne klonlanması 119Z101 numaralı TÜBİTAK projesi kapsamında gerçekleştirildi. SW480 hücrelerinde TGF- β 'nın mRNA ve protein düzeyindeki ifadesinde artışa sebep olduğu Şekil 4.4 mRNA düzeyinde ve Şekil 4.6'da protein düzeyinde belirlendi. TGF- β 'nın ADAMTS-8 promotor aktivitesine olan etkisinin belirlenmesi için Bölüm 3.2.5.1'de bahsedildiği şekilde kalsiyum fosfat metoduna uygun olacak şekilde geçici transfeksiyon çalışmaları gerçekleştirildi.

4.2.3.1 Geçici Transfeksiyonda Kalsiyum-Fosfat Presipitasyonu Metoduyla Salınan Lusiferaz ve Seap Sisteminin Optimizasyonu

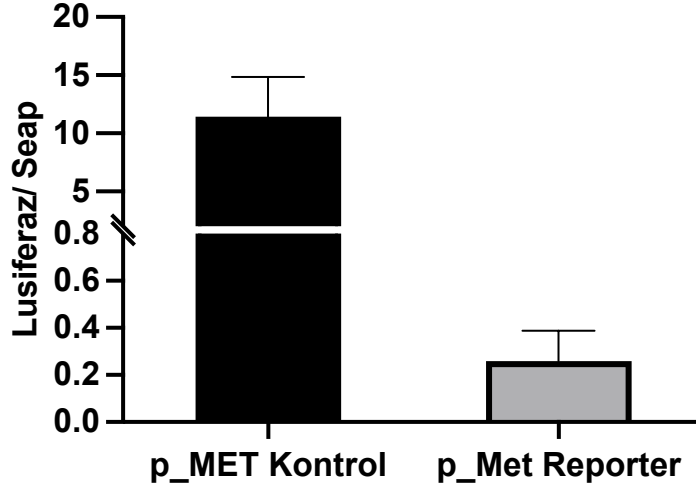
SW480 hücreleri 100 mm'lik kültür kabına 10^6 hücre olacak şekilde %10 FBS'li besiyeri ile birlikte paylaştırıldı. Hücrelerin tutunması için 37°C'de gece boyu inkübatöre kaldırıldı. İnkübe edilen hücrelere 1 μ g son konsantrasyon olacak şekilde pMetLuc-Reporter ve pMetLuc-Kontrol vektörleri, 0,5 μ g son konsantrasyon olacak şekilde pSeap2-kontrol vektörüyle birlikte Bölüm 3.2.5.1'de belirtildiği şekilde transfekte edildi. Transfekte edilen vektörler şu amaçla kullanıldı;

Viral promotör içeren pMetLuc-kontrol vektörü, sahip olduğu promotordan dolayı gen ifadesini yüksek düzeyde uyarır ve bu nedenle transfekte edilen hücrelerde yüksek Lusiferaz aktivitesi sağlar. Eğer transfeksiyon verimli ve etkiliyse, pMetLuc-kontrol vektöründe yüksek Lusiferaz aktivitesi gözlemlenir. Bu yüzden pozitif kontrol olarak kullanılır.

pMetLuc-Reporter vektörü ise gen ifadesi için herhangi bir spesifik promotör parçası taşımadığı için Lusiferaz aktivitesi vermesini beklemeyiz. Bu yüzden vektörün arka plan aktivitesi verip vermediğinin belirlenmesi için negatif kontrol amacıyla kullanılır.

pSeap2-kontrol vektörü, transfeksiyon sonucunda yüksek alkalen fosfataz aktivitesi sağlar. Bu vektör, transfeksiyon etkinliğinin ölçülmesi amacıyla kullanılır. Lusiferaz aktivitesi Seap aktivitesine oranlanarak relatif Lusiferaz aktivitesi hesaplanır.

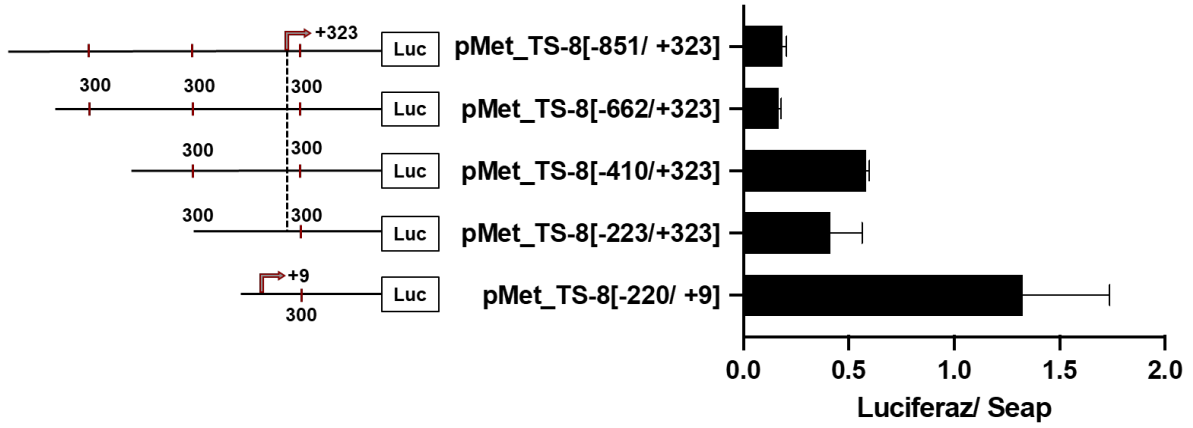
Çalışmada her bir deney grubu (pMetLuc-Kontrol ve pMetLuc-Reporter) en az üç tekrar olacak şekilde gerçekleştirildi. Transfeksiyondan 48 ve 72 saat sonra 50 µL medyum örneği alınarak Bölüm 3.2.5.2’de belirtildiği şekilde lusiferaz ve SEAP aktiviteleri luminometrede belirlendi. Seap ile normalize edilen Lusiferaz aktivitesi, Lusiferaz/Seap aktivitesi şeklinde optimize edildi ve GraphPad programı kullanılarak Şekil 4.7’de gösterildiği şekilde ve transfeksiyon etkinliğini grafiklendirildi. Analizi gerçekleştirilen sonuçlar doğrultusunda pozitif kontrolde (pMetLuc-kontrol) Lusiferaz ifadesi çok fazla iken negatif kontrol (pMetLuc-Reporter) beklediğimiz gibi arka plan göstermedi. SW480 hücrelerinde kalsiyum fosfat presipitasyonu metodunun etkin bir şekilde çalıştığı gösterildi.



Şekil 4.7: pMetLuc-Reporter ve pMetLuc-kontrol vektörleri aracılığıyla transfeksiyon etkinliğinin belirlenmesi.

4.2.3.2 *ADAMTS-8* Geni Promotor Parçalarının Bazal Aktivitelerinin Belirlenmesi

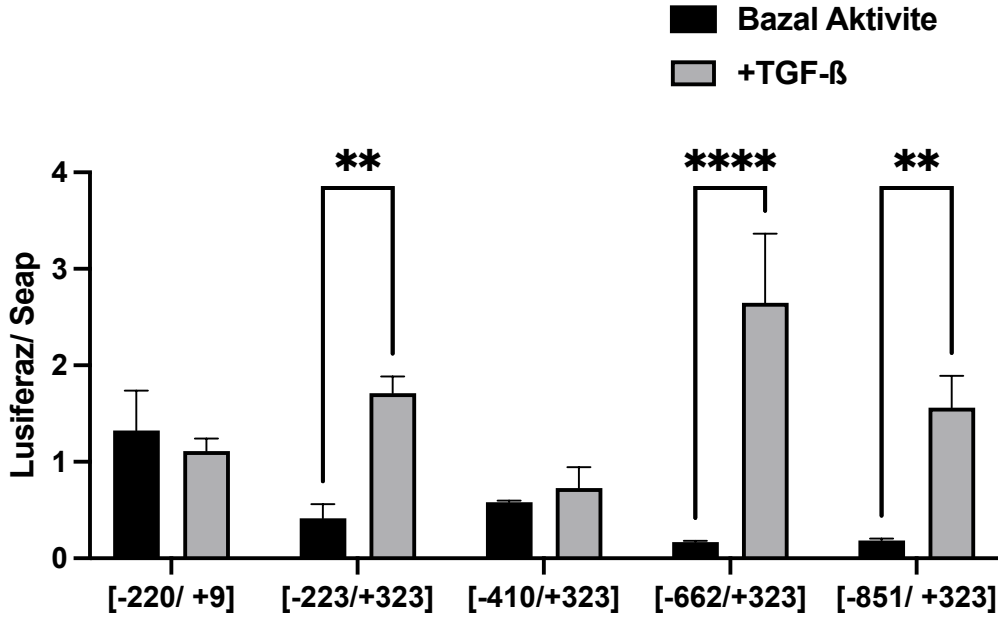
pMetLuc-Reporter vektörüne klonlanan pMET_TS-8[-223/+9], pMET_TS-8 [-226/+323], pMET_TS-8[-413/+323], pMET_TS-8[-665/+323] ve pMET_TS-8[-854/+323] promotor parçaları, SW480 hücrelerine Bölüm 3.2.5.1’de belirtildiği şekilde transfekte edildi. Daha sonra uygulama tekrar sayısını arttırmak amacıyla 96 kuyucuklu plakaya 3×10^4 hücre/kuyu olacak şekilde paylaştırıldı. Ardından transfeksiyonun 48. ve 72. saatlerinin sonunda 50 μ L olacak şekilde medyum çekildi. Bölüm 3.2.5.2’de belirtildiği şekilde medyuma salınan Lusiferaz ve Seap etkinliği belirlendi. Elde edilen değerler Lusiferaz/Seap olacak şekilde GraphPad programında analiz edildi. Şekil 4.8’de verilen grafiğe göre *ADAMTS-8* geninin promotor parçalarının hepsinin promotor aktivitesine sahip olduğu belirlendi. En yüksek promotor aktivitesi pMet_TS-8[-220/+9], sonrasında pMet_TS-8[-410/+323] ve sırasıyla pMet_TS-8[-223/+323], pMet_TS-8[-851/+323] ve pMet_TS-8[-662/+323] şeklindedir.



Şekil 4.8: Karşılaştırmalı olarak verilen ADAMTS-8 geninin promotor parçalarının bazal aktiviteleri

4.2.3.3 TGF- β Sitokininin ADAMTS-8 Bazal Promotor Aktivitesine Olan Etkisinin Belirlenmesi

SW480 hücrelerine Bölüm 3.2.5.1’de belirtildiği şekilde beş farklı promotor parçası ayrı ayrı petrielerde transfekte edildi. Transfeksiyon işleminin ertesi gününde transfekte olmuş hücreler kaldırılıp 96 plakalı kuyulara 30×10^3 hücre olacak şekilde en az 4 tekrarlı olarak paylaştırıldı. TGF- β sitokini, her bir tekrarın olduğu kuyuya 20 ng/mL konsantrasyonda uygulandı. Transfeksiyonun 48. kadar inkübe edildi. İnkübasyon süresinin her birinin sonunda 50 μ L olacak şekilde besiyeri örneği alındı. Lusiferaz ve Seap aktiviteleri, yöntem olarak Bölüm 3.2.5.2’de belirtilen şekilde ölçüldü. 48 saatte lusiferaz ve SEAP sonuçları belirlendi. Ölçüm sonuçları Seap ile normalize edildi ve sonuçlar GraphPad’de analizi yapıldı. Analiz sonucunda Şekil 4.9’da gösterilen grafik çizildi. Bu sonuca göre pMET_TS-8[-223/+9], pMET_TS-8[-226/+323], pMET_TS-8[-413/+323], pMET_TS-8[-665/+323] ve pMET_TS-8[-854/+323] promotor parçalarının aktivitesinin regülasyonunda farklılık gözlemlendi. SW480 hücrelerine transfekte edilen ADAMTS-8 promotor parçalarına TGF- β uygulamasıyla, pMET_TS-8[-223/+9], pMET_TS-8[-665/+323] ve pMET_TS-8[-854/+323] promotor parçalarının aktivitelerinde istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde arttırıcı yönde etki gösterdiği belirlendi. pMET_TS-8[-413/+323] promotor parçasının aktivitesini önemli düzeyde artışına yol açarken pMET_TS-8[-223/+9] promotor parçasının aktivitesi üzerinde herhangi bir etkiye sahip olmadığı belirlendi.



Şekil 4.9: TGF-β Sitokininin ADAMTS-8 promotor aktivitesine olan etkisini gösteren grafik.

