

**T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**



**HEP3B HÜCRELERİNDE VEGF SİTOKİNİNİN ADAMTS-1
GENİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KUBİLAY TUĞRUL GÜNERHAN

BALIKESİR, HAZİRAN - 2015

**T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**



**HEP3B HÜCRELERİNDE VEGF SİTOKİNİNİN ADAMTS-1
GENİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LISANS TEZİ

KUBİLAY TUĞRUL GÜNERHAN

BALIKESİR, HAZİRAN - 2015

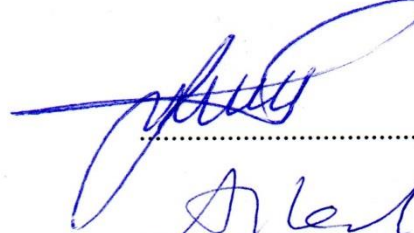
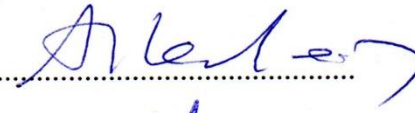

KABUL VE ONAY SAYFASI

Kubilay Tuğrul GÜNERHAN tarafından hazırlanan “**HEP3B HÜCRELERİNDE VEGF SİTOKİNİNİN ADAMTS-1 GENİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 05.06.2015 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman
Prof. Dr. Feray KÖÇKAR


.....

.....

.....

Üye
Prof. Dr. Dilek AZAZ

Üye
Yard. Doç. Dr. Meltem ALPER

Jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş olan bu tez Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Doç. Dr. Necati ÖZDEMİR

.....

Bu tez çalışması TÜBİTAK tarafından 110T961 nolu proje ile desteklenmiştir.

ÖZET

**HEP3B HÜCRELERİNDE VEGF SİTOKİNİNİN ADAMTS-1 GENİ
ÜZERİNE ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
KUBİLAY TUĞRUL GÜNERHAN
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. FERAY KÖÇKAR)**

BALIKESİR, HAZİRAN - 2015

ADAMTS-1 (A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs-1), Trombospondin tip I motifleri ile ADAM ailesi üyelerinden ayrılmakta ve günümüzde ADAMTS ailesinin ilk üyesi olarak tanımlanmaktadır. Yapılan çalışmalar ADAMTS-1'in VEGF'i (Vascular Endothelial Growth Factor) baskılayan bir protein olduğunu göstermektedir. Bir sitokin olan VEGF₁₆₅'in oluşturduğu sinyalin baskılanması anjiyogenezi inhibe eder ve aynı zamanda tümör şiddetini azaltır. Çalışmamızın amacı, VEGF sitokininin normal oksijen ve kimyasal indüklenmiş düşük oksijen koşullarında, ADAMTS-1, VEGF ve HIF1 α gen ifadesi üzerinde etkilerinin araştırılmasıdır.

VEGF₁₆₅ sitokininin karaciğer kanser hücreleri üzerinde, geç saatlerde proliferatif etki gösterdiği, MTT analizi ile belirlenmiştir. Hipoksik koşullar ADAMTS-1 gen ifadesini karaciğer hücrelerinde arttırmaktadır. VEGF₁₆₅ sitokini ise, ADAMTS-1 mRNA'sını her iki koşulda da arttırmaktadır. Bu artış, immunflorasan analizleri ile protein düzeyinde de doğrulanmıştır. ADAMTS-1 promotor parçaları, HEP3B hücrelerine geçici olarak transfekte edilmiş ve VEGF₁₆₅ sitokin uygulanarak transkripsiyonel aktivite belirlenmiştir. VEGF₁₆₅ sitokini normal oksijen şartlarında -1415/+419 ADAMTS-1 promotor parçasında transkripsiyonel aktivitede etki göstermemiştir, ancak hipoksik şartlarda -129/+419 promotor parçasında transkripsiyonel aktivite artış göstermiştir. VEGF₁₆₅ sitokininin ADAMTS-1 üzerinde etkisi, kemik kanseri modelinde mRNA düzeyinde araştırılmış, farklı bir dokuda da benzer etki gösterdiği saptanmıştır. VEGF₁₆₅, HIF1 α mRNA'sını normal oksijen koşullarında bir miktar, düşük oksijen koşullarında daha fazla arttırdığı belirlenmiştir. Ayrıca, VEGF₁₆₅ sitokininin, kendi mRNA'sında önemli bir artış göstermemektedir. VEGF₁₆₅'in hangi hücre içi sinyal iletim yolundan etkisini gösterdiğinin anlaşılması için, farklı yolak inhibitörleri uygulanmış ve ADAMTS-1 üzerinde etkileri araştırılmıştır. Buna göre VEGF₁₆₅, ADAMTS-1 mRNA'sını, normal oksijen koşullarında, MAPK, PI3K ve JNK yolları üzerinden düzenlemektedir. Hipoksik koşullarda PI3K yolunu kullanmaktadır.

ANAHTAR KELİMELER: VEGF, HEP3B, ADAMTS-1

ABSTRACT

DETERMINATION THE EFFECT OF VEGF CYTOKINES ON THE ADAMTS-1 GENE IN THE HEP3B CELLS

MSC THESIS

KUBİLAY TUĞRUL GÜNERHAN

BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

BIOLOGY

(SUPERVISOR:PROF. DR. FERAY KÖÇKAR)

BALIKESİR, JUNE 2015

ADAMTS-1 (A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs-1) was identified as the first member of ADAMTS family. Previous studies show that ADAMTS-1 that is a matrix metalloprotein inhibits VEGF₁₆₅ (Vascular Endothelial Growth Factor). Therefore, the inhibition of VEGF₁₆₅ signal that is main regulator of angiogenesis suppresses angiogenesis and consequently reduces the tumorigenesis. Therefore, the aim of the study is to investigate the effects of VEGF on ADAMTS-1, HIF1 α and VEGF gene expression under normal (normoxic) and low (hypoxic) oxygen conditions.

VEGF₁₆₅ exhibits the proliferative effect at the late time in the HEP3B cells determined by MTT cells. Hypoxic conditions increase the ADAMTS-1 gene expressions in HEP3B cells. VEGF₁₆₅ also upregulates ADAMTS-1 mRNA in normoxia and hypoxia. This increase was confirmed by Immunofluorescence analysis at the protein level. Transcriptional activity of ADAMTS-1 promoter fragments by VEGF₁₆₅ was determined by transient transfection assay followed by reporter assays. VEGF₁₆₅ cytokine does not give any effect for -1415/+419 ADAMTS-1 promoter constructs in normoxic condition. However, VEGF₁₆₅ mediated transcriptional activity of ADAMTS-1 was increased for -129/+419 promoter construct. In addition, the effect of VEGF₁₆₅ on ADAMTS-1 mRNA was also investigated in different cancer model, osteosarcoma model (SAOS-2). Similar increasing effect was observed. VEGF₁₆₅ cytokine led to increase HIF1 α mRNA to some extent, in normoxic condition whereas, drastic increase in hypoxic condition. Interestingly, VEGF₁₆₅ does not give any effect on VEGF mRNA level. Different pathway inhibitors have been used for identifying which pathway is important for VEGF₁₆₅ mediated ADAMTS-1 regulation. VEGF₁₆₅ regulates ADAMTS-1 gene expression via MAPK, PI3K and JNK pathways in normoxic conditions whereas, PI3K is important pathway in hypoxic condition.

KEYWORDS: VEGF, HEP3B, ADAMTS-1

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
TABLO LİSTESİ	vii
KISALTMALAR LİSTESİ.....	viii
ÖNSÖZ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Matriks Metalloproteinaz.....	1
1.2 ADAMTS Ailesi	2
1.2.1 ADAMTS Ailesinin Sınıflandırılması ve Bilinen Fonksiyonları	3
1.2.2 ADAMTS-1	3
1.2.2.1 ADAMTS-1'in Görevi	4
1.2.2.2 ADAMTS-1'in Regülasyonu	5
1.2.2.3 ADAMTS-1 ve Kanser	5
1.3 VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)	7
1.3.1 Anjiyogenez ve VEGF.....	7
1.3.2 VEGF Yolağı	8
1.3.3 ADAMTS-1 ve VEGF İlişkisi	11
1.4 Amaç ve Akış Diyagramı.....	11
2. MATERYAL VE METOT	13
2.1 Materyal	13
2.1.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar	13
2.1.2 Çalışmada Kullanılan Araçlar.....	14
2.1.3 Çalışmada Kullanılan Solüsyonlar.....	15
2.1.4 Çalışmada Kullanılan Vektörler	17
2.2 Metot.....	19
2.2.1 Hücre Kültürü ile İlgili Metotlar.....	19
2.2.1.1 Hücrelerin Açılması	19
2.2.1.2 Hücrelerin Büyütülmesi	19
2.2.1.3 Hücrelerin Pasajlanması.....	19
2.2.1.4 Hücrelerin Dondurulması.....	20
2.2.1.5 Hücrelerin Sayılması.....	20
2.2.1.6 Hipoksik Ortamların Oluşturulması.....	21
2.2.1.7 Sitotoksikite Deneyinin Kurulması	21
2.2.1.8 Sitokin Deneylerinin Kurulması	21
2.2.1.9 İnhibisyon Deneylerinin Kurulması.....	22
2.2.2 Transkripsiyonel Aktivite ile İlgili Metotlar.....	22
2.2.2.1 Kalsiyum Fosfat Presipitasyonu ile Geçici Transfeksiyon	22
2.2.3 RNA ile İlgili Teknikler.....	24
2.2.3.1 RNA İzolasyonunun Yapılması	24
2.2.3.2 RNA Miktarının Spektrofotometrik Olarak Belirlenmesi ve Saflığının Ölçülmesi.....	24
2.2.3.3 RNA Jel Elektroforezi.....	24
2.2.3.4 RT-PCR Reaksiyonu	25

2.2.3.5	Semi Quantitative (SQ) RT-PCR.....	25
2.2.3.6	Agaroz Jel Elektroforezi	26
2.2.3.7	Real Time PCR	27
2.2.3.8	Real Time PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi ve Analiz.....	28
2.2.4	Protein ile İlgili Teknikler.....	28
2.2.4.1	İmmunofloresans Tekniği	28
2.2.4.2	Sonuçların Değerlendirilmesi ve Analiz	29
3.	BULGULAR	30
3.1	VEGF Sitokininin HEP3B Hücre Hattına Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi	31
3.2	VEGF Sitokininin Normal Oksijen ve Hipoksik Koşullarda Etkilerinin Belirlenmesi	32
3.2.1	mRNA Düzeyinde Etkisinin Belirlenmesi.....	33
3.2.1.1	HEP3B Hücresinde mRNA Düzeyinde Etkisinin Belirlenmesi...34	
3.2.1.2	SAOS-2 Hücresinde mRNA Düzeyinde Etkisinin Belirlenmesi .39	
3.2.2	HEP3B Hücrelerinde ADAMTS-1 Proteini Üzerine Etkisinin Belirlenmesi	44
3.2.3	HEP3B Hücrelerinde ADAMTS-1 Promotor Düzeyinde Etkisinin Belirlenmesi	47
3.2.3.1	VEGF Sitokini Uygulanmış Promotor Aktivitelerinin Belirlenmesi	47
3.2.4	HEP3B Hücrelerinde Bazı İnhibitörlerin mRNA Düzeyinde Bazı Genler Üzerine Etkisinin Belirlenmesi	48
3.2.4.1	ADAMTS-1 Ekspresyon Seviyesine Etkilerinin Belirlenmesi49	
3.2.4.2	HIF1 α Ekspresyon Seviyesine Etkilerinin Belirlenmesi.....50	
3.2.4.3	VEGF Ekspresyon Seviyesine Etkilerinin Belirlenmesi.....51	
4.	SONUÇ VE ÖNERİLER	53
5.	KAYNAKLAR.....	56
6.	EKLER.....	63

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1 : ADAMTS ailesi ve sınıflandırılması.....	3
Şekil 1.2 : ADAMTS 1 proteinin domain yapısı.....	4
Şekil 1.3 : VEGF yolağı	10
Şekil 2.1 : pMetLuc kontrol vektörü haritası.....	17
Şekil 2.2 : pMetLuc reporter vektörü haritası.....	18
Şekil 2.3 : pSEAP-2 vektörü haritası.....	18
Şekil 2.4 : Thoma lamı.....	20
Şekil 2.5 : MTT metodunda gerçekleşen kimyasal değişim	21
Şekil 3.1 : Çalışılan hücre hatları görüntüsü: (1) HEP3B, (2) SAOS-2	31
Şekil 3.2 : Hep3B hücrelerinde normal oksijen koşullarında VEGF sitokininin gradiyenti ve hücre canlılığına etkileri.....	31
Şekil 3.3 : Hep3B hücrelerinde hipoksik koşullarda VEGF sitokininin gradiyenti ve hücre canlılığına etkileri.....	32
Şekil 3.4 : Farklı dozlarda VEGF sitokininin normal oksijen koşullarındaki HEP3B hücreleri ADAMTS-1 ekspresyonuna etkisi.....	32
Şekil 3.5 : VEGF sitokini uygulanmış HEP3B hücresi 1, 3, 6 ve 24 saat RNA görüntüleri.....	33
Şekil 3.6 : VEGF sitokini uygulanmış HEP3B hücresi 1, 3, 6 ve 24 saat RT-PCR görüntüleri	34
Şekil 3.7 : HEP3B’lerde 6 saat sonunda ADAMTS-1 ve HIF1 α genlerinin normal oksijen ve hipoksik koşullardaki ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması.....	35
Şekil 3.8 : VEGF’in normal oksijen koşullarında ADAMTS-1 ekspresyonuna etkisi	36
Şekil 3.9 : VEGF’in hipoksik koşullarda ADAMTS-1 ekspresyonuna etkisi	36
Şekil 3.10: VEGF’in normal koşullarda HIF1 α ekspresyonuna etkisi	37
Şekil 3.11: VEGF’in hipoksik koşullarda HIF1 α ekspresyonuna etkisi.....	37
Şekil 3.12: VEGF’in normal koşullarda VEGF ekspresyonuna etkisi	38
Şekil 3.13: VEGF’in hipoksik koşullarda VEGF ekspresyonuna etkisi.....	38
Şekil 3.14: SAOS-2’lerde 6 saat sonunda ADAMTS-1 ve HIF1 α genlerinin normal oksijen ve hipoksik koşullardaki ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması.....	39
Şekil 3.15: VEGF sitokininin normal oksijen koşullarında ADAMTS-1 ekspresyonuna etkisi	40
Şekil 3.16: VEGF sitokininin hipoksik koşullarda ADAMTS-1 ekspresyonuna etkisi	40
Şekil 3.17: VEGF’in normal koşullarda HIF1 α ekspresyonuna etkisi	41
Şekil 3.18: VEGF’in hipoksik koşullarda HIF1 α ekspresyonuna etkisi.....	42
Şekil 3.19: VEGF’in normal koşullarda VEGF ekspresyonuna etkisi	43
Şekil 3.20: VEGF’in hipoksik koşullarda VEGF ekspresyonuna etkisi.....	43
Şekil 3.21: Normal oksijen ve hipoksik koşullarda ADAMTS-1 proteini densitometrik analizi	44
Şekil 3.22: Normal oksijen koşullarda HEP3B hücrelerinde ADAMTS-1 proteini (1) ve çekirdek boyaması (2)	45

Şekil 3.23: Normal koşullarda VEGF sitokini uygulanmış HEP3B hücrelerinde ADAMTS-1 proteini (1) ve çekirdek boyaması (2)..	45
Şekil 3.24: ADAMTS-1 proteinine normal oksijen koşullarında VEGF sitokininin etkisinin immunofloresans yöntemiyle elde edilen sonuçlarla densitometrik olarak değerlendirilmesi	45
Şekil 3.25: Hipoksik koşullarda HEP3B hücrelerinde ADAMTS-1 proteini...	46
Şekil 3.26: Hipoksik koşullarda VEGF sitokini uygulanmış HEP3B hücrelerinde ADAMTS-1 proteini	46
Şekil 3.27: ADAMTS-1 proteinine hipoksik koşullarda VEGF sitokininin etkisinin immunofloresans yöntemiyle elde edilen sonuçlarla densitometrik olarak değerlendirilmesi	46
Şekil 3.28: Promotor (P) Parçalarının temsili şekli; P1:(-1415/+419), P4:(-747/+419), P7:(-129/+419)	47
Şekil 3.29: Normal oksijen koşullarda VEGF sitokini uygulanmış P1, P4 ve P7 konstraklarının aktivite sonuçları	47
Şekil 3.30: Hipoksik koşullarda VEGF sitokini uygulanmış P1, P4 ve P7 konstraklarının aktivite sonuçları	48
Şekil 3.31: VEGF sitokininin normal oksijen koşullarında ADAMTS-1 ekspresyonuna etkisi	49
Şekil 3.32: VEGF sitokininin hipoksik koşullarda ADAMTS-1 ekspresyonuna etkisi	50
Şekil 3.33: VEGF'in normal koşullarda HIF1 α ekspresyonuna etkisi	50
Şekil 3.34: VEGF'in hipoksik koşullarda HIF1 α ekspresyonuna etkisi.....	51
Şekil 3.35: VEGF'in normal koşullarda VEGF ekspresyonuna etkisi	51
Şekil 3.36: VEGF'in hipoksik koşullarda VEGF ekspresyonuna etkisi.....	52

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1 : Çalışmada kullanılan kimyasallar	13
Tablo 2.2 : Çalışmada kullanılan araçlar ve üretici firmaları	14
Tablo 2.3 : Hücre kültüründe kullanılan solüsyonlar	15
Tablo 2.4 : Transfeksiyon çalışmalarında kullanılan solüsyonlar	15
Tablo 2.5 : RNA çalışmalarında kullanılan solüsyonlar	16
Tablo 2.6 : İmmunofloresans çalışmalarında kullanılan solüsyonlar	16
Tablo 2.7 : İnhibisyonda kullanılan inhibitörlerin hazırlanışı	17
Tablo 2.8 : RT-PCR bileşenleri ve miktarları	25
Tablo 2.9 : SQ RT-PCR bileşenleri ve miktarları	25
Tablo 2.10 : SQ RT-PCR koşulları.....	26
Tablo 2.11 : Real Time PCR bileşenleri ve miktarları	27
Tablo 2.12 : Kullanılan primerlerin dizi, uzunluk ve sıcaklıkları	27
Tablo 2.13 : VEGF ve HIF1 α primerleri için Real Time PCR koşulları.....	27
Tablo 2.14 : ADAMTS-1 ve H β 2M primerleri için Real Time PCR koşulları.....	28
Tablo 3.1 : İnhibisyon deneyi inhibisyon sonuç özet tablosu	52

KISALTMALAR LİSTESİ

dNTP	Deoksiribonükleotridtrifosfat
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RT-PCR	Reverse Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SQ-PCR	Semi Quantitative Polimeraz Zincir Reaksiyonu
UV	Ultra Viyole
RPM	Dakikadaki Dönüş Sayısı
µg	Mikrogram
ng	Nanogram
Ct	Cycle Treshold
HIF1α	Hypoxia Induced Factor 1α
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
ADAMTS	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs
ADAMTS-1	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs-1
Hβ2M	Human Beta 2 Microglobulin
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit
cDNA	Complementary DNA
RNA	Ribonükleik Asit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
FCS	Fetal Sığır Serumumu
PBS	Phosphate Buffer Saline
DEPC	Dietilpirokarbonat
BSA	Sığır Serum Albümin
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
DMSO	Dimetil Sülfoksit
EDTA	Ethylendiamintetrasedik Asit
MTT	((3-(4, 5- dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide)
MOPS	3-(N-morpholino) propanesulfonic acid
DAPI	(4',6-diamidino-2-phenylindole)
T.E	Tripsin-EDTA
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
FA	Formaldehit Agaroz
HEP3B	İnsan Karaciğer Karsinomu
SAOS-2	İnsan Kemik Karsinomu
PMA	Protein Kinase C İnhibitörü
MEK1	MAPK/ERK İnhibitörü
SP600125	JNK İnhibitörü
Du145	İnsan Prostat Karsinomu
PC3	İnsan Prostat Karsinomu
LNCaP	İnsan Prostat Karsinomu

ÖNSÖZ

Yüksek lisans çalışmam sırasında üzerimde büyük emeği olan ve sürekli yol gösteren hocam Prof. Dr. Feray Köçkar'a sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.

Yüksek lisans süreci benim için her ne kadar yorucu ve sıkıntılı geçse de çoğu zaman yaptıklarımın lezzet aldım ve bu yolda devam etme isteği içerisinde oldum. Bu isteğimin devam etmesi noktasında her zaman desteklerini sürdüren kalbimdeki yerleri tarif edilemez aileme, pek kıymetli ve değerli eşime şükranlarımı sunuyorum.

Üzerimde emeği olan ve her zaman yardımlarını esirgemeyen değerli laboratuvar arkadaşlarıma ve hocalarıma minnetlerimi sunarım. İyi ki varsınız.

1. GİRİŞ

1.1 Matriks Metalloproteinaz

Ekstraselüler matriksin (ECM); memeli dokuları içindeki hücrelerin arasında bulunan onları destekleyen ve hücre proliferasyonunda görev alan, kompleks bir yapıya verilen isimdir. ECM'in yıkımında, proteaz aktivitesine sahip domain yapılarına göre protein aileleri olarak gruplandırılan birçok molekül görev alır. Bu gruplardan ilki serin proteazlardır. İkinci grup matriks metalloproteinazlardır (MMP). Üçüncü grup ise kemik farklılaşma protein1/tolloid ailesi metalloproteinazlarıdır. Son grup ise proteolizde ve hücre-hücre adezyonunda görevli ADAM (bir disintegrin ve metalloproteaz) veya MDC (metalloproteaz/disintegrin/sistein) olarak adlandırılan transmembran glikoprotein ailesidir [1-12].

MMP'ler, bazal membran makromoleküllerinin ve çeşitli ECM elemanlarının yıkılmasını katalize eden ve Zn^{++} ve Ca^{++2} 'a bağımlı bir nötral endopeptidaz ailesidir [13,14]. Çeşitlerine göre oldukça farklı hücre tipleri tarafından ekspre edilirler; endotel hücreleri, epitel hücreleri, fibroblastlar, kondrositler, keratinositler, makrofajlar, mezenşimal hücreler, nötrofiller, osteoblastlar, T lenfositler, trombositler, trofoblastlar, vasküler düz kas hücreleri, gibi [15,16]. Bütün MMP'ler başlangıçta inaktif proenzimler olarak salınırlar. Daha sonra katalitik parçalarının aktif kısmında bulunan Zn^{++} ve propeptidlerinde mevcut olan tiyol grubu arasındaki koordinasyonun bozulmasıyla Pro-MMP aktivasyonu gerçekleşir.

Bu enzim ailesinin bugüne dek klonlanmış ve sekanslanmış 66'dan fazla üyesi bulunmuştur. Bunlardan 23'ünün insanlarda sentezlendiği tespit edilmiştir. Bu üyeler substrat özgüllüğüne göre; jelatinazlar, kollajenazlar, membran tipi MMP'ler (MTMMPs), stromelisinler, ve diğerleri olmak üzere 5 alt gruba ayrılmışlardır [17].

MMP'ler normal ve sağlıklı, dinlenme halindeki dokularda ya çok az eksprese edilirler ya da eksprese edilemezler. Ancak herhangi bir dokunun

onarılması ve yenilenmesi durumunda ekspresyon seviyesi artar. Büyüme ve gelişme için bağ doku yenilenmesi gereklidir. Ayrıca kemik veya kırık ve bunlarla ilişkili dokuların kollajen yapısının bozulması, enflamasyon ve kanser ile ilişkili birçok hastalık matriks yenilenmesi ile beraberdir. Bu organizasyonun bozulması tümör invazyonunu ve malignan büyümenin ayırt edici bir özelliğidir. Yapılan çalışmalar da görülmüştür ki MMP'ler tümör hücrelerinin metastatik potansiyelinde ve invaziv davranışlarında önemlidir [18].

MMP'ler, ECM'in yıkılmasının yanı sıra apoptozis, anjiyojenez, endometriyal siklus, değişik dokuların yeniden yapılanması, immun cevap gelişimi, kemiğin yeniden modellenmesi, ovulasyon, postpartum uterin involusyonu, servikal dilatasyon ve yara iyileşmesinde rol alırlar [15].

