

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



**ADAMTS-1 PROMOTORUNUN SMAD ARACILI
REGÜLASYONUNUN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FATMA POYRAZLI

BALIKESİR, MAYIS - 2016

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



**ADAMTS-1 PROMOTORUNUN SMAD ARACILI
REGÜLASYONUNUN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FATMA POYRAZLI

**Jüri Üyeleri : Yrd. Doç. Dr. Sümeyye AYDOGAN TÜRKOĞLU
(Tez Danışmanı)**

Prof. Dr. Feray KÖÇKAR (Eş Danışmanı)

Prof. Dr. Nilüfer ÇİNKİLİÇ

Yrd. Doç. Dr. Aylin ER

Yrd. Doç. Dr. Hatice YILDIRIM

BALIKESİR, MAYIS - 2016

KABUL VE ONAY SAYFASI

FATMA POYRAZLI tarafından hazırlanan "ADAMTS-1 PROMOTORUNUN SMAD ARACILI REGÜLASYONUNUN İNCELENMESİ" adlı tez çalışmasının savunma sınavı 27.05.2016 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

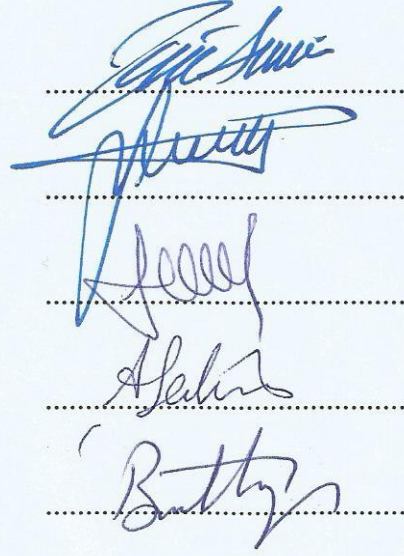
Danışman
Yrd.Doç.Dr.Sümeyye Aydoğan TÜRKÖĞLU

Eş Danışman
Prof. Dr. Feray KÖÇKAR

Üye
Prof. Dr. Nilüfer ÇİNKİLİÇ

Üye
Yrd. Doç. Dr. Aylin ER

Üye
Yrd. Doç.Dr. Hatice YILDIRIM



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 114Z695 nolu proje
ile desteklenmiştir**

ÖZET

**ADAMTS-1 PROMOTORUNUN SMAD ARACILI REGÜLASYONUNUN
İNCELENMESİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
FATMA POYRAZLI
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
(TEZ DANIŞMANI: YRD. DOÇ. DR. SÜMEYYE A. TÜRKÖĞLU)
(EŞ DANIŞMAN: PROF. DR. FERAY KÖÇKAR)
BALIKESİR, MAYIS - 2016**

ADAMTS1 (ADAM metallopeptidase with thrombospondin type I motif, 1), ADAMTS ailesinin ilk örneğidir ve Kuno ve arkadaşları tarafından fare ADAMTS1 geninin karakterizasyonu 1997 yılında yapılmıştır. ADAMTS1, endotel hücre çoğalması ve anjiogenezi TSP1 ve endostatin daha etkili bir şekilde engelleyen bir angiogenez inhibitörü olarak tanımlanmıştır. Farklı mekanizmalar ADAMTS1'in anti-anjiogenik işlevi için önerilmiştir.

Hem anti-anjiyogenetik hem de agrekanaz aktiviteli ADAMTS1' in birçok patofizyolojik durumda regülasyonu bozulmaktadır. Ancak ADAMTS1 geninin transkripsiyonel regülasyonu ile ilgili sınırlı sayıda bilgi bulunmaktadır. Bu nedenle bu çalışmanın amacı Hep3B hücrelerinde ADAMTS1' in SMAD transkripsiyon faktörlerince regülasyonuna ışık tutmaktır.

SMAD transkripsiyon faktörlerinin ADAMTS1 gen ekspresyonuna etkisi transkripsiyonel aktivitede ve mRNA seviyesinde belirlenmiştir. Öncelikli olarak SMAD2, SMAD3 ve SMAD4 transkripsiyon faktörlerinin Hep3B hücrelerinde ektopik ekspresyonu western blot ve real time teknikleri ile doğrulanmıştır. SMAD2 ve SMAD4' ün transfekte edildiği deney grubunda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında ADAMTS1 24, 48 ve 72 saatlerde artış göstermiştir özellikle 24 saatte kontrol grubuna göre 5 kat artmıştır. SMAD3 ve SMAD4' ün transfekte edildiği deney grubunda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında ADAMTS1 24, 48 ve 72 saatlerde artış göstermiştir özellikle 24 saatte kontrol grubuna göre 3,5 kat artmıştır. Transkripsiyonel aktivitenin belirlenmesi için promotor parçalarının transfeksiyonunda ve ko-transfeksiyon analizlerinde kalsiyum-fosfat presipitasyon metodu kullanılmıştır. Bazal transkripsiyonel aktivite ve ko-transfeksiyonlardan elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır. İnhisyon çalışmaları ile elde edilen değişikliğin kalkıp kalkmadığı da kontrol edilmiştir. Son olarak EMSA tekniği kullanılarak SMAD transkripsiyon faktörlerinin ADAMTS1 promotor bölgesine gerçekten bağlanıp bağlanmadığı da analiz edilmiştir. Yapılan analizler sonucunda SMAD transkripsiyon faktörlerinin gerçekten ADAMTS1 promotoruna bağlandığı EMSA ile teyit edilmiştir. ADAMTS1' in TGF- β sitokinine olan cevabının SMAD aracı yoldan olduğu düşünülmektedir.

ANAHTAR KELİMELER: ADAMTS1, TGF- β , SMAD2, SMAD3, SMAD4, HEP3B.

ABSTRACT

**AN EXAMINATION OF SMAD-MEDIATED REGULATION OF
ADAMTS-1 PROMOTER
MSC THESIS
FATMA POYRAZLI
BALIKESIR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE
BIOLOGY
(SUPERVISOR: ASSIST.PROF.DR. SÜMEYYE A. TÜRKÖĞLU)
(CO-SUPERVISOR: PROF. DR. FERAY KÖÇKAR)
BALIKESİR, MAY - 2016**

ADAMTS1 (ADAM metallopeptidase with thrombospondin type I motif, 1) is the prototype of the ADAMTS family of proteins, and the term ADAMTS was first cloned and identified by Kuno et al. in 1997. ADAMTS1 has been described as an angiogenesis inhibitor that blocks endothelial cell proliferation and angiogenesis more effectively than TSP1 and endostatin. Different mechanisms have been proposed to be responsible for the anti-angiogenic function of ADAMTS1.

ADAMTS1 that has both anti-angiogenic and aggrecanase activity was dysregulated in many pathophysiologic circumstances. However, there is limited information available on transcriptional regulation of ADAMTS1 gene. Therefore, this study mainly aim to identify the regulation of ADAMTS1 gene by SMAD transcription factors in human hepatoma cells (HEP3B).

Regulation of SMAD transcription factors on ADAMTS1 gene expression determined with transcriptional activity and mRNA level of ADAMTS1 gene. Firstly, ectopic expression of SMAD2, SMAD3 and SMAD4 transcription factors verified by western blot and Real time PCR in Hep3B cell line. After transfection of SMAD2 and SMAD4 expression vector into Hep3B cell line, we obtained 5 fold expression of ADAMTS-1 mRNA comparing control cells at 24h. We also obtained 3,5 fold expression of ADAMTS-1 mRNA after transfection of SMAD3 and SMAD4 expression vectors. For the transcriptional activity, calcium phosphate precipitation method used for transient transfection of promoter constructs and co-transfection analysis. Basal transcriptional activity and the data obtained from co-transfection analysis compared. We also treated the cells specific SMAD inhibitors and then analysed mRNA level and promoter activity of ADAMTS1. As a result of EMSA analysis we obtain interaction between SMAD transcription factor and ADAMTS1 promoter. It was thought that the response of ADAMTS-1 gene expression possibly through SMAD-dependent TGF- β pathway.

KEYWORDS: ADAMTS1, TGF- β , SMAD2, SMAD3, SMAD4, HEP3B.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
ABSTRACT	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ	x
SEMBOL LİSTESİ	xi
ÖNSÖZ.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Hücre Dışı Matriks (Ekstra sellüler Matriks; ECM) ve ADAM Ailesinin Yapısı	1
1.2 ADAMTS Ailesi.....	3
1.3 ADAMTS Proteinlerinin Yapısı.....	4
1.3.1 ADAMTS1' in Kanserle İlişkisi	8
1.3.2 ADAMTS1' in Transkripsiyonel Regülasyonu	10
1.4 Transforme Edici Büyüme Faktörü (TGF- β) Ailesi.....	12
1.5 SMAD Proteinlerinin Temel Özellikleri	13
1.5.1 SMAD Proteinlerinin Sınıflandırılması	15
1.5.2 SMAD Proteinleri ve TGF- β Sinyal İletim Yolu.....	16
1.6 Non-SMAD (SMAD-Bağımsız) Yolağı.....	18
1.6.1 TGF- β Kaynaklı ERK Aktivasyonu ve Tirozin Fosforilasyonu	18
1.6.2 TGF- β -Aracılı EMT, Rho Benzeri GTPazlar	20
1.7 Çalışmanın Amacı	21
2. MATERYAL VE METOT	26
2.1 Materyal.....	26
2.1.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar	26
2.1.2 Çalışmada Kullanılan Laboratuvar Gereçleri	28
2.1.3 Çalışmada Kullanılan Hücre Soyu.....	30
2.1.4 Çalışmada Kullanılan Vektörler	30
2.2 Metot	32
2.2.1 Çalışmada Kullanılan Ortamın, Malzemenin Temizliği ve Sterilizasyonu.....	32
2.2.2 Hücre Kültürü Teknikleri.....	32
2.2.2.1 Hücre Kültüründe Kullanılacak Malzemelerin Hazırlığı.....	32
2.2.3 DNA ile İlgili Teknikler	34
2.2.3.1 Büyük Ölçekli Plazmit İzolasyonu (Maxi Prep.).....	34
2.2.3.2 DNA Miktarının Spektrofotometrik Olarak Belirlenmesi	34
2.2.4 MTT Çalışması (Ekspresyon Vektörlerinin ve TGF- β Sitokinin Sitotoksik Etkisini Test Etmek için)	35
2.2.4.1 Canlı Hücrelerin Belirlenmesi ve Hücre Sayımı.....	35
2.2.4.2 Kalsiyum-Fosfat Presipitasyonu ile Geçici Transfeksiyon	36
2.2.4.3 MTT Uygulaması	36
2.2.5 Transkripsiyonel Aktivite Deneyleri	37
2.2.5.1 Plazmitlerin Ca-Fosfat Presipitasyonu ile Geçici Transfeksiyon	37
2.2.5.2 Salınan Sistem Lusiferaz Aktivitesinin Ölçümü	38

2.2.5.3	SEAP Aktivitesinin Ölçümü	38
2.2.6	mRNA Seviyesindeki Etkilerin Analizi ile İlgili Teknikler	39
2.2.6.1	Plazmitlerin Geçici Transfeksiyonu için DeneY Düzeninin Kurulması ve RNA izolasyonu.....	39
2.2.6.2	RNA Miktarının Spektrofotometrik Olarak Belirlenmesi.....	39
2.2.6.3	Formaldehit Jel Elektroforezi (RNA jeli)	40
2.2.6.4	Reverse Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonları (RT-PZR)	41
2.2.6.5	cDNA Sentezi.....	41
2.2.6.6	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile cDNA Kontrolü	41
2.2.6.7	Agaroz Jel Elektroforezi	42
2.2.6.8	Gerçek Zamanlı PZR (Real Time PZR).....	42
2.2.7	Protein ile İlgili Teknikler.....	44
2.2.7.1	DeneY Düzeninin Kurulması ve Protein Ekstraktlarının Hazırlanması.....	44
2.2.7.2	Protein Miktarının Qubit ile Belirlenmesi.....	46
2.2.7.3	SDS PAGE.....	46
2.2.7.4	SDS Jelinin Blotlanması	47
2.2.7.5	Proteinlerin Belirlenmesi	48
2.2.7.6	Sonuçların Filme Aktarılması	48
2.2.8	DNA-Protein Etkileşimi ile İlgili Teknikler	49
2.2.8.1	Electromobility Shift Assay (EMSA)	49
2.2.8.2	Hep3B Hücrelerinden Nükleer Ekstrakt Hazırlanması	50
2.2.8.3	Oligoların Etiketlenmesi	51
2.2.8.4	Oligonükleotidlerin Bağlanması	52
2.2.8.5	Bağlanma Reaksiyonu.....	52
2.2.8.6	Jelin Yürütülmesi ve Proteinlerin Membrana Transferi.....	52
2.2.9	İnhibisyon Çalışmaları.....	53
2.2.9.1	Protein ve RNA Eldesi	53
2.2.9.2	Kullanılan İnhibitörün Hep3B Hücrelerine Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi.....	54
2.2.10	İstatiksel Analiz	55
3.	BULGULAR	56
3.1	Ektopik Olarak SMAD2, SMAD3 ve SMAD4' ün Ekspresyonu	56
3.1.1	mRNA Seviyesinde SMAD Transkripsiyon Faktörlerinin Ektopik Üretiminin Kontrolü.....	57
3.1.1.1	Çalışmada Kullanılacak Primerlerin Optimizasyonu.....	57
3.1.1.2	Ekspresyon Vektörlerinin Hazırlanması	59
3.1.1.3	RNA İzolasyonu, cDNA Eldesi ve PZR	59
3.1.1.4	Gerçek Zamanlı PZR ile SMAD Transkripsiyon Faktörlerinin Ektopik Ekspresyonunun Doğrulanması.....	61
3.1.2	Protein Seviyesinde SMAD Transkripsiyon Faktörlerinin Ektopik Üretiminin Kontrolü.....	68
3.2	Ektopik olarak Üretilen SMAD Transkripsiyon Faktörlerinin ve TGF- β Uygulamasının Hep3B Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi	72
3.3	Ko-Transfeksiyon DeneYleri (ADAMTS1 Promotor Parçasını içeren Vektörler ve SMAD Ekspresyon Vektörlerinin birlikte Transfeksiyonu).....	76
3.3.1	SMAD Vektörlerinin Transfeksiyonu ve ADAMTS1	

	mRNA Seviyesindeki Değişikliğin Belirlenmesi	81
3.4	EMSA	84
3.5	İnhibisyon Çalışmaları	94
3.5.1	Sis3 (SMAD İnhibitörü) İnhibitörünün Hücre Proliferasyonuna Etkisi	94
3.5.2	Sis3 İnhibitörünün SMAD ve ADAMTS1 mRNA Seviyesine Etkisi	95
3.5.3	SİS3 (SMAD İnhibitörünün) Western Bloth ile Protein Düzeyine Etkisi	97
3.5.4	SMAD İnhibitörünün ADAMTS1 Promotor Parçalarına Etkisi.....	98
4.	SONUÇ VE ÖNERİLER	101
5.	KAYNAKLAR.....	111
6.	EKLER.....	120



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: Ekstrasellüler matris ve ADAM ailesinin özellikleri. [11]' den esinlenerek çizilmiştir.....	2
Şekil 1.2: ADAMTS proteinlerinin biyokimyasal yapısının şematik olarak gösterimi [2].....	5
Şekil 1.3: ADAMTS1 proteinin domain yapısı.....	7
Şekil 1.4: SMAD proteinleri ve yapısal elemanları [39].	14
Şekil 1.5: TGF- β sinyal iletim yolu ve SMAD proteinleri ile ilişkisi [38].....	17
Şekil 1.6: SMAD bağımsız Erk yolu [53].	20
Şekil 1.7: SMAD bağımsız GTPaz yolu [53].	21
Şekil 1.8: TGF- β sitokinin normal ve hipoksik koşullarda promotör parçalarına etkisi.	23
Şekil 1.9: Tez çalışma basamaklarını özetleyen akış diyagramı.	25
Şekil 2.1: pMETLuc kontrol vektörü.....	30
Şekil 2.2: pSEAP2 kontrol vektörü.	31
Şekil 2.3: pMETLuc reporter vektör haritası.....	31
Şekil 2.4: Hemositometre.....	36
Şekil 3.1: Bulgular 1. Bölümün akış diyagramı.	56
Şekil 3.2: Ekspresyon primerleri ile RT PZR sonuçları.	58
Şekil 3.3: Deney ve kontrol gruplarına ait RNA' ların formaldehit agaroz jel görüntüsü.	60
Şekil 3.4: Elde edilen cDNA' ların İnsan-beta-2 Mikroglobulin primerleri kullanılarak RT-PZR sonuçları.	61
Şekil 3.5: Hep3B hücre hattında SMAD2 mRNA seviyesi.	63
Şekil 3.6: Hep3B hücre hattında SMAD4 mRNA seviyesi.	64
Şekil 3.7: Hep3B hücrelerinde SMAD3 mRNA seviyesi.....	64
Şekil 3.8: Hep3B hücrelerinde SMAD4 mRNA seviyesi.....	65
Şekil 3.9: SMAD2/4 transfekte edilen ve TGF- β sitokini uygulanan hücrelerde SMAD2 mRNA ekspresyonu.	66
Şekil 3.10: SMAD2/4 transfekte edilen ve TGF- β sitokini uygulanan hücrelerde SMAD4 mRNA ekspresyonu.	66
Şekil 3.11: SMAD3/4 transfekte edilen ve TGF- β sitokini uygulanan hücrelerde SMAD3 mRNA ekspresyonu.	67
Şekil 3.12: SMAD3/4 transfekte edilen ve TGF- β sitokini uygulanan hücrelerde SMAD4 mRNA ekspresyonu.	67
Şekil 3.13: SMAD2/4 ve SMAD3/4 uygulanmış Hep3B hücre hattında SMAD ve İnsan- β -Aktin protein optimizasyonu.	68
Şekil 3.14: Westernde kullanılacak protein miktarı için optimizasyon deneyi.	69
Şekil 3.15: SMAD 2-3-4 transfekte edilmiş HEP3B hücrelerinde SMAD ve β -aktin proteinlerinin densitometrik analizi	70
Şekil 3.16: SMAD2/4 transfekte edilen ve TGF- β sitokini uygulanan hücrelerde SMAD2/4 ve İnsan Beta Aktinin protein etkisinin jel görüntüsü ve densitometrik analiz sonucu.	71
Şekil 3.17: SMAD3/4 transfekte edilen ve TGF- β sitokini uygulanan hücrelerde SMAD2/3 ve İnsan Beta Aktinin protein	

etkisinin jel görüntüsü ve densitometrik analiz sonucu.	72
Şekil 3.18: SMAD2/4 ve SMAD3/4 transfekte edilen ve TGF-B uygulanan hücrelerde bu uygulamaların Hep3B hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin analizi 24 saat.	74
Şekil 3.19: SMAD2/4 ve SMAD3/4 transfekte edilen ve TGF-B uygulanan hücrelerde bu uygulamaların Hep3B hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin analizi 48 saat.	74
Şekil 3.20: SMAD2/4 ve SMAD3/4 transfekte edilen ve TGF-B uygulanan hücrelerde bu uygulamaların Hep3B hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin analizi 72 saat.	75
Şekil 3.21: Bulgular 2. Bölümün akış diyagramı.	76
Şekil 3.22: Promotor (P) Parçalarının temsili şekli.	77
Şekil 3.23: 1834 bç (-1415/+419) Promotor parçasının Hep3B hücrelerinde bazal aktivitesi.	78
Şekil 3.24: P7: 548 bç (-129/+419) Promotor parçasının Hep3B hücrelerinde bazal aktivitesi.	79
Şekil 3.25: SMAD2/4, SMAD3/4 ve TGF-β sitokininin ADAMTS1 P1 (1834 bç) promotor parçasına olan etkisi.	80
Şekil 3.26: SMAD2/4, SMAD3/4 ve TGF-β sitokininin ADAMTS1 P7: 548 bç (-129/+419) promotor parçasına olan etkisi.	80
Şekil 3.27: SMAD2/4 transfekte edilen hücrelerde ADAMTS1 mRNA ekspresyonu.	82
Şekil 3.28: SMAD2/4 transfekte edilen ve TGF-β sitokini uygulan hücrelerde ADAMTS1 mRNA ekspresyonu.	82
Şekil 3.29: SMAD3/4 transfekte edilen hücrelerde ADAMTS1 mRNA ekspresyonu.	83
Şekil 3.30: SMAD3/4 transfekte edilen ve TGF-β sitokini uygulan hücrelerde ADAMTS1 mRNA ekspresyonu.	83
Şekil 3.31: Bulgular 3. Bölümün akış diyagramı.	84
Şekil 3.32: -1415/+419 insan ADAMTS-1 promotörü üzerinde yer alan muhtemel transkripsiyon faktörlerinin bağlanma dizileri ve lokalizasyonları.	86
Şekil 3.33: ADAMTS1 SMAD bağlanma bölgesine göre yapılan '+106/+166' ADAMTS1 promotor bölgesinin EMSA sonucu (Yarışma deneyleri).	89
Şekil 3.34: ADAMTS1 SMAD bağlanma bölgesine göre yapılan -1365/-1305 ADAMTS1 promotor bölgesinin EMSA sonucu (Yarışma deneyleri).	91
Şekil 3.35: ADAMTS1 SMAD bağlanma bölgesine göre yapılan '+106/+166' ADAMTS1 promotor bölgesinin supershift EMSA sonucu.	92
Şekil 3.36: ADAMTS1 SMAD bağlanma bölgesine göre yapılan -1365/-1305 ADAMTS1 promotor bölgesinin supershift EMSA sonucu.	93
Şekil 3.37: Bulgular 4. Bölümün akış diyagramı.	94
Şekil 3.38: İnhibisyon çalışmalarında kullanılan Sis3 inhibitörünün hücre proliferasyonuna olan etkisinin araştırılması 24 saat.	95
Şekil 3.39: İnhibisyon deneyi RNA formaldehit agaroz jel görüntüsü.	96
Şekil 3.40: İnhibisyon deneyinde kullanılan cDNA'ların kontrol PZR elektroforez görüntüsü.	96