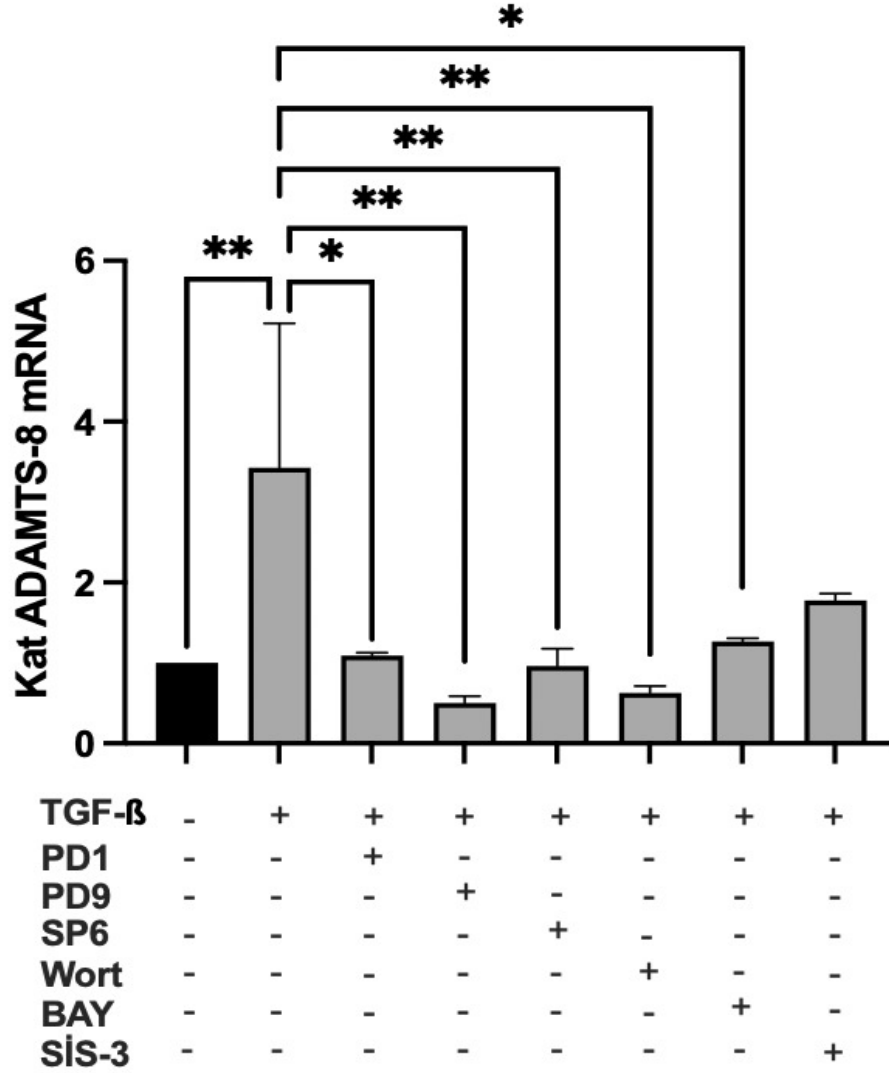
4.3 ADAMTS-8 Geninin Ekspresyonunda TGF-β Sitokin Cevabından Sorumlu Olan Hücre İçi Yolakların Belirlenmesi

4.3.1 mRNA Düzeyinde Yolak İnhibisyon Çalışmaları

TGF-β sitokininin ADAMTS-8 mRNA düzeyine olan indükleyici etkisini hücre içinde hangi sinyal iletim yollarını kullanarak gösterdiğinin belirlenmesi amacıyla Bölüm 3.2.2.7'de açıklandığı şekilde yolak inhibisyon çalışmaları yapıldı. Bu çalışmada hücre içi sinyal yolak inhibitörleri kullanıldı. PD169316 (p38 MAPK inh.), PD98059 (MEK inh.), SP600125 (JNK inh.), Wortmannin (PI3K inh.) ve SIS3 (SMAD3 inh.) gibi inhibitörler sitokin uygulamasından 45 dk önce sitokin açlığı oluşturulan hücrelere uygulanarak sonrasında TGF β sitokini ile birlikte 6 saat boyunca inkübe edildi. Hücrelerin toplanması için tripsinizasyon yöntemi kullanılarak hücre pelletleri elde edildi.

Hücre pelletlerinden RNA izolasyonu, Bölüm 3.2.3.1'deki protokole uygun olarak gerçekleştirildi. RNA'nın miktarı ve saflığı, Bölüm 3.2.3.2'de belirtilen yöntemler kullanılarak tayin edildi. Ardından, Bölüm 3.2.3.4'teki protokol doğrultusunda cDNA sentezi gerçekleştirildi. Elde edilen cDNA'lar, Hβ-2 geni primerleri kullanılarak kontrol edildi. Sonrasında ADAMTS-8 mRNA düzeyi Bölüm 3.2.3.8'de anlatılan gerçek zamanlı

PCR (Real Time PCR) yöntemiyle analiz edildi. Her bir örneğin cDNA'sı, ADAMTS-8 ve H β -2-M geni ekspresyon primerleriyle (Tablo 3.11'de belirtilen) birlikte 3 tekrarlı olarak çalışıldı. Elde edilen veriler, Bölüm 3.2.3.8'de açıklanan Livak yöntemi kullanılarak değerlendirildi [167]. Ardından GraphPad programı kullanılarak sonuçlar grafiklendirildi. İstatistiksel analizler için one-way ANOVA testi kullanıldı. Sadece TGF- β uygulanan hücrelerde, ADAMTS-8 mRNA düzeyinin kontrol grubuna kıyasla 6 saat inkübasyon süresi sonucunda arttığı daha önceki basamaklarda yapılan çalışmalardakine benzer şekilde belirlendi. p38 MAPK, MEK, JNK, PI3K, SMAD-3 yollarına özgün inhibitörler uygulanan gruplarda ADAMTS-8 mRNA düzeyinde gözlenen artışın korunmadığı bu sebeple TGF- β 'in ADAMTS-8 mRNA düzeyindeki artışı adı geçen hücre içi yolları kullanarak sağladığı belirlendi.

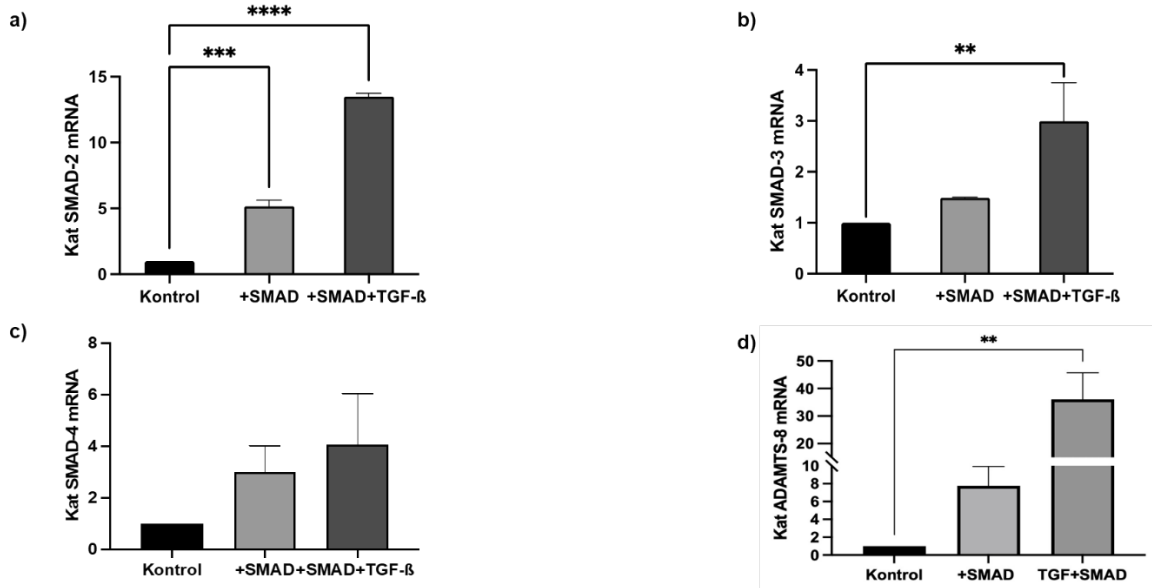


Şekil 4.10: Yolak İnhibitörlerinin ADAMTS-8 mRNA düzeyine olan etkisini gösteren grafik

4.3.1.1 TGF-β'nın, ADAMTS-8 İndüksiyonunda SMAD Bağımlılığının mRNA düzeyinde Belirlenmesi

SMAD-2, SMAD-3 ve SMAD-4 transripsiyon faktörlerinin Bölüm 3.2.5.1'de belirtildiği şekilde SW480 hücrelerine transfeksiyonu yapıldı. Transfeksiyondan 24 saat sonra %0,1'lik BSA medyumuna alındı (Kontrol, SMAD over ekspre edilmiş grup ve SMAD overekspre olmuş gruba TGF-β uygulanmış hücrelerden). BSA'lı medyumda bir saat inkübe edilip SMAD overekspre olmuş grubun bir tanesine 20 ng/mL olacak şekilde TGF-β uygulandı. Sitokinle 24 saat muamele edilip tripsinizasyon yöntemi ile Bölüm 3.2.3.1'de ifade edildiği yöntem ile kit aracılığıyla saf şekilde RNA elde edildi. Elde edilen RNA'lardan Bölüm

3.2.3.4'te anlatıldığı şekilde cDNA sentezi yapıldıktan sonra Bölüm 3.2.3.8'da belirtildiği şekilde ADAMTS-8, SMAD-2, SMAD-3, SMAD-4 genlerine spesifik primerler kullanılarak Real Time PCR kuruldu (Tablo 3.14'te belirtilen). Ct değerleri Bölüm 3.2.3.8'de anlatıldığı şekilde Livak metodu ile analiz edilip GraphPad programı ile istatistiksel analizleri yapılarak grafikler oluşturuldu [167]. SW480 hücrelerinde Şekil 4.11 a, b, c'de gösterildiği şekilde, SMAD-2, SAMD-3 ve SMAD-4 over ekspresyonunun TGF- β uygulandığında mRNA düzeyinde arttığı gözükmektedir. SMAD-2, -3, -4 over ekspresyonuna ek olarak TGF- β uygulamasının ADAMTS-8 mRNA ifadesinde ise ciddi bir artışa yol açtığı belirlendi (Şekil 4.11 d). Bu artış ADAMTS-8'in SMAD bağımlı yolu kullana bileceğini düşündürmektedir.

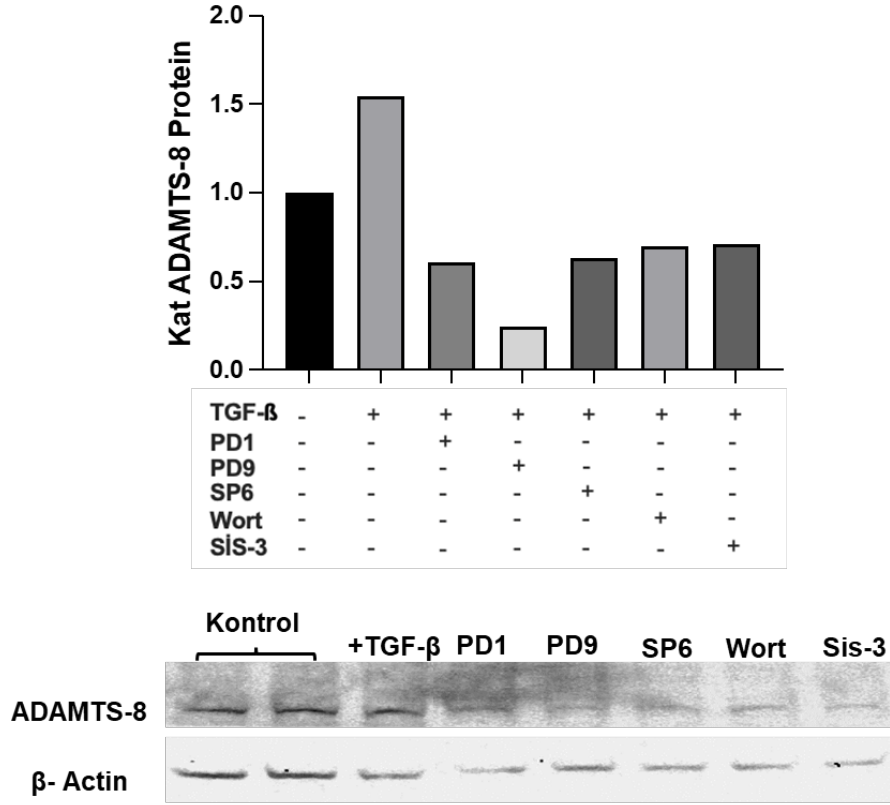


Şekil 4.11: TGF- β sitümlasyonunda, ADAMTS-8 geninin SMAD Bağımlılığının mRNA düzeyinde belirlenmesi.

4.3.2 Protein Düzeyinde Yolak İnhibisyon Çalışmaları

Yolak inhibitör deneyleri Bölüm 3.2.2.7'de belirtildiği şekilde kuruldu. Öncelikle %0,1 BSA'ya alınan SW480 hücreleri 1 saat inkübe edildi. Ardından, PD169316 (p38 MAPK inh.), PD98059 (MEK inh.), SP600125 (JNK inh.), wortmannin (PI3K inh.) ve SIS3 (SMAD3 inh.) inhibitörlerine 45 dakika süreyle 37°C'de %0,5 CO₂ içeren inkübatöre kaldırıldı. İnkübasyon süresinin sonunda TGF- β uygulanarak 6 saat inkübe edilip bu sürenin sonunda Bölüm 3.2.4.2.'de belirtildiği şekilde protein ekstraktları alındı. Protein ekstraktları

Bölüm 3.2.4.3'de belirtildiği formül ile miktarı belirlenerek 30 µg olacak şekilde eşit miktarda SDS jeline yüklendi. SDS jeli 80 V'da serbest mA'da 2,5-3 saat süresince yürütülerek proteinlerin büyüklüklerine göre ayrılması sağlandı. Bu işlemin ardından proteinler Bölüm 3.2.4.5'te belirtildiği şekilde ıslak transfere maruz bırakıldı. Transfer işlemi gerçekleşen proteinler PVDF membranında non-spesifik bağlanmaları önlemek için Bölüm 3.2.4.6'da belirtildiği şekilde bloklandı ve ardından ADAMTS-8 antikoru (1:500, mouse) ve normalizasyon amacıyla β-aktin (1:5000, mouse) antikorlarıyla muamele edildi. Daha sonra 1:10000 oranında sulandırılmış anti-mouse ikincil antikoru ile işaretlendi. İşaretlenen proteinler ECL Western substratı ile kemilüminesans ışına ile UVP sisteminde görüntülenip GraphPad programı ile analiz edildi. Sadece TGF-β uygulanan hücrelerde, ADAMTS-8 protein düzeyinde daha önceki bölümlerde gerçekleştirilen sitokin stimülasyonunda elde edilen sonuçları doğrular nitelikte bir artış gözlemlendi (Şekil 4.6). p38 MAPK, MEK, JNK, PI3K, SMAD-3 yolaklarına özgün inhibitörler uygulandığında gruplarda ADMATS-8 protein düzeyindeki artışın korunmadığı bu sebeple TGF-β'nin ADAMTS-8 protein düzeyindeki artışı adı geçen hücre içi yolakları kullanarak sağladığı belirlendi.