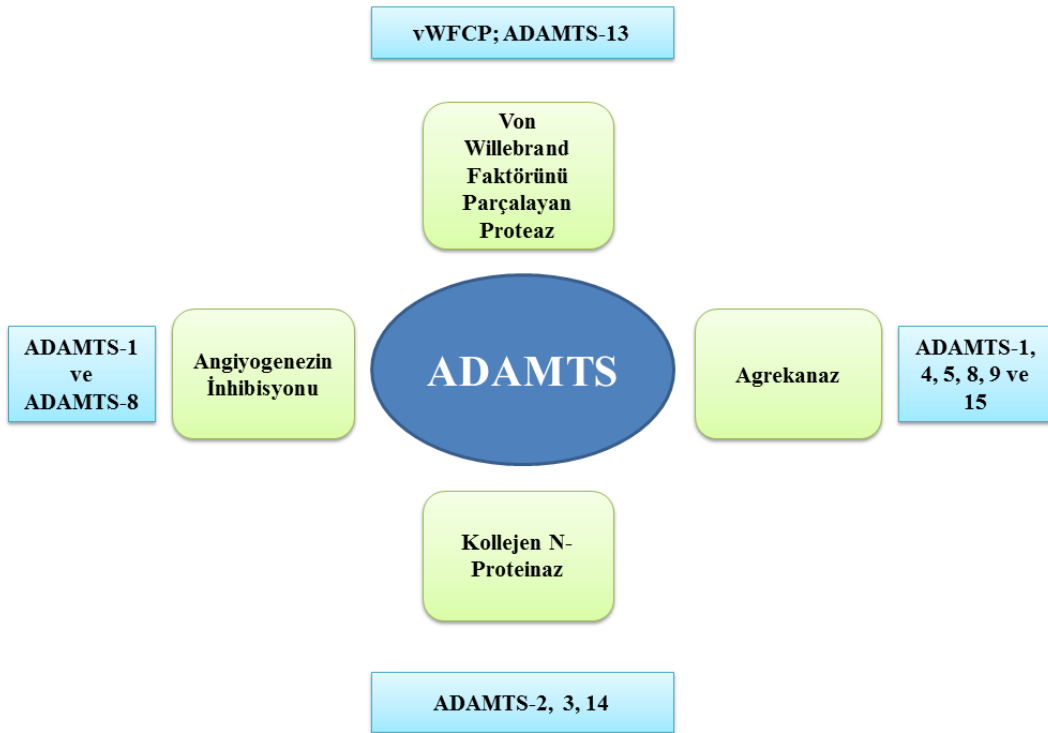
1.2 ADAMTS Ailesi

ADAM ailesindeki proteinler; çinko bağımlı, hücre membranında yer alan ve çok sayıda domaine sahip olan metalloproteinazlardır. ADAM'lar disintegrin ve metalloproteinaz domainleri vesilesiyle, adezyon proteinlerinin ve de proteinazların özelliklerini yapılarında bulundurlar. Bu özellikler ADAM'ları şu konularda önemli yapar; diğer hücre yüzey proteinlerinden ayrılma ve hücre-hücre etkileşimleri ile hücre-matriks etkileşimleri [9-12]. Bugüne kadar ADAM ailesine ait bazılarının fonksiyonları belirlenmiş olan ait 30'a yakın protein tanımlanmıştır.

1996 yılında Kuno ve arkadaşları tarafından yeni bir grup proteinin varlığı gösterilmiştir [3]. Bu protein grubu ADAM ailesine çok benzemekte, trombospondin tip 1 (TSP1) motifleri taşımakta ve enflamasyonla da ilişkilidir. Kuno ve arkadaşları, bu yeni protein grubunu tanımlamak için ADAMTS (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs) adını kullanmışlardır. Bu grup ADAM ailesi üyelerinin aksine, hücre membranında yer almazlar ve ekstrasellüler matrikse salgılanırlar. ADAMTS'ler; ADAM ailesi üyelerinin sahip oldukları tüm domainleri içerirler ancak kendilerine özgü TSP1 motiflerine de sahip olduklarından dolayı ADAM üyeleri olarak kabul edilmemişlerdir ve yeni bir aileyi oluşturmuşlardır [3].

1.2.1 ADAMTS Ailesinin Sınıflandırılması ve Bilinen Fonksiyonları

ADAMTS'ler, 4 özellik dikkate alınarak gruplandırılmıştır; domainlerin organizasyonu, protein dizisi, gen dizisi korunmuşluğu ve substrat tercihi. Bu gruplar da şu şekildedir; prokollajenin N-ucundaki propeptitlerin uzaklaştırılıp kollajene dönüşmesinde rol oynayanlar (Kollajen N-proteinazlar; ADAMTS-2, 3 ve 14), matrix proteoglikanı agrekanın parçalanmasında agrekanaz aktivitesine sahip olanlar (Agrekanazlar; ADAMTS-1, 4, 5, 8, 9, ve 15), anjiogenezin inhibisyonunda görevliler (anti-anjiyogenetik ADAMTS'ler ADAMT-1 ve 8), son olarak da kan pıhtılaşması homeostazda von Willebrand faktörünü parçalayan proteaz (vWFCP; ADAMTS-13) [9-12,19,20].



Şekil 1.1: ADAMTS ailesi ve sınıflandırılması [28]'den uyarlanmıştır.

1.2.2 ADAMTS-1

Kuno ve arkadaşları tarafından 1996 yılında tanımlanmıştır [3]. ADAMTS ailesinin ilk üyesidir. Araştırmacılar farelerde, hücre hattı enjekte ederek kaşeksi

oluşturan bir kolon kanseri oluşturarak bu kanser türünde seçici olarak ekspre olan genleri belirlemiştir. Yapılan tarama sonucu yeni bir tümör seçici genin cDNA'sının varlığı tespit edilmiştir. Yeni bulunan cDNA'nın hem yılan zehri metalloproteinazları hem de trombospondinlerle bir dizi benzerliğinin var olduğu tespit edilmiştir. Bu yeni cDNA klonu ADAMTS-1 (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs) olarak adlandırılmıştır.

ADAMTS-1 8 domain içermektedir; 1) pre-domain(Pre), 2) pro-domain(Pro), 3) metalloproteinaz domain, 4) disintegrin benzeri domain(Dis), 5) TSP-1 motifi içeren trombospondin homolog domain(TS), 6) Sisteince zengin domain(Cys), 7) Spacer bölge ve 8) Karboksi terminal TSP motifleridir [12,19].



Şekil 1.2: ADAMTS 1 proteinin domain yapısı [19]'dan uyarlanmıştır.

1.2.2.1 ADAMTS-1'in Görevi

Bazı araştırmacılar tarafından ADAMTS-1 proteinin anti-anjiyogenetik etki ile agrekanaz aktivitesine sahip olduğu gösterilmiştir. ADAMTS-1'in agrekandan başka kan damarlarındaki versikani da parçalayabildiği bilinmektedir [21,22]. Yapılan çalışmalardan bazıları bizleri şu düşünceye sokar, ADAMTS-1 ekstrasellüler matriks üzerindeki etkisi folikül üretilmesi için zorunlu, versikani degrede edici etkisinin ise ovulasyonun gerçekleşebilmesi için zorunludur [23-25]. 2000 yılında Shindo ve arkadaşlarının ADAMTS-1 susturulmuş farelerle yaptıkları çalışmada; uterus ve yumurtalık histolojisinde değişikliklerle beraber seyreden azalmış fertilitte, büyüme geriliği ve yağ dokusu malformasyonu tespit etmişlerdir [26].

2000 yılında Miles ve arkadaşları ADAMTS-1'in kemik ve osteoblastlardaki ekspresyonunun paratiroid hormonla arttığını göstermişlerdir [27].

Jones ve arkadaşları 2005 yılında yayımlanan makaleye göre ADAMTS-1, -4, -5, -8, -9, -15 ve -20'yi hiyalektanları (hiyaluronana bağlanan agrekan, brevikan,

versikan vb. proteoglikanları) yıktıklarını bulmuşlar ve bundan ötürü bu proteinleri hiyalektanazlar olarak sınıflandırmışlardır [20].

1.2.2.2 ADAMTS-1'in Regülasyonu

ADAMTS-1 proteinlerinin transkripsiyonel regülasyonu ile ilgili çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Yapılan çalışmalar da fare ve insan ADAMTS-1 ile ilgilidir.

1996 yılında Kuno ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada fare ADAMTS-1 geninin promotörü klonlanarak karakterize edilmiştir [3]. Yapılan bir başka çalışmada da DNA metillenmesinin fare ADAMTS-1 aktivitesinde düşüşe sebebiyet verdiği belirtilmiştir. Bu bize farede ADAMTS-1 aktivitesinin transkripsiyonel düzeyde promotör seviyesinde kontrol edildiğini gösterir [2]. Chou ve arkadaşlar 2008 yılında fare ADAMTS-1 promotörüne HDAC inhibitörü olarak görev yapan TSA uygulamasından sonra SP1 ve HDAC6 bağlanmasının azaldığını SP1'in azalmasıyla da ADAMTS-1 ekspresyonunun azalttığı açıklanmıştır [4-5].

Hatipoğlu ve arkadaşlarının 2009 yılındaki çalışmalarında şunu gözlemlemişlerdir; endotel hücrelerinde hipoksik koşulda, ADAMTS-1 mRNA ve protein ekspresyon miktarı hızla artmış ancak diğer hücre tiplerinde bir artış görülmemiştir. Endotel hücrelerinde ADAMTS-1 hipoksik koşullar altında geçici olarak arttığı ve HIF1 α 'in bağlanmasıyla transkripsiyonu yapıldığı anlaşılmıştır ve ADAMTS-1 in hipoksiya ile regüle edilen bir gen olduğu ifade edilmiştir [6].

1.2.2.3 ADAMTS-1 ve Kanser

Antianjiogenetik aktiviteye sahip olduğundan ADAMTS-1'in farklı tipteki kanserlerde rolünün ne olduğunun araştırılması gerekliliği görülmüştür. Malign tümörlerin en belirgin özellikleri, çevrelerindeki dokulara invaze olabilecek donanımda olmaları, vasküler ve lenfatik sisteme girerek metastaz yoluyla en uzaklardaki organlara dahi yayılabilmeleridir. Doku matriksinin yıkımı bu patolojik olayların tümünün gerçekleşmesinde önemli bir yere sahiptir. Bu sebepten ötürü

kanser gelişimi ve metastazında ADAMTS gibi matriks metaloproteazlar önemli roller üstlenirler [1].

Kanserli hücrelerde ADAMTS-1 ile alakalı yapılan güncel çalışmalara tarihsel kronoloji olarak bakacak olursak; 2001 de yayınladıkları makaleye göre Masui ve arkadaşları inceledikleri 16 hepatoselüler karsinomalarda (HCC) vakasında kanser dokusunda ADAMTS-1 mRNA ekspresyonu seviyelerini tespit etmişlerdir. Bu ekspresyon seviyelerini siroz hastalarından alınan karaciğer dokusundaki ADAMTS-1 geni mRNA ekspresyon seviyesi ile karşılaştırdıklarında, HCC' de ADAMTS-1 mRNA ekspresyon seviyesinin azaldığını bulgusuna ulaşmışlardır [7].

Yine 2001 yılındaki makalesinde Masui ve arkadaşları pankreas kanserinde ADAMTS-1, ADAMTS-8'i ile ilgili bulgulardan bahsetmişlerdir. Bu çalışmalarında; pankreas tümörlerinde ADAMTS-1'in ekspresyonunun sağlıklı dokuya kıyasla azaldığını ve daha üst düzeyde ADAMTS-1 ekspresyonunu gösteren hastalarda, retroperitoneal invazyona ve lenf nodu metastazının daha fazla görüldüğünü göstermişlerdir [7].

2005 yılında Porter ve arkadaşları insan meme kanserinde ADAMTS-1'den ADAMTS-20'ye kadar ekspresyon profillerini incelemişlerdir. İnceledikleri neoplastik olmayan meme dokusu ve meme kanseri hücre hattında ADAMTS-1, 3, 5, 8, 9, 10 ve 18'in ekspresyonlarında sürekli olarak azalma olduğunu bulmuşlardır [46].

2006 yılında Lind ve arkadaşları mide ve bağırsak kanserlerinde ADAMTS-1 proteinlerinin ekspresyonunu araştırmışlardır. Yaptıkları çalışmada kalın bağırsak kanseri tümörlerinde ADAMTS-1'in promotor hipermetilasyonu yoluyla inaktivasyona uğradığını ortaya koymuşlardır [2].

Rocks ve arkadaşlarının 2006 yılında yayımlanan makalesinde, insan küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinde ADAMTS-1'in mRNA ekspresyonunun, sağlıklı insan küçük hücreli akciğer dokularına oranla daha az olduğunu bulduklarını bildirmişlerdir [42].

2006'da yayımlanan makaleye göre Canals ve arkadaşları, Prostat stroma hücreleri ile DU145, PC3, LNCaP gibi prostat kanseri hücre hatlarında ADAMTS-1, ADAMTS-4, ADAMTS-5, ADAMTS-9, ADAMTS-15 ve TIMP-3 ekspresyonlarını

incelemişlerdir. Çalışmada stroma hücrelerinde ADAMTS-1, ADAMTS-4, ADAMTS-5, ADAMTS-9, ADAMTS-15 ve TIMP-3 proteinlerinin sürekli olarak eksprese edildiğini ve DU145, PC3, LNCaP gibi prostat kanseri hücre hatlarında ekspresyonlarının da değiştiğini göstermişlerdir [40].

2008'de Gustavsson ve arkadaşlarının androjen bağımsız ve bağımlı prostat kanserlerinde ADAMTS-1 ekspresyonunun azaldığı bulmuşlardır [44].

2009 yılındaki makalelerine göre, Sunay ve arkadaşları tarafından karaciğer hücre hattında (HEP3B) ADAMTS-1 mRNA sının ifade edildiği bildirilmiştir [41].

Yine Sunay ve arkadaşları 2010 yılında yaptıkları çalışma ile PC3 ve DU145'de ADAMTS-1 ve VEGF'in mRNA ekspresyonları araştırılmış ve hücre hatlarının ikisinde de VEGF ekspresyonu görülmüştür. ADAMTS-1 ekspresyonu ise PC3 hücre hattında görülmüştür [45].

2013 yılında yayınlanan, Freitas ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada insan meme kanseri hücre hattında (HUVEC) kanser migrasyonu ve invazyonunun uyarılmasıyla ADAMTS-1'in ekspresyon seviyesinde azalma olduğu tespit edilmiştir [47].

1.3 VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)

1.3.1 Anjiyogenez ve VEGF

Yeni damar yapımı anlamına da gelen anjiyogenez vücutta büyüme, gelişme, embriyogenez, yaraların iyileşmesi gibi durumlarda gerçekleşir. Patolojik anjiyogenez de şu gibi durumlarda görülür; kollajen doku hastalıkları, retinopatiler, psöriasis ve belki de en önemlisi tümörlerdir.

Tümörler yeni damar oluşumu gerçekleştirene kadar damar çapını 1 cm³ hacme kadar büyütebilirler. Bu hacimden sonra büyüme, çoğalma ve metastaz yapmaları için anjiyogeneze ihtiyaç duyarlar. Anjiyogenez için de en önemli molekül VEGF'tir. VEGF 1983 yılında deride damar geçirgenliğini arttıran tümör vasküler

permeabilite faktörü (VPF) şeklinde Senger ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır [36]. Günümüzde VEGF gen ailesinin 7 tane üyesi tanımlanmıştır [37].

VEGF seviyesinin; kolon, meme, tiroid, rektal kanser, akciğer, karaciğer, safra kesesi, over ve uterus kanserlerinde, anjiosarkomlarda, kafaiçi tümörlerde artmış seviyelerde bulunduğu tespit edilmiştir [48].

VEGF geni; kapiller morfogenez ve tümör anjiyogenezi önemli birkaç farklı molekül oluşturmaktadır [29,30]. VEGF düz kas hücreleri, fibroblastlar ve epitel hücreler gibi farklı hücreler tarafından salgılanmaktadır. Salgılanan bu proteinler, tirozin kinaz reseptörleri olan ve endotel hücreleri üzerinde bulunan VEGF'in 3 reseptöründen ikisinin yani VEGFR1 ve VEGFR2'nin aktivasyonu ile fonksiyon gösterir. VEGFR3 lenf damarları üzerinde bulunur [31,32].

VEGF gen ailesinden biri olan VEGFA'nın 9 tane izoformu tanımlanmıştır. Tanımlanan izoformlardan biri de VEGF₁₆₅'tir. VEGF₁₆₅ tümör anjiyogenezinin en özellikli mediatörlerindedir. Bir endojen inhibitör izoformu olan VEGF₁₆₅ VEGFR2 üzerinden etkilidir [38]. VEGF₁₆₅'in oluşturduğu sinyal baskılanırsa anjiyogenez inhibe olur ve tümör şiddetini azalır. İnsan kanserlerinde VEGF ve VEGFR2'nin ekspresyon artışı metastaz ve invazyon ile alakalıdır. Bu VEGF'nin tümör biyolojisindeki önemini ifade etmektedir [33].

1.3.2 VEGF Yolağı

VEGFR2 anjiyogenez ve endotelial hücre mitogenezinin ana sinyaldir. Reseptör dimerizasyonu ve otofosforilasyonundan sonra, SH2 domaini içeren PLC-gama (phospholipase C, gamma), VRAP (VEGF Receptor Associated Protein) ve SCK gibi sinyal transdüksiyon molekülleri doğrudan aktive edilir. Src (non-receptor tyrosine kinases) ve PI3K (Phosphatidylinositol 3-Kinase) gibi moleküller ise dolaylı bir mekanizmayla aktive edilir. Protein Kinaz C'nin (PKC) aktivasyonu, VEGFA'nın mitojenik sinyal yolu Raf1-MEK-ERK sinyal yolağında kritik role sahiptir.

Hücre canlılığı sinyaline esas olarak PI3K aracılı PKB (Protein Kinase-B) aktivasyonu aracılık etmektedir. PI3K aktivasyonu sonucunda PIP3 (Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphate) birikmeye başlar. Biriken PIP3

membrandaki PH domainine bağlanmasıyla PKB fosforilasyona aracılık eder. PKB için sinyal yolağı hedefi proapoptotik proteinler olan BAD, FKHR1 (Forkhead Transcription Factor-1) ve Caspase-9 'dur.

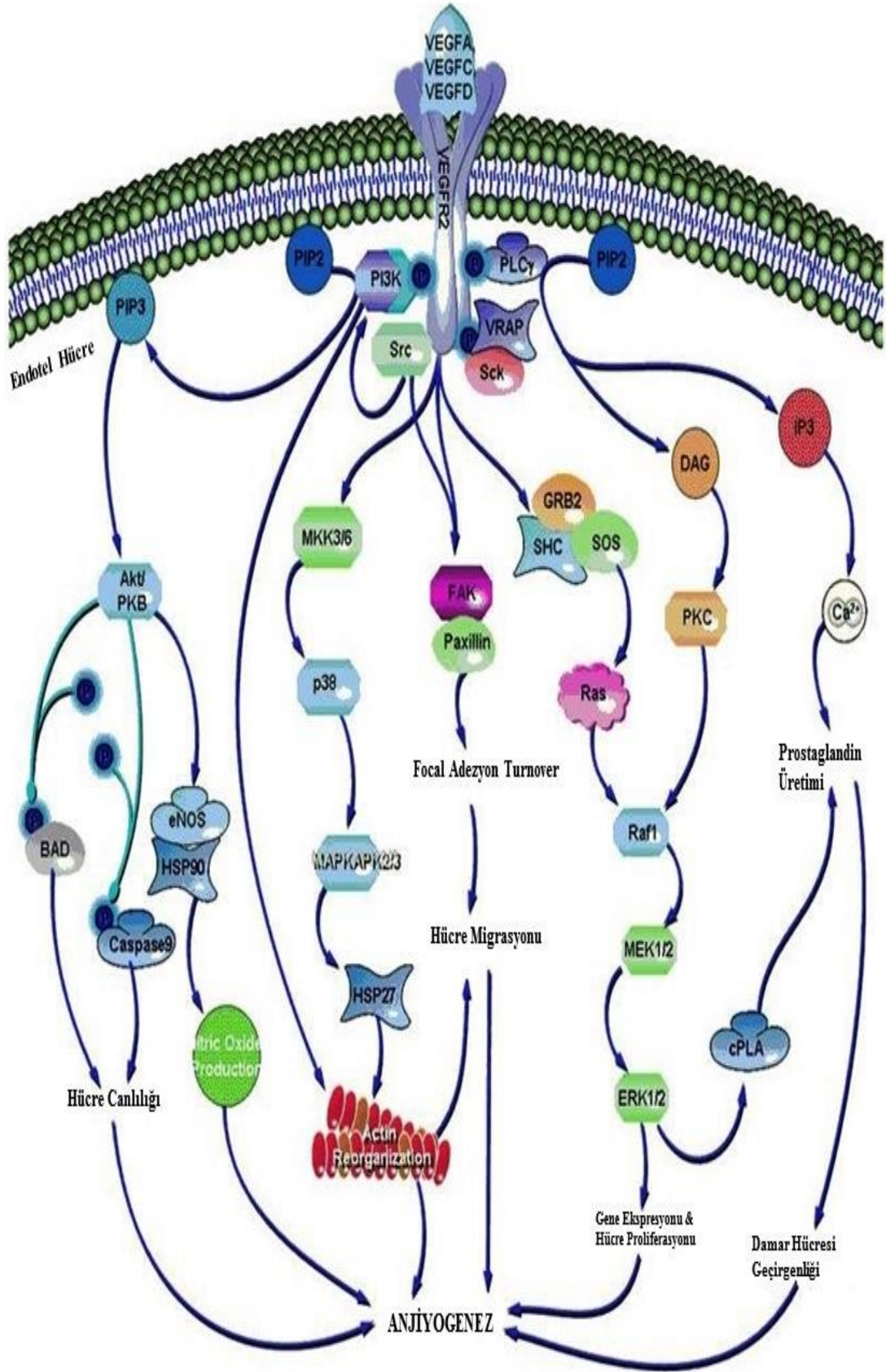
PIP2'nin hidroliziyle PLC-gama katalizlenir ve DAG (Diacylglycerol), ile IP3 (Inositol Trisphosphate) oluşturulur ki bu da Ca^{+2} salınımını ve PKC'nin aktivasyonunu uyarır. VEGFA ile uyarılmış Ca^{+2} kısa süreli Nitrik Oksit ve Ptg (Prostaglandin) üretimine sebebiyet verir.

SHC'nin fosforilasyonu SHC-GRB2(Growth Factor Receptor-Bound Protein-2)-SOS kompleksinin oluşumunu teşvik eder ve sinusoidal endotelial ve HUVEC hücrelerinde PKC bağımlı Ras bağımsız Raf1-MEK1/2-ERK1/2 yolağını indükler.

VEGF'nin mitojenik etkileri için negatif geri besleme cPLA2 (cytosolic Phospholipase-A2)'nin aktivasyonu ve prostaglandin'in biyosentezi ile sağlanır.

Endotel hücre göçünü düzenleyen aktin hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi uyarıcı mikofilamentlere VEGF sinyalini, F-Aktin polimerizasyon modülatörü HSP27 (Heat Shock Protein-27)'nin fosforilasyonu ve MAPKAPK2/3 (MAP Kinase Activated Protein Kinase-2/3) aktivasyonu tarafından modüle edilen p38 yolağı taşır.

HUVE hücrelerinde VEGFR2 vesilesiyle VEGFA tarafından FAK (Focal Adhesion Kinase) ve Paxillin aktive edilmesi, VEGFA için gerekli olan Aktinin yeniden düzenlenmesi Talin ve Vinkulin gibi Aktin sağlamlaştırıcı focal adezyon plağı proteinlerinin iyileştirilmesine öncülük eder. VEGFA ayrıca endotel kemik iliği hücre hattında RAFTK (Related Adhesion Focal Tyrosine Kinase)'nin FAK bağlantılı trozin fosforilasyonunu uyarır [39].



Şekil 1.3: VEGF yolu [39]'den uyarlanmıştır.

1.3.3 ADAMTS-1 ve VEGF İlişkisi

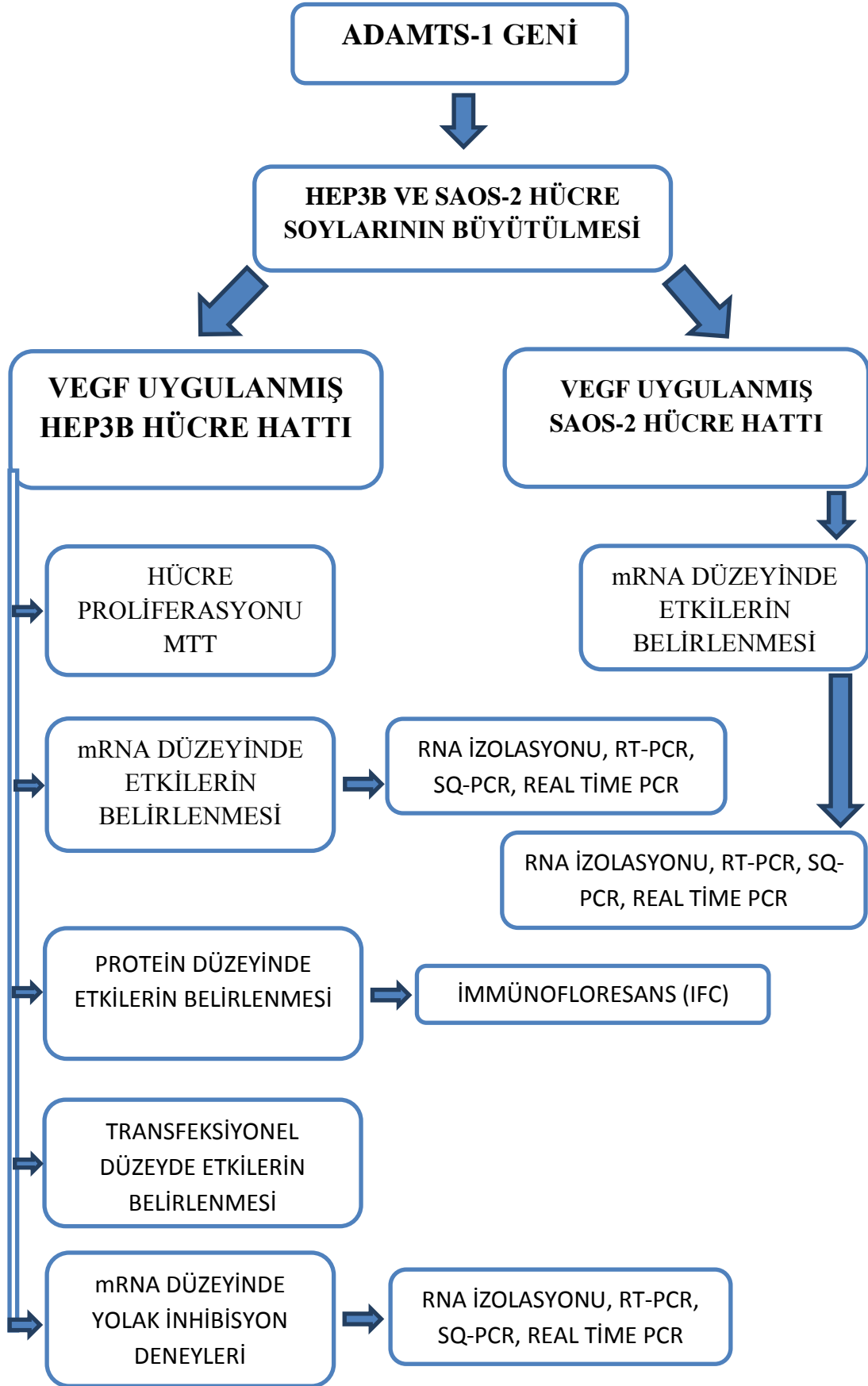
Vasküler endotelial büyüme faktörünün (VEGF) ile ADAMTS-1 in yapısı ve görevleri arasındaki bağlantı yapılmış bazı çalışmalarla göz önüne serilmiştir. Bu çalışmaların arasında en öne çıkanı, 1999 yılında Vazquez ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmadır. Bu çalışmada VEGF'in uyardığı anjiyogenezi ADAMTS-1'in inhibe ettiği ve Fibroblast Büyüme Faktörü 2'nin (FGF2) uyardığı vaskülarizasyonu ADAMTS-1'in baskılması ile anti-anjiyogenetik etki oluşturduğu bulunmuştur. Bu çalışma, ADAMTS-1 anti-anjiyogenetik aktivitelerine TS (Trombospondin tip 1) motiflerinin aracılık ettiğini düşündürecek veriler ortaya koymuştur [34].