Şekil 3.41: SİS3 ve TGF- β uygulanan Hep3B hücrelerinde (A) SMAD2, (B) SMAD3, (C) SMAD4 ve (D) ADAMTS1 etkisi.....	97
Şekil 3.42: SİS3 ve TGF- β sitokini uygulan hücrelerde SMAD2/3 ve İnsan Beta Aktin görüntüsü.	98
Şekil 3.43: SİS3 inhibitörünün ve TGF- β sitokininin SMAD uygulanmış HEP3B hücre hattında ADAMTS1 promotörü olan P1 (-1415/+419)‘ e olan etkisi 48 saat.	99
Şekil 3.44: SİS3 inhibitörünün ve TGF- β sitokininin SMAD uygulanmış HEP3B hücre hattında ADAMTS1 promotörü olan P7 (-129/+419) ‘ e olan etkisi 48 saat.	100



TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1: Çalışmada kullanılan kimyasallar, kitler ve üreticiler	26
Tablo 2.2: Çalışmada kullanılan cihazlar ve modelleri	28
Tablo 2.3: Transfeksiyon çözeltileri.	36
Tablo 2.4: Lusiferaz aktivite ölçüm çözeltileri.	38
Tablo 2.5: Seap aktivite ölçüm çözeltileri.....	38
Tablo 2.6: Formaldehit jel elektroforezi çözeltileri.	40
Tablo 2.7: DEPC' li dH ₂ O.	40
Tablo 2.8: Real Time PZR bileşenleri.....	43
Tablo 2.9: Real Time PZR koşulları.	43
Tablo 2.10: Çalışmada kullanılan primer bilgileri.	43
Tablo 2.11: Ripa Buffer çözeltisinin içeriği.....	45
Tablo 2.12: SDS PAGE çözeltileri.....	47
Tablo 2.13: Western Bloth çözeltileri.	47
Tablo 2.14: Çalışmada kullanılan EMSA primerleri.	50
Tablo 2.15: Nükleer Ekstrakt için kullanılan çözeltiler.	51
Tablo 3.1: PZR da kullanılan malzemeler ve miktarları.	57
Tablo 3.2: PZR koşulları	58
Tablo 3.3: İnsan-β-2 PZR koşulları.....	61
Tablo 3.4: Gerçek zamanlı PZR reaksiyonu bileşenleri.....	62
Tablo 3.5: Gerçek zamanlı PZR koşulları.....	63
Tablo 3.6: EMSA çalışmalarında kullanılan primer dizileri.	87

SEMBOL LİSTESİ

AP1	Activator protein 1
BSA	Sığır Serum Albumin
C/EBP	CCAAT Binding Protein
DMSO	Dimetil Sulfoksit
DEPC	Dietilpirokarbonat
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EDTA	Ethylendiamintetrasedik asit
<i>E.coli</i>	Escherichia coli
FA	Formaldehit Agaroz
FCS	Fetal Sığır Serumu
HIF	Hipoksi-indüklü faktör
KLF	Kruempel like transcription factors
LB	Luria Broth
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
RNA	Ribonükleik Asit
RT-PZR	Reverse Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RPM	Dakikada ki Dönüş Sayısı
SP1/GC	Stimulating Protein 1
SİS3	SMAD3 İnhibitörü
TSP1	Trombospondin Motif Tip 1
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TGF-β	Transforme Edici Büyüme Faktörü- β
USF	Upstream Stimulating Factor
UV	Ultra-viyole
Ü	Enzim Ünitesi
VEGF	Vasküler Endotelial Büyüme Hormonu
qRT-PZR	Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tezi olarak hazırlanan bu çalışmanın deneysel süreci Balıkesir Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Araştırma Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiş olup, Balıkesir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi öğretim üyeleri Yrd. Doç. Dr. Sümeyye AYDOĞAN TÜRKOĞLU danışmanlığında ve eş danışmanım Prof. Dr. Feray KÖÇKAR danışmanlığında sonuçlanmıştır.

Tez çalışması sürecinde her zaman bana yol gösteren, bazı çıkmazlarımda desteğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübesiyle bana destek olan değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Sümeyye AYDOĞAN TÜRKOĞLUNA' na,

Bu çalışma sürecinde beni her zaman sabırla dinleyen, yardımını esirgemeyen, engin bilgisine her zaman muhtaç olduğum ve olacağım değerli hocam Prof. Dr. Feray KÖÇKAR' a,

Laboratuvar çalışmalarımda bilgi ve birikimini benimle paylaşan, üzerimde emekleri çok olan değerli hocalarım Doç. Dr. Ekrem DÜNDAR, Yrd. Doç. Dr. Hatice YILDIRIM, Yrd. Doç. Dr. Meltem ALPER, Dr. Esra TOKAY, Öğr.Gör. Derya ALTAN, ve A.Tuğşen AYDEMİR'e,

Yoğun ve yorgun laboratuvar çalışmalarında her zaman birbirimize destek olmaya çalıştığımız, birlikte gülüp ağladığımız ve kardeş gibi gördüğüm Merve KARAMAN, Gizem GÜLER, Sinem GÜLTEKİN, Gamze GÜNGÖR, Sevgi BAYSAL ve Din Muhammed DOLİYEV' e,

Bu çalışma için özel hayatımdan fedakarlık yaptığım zamanlarda bana her zaman anlayış gösteren ve amacım doğrultusunda ilerlediğim bu yolculukta elimi hiç bırakmayan bana her koşulda inanan, maddi manevi destek olmak için özveriyle çalışan, hayatımı paylaştığım sevgili biricik eşim Beytullah POYRAZLI ve ailesine,

Sonsuz teşekkürler...

Bu yüksek lisans tezimi annem Hanife AYTEKİN' e ithaf ediyorum ve kendisini rahmetle anıyorum.

Fatma POYRAZLI

1. GİRİŞ

Karsinogenezin hücre dışı matriks yeniden şekillenmesi gibi çeşitli hücrel ve hücrelerarası mekanizmalardaki anormallikler ile ilişkili olduğu iyi bilinmektedir. Tüm ekstraselüler matriks (ECM) proteazları arasında, ADAMTS' ler ('A disintegrin like and metalloproteinase with thrombospondin motif type-1' thrombospondin motifleri ile bir disintegrin ve metalloproteaz alanları) nispeten yeni bir gruptur ve karsinogenez ve kanserin yayılımı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Karsinogenez birçok hücrel prosesinde anormalliklerle ortaya çıkmaktadır, hücre döngüsü kontrolü, apoptozis, ECM yeniden yapılanması ve metastaz [1].

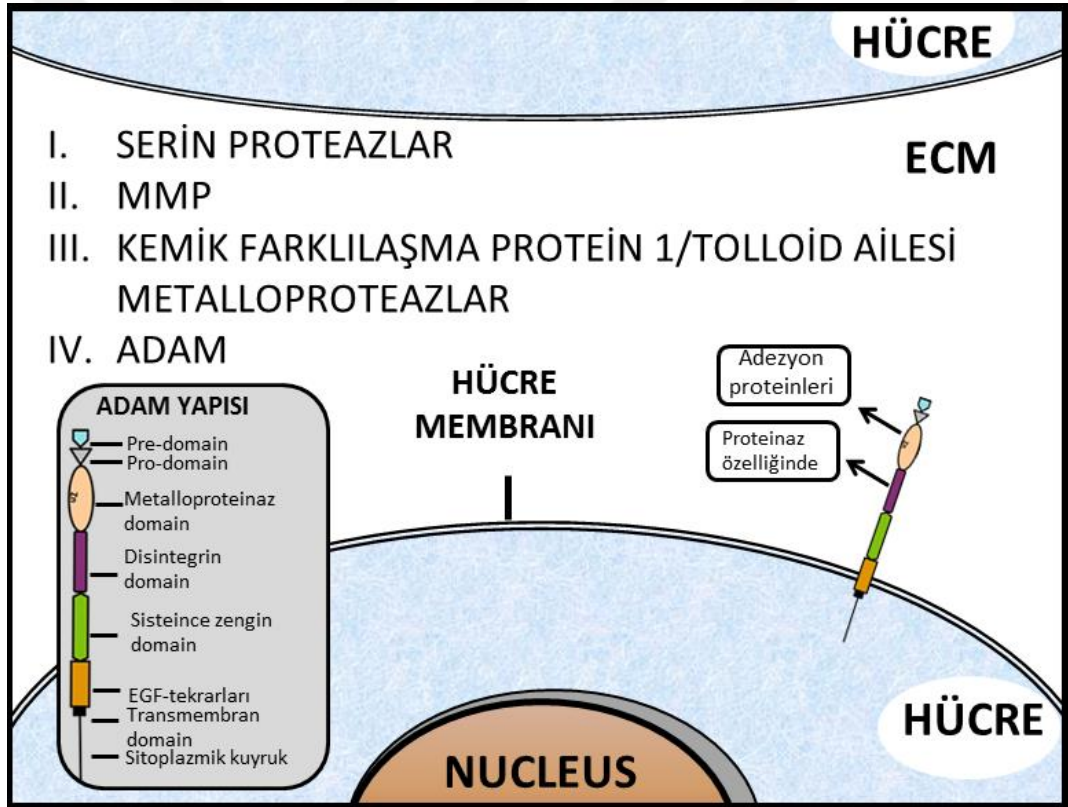
ADAMTS ailesindeki proteazlar, 19 üyesi olan bir gen ailesidir. Bu ailenin üyeleri ekstraselüler matrikse salgılanan ve değişken sayıda tip 1 motifi içeren proteazlardır. ADAMTS ailesi prokollejen ve von Willebrand faktörün matürasyonunda, morfogenez, anjiyogenez, hücre adezyonu, migrasyon, proliferasyon, ovulasyon, kanser ve artrit ile ilgili hücre dışı matriks proteolizinde görev alırlar [2].

1.1 Hücre Dışı Matriks (Ekstra sellüler Matriks; ECM) ve ADAM Ailesinin Yapısı

Ekstraselüler matriksin, hücre ve dokularda yapısal ve düzenleyici fonksiyonunun olduğu bilinmektedir. Bu görevlerinin dışında hücreler arası haberleşme, embriyogenez, hücre göçü, hemostaz, yara iyileşmesi ve apoptozis gibi pek çok fizyolojik olayda da önemlidir. Çok sayıda molekül tarafından ECM yıkımı kanser hücrelerinin çevre dokulara ve uzak organlara yayılımına sebep olmaktadır. Yeni bir grup olan ve proteaz aileleri arasında yer alan ADAMTS ailesinin çeşitli üyelerinin farklı kanserlerde önemli rollere sahip olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. ECM' nin proteolitik yıkımında proteaz aktivitesine sahip çok sayıda molekül işlev almaktadır. Bu moleküller domain yapılarına göre sınıflandırılmıştır. Bunlar serin proteazlar, matriks metalloproteinazlar (MMP), kemik farklılaşma

protein 1/tolloid ailesi olan metalloproteinazları ve proteolizde ve hücre-hücre adezyonunda görev alan ADAM (bir disintegrin ve metalloproteaz) veya MDC (metalloproteaz/disintegrin/sistein) olarak adlandırılan transmembran glikoproteinlerdir [3,4,5,6,7,8,9,10].

ADAM ailesinin üyeleri, hücre membranında bulunup ve çok sayıda domeyne sahip olan çinko bağımlı metalloproteinazlardır. Disintegrin ve metalloproteinaz domeynleri sayesinde ADAM' lar, hem proteinaz hem de adezyon proteinlerinin özelliklerine sahip olurlar. Bu özellikleri sayesinde ADAM' lar diğer hücre yüzey proteinlerinden ayrılırlar. ADAM ailesi hücre-hücre etkileşimleri ile hücre-matriks etkileşimlerinde önemli rollere sahiptirler [3,4].



Şekil 1.1: Ekstrasellüler matriks ve ADAM ailesinin özellikleri. [11]' den esinlenerek çizilmiştir.

ADAM ailesi üyelerinin geniş ölçüde aydınlatılmasının ardından ADAM ailesiyle ilişkili olup fakat yeni özelliklere de sahip olan bir grup 1997 yılında Kuno ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir. Yaptıkları bu çalışmada, ADAM protein ailesinin üyelerine çok benzeyen ayrıca trombospondin tip 1 (TSP1) motifleri taşıyan

ve inflamasyonla ilişkili olan bir proteini klonlamışlardır. Kuno ve arkadaşları, bu yeni üyeyi tanımlamak için ADAMTS (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs) ismini kullanmışlardır. ADAM ailesi üyelerinin aksine, hücre membranında yer almayıp, ekstrasellüler matrikse salgılanırlar. ADAMTS' ler; ADAM ailesi üyelerinin sahip oldukları tüm domainlere sahiptirler ve kendilerine özgü TSP1 motifleri de bulundukları için ADAM üyeleri kapsamına alınmayıp yeni bir aile oluşturulmuştur. [5]. ADAMTS' lerin MMP (Matriks Metalloproteazlar) ve de ADAM' lardan farkı, ADAMTS' lerin ECM' ye bağlanabilmeleridir. [2].

1.2 ADAMTS Ailesi

ADAMTS genleri ve ürünleri olan enzimler hücre dışı matriksin şekillenmesi, artrit, ateroskleroz, fibroz, organogenez, hemostaz ve yara iyileşmesi de dahil olmak üzere, çeşitli patolojik süreçlerde görev aldığı gibi bu ailenin üyelerinden bazıları, kanser ve kardiyovasküler hastalık ile ilişkili iken bazı üyeleri ise kalıtsal genetik bozukluklara yol açmaktadır [12].

Bir çok önemli süreçte rol alan ADAMTS' ler, protein dizisine, domainlerin organizasyonuna, gen dizi korunmuşluğuna ve substrat tercihine göre sınıflandırılmıştır. [3,4,6,7,12,13].

Buna sınıflandırmaya bakarsak:

1) Prokollajen işlemler; ADAMTS2, 3 ve 14' dir. Prokollajenin kollajene dönüştürülmesi aşamasında N-terminal propeptidlerin uzaklaştırılmasında görev alırlar. Prokollajen I, II ve III' e ADAMTS2 etki ederken, prokollajen I ve II' nin yeniden düzenlenmesinde ADAMTS3 ve ADAMTS14 işlev görür.

2) Proteoglikan degradasyonu; ADAMTS1, 4, 5, 8, 9, ve 15' dir. Majör kıkırdak protein olan agrekanın parçalanmasında agrekanaz aktivitesine sahiptirler. Daha sonra bu grubun, merkezi sinir sisteminde yoğun şekilde ifade olan kan damarlarında ve brevikan da bulunan versikanı da degrades ettiği bulunmuştur.

3) Anjiogenezin inhibisyonunda rol alan üyeler; ADAMTS1 ve 8' dir.

4) ADAMTS13 (vWFCP) homoeostasta von Willebrand Faktörünü Parçalayan Proteaz olarak bilinir. Substratı ise vWF' dir. vWF vasküler ve plazma trombositler, endotel hücrelerinde bulunan büyük bir glikoproteindir. Pıhtılaşma faktörlerinden birisi olan factor 8' in taşıyıcı proteindir ve trombosit agrekasyonunu sağlar.

5) Kıkırdak oligomerik matriks proteini (COMP); ADAMTS 7, 12,

6) Orfan ADAMTS' ler ise bugüne kadar fonksiyonu ve substratı bulunamamış ADAMTS proteinlerine verilen isimdir. Bunlar ADAMTS6, 10, 16 ve 19' dur.

Bunların dışında ADAMTS' ler organogenez, inflamasyon ve fertilitate de görev almaktadırlar. Ayrıca yapılan son çalışmalarda artritde ve pek çok kanserde bazı ADAMTS genlerinin ekspresyonları değişiklik göstermektedir [2,13,14,15].

1.3 ADAMTS Proteinlerinin Yapısı

ADAMTS' lerin çok sayıda izoformunun, alternatif splicing ile oluşuyor olması ihtimali son derece yüksektir [6]. ADAMTS proteinlerinin C-terminal kısmı ile N-terminal bölümü karşılaştırıldığında N ucunda daha fazla bir farklılığın olduğu gözlenmektedir.

ADAMTS proteinlerinin tamamı öncelikle inaktif formda bulunmaktadır ve pre-proenzim olarak sentez edilmektedir. N-terminalinden başlayarak C-terminaline ilerleyerek baktığımızda 8 farklı domain içerdiğini görmekteyiz. Bu domainler;

1-Sinyal peptid (Sinyalin ilk başladığı kısımdır),

2-Pro-domain (bu domain inaktif formda bulunan enzimi en korur),

3-Çinko bağlayıcı motif bulunduran metalloproteinaz katalitik domain,

4-Disintegrin benzeri domain (bu kısım suda çözünen yılan venom disintegrinlerine benzer bir düzen içerisindedir. Ayrıca, arjinin-glisin-aspartik asit integrin tanıma sekansı bulunduran bir aile üyesidir.),

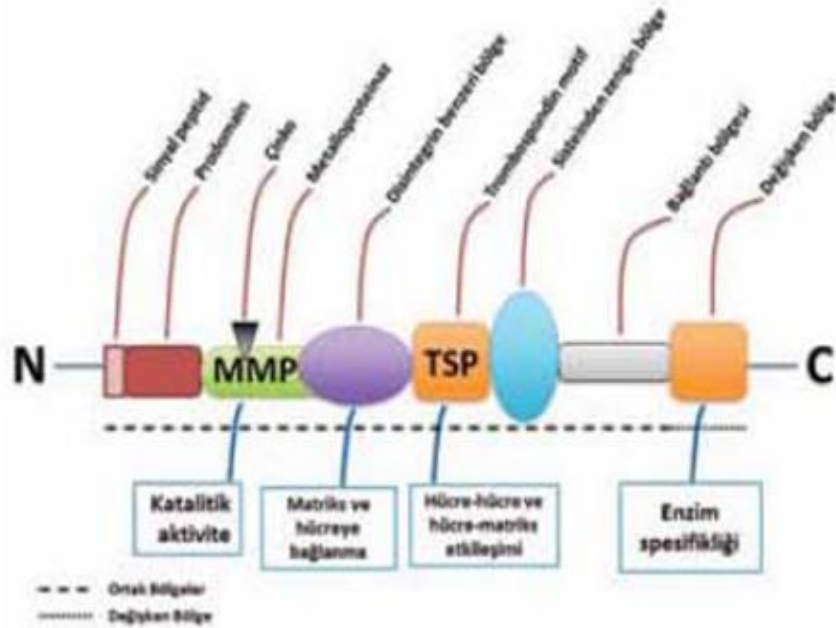
5-Bir TSP1 ve TSP2 (trombospondin tip 1 ve trombospondin tip 2)' de bulunan merkezi bir TSP motifi,

6-Sisteince zengin bir domain,

7-Yapısal özelliklerde herhangi bir etkisi bulunmayan ve farklı uzunluklarda olabilen bir ara halka (spacer) bölgesi ve

8- C-terminal bölgesinde farklı sayılarda trombospondin motifi tekrarları içerir.