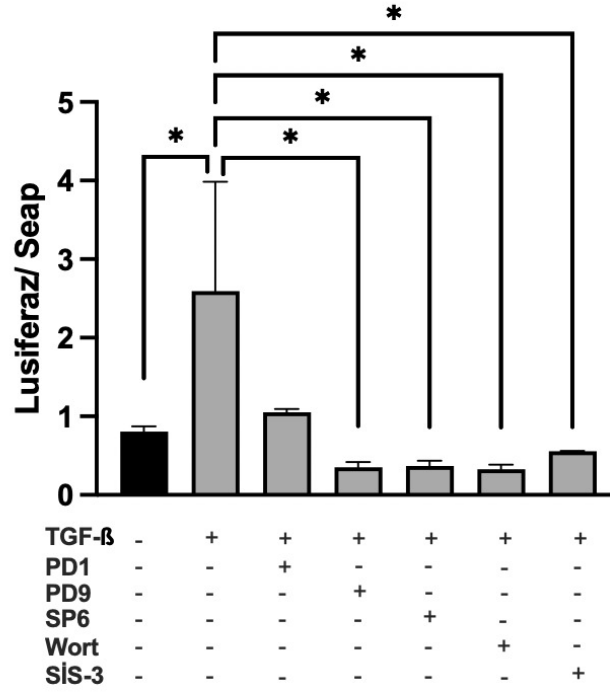


Şekil 4.12: Yolak İnhibitörlerinin ADAMTS-8 protein düzeyine olan etkisini gösteren grafik

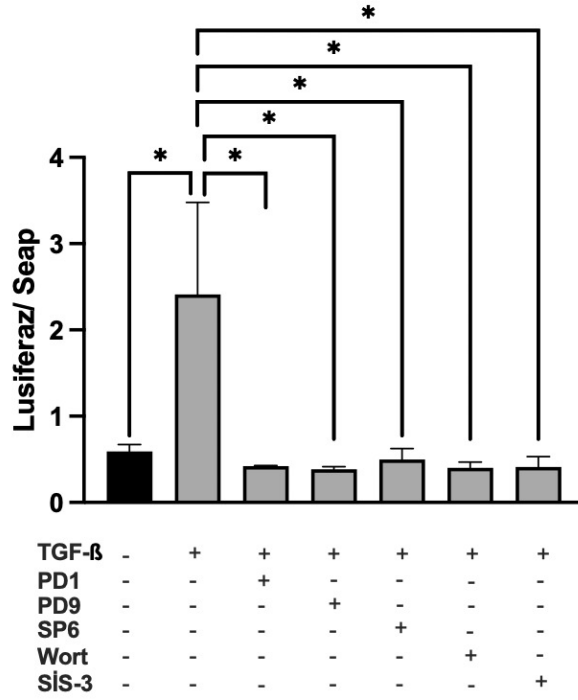
4.3.3 TGF-β Sitokini ve Yolak İnhibitörlerinin ADAMTS-8 Promotor Aktivitesine Olan Etkisinin Belirlenmesi

ADAMTS-8 geni promotorlarının TGF-β sitokini ile muamelesi sonucunda aktivitesinin arttığı Şekil 4.9’da gösterildi. Bu TGF-β’nın ADAMTS-8 promotor aktivitesine olan arttırıcı etkisini hücre içinde hangi yolakları kullanarak gösterdiğini belirlemek amacıyla istatistiksel olarak anlamlı artışın gözlemlendiği pMET_TS-8[-223/+323], pMET_TS-8[-662/+323] ve pMET_TS-8[-851/+323] promotor parçaları Bölüm 3.2.5.1’de belirtildiği şekilde SW480 hücrelerine geçici transfeksiyon yöntemi ile aktarıldı. Ertesi gün 96 kuyulu plakalara 30×10^3 hücre/kuyu olacak şekilde paylaştırıldı. Tutunan hücreler %0,1’lik BSA’lı DMEM’e alındı. 1 saat serum açlığında bırakılan hücrelere PD169316 (p38 MAPK inh.), PD98059 (MEK inh.), SP600125 (JNK inh.), wortmannin (PI3K inh.) ve SIS3 (SMAD3 inh.) inhibitörleri uygulandı. 45 dk süresince inkübe edildikten sonra 20 ng/mL TGF-β sitokini uygulanıp 6 saat süreyle inkübe edildi. Bir kısım hücrelere ise sadece TGF-β sitokini uygulandı. İnkübasyonun ardından 50 µL besiyeri ortamından medyum alındı. Bölüm 3.2.6.2’de belirtildiği şekilde Lusiferaz ve Seap aktiviteleri ölçüldü. Elde edilen ölçüm sonuçları, Seap

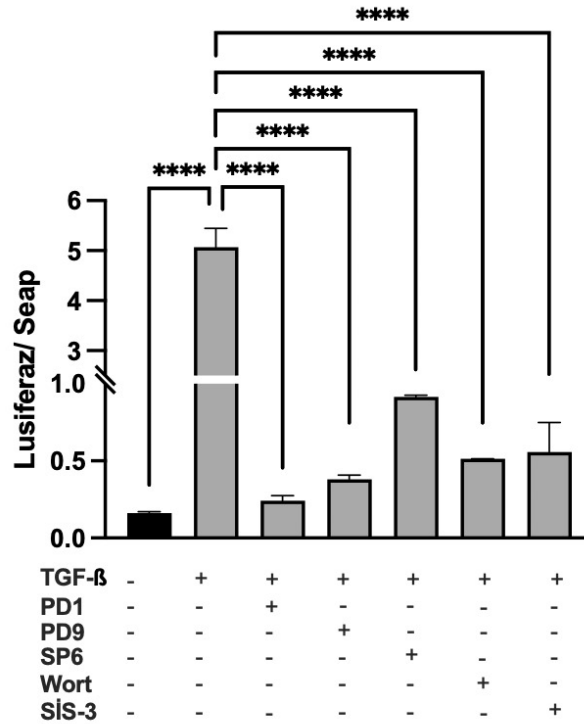
kullanılarak normalize edildi ve bu normalizasyon sonuçları GraphPad yazılımı kullanılarak analiz edildi. Şekil 4.13, Şekil 4.14 ve Şekil 4.15'te ADAMTS-8'in her üç promotor parçası için de pMET_TS-8[-223/+323], pMET_TS-8[-662/+323] ve pMET_TS-8[-851/+323]). p38 MAPK, MEK, JNK, PI3K, SMAD-3 yollarını kullanarak ADAMTS-8 transkripsiyonel aktivitesinde indükleyici etki gösterdiği belirlendi.



Şekil 4.13: pMET_TS-8[-223/+323] promotor parçasının TGF-β sitokini ile regülasyonunda kullandığı yollar



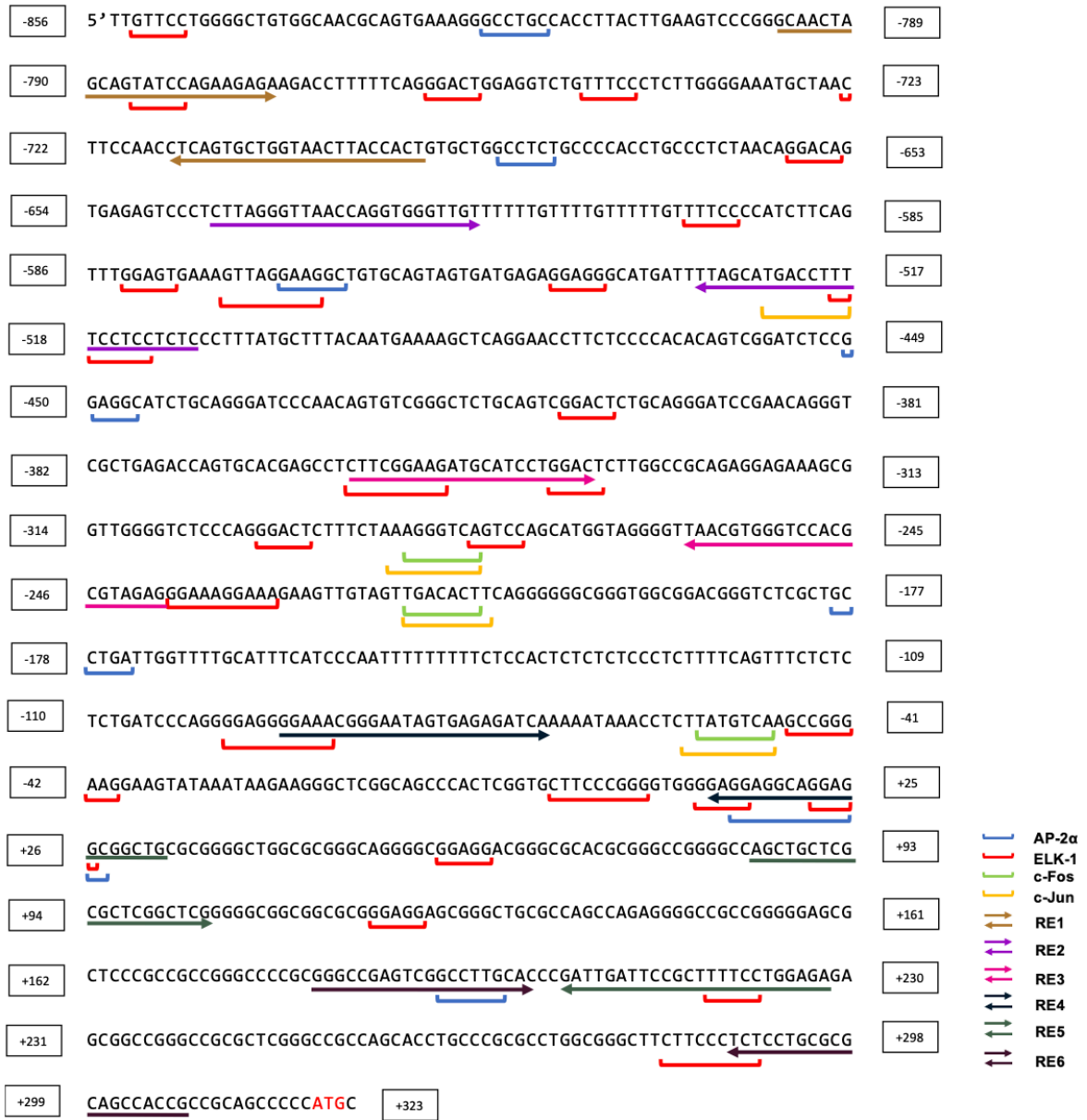
Şekil 4.14: pMET_TS-8 [-662/+323] promotor parçasının TGF-β sitokini ile regülasyonunda kullandığı yolaklar



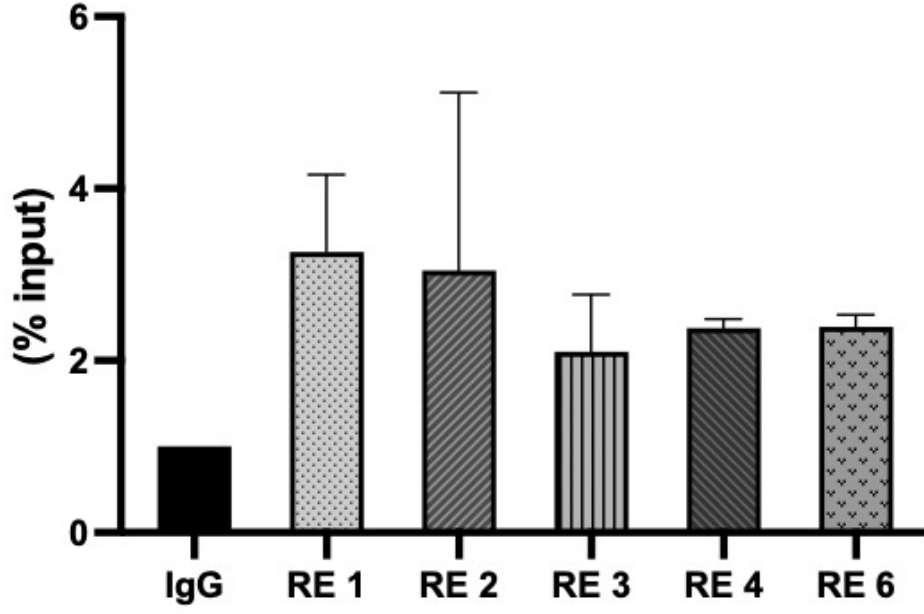
Şekil 4.15: pMET_TS-8[-851/+323] promotor parçasının TGF-β sitokini ile regülasyonunda kullandığı yolaklar.

4.3.4 TGF- β Sitokininin Aktive Ettiği ADAMTS-8 Promotoruna Bağlanan SMAD2/3 Transkripsiyon Faktörlerinin ChIP Analizi ile Belirlenmesi

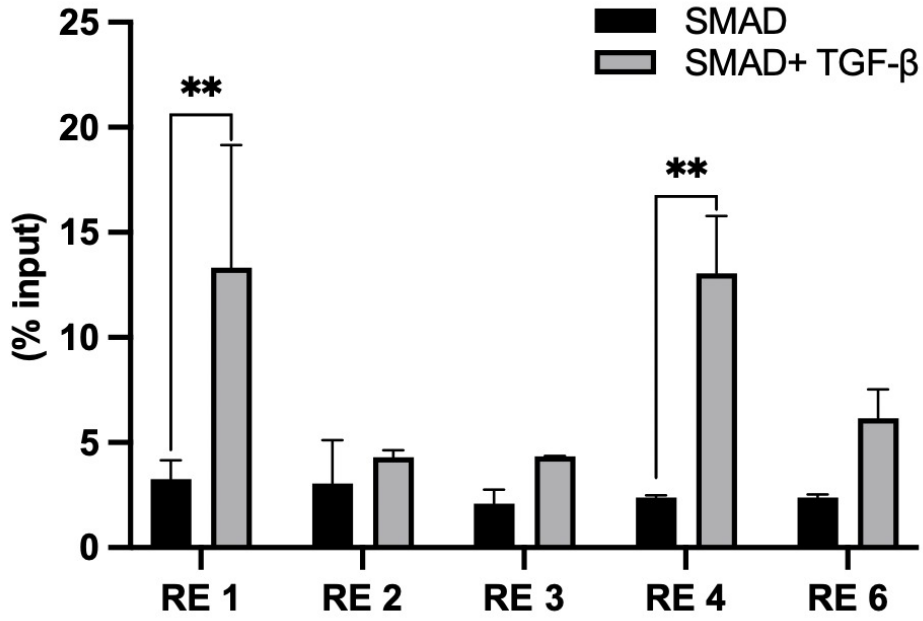
ADAMTS-8 promotorunda SMAD transkripsiyon faktörünün muhtemel bağlanma bölgelerini belirleye bilmek için ChIP analizi Bölüm 3.2.6'da belirtilen alt basamaklar kullanılarak gerçekleştirildi. Bu deney için bir gruba sadece SMAD-2, -3 ve -4 over ekspres edildi. Diğer gruba ise SMAD-2, -3, -4 over ekspres olan SW480 hücrelerine 20 ng/mL TGF- β uygulandı. ChIP'e hazır hale gelen iki grup $\sim 10^6$ SW480 hücresi, öncelikle Bölüm 3.2.6.1'de bahsedildiği şekilde fiksasyona maruz bırakıldı. Sonrasında sonikasyon ile hücre lizati Bölüm 3.2.6.2'de bahsedildiği şekilde elde edildi. Elde edilen hücre lizatları ile SMAD2/3 antikoruna ile immünopresipitasyon işlemi gerçekleştirildi. Oluşan protein/DNA kompleksinin ayrıştırılması için Bölüm 3.2.6.4'te bahsedildiği şekilde elüsyon alındı. Ardından Bölüm 3.2.8.5'te bahsedildiği şekilde kolon sistemi kullanılarak DNA saf halde elde edildi. ChIP sonucunda elde edilen DNA örnekleri, Bölüm 3.2.3.8'de belirtilen prosedür doğrultusunda Real Time PCR ile analiz edildi. Elde edilen Ct değerleri % 10 inputa göre normalize edildi. IgG uygulanan negatif kontrole göre kat alınarak GraphPad programında analizi gerçekleştirildi. Bunun sonucunda SMAD over ekspres olmuş SW480 hücrelerinde cevap element (RE) dediğimiz ADAMTS-8 promotor parçalarında istatistiksel olarak bağlanmanın bulunduğu bölgeler RE1 ve RE2 olarak bulunmuştur (*bk.* Şekil 4.16). Bu sonuçlar doğrultusunda SMAD over ekspres olan SW480 hücrelerinde 20 ng/mL TGF- β sitokini uygulanmış ADAMTS-8 promotor cevap elementlerinin her birinde SMAD-2/3 antikoruna ile immüno çökelme gözlemlendi. Bu çökelme TGF- β uygulamasıyla birlikte özellikle RE1 ve RE4 promotor bölgelerinde cevap elementinde istatistiksel olarak anlamlı şekilde gerçekleştiği gözlemlendi (*bk.* Şekil 4.17). Bu sonuçlar bize SMAD-2, -3 ve -4'ün ADAMTS-8 promotorunda RE1 ve RE4'te bağlanma bölgelerinin olabileceğini düşündürmektedir.