2001 yılında Tang'ın yayınladığı çalışmaya göre, ADAMTS-1'in birinci C-terminaldeki TS tekrarında bulunan ve ADAMTS-1 ve ADAMTS-8 dışında hiçbir ADAMTS de tespit edilmemiş GWQRRL/TVECRD motifinin dikkate değer bir rol üstlendiğini göstermektedir [12].

2003 yılında Lique ve arkadaşları ADAMTS-1'in C-terminalindeki iki adet TS motifi tekrarı sayesinde VEGF₁₆₅'e bağlandığını göstermiştir [35].

1.4 Amaç ve Akış Diyagramı

Çalışmaya başlamadan yaptığımız literatür araştırmasında Vazquez ve arkadaşları tarafından 1999 yılında ADAMTS-1'in VEGF'in uyardığı anjiyogenezi inhibe ettiği bulunmuştur [34]. Bizim çalışmamızda acaba VEGF'in ADAMTS-1 üzerine ne gibi etkileri vardır sorusuna cevap aranmıştır. Bunun için normal oksijen ve hipoksik koşullar altında karaciğer karsinoma hücresi olan HEB3B hücrelerine farklı saat ve dozlarda VEGF sitokini verilerek mRNA ve protein düzeyindeki transkripsiyonel farklılıkları araştırmak amaçlanmıştır. Ayrıca VEGF sitokini uygulanarak ADAMTS-1 promotor düzeyinde transkripsiyonel aktivitedeki değişiklikler izlenmiş ve sinyal yolağının araştırılması hedeflenmiştir. Çalışmamızın planlanan akış diyagramı aşağıda özetlenmiştir.



2. MATERYAL VE METOT

2.1 Materyal

2.1.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasalların tamamı moleküler biyoloji için uygun saflıktadır. Moleküler biyoloji materyalleri, lusiferaz sisteminde kullanılan kimyasal ve enzimler, RT-PZR çalışmalarında kullanılan kimyasal ve enzimler Sigma, Merck, Fermentas, Invitrogen, Applichem, SantaCruz, Roche ve Clontech firmalarından temin edilmiştir.

Tablo 2.1: Çalışmada kullanılan kimyasallar.

Kimyasallar	Üretici Firma
DMEM	Invitrogen
FCS	Invitrogen
PBS	Sigma
Trypsin	Sigma
EDTA	Sigma
DMSO	Merck
Tripan Mavisi	Sigma
BSA	Sigma
DEPC	Sigma
MOPS	Sigma
NaAc	Sigma
Formaldehit	Sigma
SDS	Merck
Etanol	Merck
Beta-merkaptotanol	Sigma
Oligodt	Fermentas
5X Reaksiyon Buffer	Fermentas
Ribolock RNase	Fermentas
dATP, dGTP, dCTP, dTTP	Fermentas
Reverse Transkriptaz	Fermentas
10X Tag Buffer	Fermentas
MgCl ₂	Fermentas
Taq Polimeraz	Fermentas
Agaroz	Fluka
Etidyum-Bromid	Sigma

Tablo 2.1: (Devamı)

1kb DNA Marker	Fermantas
RiboRuler High Range Marker	Thermo
6X Loading Dye	Merck
Tris Base	Sigma
Borik Asit	Merck
CaCl ₂	Sigma
Hepes	Sigma
Gliserol	Merck
DAPI	Thermo
Antifade Mounting Solüsyon	Invitrogen
GeneJET™ RNA Purification Kit	Fermantas
SYBR® Green PZR Master Kit	Roche
Ready-To-Glow Secreted Luciferase Reporter Assay Kit	Clontech
MEK1	Cell Signalling
PMA	Santa Cruz
SP600125	Santa Cruz
Wortmanin	Cell Signalling
VEGF Sitokini	Cell Signalling
ADAMTS-1 Antibody	Santa Cruz
Alexa Flour 488 Goat anti Rabbit	Life Technologies
ADAMTS-1 Primeri	IDT
Hβ2M Primeri	IDT
VEGF Primeri	IDT
HIF1α Primeri	Macrogen
pMetLuc Reporter	Clontech Laboratories
pMetLuc Kontrol	Clontech Laboratories
Seap-2 kontrol	Clontech Laboratories

2.1.2 Çalışmada Kullanılan Araçlar

Tablo 2.2: Çalışmada kullanılan araçlar ve üretici firmaları.

Kullanılan Araç	Üretici Firma
-86 Derin Dondurucu	Thermo
Buzdolabı (-20) ve (+4)	Arçelik/Türkiye
Laminar Air Flow	TelstarBİOII/ İspanya
CO ₂ 'li İnkübatör	Nuair
Otomatik Pipet	Finnpipette
Otoklav	Hirayama/Japonya
Sıcak Su Banyosu	Elektromag/Türkiye
Saf Su Cihazı	Destilasyon 3.1/ (Comecta Sa)
Mikroskop	Nikon Eclipse
Floresans Mikroskop	Olympus BX51
Buz Makinesi	Fiocchetti/ İtalya

Tablo 2.2: (Devamı)

Elektronik Tartı	Sartorius/Almanya
pH Metre	WTW/Almanya
Isıtmalı Manyetik Karıştırıcı	Velp Scientifica/ İspanya
Santrifüj	Hettich Zentrifügen, Almanya
Vorteks	Elektromag/Türkiye
Spektrofotometre	Thermo
PCR Cihazı	Biolab
Elektroforez Tankı	Apelex, İngiltere
Elektroforez'in Güç Kaynağı	Consort/İngiltere
Jel Görüntüleme Sistemi	Bioimaging system
Light Cycler 485	Roche Diagnostic
Luminometre	Thermo
Cryovial	Corning
50 ve 15mL Falkon	İsolab
25 ve 75 cm ² Flask	Corning
Quartz 96 Kuyulu Plaka	Sigma
10 ve 25 mL Serolojik Pipetler	Corning
0,22 ve 0,45 µm Filtre	Sartorius

2.1.3 Çalışmada Kullanılan Solüsyonlar

Tablo 2.3: Hücre kültüründe kullanılan solüsyonlar.

FCS	Stok serum 56 °C'de 30 dk inaktive edildi. 0,22 µm filtreden geçirildi. -20 °C'de kullanıma hazır saklandı.
PBS	Her 100 mL dH ₂ O 'ya 1 tablet atıldı. Otoklavlandıktan sonra +4 °C'de saklandı.
T.E	0,25 g tripsin, 0,2 g EDTA tartılıp 100 mL 1XPBS içerisinde çözüldü. 0,22 µm filtre ile süzöldükten sonra kullanıma hazır olarak -20 °C'de saklandı.
BSA	% 30'luk 50 mL BSA için 1,5 g BSA tartıldı ve üzeri 50 mL dH ₂ O eklenip 0,22 µm filtre ile süzöldü.
MTT	Konsantrasyonu 5 mg/mL olacak şekilde steril PBS içinde 1 gece boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılarak hazırlandı. 0,22 µm filtre ile süzöldü. +4 °C'de saklandı.

Tablo 2.4: Transfeksiyon çalışmalarında kullanılan solüsyonlar.

2 mM CaCl ₂	14,7 g CaCl ₂ 50 mL'ye dH ₂ O ile tamamlandı. 121 °C'de 30 dk otoklavlandıktan sonra +4 °C'de saklandı.
2X HEPES (pH: 7,05 - 7,12)	1,6 g NaCl, 0,04 g Na ₂ HPO ₄ , 1,3 g Hepes dH ₂ O ile 100 mL'ye tamamlandı. Otoklavlandı ve filtre edilerek -20 °C'de saklandı.
10X Substrat Solusyonu	Liyofilize haldeki substrat, substrat tamponu ile sulandırıldı.

Tablo 2.4: (Devamı)

1X Substrat/Reaksiyon Tamponu	10X Substrat solüsyonununun reaksiyon tamponu ile 10 kat sulandırılması ile elde edildi.
1X Dilüsyon Tamponu	5X Dilüsyon tamponu dH ₂ O ile 5 kat sulandırılarak elde edildi.

Tablo 2.5: RNA çalışmalarında kullanılan solüsyonlar.

RNA Jeli Hazırlama Solüsyonları	
DEPC'li Su	0,1 mL DEPC, 100 mL dH ₂ O ile çözülür. 37 °C'de 12 saat bekletilir. Otoklavlanır.
10X FA Jel Tamponu (pH:7)	0,2 M MOPS (pH:7) + 0,05 M EDTA (pH:8) + 0,01 M NaAc tartılır. Üzeri DEPC'li su ile 1 L'ye tamamlanır ve otoklavlanır.
FA Tank Tamponu	100 mL 10X FA jel tamponu + 0,25 M %37'lik (12,3M) Formaldehit eklenir. DEPC'li su ile 1 L'ye tamamlanır.
Agaroz Jel Hazırlama Solüsyonları	
5X Tris-Borik Asit-EDTA (TBE) (pH:8)	54 g Tris Base, 27,5 g Borik Asit, 20 mL 0,5 M EDTA (pH:8,00) tartılır. dH ₂ O ile 1 L tamamlanır. Otoklavlanır.
0,5X TBE (pH:8)	100 mL 5X TBE tamponu, 900 mL dH ₂ O ile sulandırılır. Otoklavlanır.
1 kb marker	1 µL (DNA ladder) + 1 µL yükleme boyası (6X loading dye) + 4 µL dH ₂ O ile çözülür. -20 °C' de saklanır.
Etidyum-Bromid	1 mL'de 10 mg olacak şekilde dH ₂ O ile hazırlanır. Işık geçirmeyecek şekilde saklanır.

Tablo 2.6: İmmunofloresans çalışmalarında kullanılan solüsyonlar.

BSA	% 30'luk 50 mL BSA için 1,5 g BSA tartıldı ve üzeri 50 mL dH ₂ O eklenip 0,22µm filtre ile süzüldü.
Triton X-100	PBS ile % 0,3 olacak şekilde seyreltildi.
PBS	Her 100 mL dH ₂ O'ya 1 tablet atıldı. Otoklavlanıp steril hale getirildikten sonra +4 °C'de saklandı.

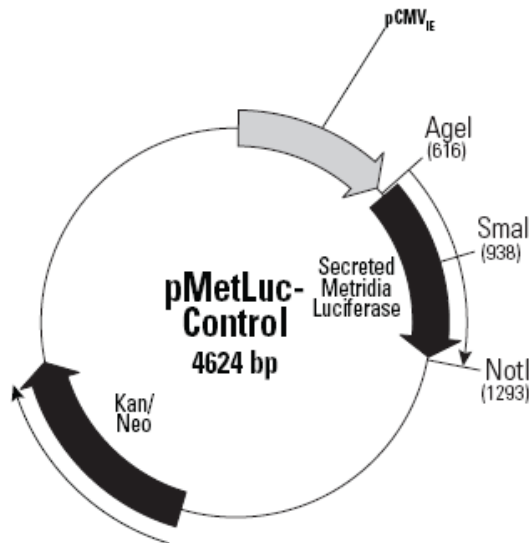
Tablo 2.6: (Devamı)

% 16 Paraformaldehit	16 g paraformaldehit tartıldı ve üzerine 100 mL dH ₂ O eklendi. 80 °C'de manyetik karıştırıcıda eritildi. 0,22'lik filtreden geçirilerek steril edildi. -20 °C'de saklandı. Deneyler esnasında % 4'lük kullanıldı.
-------------------------	---

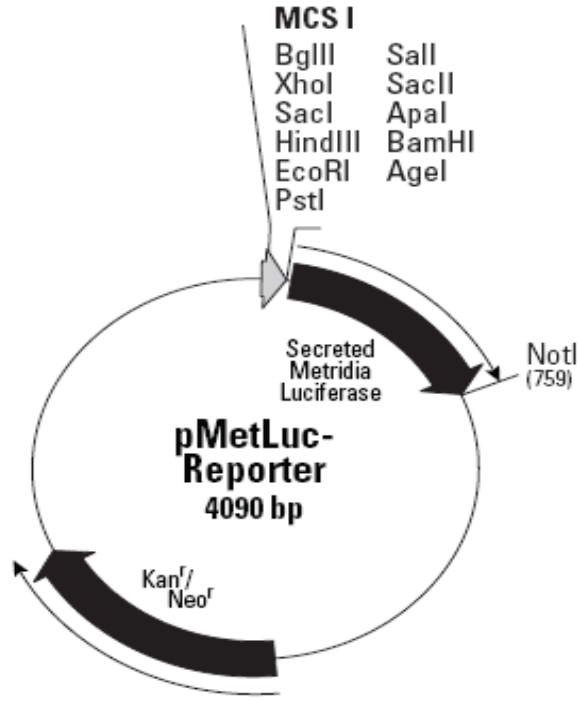
Tablo 2.7: İnhibisyonda kullanılan inhibitörlerin hazırlanışı.

Adı	Stok hazırlanışı
Wortmanin	1 mg Wortmanin 1160 µL DMSO içerisinde çözüldü. Daha sonra ependorflara bölünerek -20 °C'de saklandı. Ana stok 2 mM olarak hazırlandı. Son Konsantrasyon 1 µM.
PMA	1 mg PMA 400 µL DMSO içerisinde çözüldü. Daha sonra ependorflara bölünerek -20 °C'de saklandı. Ana stok 2,5 mM olarak hazırlandı. Son Konsantrasyon 1 µM.
SP600125	10 mg SP600125 2300 µL DMSO içinde çözüldü. Daha sonra ependorflara bölünerek -20 °C'de saklandı. Ana stok 20 mM olarak hazırlandı. Son Konsantrasyon 20 µM
MEK1	1,5 mg MEK1 280 µL DMSO içerisinde çözüldü. Daha sonra ependorflara bölünerek -20 °C'de saklandı. Ana stok 20 mM olarak hazırlanmış oldu. Son Konsantrasyon 10 µM

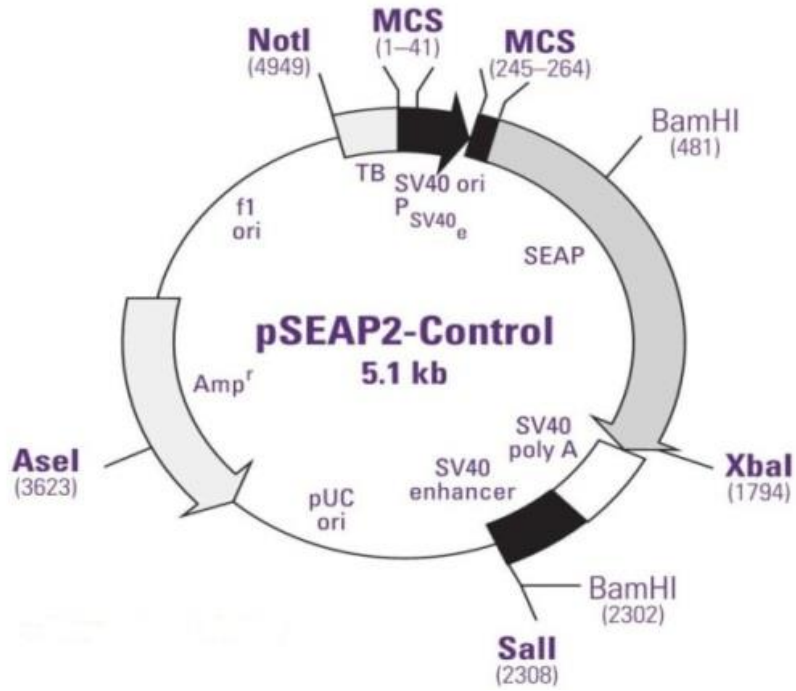
2.1.4 Çalışmada Kullanılan Vektörler



Şekil 2.1: pMetLuc kontrol vektörü haritası.



Şekil 2.2: pMetLuc reporter vektörü haritası.



Şekil 2.3: pSEAP-2 vektörü haritası.

2.2 Metot

2.2.1 Hücre Kültürü ile İlgili Metotlar

2.2.1.1 Hücrelerin Açılması

Çalışma için insan karaciğer kanseri hücre hattı olan HEP3B ve insan kemik kanseri hücre hattı olan SAOS-2 kullanıldı. Çalışmaya başlamadan önce laminar air flow çalıştırıldı. Laminar air flowun içi % 70'lik alkol dezenfekte edildi. Hücrelerin besiyeri 37 °C'de % 10 FCS+DMEM olacak şekilde hazırlandı. -80 °C de saklanan hücre hatları çıkarıldı. Hızlı bir şekilde su banyosu yardımıyla 37 °C'ye gelmesi sağlandıktan sonra pastör pipeti ile 15 mL'lik falkon tüplerin içinde bulunan besiyerine alındı ve 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj işlemi sürerken hücrelerin büyüyecekleri 75 cm² flaslara 13 mL hazırlanan besiyeri konuldu. Santrifüj işlemi tamamlandıktan sonra süpernatant döküldü ve altta kalan pellet kısmına 2 mL besiyeri koyularak pastör pipeti yardımıyla pellet çözüldü ve 75 cm² flaska aktarıldı. Hücreler % 5 CO₂ içeren 37 °C'de nemli inkübatörde büyümeye bırakıldı.

2.2.1.2 Hücrelerin Büyütülmesi

Büyümeye bırakılan hücreler % 80 doluluk oranına ulaşana kadar besiyerinde bırakıldı. Gerekli görülen durumlarda besiyeri yenisiyle değiştirildi.

2.2.1.3 Hücrelerin Pasajlanması

Hücreler % 80 doluluk oranına ulaşınca 75 cm² flask laminar air flow içerisine alındı. Besiyeri boşaltıldı ve hücreler 2 kez PBS ile yıkandı. Flask içine tripsinizasyon için 3 mL Tripsin EDTA (T.E) konuldu ve hücreler tutundukları yüzeyden kalkana kadar beklenildi. Yüzeyden kalkma işi tamamlandıktan sonra tripsinin inaktivitesi, % 10 FCS+DMEM ile sağlandı. Hücreler içinde buldukları

sıvı ile beraber 15 mL'lik falkona serolojik pipet yardımıyla alındı ve 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Pellet kısmı %10 FCS+DMEM ile çözüldü ve içerik flasklara eşit olarak paylaştırıldı. Flaskların besiyeri miktarı 15 mL'ye tamamlandı ve etiketlendi. Flasklar tekrar inkübatöre alındı.

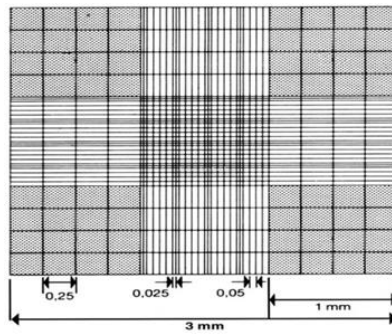
2.2.1.4 Hücrelerin Dondurulması

Hücreler stok yapılmak istendiğinde Bölüm 2.2.1.3'de anlatıldığı gibi süpernatant atılma işlemine kadar pasajlama işleminin benzeri yapıldı. Süpernatant atıldıktan sonra pellet üzerine 0,9 mL FCS ve 0,1 mL DMSO eklendi ve pellet pastör pipeti ile çözümlenerek cryovial tüplere alındı. Tüplerin etiketlenmesi yapıldı -80 °C'de muhafaza edildi.

2.2.1.5 Hücrelerin Sayılması

Büyütülen hücrelerden deney kurulumu için yeterli sayıda alınacak hücrelerin sayısı thoma lamı yardımıyla belirlendi. Büyütülen hücreler besiyerinde ayrılıp pellet haline getirildi. 6 mL medyum içerisinde pellet çözüldü ve süspansiyondan 10 µL alınarak ependorfa konuldu. Aynı ependorfa 10 µL ölü hücrelerin absorbe ettiği tripan mavisi konuldu ve 5 dk oda sıcaklığında beklenildi. Pipet yardımıyla bu karışımdan 10 µL alınarak thoma lamına aktarıldı. Maviye boyanmışlar dışında kalan hücrelerin sayımı yapıldı. Sayım sonucunda 1 mL'deki hücre sayısı aşağıda belirtilen formül kullanılarak hesaplandı.

1 mL'deki Hücre Sayısı= Alanda Sayılan Hücre Sayısı x 10⁴ x Seyreltme Faktörü



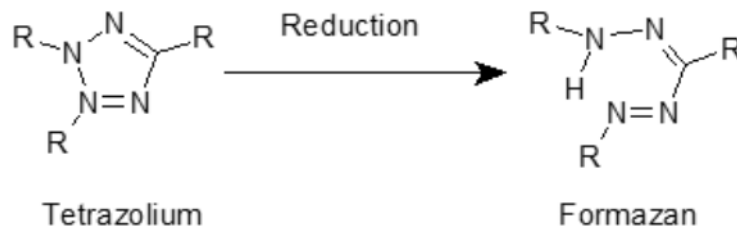
Şekil 2.4: Thoma lamı.

2.2.1.6 Hipoksik Ortamların Oluşturulması

Hipoksik model oluşturulacak deney gruplarında; hücreler sayıldı, deney kurulumu yapılacak büyüme ortamına hücreler 1 gece inkübasyona bırakıldı. İlgili madde uygulanması ile birlikte – sitokin, inhibitör vb.- son konsantrasyon 150 µM olacak şekilde ortama CoCl₂ eklendi.

2.2.1.7 Sitotoksisite Deneyinin Kurulması

Hücre sayımı işlemi yapıldıktan sonra 96 kuyulu plaka içine kuyu başına 5000 hücre ve 200 µL % 10 FCS+DMEM konuldu. 1 gece inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün kuyulu plakadaki besiyer boşaltıldı ve hücreler % 0,1 BSA içeren DMEM ortamına alındı, burada 1 saat bekletildi. Daha sonra farklı dozlarda (5 ve 20 ng/mL) VEGF sitokini uygulandı. Bazı gruplara CoCl₂ ile hipoksik ortam oluşturuldu. Sitokin uygulandıktan 1, 3, 6, 24, 48 ve 72 saat sonra kuyu başı son konsantrasyon 0,5 mg/mL olacak şekilde MTT uygulandı ve 4 saat inkübasyona bırakıldı. 4 saat sonra medyum uzaklaştırıldı. 0,004 M HCl içeren izopropanol ile kristaller çözüldü ve UV spektrometrede 550 nm dalga boyunda absorbanans alındı.



Şekil 2.5: MTT metodunda gerçekleşen kimyasal değişim.

2.2.1.8 Sitokin Deneylerinin Kurulması

Hücreler büyütülüp Bölüm 2.2.1.5'te belirtildiği gibi sayıldıktan sonra besiyeri olarak 5 mL % 10 FCS+DMEM içeren 25 cm² flasklara 2.000.000 hücre olacak şekilde ekildi. 1 gece inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün besiyeri % 0,1 BSA+DMEM içeren besiyeri ile değiştirildi. 1 saat sonra 5 ve 20 ng/mL olmak üzere

2 farklı dozda VEGF sitokini uygulandı. Bazı gruplar CoCl_2 ile hipoksik ortama sokuldu. 1, 3, 6, 24, 48 ve 72 saat inkübasyon süresi sonunda hücrelerin besiyerleri uzaklaştırıldı. Hücreler 1 mL T.E ile tutundukları yüzeyden kaldırıldı ve 15 mL'lik falkonlara pastör pipeti ile aktarıldı. 1000 rpm'de 5 dk sanrifüj yapıldıktan sonra süpernatant atıldı. Etiketleme yapıldıktan sonra RNA izolasyonu için -80°C ' de muhafazaya alındı.

2.2.1.9 İnhibisyon Deneylerinin Kurulması

Hücreler büyütülüp Bölüm 2.2.1.5'te belirtildiği gibi sayıldıktan sonra besiyeri olarak 5 mL %10 FCS+DMEM içeren 25 cm^2 flaklara 2.000.000 hücre olacak şekilde ekildi. 1 gece inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün besiyeri % 0,1 BSA+DMEM içeren besiyeri ile değiştirildi. 1 saat sonra MEK1, PMA, SP600125, Wortmanin inhibitörleri üretici firmanın belirttiği şekilde hazırlandıktan sonra hücrelere uygulandı. 1 saat sonra 5 ve 20 ng/mL olmak üzere 2 farklı dozda VEGF sitokini uygulandı. Bazı gruplar CoCl_2 ile hipoksik ortama sokuldu. 6 saat sonra hücrelerin besiyerleri uzaklaştırıldı. Hücreler 1 mL T.E ile tutundukları yüzeyden kaldırıldı ve 15 mL'lik falkonlara pastör pipeti ile aktarıldı. 1000 rpm'de 5 dk sanrifüj yapıldıktan sonra süpernatant atıldı. Etiketleme yapıldıktan sonra RNA izolasyonu için -80°C ' de muhafazaya alındı.