ADAMTS üyelerinin tümünde bulunan bu domeinlerin dışında, ailenin bazı üyelerinin farklı domeynlerde sahip oldukları ve bu farklı domeinlerin ise molekülün C ucunda bulunduğu görülmektedir [2,4,7,13].



Şekil 1.2: ADAMTS proteinlerinin biyokimyasal yapısının şematik olarak gösterimi [2].

ADAMTS ailesinin Vazquez ve grubu tarafından 1999 yılında anti-anjiyogenetik etkisi olan proteinlere sahip olduğu bulunmuştur [18]. ADAMTS1 ise ilk inflamasyon aracısı olarak tanımlanmıştır. Organogeneziste, kan / lenf damarı oluşumu, yumurtalık follikülogenez ve ovulasyon gibi fizyolojik olaylarda rol almaktadır [16]. Inagaki ve arkadaşları 2014 yılında yaptıkları çalışmalarında

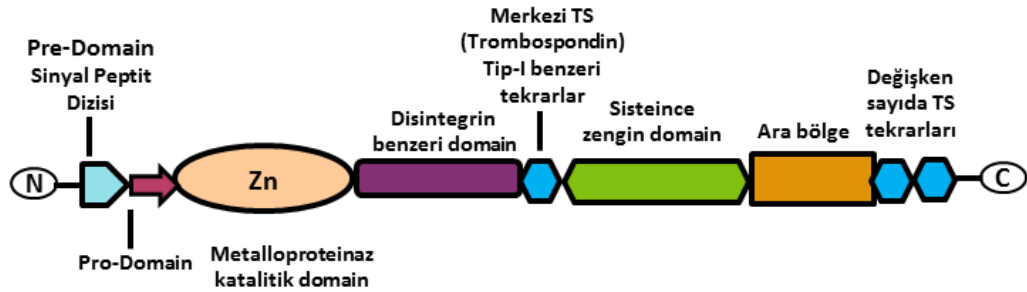
ADAMTS1' in lenf anjiyogenezi üzerindeki etkisini araştırmışlardır ve gen terapisi ile ADAMTS1 in-vitro şartlarda lenf anjiyogenezi inhibe ettiğini göstermişlerdir. Ayrıca immünopresipitasyon işlemleri ile ADAMTS1' in VEGF ile bir kompleks oluşturduğunu ortaya koymuşlardır [17]. Yine 2015' de yapılan bir çalışmada ADAMTS1, civciv korallantoik membranda VEGF ile uyarılan anjiyogenezi yani damarlaşmayı önlemektedir. Ayrıca ADAMTS1, fibroblast büyüme faktörü-2 (FGF-2) ile uyarılan damarlanmayı da baskılamaktadır [2,18].

Vücudumuzda bulunan kan damarları vaskülogenez ve anjiyogenez sonucu oluşmaktadır. Vaskülogenez, primitif damar oluşumudur ve anjiyoblastlardan farklılaşarak oluşurlar. Anjiyoblastlar, ekstraembriyonik mezodermden oluşan mezenşimalden oluşmaktadır. Anjiyoblastların çoğalması ve bu hücre topluluğunun birleşmesi sonucu ilk olarak primer kapiller pleksus oluşur. Bunun sonucunda ise primer kapiller pleksustan yeni damar yapıları filizlenirler ve dallanırlar. Embriyo gelişimin ilk günlerinde çevre dokulardan difüzyon ile beslenir. Sonuçta geliştikçe büyüyen embriyo gittikçe oksijen ve besin ihtiyacını karşılamakta zorlanır. Bu sebeple erken dönem olan üçüncü haftanın başlarında anjiyogenezis görülmeye başlar. Damar oluşumu yani anjiyogenez, büyüme ve gelişme gibi durumlarda gerçekleşmesi beklenen bir süreçtir. Ayrıca romatoid artrit, kanserlerde, bağırsak hastalıkları gibi inflamatuvar hastalıklarda, maküler dejenerasyon gibi göz hastalıklarında patolojik olarak anjiyogenez meydana geldiği saptanmıştır. Bunların dışında ise infertilite, periferik arter hastalıkları, gecikmiş yara iyileşmesi, kalp yetmezliği gibi durumlarda ise anjiyogenezde yetersizlikler olduğu gözlemlenmiştir. Günümüzde çok yaygın olarak gözlenen kanserde özellikle tümör hücrelerinin büyümesi için gerekli olan besinlerin alınımında bu tümör hücrelerinden salgılanan bazı maddeler sonucu anjiyogenez uyarılmaktadır. Bunun sonucunda da tümör hücresi bu damarlaşma yoluyla farklı dokulardan aldığı besinlerle büyüüp gelişir. Nitekim günümüzde yapılan bir çok klinik deneylerde anti-anjiyogenik ajanlar, insan tümörlerinin üzerindeki antitümör aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla kullanılmaktadır [19,20].

Ayrıca ADAMTS1 Majör kıkırdak protein olan agrekanın parçalanmasında agrekanaz aktivitesine sahiptir. Ayrıca, merkezi sinir sisteminde ifadesi bulunan brevikan da ve kan damarlarında var olan versikanı da parçaladığı gözlemlenmiştir.

Agrekan, kıkırdakta bulununan bir proteoglikandır. Dokuda bulunan tip 2 kollajen sarmalının şişmesi ve hidrate edilmesi sonucu bu baskıya karşı koymadan sorumludur [2].

ADAM ailesinin ardından ADAM' lara çok benzeyen fakat onlardan farklı olarak başka domeinlere de sahip olan ADAMTS' lerde ilk olarak ADAMTS-1 aydınlatılmıştır. Böylelikle ADAMTS1 de bulunan yapısal domainlerin aydınlatılması bütün ADAMTS' ler için model teşkil etmiştir. ADAMTS1 proteini şekil 1.3' de görüldüğü üzere 8 farklı domain içermektedir; 1) pre-domain (sinyal peptit dizisi), 2) pro-domain, 3) katalitik metalloproteinaz domain, 4) disintegrin benzeri bir domain, 5) merkezi TSP-1 motifi bulunduran domain, 6) Sisteince zengin olan bir domain, 7) ara bölge ve 8) C-terminal bölgesinde bulunan TSP motifleri içerir. ADAMTS' ailesinin üyeleri ECM' e salgılanan ve hücre yüzeyine bağlanabilme özelliği olan proteinlerdir [5,21].



Şekil 1.3: ADAMTS1 proteinin domain yapısı.

(Pre-domain, pro-domain, katalitik metalloproteinaz domain, disintegrin benzeri bir domain, sisteince zengin bir domain TSP1 tekrarı, ara domain. [22] 'den esinlenerek çizilmiştir.)

1.3.1 ADAMTS1' in Kanslerle İlişkisi

ADAMTS1' in kanser ile ilişkisi ile yapılan çok sayıda çalışma, prostat, karaciğer ve meme bezi tümörlerinin ilerlemesi sırasında ADAMTS1' in mRNA ve protein düzeylerinde değişiklik olduğunu ortaya çıkarmıştır [16]. Yapılan bu çalışmalar sonucu ADAMTS1' in anjiyogenez ile bağlantısı olduğu ve anti-anjiyogenetik rolü belirlenmiştir. Anjiyogenez tümörün ilerlemesinde önemli bir rol oynar. Çeşitli raporlar ADAMTS1' in birden fazla mekanizmasının anjiyogenezi inhibe ettiğini göstermektedir. Obika ve arkadaşları yapmış oldukları araştırmalarında tümör büyümesi ile anjiyogenezle ilgili in-vivo çalışmalar ve in-vitro' da endotel hücrelerinde ADAMTS1' in etkisini araştırmışlardır. Tam uzunluktaki ADAMTS1 ile delesyona uğratılmış katalik ADAMTS1 konstraktlarının endotelial hücrelere transfeksiyonu gerçekleştirmişlerdir ve her iki sonuçta da endotel oluşumunu inhibe ettiğini göstermişlerdir [23].

2006 yılında yayınladıkları çalışmalarında, Rocks vd., insan küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinde (non-small-cell lung carcinomas, NSCLC) sağlıklı dokulara oranla, ADAMTS1 ekspresyonunun, daha az olduğunu tespit etmişlerdir [24].

ADAMTS1, 4, 5, 9, 15 ve TIMP-3 ekspresyonuna DU145, LNCaP, PC3 prostat hücre hatları kullanılarak bakılan bir çalışmada, bu hücrelerin bu proteinleri sürekli olarak eksprese ettikleri fakat bu prostat stroma hücre hatlarındaki ekspresyonunun ise değişiklik gösterdiğini tespit etmişlerdir [25]. Ayrıca bizim yaptığımız bir çalışmada ADAMTS1 ve substratı olan VEGF' in mRNA düzeyindeki ifadesi DU145 ve PC3 olarak adlandırılan androjen bağımsız prostat kanser modellerinde araştırılmış ve ADAMTS1 ekspresyonunun sadece PC3 hücre hattında tespiti gerçekleştirilmiştir ayrıca her iki hücre hattında VEGF ekspresyonu da gözlemlenmiştir [27]. ADAMTS1 ile 20' ye kadar olan ADAMTS üyelerinin ekspresyonunun araştırıldığı bir çalışmada meme kanseri hücre hattında, insan sağlıklı meme kanseri hücre hattında ve neoplastik olmayan meme dokusunda yapılan araştırmada; meme kanseri durumunda, tümörün derecesinden, heterojenitesinden ve tipinden bağımsız olarak, ADAMTS üyelerinin yedi tanesinde (ADAMTS1, 3, 5, 8, 9, 10 ve 18) devamlı olarak ekspresyonunun azaldığını rapor etmişlerdir. Gustavsson vd.' nin 2008 yılında androjen-bağımlı ve bağımsız prostat

kanserlerinde anjiyogenez ile ilgili yaptıkları bir çalışmada ise ADAMTS1' in anjiyogenez regülasyonunda ekspresyonunun azaldığını tespit etmişlerdir [26, 28].

Karaciğer kanserleriyle birlikte ADAMTS proteinlerinin çalışıldığı çalışmalar literatürde çok azdır. Tek çalışma Masui ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmadır. Bu çalışmada ADAMTS1' in mRNA ekspresyonunu karaciğer kanserinde (HCC) çalışmışlardır ve 16 karaciğer kanseri hastasında ADAMTS1' in ekspresyonunu belirlemişlerdir. Daha sonra ise siroz vakalarından alınan karaciğer dokusundaki ADAMTS1 ekspresyonu ile karşılaştırdıklarında karaciğer kanserinde ADAMTS1' in ekspresyonunun azaldığını rapor etmişlerdir [29]. Ayrıca yine grubumuz tarafından ADAMTS1 mRNA'nın karaciğer hücre hattında (Hep3B) ifade olduğu belirtilmiştir [27].

Mide ve bağırsak kanserlerinde ADAMTS proteinlerinin ekspresyonu ile ilgili yapılan bir çalışmada ADAMTS1' in kolorektal tümörlerde promotör hipermetilasyonu yoluyla inaktive edildiği tespit edilmiştir [30].

Masui vd., ADAMTS1 ve ADAMTS8' in pankreas kanserlerinde mRNA ekspresyonunu araştırdıkları bir çalışmada; sağlıklı doku ve pankreas tümörlerinde, ADAMTS1' in ekspresyonuna bakmışlardır. Sağlıklı dokuyla karşılaştırılan ADAMTS1 ekspresyonunun pankreas kanserlerinde azaldığını ve ADAMTS1 ekspresyonuna daha yüksek düzeylerde sahip olan hastalarda, hayatta kalma süresinin retroperitoneal invazyon ve lenf nodu metastazına daha sık rastlandığını rapor etmişlerdir [29].

ADAMTS1 metastatik karsinomada up-regüle olan bir proteazdır. Kanser hücrelerinde aşırı ekspresyon olmaktadır. Ricciardelli vd., nakavt farelerde MMTV-PyMT fare meme tümörü modelinde meme kanserinin ilerlemesini ve spontan metastazı araştırmışlar. Adamts1^{-/-}/PyMT farenin yabani tip ve heterozigot yavrular ile karşılaştırıldığında meme tümörü ve akciğer metastaz tümör yükü içeren farelerin hayatta kalma süreleri azalmıştır. ADAMTS1 eksik olan farelerde daha düşük tümör yükü olduğunu gözlemlemişlerdir [31].

Chen vd., mide kanseri ve lenf nodu üzerinde ADAMTS1' in ifadesini araştırdıklarında; ADAMTS1' in mRNA ve protein düzeyindeki seviyesi normal dokulara oranla birincil tümörlerde daha düşük bulmuşlardır. ADAMTS1' in protein

ve mRNA ifadesinin primer tümörlerdeki lenf düğümü metastazı ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Primer mide tümörleri ve normal dokularda ADAMTS1 ve VEGF' in mRNA ve protein ifadesi arasında negatif korelasyonun olduğunu bulmuşlardır. Negatif korelasyonda primer mide tümörlerindeki MVD (mikrodamar yoğunluğu) ve ADAMTS1 protein ekspresyonu arasında bir ilişki saptamamışlardır. Bunun aksine ADAMTS1 ve TSP1' in mRNA ve protein ekspresyonunda primer mide tümörü, normal dokular ve metastatik lenf düğümleri arasında anlamlı bir ilişki tespit etmişlerdir. Bu bulgularda da ADAMTS1' in ifadesinin, primer mide kanserinde ve lenf nodu metastazında eş olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte mide kanserinde ve lenf nodüllerinde anti-anjiyojenik aktivitesini kaybettiğini savunmuşlardır [32].

Chen vd., Ağustos 2015 de yaptıkları bir çalışmada ise primer mide tümöründe ve mide kanseri hücre hattında ADAMTS1 ekspresyonundaki azalmanın metilasyona bağlı olup olmadığını araştırmışlardır. Buna ek olarak ADAMTS1 metilasyonu ve klinikopatolojik özellikler arasındaki ilişki primer mide kanserli hastalarda araştırılmıştır. Sonuç olarak primer gastrik tümör dokularında ADAMTS1 metilasyon sıklığı, normal mide dokuları ile karşılaştırıldığında, anlamlı olarak daha yüksek olduğunu ortaya koymuşlardır. Bu nedenle, ADAMTS1' in anormal derecede metilasyonunun olması mide kanseri gelişiminde ve ilerlemesinde önemli etkisi olmuştur [33].

Yine yapılan bir çalışmada ADAMTS1' in, normal doku ile karşılaştırıldığında insan göğüs karsinomalarında down-regüle olduğu gözlemlenmiştir [12].

1.3.2 ADAMTS1' in Transkripsiyonel Regülasyonu

2006 yılında Lind vd. tarafından yapılan bir araştırmada fare ADAMTS1 aktivitesini DNA metilasyonunun azalttığı gösterilmiştir ve bu da farelerde ADAMTS1' in aktivitesinin promotor düzeyinde yapıldığını göstermektedir yani kanser spesifik hipermetilasyona uğradığı düşünülmektedir [30]. Yine yapılan bir çalışmada fareye ait bir ADAMTS1 geninin promotoruna TSA uygulanmıştır (TSA bir HDAC inhibitörüdür). Bu çalışma sonucunda ise fare ADAMTS1 promotoruna

SP1 ve HDAC6 bağlanmasının azaldığını tespit etmişlerdir. Sonuç olarak bu çalışmada SP1' in fare ADAMTS1 ekspresyonunu azalttığı gösterilmiş ve proksimal bölgede bulunan GC kutularının inaktivasyon için gerekli olduğu rapor edilmiştir. [34,35].

Hatipoğlu vd. tarafından 2009 yılında yapılan bir araştırmada hipoksik ortamda endotel hücrelerde insan ADAMTS1' in regülasyon mekanizması çalışılmıştır. Hipoksik ortamda, ADAMTS1' in mRNA ve protein ekspresyonunun hızlı bir şekilde artış gösterdiği ancak çalışma yapılan diğer hücre hatlarında böyle bir durum gözlenmemiştir. Ayrıca ADAMTS1' in hipoksik durumda uyarılmasının geçici bir durum teşkil ettiği, HUVEC (İnsan Umbilical Ven Endotel Hücre) hücre hatlarında ise ADAMTS1 substratı olan VEGF' nin hipoksiya ile uyarılmasının zamana bağlı olarak arttığı tespit edilmiştir. Endotel hücrelerde ADAMTS1 hipoksiya durumunda geçici olarak indüklendiği ve HIF-1' in bağlanması aracılığıyla transkripsiyonu yapıldığı gösterilmiştir. Sonuç olarak ADAMTS1 in hipoksik dönemde erken regüle olan bir gen olduğu tespit edilmiştir [36].

Grubumuzca yürütülen TBAG 110T574 nolu proje ile desteklenen ve Yrd. Doç. Dr. Sümeyye A. Türkoğlu'nun doktora tezi [10] kapsamında ADAMTS1' in Hep3B hücre hattında ekspresyon edildiği, hipoksik koşullar oluşturularak HIF1 α ' nın bu koşullarda arttığı ve Hep3B hücre hattında normal ve hipoksik koşullarda ADAMTS1 ekspresyonunun özellikle 24 saatte arttığı tespit edilmiştir. 2016 yılında GENE dergisinde basılan bu çalışmada SP1 transkripsiyon faktörünün ADAMTS1 geninin regülasyonunda önemli bir transkripsiyon faktörü olduğu, azaltıcı bir etkiye sebep olduğu bulunmuştur. Bir diğer transkripsiyon faktörü olan USF Transkripsiyon Faktörünün ADAMTS1 geninin hem mRNA hem protein hemde transkripsiyonel aktivitede azalışa sebep olduğu da bulunmuştur ancak hipoksik koşullarda istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilememiştir. C/EBP α Transkripsiyon Faktörünün ise ADAMTS1 geni üzerinde herhangi bir etkisi tespit edilememiştir [37].

1.4 Transforme Edici Büyüme Faktörü (TGF- β) Ailesi

Evrimin gelişimi ve çok hücreli yaşam formlarının ortaya çıkmasıyla hareket, bölünme, farklılaşma ve organizasyon için hücrelerin yetenekleri üzerinde tek tek sıkı kontrole ihtiyaçları ortaya çıkmıştır. Karmaşık hücreler arası iletişim sistemleri, tüm organizmanın bu sistem içinde bireysel olarak uygun davranmalarını sağlamak için gelişmiştir. Transforme edici büyüme faktörü (Transforming Growth Factor- β , TGF- β) ailesi, gelişimi çok yönlü olarak kontrol eden ekstrasellüler büyüme faktörlerinin büyük bir grubunu oluşturur. TGF- β üyeleri hücre motilitesi, proliferasyonu, adezyonu, farklılaşması ve ölümü gibi hücresel süreçleri düzenlemede görev aldıkları gibi, organizmanın homeostazisinde, dokuların gelişiminde ve onarımında da önemli roller üstlenirler. Bu faktörlerin tümü, hücre içi sinyallerin düzenlenmesinde önemli bir yer tutar [38].