Şekil 4.16: ADAMTS-8 [-856/+323] promotörü üzerinde bulunan TGF-B ile ilişkili transkripsiyon faktörlerinin muhtemel bağlanma bölgeleri.



Şekil 4.17: SMAD over ekspresyonu sonucu SMAD2/3 antikorunu ile SMAD-2,-3 ve -4'ün immüno-çökeltme yeteneğinin grafiği.



Şekil 4.18: Smad2/3 antikorunun SMAD-2, -3 ve -4 over ekspresyonu ile TGF-β'ya bağlı immüno-çökeltme yeteneğinin grafiği.

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Kolorektal kanser gelişimi, tümör baskılayıcı genlerin baskılanmasını ve onkogenlerin aktivasyonunu içeren kademeli bir mutasyon birikimi ile ilişkilidir [168]. KKR'nin gelişimi ve ilerlemesinde farklı moleküler mekanizmalar rol oynamaktadır. Kolorektal kanser ile ilişkilendirilmiş olan EGFR/MAPK, Notch, PI3K, TGF- β ve Wnt sinyal yolları, normal şartlarda hücre farklılaşması, proliferasyonu, anjiyogenez, hayatta kalma ve apoptoz dahil olmak üzere çeşitli biyolojik süreçlerin düzenlenmesinde rol oynamaktadır [169]. Fakat KKR'lı hücrelerde, EGFR/MAPK, Notch, PI3K, TGF- β ve Wnt sinyal yollarıyla ilişkili olarak, hücre proliferasyonunda, invazyonda ve apoptoz inhibisyonunda artışa neden olan genler belirlenmiştir. Bu genler arasında EGFR, RAS, RAF, Notch-1, Jagged-1, PIK3CA, PTEN, TGF-B R2, TGF-B R1, SMAD'lar, AXIN ve CTNNB1 bulunmaktadır [170].

TGF- β sinyali, hem pro- hem de anti-onkojenik etkiler sergilemektedir. Kanser hücreleri ve mikroçevreleri, TGF- β 'nın parakrin ve otokrin etkileri aracılığıyla modüle edilmektedir [171]. TGF- β sinyal yolunda meydana gelen mutasyonlar, TGF- β 'nın hücre büyümesini kontrol etme ve apoptozu sağlama işlevlerini bozmaktadır [172]. Özellikle, SMAD proteinlerindeki mutasyonlar kolorektal kanser hücrelerinde sıkça görülmektedir. SMAD-4 delesyonu EMT'yi teşvik ederek kemoterapiye yanıtta olumsuz bir etki gösterirken, SMAD-7 delesyonu ise kolorektal kanserli hastalarda daha iyi bir prognoz ile ilişkilendirilmiştir. SMAD-7 mutasyonu ayrıca karaciğer metastazını arttırmaktadır [173]. Ayrıca, SMAD-4 mutasyonları kolorektal kanserli hastalarda sıkça görülmektedir ve SMAD-4 fonksiyon kaybı, ilerlemiş karsinoma ve TGF- β tarafından uyarılan ERK sinyal yolunun aşırı aktivasyonuna yol açmaktadır [174]. Ayrıca TGF- β reseptörlerinde meydana gelen mutasyonlarda KKR'yı tetiklemektedir. Örneğin, kolorektal kanserin ilerlemesinde TGF- β 1'in rolünü desteklemek adına, TGF- β 1'in ve reseptörü olan TGF- β R||'in aşırı ifadesinin, kolorektal kanserli hastalarda SMAD-4 ile SMAD-7'nin aktive edilmesiyle kolorektal kanser gelişimini tetiklediği gösterilmiştir [175].

ADAMTS'ler, salgılanan, hücreler arası matrisle ilişkili çinko metalloendopeptidazlardır. Bu enzimler, enflamasyon, doku morfogenezi, vasküler biyoloji ve patofizyolojik yeniden modellemede çeşitli rollere sahiptir [116]. ADAMTS protein ailesi, hücre zarı birleşmesi, sitokin ve büyüme kontrolü gibi işlevlerde rol oynar. Ek olarak, kanserde yayılma, kök hücre

benzeri özelliklerin artışı ve metastaz gibi mekanizmaları destekleyen epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) ile ilişkilendirilmiştir [176, 177]. Memeli genomları, 1'den 20'ye kadar numaralandırılmış 19 adet ADAMTS geni içerir [127]. ADAMTS proteinleri, çeşitli kökenlere sahip tümörlerde ekspresyon düzeylerinin değiştiği tespit edildiği için kanserle ilişkilendirilmiştir [178]. ADAMTS'ler, bazı kanser türleri için potansiyel prognostik değerlere sahiptir ve kanserin ilerlemesini modüle ettiği gösterilmiştir [179].

ADAMTS-8, ADAMTS ailesine ait bir proteazdır. ADAMTS-8, özellikle ekstraselüler matriksin düzenlenmesinde görev alır [180]. Bu protein, birçok hücrel olayda rol oynayan çeşitli substratları parçalayabilen bir metalloproteinazdır. ADAMTS-8'in çeşitli patolojik süreçlerde ve hastalıklarda rol aldığına dair kanıtlar bulunmaktadır. Örneğin, ADAMTS-8'in kanser metastazında, eklem hastalıklarında ve kardiyovasküler hastalıklarda etkili olduğu gösterilmiştir [181-183]. ADAMTS-8'in inhibitörleri veya aktivatörleri, bu proteinin işlevini düzenleyerek potansiyel terapötik hedefler haline gelebilir.

ADAMTS-8 ve diğer ADAMTS proteazları, hücre ve doku düzeyindeki biyolojik süreçlerin anlaşılmasında önemli bir araştırma alanı olmuştur. Araştırmalar, ADAMTS-8'in substrat özelliklerini, aktivasyon mekanizmalarını, düzenleyici faktörlerini ve rolünü daha iyi anlamak için devam etmektedir. Bu çalışmalar, ADAMTS-8'in fizyolojik ve patolojik süreçlerdeki rolünü aydınlatarak potansiyel terapötik hedeflerin belirlenmesine katkıda bulunabilir.

TGF- β , güçlü bir hücre proliferasyon inhibitörüdür ve bir tümör baskılayıcı görevi görür. Bununla birlikte, tümör hücrelerinde TGF- β , anti-proliferatif yanıtı kaybeder ve onkojenik bir faktör haline gelir [184]. TGF- β ailesi sinyali, esas olarak TGF- β konsantrasyonuna ve hücre tipine bağlı olarak hem proliferatif hem de anti-proliferatif tepkiler gösterebilir [185, 186]. Genel olarak, literatür bilgileri SW480 hücrelerinde TGF- β 'nın MTT analizi üzerindeki etkisi hakkında sınırlı bilgi sağlar. Zhu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 2 KRK hücre hattı olan HT-29 ve SW480 hücrelerinde farklı TGF- β konsantrasyonunda uygulanmıştır (1, 5, 10 ve 15 ng/mL). Farklı konsantrasyonlarda doz uygulaması sonucunda SW480 hücrelerinde istatistiksel olarak canlılığı değişmezken HT-29 hücrelerinde %10 oranında canlılıkta azalış olduğu bulunmuştur [187]. Bu bulgular hala belirsizliğini koruduğu için tez kapsamında SW480 hücrelerindeki TGF- β 'nın zamana bağlı olarak sitotoksik etkisini belirlemek için farklı dozlarda (10, 20 ve 40 ng/mL) TGF- β sitokini

uygulayarak MTT analizi gerçekleştirildi. Zhu ve arkadaşlarının bulmuş olduğu gibi SW480 hücrelerinde TGF- β 'nin proliferatif etkisi 10 ng/mL'de tüm saat dilimlerinde anlamlı olmazken Şekil 4.1'de gösterildiği gibi 20 ng/mL'lik dozun SW480 hücrelerinde hücre proliferasyonunu istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırdığı belirlenmiştir. Doz belirlemesi gerçekleştirilmesiyle birlikte sitokin deneyleri gerçekleştirilmiştir.

Birçok ADAMTS geni, sitokinler, büyüme faktörleri, hormonlar ve inflamatuvar mediatörler tarafından transkripsiyonel olarak düzenlenir. Örneğin, IL-1 β ve TNF- α 'nın OUMS-27 hücrelerine ve insan kondrosit hücrelerine uygulanmasını takiben ADAMTS-1, -4, -5, -8 ve -9 genlerinin mRNA seviyelerinde değişikliğe sebep olmuştur [188]. Farklı bir çalışmada ise TGF- β 1, stromal hücrelerde ADAMTS-1, -5, -9 ve -15 genlerinin transkripsiyonunu baskılayıcı bir etkiye sahiptir. Bu genlerin mRNA seviyeleri, TGF- β 1'nin uygulanmasıyla azalmıştır. Bununla birlikte, ADAMTS-4 geninin transkripsiyon seviyesi TGF- β 1 uygulamasıyla artmıştır [165]. Badshah ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ADAMTS-8 geninin aşırı ifadesi lentigo maligna (LM) fenotipini etkileyen bir faktör olabileceği ve TGF- β 1 sinyal yollarıyla ilişkili olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, TGF- β 1'e yanıt olarak miofibroblast farklılaşmasının azalmasıyla ilişkili olarak ADAMTS-8'in miofibroblast belirteçlerini indükleyebileceği belirtilmektedir [189]. ADAMTS-8'in TGF- β ile regülasyonu ile ilgili çalışmalar mevcut olsa da hala tam olarak aydınlatılamamıştır ve kolorektal kanserdeki regülasyonu üzerine herhangi bir çalışma mevcut değildir. Bu amaçla tez çalışması kapsamında, TGF- β sitokininin ADAMTS-8 geninin mRNA düzeyindeki ifadesi Real Time PCR çalışması ile belirlenmiştir. Bu çalışmanın sonucunda 6 saat dışında hem erken saatlerde hem de geç saatlerde mRNA ifadesinde artış gözlemlenmiştir. Bu bulguya paralel şekilde protein düzeyinde, TGF- β sitokininin SW480 hücrelerinde tüm saat dilimlerinde artış olduğu gözlemlenmiştir. Bu artışın en fazla olduğu zaman diliminin 3. Saat olduğu ve bu saat sonunda hızlı artışın zaman bağı olarak azaldığı gözlemlenmiştir. Protein düzeyindeki artış Western Blot yöntemi ile gözlemlenmiş olup ADAMTS-8 geni β -Aktin geni ile normalize edilerek hesaplanmıştır.

Choi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, ADAMTS-8'in normal dokularda geniş ölçüde eksprese edildiğini ancak nazofaringeal, özofagus skuamöz hücreli, mide ve kolorektal kansinomlar dahil olmak üzere yaygın kansinom hücre dizilerinde promotor metilasyonu ile sıklıkla az ifade edildiğini veya susturulduğunu bulunmuştur. Bu az ifadenin sonucu olarak, EGFR-MEK-ERK sinyal yolu aşırı aktive olabilir [141]. Bu bilgi kanserde tümör süpresör

olarak görev aldığı düşünölen ADAMTS-8 geninin rolünü anlamak için önemli bir adımdır. Bu bilgiler ışığında TGF- β ile uyarılan ADAMTS-8 geninin SW480 hücrelerindeki ifadesindeki artışın hangi hücre içi yol/yolları kullanarak regöle ettiğini bulabilmek için inhibisyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmaların sonucunda mRNA düzeyindeki regölasyonunda. p38 MAPK, MEK, JNK, PI3K, SMAD-3 yollarını kullanarak gerçekleştiiği bulunmuştur. TGF- β sitokininin SMAD bağımlılığını araştırmak için SW480 hücrelerinde ADAMTS-8 geninin mRNA ekspresyonu Real Time PCR ile belirlenmiştir. Bu verilerin ışığında SMAD-2, -3, -4 over ekspresyonu başarılı şekilde gerçekleşmiştir. SMAD over ekspre olan hücrelere TGF- β uygulandığında SMAD-2 ve SMAD-3 ve SMAD-4 ifadesinde artış olurken ADAMTS-8 ifadesinde önemli düzeyde artış olduğu belirlenmiştir

ADAMTS-8 promotor parçalarının SW480 hücrelerinde transkripsiyonel olarak aktif oldukları 119Z101 numaralı TÜBİTAK kapsamında yapılan çalışmalarda ilk kez grubumuz tarafından belirlenmiştir. Bu tez çalışması kapsamında da yine ilk olarak TGF- β 'nın ADAMTS-8 promotor aktivitesini arttırıcı yönde etki ettiği belirlenmiştir. ADAMTS-8 promotor parçaları kalsiyum fosfat metoduyla transfekte edildikten sonra gerçekleştirilen TG- β uygulaması sonrasında elde edilen sonuçlarda TGF- β 'nın, özellikle şu promotor parçalarının bazal aktiviterinde anlamlı artışa yol açtığı belirlenmiştir. En aktif parçalarda TGF- β sitokininin ADAMTS-8 geninin regölasyonunda kullandığı hücre içi yolakları belirleye bilmek için özğün inhibitörler kullanarak transfeksiyon gerçekleştirilmiştir. SW480 hücrelerinde elde edilen sonuçlara göre muhtemelen TGF- β sitokini; p38 MAPK, MEK, JNK, ve PI3K ve SIS3 yolakları üzerinden ADAMTS-8 promotor parçalarının transkripsiyonel regölasyonunu sağlamaktadır. Promotor bölgesinde muhtemel SMAD bağlanma bölgeleri için ChIP deneyi gerçekleştirilmiştir. SMAD over ekspre olan SW480 hücrelerinde ADAMTS-8 promotor cevapelementlerinin her birinde SMAD-2,-3 ve -4'te immüno-çökelme gözlemlenmiştir (*bk.* Şekil 4.16). Bu çökelme TGF- β uygulamasıyla birlikte özellikle RE1 ve RE4. promotor cevap elementinde istatistiksel olarak anlamlı şekilde gerçekleşmiştir (*bk.* Şekil 4.17). Bu sonuçlar bize SMAD-2-3 ve -4'ün ADAMTS-8 promotorunda RE1 ve RE4'te bağlanma bölgelerinin olabileceğini düşündürmektedir.