2.2.2 Transkripsiyonel Aktivite ile İlgili Metotlar

2.2.2.1 Kalsiyum Fosfat Presipitasyonu ile Geçici Transfeksiyon

2.2.2.1.1 Trasfeksiyon Deneyinin Kurulması

Hücreler büyütülüp Bölüm 2.2.1.5'te belirtildiği gibi sayıldıktan sonra besiyeri olarak 1 mL %10 FCS+DMEM içeren 12 kuyulu plakalara kuyu başına 250.000 hücre olacak şekilde ekildi. 1 gece inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün transfekte edilecek DNA ve 2 M CaCl_2 ayrı bir tüp içinde hazırlandı. Üzerlerine 2X

Hepes eklenerek yarım saat presipitasyon için oda sıcaklığında bekletildi. Süspansiyon kalsiyum fosfat presipitasyonu oluştuktan sonra damla damla kuyucuklara eklendi. 12 kuyulu plaka hafifçe sallanarak karışımın dağılması sağlandı. 6 saat inkübasyonda bırakıldı. Sonra transfeksiyon medyumunu değiştirildi, PBS ile kuyular yıkandı ve taze % 10 FCS+DMEM eklendi. 1 gece inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün besiyeri ortamdan uzaklaştırıldı, 2 kez PBS ile kuyular yıkandı ve % 0,1 BSA içeren DMEM kuyulara konuldu. 1 saat sonra deney planına göre sitokin uygulanacak kuyulara sitokin ve hipoksik koşullar oluşturulacak kuyulara CoCl_2 uygulandı. 48 ve 72 saat sonra deney guruplarına göre kuyulardaki medyumlardan 100 μL alınarak promotor aktivitesi, lusiferaz ve seap aktivitesine bakılarak belirlendi.

2.2.2.1.2 Lusiferaz Aktivitesinin Ölçülmesi

48 ve 72 saat sonra alınan medyumlar 96 kuyulu plaka kuyularına kuyu başı 50 μL olacak şekilde konuldu. Her bir kuyu için taze hazırlanmış 1X Substrat/Reaksiyon tamponundan 5 μL medyumun üzerine eklendi ve luminometrede sonuçlar okundu.

2.2.2.1.3 SEAP Aktivitesinin Ölçülmesi

48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda ayrılan 25 μL hücre kültürü medyumunu 96 kuyulu plakalara konuldu. 1X dilüsyon tamponundan 75 μL medyumların üzerine eklendi. Plaka 65 $^{\circ}\text{C}$ ' de 30 dk bekletildi. Daha sonra 2-3 dk buzda bekletilerek soğutulduktan sonra oda sıcaklığına gelmesi sağlandı. Oda sıcaklığındaki SEAP substrat solüsyonundan her bir örneğe 100 μL eklendi ve örnekler oda sıcaklığında 10-60 dk bekletildi. İşlem sonunda sonuçlar luminometrede okutuldu.

2.2.3 RNA ile İlgili Teknikler

2.2.3.1 RNA İzolasyonunun Yapılması

Sitokin deney grupları Bölüm 2.2.1.8'deki, inhibisyon deney grupları Bölüm 2.2.1.9'daki gibi kurulup saklandıktan sonra RNA izolasyonu GeneJET™ RNA Purifikasyon Kit ile üretici firmanın talimatları doğrultusunda yapıldı.

2.2.3.2 RNA Miktarının Spektrofotometrik Olarak Belirlenmesi ve Saflığının Ölçülmesi

RNA izolasyon işlemi yapıldıktan sonra RNA'lar 40 kat RNaz içermeyen DEPC'li su ile sulandırılarak Kuvartz 96 kuyulu plaka kuyularına konuldu. Spektrofotometrede 260 ve 280nm dalga boylarında absorbanları alındı. A_{260}/A_{280} oranı hesaplanarak RNA'nın saflığı belirlendi. RNA miktarı aşağıdaki formülle belirlendi.

$$\text{RNA Miktarı} = 40 \mu\text{g/mL} \times \text{OD}_{260} \times \text{Seyreltme Faktörü}$$

2.2.3.3 RNA Jel Elektrofrez

RNA örnekleri RNaz enziminin etkilerine karşı açıktır. Bu yüzden kullanılan cam malzemeler, elektroforez tankı ve su RNaz enziminden arındırıldı. Cam malzemelerin arındırılması % 0,1 DEPC içeren suda 12 saat bekletilip otoklavlanarak yapıldı. Elektroforez tankı için % 0,5'lik SDS çözeltisi ile yıkama yapıldı ve RNaz içermeyen su ile durulandı. Saf etanolden geçirilip kurumaya bırakıldı.

Jelin yapımı; 0,5 g agaroz tartıldıktan sonra 10 X FA jel tamponunda çözüldü. Hacmi RNaz içermeyen steril dH₂O ile 50 mL 'ye tamamlandı. Jel kaynatıldıktan sonra 40 - 50 °C'ye kadar soğuması beklendi. % 37'lik (12,3 M) formaldehitten 0,9 mL jele eklendi ve homojen bir şekilde karışması sağlandı. 10 mg/mL Ethidium-Bromide stok solüsyonundan jele 1 µL eklendi. Jel elektroforezinin kasetine taraklar yerleştirildikten sonra hazırlanan jel kasete döküldü. Jelin polimerleşmesi beklendi.

RNA örnekleri önce 70 °C'de 10 dk ısı ile denatüre edildi, 10 dk buzda bekletildi. Jele yüklenen örnekler FA tank tamponu içerisinde 80 V'ta 40 dk yürütüldü.

2.2.3.4 RT-PCR Reaksiyonu

İki basamaklı olarak gerçekleştirildi. cDNA sentezi için tüpe öncelikle 11,5 µL son hacimde, 1 µg/mL RNA kalıbı, 200 pmol Anchored Oligo (dT)₂₃ primer eklendi ve 65 °C'de 5 dk ön inkübasyona bırakılarak ilk basamak gerçekleştirildi.

İkinci basamakta ilk basamak sonucunda elde edilen ürünlerin üzerine Tablo 2.2' deki bileşenler eklendi ve 25 °C'de 5 dk, 42 °C'de 60 dk. , 70 °C'de 5dkinkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda kontrol için cDNA'lara SQ RT-PCR yapıldı ve kontrolden sonra cDNA'lar -20 °C'de muhafaza edildi.

Tablo 2.8: RT-PCR bileşenleri ve miktarları.

Bileşenler (Son Konsantrasyon)	Miktarları
5X Revers Transfer Buffer (1 X)	4 µL
dNTP (1 mM)	2 µL
RNaz İnhibitor (1 U/µL)	0,5 µL
Revers Transkriptaz (10 U/µL)	1 µL

2.2.3.5 Semi Quantitative (SQ) RT-PCR

Elde edilen cDNA'ların pozitif kontrolü daha önceden kontrolü ve optimizasyonu yapılmış kalıp olarak kullanılan Human β2 Microglobulin (Hβ2M) primerleri ile yapıldı.

Tablo 2.9: SQ RT-PCR bileşenleri ve miktarları.

Bileşenler (Son Konsantrasyon)	Miktarları
10X Taq Buffer (1 X)	5 µL
MgCl ₂ (1 mM)	2 µL
Revers Primer (2 ng)	1 µL

Tablo 2.9: (Devamı)

Forward Primer (2 ng)	1 µL
dNTP (0,2 mM)	1 µL
dH ₂ O	38,5 µL

Tablo 2.9' deki bileşenlerle karışım yapıldı ve üzerlerine 1 µL cDNA ve 0,5 µL Taq DNA polimeraz koyularak Tablo 2.10'daki şartlarda PCR yapıldı. PCR sonrasında örnekler agaroz jele yüklenerek görüntülendi ve kontrolü yapıldı.

Tablo 2.10: SQ RT-PCR koşulları.

Segment	Döngü	Sıcaklık °C	Süre
1	1	94	5dk
2	19	94	30 s
		58	30 s
		72	30 s
3	1	72	10dk

2.2.3.6 Agaroz Jel Elektrofrez

DNA'nın jelde görüntülenebilmesi amacıyla % 1'lik agaroz jel hazırlandı. Bunun için jel elektrofrez aparatına bizim için uygun miktar olan 2 g agaroz tartılarak 200 mL 0,5 X TBE tamponunda çözüldü ve sonra kaynatıldı. 50 °C'ye kadar soğutuldu sonra son konsantrasyon 0,5 µg/mL olacak şekilde Ethidium-Bromide eklenerek karıştırıldı. Daha sonra tarakları önceden yerleştirildiği kasete agaroz jel dökülerek polimerleşmesi sağlandı. Taraklar jelden ayrıldıktan sonra içine 0,5 X TBE tamponu ile doldurulmuş elektrofrez tankına kaset yerleştirildi. Örnekler yükleme boyası ile karıştırılıp jele yüklendi ve 80 V'ta yürütülerek jel görüntüleme sisteminde görüntülendi.

2.2.3.7 Real Time PCR

Real Time PCR için öncelikli olarak Tablo 2.11'deki bileşenlere sahip karışım hazırlandı. Primer olarak ADAMTS-1, VEGF, HIF1 α ve internal kontrol için H β 2M kullanıldı. Döngü koşulları Tablo 2.13 ve Tablo 2.14'deki gibi hazırlandı. Elde edilen Real Time PCR sonuçları değerlendirildi ve istatistiksel olarak analiz edildi.

Tablo 2.11: Real Time PCR bileşenleri ve miktarları.

Bileşenler	Miktarı
SYBR® Green PCR Master Karışım	5 μ L
Forward Primer (100 ng/ μ L)	0,5 μ L
Reverse Primer (100 ng/ μ L)	0,5 μ L
dH ₂ O	3 μ L
cDNA	1 μ L

Tablo 2.12: Kullanılan primerlerin dizi, uzunluk ve sıcaklıkları.

Primer Adı	Tipi	Dizisi	Uzunluk (bp)	T _m (°C)
ADAMTS-1	Forward	5'CAGCCCAAGGTTGTAGATGGTA'3	241	58
	Reverse	5'TTCACTTCGATGTTGGTGGCTC'3		
H β 2M	Forward	5'TTTCTGGCCTGGAGGCTATC'3	314	60
	Reverse	5'CATGTCTCCATCCCACTTAACT'3		
VEGF	Forward	5'CTACCTCCACCATGCCAAGT'3	311	52
	Reverse	5'TCTCTCCTATGTGCTGGCCT'3		
HIF1 α	Forward	5'CCACCTATGACCTGCTTGGT'3	269	52
	Reverse	5'TGTCCTGTGGTGA CTGTCC'3		

Tablo 2.13: VEGF ve HIF1 α primerleri için Real Time PCR koşulları.

Segment	Döngü	Sıcaklık °C	Süre
1	1	95	10 dk
2	35	95	10 s
		52	10 s
		72	12 s
3	1	95	5 dk
4	1	65	60 s
5	1	97	
6	1	40	30 s

Tablo 2.14: ADAMTS-1 ve H β 2M primerleri için Real Time PCR koşulları.

Segment	Döngü	Sıcaklık °C	Süre
1	1	95	10 dk
2	35	95	10 s
		58	10 s
		72	12 s
3	1	95	5 dk
4	1	65	60 s
5	1	97	
6	1	40	30 s

2.2.3.8 Real Time PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi ve Analiz

Real Time PCR sonuçları değerlendirilmesiiçin Livak metodu kiullanıldı. ADAMTS-1, VEGF ve HIF1 α için elde edilen Ct değerleri, internal kontrol olarak kullanılan H β 2M geninin Ct ortalamasından çıkarıldı. Elde edilen değerlerin 2 tabanında kuvveti alındı. Kontrol grupları, grupların kendisine bölünerek '1' birim olarak kabul edildi. İlgili saatlerde çalışılan deneylerin sonuçları kontrol değerine bölündü ve 1'in katı olacak şekilde sonuçlar elde edildi. Sonuçların istatistiksel olarak analizi MiniTab (One Way ANOVA) programı ile yapıldı. $p \leq 0,05$ olduğu durumlar istatistiki olarak anlamlı olarak kabul edildi [49].

2.2.4 Protein ile İlgili Teknikler

2.2.4.1 İmmunofloresans Tekniği

Hücreler büyütülüp sayımı yapıldıktan sonra 24 kuyulu plaka kuyularına besiyeri olarak 500 μ L % 10 FCS+DMEM konuldu ve kuyu tabanına cover slipler iyice yerleştirildi. Daha sonra kuyu başı 125.000 hücre eklendi. 1 gece inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün besiyeri ortamdan uzaklaştırıldı ve hücreler PBS ile yıkandı. Daha sonra % 0,1 BSA içeren DMEM eklendi. 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında normal oksijen koşulları ve hipoksik koşullar oluşturuldu. Sonrasında VEGF sitokini eklendi, inkübasyona bırakıldı. 6 saat sonra medyum ortamdan uzaklaştırıldı. Kuyulardaki hücreler PBS içinde çözülmüş % 4'lük paraformaldehid ile oda sıcaklığında 15 dk fikse edildi. Çalışılan protein

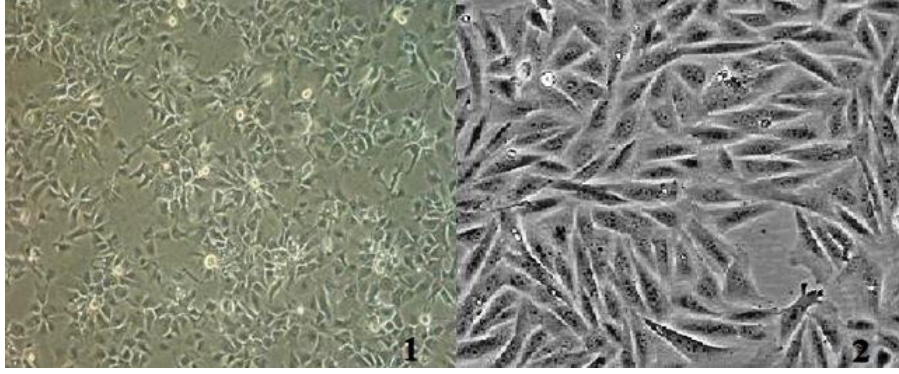
sitoplazmada bulunan ADAMTS-1 proteini olduğu ve primer ve sekonder antikorun sitoplazmaya geçmesi gerektiği için hücre membranının parçalanması amacıyla deterjan olan Triton X-100 uygulandı. Fiksatif uzaklaştırıldıktan sonra % 0,3 Triton X-100 içeren PBS kuyulara damlatıldı ve oda sıcaklığında 10 dk beklenildi. 2 kez PBS ile yıkama yapıldı. Spesifik olmayan bağlanmaları engellemek için hücreler % 10 BSA içeren PBS’de 30 dk oda sıcaklığında bekletildi. Sonrasında 2 kez PBS ile hücreler yıkandı. % 1 BSA içeren PBS’ de uygun konsantrasyonda primer antikor uygulandı ve +4 °C’de 5 gün nemli bir ortamda bırakıldı. Süre sonunda PBS ile yıkama yapıldı. Bundan sonraki aşama karanlık ortamda gerçekleştirildi. % 1 BSA’lı PBS içene uygun konsantrasyonda sekonder antikor eklenerek 40 dk oda sıcaklığına bekletildi. Sonrasında PBS ile çok iyi bir şekilde hücreler yıkandı. Yıkamadan sonra hücre çekirdeğini boyamaya yarayan DAPI uygulandı. Cover slipler kuyulardan çıkarıldı ve üzerine kapama solüsyonu (Antifade Mounting Solüsyon) damlatılan lam üzerine ters kapatılarak uygun dalga boyunda floresans mikroskopunda görüntüledi.

2.2.4.2 Sonuçların Değerlendirilmesi ve Analiz

Mikroskopta kullanılan görüntüler Image J programı kullanılarak analiz edildi. Ortalaması ve standart sapması excel programı kullanılarak hesaplandı. Yine excel programı yardımıyla grafik çizilerek değerlendirilmesi yapıldı.

3. BULGULAR

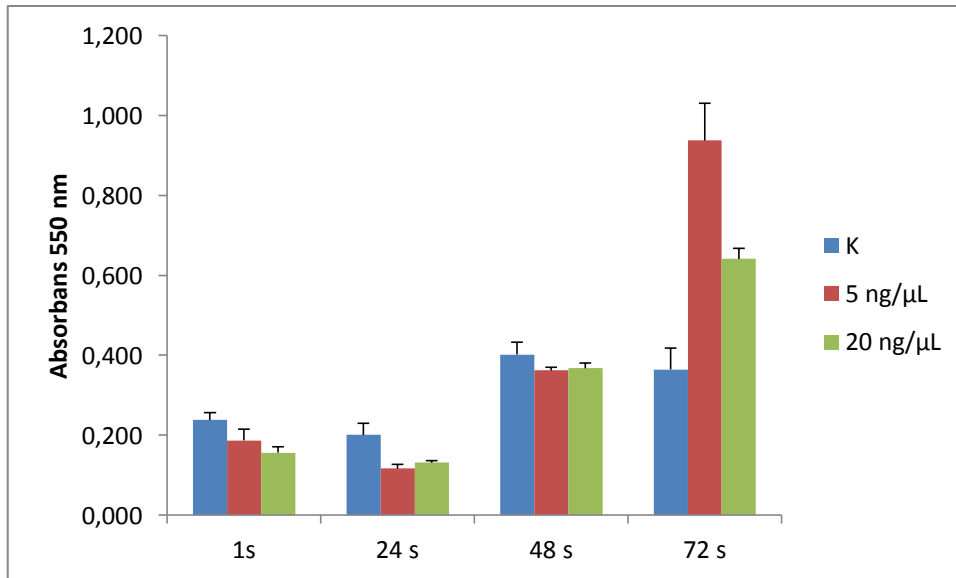
Çalışmaya ilk olarak hücre canlılığına hipoksik koşulların ve VEGF sitokininin etkisinin tespiti ile başlandı. VEGF sitokininin etkilerinin HEP3B hücreleri için spesifik olup olmadığını belirlemek amacıyla yan model ile de çalışıldı. Yan model olarak SAOS-2 hücre tipi seçildi. HEP3B ve yan model olarak seçilen SAOS-2 hücre hatlarına normal oksijen ve hipoksik koşullar altında farklı dozlarda VEGF sitokini uygulanarak farklı saatler sonunda mRNA düzeyinde etki belirlendi. mRNA düzeyinin belirlenmesinde ADAMTS-1, VEGF, HIF1 α ve H β 2M olmak üzere 4 farklı primer kullanıldı. ADAMTS-1 ekspresyon düzeyindeki değişiklikleri tespit etmek amacıyla, VEGF primerleri, VEGF sitokin uygulaması sonrasında VEGF ekspresyon düzeyindeki değişiklikleri tespit etmek için kullanıldı. HIF1 α primeri oluşturmaya çalıştığımız hipoksik koşulların gerçekten oluşup oluşmadığını kontrol etmek amacıyla kullanıldı. H β 2M primeri normalizasyon amaçlı olarak kullanıldı. mRNA seviyesinde etki belirlendikten sonra protein düzeyinde de etkinin belirlenmesi için ADAMTS-1 primer antikoru ile HEP3B hücrelerine normal oksijen ve hipoksik koşullarda immunofloresans uygulaması yapıldı. VEGF sitokininin ADAMTS-1 promotorunun transkripsiyonel aktivitesini artırıp arttırmadığını belirlemek için yine HEP3B hücrelerinde normal oksijen ve hipoksik koşullarda transfeksiyon deneyleri kuruldu. VEGF sitokininin hücre içi sinyal iletiminde kullandığı yolağı ya da yolakları tespit etmek amacıyla 4 farklı inhibitör kullanılarak inhibisyon çalışması yapıldı. İnhibisyon çalışması da HEP3B hücrelerinde normal oksijen ve hipoksik koşullar altında çalışıldı. Bu çalışmalarımızdaki bütün verilerin eldesi için yapılan çalışmalar birbirinden bağımsız 3 tekrarlı olarak yapıldı.



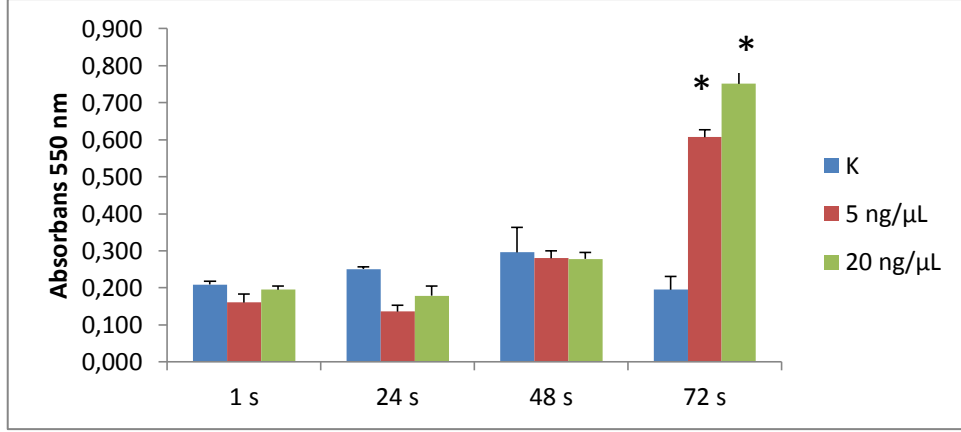
Şekil 3.1: Çalışılan hücre hatları görüntüsü: (1) HEP3B, (2) SAOS-2.

3.1 VEGF Sitokininin HEP3B Hücre Hattına Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi

Bölüm 2.2.1.7’de anlatıldığı gibi son konsantrasyonu 5 ng/µL ve 20 ng/µL olacak şekilde VEGF sitokini uygulanması gerçekleştirildi. Normal oksijen ve CoCl₂ uygulanarak oluşturulan hipoksik koşullarda sitokin uygulaması yapıldı. 1, 3, 6, 24, 48 ve 72 saat zaman aralıklarında MTT testi uygulanarak sitotoksik etkisi araştırıldı. Sonuçlar MiniTab programı kullanılarak Anova One Way testi ile analiz edildi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturmadığı görüldü ($p>0,05$). Sonuçlar Şekil 3.2 ve Şekil 3.3’de görülmektedir.



Şekil 3.2: Hep3B hücrelerinde normal oksijen koşullarında VEGF sitokininin gradiyenti ve hücre canlılığına etkileri.

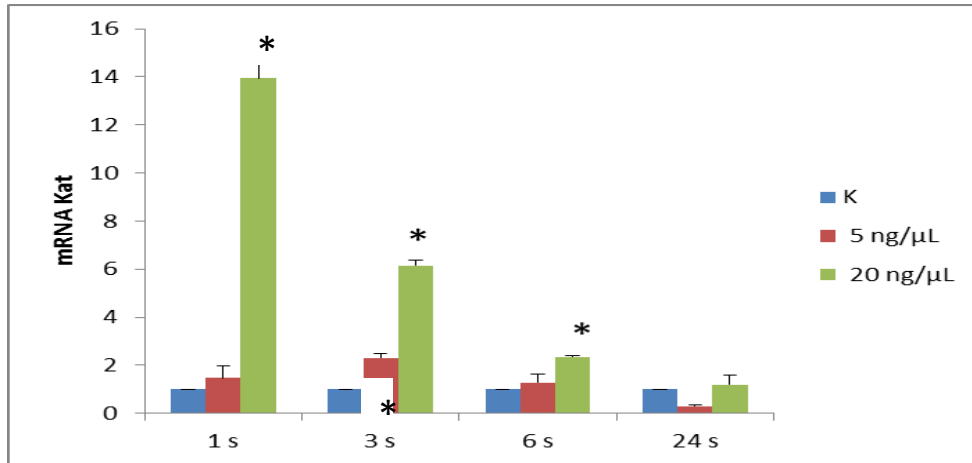


Şekil 3.3: Hep3B hücrelerinde hipoksik koşullarda VEGF sitokininin gradiyenti ve hücre canlılığına etkileri.

3.2 VEGF Sitokininin Normal Oksijen ve Hipoksik Koşullarda Etkilerinin Belirlenmesi

Deney gruplarımız farklı saat, doz ve ortam koşulları oluşturularak gerçekleştirildi. Son konsantrasyonu 5 ng/μL ve 20 ng/μL olacak şekilde 2 farklı dozda VEGF sitokini uygulaması yapıldı. Normal oksijen ve CoCl₂ uygulanmasıyla hipoksik koşullar oluşturuldu. Son olarak da 1, 3, 6, 24, 48 ve 72 saat gibi farklı saatlerde çalışma sonuçları alındı.