İnsan genomunda 42 üyesi vardır, *Drosophila* da 7 ve *Caenorhabditis elegans* da 4 tanedir. Transforme edici büyüme faktörü- β (TGF- β) ailesi bu molekül sınıfında en önemli temsilcilerden biridir. TGF- β 'nın 5 izoformu bulunmaktadır. Bunlar: TGF-b1, TGF-b2, TGF-b3, TGF-b4 ve TGF-b5' dir. TGF-b1, TGF-b2 ve TGF-b3 özellikle memelilerde bulunmaktadır. TGF-b4 ve TGF-b5 ise bir süper ailede bulunurki bu aile; kemik morfogenetik proteinler (BMPs), aktivin, miyostatinler ve inhibin de içinde bulunduğu bir ailedir. TGF- β ailesinin birçok üyesi bulunmaktadır. Bu ailenin üyeleri kemik morfogenetik proteinleri, nodals, activins, anti-Muellerian hormon (AMH), myostatins ve diğerlerinin içinde bulunduğu birbirine benzer polipeptit içeren geniş bir ailedir. TGF- β , hücre proliferasyonu, hücre bölünmesi, farklılaşmasını ve migrasyonu düzenleyen, organizasyon, göç, yapışma ve ölüm üzerinde de etkileri bulunan bir sitokindir. TGF- β hücre çoğalmasını inhibe etmek gibi hepatositlerin aşırı büyümesini kontrol etmek için apoptosisi teşvik ettiği de gösterilmiştir [39,40]. TGF- β sitokini büyümeyi inhibe eder. TGF- β , bağışıklık sisteminin önemli moleküllerindendir ve hücre diferansiyasyonunda da rol alır. Hücre çoğalması ve farklılaşması esnasında mutajenlerle gerçekleşen değişiklikler, sinyal yollarında görevli olan TGF- β ' nın mRNA seviyeleri gen ekspresyon seviyesindeki değişiklikleri etkiler. TGF- β , hem tumor suppressor hemde tümör promoteri olarak görev yapar. TGF- β , tumor progresyonuna neden olurken aynı zamanda tümörün büyümesini inhibe eder.

Karsinogenezisin premalign fazında büyümekte olan hücreleri, apoptozis induksiyonu ve diferansiyasyonu inhibe ederken diğer taraftan ise TGF- β 'nın modüle ettiği invazyon, anjiogenezis gibi proseslerde bu inhibisyonun kaybıyla kanser gelişimi görülür [39,41].

Hepatosellüler karsinom (HCC) daki artış, geç tanı ve tedavi seçenekleri kısıtlı olduğu için önemli bir halk sağlığı sorunudur. TGF- β karaciğer hasarı ve yenilenmenin erken evrelerinde sitostatik sinyalleri sağlamak için bilinen, ancak tümör başlaması ve karaciğer kanseri ilerlemesinde etkileri arttıran bir etki gösterir [42]. TGF- β sinyal yolunun biyokimyasal omurgasının ve hücrelerin bu sinyallere cevaplarının nasıl çevrildiği sağlam bir şekilde aydınlatılmıştır. Bu yolun özünde SMAD transkripsiyon faktörleri yer alır [39].

Transforme edici büyüme faktörü (TGF- β) ailesi, büyüme ve gelişimi kontrol eden ekstrasellüler büyüme faktörlerinin büyük bir grubunu oluşturmaktadır. TGF- β üyeleri hücre proliferasyonu, adezyonu, farklılaşması, motilitesi ve ölümü gibi hücrel süreçleri düzenlemede rol oynar. Bu faktörlerin tümü, hücre içi sinyallerin düzenlenmesinde önemli bir yer tutar [38].

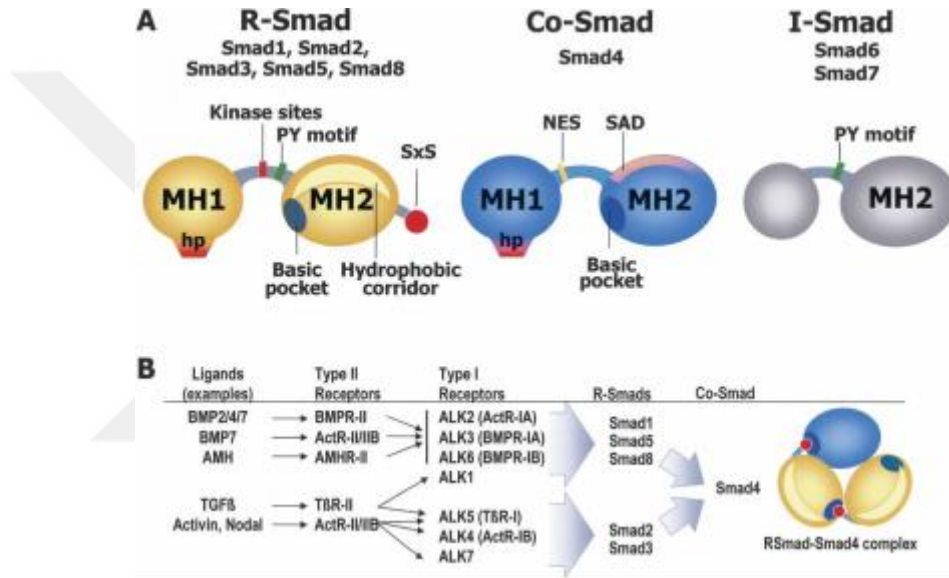
TGF- β ailesinin üyeleri, TGF- β reseptörlerine sinyallerini iletirler. Bu reseptörler serin/treonin kinaz aktivitesine sahiptir. TGF- β reseptörleri, yapısal ve fonksiyonel olarak 2'ye ayrılır. Bunlar tip I ve tip II'dir. Tip II reseptörün, tip I reseptörünü uyararak aktivasyonu sonucu TGF- β sinyali başlar. Aktive olan tip I reseptörü, SARA gibi bazı moleküller aracılığıyla gerçekleştirilen SMAD proteinlerini fosforlar. Aktive olan SMAD proteinleri ise hücre çekirdeğine sinyal taşırlar. Tip I reseptör kinazların tanımlanmış ilk substratları, SMAD ailesine mensup proteinlerdir. Bu proteinler, reseptör sinyallerinin hücre çekirdeğine ve çekirdek içindeki hedef genlere iletiminde görevlidirler. [43].

1.5 SMAD Proteinlerinin Temel Özellikleri

SMAD proteinleri, *Drosophila*'da bulunan MAD (mothers against decapentaplegic) ve *Caenorhabditis elegans*'ta bulunan SMA proteinleriyle homologtur. Bu ismi iki proteinin isimlerinin kombinasyonundan almaktadır [44]. İnsan ve fare genomunda sekiz adet, *Drosophila*'da dört ve *C.elegans*'ta üç adet

SMAD proteini tanımlanmıştır. SMAD proteinleri 500 aminoasit uzunluğunda, linker bölgesi ile bağlanan 2 küresel domainden oluşmaktadır [39,45] (Şekil 1.4). Memelilere ait SMAD proteinleri üç sınıfa ayrılır;

1. Reseptör aracılığıyla düzenlenen SMAD'lar (R-SMAD'lar): SMAD1, SMAD2, SMAD3, SMAD5 VE SMAD8/9,
2. Ortak mediatör SMAD (Co-SMAD): SMAD4,
3. Antagonistik ya da inhibitör SMAD'lar (I-SMAD'lar): SMAD6 ve SMAD7 [46].



Şekil 1.4: SMAD proteinleri ve yapısal elemanları [39].

N- terminal domaini veya ‘‘Mad-Homology 1’’ (MH1) domaini bütün R-SMAD'lar ve SMAD4 de bulunmakta fakat SMAD6 ve SMAD7 de bulunmamaktadır. C-terminal veya MH2 domaini tüm SMAD proteinlerinde yer almakta ancak linker bölgesi çeşitli alt gruplar arasında oldukça farklılıklar göstermektedir. X-Ray kristal yapısı analizi ile diğer fonksiyonel çalışmalarla birlikte MH1 ve MH2 domainlerinin proteinleri ve DNA ile SMAD proteinlerinin ana etkileşimi için kritik bilgi sağladığı gösterilmiştir. MH1 domaini sıkı bir şekilde bağlı olan çinko atomu tarafından stabilize edilmiş bir DNA-binding modülüdür. DNA ile teması öncelikle esas olarak bütün R-SMAD'lar ve SMAD4' de hairpin yapısı tarafından sağlanmaktadır. İlginç olarak SMAD 2' nin en fazla splice formu DNA

bağlanma blokları olan insert (exon 3 tarafından kodlanan) içerir. MH1 domaini linker bölge tarafından izlenir. MH1 domainin linker bölgesi, protein kinazlar ve SMAD4' deki bir nükleer sinyal taşınması (NES) nın birkaç sınıfı için, fosforilasyon alanları içerir. Smurf (SMAD ubiquitinyasyon ilgili faktör) ubiquitin ligazlar için bağlanma alanları ile esnek segmentler tarafından bu kısım takip edilir [39].

SMAD MH2 domaini son derece korunmuştur ve sinyal iletimi çok yönlü bir protein ile etkileşen modüldür. R-SMAD' lar C-ucunda korunmuş Ser-X-Ser motifine sahiptir, bu aktiveleştirilmiş reseptör tarafından fosforile edilir. Bazik rezidü etkileşimleriyle kaplı bir cep, SMAD4 olması durumunda R-SMAD' ların fosforile kuyruğuyla ve RSMAD' ların olması durumunda da aktif reseptörün fosforlu bölgesi ile etkileşime girer. Bir dizi bitişik hidrofobik yamalar olan Nükleoporinlerin parçaları ve DNA-binding co-faktörler ile sitoplazmik tutma proteinleriyle etkileşimlere aracılık eder ve MH2 domaininin yüzeyinde 'hidrofobik koridor' olarak anılır. Üst üste çakışan linker ve MH2 bölgeleri (SMAD4 aktivasyon domaini SAD) transkripsiyonel aktivatörler ve baskılayıcılarla etkileşimlere aracılık eder [39].

1.5.1 SMAD Proteinlerinin Sınıflandırılması

İnsan ve fare genomunda sekiz adet, *Drosophila*' da dört ve *C.elegans*' ta üç adet SMAD proteini tanımlanmıştır [38]. Memelilerde sadece 5 tanesi TGF- β ailesinin substratıdır. SMAD1, SMAD2, SMAD3, SMAD5 ve SMAD8 TGF- β reseptör ailesinin substratları; yaygın olarak reseptör-regülatör olarak düzenlenmiş SMAD' lar veya RSMAD' lar olarak adlandırılır. Memelilere ait SMAD proteinleri üç sınıfa ayrılır; Reseptör aracılığıyla düzenlenen SMAD' lar (R-SMAD' lar), Ortak mediatör SMAD (Co-SMAD) ve Antagonistik ya da inhibitör SMAD' lar (I-SMAD' lar) dır (Tablo 1.1) [39,46].

Tablo 1.1: Memelilere ait SMAD proteinlerinin sınıflandırılması [39,46].

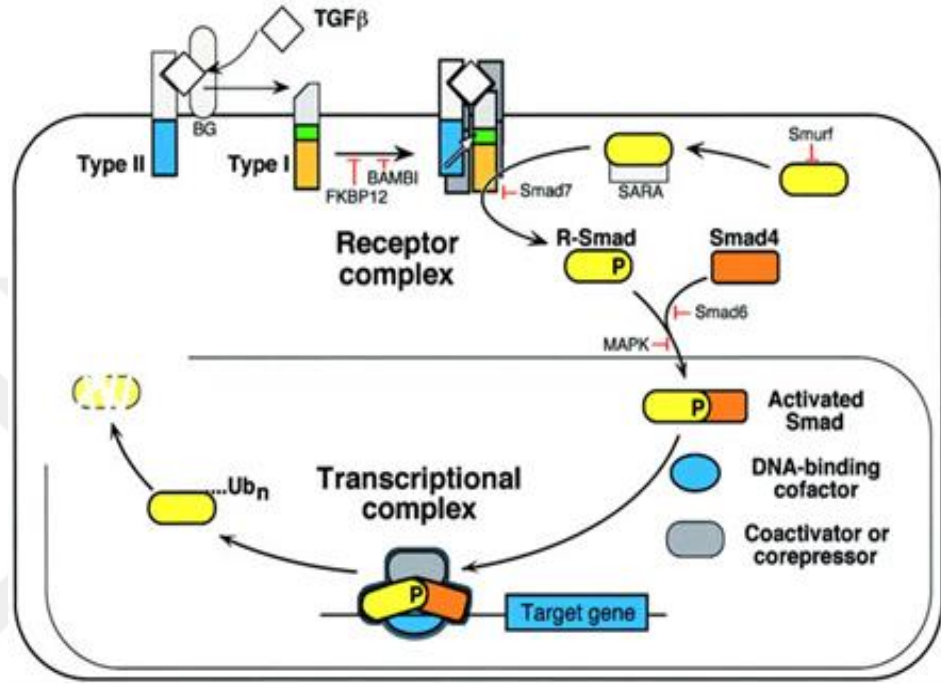
SINIFI	ÇEŞİTİ	İŞLEVİ
1. Reseptör aracılığıyla düzenlenen SMAD'lar (R-SMAD'lar)	SMAD1, SMAD2, SMAD3, SMAD5 ve SMAD8	TGF- β reseptör ailesinin substratlarıdır. SMAD2 ve 3, TGF- β , activin ve nodal reseptörleri için substrat görevi görür. SMAD1, 5 ve SMAD8, BMP ve anti-Muellerian reseptörleri için substrat hizmeti görür.
2. Ortak mediatör SMAD (Co-SMAD)	SMAD4	R-SMAD'lar ile etkileşime girerek nükleusa transportu sağlar.
3. Antagonistik ya da inhibitör SMAD'lar (I-SMAD'lar)	SMAD6 ve SMAD7	R-SMAD'ların ve Co-SMAD'ların aktivasyonunu bloke eder (SMAD inhibitörü).

1.5.2 SMAD Proteinleri ve TGF- β Sinyal İletim Yolu

SMAD' proteinleri, hücre çekirdeğine sinyal ileten ve DNA' ya bağlanma yeteneği ile transkripsiyonel kompleks oluşturan bir ailedir. SMAD bağımlı TGF- β sinyal iletim yolunda, TGF- β ' nın tip II reseptöre bağlanması ile aktif hale gelen reseptör, tip I reseptörün GS domaininde bulunan özgün serin ve treonin rezidülerinden fosforilasyonunu sağlar. Bu GS domaini FKBP12' yi sürekli inaktif bazal durumda tutmaya çalışır. Daha sonra ise tip I reseptörünün bu bölgesi fosforillenmiş olup bir Ser-X-Ser kuyruğu eklenir. Bu fosforillenmiş kuyruğa Smad 4' ün de aktif hale gelmiş kuyruğuyla etkileşime girer. Co-SMAD olan SMAD4 ile R-SMAD' larındaki MH2 bölgesinde bulunan fosforilli kuyruk birleşerek SMAD kompleksi oluşur ve bu kompleks hücre çekirdeğine sinyali iletir.

TGF- β ve ilgili faktörler, tip I ve tip II reseptörlerine bağlanarak ve bunların bir reseptör kompleksi oluşturması sonucuyla sinyalin aktivasyonu sağlanır. Bilinen iki

farklı ligand bağlanma çeşidi vardır. TGF- β ve aktivin reseptörleri için karakteristik olan birinci bağlanma ligandın tip II reseptöre direkt bağlanması ile gerçekleşir, daha sonra tip I reseptör ile bu kompleks (ligand-tip II reseptör) arasında etkileşim olur. Tip I reseptörler ligandı tanır ve tip II reseptöre bağlanır [47].



Şekil 1.5: TGF- β sinyal iletim yolu ve SMAD proteinleri ile ilişkisi [38].

İkinci bağlanma çeşidi ise BMP (Bone Morphogenic Factor) reseptörleri ve bu gruba dahil olanlar için tipiktir, tip I ve tip II BMP reseptörleri liganda beraber bağlanırlar [48]. Öncelikle aktif, ligand-tip I/tip II reseptör kompleksi oluşur, tip II reseptör fosforilasyon ile tip I reseptörü aktive eder, aktif hale gelen tip I reseptör sitoplazmadan hücre çekirdeğine sinyal ileten SMAD2 ve SMAD3 proteinlerini fosforlar [28,43,45]. Fosforillenmiş olan R-SMAD' lar da SMAD4 (Co-SMAD) ile birleşerek hücre çekirdeğine taşınırlar [49,50,51] (Şekil 1.5). Sonuçta bu kompleks yapılar çekirdek içinde yalnız veya DNA-bağlanma altbirimi ile birleşik halde bulunabilir ve spesifik promotör elemanlarına bağlanarak hedef genleri aktive ederler [52].

1.6 Non-SMAD (SMAD-Bağımsız) Yolağı

SMAD' lar sitoplazma ve çekirdek arasında mekik görevi görürler. Aktive edildikleri zaman, TGF- β reseptörlerindeki yapısal değişiklikler ile SMAD' ların doğrudan bağlanmasına izin verilir ve tip I reseptörlerinin sitoplazmik domainleri kinaz aktiviteleri tarafından fosforillenir. Bu sonuçlar, çekirdekteki SMAD' ların birikimi sonucu hedef gen transkripsiyonunu düzenler [53]. TGF- β sinyalleri transmembran tip I ve tip II, serin / treonin kinaz reseptör (sırasıyla T β RI ve T β RII) tarafından iletilir. Ayrıca TGF- β SMAD-bağımsız yolakta da kullanılır. TGF- β ile indüklenen sinyaller, sinyal bileşenlerinin post-translasyonel modifikasyonları ile düzenlenir [54].

SMAD bağımsız yollarında, TGF- β reseptörleri aracılığıyla fosforilasyon ya da doğrudan etkileşimlerinin altında yatan biyokimyasal mekanizmalar aydınlatılmıştır. İn vitro hücre modellerinde TGF- β sinyalizasyonunda gerçekleştirilen deneylerde; mitojen-aktive protein kinazlar (MAPK' lar) ERK, Rho-benzeri GTPaz sinyalizasyon yolları, Ras, p38, c-Jun N-terminal kinazlar (JNKs) ve fosfatidilinositol-3-kinaz (PI3K) /AKT yolları non-SMAD bağlanmalarına dahil edilmiştir [53,55].