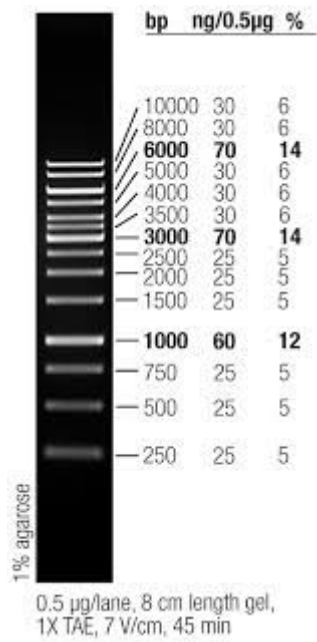
Elde edilen verilere göre, kolorektal kanserde normal şartlarda azalmış ADAMTS-8 ifadesinin, TGF- β uygulamasıyla birlikte ifadesinin arttırdığı bulunmuştur. Bu bulgu, ADAMTS-8'in kolorektal kanserde potansiyel bir rolü olabileceğini göstermektedir.

Çalışma kapsamında ADAMTS'lerin antiangiyojenik üyesi olan ADAMTS-8 geninin TGF- β tarafından regüle olan bir gen olduğu belirlenmiştir. Fakat ADAMTS-8'in kolorektal kanserdeki tam rolünün ve hücre içi sinyal yollarının belirlenebilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

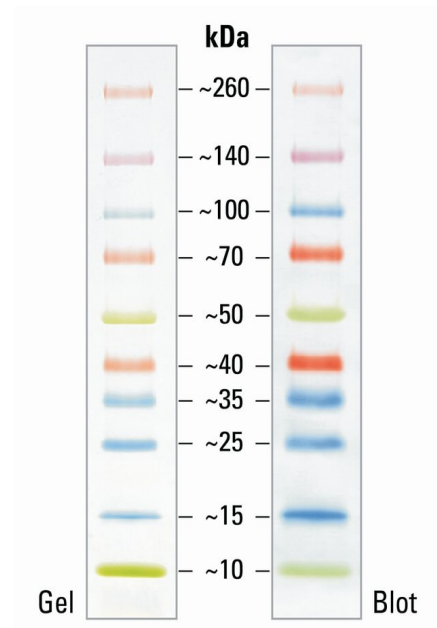
EKLER

EKLER

EK A: Kullanılan Markerler.



▲ DNA Ladder
(RiboRuler™)



▲ Protein Ladder
(PageRuler™)

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : FEYZA NUR SAV
Doğum tarihi ve yeri : 26.05.1998/ İNEGÖL
e-posta : savnurfezya@gmail.com

Öğrenim Bilgileri

Derece	Okul/Program	Yıl
Y. Lisans	Balıkesir Üniversitesi/Moleküler Biyoloji ve Genetik	2023
Lisans	Balıkesir Üniversitesi/Moleküler Biyoloji ve Genetik	2020
Lise	Naire Çikeyava Anadolu Lisesi	2016

6. KAYNAKLAR

- [1] H. Sung *et al.*, "Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries," (in eng), *CA Cancer J Clin*, vol. 71, no. 3, pp. 209-249, May 2021, doi: 10.3322/caac.21660.
- [2] M. Arnold, M. S. Sierra, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal, and F. Bray, "Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality," *Gut*, vol. 66, no. 4, pp. 683-691, 2017.
- [3] E. Dekker, P. J. Tanis, J. L. A. Vleugels, P. M. Kasi, and M. B. Wallace, "Colorectal cancer," (in eng), *Lancet*, vol. 394, no. 10207, pp. 1467-1480, Oct 19 2019, doi: 10.1016/s0140-6736(19)32319-0.
- [4] G. Murphy, S. S. Devesa, A. J. Cross, P. D. Inskip, K. A. McGlynn, and M. B. Cook, "Sex disparities in colorectal cancer incidence by anatomic subsite, race and age," *International journal of cancer*, vol. 128, no. 7, pp. 1668-1675, 2011.
- [5] M. S. Lee, D. G. Menter, and S. Kopetz, "Right Versus Left Colon Cancer Biology: Integrating the Consensus Molecular Subtypes," (in eng), *J Natl Compr Canc Netw*, vol. 15, no. 3, pp. 411-419, Mar 2017, doi: 10.6004/jnccn.2017.0038.
- [6] M. Riihimäki, A. Hemminki, J. Sundquist, and K. Hemminki, "Patterns of metastasis in colon and rectal cancer," *Scientific reports*, vol. 6, no. 1, pp. 1-9, 2016.
- [7] H. Ma, L. A. A. Brosens, G. J. A. Offerhaus, F. M. Giardiello, W. W. J. de Leng, and E. A. Montgomery, "Pathology and genetics of hereditary colorectal cancer," (in eng), *Pathology*, vol. 50, no. 1, pp. 49-59, Jan 2018, doi: 10.1016/j.pathol.2017.09.004.
- [8] N. B. Henrikson *et al.*, "Family history and the natural history of colorectal cancer: systematic review," *Genetics in medicine*, vol. 17, no. 9, pp. 702-712, 2015.
- [9] P. Kanth, J. Grimmert, M. Champine, R. Burt, and N. J. Samadder, "Hereditary Colorectal Polyposis and Cancer Syndromes: A Primer on Diagnosis and Management," (in eng), *Am J Gastroenterol*, vol. 112, no. 10, pp. 1509-1525, Oct 2017, doi: 10.1038/ajg.2017.212.
- [10] H. T. Lynch *et al.*, "Genetics, natural history, tumor spectrum, and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: an updated review," (in eng), *Gastroenterology*, vol. 104, no. 5, pp. 1535-49, May 1993, doi: 10.1016/0016-5085(93)90368-m.
- [11] A. K. Rustgi, "The genetics of hereditary colon cancer," (in eng), *Genes Dev*, vol. 21, no. 20, pp. 2525-38, Oct 15 2007, doi: 10.1101/gad.1593107.
- [12] "Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer," (in eng), *Nature*, vol. 487, no. 7407, pp. 330-7, Jul 18 2012, doi: 10.1038/nature11252.
- [13] J. Guinney *et al.*, "The consensus molecular subtypes of colorectal cancer," (in eng), *Nat Med*, vol. 21, no. 11, pp. 1350-6, Nov 2015, doi: 10.1038/nm.3967.
- [14] L. H. Nguyen, A. Goel, and D. C. Chung, "Pathways of colorectal carcinogenesis," *Gastroenterology*, vol. 158, no. 2, pp. 291-302, 2020.
- [15] M. S. Pino and D. C. Chung, "Microsatellite instability in the management of colorectal cancer," *Expert review of gastroenterology & hepatology*, vol. 5, no. 3, pp. 385-399, 2011.
- [16] C. R. Boland and A. Goel, "Microsatellite instability in colorectal cancer," *Gastroenterology*, vol. 138, no. 6, pp. 2073-2087. e3, 2010.
- [17] J. M. Bae, J. H. Kim, and G. H. Kang, "Epigenetic alterations in colorectal cancer: the CpG island methylator phenotype," 2013.
- [18] J. Guinney *et al.*, "The consensus molecular subtypes of colorectal cancer," *Nature medicine*, vol. 21, no. 11, pp. 1350-1356, 2015.

- [19] J. M. Zhang and J. An, "Cytokines, inflammation, and pain," (in eng), *Int Anesthesiol Clin*, vol. 45, no. 2, pp. 27-37, Spring 2007, doi: 10.1097/AIA.0b013e318034194e.
- [20] C. Liu, D. Chu, K. Kalantar-Zadeh, J. George, H. A. Young, and G. Liu, "Cytokines: From Clinical Significance to Quantification," (in eng), *Adv Sci (Weinh)*, vol. 8, no. 15, p. e2004433, Aug 2021, doi: 10.1002/advs.202004433.
- [21] C. J. Wilson, C. E. Finch, and H. J. Cohen, "Cytokines and cognition--the case for a head-to-toe inflammatory paradigm," (in eng), *J Am Geriatr Soc*, vol. 50, no. 12, pp. 2041-56, Dec 2002, doi: 10.1046/j.1532-5415.2002.50619.x.
- [22] K. B. Megha, X. Joseph, V. Akhil, and P. V. Mohanan, "Cascade of immune mechanism and consequences of inflammatory disorders," (in eng), *Phytomedicine*, vol. 91, p. 153712, Oct 2021, doi: 10.1016/j.phymed.2021.153712.
- [23] A. H. Sprague and R. A. Khalil, "Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease," (in eng), *Biochem Pharmacol*, vol. 78, no. 6, pp. 539-52, Sep 15 2009, doi: 10.1016/j.bcp.2009.04.029.
- [24] M. K. Lichtman, M. Otero-Vinas, and V. Falanga, "Transforming growth factor beta (TGF- β) isoforms in wound healing and fibrosis," (in eng), *Wound Repair Regen*, vol. 24, no. 2, pp. 215-22, Mar 2016, doi: 10.1111/wrr.12398.
- [25] Ł. A. Poniatowski, P. Wojdasiewicz, R. Gasik, and D. Szukiewicz, "Transforming Growth Factor Beta Family: Insight into the Role of Growth Factors in Regulation of Fracture Healing Biology and Potential Clinical Applications," *Mediators of Inflammation*, vol. 2015, 2015.
- [26] F. W. Ruscetti, S. Akel, and S. H. Bartelmez, "Autocrine transforming growth factor-beta regulation of hematopoiesis: many outcomes that depend on the context," (in eng), *Oncogene*, vol. 24, no. 37, pp. 5751-63, Aug 29 2005, doi: 10.1038/sj.onc.1208921.
- [27] M. C. Fleisch, C. A. Maxwell, and M. H. Barcellos-Hoff, "The pleiotropic roles of transforming growth factor beta in homeostasis and carcinogenesis of endocrine organs," (in eng), *Endocr Relat Cancer*, vol. 13, no. 2, pp. 379-400, Jun 2006, doi: 10.1677/erc.1.01112.
- [28] J. Massagué, "TGFbeta in Cancer," (in eng), *Cell*, vol. 134, no. 2, pp. 215-30, Jul 25 2008, doi: 10.1016/j.cell.2008.07.001.
- [29] C. Neuzillet *et al.*, "Targeting the TGF β pathway for cancer therapy," (in eng), *Pharmacol Ther*, vol. 147, pp. 22-31, Mar 2015, doi: 10.1016/j.pharmthera.2014.11.001.
- [30] D. R. Principe *et al.*, "TGF- β : duality of function between tumor prevention and carcinogenesis," (in eng), *J Natl Cancer Inst*, vol. 106, no. 2, p. djt369, Feb 2014, doi: 10.1093/jnci/djt369.
- [31] K. A. Harradine and R. J. Akhurst, "Mutations of TGFbeta signaling molecules in human disease," (in eng), *Ann Med*, vol. 38, no. 6, pp. 403-14, 2006, doi: 10.1080/07853890600919911.
- [32] B. Bierie and H. L. Moses, "Tumour microenvironment: TGFbeta: the molecular Jekyll and Hyde of cancer," (in eng), *Nat Rev Cancer*, vol. 6, no. 7, pp. 506-20, Jul 2006, doi: 10.1038/nrc1926.
- [33] M. H. Barcellos-Hoff, "Latency and activation in the control of TGF- β ," *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, vol. 1, pp. 353-363, 1996.
- [34] A. P. Hinck and M. D. O'Connor-McCourt, "Structures of TGF- β receptor complexes: implications for function and therapeutic intervention using ligand traps," (in eng), *Curr Pharm Biotechnol*, vol. 12, no. 12, pp. 2081-98, Dec 2011, doi: 10.2174/138920111798808383.