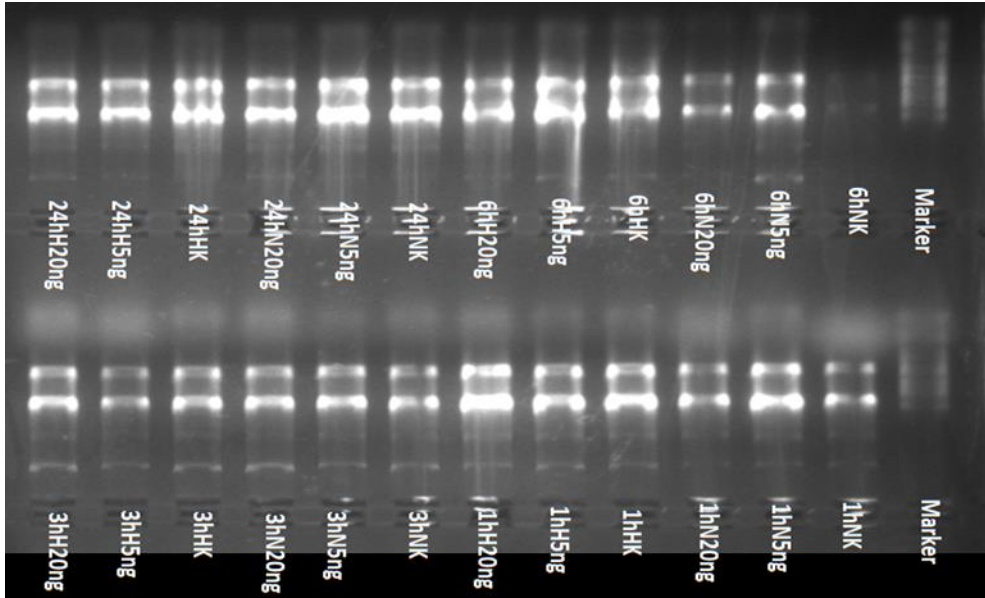
Çalışmada kullanılan son konsantrasyonu 5 ng/μL ve 20 ng/μL olacak şekilde uygulanan VEGF sitokininde istenilen etki Şekil 3.4'te de görüldüğü gibi 20 ng/μL dozda gözlemlendiği için çalışmaya bu doz uygulaması üzerinden devam edildi.



Şekil 3.4: Farklı dozlarda VEGF sitokininin normal oksijen koşullarındaki HEP3B hücreleri ADAMTS-1 ekspresyonuna etkisi.

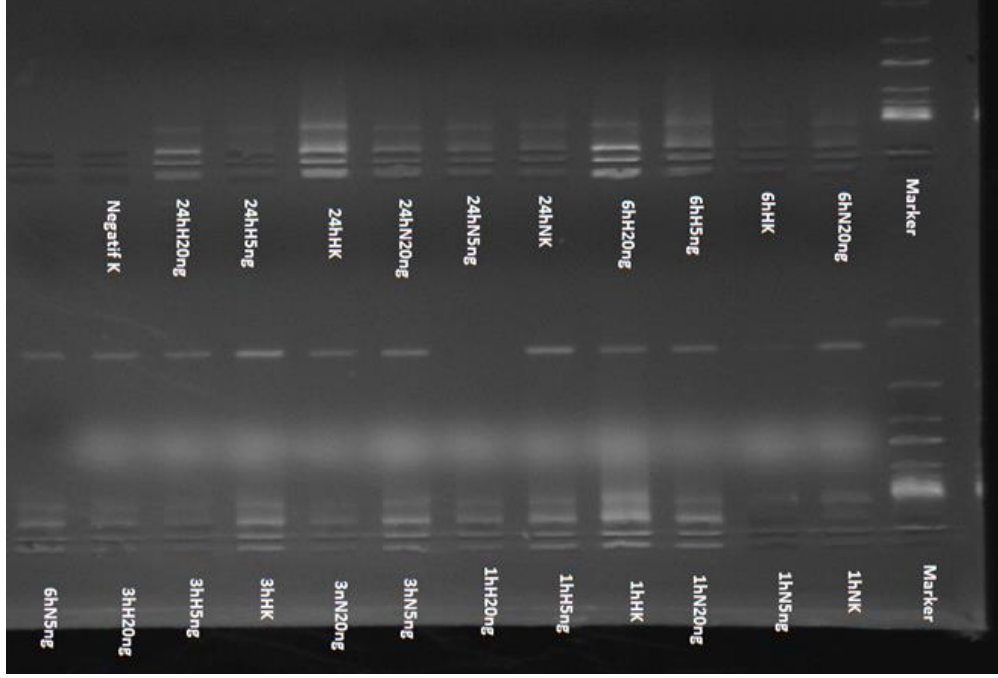
3.2.1 mRNA Düzeyinde Etkisinin Belirlenmesi

Deney grupları Bölüm 2.2.1.8’de bahsedildiği gibi 20 ng/mL doz VEGF sitokini uygulanarak kuruldu. Bölüm 2.2.3.1’deki gibi RNA izolasyonu yapıldı. Bölüm 2.2.3.2’deki gibi RNA saflığı ve miktarı belirlendi. Bölüm 2.2.3.3’deki gibi RNA agaroz jel elektroforezinde görüntülenmesi yapıldı. RNA varlığı görüldükten sonra cDNA eldesi bölümüne geçildi.



Şekil 3.5: VEGF sitokini uygulanmış HEP3B hücresi 1, 3, 6 ve 24 saat RNA görüntüleri.

cDNA eldesi Bölüm 2.2.3.4’deki gibi yapıldı. cDNA kontrolü yapılması için Bölüm 2.2.3.5’de bahsedildiği gibi SQ-PCR yapıldı. Bölüm 2.2.3.6’daki gibi agaroz jel elektroforezi, agaroz jele RT-PCR’lar yüklenerek yapıldı. RT-PCR görüntülenmesi yapıp doğruluğuna karar verildikten sonra Real Time PCR aşamasına geçildi.

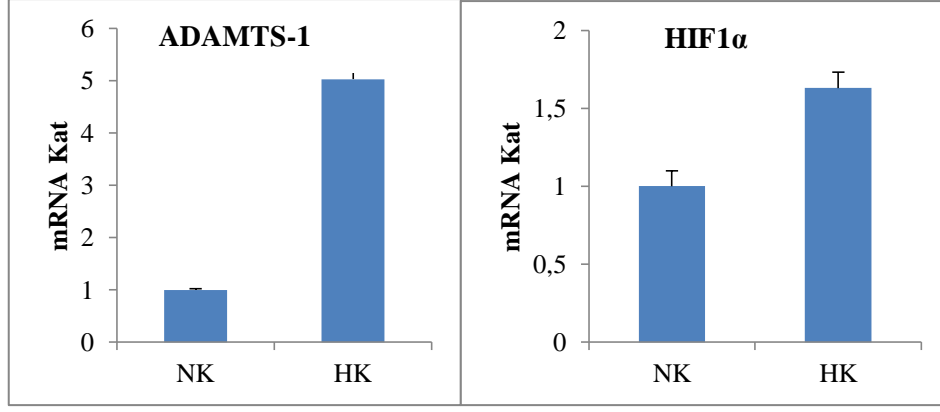


Şekil 3.6: VEGF sitokini uygulanmış HEP3B hücresi 1, 3, 6 ve 24 saat RT-PCR görüntüleri.

Bölüm 2.2.3.7'deki gibi ADAMTS-1, HIF1 α ve VEGF primeri uygulanarak yapıldı. İnternal kontrol olarak H β 2M primeri kullanıldı. Bölüm 2.2.3.8'deki gibi değerlendirildi.

3.2.1.1 HEP3B Hücresinde mRNA Düzeyinde Etkisinin Belirlenmesi

İlk etapta HEP3B hücrelerindeki ADAMTS-1 ve HIF1 α genlerinin normal oksijen ve hipoksik koşullardaki ekspresyon seviyelerine bakıldı. Deney grupları sitokin aşaması olmadan Bölüm 2.2.1.8'de bahsedildiği gibi kuruldu. Bölüm 2.2.3.1'deki gibi RNA izolasyonu yapıldı. Bölüm 2.2.3.2'deki gibi RNA saflığı ve miktarı belirlendi. cDNA eldesi Bölüm 2.2.3.4'deki gibi yapıldı. cDNA kontrolü bölüm 2.2.3.5'de bahsedildiği gibi yapıldı. Bölüm 2.2.3.7'deki gibi ADAMTS-1 ve HIF1 α primerleri ayrı ayrı uygulanarak yapıldı. İnternal kontrol olarak H β 2M primeri kullanıldı. Bölüm 2.2.3.8'deki gibi değerlendirildi.

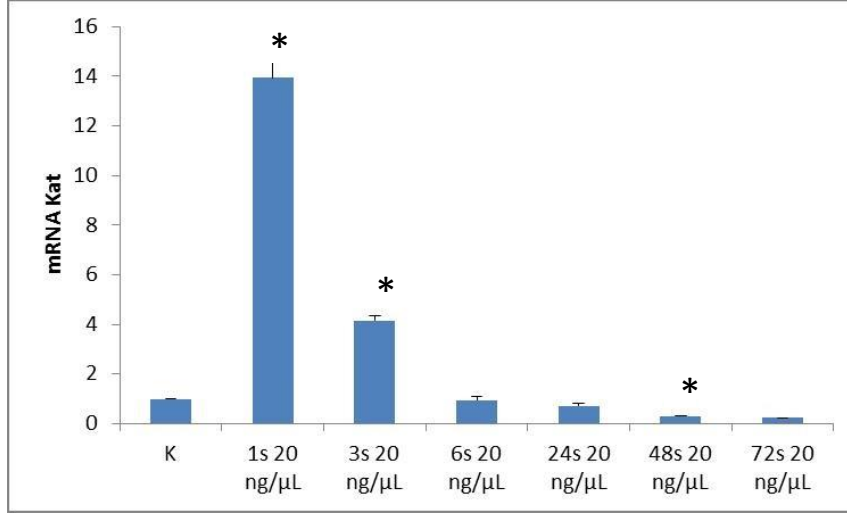


Şekil 3.7: HEP3B'lerde 6 saat sonunda ADAMTS-1 ve HIF1 α genlerinin normal oksijen ve hipoksik koşullardaki ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması.

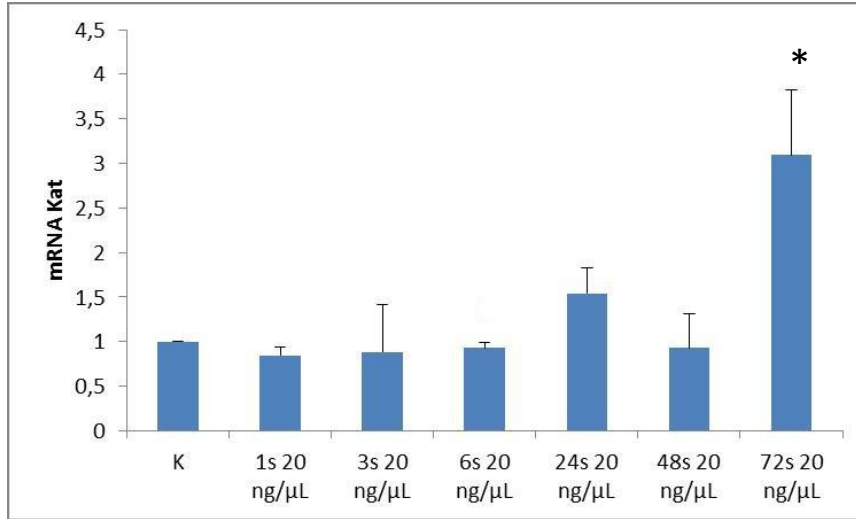
HEP3B hücrelerinde ADAMTS-1 geni ekspresyonu ile HIF1 α ekspresyonunun hipoksik koşullarda normal oksijen koşullara göre arttığı gözlenmiştir. Hipoksik koşullarda HIF1 α 'da ki artış, hipoksik koşulların başarılı bir şekilde oluştuğunu göstermektedir (Şekil 3.7).

3.2.1.1.1 ADAMTS-1 Ekspresyon Seviyesine Etkilerinin Belirlenmesi

Deney grupları Bölüm 2.2.1.8'de bahsedildiği gibi kuruldu. 20 ng/mL dozda VEGF sitokini uygulandı. Bölüm 2.2.3.1'deki gibi RNA izolasyonu yapıldı. Bölüm 2.2.3.2'deki gibi RNA saflığı ve miktarı belirlendi. cDNA eldesi Bölüm 2.2.3.4'deki gibi yapıldı. cDNA kontrolü Bölüm 2.2.3.5'de bahsedildiği gibi yapıldı. Bölüm 2.2.3.7'deki gibi ADAMTS-1 primeri uygulanarak yapıldı. İnternal kontrol olarak H β 2M primeri kullanıldı. Bölüm 2.2.3.8'deki gibi değerlendirildi.



Şekil 3.8: VEGF'in normal oksijen koşullarında ADAMTS-1 ekspresyonuna etkisi.



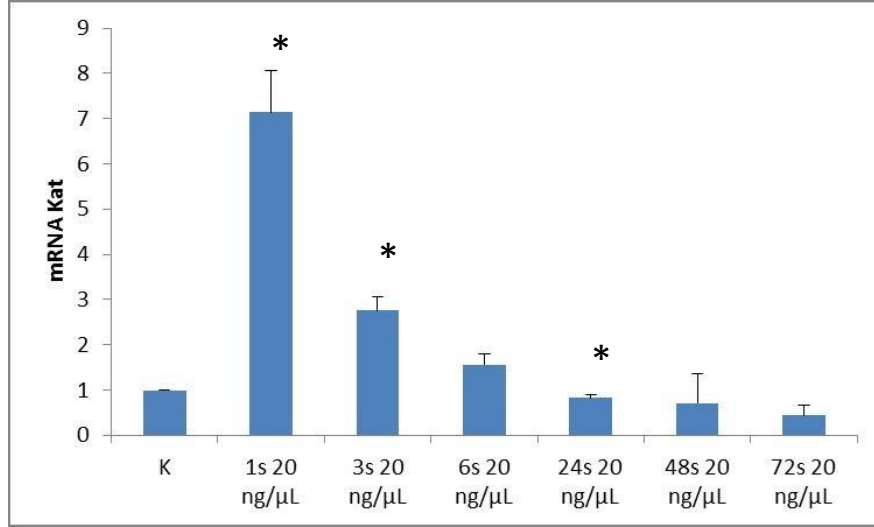
Şekil 3.9: VEGF'in hipoksik koşullarda ADAMTS-1 ekspresyonuna etkisi.

VEGF sitokini uygulaması ile HEP3B hücrelerinde ADAMTS-1 geni ekspresyonu; normal oksijen koşullarında erken saatler olan 1 ve 3. saatlerde artış (Şekil 3.8), hipoksik koşullarda ise geç saat olan 72 saatte artış (Şekil 3.9) göstermiştir.

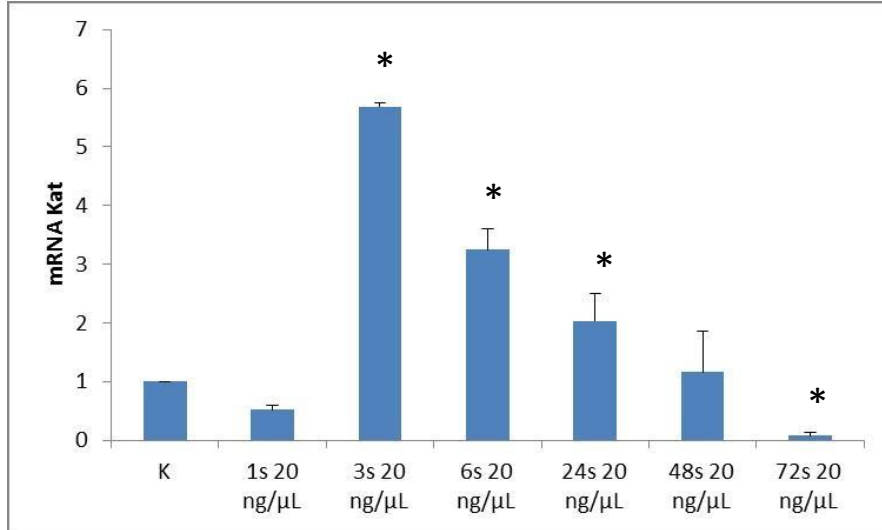
3.2.1.1.2 HIF1 α Ekspresyon Seviyesine Etkilerinin Belirlenmesi

Deney grupları Bölüm 2.2.1.8' de bahsedildiği gibi kuruldu. 20 ng/mL dozda VEGF sitokini uygulandı. Bölüm 2.2.3.1'deki gibi RNA izolasyonu yapıldı. Bölüm

2.2.3.2'deki gibi RNA saflığı ve miktarı belirlendi. cDNA eldesi Bölüm 2.2.3.4'deki gibi yapıldı. cDNA kontrolü Bölüm 2.2.3.5'de bahsedildiği gibi yapıldı. Bölüm 2.2.3.7'deki gibi HIF1 α primeri uygulanarak yapıldı. İnternal kontrol olarak H β 2M primeri kullanıldı. Bölüm 2.2.3.8'deki gibi değerlendirildi.



Şekil 3.10: VEGF'in normal oksijen koşullarında HIF1 α ekspresyonuna etkisi.

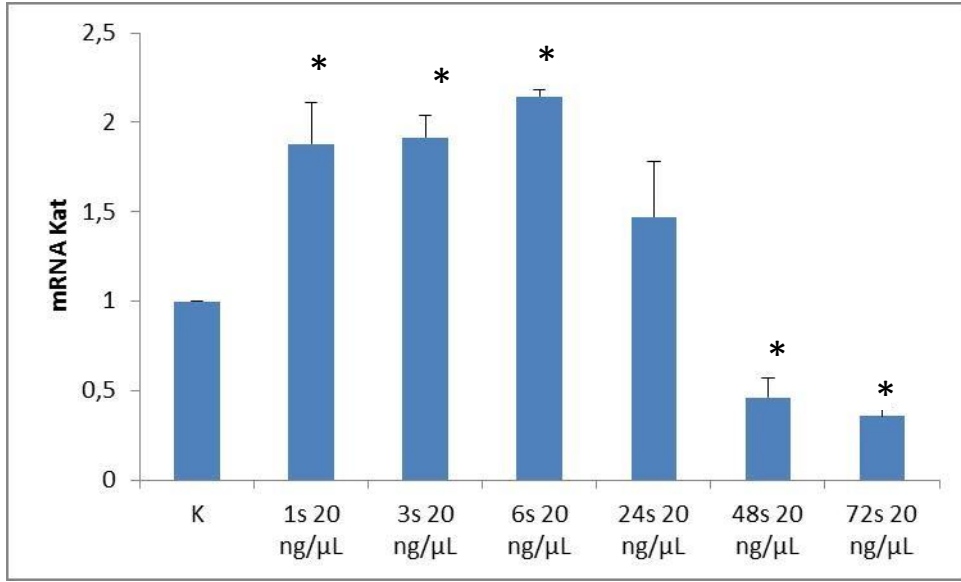


Şekil 3.11: VEGF'in hipoksik koşullarda HIF1 α ekspresyonuna etkisi.

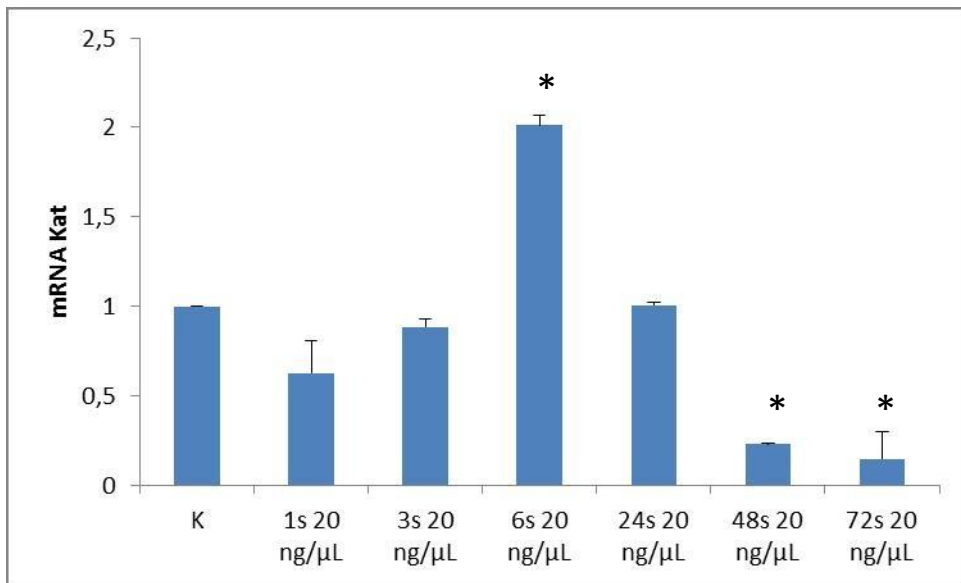
VEGF sitokini uygulaması ile HEP3B hücrelerinde HIF1 α geni ekspresyonu; normal oksijen koşullarında erken saatler olan 1, 3 ve 6. saatlerde artış (Şekil 3.10), hipoksik koşullarda ise ilerleyen saatlere doğru artış (Şekil 3.11) göstermiştir.

3.2.1.1.3 VEGF Ekspresyon Seviyesine Etkilerinin Belirlenmesi

Deney grupları Bölüm 2.2.1.8’de bahsedildiği gibi kuruldu. 20 ng/mL dozda VEGF sitokini uygulandı. Bölüm 2.2.3.1’deki gibi RNA izolasyonu yapıldı. Bölüm 2.2.3.2’deki gibi RNA saflığı ve miktarı belirlendi. cDNA eldesi Bölüm 2.2.3.4’deki gibi yapıldı. cDNA kontrolü Bölüm 2.2.3.5’de bahsedildiği gibi yapıldı. Bölüm 2.2.3.7’deki gibi VEGF primeri uygulanarak yapıldı. İnternal kontrol olarak H β 2M primeri kullanıldı. Bölüm 2.2.3.8’deki gibi değerlendirildi.



Şekil 3.12: VEGF’in normal oksijen koşullarında VEGF ekspresyonuna etkisi.

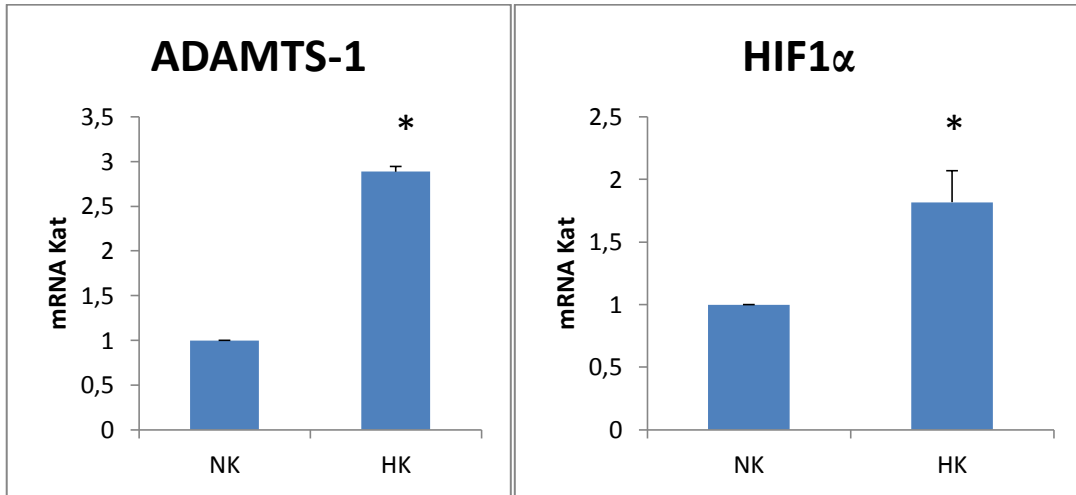


Şekil 3.13: VEGF’in hipoksik koşullarda VEGF ekspresyonuna etkisi.

VEGF sitokini uygulaması ile HEP3B hücrelerinde VEGF geni ekspresyonu; normal oksijen koşullarında 1, 3 ve 6. saate kadar artış ilerleye saatlerde ise azalış (Şekil 3.12), hipoksik koşullarda ise 6. saatte artış (Şekil 3.13) göstermiştir.

3.2.1.2 SAOS-2 Hücresinde mRNA Düzeyinde Etkisinin Belirlenmesi

SAOS-2 hücrelerindeki ADAMTS-1 ve HIF1 α genlerinin normal oksijen ve hipoksik koşullardaki ekspresyon seviyelerine bakıldı. Deney grupları sitokin aşaması olmadan Bölüm 2.2.1.8’de bahsedildiği gibi kuruldu. Bölüm 2.2.3.1’deki gibi RNA izolasyonu yapıldı. Bölüm 2.2.3.2’deki gibi RNA saflığı ve miktarı belirlendi. cDNA eldesi Bölüm 2.2.3.4’deki gibi yapıldı. cDNA kontrolü Bölüm 2.2.3.5’de bahsedildiği gibi yapıldı. Bölüm 2.2.3.8’deki gibi ADAMTS-1 ve HIF1 α primerleri ayrı ayrı uygulanarak yapıldı. İnternal kontrol olarak H β 2M primeri kullanıldı. Bölüm 2.2.3.8’deki gibi değerlendirildi.

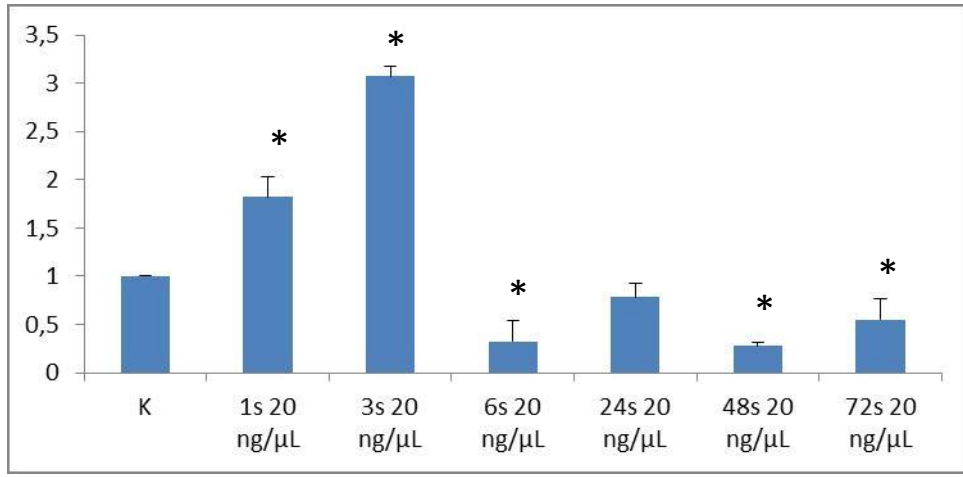


Şekil 3.14: SAOS-2’lerde 6 saat sonunda ADAMTS-1 ve HIF1 α genlerinin normal oksijen ve hipoksik koşullardaki ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması.