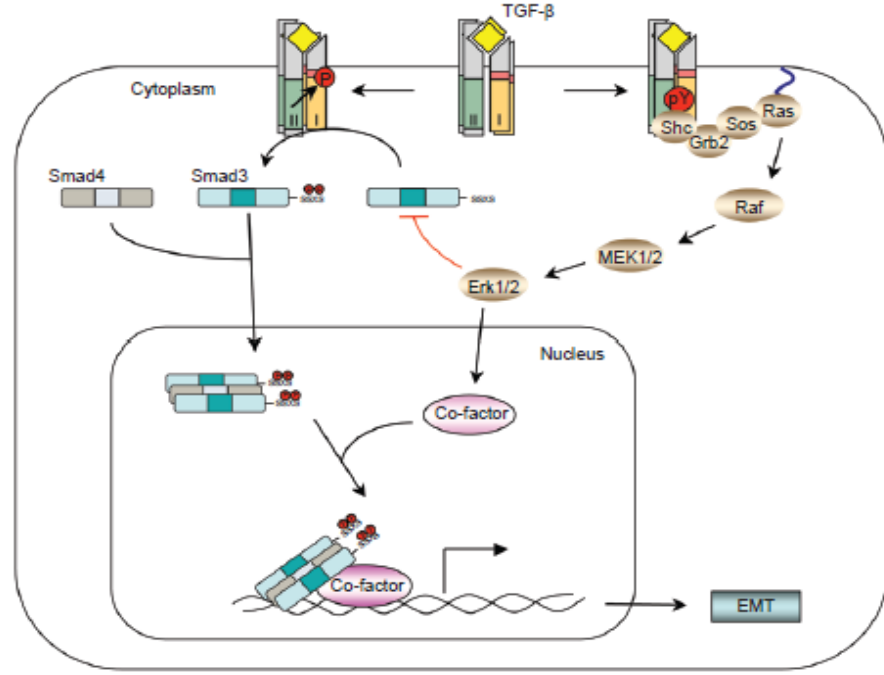
1.6.1 TGF- β Kaynaklı ERK Aktivasyonu ve Tirozin Fosforilasyonu

TGF- β aktivasyonu ile Erk MAPK yolağını gösteren ilk gözlemler, sıçan bağırsağında veya mink akciğer epitelyal hücrelerinde yapılan çalışmalardır. Epitelyal hücrelerinde, TGF- β ' ya yanıt olarak Ras' ın hızlı GTP yüklemesi Raf' ın alımına neden olabilir. Böylece, bir MAP kinaz kinaz kinaz (MAP3K), plazma membranı ve MEK1 aracılığıyla Erk aktivasyonuna yol açar. Daha sonra epitel hücrelerinde, göğüs kanseri hücreleri ve fibroblastlar da TGF- β ile Erk hızlı aktive olur. TGF- β ile indüklenen ERK fosforilasyon kinetiği hücre tipleri ve kültür şartlarına göre değişmektedir. Reseptör tirozin kinaz (RTK) / RAS / ERK, sinyal yolağı içinde, kendi RTK büyüme faktörlerinin bağlanma dimerizasyonu ve RTK aktivasyonunu uyarmaktadır. Bu oto ve RTK sitoplazmik alanına birden fazla tirozin tortularının trans-fosforilasyonu ile sonuçlanır. Fosforilasyon sonrası tirozin kalıntıları, ya Src homology 2 (SH2) ya da fosfotirozin bağlanma (PTB) domainleri

(Src ve büyüme faktörü reseptör bağlayıcı protein 2 (Grb2) halinde) ile çok sayıda sinyal molekülleri için yerleştirme yeri olarak görev yaparlar. Grb2' nin SH2 olarak adlandırılan ve tirozince zengin bir domaini bulunan adaptör bir proteindir. Sos bölgesinde de aynı şekilde tirozince zengin bir domain yapısı bulunur. Tirozin fosforilasyonu ile bu bölgeler etkileşime geçerek bir Grb2 / Sos kompleksi oluştururlar. Bu, GDP ve GTP' nin değişimini katalizleyerek Ras' ın aktivasyonu sağlar. Ras bir G proteindir. G roteinleri GDP ya da GTP ye bağlanarak faaliyet gösterirler ve GDP' ye bağlandıklarında inaktif forma, GTP' ye bağlandıklarında ise aktif hale gelirler. GTP bağlı iken Ras, bir kinaz olan Raf' ı tirozin fosforilasyonu ile aktifleştirir. Raf da sırasıyla Mek ve Erk' i uyararak MAPK kaskadını aktive eder [53].

Tip I ve tip II TGF- β reseptörleri serin-treonin kinazlar da iyi tanımlanmış olmasına rağmen, T β RII üç tirozin bölgesi üzerinde oto-fosforilasyona maruz kalır. Bunlar; Y259, Y336, ve Y424 dür. Serin ve threonin üzerindeki otofosforilasyon çok daha düşük bir düzeydedir. T β RII, Y284 üzerinde RTK içermeyen Src tarafından fosforile edilir. Grb2 ve Shc kenetlenme alanı olarak görev yapar. Böylece MAPK sinyal kaskadı için T β RII köprü görevi görür. Ayrıca T β RI de, tirozin rezidüleri ile TGF- β stimülasyonu sonrası fosforile edilebilir. T β RI, T β RII' ye ligand bağlanması ve biçimlenmesi ile aktive olur [53].

Epitelyal mezanşimal geçiş için (EMT), Erk aktivasyonu önemlidir TGF- β ' nin ana biyolojik fonksiyonlarından biridir. EMT embriyo gelişimi için gerekli olan normal fizyolojik bir süreçtir ve tümör metastazı ve fibroz ile bağlantılı patolojik süreçlerde etkilidir [53].



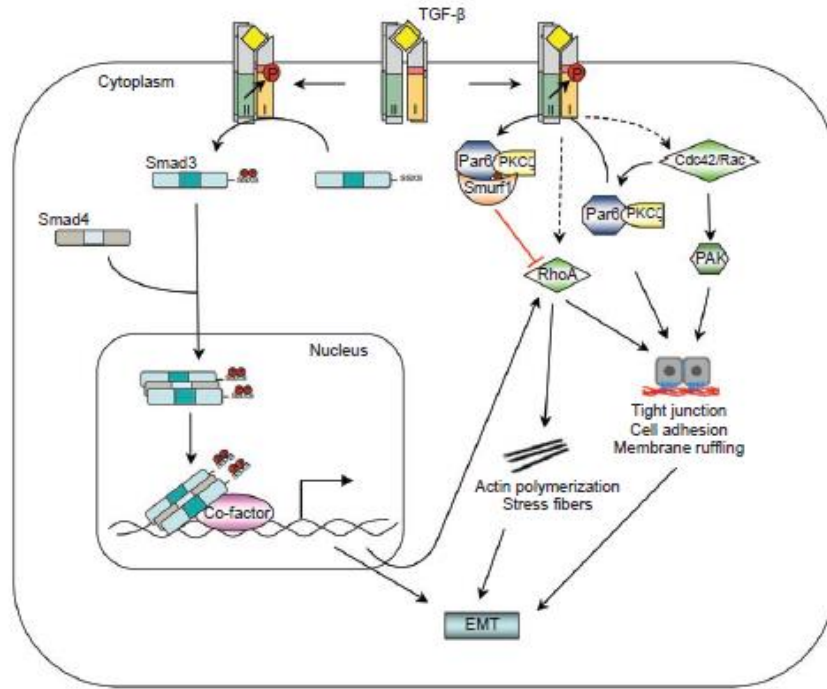
Şekil 1.6: SMAD bağımsız Erk yolu [53].

1.6.2 TGF-β-Aracılı EMT, Rho Benzeri GTPazlar

Rho benzeri GTPazlar, RhoA, Rac ve Cdc42 içerir. Dinamik hücre iskeleti organizasyonunda, hücre motilitesi ve gen ekspresyonu etkenlerinin bir çeşidinin kontrol edilmesinde önemli rol oynamaktadırlar. MAPK yolağı gibi, RhoA da, TGF-β-kaynaklı EMT de önemli bir rol oynar. TGF-β, hızla epitel hücreleri ve birincil keratinositlerde stres lif oluşumu ve mezenkimal özellikleri için RhoA bağımlı sinyal yollarını aktive eder [53].

Ancak, RhoA protein seviyesinin down regülasyonunda TGF-β' nın, tight junctions kısımlarında bildirilmiştir. Par6, epitel hücre kutuplarını düzenleyen bir iskele proteindir ve tight junctionlarda da TβRI ile etkileşime girer. TGF-β stimülasyonu, TβRI-TβRII komplekslerinde tight junction donanımını ve birikimini indükler. TβRII serin rezidüsü 345, Par 6' yı fosforiller. Sonra fosforilasyon, polarize olmuş epitel hücre yaprakları içinde tight junctions larda Par6 toplayan Smurf 1 reseptör kompleksi aktive olur. Par 6/Smurf1 kompleksine lokalize ubiquitinasyon ve hücresel çıkıntılardaki RhoA aracılık yapar. RhoA Smurf1-aracılı degradasyonu lokalize bir olaydır ve lamellipodia ve filopodia benzeri çıkıntılarda

Smurf1 varlığıyla gerçekleşir. PKC, Cdc42/Rac1-Par6 polarite kompleksinin bir efektörüdür. Smurf1 lokalizasyonunu düzenleyen Smurf1 ve hücresel çıkıntılardaki Rho A degradasyonu (aktif çıkıntı alanlarında lokalizasyonu sınırlı olan RhoA'nın doğrudan Smurf1'e) doğrudan bağlanabilir. Smurf1 tarafından RhoA ubikuitinasyonunun alanları, iki tanedir ve bunlar lizin 6 ve 7'dir. Bu iki lizin mutasyonu TGF-β'ya yanıt olarak tight junctions ve EMT çözülmesini inhibe eder. Böylece, RhoA degradasyonunun düzenlenmesi yoluyla TGF-β tight junctions ve aktin hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesini teşvik eder. TGF-β düzenlenmesinde RhoA aktivitesinde iki farklı mod vardır: stimülasyonun erken safhasında RhoA'nın hızlı aktivasyonunu indükler ve sonraki aşamalarda RhoA protein seviyesini düzenler. RhoA bunun yanı sıra, TGF-β da Cdc42 GTPaz aktivasyonuna neden olabilir [53].



Şekil 1.7: SMAD bağımsız GTPaz yolu [53].

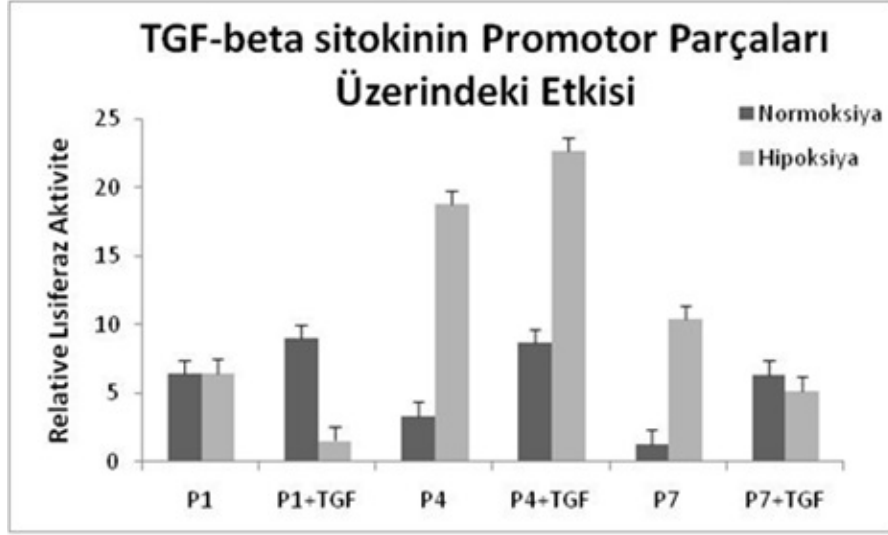
1.7 Çalışmanın Amacı

Bu çalışmada anti-anjiogenetik etkili bir matriks metalloproteaz olan ADAMTS1'in, transkripsiyonel düzeyde SMAD transkripsiyon faktörleri ile regülasyonu çalışılmıştır. İnsan ADAMTS1 geninin transkripsiyonel regülasyonu

konusunda oldukça sınırlı bilgi bulunmaktadır. Özellikle ADAMTS1 promotorunun, SMAD genleri ile ilişkisi ve regülasyonu konusunda herhangi bir literatür yoktur. Grubumuzca, tamamlanmış 2 adet İnsan ADAMTS1 konulu TÜBİTAK projesi bulunmaktadır.

110T574 nolu hızlı destek projesi kapsamında ADAMTS1 geninin SP1, USF ve C/EBP transkripsiyon faktörleri ile regülasyonu çalışılmıştır. İnsan ADAMTS1 geninin regülasyonuna yönelik ilk çalışma Hatipoğlu ve arkadaşları tarafından 2009 yılında yayınlanmıştır. Bu çalışmaya göre, endotel hücrelerinde hipoksik şartlarda, ADAMTS1' in mRNA ve protein ekspresyon seviyesi hızlı bir şekilde artmaktadır. Araştırmacılar ADAMTS1' in HIF1 α ' nın yeni bir hedef geni olduğunu ileri sürmektedir. Bu çalışma hipoksik koşullar altında genin regülasyonunu ve HIF1 α ' yı incelemektedir. Ancak bu çalışmada da insan ADAMTS1 geninin normal oksijen koşullarında (normoksiya) nasıl regüle edildiği ve hepatoma hücrelerinde dokuya spesifik regülasyonu ile ilgili bilgilere rastlanmamıştır. Bu amaç doğrultusunda TBAG 110T574 nolu proje ile araştırmalarını Yrd.Doç.Dr. Sümeyye AYDOĞAN TÜRKOĞLU' nun yaptığı ve Prof. Dr. Feray KÖÇKAR' ın yürütücülüğünü yaptığı proje kapsamında İnsan ADAMTS1 promotorunun normal oksijen varlığında insan hepatoma hücre modeli kullanılarak transkripsiyonel regülasyonu araştırılmıştır [48].

110T961 numaralı 1001 projemizde ise ADAMTS1 geninin TGF- β ve VEGF sitokinleri ile regülasyonu çalışılmıştır. Bu 1001 projesinden elde ettiğimiz verilere göre insan ADAMTS1 geni TGF- β sitokini tarafından upregüle edilmektedir (Şekil 1.8) (tarafımızca literatüre ilk kez sunulacak bir veridir). Ancak bu regülasyonun TGF- β sitokininin etki yollarından biri olan SMAD transkripsiyon faktörleri ile olup olmadığı bilinmemektedir. Tamamlanmış olan bu projede ADAMTS1' in sitokinlerce regülasyonunu aydınlatmaya yönelik olmuştur. Projede mRNA, protein düzeyinde ADAMTS1 ekspresyonunun tespiti yapılmıştır. Projede bu cevabın hangi transkripsiyon faktörü ile gerçekleştiği gibi bir detaylandırmaya gidilmemiştir. Bu tez kapsamında, elde edilmiş olan sitokin cevabının SMAD transkripsiyon faktörlerince olup olmadığını araştırmaya yönelik olarak yapılmıştır. Çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz verilere göre ADAMTS1' in TGF- β sitokinine olan cevabı incelendiğinde, bu cevabın SMAD bağımlı yoldan gerçekleştiği düşünülmektedir.



Şekil 1.8: TGF- β sitokinin normal ve hipoksik koşullarda promotor parçalarına etkisi.
(110T961 nolu Tübitak proje raporundan alınmıştır.)

TGF- β sitokinin promotor parçaları üzerindeki etkisi araştırılmış ve sonuçta normal oksijen koşullarında her üç promotor parçasında da transkripsiyonel aktiviteyi arttırdığı tespit edilmiştir. Hipoksik koşullar incelendiğinde TGF- β sitokinin promotor parçaları üzerindeki etkisinin farklı olduğu tespit edilmiştir. Hipoksik koşullarda elde edilen verilere bakıldığında farklı bir regülasyon olduğu düşünülmektedir.

Bu çalışmanın amacı:

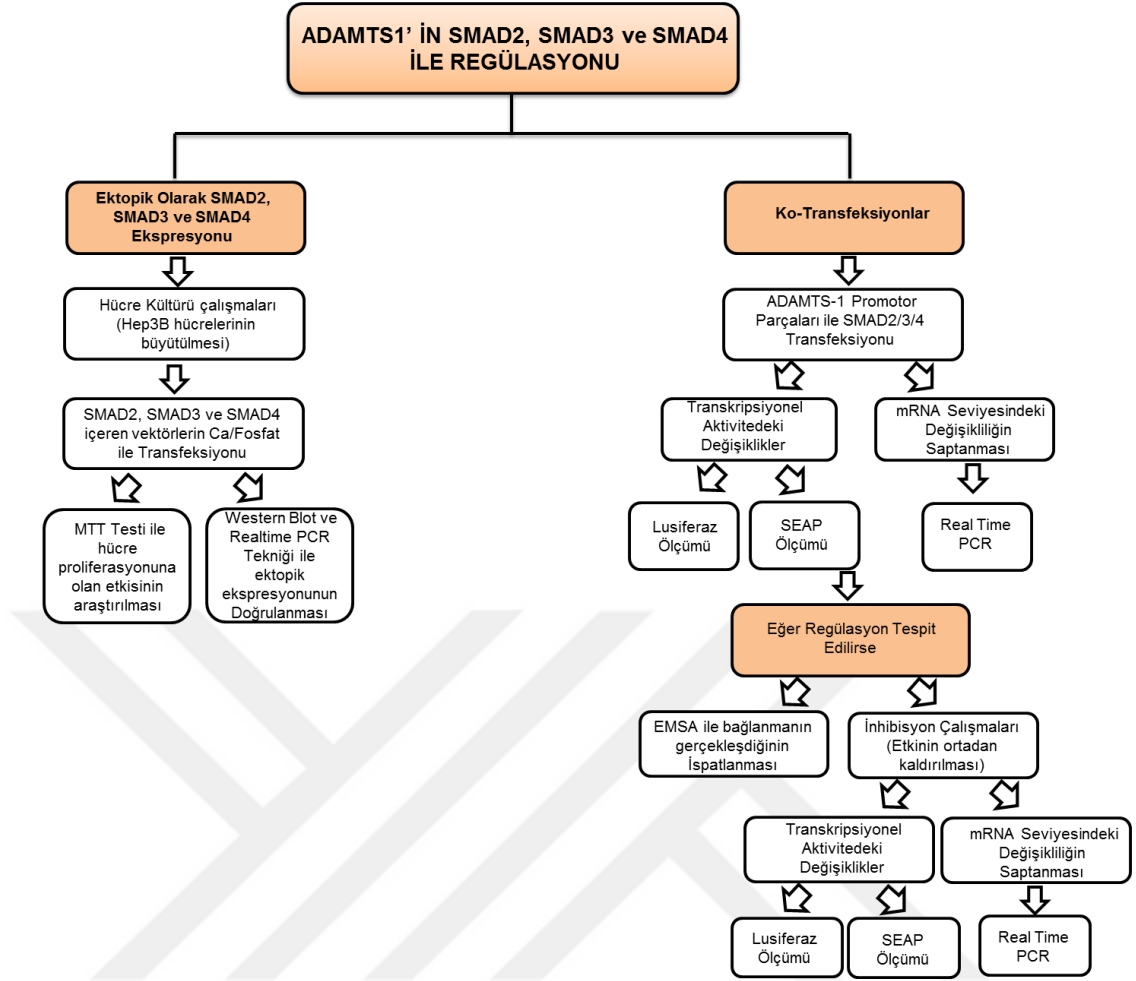
- (i) SMAD2, SMAD3 ve SMAD4 genlerini içeren ökaryotik ekspresyon vektörlerinin Hep3B hücrelerine transfeksiyonunun yapılması ve ektopik ekspresyonun, western blot ve real time teknikleri ile doğrulanması **(Ko-transfeksiyonlarda SMAD genlerini içeren vektörlerin kullanımı öncesi test edilmesi amacıyla)**
- (ii) ADAMTS1 promotor bölgesinin 5' ucu sabit tutularak 3' ucundan kısaltılarak hazırlanan ADAMTS1 promotor parçalarının Hep3B hücrelerine transfeksiyonu. **(Bazal transkripsiyonel aktivitenin belirlenmesi amacıyla)**
- (iii) SMAD2, SMAD3 VE SMAD4 transkripsiyon faktörlerinin ADAMTS1 promotor dizisinde bağlanma motifleri bulunmaktadır. Bu

ekspresyon plazmitleri ADAMTS1 promotor parçalarıyla birlikte Hep3B hücrelerine geçici olarak transfekte edilecek ve lusiferaz aktivitesi ölçülerek ADAMTS1 promotor aktivitesine olan katkıları belirlenmesi. **(SMAD2, SMAD3 VE SMAD4 transkripsiyon faktörlerinin ADAMTS1 transkripsiyonel aktivitesine olan katkılarının belirlenebilmesi amacıyla)**

(iv) Radyoaktif olmayan EMSA yöntemi ile fonksiyonel bir bağlanmanın olup olmadığı belirlenmesi. **(Transkripsiyon faktörlerinin fonksiyonel olarak ADAMTS1 promotor bölgesine bağlanıp bağlanmadığının belirlenebilmesi amacıyla)**

(v) Kotransfeksiyondan kantitatif RealTime PCR'a dayalı yöntem ile ADAMTS1 mRNA ekspresyon seviyesi karşılaştırılması. **(SMAD2, SMAD3 VE SMAD4 transkripsiyon faktörlerinin ADAMTS1 mRNA düzeyine olan etkilerinin belirlenmesi amacıyla)**

(vi) SMAD inhibitörünün uygulandığı inhibitör deneylerinin kurulması. **(İnhibisyon çalışmaları ile etkinin ortadan kaldırılması amacıyla)**



Şekil 1.9: Tez çalışma basamaklarını özetleyen akış diyagramı.