- [35] D. S. Romeo, K. Park, A. B. Roberts, M. B. Sporn, and S. J. Kim, "An element of the transforming growth factor-beta 1 5'-untranslated region represses translation and specifically binds a cytosolic factor," (in eng), *Mol Endocrinol*, vol. 7, no. 6, pp. 759-66, Jun 1993, doi: 10.1210/mend.7.6.8361501.
- [36] S. J. Kim *et al.*, "Autoinduction of transforming growth factor beta 1 is mediated by the AP-1 complex," (in eng), *Mol Cell Biol*, vol. 10, no. 4, pp. 1492-7, Apr 1990, doi: 10.1128/mcb.10.4.1492-1497.1990.
- [37] A. B. Roberts, "Molecular and cell biology of TGF-beta," (in eng), *Miner Electrolyte Metab*, vol. 24, no. 2-3, pp. 111-9, 1998, doi: 10.1159/000057358.
- [38] W. Wang, V. Koka, and H. Y. Lan, "Transforming growth factor-beta and Smad signalling in kidney diseases," (in eng), *Nephrology (Carlton)*, vol. 10, no. 1, pp. 48-56, Feb 2005, doi: 10.1111/j.1440-1797.2005.00334.x.
- [39] N. Khalil, "TGF-beta: from latent to active," (in eng), *Microbes Infect*, vol. 1, no. 15, pp. 1255-63, Dec 1999, doi: 10.1016/s1286-4579(99)00259-2.
- [40] C. B. Trelford, L. Dagnino, and G. M. Di Guglielmo, "Transforming growth factor- β in tumour development," (in eng), *Front Mol Biosci*, vol. 9, p. 991612, 2022, doi: 10.3389/fmolb.2022.991612.
- [41] R. Derynck *et al.*, "Human transforming growth factor-beta complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells," (in eng), *Nature*, vol. 316, no. 6030, pp. 701-5, Aug 22-28 1985, doi: 10.1038/316701a0.
- [42] L. E. Gentry and B. W. Nash, "The pro domain of pre-pro-transforming growth factor beta 1 when independently expressed is a functional binding protein for the mature growth factor," (in eng), *Biochemistry*, vol. 29, no. 29, pp. 6851-7, Jul 24 1990, doi: 10.1021/bi00481a014.
- [43] K. Janssens, P. ten Dijke, S. H. Ralston, C. Bergmann, and W. Van Hul, "Transforming growth factor-beta 1 mutations in Camurati-Engelmann disease lead to increased signaling by altering either activation or secretion of the mutant protein," (in eng), *J Biol Chem*, vol. 278, no. 9, pp. 7718-24, Feb 28 2003, doi: 10.1074/jbc.M208857200.
- [44] A. M. Brunner, H. Marquardt, A. R. Malacko, M. N. Liubin, and A. F. Purchio, "Site-directed mutagenesis of cysteine residues in the pro region of the transforming growth factor beta 1 precursor. Expression and characterization of mutant proteins," (in eng), *J Biol Chem*, vol. 264, no. 23, pp. 13660-4, Aug 15 1989.
- [45] L. E. Gentry, M. N. Liubin, A. F. Purchio, and H. Marquardt, "Molecular events in the processing of recombinant type 1 pre-pro-transforming growth factor beta to the mature polypeptide," (in eng), *Mol Cell Biol*, vol. 8, no. 10, pp. 4162-8, Oct 1988, doi: 10.1128/mcb.8.10.4162-4168.1988.
- [46] C. M. Dubois, F. Blanchette, M. H. Laprise, R. Leduc, F. Grondin, and N. G. Seidah, "Evidence that furin is an authentic transforming growth factor-beta1-converting enzyme," (in eng), *Am J Pathol*, vol. 158, no. 1, pp. 305-16, Jan 2001, doi: 10.1016/s0002-9440(10)63970-3.
- [47] M. Kusakabe, P. L. Cheong, R. Nikfar, I. S. McLennan, and K. Koishi, "The structure of the TGF-beta latency associated peptide region determines the ability of the proprotein convertase furin to cleave TGF-betas," (in eng), *J Cell Biochem*, vol. 103, no. 1, pp. 311-20, Jan 1 2008, doi: 10.1002/jcb.21407.
- [48] D. B. Rifkin, "Latent transforming growth factor-beta (TGF-beta) binding proteins: orchestrators of TGF-beta availability," (in eng), *J Biol Chem*, vol. 280, no. 9, pp. 7409-12, Mar 4 2005, doi: 10.1074/jbc.R400029200.

- [49] H. Hayashi and T. Sakai, "Biological Significance of Local TGF- β Activation in Liver Diseases," (in eng), *Front Physiol*, vol. 3, p. 12, 2012, doi: 10.3389/fphys.2012.00012.
- [50] P. E. Gleizes, R. C. Beavis, R. Mazzieri, B. Shen, and D. B. Rifkin, "Identification and characterization of an eight-cysteine repeat of the latent transforming growth factor-beta binding protein-1 that mediates bonding to the latent transforming growth factor-beta1," (in eng), *J Biol Chem*, vol. 271, no. 47, pp. 29891-6, Nov 22 1996, doi: 10.1074/jbc.271.47.29891.
- [51] J. Saharinen, J. Taipale, and J. Keski-Oja, "Association of the small latent transforming growth factor-beta with an eight cysteine repeat of its binding protein LTBP-1," (in eng), *Embo j*, vol. 15, no. 2, pp. 245-53, Jan 15 1996.
- [52] J. Massagué, "TGF β signalling in context," (in eng), *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 13, no. 10, pp. 616-30, Oct 2012, doi: 10.1038/nrm3434.
- [53] P. J. Wipff, D. B. Rifkin, J. J. Meister, and B. Hinz, "Myofibroblast contraction activates latent TGF-beta1 from the extracellular matrix," (in eng), *J Cell Biol*, vol. 179, no. 6, pp. 1311-23, Dec 17 2007, doi: 10.1083/jcb.200704042.
- [54] O. Tatti, P. Vehviläinen, K. Lehti, and J. Keski-Oja, "MT1-MMP releases latent TGF-beta1 from endothelial cell extracellular matrix via proteolytic processing of LTBP-1," (in eng), *Exp Cell Res*, vol. 314, no. 13, pp. 2501-14, Aug 1 2008, doi: 10.1016/j.yexcr.2008.05.018.
- [55] T. Kobayashi *et al.*, "Matrix metalloproteinase-9 activates TGF- β and stimulates fibroblast contraction of collagen gels," (in eng), *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, vol. 306, no. 11, pp. L1006-15, Jun 1 2014, doi: 10.1152/ajplung.00015.2014.
- [56] J. A. Yee, L. Yan, J. C. Dominguez, E. H. Allan, and T. J. Martin, "Plasminogen-dependent activation of latent transforming growth factor beta (TGF beta) by growing cultures of osteoblast-like cells," (in eng), *J Cell Physiol*, vol. 157, no. 3, pp. 528-34, Dec 1993, doi: 10.1002/jcp.1041570312.
- [57] Q. Yu and I. Stamenkovic, "Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis," (in eng), *Genes Dev*, vol. 14, no. 2, pp. 163-76, Jan 15 2000.
- [58] S. Schultz-Cherry and J. E. Murphy-Ullrich, "Thrombospondin causes activation of latent transforming growth factor-beta secreted by endothelial cells by a novel mechanism," (in eng), *J Cell Biol*, vol. 122, no. 4, pp. 923-32, Aug 1993, doi: 10.1083/jcb.122.4.923.
- [59] S. Kojima, K. Nara, and D. B. Rifkin, "Requirement for transglutaminase in the activation of latent transforming growth factor-beta in bovine endothelial cells," (in eng), *J Cell Biol*, vol. 121, no. 2, pp. 439-48, Apr 1993, doi: 10.1083/jcb.121.2.439.
- [60] Y. Sato and D. B. Rifkin, "Inhibition of endothelial cell movement by pericytes and smooth muscle cells: activation of a latent transforming growth factor-beta 1-like molecule by plasmin during co-culture," (in eng), *J Cell Biol*, vol. 109, no. 1, pp. 309-15, Jul 1989, doi: 10.1083/jcb.109.1.309.
- [61] D. A. Pociask, P. J. Sime, and A. R. Brody, "Asbestos-derived reactive oxygen species activate TGF-beta1," (in eng), *Lab Invest*, vol. 84, no. 8, pp. 1013-23, Aug 2004, doi: 10.1038/labinvest.3700109.
- [62] R. M. Lyons, J. Keski-Oja, and H. L. Moses, "Proteolytic activation of latent transforming growth factor-beta from fibroblast-conditioned medium," (in eng), *J Cell Biol*, vol. 106, no. 5, pp. 1659-65, May 1988, doi: 10.1083/jcb.106.5.1659.

- [63] S. Cheifetz *et al.*, "Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 267, no. 27, pp. 19027-19030, 1992.
- [64] F. López-Casillas, S. Cheifetz, J. Doody, J. L. Andres, W. S. Lane, and J. Massague, "Structure and expression of the membrane proteoglycan betaglycan, a component of the TGF- β receptor system," *Cell*, vol. 67, no. 4, pp. 785-795, 1991.
- [65] C. E. Gatza, S. Y. Oh, and G. C. Blobe, "Roles for the type III TGF- β receptor in human cancer," *Cellular signalling*, vol. 22, no. 8, pp. 1163-1174, 2010.
- [66] B. O. Fanger, L. M. Wakefield, and M. B. Sporn, "Structure and properties of the cellular receptor for transforming growth factor type beta," *Biochemistry*, vol. 25, no. 11, pp. 3083-3091, 1986.
- [67] S. Cheifetz, B. Like, and J. Massague, "Cellular distribution of type I and type II receptors for transforming growth factor-beta," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 261, no. 21, pp. 9972-9978, 1986.
- [68] R. A. Igotz and J. Massague, "Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 261, no. 9, pp. 4337-4345, 1986.
- [69] A. P. Hinck, "Structural studies of the TGF- β s and their receptors - insights into evolution of the TGF- β superfamily," (in eng), *FEBS Lett*, vol. 586, no. 14, pp. 1860-70, Jul 4 2012, doi: 10.1016/j.febslet.2012.05.028.
- [70] K. Miyazono, "TGF-beta signaling by Smad proteins," (in eng), *Cytokine Growth Factor Rev*, vol. 11, no. 1-2, pp. 15-22, Mar-Jun 2000, doi: 10.1016/s1359-6101(99)00025-8.
- [71] H. Ikushima *et al.*, "An Id-like molecule, HHM, is a synexpression group-restricted regulator of TGF-beta signalling," (in eng), *Embo j*, vol. 27, no. 22, pp. 2955-65, Nov 19 2008, doi: 10.1038/emboj.2008.218.
- [72] H. Ikushima and K. Miyazono, "TGFbeta signalling: a complex web in cancer progression," (in eng), *Nat Rev Cancer*, vol. 10, no. 6, pp. 415-24, Jun 2010, doi: 10.1038/nrc2853.
- [73] S. Jia and A. Meng, "TGF β family signaling and development," (in eng), *Development*, vol. 148, no. 5, Mar 12 2021, doi: 10.1242/dev.188490.
- [74] P. Kavsak *et al.*, "Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation," (in eng), *Mol Cell*, vol. 6, no. 6, pp. 1365-75, Dec 2000, doi: 10.1016/s1097-2765(00)00134-9.
- [75] T. Mochizuki *et al.*, "Roles for the MH2 domain of Smad7 in the specific inhibition of transforming growth factor-beta superfamily signaling," (in eng), *J Biol Chem*, vol. 279, no. 30, pp. 31568-74, Jul 23 2004, doi: 10.1074/jbc.M313977200.
- [76] A. Nakao *et al.*, "Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling," (in eng), *Nature*, vol. 389, no. 6651, pp. 631-5, Oct 9 1997, doi: 10.1038/39369.
- [77] T. Ebisawa *et al.*, "Smurf1 interacts with transforming growth factor-beta type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation," (in eng), *J Biol Chem*, vol. 276, no. 16, pp. 12477-80, Apr 20 2001, doi: 10.1074/jbc.C100008200.
- [78] M. J. Macias, P. Martin-Malpartida, and J. Massagué, "Structural determinants of Smad function in TGF- β signaling," (in eng), *Trends Biochem Sci*, vol. 40, no. 6, pp. 296-308, Jun 2015, doi: 10.1016/j.tibs.2015.03.012.
- [79] L. J. Jonk, S. Itoh, C. H. Heldin, P. ten Dijke, and W. Kruijer, "Identification and functional characterization of a Smad binding element (SBE) in the JunB promoter that acts as a transforming growth factor-beta, activin, and bone morphogenetic

- protein-inducible enhancer," (in eng), *J Biol Chem*, vol. 273, no. 33, pp. 21145-52, Aug 14 1998, doi: 10.1074/jbc.273.33.21145.
- [80] Y. Shi, Y. F. Wang, L. Jayaraman, H. Yang, J. Massagué, and N. P. Pavletich, "Crystal structure of a Smad MH1 domain bound to DNA: insights on DNA binding in TGF-beta signaling," (in eng), *Cell*, vol. 94, no. 5, pp. 585-94, Sep 4 1998, doi: 10.1016/s0092-8674(00)81600-1.
- [81] J. W. Wu *et al.*, "Crystal structure of a phosphorylated Smad2. Recognition of phosphoserine by the MH2 domain and insights on Smad function in TGF-beta signaling," (in eng), *Mol Cell*, vol. 8, no. 6, pp. 1277-89, Dec 2001, doi: 10.1016/s1097-2765(01)00421-x.
- [82] J. Massagué, J. Seoane, and D. Wotton, "Smad transcription factors," (in eng), *Genes Dev*, vol. 19, no. 23, pp. 2783-810, Dec 1 2005, doi: 10.1101/gad.1350705.
- [83] B. Qin, S. S. Lam, and K. Lin, "Crystal structure of a transcriptionally active Smad4 fragment," (in eng), *Structure*, vol. 7, no. 12, pp. 1493-503, Dec 15 1999, doi: 10.1016/s0969-2126(00)88340-9.
- [84] K. Miyazawa and K. Miyazono, "Regulation of TGF- β Family Signaling by Inhibitory Smads," (in eng), *Cold Spring Harb Perspect Biol*, vol. 9, no. 3, Mar 1 2017, doi: 10.1101/cshperspect.a022095.
- [85] E. Aragón *et al.*, "Structural basis for distinct roles of SMAD2 and SMAD3 in FOXH1 pioneer-directed TGF- β signaling," (in eng), *Genes Dev*, vol. 33, no. 21-22, pp. 1506-1524, Nov 1 2019, doi: 10.1101/gad.330837.119.
- [86] S. Dennler, S. Huet, and J. M. Gauthier, "A short amino-acid sequence in MH1 domain is responsible for functional differences between Smad2 and Smad3," (in eng), *Oncogene*, vol. 18, no. 8, pp. 1643-8, Feb 25 1999, doi: 10.1038/sj.onc.1202729.
- [87] S. Dennler, S. Itoh, D. Vivien, P. ten Dijke, S. Huet, and J. M. Gauthier, "Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF beta-inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene," (in eng), *Embo j*, vol. 17, no. 11, pp. 3091-100, Jun 1 1998, doi: 10.1093/emboj/17.11.3091.
- [88] P. ten Dijke and C. S. Hill, "New insights into TGF-beta-Smad signalling," (in eng), *Trends Biochem Sci*, vol. 29, no. 5, pp. 265-73, May 2004, doi: 10.1016/j.tibs.2004.03.008.
- [89] Y. Wang *et al.*, "SMAD4 promotes TGF- β -independent NK cell homeostasis and maturation and antitumor immunity," (in eng), *J Clin Invest*, vol. 128, no. 11, pp. 5123-5136, Nov 1 2018, doi: 10.1172/jci121227.
- [90] R. Igalouzene *et al.*, "SMAD4 TGF- β -independent function preconditions naive CD8⁺ T cells to prevent severe chronic intestinal inflammation," (in eng), *J Clin Invest*, vol. 132, no. 8, Apr 15 2022, doi: 10.1172/jci151020.
- [91] C. Pouponnot, L. Jayaraman, and J. Massagué, "Physical and functional interaction of SMADs and p300/CBP," (in eng), *J Biol Chem*, vol. 273, no. 36, pp. 22865-8, Sep 4 1998, doi: 10.1074/jbc.273.36.22865.
- [92] M. P. de Caestecker *et al.*, "The Smad4 activation domain (SAD) is a proline-rich, p300-dependent transcriptional activation domain," (in eng), *J Biol Chem*, vol. 275, no. 3, pp. 2115-22, Jan 21 2000, doi: 10.1074/jbc.275.3.2115.
- [93] K. Tzavlaki and A. Moustakas, "TGF- β Signaling," (in eng), *Biomolecules*, vol. 10, no. 3, Mar 23 2020, doi: 10.3390/biom10030487.
- [94] A. Vander Ark, J. Cao, and X. Li, "TGF- β receptors: In and beyond TGF- β signaling," *Cellular signalling*, vol. 52, pp. 112-120, 2018.
- [95] R. Derynck and E. H. Budi, "Specificity, versatility, and control of TGF- β family signaling," *Science signaling*, vol. 12, no. 570, p. eaav5183, 2019.