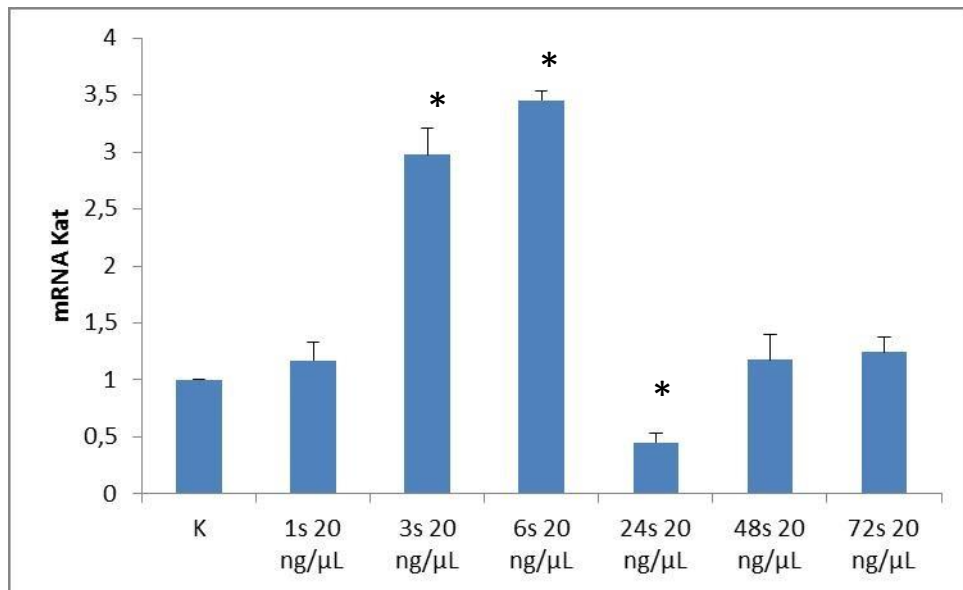
SAOS-2 hücrelerinde ADAMTS-1 geni ekspresyonu ile HIF1 α ekspresyonunun hipoksik koşullarda normal oksijen koşullarına göre HEP3B hücrelerindeki gibi arttığı gözlenmiştir. Hipoksik koşullarda HIF1 α ’da ki artış, hipoksik koşulların başarılı bir şekilde oluştuğunu göstermektedir (Şekil 3.14).

3.2.1.2.1 ADAMTS-1 Ekspresyon Seviyesine Etkilerinin Belirlenmesi

Deney grupları Bölüm 2.2.1.8’de bahsedildiği gibi kuruldu. 20 ng/mL dozda VEGF sitokini uygulandı. Bölüm 2.2.3.1’deki gibi RNA izolasyonu yapıldı. Bölüm 2.2.3.2’deki gibi RNA saflığı ve miktarı belirlendi. cDNA eldesi Bölüm 2.2.3.4’deki gibi yapıldı. cDNA kontrolü Bölüm 2.2.3.5’de bahsedildiği gibi yapıldı. Bölüm 2.2.3.7’deki gibi ADAMTS-1 primeri uygulanarak yapıldı. İnternal kontrol olarak H β 2M primeri kullanıldı. Bölüm 2.2.3.8’deki gibi değerlendirildi.



Şekil 3.15: VEGF sitokininin normal oksijen koşullarında ADAMTS-1 ekspresyonuna etkisi.

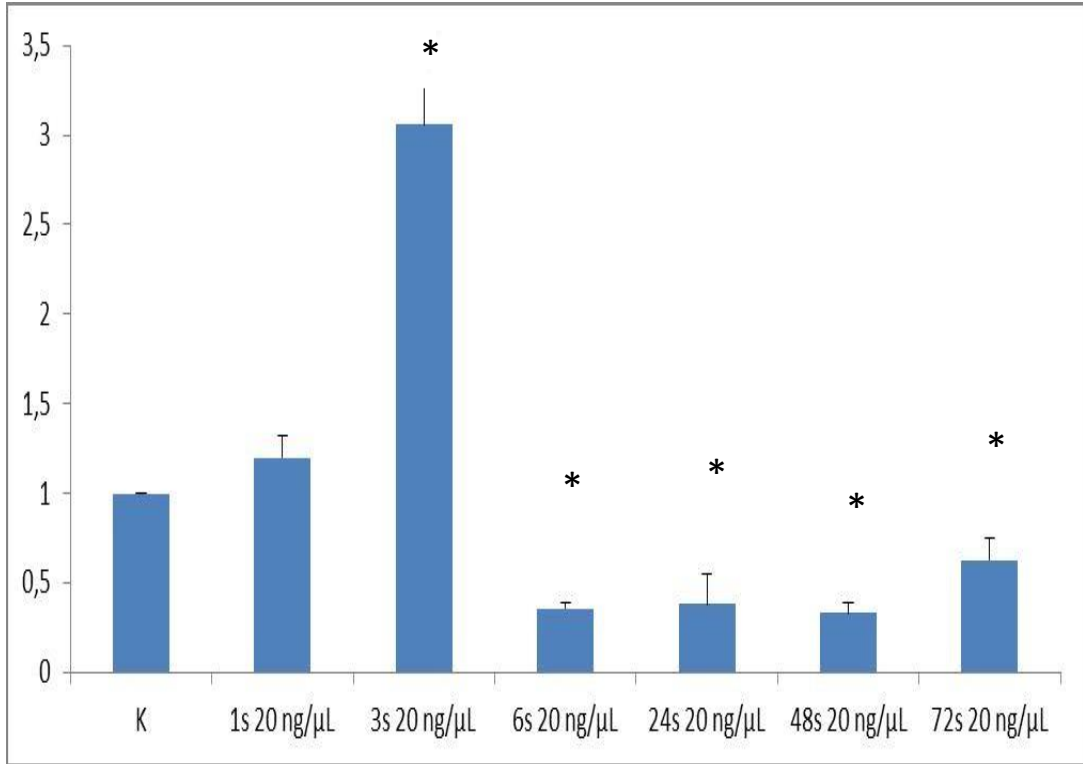


Şekil 3.16: VEGF sitokininin hipoksik koşullarda ADAMTS-1 ekspresyonuna etkisi.

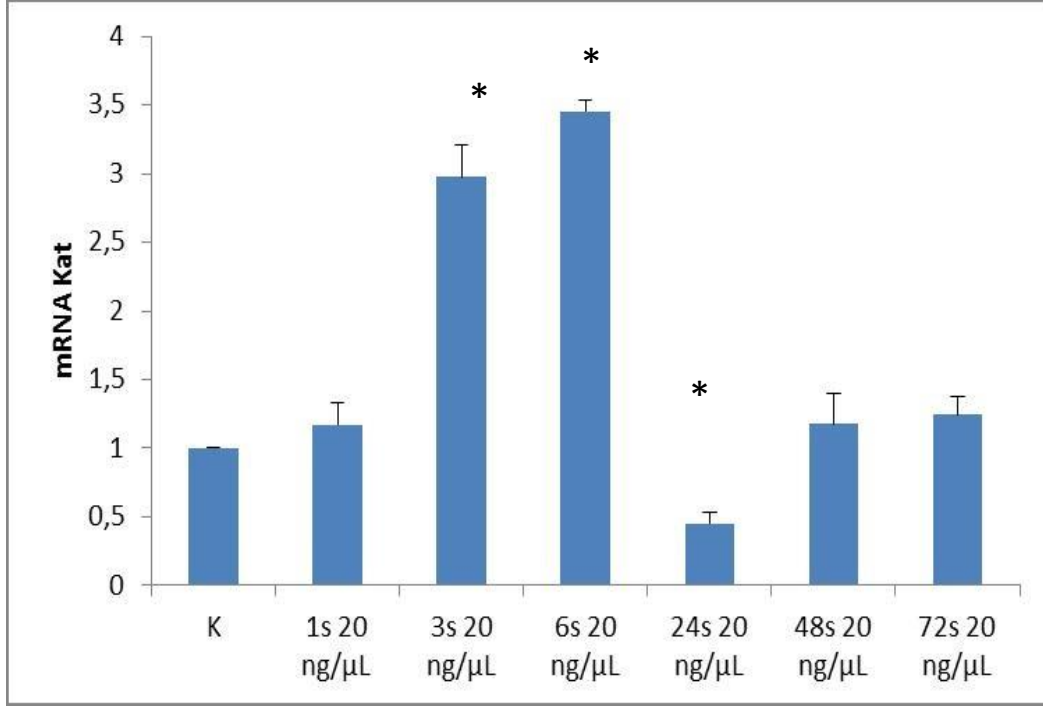
VEGF sitokini uygulaması ile SAOS-2 hücrelerinde ADAMTS-1 geni ekspresyonu; normal oksijen koşullarında 1, 3 ve 6. saate kadar artış ilerleye saatlerde ise azalış (Şekil 3.15), hipoksik koşullarda ise 6. saatte kadar artış (Şekil 3.16) göstermiştir.

3.2.1.2.2 HIF1 α Ekspresyon Seviyesine Etkilerinin Belirlenmesi

Deney grupları Bölüm 2.2.1.8’de bahsedildiği gibi kuruldu. 20 ng/mL dozda VEGF sitokini uygulandı. Bölüm 2.2.3.1’deki gibi RNA izolasyonu yapıldı. Bölüm 2.2.3.2’deki gibi RNA saflığı ve miktarı belirlendi. cDNA eldesi Bölüm 2.2.3.4’deki gibi yapıldı. cDNA kontrolü Bölüm 2.2.3.5’de bahsedildiği gibi yapıldı. Bölüm 2.2.3.7’deki gibi HIF1 α primeri uygulanarak yapıldı. İnternal kontrol olarak H β 2M primeri kullanıldı. Bölüm 2.2.3.8’deki gibi değerlendirildi.



Şekil 3.17: VEGF’in normal oksijen koşullarında HIF1 α ekspresyonuna etkisi.

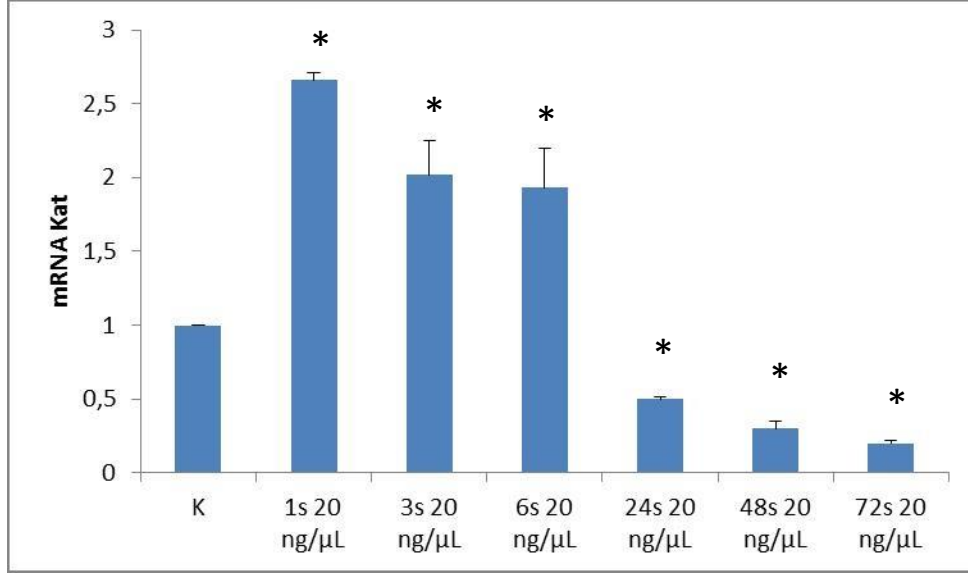


Şekil 3.18: VEGF'in hipoksik koşullarda HIF1 α ekspresyonuna etkisi.

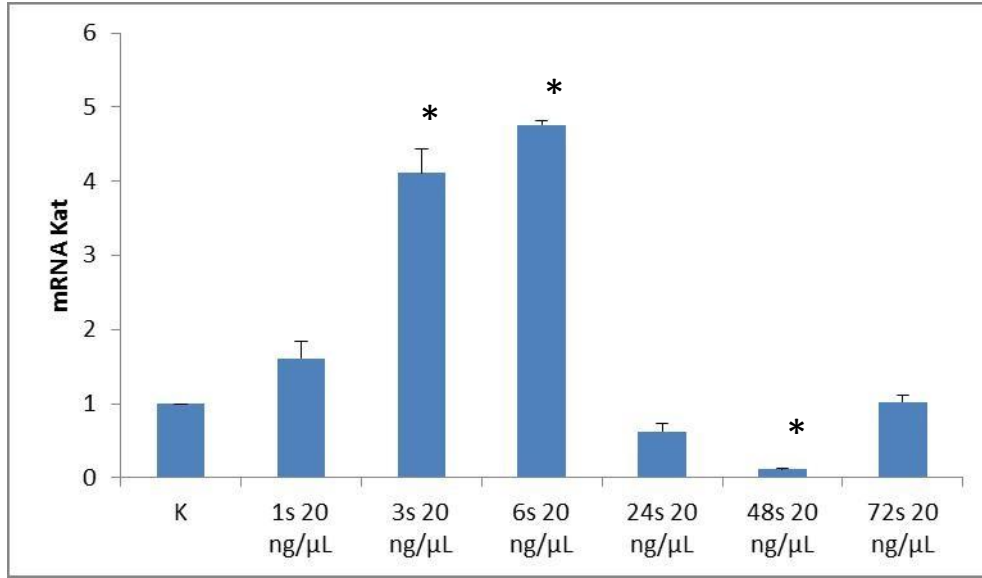
VEGF sitokini uygulaması ile SAOS-2 hücrelerinde HIF1 α geni ekspresyonu; normal oksijen koşullarında 1 ve 3. saate kadar artış ilerleyen saatlerde ise azalış (Şekil 3.17), hipoksik koşullarda ise 6. saatte kadar artış ilerleyen saatlerde azalış (Şekil 3.18) göstermiştir.

3.2.1.2.3 VEGF Ekspresyon Seviyesine Etkilerinin Belirlenmesi

Deney grupları Bölüm 2.2.1.8'de bahsedildiği gibi kuruldu. 20 ng/mL dozda VEGF sitokini uygulandı. Bölüm 2.2.3.1'deki gibi RNA izolasyonu yapıldı. Bölüm 2.2.3.2'deki gibi RNA saflığı ve miktarı belirlendi. cDNA eldesi Bölüm 2.2.3.4'deki gibi yapıldı. cDNA kontrolü Bölüm 2.2.3.5'de bahsedildiği gibi yapıldı. Bölüm 2.2.3.7'deki gibi VEGF primeri uygulanarak yapıldı. İnternal kontrol olarak H β 2M primeri kullanıldı. Bölüm 2.2.3.8'deki gibi değerlendirildi.



Şekil 3.19: VEGF'in normal oksijen koşullarında VEGF ekspresyonuna etkisi.

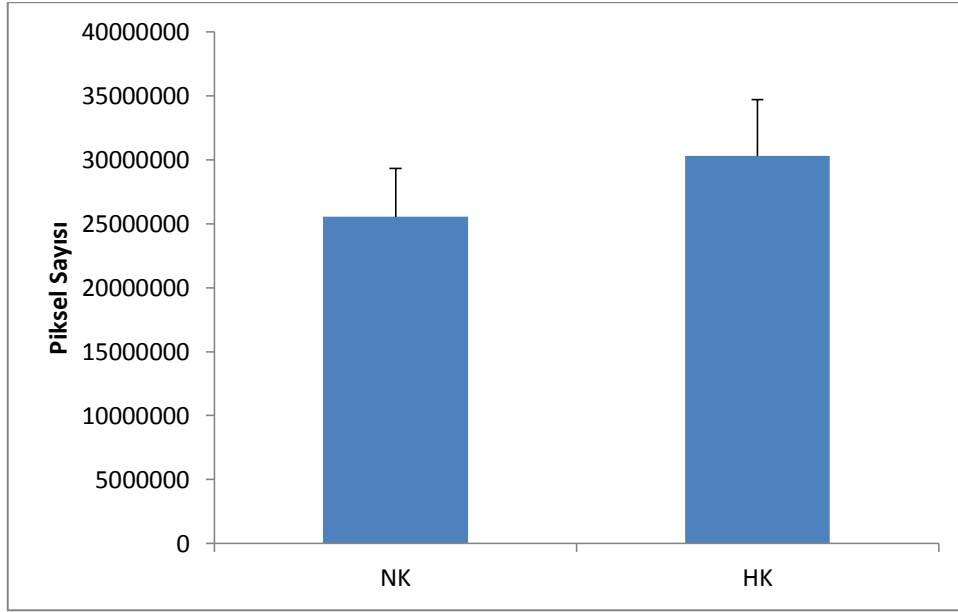


Şekil 3.20: VEGF'in hipoksik koşullarda VEGF ekspresyonuna etkisi.

VEGF sitokini uygulaması ile SAOS-2 hücrelerinde VEGF geni ekspresyonu; normal oksijen koşullarında 1, 3 ve 6 saate kadar artış ilerleye saatlerde ise azalış (Şekil 3.19), hipoksik koşullarda ise 6. saatte kadar artış ilerleyen saatlerde azalış (Şekil 3.20) göstermiştir.

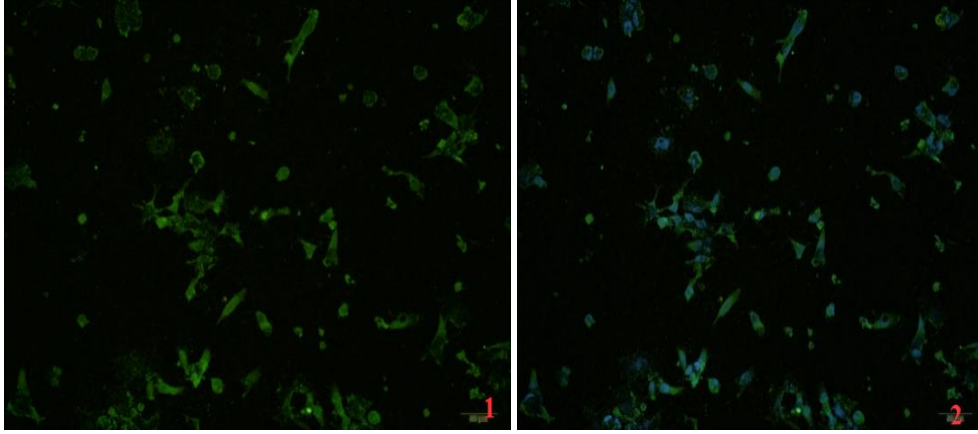
3.2.2 HEP3B Hücrelerinde ADAMTS-1 Proteini Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

VEGF sitokini uygulamadan önce mRNA düzeyinde yapıldığı gibi normal oksijen ve hipoksik koşullardaki HEP3B hücrelerinde ADAMTS-1 protein düzeyleri belirlendi. Daha sonra VEGF sitokininin ADAMTS-1 proteini üzerine etkisini belirlemek için immunofloresans yöntemi kullanıldı. Bölüm 2.2.4.1’de belirtildiği gibi 20 ng/mL doz VEGF sitokini hücrelere verilerek immunofloresans tekniği uygulanmış, sonuçlar Bölüm 2.2.4.2’deki gibi değerlendirilmiştir.

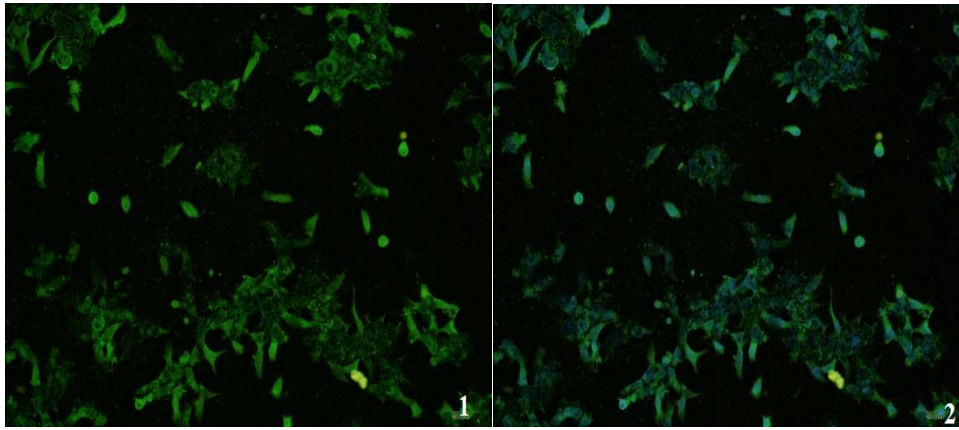


Şekil 3.21: Normal oksijen ve hipoksik koşullarda ADAMTS-1 proteini densitometrik analizi.

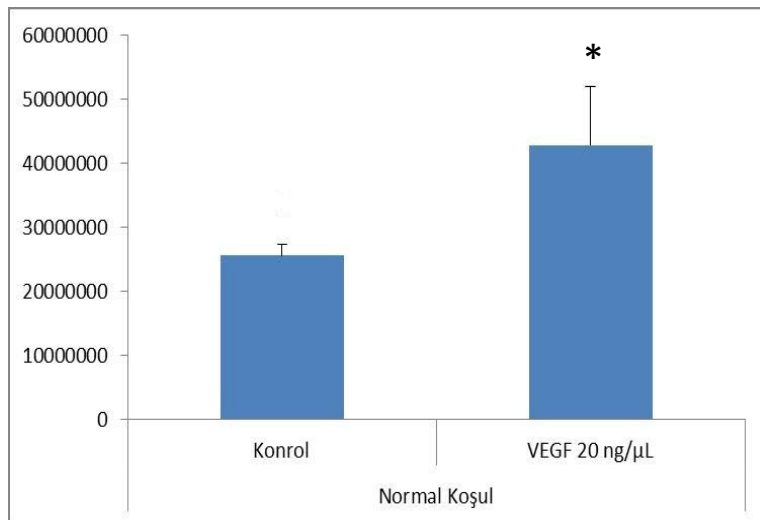
Normal oksijen ve hipoksik koşullardaki HEP3B hücrelerinde ADAMTS-1 protein düzeyleri karşılaştırıldığında tıpkı mRNA düzeyindeki karşılaştırmada olduğu gibi hipoksik koşullarda ADAMTS-1 proteini düzeyinde artış gözlemlendi (Şekil 3.21). VEGF sitokini 20ng/mL dozda uygulandığında ise hem normal oksijen (Şekil 3.24) hem hipoksik (Şekil 3.27) koşullarda ADAMTS-1 protein miktarının arttığı yapılan densitometrik analiz ile belirlendi.



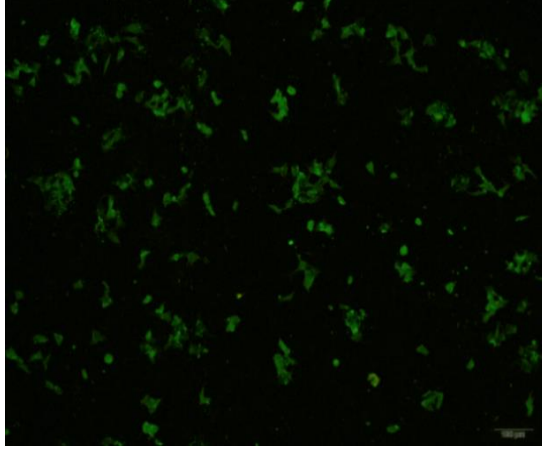
Şekil 3.22: Normal oksijen koşullarda HEP3B hücrelerinde ADAMTS-1 proteini (1) ve çekirdek boyaması (2).



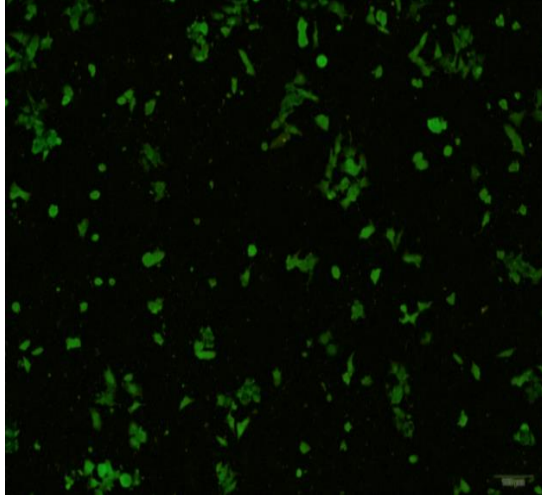
Şekil 3.23: Normal oksijen koşullarında VEGF sitokini uygulanmış HEP3B hücrelerinde ADAMTS-1 proteini (1) ve çekirdek boyaması (2).



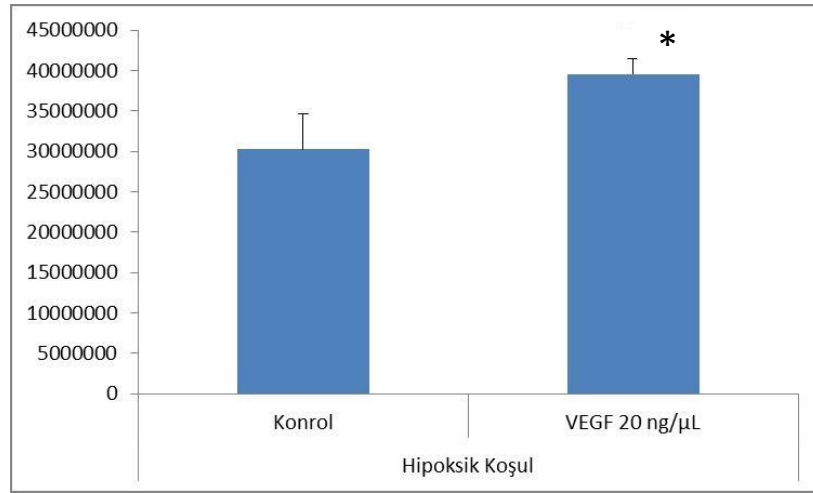
Şekil 3.24: ADAMTS-1 proteinine normal oksijen koşullarında VEGF sitokininin etkisinin İmmunofloresans yöntemiyle elde edilen sonuçlarla densitometrik olarak değerlendirilmesi.