2. MATERYAL VE METOT

2.1 Materyal

2.1.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

Bu projede kullanılan kimyasal malzemelerin tümünün içeriği moleküler biyoloji için uygun saflıkta ve sterilliktir. RNA, DNA ve Protein konsantrasyonunun belirlenmesinde, RT - PZR çalışmalarında, qRT-PZR çalışmalarında kullanılan kimyasallar ve enzimler; Molecular probes, LightCycler, Fermentas ve Thermo scientific firmalarından temin edilmiştir.

Tablo 2.1: Çalışmada kullanılan kimyasallar, kitler ve üreticiler

Kimyasallar	Üretici
Akrilamid-Bisakrilamid	Merck
APS (Amonyum persülfat)	Fisher Chemicals
Ampicilin	Sigma
Agaroz	Prona
BSA (Bovin Serum Albumin)	Sigma
Beta-merkaptotanol	Merck
Borik asit	Merck
Biotin 3' End DNA Labeling Kit	Thermo Scientific
C ₂ H ₃ NaO ₂ (Sodyum Asetat)	Sigma
CaCl ₂ (Kalsiyum klorür)	Borasan Kimya
C-jun (Sc-44, lot#H0112 rabbit polyclonal IgG)	Santa Cruz
DMEM	Sigma
DEPC	AppliChem
DMSO (Dimetil sulfoksit)	Merck

Tablo 2.1: (Devam)

Etanol	Sigma
EDTA	Riedel
Etidyum Bromür	Sigma
FCS	Sigma
Formaldehit	Sigma
Goat anti-mouse IgG-HRP	Sigma
Gliserol	Merck
Hepes	Sigma
İzoamil Alkol	Fluka
LB-Broth	Sigma
LB-Agar	Sigma
LightShift® Chemiluminescent EMSA Kit	Thermo Scientific
MOPS	Sigma
MTT	Clontech
MgCl ₂ (Magnezyum klorür)	Fermantas
Metanol	Sigma-Aldrich
Nylon Membran	Thermo Scientific
NaCl ₂ (Sodyum klorür)	Sigma
NaOH (Sodyum hidroksit)	Sigma
NaHPO ₄ (Sodyum hidrojen fosfat)	Sigma
PBS	Sigma
Pierce ECL (Western Blotting substrat)	Thermo
PVDF Membran	Millipore
Page Ruler Prest	Thermo
pMetLuc Haberci ve Kontrol vektörü	Clontech
Ready-To-Glow Secreted Luciferase Reporter Assay Kiti	Clontech
Süt tozu	Santa Cruz
SDS (Sodyum dodecyl sulfat)	Sigma-Aldrich

Tablo 2.1: (Devam)

SİS3 (SMAD3 İnhibitörü, sc-222318, Lot# F2811)	Santa Cruz
SMAD2/3 (Sc-133098 lot#j0112 mouse monoclonal antikor)	Santa Cruz
SYBR® Green PZR Master Mix ve Gradiend su	Roche
Tripsin	Sigma
Tris Base	Sigma
TGF- β (Lot# 1352669B)	İnvitrogen-Gibco
Tween 20	Sigma-Aldrich
TEMED (Tetramethylethylenediamine)	Sigma
Tripan mavi solüsyonu	Sigma
β -aktin Antikor	Sigma

2.1.2 Çalışmada Kullanılan Laboratuvar Gereçleri

Tablo 2.2: Çalışmada kullanılan cihazlar ve modelleri.

Kullanılan Cihazlar	Model
Buz Makinası	Fiocchetti Frigoriferi Scientifici, İtalya
Buzdolabı	Arçelik, Türkiye
CO2 'li inkübatör	Nuair
Çalkalamalı İnkübatör	Shel-Lab, USA
DNA elektroforezi	Minicell Primo
Etüv	WTB, Germany, Nüve, Türkiye
Görüntüleme Cihazı	Fusion FX VILBER LOURMAT
Hassas Terazı	Sartorius
Isıtmalı Manyetik Karıştırıcı	Velp Scientifica, İspanya

Tablo 2.2: (Devam)

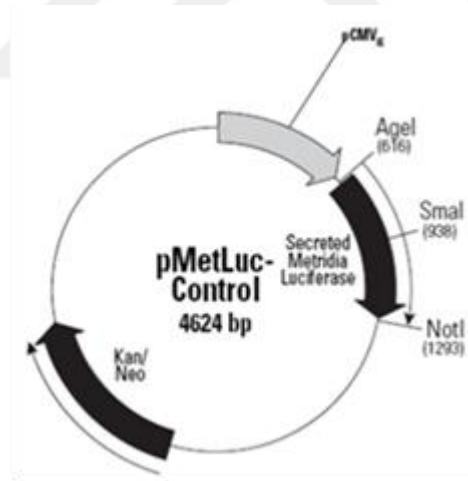
Isı kontrollü çalkalamalı inkübatör	GFL, Almanya
İnverted Mikroskop	Nikon
96 kuyulu plaka okuyucu spektrofotometre	Bio-Tek
Laminar Air Flow	Telstar BIOII, İspanya
Luminometre	Thermo
Otomatik pipetler	Finnpipette
Otoklav	Hırayama, Japonya
pH Metre	WTW, Almanya
PZR	BioLab
RNA elektroforezi	Thermo
Sıcak su banyosu	Consort, İngiltere
37 ⁰ C Su banyosu	Poly Science
+4 ⁰ C Soğutmalı Mikro santrifüj (Ependorf)	Thermo
+4 ⁰ C Soğutmalı Makro santrifüj (Falkon)	Sigma
Santrifüj (Ependorf)	Mikro 120 Hettich
Santrifüj (Falkon)	Nüve NF815
Saf su cihazı	Destilasyon 3.1 (Comecta Sa)
-80 ⁰ C ultralow freezer	Sanyo, Japonya /WiseCryo
UV Jel Görüntüleme	Quantum-Capt
Vorteks	Elektromag, Türkiye
qRT PZR	Roche
Qubit	Invitrogen

2.1.3 Çalışmada Kullanılan Hücre Soyusu

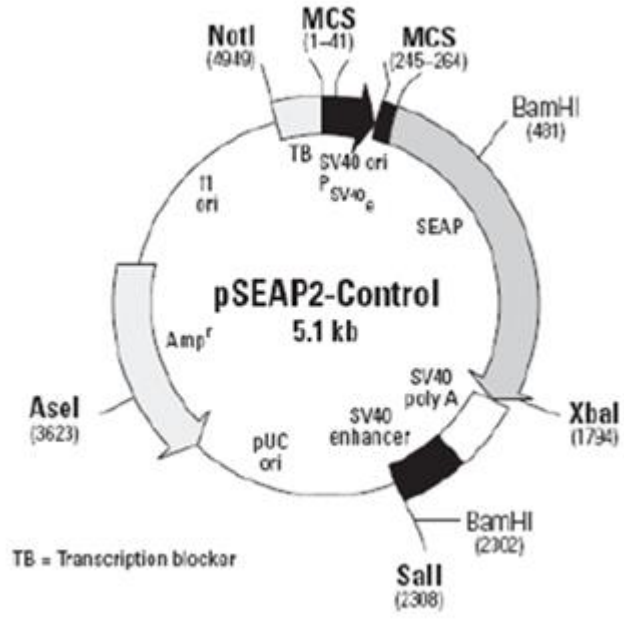
Bu projede kullanılan İnsan Karaciğer Karsinomu (Hep3B) hücre hattı Cardiff Üniversitesinden Dr. Ramji' den sağlandı.

2.1.4 Çalışmada Kullanılan Vektörler

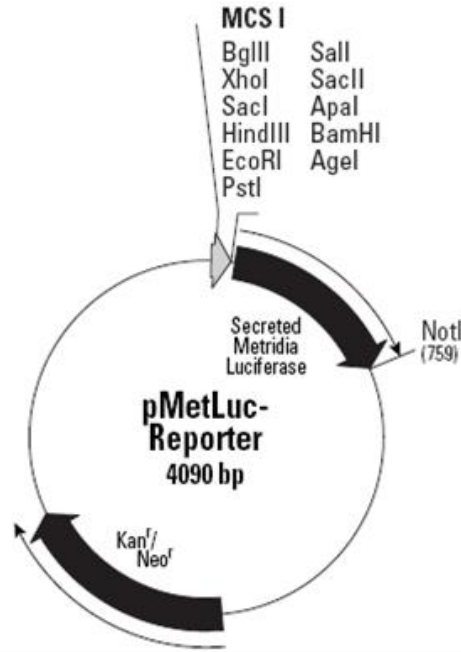
Çalışmada kullanılan ADAMTS1 promotor parçaları lusiferaz tabanlı bir vektör olan pmetluc vektörü içerisinde. Promotor aktivitesini belirlemek için raportör (Haberci) gen olarak *Metridia longa* (marin copepod) lusiferaz geni içeren pmetluc vektör sistemi kullanılmıştır. Bu sistemde Lusiferaz proteinini medyuma salındığı için lusiferaz aktivitesini belirlemek hassas, güvenilir ve hızlıdır. pMET-Luc kontrol vektörü ve Seap kontrol vektörleri transfeksiyon çalışmasının başarısını kontrol etmek için kullanılmıştır.



Şekil 2.1: pMETLuc kontrol vektörü.



Şekil 2.2: pSEAP2 kontrol vektörü.



Şekil 2.3: pMETLuc reporter vektör haritası.

2.2 Metot

2.2.1 Çalışmada Kullanılan Ortamın, Malzemenin Temizliği ve Sterilizasyonu

Bütün cam malzemeler, manuel hazırlanan bazı solüsyonlar, pipet uçları, ependorflar, santrifüj tüpleri, bakteri kültür ortamları 121⁰C' de 30 dakika (1,02 atm basınçta) otoklavda steril edildi ve etüvde kurutularak kullanıldı.

Doku Kültürü Laboratuvarı özellikle Laminar Flow ve hücrelerin büyütüldüğü inkübatör her hafta periyodik olarak virkon içeren sıvılarla temizlendi. Çalışmaya başlanmadan önce en az yarım saat UV lamba açıldı ve her çalışmada kullanılacak ortam tekrar steril edildi.

2.2.2 Hücre Kültürü Teknikleri

2.2.2.1 Hücre Kültüründe Kullanılacak Malzemelerin Hazırlığı

2.2.2.1.1 FCS Hazırlanması

FCS (Fetal Calf Serum)' nin taşınması soğuk zincirle yapıldı. -20⁰C' de saklandı. Stok serum ilk kullanımdan önce +4⁰C bir gece buzlarının çözünmesi sağlandı. Daha sonra 37⁰C' de 15 dakika ve 56⁰C' de 35 dakika ısı ile inaktive edilerek alikotları yapıp filtrelendikten (0,22 µm) sonra tekrar -20⁰C de saklandı.

2.2.2.1.2 Hücre Kültürü Medyumunun Hazırlanması

Hücre kültürü medyumunu DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) içine bazı zamanlarda Penicillin son konsantrasyonu 100 ünite/ml, Streptomycin son konsantrasyonu 10 µg/ml ve her zaman FCS (Fetal Calf Serum) son konsantrasyonu %10 olacak şekilde eklenmiştir. Tüm bileşenler 0,22 µm olan steril filtreden süzülerek kullanıldı.

2.2.2.1.3 Tripsin-EDTA Solüsyonunun Hazırlanması

%0,05 Tripsin ve 0,5 mM EDTA, steril PBS (1 X) içerisinde çözüldü. Bu çözelti steril cam malzemeler kullanılarak hazırlandı ve 0,22 µm' lik filtreden geçirilerek steril edildi. -20°C' de muhafaza edildi.

2.2.2.1.4 Çalışmada Kullanılan Hücre Soyu ile Yapılan İşlemler

Hücreler uzun süreliğine -80°C' de saklandı. Hücre hatlarının, büyütülmesi için -80°C'den çıkarılan hücreler 37°C sıcaklığındaki su banyosuna alındı ve hızlıca çözümleri sağlandı. Çözünen hücreler 5 ml %10' luk FCS içeren DMEM' e alındı, alt üst edilerek 1000 rpm' de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı, oluşan pellet %10' luk FCS içeren DMEM ile çözüldü ve 75cm²' lik flasklara ekimi yapıldı. Flasklar isim tarih ve pasaj numaraları yazılarak etiketlendi ve 37°C' de %5 CO₂ içeren inkübatöre kaldırıldı.

Hücreler 75 cm²' lik flaskların %90' nını doldurunca içerisindeki medyum uzaklaştırıldı ve 3 ml Tripsin-EDTA eklenerek 3 dakika inkübatörde hücrelerin kalkması beklendi ve tripsinizasyon sonucu hücreler kaldırıldı. Hücreler yüzeyden ayrılınca 5 ml %10 FCS içeren medyum eklenerek Tripsin-EDTA inaktive edildi. Falconlara alınarak 1000 rpm' de 5 dakika santrifüj ile hücreler çöktürüldü. Süpernatant uzaklaştırıldı, pellet 2 ml medyum ile çözüldü ve flasklara ekim yapıldı. Flasklar etiketlenerek 37°C, %5 CO₂ içeren inkübatöre konuldu. Bu teknik ile Hep3B hücre hattı %10 FCS içeren 15 ml DMEM medyumunu içerisinde 75 cm² flasklarda, haftada 1-2 kez rutin pasaj yapılarak üretildi. Hücrelerin dondurulması

için de süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra bu kez pellet 1 ml de %10 DMSO içeren FCS ile dikkatlice çözüldü, cryovial tüplerine konuldu ve etiketlenerek -80°C' deki dolaba uzun dönem için kaldırıldı.

2.2.3 DNA ile İlgili Teknikler

2.2.3.1 Büyük Ölçekli Plazmit İzolasyonu (Maxi Prep.)

İlgili ekspresyon vektörlerinin *E.coli*, *DH5a* soyuna transformasyonları önceden gerçekleştirildi. İşlemlere başlamadan önce bütün kullanılacak cam malzemelerin sterilizasyonları gerçekleştirildi. Büyük miktarda ve transfekte edilebilecek saflıkta plazmit DNA izolasyonu için Endo-free Maxi Prep Kit (Fermentas) kullanıldı. Kit protokolüne göre, uygun konsantrasyonda seçici antibiyotik içeren 2-5 ml LB besiyeri içerisine tek koloni ekim yapıldı. 37°C de 1 gece 200 rpm de çalkalamalı etüvde inkübe edildi. Süre sonunda başlangıç kültürü 1/500-1/1000 arasında seçici antibiyotik içeren LB medyumda dilue edilir. Yüksek kopyalı plazmitler için 100 ml LB medyum, düşük kopyalı olanlar için 250 ml LB medyum kullanılır. 37°C de 12-16 saat 250 rpm'de inkübe edilerek bakterilerin büyümesi beklendi. Bakteriler yeterli yoğunluğa ulaştıktan sonra +4°C' de 6000 rpm' de 15 dakika santrifüj yapılarak protokolün diğer basamakları uygun şekilde gerçekleştirildi. Spektrofotometrede ölçümleri yapıldı. Sonuçta yüksek saflıkta ve yoğunlukta DNA elde edildi.

2.2.3.2 DNA Miktarının Spektrofotometrik Olarak Belirlenmesi

İzole edilen plazmitlerin miktarları ve saflıkları 260 nm ve 280 nm' de absorbanslarının ölçümü ile hesaplandı. Bu amaçla kuvartz küvetlere kör değer için 200 µl dH₂O, DNA ölçümleri için 195 µl dH₂O ve ilgili plazmit DNA konuldu. Elde edilen absorbans değerleri ve saflıklarının değerlendirilmesi için aşağıdaki formüller kullanıldı.

$$\text{DNA miktarı} = A_{260} \times 50 \times 40 \text{ ng/}\mu\text{l}$$

$$\text{Saflık} = A_{260} / A_{280}$$

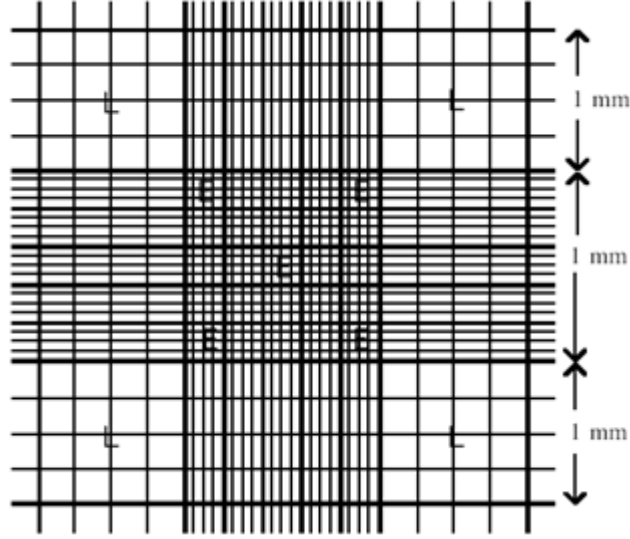
2.2.4 MTT Çalışması (Ekspresyon Vektörlerinin ve TGF- β Sitokinin Sitotoksik Etkisini Test Etmek için)

2.2.4.1 Canlı Hücrelerin Belirlenmesi ve Hücre Sayımı

Canlı hücrelerin belirlenmesi ve hücre sayımı için tripan mavisi ile boyama yöntemi kullanılmıştır. Toplam hücre süspansiyonun mililitresindeki hücre sayısı hesaplamak için üzeri 25 küçük kareye ayrılmış, 1 mm² alan içeren, 0,1 mm derinliği olan ve böylelikle toplam hacmin hesaplanabildiği hemositometre (Şekil 2.4) lamı kullanıldı. Flasklardan tripsinizasyon ile kaldırılan hücreler 1000 rpm' de 5 dakika santrifüj edildi. 10 ml %10 FCS içeren medyumda çözüldü. Canlı ve ölü hücreleri ayırt etmek için 10 μ l hücre süspansiyonu eşit hacimde tripan mavisi (1:1 dilasyon oranında) ile 3-5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Ölü hücreler mavi boyanırken canlı hücreler boyanmamıştır. Boyanmayan hücreler sayılmıştır. Bu işlemde iki farklı boyama işlemi yapılarak ve her boyamada 2 kez sayım yapılarak toplam 4 sonucun ortalaması ile aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

Süspansiyonun mililitresindeki toplam hücre sayısı aşağıdaki formülle bulunur:

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



Şekil 2.4: Hemositometre.

2.2.4.2 Kalsiyum-Fosfat Presipitasyonu ile Geçici Transfeksiyon

Tablo 2.3: Transfeksiyon çözeltileri.

Solüsyonlar	İçeriği
2 mM CaCl ₂	14,7 g CaCl ₂ tartıldı, 50 ml' ye distile su ile tamamlandı. Otoklav yapılarak filtre edildi ve +4°C' de saklandı.
2X Hepes	1,6 g NaCl, 0,04 g Na ₂ HPO ₄ , 1,3 g Hepes tartıldı ve 100 ml' ye distile su ile tamamlandı. pH 7,05 – 7,12 aralığına ayarlandı. Otoklav yapılarak filtre edildi ve -20°C' de saklandı.

2.2.4.3 MTT Uygulaması

96 kuyulu plakalara her biri kuyuya 50.000 hücre olacak şekilde paylaştırılan hücrelere yapılan transfeksiyon işleminden sonra uygun zaman aralığını tamamlayan gruplara 20 µl MTT solusyonu herbir kuyuya uygulandı ve hücrelerin MTT' yi metabolize etmeleri için 37°C' de 4 saat beklendi. Medyum uzaklaştırıldı. 0,004M HCl içeren isopropanol uygulanarak oluşan Formazan kristalleri MTT solusyonu ile

pipetaj yardımıyla çözüldü ve hücrelerin 550 nm dalga boyunda spektrofotometrede absorbans değerleri alındı.