- [96] A. Moustakas and C.-H. Heldin, "Non-Smad TGF- β signals," *Journal of cell science*, vol. 118, no. 16, pp. 3573-3584, 2005.
- [97] M. Yamashita, K. Fathyol, C. Jin, X. Wang, Z. Liu, and Y. E. Zhang, "TRAF6 mediates Smad-independent activation of JNK and p38 by TGF-beta," (in eng), *Mol Cell*, vol. 31, no. 6, pp. 918-24, Sep 26 2008, doi: 10.1016/j.molcel.2008.09.002.
- [98] M. H. de Borst, L. Wassef, D. J. Kelly, H. van Goor, and G. Navis, "Mitogen activated protein kinase signaling in the kidney: target for intervention?," *Signal Transduction*, vol. 6, no. 1, pp. 32-53, 2006.
- [99] M. K. Lee *et al.*, "TGF-beta activates Erk MAP kinase signalling through direct phosphorylation of ShcA," (in eng), *Embo j*, vol. 26, no. 17, pp. 3957-67, Sep 5 2007, doi: 10.1038/sj.emboj.7601818.
- [100] R. Derynck and Y. E. Zhang, "Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signalling," *Nature*, vol. 425, no. 6958, pp. 577-584, 2003.
- [101] P. A. Suwanabol *et al.*, "TGF- β and Smad3 modulate PI3K/Akt signaling pathway in vascular smooth muscle cells," (in eng), *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, vol. 302, no. 11, pp. H2211-9, Jun 1 2012, doi: 10.1152/ajpheart.00966.2011.
- [102] L. Zhang, F. Zhou, and P. ten Dijke, "Signaling interplay between transforming growth factor- β receptor and PI3K/AKT pathways in cancer," (in eng), *Trends Biochem Sci*, vol. 38, no. 12, pp. 612-20, Dec 2013, doi: 10.1016/j.tibs.2013.10.001.
- [103] L. Zhang *et al.*, "TRAF4 promotes TGF- β receptor signaling and drives breast cancer metastasis," (in eng), *Mol Cell*, vol. 51, no. 5, pp. 559-72, Sep 12 2013, doi: 10.1016/j.molcel.2013.07.014.
- [104] B. Ozdamar, R. Bose, M. Barrios-Rodiles, H.-R. Wang, Y. Zhang, and J. L. Wrana, "Regulation of the polarity protein Par6 by TGF β receptors controls epithelial cell plasticity," *Science*, vol. 307, no. 5715, pp. 1603-1609, 2005.
- [105] C. P. Blobel, "ADAMs: key components in EGFR signalling and development," (in eng), *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 6, no. 1, pp. 32-43, Jan 2005, doi: 10.1038/nrm1548.
- [106] D. R. Edwards, M. M. Handsley, and C. J. Pennington, "The ADAM metalloproteinases," (in eng), *Mol Aspects Med*, vol. 29, no. 5, pp. 258-89, Oct 2008, doi: 10.1016/j.mam.2008.08.001.
- [107] M. J. Duffy, E. McKiernan, N. O'Donovan, and P. M. McGowan, "The role of ADAMs in disease pathophysiology," (in eng), *Clin Chim Acta*, vol. 403, no. 1-2, pp. 31-6, May 2009, doi: 10.1016/j.cca.2009.01.007.
- [108] K. Kuno, N. Kanada, E. Nakashima, F. Fujiki, F. Ichimura, and K. Matsushima, "Molecular cloning of a gene encoding a new type of metalloproteinase-disintegrin family protein with thrombospondin motifs as an inflammation associated gene," (in eng), *J Biol Chem*, vol. 272, no. 1, pp. 556-62, Jan 3 1997, doi: 10.1074/jbc.272.1.556.
- [109] S. S. Apte, "A disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin-type) with thrombospondin type 1 motif (ADAMTS) superfamily: functions and mechanisms," (in eng), *J Biol Chem*, vol. 284, no. 46, pp. 31493-7, Nov 13 2009, doi: 10.1074/jbc.R109.052340.
- [110] S. Porter, I. M. Clark, L. Kevorkian, and D. R. Edwards, "The ADAMTS metalloproteinases," (in eng), *Biochem J*, vol. 386, no. Pt 1, pp. 15-27, Feb 15 2005, doi: 10.1042/bj20040424.
- [111] B. H. Koo, J. M. Longpré, R. P. Somerville, J. P. Alexander, R. Leduc, and S. S. Apte, "Regulation of ADAMTS9 secretion and enzymatic activity by its propeptide," (in eng), *J Biol Chem*, vol. 282, no. 22, pp. 16146-54, Jun 1 2007, doi: 10.1074/jbc.M610161200.

- [112] F. X. Gomis-Rüth, "Structural aspects of the metzincin clan of metalloendopeptidases," (in eng), *Mol Biotechnol*, vol. 24, no. 2, pp. 157-202, Jun 2003, doi: 10.1385/mb:24:2:157.
- [113] L. Mosyak *et al.*, "Crystal structures of the two major aggrecan degrading enzymes, ADAMTS4 and ADAMTS5," (in eng), *Protein Sci*, vol. 17, no. 1, pp. 16-21, Jan 2008, doi: 10.1110/ps.073287008.
- [114] J. C. Adams and J. Lawler, "The thrombospondins," (in eng), *Cold Spring Harb Perspect Biol*, vol. 3, no. 10, p. a009712, Oct 1 2011, doi: 10.1101/cshperspect.a009712.
- [115] R. P. Somerville *et al.*, "Characterization of ADAMTS-9 and ADAMTS-20 as a distinct ADAMTS subfamily related to *Caenorhabditis elegans* GON-1," (in eng), *J Biol Chem*, vol. 278, no. 11, pp. 9503-13, Mar 14 2003, doi: 10.1074/jbc.M211009200.
- [116] R. Kelwick, I. Desanlis, G. N. Wheeler, and D. R. Edwards, "The ADAMTS (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs) family," (in eng), *Genome Biol*, vol. 16, no. 1, p. 113, May 30 2015, doi: 10.1186/s13059-015-0676-3.
- [117] T. Ahlquist *et al.*, "Gene methylation profiles of normal mucosa, and benign and malignant colorectal tumors identify early onset markers," (in eng), *Mol Cancer*, vol. 7, p. 94, Dec 31 2008, doi: 10.1186/1476-4598-7-94.
- [118] G. E. Lind *et al.*, "ADAMTS1, CRABP1, and NR3C1 identified as epigenetically deregulated genes in colorectal tumorigenesis," (in eng), *Cell Oncol*, vol. 28, no. 5-6, pp. 259-72, 2006, doi: 10.1155/2006/949506.
- [119] Y. H. Kim *et al.*, "Epigenomic analysis of aberrantly methylated genes in colorectal cancer identifies genes commonly affected by epigenetic alterations," (in eng), *Ann Surg Oncol*, vol. 18, no. 8, pp. 2338-47, Aug 2011, doi: 10.1245/s10434-011-1573-y.
- [120] C. Zhang *et al.*, "High-resolution melting analysis of ADAMTS9 methylation levels in gastric, colorectal, and pancreatic cancers," (in eng), *Cancer Genet Cytogenet*, vol. 196, no. 1, pp. 38-44, Jan 1 2010, doi: 10.1016/j.cancergencyto.2009.08.016.
- [121] A. Moncada-Pazos *et al.*, "The ADAMTS12 metalloprotease gene is epigenetically silenced in tumor cells and transcriptionally activated in the stroma during progression of colon cancer," (in eng), *J Cell Sci*, vol. 122, no. Pt 16, pp. 2906-13, Aug 15 2009, doi: 10.1242/jcs.050468.
- [122] C. G. Vilorio *et al.*, "Genetic inactivation of ADAMTS15 metalloprotease in human colorectal cancer," (in eng), *Cancer Res*, vol. 69, no. 11, pp. 4926-34, Jun 1 2009, doi: 10.1158/0008-5472.Can-08-4155.
- [123] Z. Li *et al.*, "C-terminal ADAMTS-18 fragment induces oxidative platelet fragmentation, dissolves platelet aggregates, and protects against carotid artery occlusion and cerebral stroke," (in eng), *Blood*, vol. 113, no. 24, pp. 6051-60, Jun 11 2009, doi: 10.1182/blood-2008-07-170571.
- [124] T. Sjöblom *et al.*, "The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers," (in eng), *Science*, vol. 314, no. 5797, pp. 268-74, Oct 13 2006, doi: 10.1126/science.1133427.
- [125] S. S. Apte, "ADAMTS Proteases: Mediators of Physiological and Pathogenic Extracellular Proteolysis," in *Encyclopedia of Cell Biology*, R. A. Bradshaw and P. D. Stahl Eds. Waltham: Academic Press, 2016, pp. 630-638.
- [126] K. W. J. Rose, N. Taye, S. Z. Karoulias, and D. Hubmacher, "Regulation of ADAMTS Proteases," (in eng), *Front Mol Biosci*, vol. 8, p. 701959, 2021, doi: 10.3389/fmolb.2021.701959.

- [127] R. Kelwick, I. Desanlis, G. N. Wheeler, and D. R. Edwards, "The ADAMTS (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs) family," *Genome Biology*, vol. 16, no. 1, p. 113, 2015/05/30 2015, doi: 10.1186/s13059-015-0676-3.
- [128] M. El Mabrouk, J. Sylvester, and M. Zafarullah, "Signaling pathways implicated in oncostatin M-induced aggrecanase-1 and matrix metalloproteinase-13 expression in human articular chondrocytes," (in eng), *Biochim Biophys Acta*, vol. 1773, no. 3, pp. 309-20, Mar 2007, doi: 10.1016/j.bbamcr.2006.11.018.
- [129] K. Uchida *et al.*, "Transforming growth factor activating kinase 1 regulates extracellular matrix degrading enzymes and pain-related molecule expression following tumor necrosis factor- α stimulation of synovial cells: an in vitro study," (in eng), *BMC Musculoskelet Disord*, vol. 18, no. 1, p. 283, Jul 1 2017, doi: 10.1186/s12891-017-1648-4.
- [130] Y. Mimata *et al.*, "Interleukin-6 upregulates expression of ADAMTS-4 in fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis," (in eng), *Int J Rheum Dis*, vol. 15, no. 1, pp. 36-44, Feb 2012, doi: 10.1111/j.1756-185X.2011.01656.x.
- [131] Y. R. Xu and C. Q. Lei, "TAK1-TABs Complex: A Central Signalosome in Inflammatory Responses," (in eng), *Front Immunol*, vol. 11, p. 608976, 2020, doi: 10.3389/fimmu.2020.608976.
- [132] M. Vistnes, J. M. Aronsen, I. G. Lunde, I. Sjaastad, C. R. Carlson, and G. Christensen, "Pentosan polysulfate decreases myocardial expression of the extracellular matrix enzyme ADAMTS4 and improves cardiac function in vivo in rats subjected to pressure overload by aortic banding," (in eng), *PLoS One*, vol. 9, no. 3, p. e89621, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0089621.
- [133] K. M. Doyle, D. L. Russell, V. Sriraman, and J. S. Richards, "Coordinate transcription of the ADAMTS-1 gene by luteinizing hormone and progesterone receptor," (in eng), *Mol Endocrinol*, vol. 18, no. 10, pp. 2463-78, Oct 2004, doi: 10.1210/me.2003-0380.
- [134] T. Shindo *et al.*, "ADAMTS-1: a metalloproteinase-disintegrin essential for normal growth, fertility, and organ morphology and function," (in eng), *J Clin Invest*, vol. 105, no. 10, pp. 1345-52, May 2000, doi: 10.1172/jci8635.
- [135] S. Gao, C. De Geyter, K. Kossowska, and H. Zhang, "FSH stimulates the expression of the ADAMTS-16 protease in mature human ovarian follicles," (in eng), *Mol Hum Reprod*, vol. 13, no. 7, pp. 465-71, Jul 2007, doi: 10.1093/molehr/gam037.
- [136] C. L. Jacobi, L. J. Rudigier, H. Scholz, and K. M. Kirschner, "Transcriptional regulation by the Wilms tumor protein, Wt1, suggests a role of the metalloproteinase Adamts16 in murine genitourinary development," (in eng), *J Biol Chem*, vol. 288, no. 26, pp. 18811-24, Jun 28 2013, doi: 10.1074/jbc.M113.464644.
- [137] R. Schnellmann *et al.*, "A Selective Extracellular Matrix Proteomics Approach Identifies Fibronectin Proteolysis by A Disintegrin-like and Metalloprotease Domain with Thrombospondin Type 1 Motifs (ADAMTS16) and Its Impact on Spheroid Morphogenesis," (in eng), *Mol Cell Proteomics*, vol. 17, no. 7, pp. 1410-1425, Jul 2018, doi: 10.1074/mcp.RA118.000676.
- [138] A. K. Surridge *et al.*, "Characterization and regulation of ADAMTS-16," (in eng), *Matrix Biol*, vol. 28, no. 7, pp. 416-24, Sep 2009, doi: 10.1016/j.matbio.2009.07.001.
- [139] M. Alper and F. Kockar, "IL-6 upregulates a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 2 (ADAMTS-2) in human osteosarcoma cells mediated by JNK pathway," (in eng), *Mol Cell Biochem*, vol. 393, no. 1-2, pp. 165-75, Aug 2014, doi: 10.1007/s11010-014-2056-9.