Şekil 3.25: Hipoksik koşullarda HEP3B hücrelerinde ADAMTS-1 proteini.



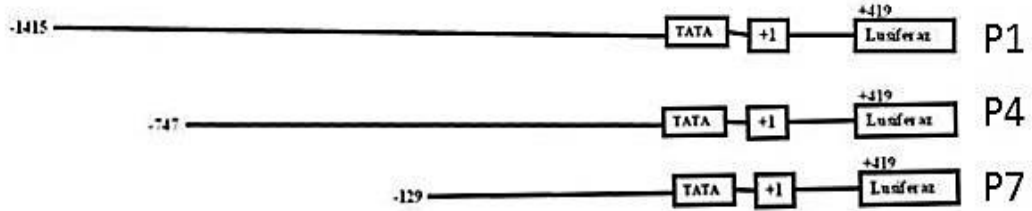
Şekil 3.26: Hipoksik koşullarda VEGF sitokini uygulanmış HEP3B hücrelerinde ADAMTS-1 proteini.



Şekil 3.27: ADAMTS-1 proteinine hipoksik koşullarda VEGF sitokininin etkisinin İmmunofloresans yöntemiyle elde edilen sonuçlarla densitometrik olarak değerlendirilmesi.

3.2.3 HEP3B Hücrelerinde ADAMTS-1 Promotor Düzeyinde Etkisinin Belirlenmesi

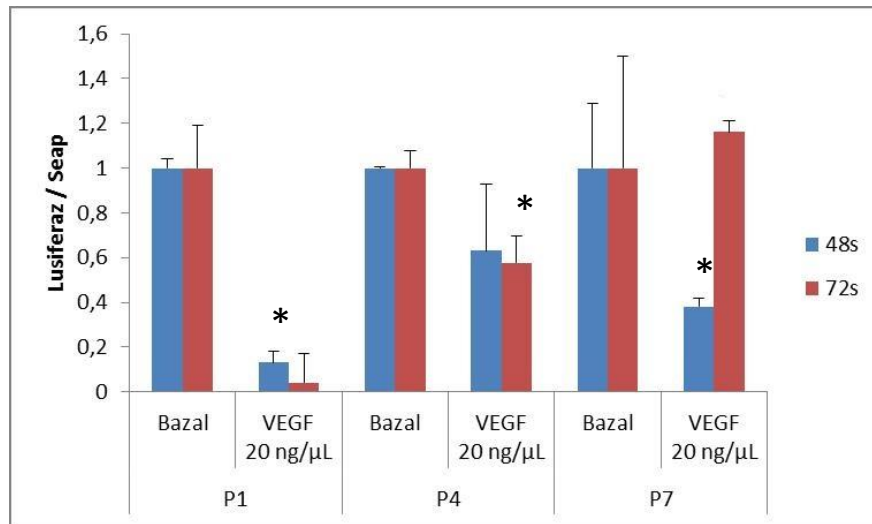
Transfeksiyonel aktivite için kullandığımız promotor parçaları Hatipoğlu ve arkadaşları tarafından laboratuvarımıza bağışlanmıştır [6]. VEGF'in etkisini belirlemek için hücelere 20 ng/mL doz VEGF sitokini uygulandı.



Şekil 3.28: Promotor (P) Parçalarının temsili şekli; P1:(-1415/+419), P4:(-747/+419), P7:(-129/+419).

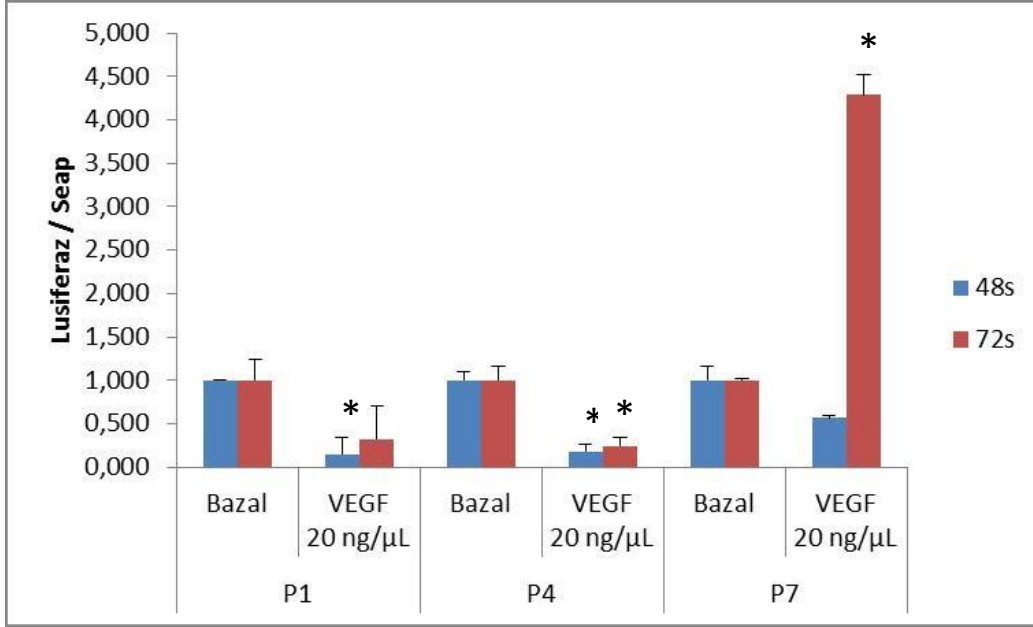
3.2.3.1 VEGF Sitokini Uygulanmış Promotor Aktivitelerinin Belirlenmesi

Farklı uzunluklardaki 3 promotor konstrakla Bölüm 2.2.2.1.1 de belirtildiği gibi deney kuruldu. Bölüm 2.2.2.1.2 ve Bölüm 2.2.2.1.3 de belirtildiği gibi lusiferaz ve seap aktivitelerine bakıldı.



Şekil 3.29: Normal oksijen koşullarda VEGF sitokini uygulanmış P1, P4 ve P7 konstraklarının aktivite sonuçları.

20 ng/mL dozda VEGF sitokini uygulanmış HEP3B hücrelerinde, farklı uzunluklardaki P1, P4 ve P7 ADAMTS-1 promotor konstraklarının 48 ve 72 saat sonucu lusiferaz ve seap salınımlarına bakıldığında; normal oksijen koşulları altında P1 ve P4 ADAMTS-1 promotor aktivitelerinde hem 48 hem 72 saatte azalış, P7 de ise 48 saatte azalış 72 saatte ise değişim gözlenmemiştir (Şekil 3.29).



Şekil 3.30: Hipoksik koşullarda VEGF sitokini uygulanmış P1, P4 ve P7 konstraklarının aktivite sonuçları.

Hipoksik koşullar altında ise P1 ve P4 ADAMTS-1 promotor aktivitesinde 48 ve 72 saatte azalış, P7 de is 48 saatte azalış 72 saatte ise artış görülmektedir (Şekil 3.30). Buna göre VEGF sitokini P7 promotorunda 72 saatte hipoksik koşullar altında da ADAMTS-1'in transkripsiyonel aktivitesini arttırmıştır.

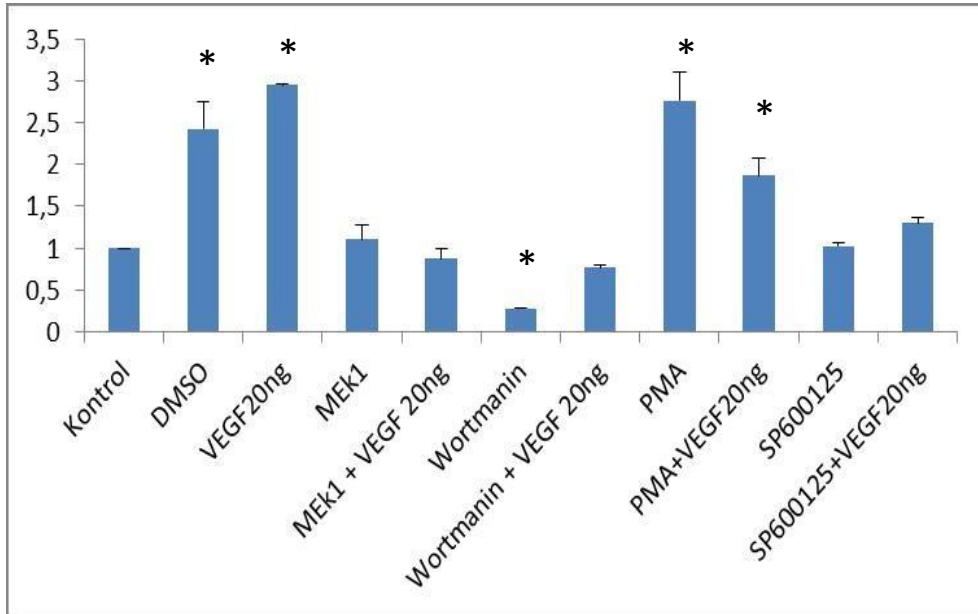
3.2.4 HEP3B Hücrelerinde Bazı İnhibitörlerin mRNA Düzeyinde Bazı Genler Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

Hücreler büyütülüp Bölüm 2.2.1.5' te belirtildiği gibi sayıldıktan sonra besiyeri olarak 5 mL % 10 FCS+DMEM içeren 25 cm² flasklara 2.000.000 hücre olacak şekilde ekildi. 1 gece inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün besiyeri % 0,1 BSA+DMEM içeren besiyeri ile değiştirildi. 1 saat sonra MEK1, PMA, SP600125, Wortmanin inhibitörleri üretici firmanın belirttiği şekilde hazırlandıktan hücrelere

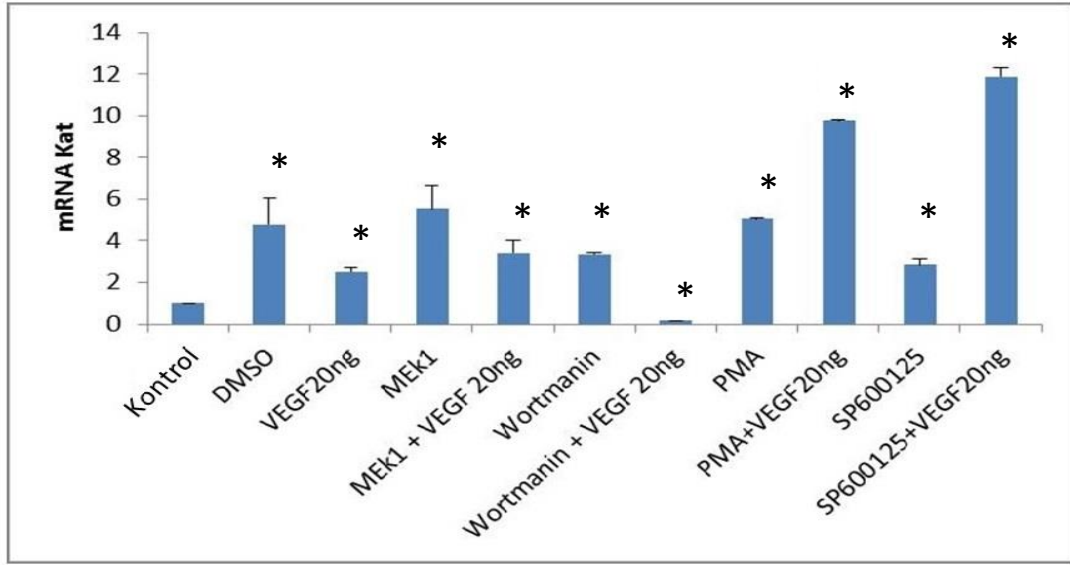
uygulandı. 1 saat sonra 20 ng/mL dozda VEGF sitokini uygulandı. Bazı gruplar CoCl_2 ile hipoksik ortama sokuldu. 6 saat sonra hücrelerin besiyerleri uzaklaştırıldı. Hücreler 1 mL T.E ile tutundukları yüzeyden kaldırıldı ve 15 mL'lik falkonlara pastör pipeti ile aktarıldı. 1000 rpm'de 5 dk sanrifüj yapıldıktan sonra süpernatant atıldı. Bölüm 2.2.3.1'deki gibi RNA izolasyonu yapıldı. Bölüm 2.2.3.2'deki gibi RNA saflığı ve miktarı belirlendi. cDNA eldesi Bölüm 2.2.3.4'deki gibi yapıldı. cDNA kontrolü Bölüm 2.2.3.5 de bahsedildiği gibi yapıldı. Bölüm 2.2.3.7'deki gibi ADAMTS-1, VEGF ve HIF1 α primeri ayrı ayrı uygulanarak yapıldı. İnternal kontrol olarak H β 2M primeri kullanıldı. Bölüm 2.2.3.8'deki gibi değerlendirildi.

3.2.4.1 ADAMTS-1 Ekspresyon Seviyesine Etkilerinin Belirlenmesi

Yapılan yolak inhibisyon çalışmasında normal oksijen koşullarında HEP3B hücrelerinde VEGF₁₆₅ sitokini ADAMTS-1 geni ekspresyonunda Wortmanin, SP600125 ve MEK1 inhibitörlerinin etkiledikleri sinyal iletim yollarına etki ettiği tespit edilmiştir (Şekil 3.31).



Şekil 3.31: VEGF sitokininin normal oksijen koşullarında ADAMTS-1 ekspresyonuna etkisi.

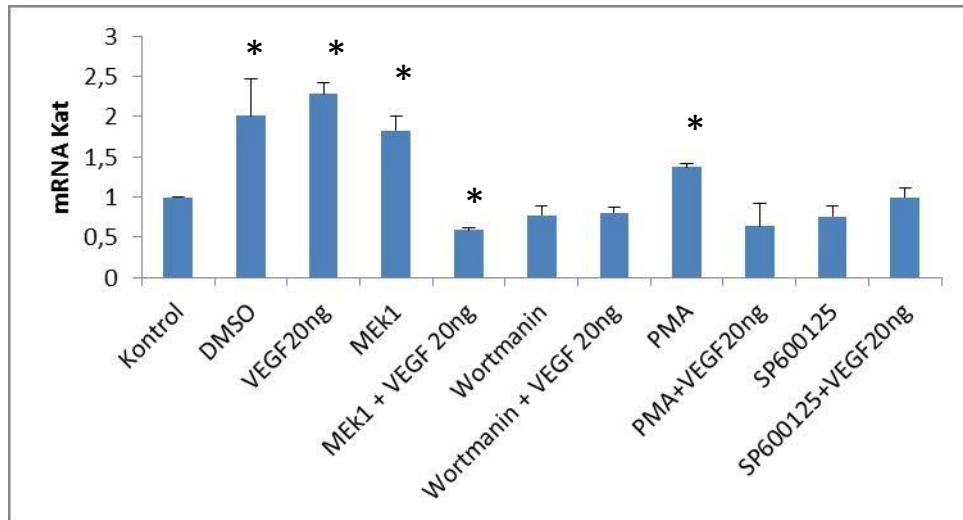


Şekil 3.32: VEGF sitokininin hipoksik koşullarda ADAMTS-1 ekspresyonuna etkisi.

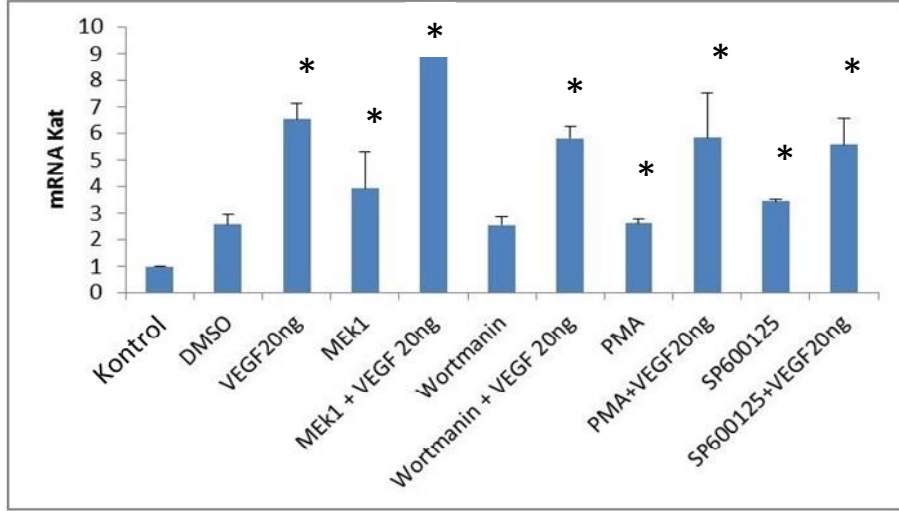
Hipoksik koşullarda ise bu durum sadece Wortmanin inhibitörünün etkilediği sinyal iletim yoluna etki ettiği belirlenmiştir (Şekil 3.32).

3.2.4.2 HIF1 α Ekspresyon Seviyesine Etkilerinin Belirlenmesi

Normal oksijen koşullarında HEP3B hücrelerinde VEGF₁₆₅ sitokini HIF1 α geni ekspresyonunda Wortmanin, SP600125, PMA ve MEK1 inhibitörlerinin etkiledikleri sinyal iletim yollarına etki ettiği tespit edilmiştir (Şekil 3.33).



Şekil 3.33: VEGF'in normal oksijen koşullarında HIF1 α ekspresyonuna etkisi.

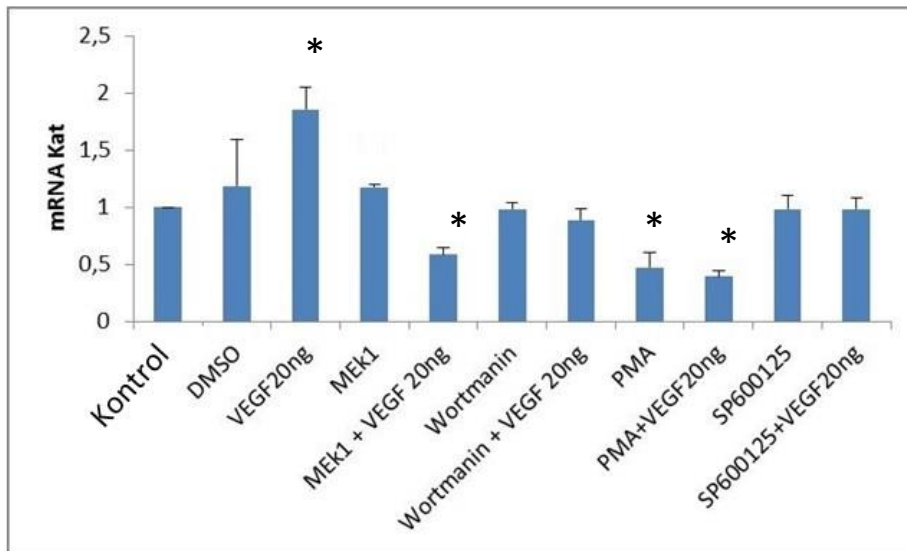


Şekil 3.34: VEGF'in hipoksik koşullarda HIF1 α ekspresyonuna etkisi.

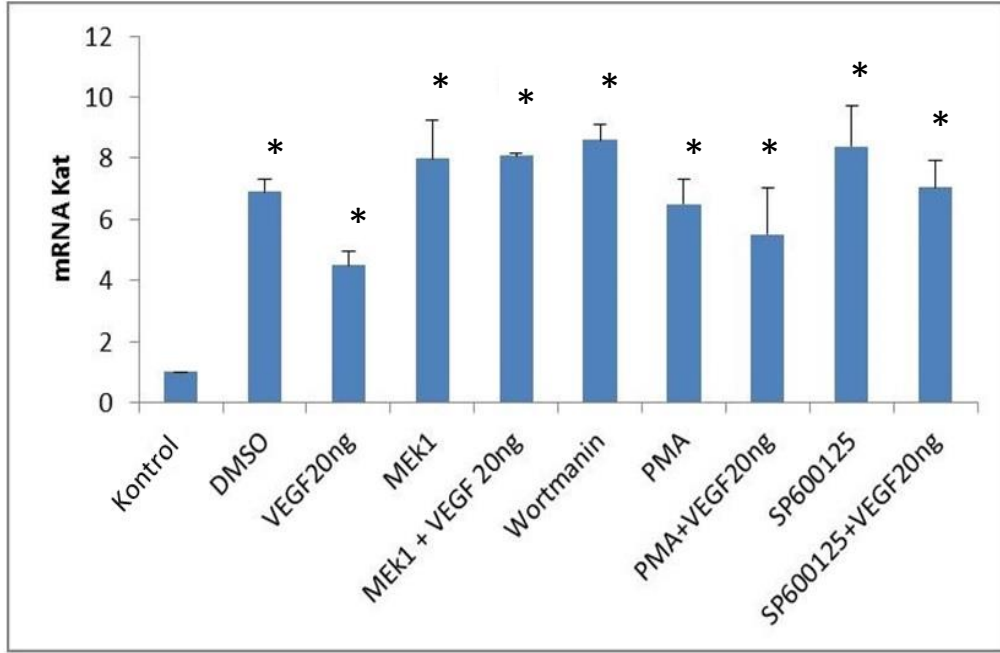
Hipoksik koşullarda ise inhibitörlerin etkilediği sinyal iletim yollarını etki etmediği belirlenmiştir (Şekil 3.34).

3.2.4.3 VEGF Ekspresyon Seviyesine Etkilerinin Belirlenmesi

Normal oksijen koşullarında HEP3B hücrelerinde VEGF₁₆₅ sitokini VEGF geni ekspresyonunda Wortmanin, SP600125, PMA ve MEK1 inhibitörlerinin etkiledikleri sinyal iletim yollarına etki ettiği tespit edilmiştir (Şekil 3.35).



Şekil 3.35: VEGF'in normal oksijen koşullarında VEGF ekspresyonuna etkisi.



Şekil 3.36: VEGF'in hipoksik koşullarda VEGF ekspresyonuna etkisi.

Hipoksik koşullarda ise inhibitörlerin etkilediği sinyal iletim yollarını etki etmediği belirlenmiştir (Şekil 3.36).

İnhibisyon ile alakalı elde edilen tüm sonuçlar Tablo 3.1'de özetlendiği gibidir.

Tablo 3.1: İnhibisyon deneyi inhibitör sonuç özet tablosu.

VEGF ₁₆₅ Sitokini Uygulamasıyla	ADAMTS-1		HIF1 α		VEGF	
	Normal Oksijen	Hipoksik Koşullar	Normal Oksijen	Hipoksik Koşullar	Normal Oksijen	Hipoksik Koşullar
Wortmanin	Etki Var	Etki Var	Etki Var	Etki Yok	Etki Var	-----
SP600125	Etki Var	Etki Yok	Etki Var	Etki Yok	Etki Var	Etki Yok
PMA	Etki Yok	Etki Yok	Etki Var	Etki Yok	Etki Var	Etki Yok
MEK1	Etki Var	Etki Yok	Etki Var	Etki Yok	Etki Var	Etki Yok

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

ADAMTS-1, Kuno ve arkadaşları tarafından 1996 yılında tespit edilmiştir [3]. İnsan karaciğer kanserlerinde VEGF ve VEGFR2'nin ekspresyon artışı metastaz ve invazyon ile alakalıdır. Bu VEGF'ün tümör biyolojisindeki önemini ifade eder [33]. ADAMTS-1'in VEGF'in uyardığı anjiyogenezi inhibe ettiği ve tümör şiddetinin azaldığı ise 1999 yılında Varquez ve arkadaşlarının yaptığı çalışma ile tespit edilmiştir [34]. Fakat VEGF üzerinde etkisi olan ADAMTS-1'in üzerinde, VEGF'in ne gibi bir etkisi varsorusunu cevaplayan herhangi bir çalışma ortaya konulmadığı saptanmıştır. Bunu belirleme isteği ile çalışma başlatılmıştır.

Sitokin; bazı uyarılara karşı özel hücrelerin salgıladığı, hedeflediği hücrenin davranışı üzerinde etkisi olan düzenleyici proteinlere verilen isimdir [48]. Düşük glikoz seviyesinde oksidatif stres ve hipoksik ortamda HIF1 α 'in regülasyonunun arttığını ve bunun da VEGF salınımında etkili olduğunu Hatipoğlu ve arkadaşları 2009 yılında tespit etmiştir [6]. Bu tespit ile hipoksik koşullar da çalışmaya dâhil edildi. 2003 yılında Armstrong ve arkadaşları yaptıkları çalışmada ADAMTS-1'in anti-anjiyogenetik etkisinden sorumlu olan yerin C-terminalindeki iki TS motifi tekrar olduğunu ve proteinin bu bölgeler sayesinde VEGF₁₆₅'e bağlandığını göstermiştir [50]. Lind ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada DNA metillenmesinin fare ADAMTS-1 aktivitesinde düşüşe sebebiyet verdiği tespit edilmiş ve farede ADAMTS-1 aktivitesinin transkripsiyonel düzeyde promotor seviyesinde kontrol edildiğini gösterilmiştir [2]. 2012 yılında yayınlanan Türkoğlu'nun doktora tezinde bazı ADAMTS-1 promotor parçalarının çalışıldığını biliyoruz [28]. Karşılaşacağımız sonuçlarda VEGF₁₆₅'in, ADAMTS-1'in promotor yapısı ile bir etkileşimi olup olmadığını anlamak amacıyla çalışma konusuna ADAMTS-1'in bazı promotor parçalarını incelemek eklendi. MEK1, SP600125, Wortmanin, PMA inhibitörlerinin VEGF sinyali üzerine ne gibi etkisi olduğunu, bu etkininde ADAMTS-1 regülasyonunu nasıl etkileyebileceğini araştırıldı.