2.2.5 Transkripsiyonel Aktivite Deneyleri

2.2.5.1 Plazmitlerin Ca-Fosfat Presipitasyonu ile Geçici Transfeksiyon

Transfeksiyon için hücreler 1 gün önceden 12 kuyulu plakalara 250.000/kuyu olacak şekilde paylaştırıldı. 45 µl son hacimde; 2 M CaCl solüsyonu ilave edilerek DNA (0,5 µg) ile karıştırıldı. Karışımın üzerine 45µl 2 X HEPES damla damla eklendi ve presipitasyonun oluşması için yarım saat beklendi. Sürenin sonunda presipitasyon oluştuktan sonra karışım her bir kuyuya 90 µl olacak şekilde damla damla eklendi. Hücreler 6 saatlik inkübasyon için CO₂' li inkübatöre kaldırıldı. Sürenin sonunda kuyulardan medyum uzaklaştırılarak tüm kuyulara %0,1' lik BSA içeren medyum konuldu ve 1 saat sonra ilgili kuyuya 500Ü/ml TGF-β sitokini uygulandı. 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sürelerinin sonunda lusiferaz ve salınan alkalın fosfat aktivitesi luminometre ile ölçüldü.

Hücelere promotor parçasını içeren rekombinant plazmitler (pMetLuc+ADAMTS1promotor) ile birlikte transfeksiyon etkinliğinin analiz edilmesi amacıyla 0,5 µg SEAP (SEAP-2-secreted alkaline fosfatase) vektörü de transfekte edildi. Bazal aktivite ile (pMetLuc+ADAMTS1promotor+SEAP-2) SMAD transfekte edilen grupların sonuçları karşılaştırıldı (pMetLuc+ADAMTS1promotor+SEAP-2+SMAD2-4 veya SMAD3-4). Lusiferaz enzim aktivitesini belirlemek için 'Clontech Ready-To-Glow™ Secreted Luciferase System' kullanılmıştır. Ölçümler Luminoskan Ascent marka luminometre ile alınmıştır. Çıkan değerler excel de Lusiferaz aktivitesi SEAP aktivitesine oranlanarak sonuçlar normalize edildi. Transfeksiyon etkinliği ise pmetluc kontrol vektörü ve SEAP kontrol vektörünün birlikte ve ayrı ayrı transfeksiyonu ile değerlendirildi.

2.2.5.2 Salınan Sistem Lusiferaz Aktivitesinin Ölçümü

Tablo 2.4: Lusiferaz aktivite ölçüm çözeltileri.

Solüsyonlar	İçeriği
10 X Substrat Çözeltisi	Kit içerisindeki liyofilize substrat eşit hacimdeki substrat buffer ile çözüldü.
1 X Substrat/Reaksiyon Tamponu	10 X substrat çözeltisinin, 1/10 oranında kullanılacak kadar miktarı, reaksiyon tamponu ile sulandırıldı. Her ölçüm için 1 µl (384 well plate için) kullanıldı.

12 kuyulu plakalara transfekte edilen promoter parçalarının bulunduğu medyumlardan istenilen saatler sonunda hücre medyumunu alındı. Sonuçların okunması için; 384 kuyulu plakalara 9 µl hücre kültürü medyumunu eklendi. 10 X Lusiferaz substrat solusyonu hazırlandı. Kullanmak üzere Reaksiyon tamponu ile 1 X' e sulandırıldı. Bir örnek için taze hazırlanmış 1 X Substrat/Reaksiyon tamponundan 1 µl kullanıldı ve bütün örnekler luminometrede tek tek konularak ölçüldü.

2.2.5.3 SEAP Aktivitesinin Ölçümü

Tablo 2.5: Seap aktivite ölçüm çözeltileri.

Solüsyonlar	İçeriği
1 X Dilüsyon Tamponu	Kit içerisindeki 5 X dilüsyon tamponundan çalışmada kullanılacak hacim kadarı 1 X' e distile dH ₂ O ile sulandırıldı. Her örnek için 15 µl (384 well plate için) kullanıldı.

12 kuyulu plakalara yapılan transfeksiyon sonrasında istenilen saatler sonunda sonuçlar için alınan 25 µl hücre kültürü medyumunu 96 kuyulu plakalara eklendi. 5 X dilüsyon tamponu 1 X' e ddH₂O ile dilüe edildi. 75 µl 1 X Dilüsyon tampon örneklerine eklendi ve plaka aliminyum folya ile sarılarak 65⁰C'de 30 dakika bekletildi. Ardından 2-3 dakika buzda bekletildi ve daha sonra oda sıcaklığına

getirildi. Oda sıcaklığına getirilmiş olan SEAP substrat çözeltisinden 40 µl eklendi ve örnekler oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi. İşlem sonunda sonuçlar luminometrede ölçüldü.

2.2.6 mRNA Seviyesindeki Etkilerin Analizi ile İlgili Teknikler

2.2.6.1 Plazmitlerin Geçici Transfeksiyonu için Deney Düzeninin Kurulması ve RNA izolasyonu

25cm² flasklarda transfeksiyondan 24 saat önce hücreler yaklaşık 2x10⁶ hücre olacak şekilde yayıldı. Transfekte edilecek DNA' lar sırasıyla 10 µg son konsantrasyonda olacak şekilde SMAD2, SMAD3, SMAD4 ve 2M CaCl₂ ayrı bir tüp içinde hazırlandı. Ayrıca kontrol için pMETLuc kontrol vektörü de transfekte edildi. Üzerine 2 XHepes eklenerek 45 dakika presipitasyon için oda sıcaklığında bekletildi. DNA: Kalsiyum fosfat presipitasyonu oluştuktan sonra karışım damla damla kuyucuklara 270 µl olarak eklendi. Her damladan sonra flask hafifçe sallanarak karışımın dağılması sağlandı. 6 saat inkübasyon süresinden sonra transfeksiyon solusyonu değiştirilerek, taze medyum eklendi. 1 gün sonra tüm flasklara %0,1' lik BSA içeren medyum konuldu ve 1 saat sonra ilgili flasklara 500 Ü/ml TGF-β sitokini uygulandı. Örnek alınacak saatler sonunda hücreler tripsin ile kaldırıldı ve pellet haline getirilerek RNA izolasyonları yapıldı. Kontrol ve deney gruplarına ait pelletlerden RNA' lar ticari kitte (Fermentas) belirtilen işlem basamakları uygulanarak izole edildi. Tüm aşamalarda sterilizasyona dikkat edildi ve özellikle DEPC' li dH₂O ile tüm yüzeyler temizlendi. Elde edilen RNA' lar -80°C dondurucuda uzun dönemde saklandı.

2.2.6.2 RNA Miktarının Spektrofotometrik Olarak Belirlenmesi

İzole edilen RNA'ların miktarları ve saflıklarının tayini için 260 nm ve 280 nm' de absorbansları alındı. Bu amaçla kuvartz küvetlere kör değer için 200 µl dH₂O, RNA ölçümleri için 195 µl dH₂O ve 5µl ilgili RNA konuldu. Elde edilen

absorbans değerleri ve saflıklarının değerlendirilmesi için aşağıdaki formüller kullanıldı.

$$\text{RNA miktarı} = A_{260} \times \text{Sulandırma Katsayısı} \times 40 \text{ ng/}\mu\text{l}$$

$$\text{Saflık} = A_{260}/A_{280}$$

2.2.6.3 Formaldehit Jel Elektrofrez (RNA jeli)

Tablo 2.6: Formaldehit jel elektrofrez çözeltileri.

Solüsyonlar	İçeriği
10 X FA Jel Tamponu	41,9 g MOPS (asitsiz), 6,8 g Na-asetat tartıldı, 20 ml 0,5M EDTA eklendi. pH 7,00,2' ye ayarlandı ve 1 litreye tamamlandı.
FA Jel Yürütme Tamponu	100 ml 10 X FA Jel tampon stoęundan, 20 ml %37' lik (12,3 M) formaldehit, 880 ml DEPC' li su ile 1 litreye tamamlandı.

Tablo 2.7: DEPC' li dH₂O.

Çözelti	İçeriği
1 lt DEPC' li H ₂ O	1 ml DEPC, 1 lt dH ₂ O' ya eklendi ve 37 ⁰ C' de 1 gece bekletildi.

Elektrofrez tankı, aparatları ve kullanılan cam malzemeler jel dökülmeden önce %0,5' lik SDS ile yıkandıktan sonra DEPC' li sudan geçirildi. Daha sonra etanol ile yıkandıktan sonra peçete üzerinde kurumaya bırakıldı. 0,5 g agaroz, 5 ml 10 X FA jel tampon ve 50 ml DEPC' li su mikrodalgada kaynatıldı ve buharlaşma bitene kadar soğumaya bırakıldı. 900 μ l formaldehit ve 1 μ l etidyum bromür eklenerek kasete döküldü. Jel donduktan sonra kaset 1 XFA jel tamponu ile doldurulan tanka yerleştirildi. 5 μ l RNA örneği ve 3 μ l 2 X yükleme boyası 65⁰C' de

10 dakika bekletildi ve buzda soğutulduktan sonra kuyulara yüklendi. RNA'ların kalitesi görüntüledikten sonra diğer basamaklara geçildi.

2.2.6.4 Reverse Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonları (RT-PZR)

RT-PZR iki ayrı basamakta kullanıldı. Birinci basamakta Reverse-Transkriptaz (RT) kullanılarak cDNA sentezlenmesi gerçekleştirildi, ikinci basamakta ise gene spesifik primerler ile ilk basamakta elde edilen cDNA kullanılarak ilgili gen bölgesinin amplifikasyonu, Polimeraz Zincir Reaksiyonları (PZR) gerçekleştirildi.

2.2.6.5 cDNA Sentezi

Elde edilen RNA'ların miktarları 2.2.6.2' de belirtildiği gibi hesaplandı. 1 µg RNA olacak şekilde alınması gereken miktar hesaplandı. 1µl Oligo dT eklenerek dH₂O ile 12,5 µl' ye tamamlandı. 65⁰C' de 5 dakika PZR cihazında inkübe edildi. Her bir örnek için 4 µl Buffer RT, 2 µl dNTP, 1 µl Revers Transkriptaz ve 0,5 µl Ribolock İnhibitörden oluşan karışım hazırlandı. Bu karışımdan her bir tüpe 7,5 µl paylaştırıldı. Örnekler 42⁰C de 1 saat ve 72⁰C 10 dakika PZR cihazında inkübe edildi.

2.2.6.6 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile cDNA Kontrolü

cDNA eldesinden sonra İnsan-β-2 Mikroglobulin için optimize edilen şartlarda (tablo 3-3) PZR yapıldı. PZR reaksiyonları 50 µl hacimde yapıldı. Kalıp olarak H-β-2 Mikroglobulin için 1µl cDNA kullanıldı. Her bir primer son konsantrasyonu 2 ng, 1 X Tampon (Fermentas) (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 9.0, %1 (v/v) Triton X-100), 200 mM her bir dNTP ve 2,5 ünite Taq DNA polimeraz (Fermentas) kullanıldı. MgCl₂ konsantrasyonu 2mM olarak kullanılmıştır. PZR sonuçları agaroz jelde görüntülenmiştir.

2.2.6.7 Agaroz Jel Elektrofözezi

%0,8' lik jel hazırlayabilmek için, LB Agar ve 0,5X TBE erlene konularak mikrodalga fırında kaynatıldı ve jel soğumaya bırakıldı. Jel kasete dökülmeden önce üzerine UV translaminatörde görüntüleyebilmek için son konsantrasyon 0,5 µg/ml Etidyum Bromür eklendi. Kasete taraklar yerleştirildikten sonra jel kasete döküldü ve donmaya bırakıldı. Polimerizasyon oluşmasının ardından taraklar çıkarılarak kuyulara örnekler 25 µl olarak yüklendi. Örneklerin jelde yürürken takibini yapabilmek için ve örneklerin kuyulara inmesini sağlamak amacıyla üzerlerine 6 X Loading Dyne boya konuldu. 25 µl hacim içerisine 5 µl boya eklendi. DNA elektrofözez tankı 0,5 X TBE ile doldurularak 90 V da 40 dk yürütülerek görüntüleme yapıldı.

2.2.6.8 Gerçek Zamanlı PZR (Real Time PZR)

Her deney seti için 3 tekrarlı olarak 'LightCycler 480 SSBYBR Green I Master' gerçek zamanlı PZR kiti kullanılarak belirtilen koşullarda gerçek zamanlı PZR yapıldı. 96 kuyulu plakalara belirtilen solusyonlar belirtilen miktarda konuldu. Kuyularda hava kabarcığı olmamasına dikkat edildi. Plaka film ile kapatılarak Roche Real Time PZR cihazına konuldu. Elde edilen Ct değerleri öncelikli olarak 3 tekrarlı çalışıldığı için her deney grubu için elde edilen değerlerin ortalaması alınmıştır, ardından tek bir kontrol olması hedeflendiği için her zaman dilimine ait kontrol gruplarının ortalaması alınmıştır. Daha sonra kontrol genimiz olan Human-β- 2 mikroglobülin geninin Ct değerleri ile bulunan Ct değerinin formülü aşağıdaki gibidir;

$$Ct_{H-\beta-2} - Ct_{\text{çalışılan gen}} = \Delta Ct$$

$$\text{Hedef ct değeri} = 2^{-\Delta Ct}$$

Tablo 2.8: Real Time PZR bileşenleri.

BİLEŞENLER	MİKTAR
cDNA	1 µl
Primer-Forward	0,5 µl
Primer-Reverse	0,5 µl
dH ₂ O	3 µl
Master Mix	5 µl
Son Hacim	10 µl

Tablo 2.9: Real Time PZR koşulları.

Sıcaklık	Süre	Döngü
95 ⁰ C	10 dk	1
95 ⁰ C	10 sn	35
60 ⁰ C	10 sn	
72 ⁰ C	10 sn	
72 ⁰ C	5 dk	1
Erime Eğrisi Analizi	-	1

Tablo 2.10: Çalışmada kullanılan primer bilgileri.

ADAMTS1				
Forward	Reverse	Accession Number	Product Size	Annealing sıcaklığı
5'- CAGCCCAAGGTT GTAGATGGTA-3' (2475-2496)	5'- TTCACCTTCGATGT TGGTGGCTC-3' (2716-2695)	NM_00698 8	241 bp	50 ⁰ C
Hβ2				
Forward	Reverse	Accession Number	Product Size	Annealing sıcaklığı
5'TTTCTGGCCTG GAGGCTATC '3	5'CATGTCTCCATC CCACTTAACT '3	NM_00404 8	314 bç	60 ⁰ C

Tablo 2.10: (Devam)

SMAD2				
Forward	Reverse	Accession Number	Product Size	Annealing sıcaklığı
5'- CGCCAGTTGTGAA GAGACTGCTGG - 3'	5'- GGGATACCTGGAG ACGACCATCAA-3'	XM_00672 2451.1	329bp	62 ⁰ C
SMAD3				
Forward	Reverse	Accession Number	Product Size	Annealing sıcaklığı
5'- GTGAAGCGCCTG CTGGGCTGGAA 3'	5'- ATTGAAGGCGAAC TCACACAGCTcc -3'	NM_00590 2.3	135bp	63 ⁰ C
SMAD4				
Forward	Reverse	Accession Number	Product Size	Annealing sıcaklığı
5'- TGAAAGTTTGGTA AAGAAGCTGAAG -3'	5'- TCACCATCATACT TGATGGAGCAT -3'	NM_00535 9.5	355bp	55 ⁰ C

2.2.7 Protein ile İlgili Teknikler

2.2.7.1 Deney Düzeninin Kurulması ve Protein Ekstraktlarının Hazırlanması

25cm² flasklarda transfeksiyondan 24 saat önce hücreler yaklaşık 2x10⁶ olacak şekilde yayıldı. Transfekte edilecek DNA' lar sırasıyla 10 µg son konsantrasyonda olacak şekilde SMAD2, SMAD3 ve SMAD4 ve 2M CaCl₂ ayrı bir tüp içinde hazırlandı. Üzerine 2 X Hepes eklenerek yarım saat prespitasyon için oda sıcaklığında bekletildi. DNA: Kalsiyum fosfat prespitasyonu oluştuktan sonra

karışım damla damla kuyucuklara eklendi. Flask hafifçe sallanarak karışımın dağılması sağlandı. 6 saat sonra transfeksiyon solusyonu değiştirildi. Tüm kuyular %0,1' lik BSA içeren medyum konuldu ve 1 saat sonra ilgili kuyuya 500 Ü/ml TGF- β sitokini uygulandı. İstenilen saat sonunda hücreler tripsin ile kaldırıldı ve pellet haline getirilerek protein izolasyonları için -80°C dondurucuda saklandı. Pelletler -80°C dondurucudan alınarak buz üzerinde erimesi sağlandı. Herbir örnek için 100 μ l Ripa Buffer eklendi. 45 dakika boyunca 10 dakika süre arayla pipetaj yapıldı. +4°C soğutmalı santrifüjde 12000 g' de 10 dakika santrifüj yapıldı. Supernatant soğutulmuş ependorfa alındı. Örnekler -80°C dondurucuda saklandı.

Tablo 2.11: Ripa Buffer çözeltisinin içeriği.

Bileşenler (Son Konstrasyon)	Alınan miktar
10 mM TrisCl (pH:8)	500 μ l
%1 Triton X100	500 μ l
%0,1 SDS	10 ml
%0,1 Sodyum deoxycholate	0,05 g
1 mM EDTA	100 μ l
1 mM EGTA	500 μ l
140 mM NaCl	7 ml
Proteaz İnhibitörü	2 tablet

2.2.7.2 Protein Miktarının Qubit ile Belirlenmesi

Örnek başına 199 µl Qubit Reagent Protein Buffer ve 1 µl Reagent boyasından eklenerek bir karışım oluşturuldu. Bu karışımdan 199 µl ve 1 µl de protein konularak 10 saniye vorteks yapıldı. 15 dakika oda sıcaklığında beklenerek Qubit cihazında ölçüm alındı.

Protein Miktarı = Cihazda okunan değer X 200 (Seyreltme Katsayısı)

2.2.7.3 SDS PAGE

Elektroforez aparatları, cam levhalar ve tanklar su, %70 etanol ve %90 izopropanol ile başlamadan önce temizlendi. İlk olarak ayırma jeli tabloda belirtilen şekilde hazırlandı, üst kısımda 3 cm boşluk kalacak şekilde döküldü. Hava kabarcığı oluşması halinde %90 izopropanol eklenerek giderildi. 30-40 dakika jelin polimerizasyonu için beklendi. Jel polimerize olduktan sonra izopropanol uzaklaştırılarak ddH₂O ile yüzey yıkandı. Kurutma kağıdı ile yüzey kurutuldu. Ardından yağma jeli döküldü ve jel donmadan hemen kuyu oluşumu için tarak yerleştirildi. Yağma jelinin polimerizasyonundan sonra, tarak çıkarıldı ve kuyucuklardaki hava kabarcıklarının uzaklaştırılması için yine ince şeritler halinde kesilmiş kurutma kağıdı kullanıldı. Daha sonra hazırlanan jeller tank içine yerleştirildi.

Miktarları hesaplanan proteinlerin 22,5 µl hacimde alındı. Protein örneği başına 900 µl 4 X Sample Laemli Buffer'a 100 µl β-merkapt etanol eklenerek bir karışım hazırlandı. Bu karışımdan 7,5 µl alınarak proteinlere eklenerek son hacim 30 µl olacak şekilde tamamlandı. Örnekler 95⁰C' de 5 dakika denatüre edilerek proteinler hazırlandı. İlk kuyuya 5 µl Prestained Protein Ladder yüklenerek diğer kuyulara proteinleri yükleme işlemine geçildi.

Jelin yürütülmesi için, 0.1 (w/v) SDS içeren 1 X Running Buffer ile tank doldurularak (orta kısım ve alt kısım) 90 volta yaklaşık 90 dakika yürütüldü.

Tablo 2.12: SDS PAGE çözeltileri.