- [140] L. Wagstaff, R. Kelwick, J. Decock, and D. R. Edwards, "The roles of ADAMTS metalloproteinases in tumorigenesis and metastasis," (in eng), *Front Biosci (Landmark Ed)*, vol. 16, no. 5, pp. 1861-72, Jan 1 2011, doi: 10.2741/3827.
- [141] G. C. Choi *et al.*, "The metalloprotease ADAMTS8 displays antitumor properties through antagonizing EGFR-MEK-ERK signaling and is silenced in carcinomas by CpG methylation," (in eng), *Mol Cancer Res*, vol. 12, no. 2, pp. 228-38, Feb 2014, doi: 10.1158/1541-7786.Mcr-13-0195.
- [142] J. E. Choi *et al.*, "Aberrant methylation of ADAMTS1 in non-small cell lung cancer," (in eng), *Cancer Genet Cytogenet*, vol. 187, no. 2, pp. 80-4, Dec 2008, doi: 10.1016/j.cancergencyto.2008.08.001.
- [143] R. Rabadán *et al.*, "Identification of relevant genetic alterations in cancer using topological data analysis," (in eng), *Nat Commun*, vol. 11, no. 1, p. 3808, Jul 30 2020, doi: 10.1038/s41467-020-17659-7.
- [144] Z. Hu *et al.*, "Revealing Missing Human Protein Isoforms Based on Ab Initio Prediction, RNA-seq and Proteomics," (in eng), *Sci Rep*, vol. 5, p. 10940, Jul 9 2015, doi: 10.1038/srep10940.
- [145] S. D. Wainwright, J. Bondeson, and C. E. Hughes, "An alternative spliced transcript of ADAMTS4 is present in human synovium from OA patients," (in eng), *Matrix Biol*, vol. 25, no. 5, pp. 317-20, Jul 2006, doi: 10.1016/j.matbio.2006.03.006.
- [146] M. Kashiwagi *et al.*, "Altered proteolytic activities of ADAMTS-4 expressed by C-terminal processing," (in eng), *J Biol Chem*, vol. 279, no. 11, pp. 10109-19, Mar 12 2004, doi: 10.1074/jbc.M312123200.
- [147] S. Santamaria *et al.*, "Exosites in Hypervariable Loops of ADAMTS Spacer Domains control Substrate Recognition and Proteolysis," (in eng), *Sci Rep*, vol. 9, no. 1, p. 10914, Jul 29 2019, doi: 10.1038/s41598-019-47494-w.
- [148] K. Fushimi, L. Troeberg, H. Nakamura, N. H. Lim, and H. Nagase, "Functional differences of the catalytic and non-catalytic domains in human ADAMTS-4 and ADAMTS-5 in aggrecanolytic activity," (in eng), *J Biol Chem*, vol. 283, no. 11, pp. 6706-16, Mar 14 2008, doi: 10.1074/jbc.M708647200.
- [149] Z. Balic, S. Misra, B. Willard, D. P. Reinhardt, S. S. Apte, and D. Hubmacher, "Alternative splicing of the metalloprotease ADAMTS17 spacer regulates secretion and modulates autoproteolytic activity," (in eng), *Faseb j*, vol. 35, no. 2, p. e21310, Feb 2021, doi: 10.1096/fj.202001120RR.
- [150] R. P. Somerville *et al.*, "ADAMTS7B, the full-length product of the ADAMTS7 gene, is a chondroitin sulfate proteoglycan containing a mucin domain," (in eng), *J Biol Chem*, vol. 279, no. 34, pp. 35159-75, Aug 20 2004, doi: 10.1074/jbc.M402380200.
- [151] D. D. Wagner and V. J. Marder, "Biosynthesis of von Willebrand protein by human endothelial cells: processing steps and their intracellular localization," (in eng), *J Cell Biol*, vol. 99, no. 6, pp. 2123-30, Dec 1984, doi: 10.1083/jcb.99.6.2123.
- [152] J. E. Sadler, "Biochemistry and genetics of von Willebrand factor," (in eng), *Annu Rev Biochem*, vol. 67, pp. 395-424, 1998, doi: 10.1146/annurev.biochem.67.1.395.
- [153] L. Li, S. Yuan, X. Zhao, and T. Luo, "ADAMTS8 is frequently down-regulated in colorectal cancer and functions as a tumor suppressor," (in eng), *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 524, no. 3, pp. 663-671, Apr 9 2020, doi: 10.1016/j.bbrc.2020.01.020.
- [154] F. Vázquez *et al.*, "METH-1, a human ortholog of ADAMTS-1, and METH-2 are members of a new family of proteins with angio-inhibitory activity," (in eng), *J Biol Chem*, vol. 274, no. 33, pp. 23349-57, Aug 13 1999, doi: 10.1074/jbc.274.33.23349.

- [155] Y. Zhou *et al.*, "Quantification of Von Willebrand Factor Cleavage by adamts-13 in Patients Supported by Left Ventricular Assist Devices," (in eng), *Asaio j*, vol. 63, no. 6, pp. 849-853, Nov/Dec 2017, doi: 10.1097/mat.0000000000000602.
- [156] L. A. Collins-Racie *et al.*, "ADAMTS-8 exhibits aggrecanase activity and is expressed in human articular cartilage," (in eng), *Matrix Biol*, vol. 23, no. 4, pp. 219-30, Jul 2004, doi: 10.1016/j.matbio.2004.05.004.
- [157] J. B. Bard, M. K. Bansal, and A. S. Ross, "The extracellular matrix of the developing cornea: diversity, deposition and function," (in eng), *Development*, vol. 103 Suppl, pp. 195-205, 1988, doi: 10.1242/dev.103.Supplement.195.
- [158] C. J. Liu, "The role of ADAMTS-7 and ADAMTS-12 in the pathogenesis of arthritis," (in eng), *Nat Clin Pract Rheumatol*, vol. 5, no. 1, pp. 38-45, Jan 2009, doi: 10.1038/ncprheum0961.
- [159] A. J. Fosang and C. B. Little, "Drug insight: aggrecanases as therapeutic targets for osteoarthritis," (in eng), *Nat Clin Pract Rheumatol*, vol. 4, no. 8, pp. 420-7, Aug 2008, doi: 10.1038/ncprheum0841.
- [160] B. L. Tang, "ADAMTS: a novel family of extracellular matrix proteases," (in eng), *Int J Biochem Cell Biol*, vol. 33, no. 1, pp. 33-44, Jan 2001, doi: 10.1016/s1357-2725(00)00061-3.
- [161] J. C. Rodríguez-Manzaneque *et al.*, "ADAMTS1 cleaves aggrecan at multiple sites and is differentially inhibited by metalloproteinase inhibitors," (in eng), *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 293, no. 1, pp. 501-8, Apr 26 2002, doi: 10.1016/s0006-291x(02)00254-1.
- [162] J. Xue, J. Wang, Q. Liu, and A. Luo, "Tumor necrosis factor- α induces ADAMTS-4 expression in human osteoarthritis chondrocytes," (in eng), *Mol Med Rep*, vol. 8, no. 6, pp. 1755-60, Dec 2013, doi: 10.3892/mmr.2013.1729.
- [163] Y. D. Liu *et al.*, "Systemic administration of strontium or NBD peptide ameliorates early stage cartilage degradation of mouse mandibular condyles," (in eng), *Osteoarthritis Cartilage*, vol. 24, no. 1, pp. 178-187, Jan 2016, doi: 10.1016/j.joca.2015.07.022.
- [164] S. L. Turner, D. Mangnall, N. C. Bird, R. A. Bunning, and M. E. Blair-Zajdel, "Expression of ADAMTS-1, ADAMTS-4, ADAMTS-5 and TIMP3 by hepatocellular carcinoma cell lines," (in eng), *Int J Oncol*, vol. 41, no. 3, pp. 1043-9, Sep 2012, doi: 10.3892/ijo.2012.1525.
- [165] A. N. Corps, G. C. Jones, R. L. Harrall, V. A. Curry, B. L. Hazleman, and G. P. Riley, "The regulation of aggrecanase ADAMTS-4 expression in human Achilles tendon and tendon-derived cells," (in eng), *Matrix Biol*, vol. 27, no. 5, pp. 393-401, Jun 2008, doi: 10.1016/j.matbio.2008.02.002.
- [166] Y. Zhang *et al.*, "Noninvasive photoacoustic microscopy of living cells in two and three dimensions through enhancement by a metabolite dye," (in eng), *Angew Chem Int Ed Engl*, vol. 50, no. 32, pp. 7359-63, Aug 1 2011, doi: 10.1002/anie.201101659.
- [167] K. J. Livak and T. D. Schmittgen, "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method," (in eng), *Methods*, vol. 25, no. 4, pp. 402-8, Dec 2001, doi: 10.1006/meth.2001.1262.
- [168] E. R. Fearon and B. Vogelstein, "A genetic model for colorectal tumorigenesis," (in eng), *Cell*, vol. 61, no. 5, pp. 759-67, Jun 1 1990, doi: 10.1016/0092-8674(90)90186-i.
- [169] Y. Tabana, S. Dahham, A. Shah, and A. Majid, "Major signaling pathways of colorectal carcinogenesis," *Recent Adv Colon Cancer*, vol. 1, pp. 1-2, 2016.

- [170] Z. Koveitypour *et al.*, "Signaling pathways involved in colorectal cancer progression," (in eng), *Cell Biosci*, vol. 9, p. 97, 2019, doi: 10.1186/s13578-019-0361-4.
- [171] R. Derynck, R. J. Akhurst, and A. Balmain, "TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression," (in eng), *Nat Genet*, vol. 29, no. 2, pp. 117-29, Oct 2001, doi: 10.1038/ng1001-117.
- [172] Y. Takagi *et al.*, "Somatic alterations of the SMAD-2 gene in human colorectal cancers," (in eng), *Br J Cancer*, vol. 78, no. 9, pp. 1152-5, Nov 1998, doi: 10.1038/bjc.1998.645.
- [173] S. K. Halder, G. Rachakonda, N. G. Deane, and P. K. Datta, "Smad7 induces hepatic metastasis in colorectal cancer," (in eng), *Br J Cancer*, vol. 99, no. 6, pp. 957-65, Sep 16 2008, doi: 10.1038/sj.bjc.6604562.
- [174] M. Iglesias, P. Frontelo, C. Gamallo, and M. Quintanilla, "Blockade of Smad4 in transformed keratinocytes containing a Ras oncogene leads to hyperactivation of the Ras-dependent Erk signalling pathway associated with progression to undifferentiated carcinomas," (in eng), *Oncogene*, vol. 19, no. 36, pp. 4134-45, Aug 24 2000, doi: 10.1038/sj.onc.1203764.
- [175] M. Gulubova, I. Manolova, J. Ananiev, A. Julianov, Y. Yovchev, and K. Peeva, "Role of TGF-beta1, its receptor TGFbetaRII, and Smad proteins in the progression of colorectal cancer," (in eng), *Int J Colorectal Dis*, vol. 25, no. 5, pp. 591-9, May 2010, doi: 10.1007/s00384-010-0906-9.
- [176] N. Rocks *et al.*, "Emerging roles of ADAM and ADAMTS metalloproteinases in cancer," *Biochimie*, vol. 90, no. 2, pp. 369-379, 2008/02/01/ 2008, doi: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2007.08.008>.
- [177] N. Théret, F. Bouezzedine, F. Azar, M. Diab-Assaf, and V. Legagneux, "ADAM and ADAMTS Proteins, New Players in the Regulation of Hepatocellular Carcinoma Microenvironment," (in eng), *Cancers (Basel)*, vol. 13, no. 7, Mar 29 2021, doi: 10.3390/cancers13071563.
- [178] S. Cal and C. López-Otín, "ADAMTS proteases and cancer," *Matrix Biology*, vol. 44-46, pp. 77-85, 2015/05/01/ 2015, doi: <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2015.01.013>.
- [179] X. Zhang *et al.*, "The potential prognostic values of the ADAMTS-like protein family: an integrative pan-cancer analysis," (in eng), *Ann Transl Med*, vol. 9, no. 20, p. 1562, Oct 2021, doi: 10.21037/atm-21-4946.
- [180] L. A. Collins-Racie *et al.*, "ADAMTS-8 exhibits aggrecanase activity and is expressed in human articular cartilage," *Matrix Biology*, vol. 23, no. 4, pp. 219-230, 2004/07/01/ 2004, doi: <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2004.05.004>.
- [181] J. Omura *et al.*, "ADAMTS8 Promotes the Development of Pulmonary Arterial Hypertension and Right Ventricular Failure: A Possible Novel Therapeutic Target," (in eng), *Circ Res*, vol. 125, no. 10, pp. 884-906, Oct 25 2019, doi: 10.1161/circresaha.119.315398.
- [182] T. Ayanoglu, H. Atalar, E. Esen, M. B. Ataoğlu, S. Turanlı, and K. Demircan, "The role of ADAMTS genes in the end stage of hip osteoarthritis," (in eng), *Acta Orthop Traumatol Turc*, vol. 53, no. 2, pp. 140-144, Mar 2019, doi: 10.1016/j.aott.2018.12.007.
- [183] H. C. Lee *et al.*, "The Therapeutic Potential of ADAMTS8 in Lung Adenocarcinoma without Targetable Therapy," (in eng), *J Pers Med*, vol. 12, no. 6, May 30 2022, doi: 10.3390/jpm12060902.

- [184] L. Kubiczikova, L. Sedlarikova, R. Hajek, and S. Sevcikova, "TGF- β – an excellent servant but a bad master," *Journal of Translational Medicine*, vol. 10, no. 1, p. 183, 2012/09/03 2012, doi: 10.1186/1479-5876-10-183.
- [185] Y. Zhang, P. B. Alexander, and X. F. Wang, "TGF- β Family Signaling in the Control of Cell Proliferation and Survival," (in eng), *Cold Spring Harb Perspect Biol*, vol. 9, no. 4, Apr 3 2017, doi: 10.1101/cshperspect.a022145.
- [186] M. J. Goumans, G. Valdimarsdottir, S. Itoh, A. Rosendahl, P. Sideras, and P. ten Dijke, "Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors," (in eng), *Embo j*, vol. 21, no. 7, pp. 1743-53, Apr 2 2002, doi: 10.1093/emboj/21.7.1743.
- [187] S. M. Zhu, Y. R. Park, S. Y. Seo, I. H. Kim, S. T. Lee, and S. W. Kim, "Parthenolide inhibits transforming growth factor β 1-induced epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer cells," (in eng), *Intest Res*, vol. 17, no. 4, pp. 527-536, Oct 2019, doi: 10.5217/ir.2019.00031.
- [188] K. Demircan *et al.*, "ADAMTS-9 is synergistically induced by interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha in OUMS-27 chondrosarcoma cells and in human chondrocytes," (in eng), *Arthritis Rheum*, vol. 52, no. 5, pp. 1451-60, May 2005, doi: 10.1002/art.21010.
- [189] Badshah, II *et al.*, "Differential expression of secreted factors SOSTDC1 and ADAMTS8 cause profibrotic changes in linear morphoea fibroblasts," (in eng), *Br J Dermatol*, vol. 180, no. 5, pp. 1135-1149, May 2019, doi: 10.1111/bjd.17352.