Yapılan çalışma neticesinde; HEB3B hücrelerinde ve SAOS-2 hücrelerinde hipoksik ortam, ADAMTS-1 regülasyonu arttırıcı etkiye sahip olduğu tespit

edilmiştir. VEGF sitokini normal oksijen koşullarında ADAMTS-1 genine erken saatlerde etki ederken hipoksik koşullarda geç saatte etki ettiği tespit edilmiştir. Bu bulguyu transfeksiyonel aktivite deney sonuçları da desteklemektedir. VEGF sitokininin hem normal oksijen hem hipoksik koşullarda HIF1 α geni üzerine etken saatlerde 7 kata kadar etki ettiği tespit edilmiştir. VEGF sitokininin VEGF geni üzerine ise ADAMTS-1 ve HIF1 α genlerinde olduğu gibi anlamlı bir etkisi görülmemiştir.

SAOS-2 hücre hattında ise, VEGF sitokini ADAMTS-1 geni üzerine normal oksijen koşullarında HEP3B hücre hattında olduğu gibi erken saatlerde mRNA regülasyonuna arttırıcı etki yaptığı tespit edilmiştir. Hipoksik koşullarda ise etkisini HEP3B hücre hattından farklı olarak erken saatlerde göstermiştir. VEGF sitokininin HIF1 α geni üzerine etkisi hem normal oksijen hem hipoksik koşullardaki etkisi erken saatlerde arttırıcı yönde olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgu HEP3B hücre hattındaki bulgu ile paralellik göstermektedir. VEGF sitokininin VEGF sitokini üzerine etkisin, HEP3B hücre hattından farklı olarak SAOS-2 hücre hattında hem normal oksijen hem hipoksik koşullar altında erken saatlerde mRNA regülasyonunu arttırıcı yönde olduğu tespit edilmiştir.

Hem HEP3B hem SAOS-2 hücre hattında HIF1 α mRNA regülasyonunun artış göstermesi hipoksik koşulların oluştuğunu göstermektedir. VEGF sitokininin VEGF geni üzerine ilerleyen saatlerde negatif etki göstermiş olması, belirli bir seviyeden sonra ortamdaki VEGF sitokininin VEGF geni üzerine susturucu bir özellik sergilediğini göstermektedir.

VEGF sitokininin ADAMTS-1 geni üzerinde gösterdiği mRNA regülasyonunu arttırıcı etkisinin, protein düzeyinde de etkisini sürdürdüğü tespit edilmiştir. Yapılan immunofloresans çalışmasında ulaşılan sonucun mRNA düzeyinde ulaşılan sonuç ile paralellik arz ettiği görülmüştür. Yine bu hücrelerde hipoksiya geni olan HIF1 α regülasyonu incelediğinde regülasyon artışı tespit edilmiştir. VEGF sitokininin VEGF geni üzerine olan etkisini incelediğinde HEP3B hücrelerinde anlamlı bir değişim görülmemiştir.

Transkripsiyonel aktiviteye bakıldığında VEGF₁₆₅ sitokini normal oksijen şartlarında -1415/+419 ADAMTS-1 promotör parçasında transkripsiyonel aktivitede

etki göstermemiştir, ancak hipoksik şartlarda -129/+419 promotor parçasında transkripsiyonel aktivite artış göstermiştir. VEGF₁₆₅ sitokini mRNA düzeyinde ADAMTS-1 genini normal oksijen koşullarında arttırırken bu etkinin transkripsiyonel düzeyde görülmemesinin sebebi, VEGF₁₆₅ sitokininin -1415/+419 ADAMTS-1 promotor parçasının uzunluğunun dışında kalan bir bölge ile etkileşime geçerek etkisini gösteriyor olması olabilir.

Yolak çalışmasında ise uygulanan VEGF₁₆₅'in ADAMTS-1 geni regülasyonunun; normal oksijen koşulları altında Wortmanin, SP600125 ve MEK1 inhibitörleri uygulaması ile azaldığı ve PMA uygulaması bir etki görülmediği tespit edilmiştir. Hipoksik koşullarda ise Wortmanin uygulaması ile azaldığı tespit edilmiştir. Buradaki bulgulara göre VEGF sitokini ADAMTS-1 geni için normal oksijen koşullarında Wortmanin, SP600125 ve MEK1 inhibitörlerinin etkilediği sinyal yolağını kullanıyor olabilir. Hipoksik koşullarda ise Wortmanin inhibitörünün etkilediği sinyal yolağını kullanıyor olabilir.

VEGF₁₆₅ uygulaması ile HIF1 α geni regülasyonunu normal oksijen koşulları altında Wortmanin, SP600125, PMA ve MEK1 inhibitörleri uygulaması ile azaldığı tespit edilmiştir. Hipoksik koşullarda ise etki görülmemiştir. Buradaki bulgulara göre VEGF sitokini HIF1 α geni için normal oksijen koşullarında Wortmanin, SP600125, PMA ve MEK1 inhibitörlerinin etkilediği sinyal yolağını kullanıyor olabilir. Hipoksik koşullarda ise inhibitörlerin etkilediği sinyal yolaklarını kullanmıyor olabilir.

VEGF₁₆₅ uygulaması ile VEGF geni regülasyonunu normal oksijen koşulları altında Wortmanin, SP600125, PMA ve MEK1 inhibitörleri uygulaması ile azaldığı tespit edilmiştir. Hipoksik koşullarda ise etki görülmemiştir. Buradaki bulgulara göre VEGF sitokini HIF1 α geni için normal oksijen koşullarında SP600125, PMA ve MEK1 inhibitörlerinin etkilediği sinyal yolağını kullanıyor olabilir. Hipoksik koşullarda ise inhibitörlerin etkilediği sinyal yolaklarını kullanmıyor olabilir.

Sonuç olarak ADAMTS-1 1996 yılında aydınlatılan ve hergün üzerinde yeni çalışmalar yapılan bir gen grubudur. Kanserin anjiyogenezle ilişkili olması ve ADAMTS-1'in de anti-anjiyogenetik özelliğe sahip olması ADAMTS-1'i sitokin ve inhibitör gibi etkenlerle çalışmalar yapılmasının devamı için cazip kılmaktadır.

5. KAYNAKLAR

[1] Rocks, N., Paulissen, G., El Hour, M., Quesada, F., Crahay, C., Gueders M., et al., “Emerging roles of ADAM and ADAMTS metalloproteinases in cancer”, *Biochimie*, 90, 369, (2008).

[2] Lind, G. E., Kleivi, K., Meling, G. I., Teixeira, M. R., Thiis-Evensen, E., Rognum T.O., et al., “ADAMTS1, CRABP1, and NR3C1 identified as epigenetically deregulated genes in colorectal tumorigenesis”, *Cell Oncol.*, 28, 5-6, (2006).

[3] Kuno, K., Kanada, N., Nakashima, E., Fujiki, F., Ichimura, F., Matsushima, K., "Molecular cloning of a gene encoding a new type of metalloproteinase-disintegrin family protein with thrombospondin motifs as an inflammation associated gene", *The Journal of Biological Chemistry*, 272, 556, (1997).

[4] Doyle, K. M. H., Russell D. L., Sriraman, V., Richards, J. S., “Coordinate Transcription of the ADAMTS-1 Gene by Luteinizing Hormone and Progesterone Receptor”, *Molecular Endocrinology*, 18, 2463–2478, (2004).

[5] Chou, C. W., Chen, C. C., “HDAC inhibition upregulates the expression of angiostatic ADAMTS1”, *FEBS Letters*, 582, 4059–4065, (2008).

[6] Hatipoglu, O. F., Hirohat, S., Cilek, M. Z., Ogawa, H., Miyoshi, T., Obika, M., et al., “ADAMTS1 Is a Unique Hypoxic Early Response Gene Expressed by Endothelial Cells”, *The Journal of Biological Chemistry*, 284, 16325–16333, (2009).

[7] Masui, T., Hosotani, R., Tsuji, S., Miyamoto, Y., Yasuda, S., Ida, J., et al., “Expression of METH-1 and METH-2 in pancreatic cancer”, *Clinical Cancer Research*, 7, 3437, (2001).

[8] Sunay, F. B., Turkoglu, S. A., Kockar, F., “The expressions of ADAMTS-1-2-3 and-8 in HEP3B cells”, *Febs Journal*, 276, 121-122, (2009).

[9] Kaushal, G. P., Shah, S.V., “The new kids on the block: ADAMTSs, potentially multifunctional metalloproteinases of the ADAM family”, *The Journal of Clinical Investigation*, 105, 1335, (2000).

[10] Tang, B. L., Hong, W., “ADAMTS: A novel family of proteases with an ADAM protease domain and thrombospondin 1 repeats”, *FEBS Letters*, 445, 223, (1999).

[11] Porter, S., Clark I. M., Kevorkian, L., Edwards, D. R., “The ADAMTS metalloproteinases”, *Biochem. J.*, 386, 15, (2005).

[12] Tang B. L., “ADAMTS: a novel family of extracellular matrix proteases”, *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 33, 33, (2001).

[13] Manase, K., Endo, T., Chida, M., Nagasawa, K., Honnma, H., Yamazaki, K., et al., “Coordinated elevation, of membrane type I-matrix metalloproteinase and matrix metalloproteinase-2 expression in rat uterus during postpartum involution”, *Reprod Biol Endocrin*, 4, 1-7, (2006).

[14] Montagnana, M., Lippi, G., Albiero, A., Scevarolli, S., Salvagno, G. L., Franchi, M., et al., ”Evaluation of metalloproteinases 2 and 9 and their inhibitors in physiologic and pre-eclamptic pregnancy”. *J Clin Lab Anal*, 23, 88-92, (2009).

[15] Galis, Z. S. and Khatri, J. J., “Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: The good, the bad, and the ugly”, *Circ Res*, 90, 62, (2002).

[16] Nagase, H., and Woessner, J. F., “Matrix metalloproteinases”, *J Biol Chem*, 274, 4, (1999).

[17] Parks, W. C., “Matrix metalloproteinases in repair”, *Wound Rep Reg*, 7, (1999).

[18] Lockwood, C. J., Krikun, G., Hausknecht, V. A., Papp, C., Schatz, F., “Matrix Metalloproteinase and Matrix Metalloproteinase Inhibitor Expression in Endometrial Stromal Cells during Progestin-Initiated Decidualization and Menstruation-Related Progestin Withdrawal”, *Endocrinology*, 139, 13, (1998).

[19] Apte, S., “A disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motifs: the ADAMTS family”, *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 36, 981, (2004).

[20] Jones, G. C., Riley, G. P., “ADAMTS proteinases: a multi-domain, multi- functional family with roles in extracellular matrix turnover and arthritis”, *Arthritis Research & Therapy*, 7, 160, (2005).

[21] Matthews, R. T., Gary, S. C., Zerillo, C., Pratta, M., Solomon, K., Arner, E. C., et al., “Brain-enriched hyaluronan binding (BEHAB)/brevican cleavage in a glioma cell line is mediated by a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs (ADAMTS) family member”, *The Journal of Biological Chemistry*, 275, 30, (2000).

[22] Sandy, J. D., Westling, J., Kenagy, R. D., Iruela-Arispe, M. L., Verscharen, C., Rodriguez-Mazaneque, J. C., et al., “Versican V1 proteolysis in human aorta in vivo occurs at the Glu441-Ala442 bond, a site that is cleaved by recombinant ADAMTS-1 and ADAMTS-4”, *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 16, (2001).

[23] Brown, H. M., Dunning, K. R., Robker, R. L., Pritchard, M., Russell, D. L., “Requirement for ADAMTS-1 in extracellular matrix remodeling during ovarian folliculogenesis and lymphangiogenesis”, *Developmental Biology*, 300, 699, (2006).

[24] Russell, D. L., Doyle, K. M. H., Ochsner, S. A., Sandy, J. D., Richards, J. S., “Processing and localization of ADAMTS-1 and proteolytic cleavage of versican during cumulus matrix expansion and ovulation”, *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 43, (2003).

[25] Richards, J. S., “Ovulation: New factors that prepare the oocyte for fertilization”, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 234, 75, (2005).

[26] Shindo, T., Kurihara, H., Kuno, K., Yokoyama, H., Wada, T., Kurihara, Y., et al., “ADAMTS-1: a metalloproteinase- disintegrin essential for normal growth, fertility, and organ morphology and function”, *The Journal of Clinical Investigation*, 105, 1345, (2000).

[27] Miles, R. R., Sluka, J. P., Halladay, D. L., Santerre, L. V., Hale, L. V., Bloem, L., et al., “ADAMTS-1 A cellular disintegrin and metalloprotease with thrombospondin motifs as a target for parathyroid hormone in bone”, *Endocrinology*, 141, 4533, (2000).

[28] Turkoglu, S. A., ” İnsan ADAMTS-1 Geninin Transkripsiyonel Regülasyonu”, Doktora Tezi, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, (2012).

[29] Fontanini, G., Lucchi, M., Vignati, S., Mussi, A., Ciardiello, F., DeLaurentiis, M., et al., “Angiogenesis as a prognostic indicator of survival in non-small cell lung carcinoma: a propective study”, *J. Natl. Cancer Inst.*, 14, 461, (1996).

[30] Srivastava, A., Laidler, P., Davies, R. P., Horfan, K., “The prognostic significance of tumor vascularity in intermediate-thickness (0,76-4,0 mm) skin melanoma. A quantitative histologic study”, *Am. J. Pathol.*, 133, 419, (1988).

[31] Veikkola, T., Karkkainen, M., Claesson-Welsh, L., Alitalo, K., “Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors” *Cancer Res.*, 60, 203, (2000).

[32] Ferrara, N., “Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis”, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 280, 1358, (2001).

[33] Shibuya, M., “Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogenesis”, *Cell Struct Funct.*, 26, 25, (2001).

[34] Vázquez, F., Hastings, G., Ortega, M. A., Lane, T. F., Oikemus, S., Lombardo, M., 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”, *The Journal of Biological Chemistry*, 274, 33 , (1999).

[35] Luque, A., Carpizo, D. R., Iruela-Arispe, M. L., “ADAMTS1/METH1 inhibits endothelial cell proliferation by direct binding and sequestration of VEGF165”, *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 26 , (2003).

[36] Senger, D. R., Gali, S. J., Dvorak, A. M., et al. “Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid”, *Science*, 219, 983-985, (1983).

[37] Byrne, A. M, Bouchier-Hayes, D. J. , Harmeey, J. H., “Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF)”, *J Cell Mol Med.*, 9, 777-794, (2005).

[38] Konopatskaya, O., Churchill, A. J., Harper, S. J., et al., “VEGF165b, an endogenous C-terminal splice variant of VEGF, inhibits retinal neovascularization in mice”, *Mol Vis.*, 12, 626-632, (2006).

[39]http://www.sabiosciences.com/pathway.php?sn=VEGF_Pathway
(20.05.2015)

[40] Canals, F., Colomé, N., Ferrer, C., Plaza-Calogne, M. C., Rodriguez-Manzeneque, J. C., “Identification of substrates of the extracellular protease ADAMTS1 by DIGE proteomic analysis”, *Proteomics*, 6, 28, (2006).

[41] Sunay, F. B., Turkoglu, S. A., Kockar, F., “The expressions of ADAMTS-1-2-3 and-8 in Hep3B cells”, *Febs Journal*, 276, 121-122, (2009).

[42] Rocks, N., Paulissen, G., Quesada Calvo, F., Polette, M., Gueders, M., Munaut, C., et al., “Expression of a disintegrin and metalloprotease (ADAM and ADAMTS) enzymes in human non-small-cell lung carcinomas (NSCLC)”, *British Journal of Cancer*, 94, 724, (2006).

[43] Cross, N. A., Chandrasekharan, S., Jokonya, N., Fowles, A., Hamdy, F. C., Buttle, D. J., et al., "The expression and regulation of ADAMTS-1, -4, -5, -9, and -15, and TIMP-3 by TGFbeta1 in prostate cells: relevance to the accumulation of versican", *Prostate*, 63, 269, (2005).

[44] Gustavsson, H., Jennbacken, K., Welen K., Damber, J. E., "Altered expression of genes regulating angiogenesis in experimental androgen-independent prostate cancer", *Prostate*, 68, 161, (2008).

[45] Sunay, F. B., Turkoglu, S. A., Kockar, F., Okuyan, D., "The expressions of ADAMTS1 and VEGF in Du145, PC3, MCF-7 and HT-29 cell lines", *Febs Journal*, 277, 169-169, (2010).

[46] Porter, S., Span, P. N., Sweep, F. C. G. J., Tjan-Heijnen, V. C. G., Pennington, C. J., Pedersen, et al., "ADAMTS8 and ADAMTS15 expression predicts survival in human breast carcinoma", *Int. J. Cancer*, 115, 849, (2005).

[47] Freitas, V. M., do Amaral, F. B., Silva, T. A., Santos, E. S. Mangone, F. R., Pinheiro, J. D., et al., "Decreased expression of ADAMTS-1 in human breast tumors stimulates migration and invasion", *Molecular Cancer*, 12, 1-15, (2013).

[48] Güneş, H., "Sitokinlerin Hücre Döngüsü Üzerinde Etkileri", *Tr. J. of Biology*, 23, 283-292, (1999).

[49] Livak, K. J., Schmittgen, T. D., "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method", *Methods*, 25, 402-8, (2001).

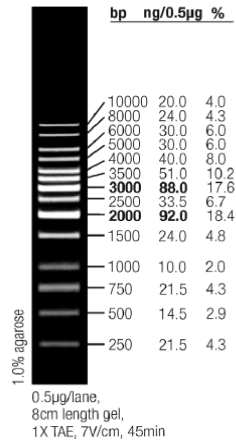
[50] Armstrong L.C., Bornstein P., "Thrombospondins 1 and 2 function as inhibitors of angiogenesis", *Matrix Biol.*, 22, 1, 63, (2003).

EKLER

6. EKLER

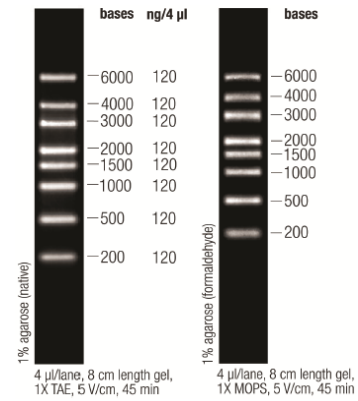
EK A Kullanılan Büyüklük Belirteçleri

GeneRuler™ 1kb DNA Ladder



Şekil EK A. 1: Fermantas 1 kb DNA marker

RiboRuler High Range RNA Ladder, ready-to-use



Şekil EK A. 2: Thermo RiboRuler High Range RNA marker

EK B ADAMTS-1 Promotor Bilgileri

P1: 1834bç(-1415/+419) Promotor Bölgesi

GACGTGTGGGAGAACTAGAAGGGACGCTTCTGGCTGGGGCCAAGTAA
GTGGGGAAGATCTGGGGAGGAGCGAGGAAAGGACCCAGATCTACTTGGA
GCCAACCAAGAGACCGGACGGGAGTGGGGCGGAAAGGC**GGAGACCAGT**
TCGAGCACTAACGCGGGGGCGCGCGAGTGTGAGGGTTGCGGGTCCGCCC
GGGGCTAGGGCGGTGCTCTCGCCATTGTCCCCG**CGGCTT**CCGCCTGTG
AAACACGTCCTTCTCTGGGTCCTTGAGCCCCTCCCACTTTTTGGAGAGA
AGAGCCACTCAGTTTTTTTTTCTAAGGACCTGTTGGTGGACCTCTCCTCGC
TTTCGTAACGCG**GATATAGCCTTTCCCTTCCT**GGTAGGAAGAGGAAG
GAGGGGTCCGGGAAGGAAGCCGATTTCTTCTTTCCCCCTCTGCACGCTT
GCTAGCCCCAGCGATCGCTGCTGGCCCCCGGGTAGGAAAGTGGGGTTCCT
GGCCGTTTCTGCGACGCTGGCCTAGGGCTTGCAGCTGCTGTTGAGTGAAA
GCACGCAGACTGGCGGGAGCCGATCATTCTCGAATGAAGAAGAAAAAG
CGCAATTCCCTCCTTATGCTCTAGGGAATTGAGCCGCGTCCCAGATCACC
CATTCCAGAAATGTGAAACCG**G**GCCCC**TCACAAAGTCGTCTCTGGTGAA**
GAGGTGGCGTGCGGGGTGGGGGTGGTGGAGGGTGAAGGCATAAGCAA
ACATATTTTAAAATCCAGATCGTAGGAAGTGTCACCTGGCCCCTCACCCA
GGCATGCTTTCTGGGGGAAGCGCAGGGCCAAGCTTTCCCTAGAAAAGCT
GGGGCGAAGAGAGAGCAGGCGGGCGGCTAAGGAGCTCCTGGCAGGCTGG
GAAGGTGGAGAAGTGGGGTGAGGTATTTTTCTAGAAA**GTGTAGCCCTA**
GCTCATCTCCTAGATTGGGGAAGAGGGAACTGAGGGAGGAGGGAAGGA
GACCCAGGGCAGCTCCAGGATAGGGAAATGTTGAAGAAGGGACTGCGTT
CTCCAACCGAACCCCTCCCTCCTGGGAACCGCAGCCCAGCGCGGTAAGTGA
GTTACCGCAACCGGGCGGTGGGGAGGAAGGGTGGTCCAGGAAACCGGCG
AGGGAGAAAAGCGGTGGAAGGGAGAGTCTTCTCCCTGGAGCGGCCCCAG
CAGTACAAAGTGCTGGTCACAGCGCCCCTCCGCCCTAGATTGACGAG
CAGTGGCGTGGAGCCAGCGCGGAGGCTGCCCCCTCCCCCTCCCGAGCCC

GCAGCGCGGAGCGCGGTTTAGCACCAACGGAGCCGGGGGCGGCGTCTT
TGGGATGGAAAAGGGCCAAAGGGGAGGAGTGGGGTGGGGGTGGGGGT
TCACTGGTCCACTATAAAAGGACCGCTCGGCTGCCCGGTTCTTGCACTCG
CTGGAAAGCGGCTCCGAGCCAGGGGCTATTGCAAAGCCAGGCTGCGCTA
CCGGACGGAGAGGGGAGAGCCCTGAGCAGAGTGAGCAACATCGCAGCC
AAGGCGGAGGCCGAAGAGGGGCGCCAGGCACCAATCTCCGCGTTGCCTC
AGCCCCGGAGGCGCCCCAGAGCGCTTCTTGTCCCAGCAGAGC

P4: 166 bç (-747/+419) Promotor Bölgesi

TCACAAAGTCGTCTCTGGTG AAGAGGTGGCGTGCGGGGTGGGGGTGG
TGGAGGGTGAAGGCATAAGCAAACATATTTTAAAATCCAGATCGTAGGA
AGTGTCACCTGGCCCCTCACCCAGGCATGCTTTCTGGGGGAAGCGCAGGG
CCAAGCTTTCCTAGAAAAGCTGGGGCGAAGAGAGAGCAGGCGGCGGCT
AAGGAGCTCCTGGCAGGCTGGGAAGGTGGAGAAGTGGGGTGAGGTATTT
TTCTAGAAAAGTGTAGCCCTAGCTCATCTCCTAGATTGGGGGAAGAGGGA
ACTGAGGGAGGAGGGAAGGAGACCCAGGGCAGCTCCAGGATAGGGAAA
TGTTGAAGAAGGGACTGCGTTCTCCAACCGAACCTCCCTCCTGGGAACC
GCAGCCCAGCGCGGTAAGTACTGAGTTACCGCAACCGGGCGGTGGGGAGGAA
GGGTGGTCCAGGAAACCGGCGAGGGAGAAAAGCGGTGGAAGGGAGAGT
CTTCTCCCTGGAGCGGCCCCAGCAGTACAAAGTGCTGGTCA CAGCGCCC
CTTCCGCCCCTAGATTGACGAGCAGTGGCGTGGAGCCAGCGCGGAGGCT
GCCCCCTCCCCCTCCCGAGCCCGCAGCGCGGA GCGCGGTTTAGCACCAA
CGGAGCCGGGGGCGGCGTCTTTGGGATGGAAAAGGGCCAAAGGGGAGG
AGTGGGGTGGGGGTGGGGGTTTCACTGGTCCACTATAAAAGGACCGCTC
GGCTGCCCGGTTCTTGCACTCGCTGGAAAGCGGCTCCGAGCCAGGGGCTA
TTGCAAAGCCAGGCTGCGCTACCGGACGGAGAGGGGAGAGCCCTGAGCA
GAGTGAGCAACATCGCAGCCAAGGCGGAGGCCGAAGAGGGGCGCCAGG
CACCAATCTCCGCGTTGCCTCAGCCCCGGAGGCGCCCCAGAGCGCTTCTT
GTCCCAGCAGAGC

P7: 548 bç (-129/+419) Promotor Bölgesi

GCGCGGTTTAGCACCAACGGAGCCGGGGGCGGCGTCTTTGGGATGGAA
AAGGGCCAAAGGGGAGGAGTGGGGTGGGGGTGGGGGTTTCACTGGTCCA
CTATAAAAGGACCGCTCGGCTGCCCGGTTCTTGCACTCGCTGGAAAGCGG
CTCCGAGCCAGGGGCTATTGCAAAGCCAGG**GTG**CGCTACCGGACGGAGA
GGGGAGAGCCCTGAGCAGAGTGAGCAACATCGCAGCCAAGGCGGAGGC
CGAAGAGGGGCGCCAGGCACCAATCTCCGCGTTGCCTCAGCCCCGGAGG
CGCCCCAGAGCGCTTCTTGTCCCAGCAGAGC