Jel İçeriği	%10 Ayırma Jeli	%5 Yığıma Jeli
Üst Jel Tamponu	---	2.5 ml
Alt Jel Buffer	2.5 ml	---
Akrilamid-Bisakrilamid (37.5:1)	2.5 ml	1.25 ml
ddH ₂ O	5 ml	6.25 ml
%10 (w/v) APS	100 µl	50 µl
TEMED	10 µl	5 µl

Tablo 2.13: Western Bloth çözeltileri.

Solüsyon	İçeriği
SDS PAGE Alt Jel	1,5 M Tris-HCl (pH 8,8), %10 (w/v) SDS
SDS PAGE Üst Jel	1 M Tris-HCl (pH 6,8), %10 (w/v) SDS
SDS PAGE Yürütme Çözeltisi	25 mM Tris, 250 mM Glisin, % 0,1 (w/v) SDS
Western Blot Transfer Çözeltisi	25 mM Tris, 192 mM Glisin, % 20 (v/v) Metanol
10 X TBS	10 mM Tris-HCl, 20 mM NaCl, pH 7.4

2.2.7.4 SDS Jelinin Blotlanması

Proteinlerin elektroforetik transferi için Biorad sistemi kullanıldı. Proteinlerin transferi için PVDF membranlar kullanıldı. Transfer buffer yukarıda Tablo 2.13' de belirtildiği şekilde hazırlandı. -20°C hazırlanan buffer bir süre soğumaya bırakıldı. Camların arasındaki jel soğuk transfer buffer içine bırakıldı. Transfer sistemi

aparatları, süngerlerde aynı transfer buffer içine bırakıldı. Kurutma kağıtları ve PVDF membran jel boyutlarında kesilerek hazırlandı. Kurutma kağıtları da soğuk transfer bufferda ıslatıldı. PVDF membran ise soğuk metanolde 1 dakika tutulduktan sonra transfer buffera alınarak transfer sistemi için hazırlandı. Cam levhalar arasındaki jel çıkartıldı, yağma jeli kesilerek uzaklaştırıldı. Daha sonra sandiwiç hazırlandı. Bunun için transfer kasedi arasına sünger, kurutma kağıdı, jel, membran, kurutma kağıdı, sünger olacak şekilde sandiwiç hazırlandı. Bu sırada hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi. Daha sonra kaset, transfer buffer ile dolu olan blot tankına yerleştirildi ve 15 volt akımda 12-18 saat (over-night) transfere bırakıldı.

2.2.7.5 Proteinlerin Belirlenmesi

Proteinlerin transfer olduğu PVDF membranlar ilk olarak 20 ml bloklama çözeltisinde (%5 (w/v) yağsız süt tozu ve %0.1 (v/v) Tween20 içeren 1X TBS) 1 saat horizontal çalkalayıcıda oda sıcaklığında inkübe edildi. Süre sonunda bloklama çözeltisi uzaklaştırılarak 5 dakikalık sürelerle 3 kez membran yıkandı, bunun için %0.1 (v/v) Tween20 içeren 1 X TBS kullanıldı. Membran primer antikor (SMAD2/3 Sc-133098 lot#j0112 mouse monoclonal IgG2) ile 1-1,5 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Daha sonra sekonder antikor (Goat anti-mouse IgG-HRP) ile bir saat oda sıcaklığında inkübasyon yapıldı ve görüntülemeye geçildi.

2.2.7.6 Sonuçların Filme Aktarılması

Membranlar 2 dakika ECL sistemi Pierce ECL (Western Blotting Substrate-Thermo) substratla muamele edildi. Reagent A ve Reagent B çözeltilerinden ayrı ayrı 2 ml alınarak membran üzerine uygulandı. Ardından karanlık odaya geçilerek membran filme aktarıldı. Membran film üzerinde 30 sn, 5dk ve 15dk aralıklarla bastırıldı. Filmi yıkayarak sonuçlar görünür hale getirildi.

2.2.8 DNA-Protein Etkileşimi ile İlgili Teknikler

2.2.8.1 Electromobility Shift Assay (EMSA)

EMSA, DNA-protein etkileşimlerini belirlemek için kullanılan bir tekniktir. DNA-protein kompleksinin oluşması durumunda, bu kompleks denatüre olmayan jelde serbest DNA molekülüne göre daha yavaş hareket etmektedir. İlgili proteinin DNA'ya bağlanması durumunda jeldeki hareketi değişerek daha arkada kalmaktadır. DNA'nın hareketindeki bu değişimler değerlendirilerek düşünülen protein ile etkileşime girip girmediği belirlenebilmektedir [56]. Bu çalışmada biyoinformatik analiz ile belirlenen ve promotor bölgesine bağlanması muhtemel SMAD transkripsiyon faktörlerinden fonksiyonel olarak ADAMTS1 promotor bölgesine bağlanıp bağlanmadığı radyoaktif olmayan EMSA çalışmaları ile belirlenmiştir. Bu amaçla öncelikle nükleer ekstrakt hazırlanarak önceden biyotinlenmiş ve çift zincirli hale getirilmiş oligonükleotidler ile birlikte bağlanma reaksiyonları kurulmuştur. Yarışma reaksiyonları için biyotin ile işaretlenmemiş oligonükleotidlerden reaksiyon tüpüne yaklaşık 1000 kat fazla eklenmiştir. Bağlanma reaksiyonları denatüre olmayan jele yüklenerek yürütülmüş ve membrana transfer edilmiştir. Kompleks HRP (Horseradish Peroxidase) takısı içeren streptavidin kompleksi ile işaretlenerek ECL sistemi ile görünür hale getirilmiştir. Sonuçlar X-Ray filmine aktarılarak görüntülenmiştir.

Tablo 2.14: Çalışmada kullanılan EMSA primerleri.

ADAMTS1 (+106+166) F	GCGGAGGCCGAAGAGGGGCGCCAGGCA CCAATCTCCGCGTTGCCTCAGCCCCGGAG GCG
ADAMTS1 (+106+166) R	CCGCCTCCGGCTTCTCCCCGCGGTCCGTGG TTAGTGGCGCAACGGAGTCGGGGCCTCCG C
ADAMTS1 (-1365-1305) F	GGGGAAGATCTGGGGAGGAGCGAGGAAA GGACCCAGATCTACTTGGAGCCAACCAAG AGA
ADAMTS1 (-1365-1305) R	CCCCTTCTAGACCCCTCCTCGCTCCTTTCCT GGGTCTAGATGAACCACGGTTGGTTCTCT

2.2.8.2 Hep3B Hücrelerinden Nükleer Ekstrakt Hazırlanması

75cm² lik flasklarda büyütülen hücreler flask yüzeyini %80-90 oranında doldurduktan sonra, hücreler buzda soğutulmuş 10 ml PBS ile 2 kez yıkandıktan sonra 3 ml TEN Buffer tamponu eklendi ve buz üzerinde 5 dakika bekletildi. Hücreler flask yüzeyinden kazıcı aparat ile kazınarak 2 ml' lik ependorflara alındı. +4°C' de, 13.000 rpm' de 1 dk santrifüjlendi. Pellet 1,5 ml soğuk PBS ile pipetaj yapılarak yıkandı. +4°C' de 13.000 rpm' de 5 dk santrifüj edildi ve üst kısım atıldı. Oluşan pellet 50 µl A tamponunda çözüldükten sonra buzda 15 dk bekletildi ve hamilton enjektöründen 5 kez geçirilerek lizis edildi. Lizat +4°C' de, 13.000 rpm' de 20 sn santrifüj edildikten sonra oluşan pellet 60 µl C tamponu eklenerek yeniden homojen hale getirildi. Buzda 30 dk bekletildikten sonra +4°C' de, 13.000 rpm' de 5 dk santrifüj edildi. Protein miktarı Qubit de ilgili solüsyonlar kullanılarak belirlendi ve sonuçlar not edildi. Örnekler sonra 10 µl' lik hacimlere ayrılarak -80°C dondurucuda saklandı. Böylece EMSA çalışmaları için nükleer ekstrakt hazırlanmış oldu [56].

Tablo 2.15: Nükleer Ekstrakt için kullanılan çözeltiler.

Solüsyon	İçeriği
TEN Buffer	40 mM Tris-HCl, pH: 7,5, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl
Buffer A	10 mM HEPES pH: 7,9, 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl ₂ , 0,5 mM PMSF, 0,5 mM DTT, 1 µg/ml Tip I soya fasülyesi tripsin inhibitörü
Buffer C	20 mM HEPES pH: 7,9, 420 mM NaCl, 1,5 mM MgCl ₂ , 0,2 mM EDTA, %25 gliserol 0,5 mM DTT, 0,5 mM PMSF 1 µg/ml pepstatin A, 10 µg/ml aprotinin, 10 µg/ml leupeptin, 10 µg/ml Tip I soya fasülyesi tripsin inhibitörü

2.2.8.3 Oligoların Etiketlenmesi

Oligoların etiketlenmesi için Pierce Biotin 3' End DNA Labeling Kit kullanıldı. Kitteki tüm malzemeler TdT enzimi hariç buz üzerine konularak çözüldü. TdT enzimi kullanılacağı zaman -20°C' den çıkarıldı. Stok TdT enzimi, 5 X TdT Reaksiyon Buffer ile son konsantrasyonda 1 X TdT Reaksiyon Buffer ve TdT enziminin de 2 Ü/µg hale gelecek şekilde sulandırıldı. Daha sonra labelling işlemine geçildi. Ultra saf su 25 µl, 5 X TdT Reaction Buffer 10 µl, Unlabeled Control Oligo (1 µM = 1 picomol/ µl) 5 µl, Biotin-11-UTP (5 µM) 5 µl, Diluted TdT (2 Ü/µl) 5 µl kullanılarak toplam hacim 50 µl' ye tamamlandı. 37°C' de 30 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon işleminden sonra 2.5 µl 0.2 M EDTA (pH=8) eklenerek reaksiyonu durduruldu. 50 µl kloroform:izoamil alkol (24:1) reaksiyona konuldu. Bu işlem, TdT' yi uzaklaştırmak için yapılmıştır. Kısa bir süre vorteksleme yapıldı. Ardından 1-2 dakika santrüfüjleme yapıldı birbirinden ayrılmış 2 faz görüldü ve üstteki faz temiz bir ependorfa alındı. Bu çalışmada kullanılan ADAMTS1' e göre dizayn edilmiş EMSA primerlerinin hem forward hemde reverse primerlerinin ikisinde etiketlenmiştir.

2.2.8.4 Oligonükleotidlerin Bağlanması

Oligoların anneal edilmesi demek, eşit miktarda etiketli oligoların birleştirilip çift zincirli DNA oluşturulması demektir. Oligonükleotidlerin bağlanması amacıyla, biyotinli primerlerden son konsantrasyonda 80 fmol/μl kullanılarak 50 μl' lik son hacimde sulandırıldı ve PCR tüpünde birleştirilerek çift zincirli hale gelmeleri için 95°C' de 5 dk inkübasyona bırakıldıktan sonra oda ısısında 1-2 saat yavaşça soğuması için bekletildi.

Biyotinsiz problarda bu aşama biyotinli problemlerin 1000 kat fazlası yani 80.000 fmol/μl olacak şekilde hazırlanarak inkübasyona bırakıldı. Tüm oligolar -20°C' de saklandı [57].

2.2.8.5 Bağlanma Reaksiyonu

Bağlanma reaksiyonu için üretici firmanın belirttiği talimatlar doğrultusunda 20 μl' lik son hacim içerisine; son konsantrasyonu 1 X olacak şekilde bağlanma tamponu, 50 ng/μl son konsantrasyonda poly dI.dC, 4 μg nükleer ekstrakt, 5 mM MgCl₂, 5 mM KCl, 20 fmol biyotin etiketli primer eklenerek 10 dk buzda ve sonra 20 dk oda sıcaklığında bağlanma reaksiyonunun gerçekleşmesi için bekletildi [57].

2.2.8.6 Jelin Yürütülmesi ve Proteinlerin Membrana Transferi

Kullanılacak olan camlar ve aparatlar 24 saat önce saf suda bekletildi ve ardından etanol ile silinerek SDS kalıntılarının kurtulmaya çalışıldı. Native poliakrilamid jel %6 Akrilamid: Bisakrilamid (37,5:1), 0,5X/L TBE tamponu, %0,25 gliserol, %0,1 Amonyum persülfat (APS) ve TEMED ilave edilerek hazırlandı. Hazırlanan jel için yürütme tamponunda 90 V akımda, 1 saat süresince ön yürütme yapıldı.

Transfer için naylon membran kullanıldı (Thermo Scientific). Jel, naylon membran, Whatman 3 MM kağıt, sünger pedler transfer tamponu (0,5 X/L TBE)

içinde alınarak oda sıcaklığında 5-10 dk bekletildi. Daha sonra transfer kaseti arasına eksi yüklü kutuptan başlamak üzere sırasıyla sünger, Whatman kağıdı, jel, membran, Whatman kağıdı, sünger hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilerek yerleştirildi. Kaset, soğuk transfer tamponu ile dolu olan blot tankına yerleştirildi ve 90 volt akımda 1,5-2 saat boyunca transfere bırakıldı. Transfer sonrasında kross-link reaksiyonu için üzerine streç film ile sarılarak üzerine membran hava kabarcığı kalmayacak şekilde konuldu ve membranın üzeri tekrar streç film ile sarılarak, 15 dk UV transilimünatör tutuldu. Kross-link sonrasında membran, oda sıcaklığında 15 dk süresince bloklama tamponu içerisinde çalkalandı. Bu sürenin sonunda Streptavidin-Horseradish Peroxidase Conjugate taze bloklama tamponuna eklenerek 15 dk oda sıcaklığında çalkalandı. Membran kittede bulunan 1 X yıkama tamponu ile üç kez yıkandıktan sonra 15 ml substrat dengeleme tamponu eklenerek 5 dk çalkalandı [56].

Biotin işaretli DNA: protein kompleksi, ECL substratı kullanılarak görüntülendi ve X-Ray filme aktarıldı, film tab edildi veya Fusion FX VILBER LOURMAT cihazında sonuçlar görüntülendi.

2.2.9 İnhibisyon Çalışmaları

2.2.9.1 Protein ve RNA Eldesi

2.2.9.1.1 Deney Düzeninin Kurulması

25cm² flasklarda hücreler yaklaşık 2x10⁶ olacak şekilde yayıldı. Bir gün sonra tüm kuyular %0,1' lik BSA içeren medyuma konuldu ve 1 saat sonra son konsantrasyonu 3 µM olarak SİS3 (SMAD inhibitörü) uygulandı ve uygulamadan 1 saat sonra ise kuyulara 500 Ü/ml TGF-β sitokini uygulandı. İstenilen saatler sonunda hücreler tripsin ile kaldırıldı. Protein ve RNA için pellet haline getirilerek -80°C dondurucuda saklandı.

Protein izolasyonu tablo 2.11' de verilen bileşenlerle gerçekleştirildi ve RNA izolasyonu kittede belirtilen koşullarla gerçekleştirildikten sonra RNA ölçümleri bölüm

2.2.6.2' de anlatıldığı şekilde; protein ölçümleri ise bölüm 2.2.7.2' de anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi. Hücre pelletlerinden elde edilen cDNA' lar ile Real time PCR ve protein pelletleri ile western blot yapılarak inhibitörün etkisi değerlendirildi.

2.2.9.2 Kullanılan İnhitörün Hep3B Hücrelerine Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

2.2.9.2.1 Kalsiyum-Fosfat Yöntemi ile Transfeksiyon

Transfeksiyon için hücreler 1 gün önceden 96 kuyulu plakalara 50.000/kuyu olacak şekilde paylaştırıldı. Transfeksiyon için kullanılan kimyasallar tablo 4 de belirtilmiştir. 45 µl son hacimde; 2 M CaCl solüsyonu ilave edilerek DNA (0,5 µg) ile karıştırıldı. Karışımın üzerine toplam hacim içerisinde 45 µl 2 X HEPES damla damla eklendi ve presipitasyonun oluşması için yarım saat beklendi. Sürenin sonunda presipitasyon oluştuğundan sonra karışım her bir kuyuya 9 µl olacak şekilde damla damla eklendi. Hücreler 6 saatlik inkübasyon için CO₂' li inkübatöre kaldırıldı. Sürenin sonunda kuyulardan medyum uzaklaştırılarak tüm kuyular taze besi yeri ile değiştirildi. 1 gün sonra tüm kuyulara %0,1' lik BSA içeren medyum konuldu ve 1 saat sonra son konsantrasyonu 3 µM olacak şekilde ilgili kuyulara SİS3 (SMAD inhibitörü) uygulandı ve uygulamadan 1 saat sonra ise ilgili kuyulara 500 Ü/ml TGF-β sitokini uygulandı.

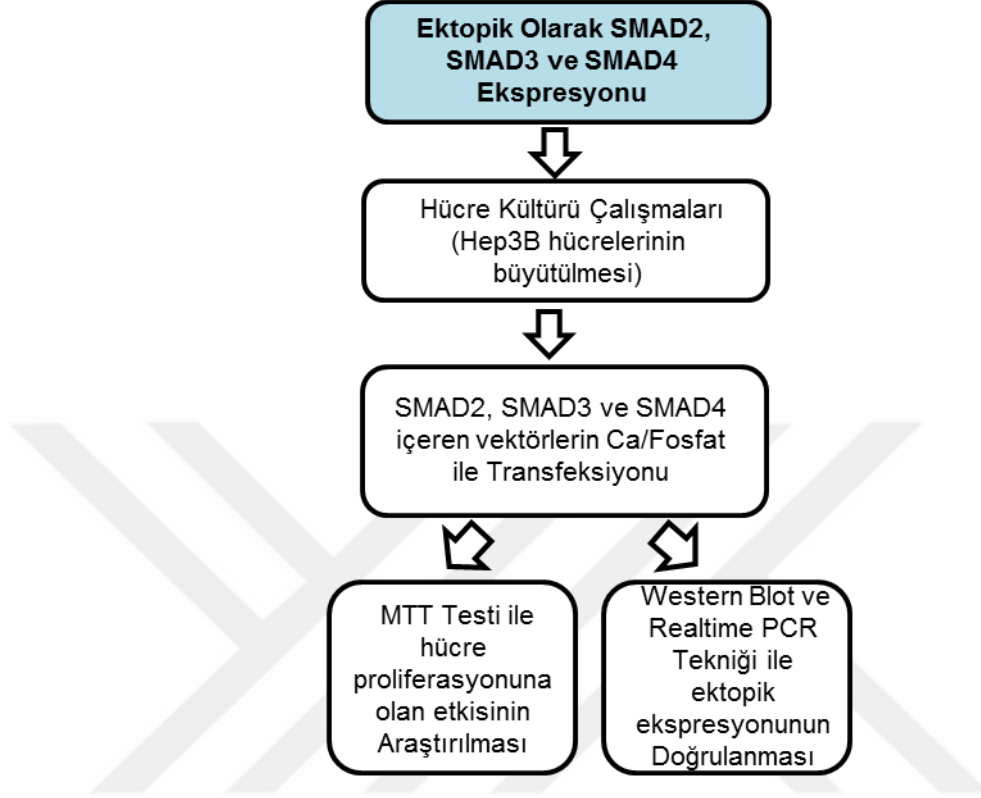
Hücrelere SMAD2 ile SMAD4 ve SMAD3 ile SMAD4 içeren rekombinant plazmitler ile birlikte transfeksiyon etkinliğinin ve başarısının analizi amacıyla 0,5 µg pMETLuc kontrol vektörü de transfekte edildi. 96 kuyulu plakalara her biri kuyuya 50.000 hücre olacak şekilde hücreler paylaştırıldı. 20 µl MTT solüsyonu herbir kuyuya uygulandı ve hücrelerin MTT' yi metabolize etmeleri için 37⁰C' de 4 saat beklendi. Medyum uzaklaştırıldı. 0,004 M HCl içeren isopropanol uygulanarak oluşan Formazan kristalleri MTT solüsyonu ile pipetaj yardımıyla çözüldü ve hücrelerin 550 nm dalga boyunda absorbanans değerleri alındı.

2.2.10 İstatiksel Analiz

Real Time PZR' da kontrol ve deneysel gruplar cT değerlerine göre standart sapmalarıyla Livak Metodu ile değerlendirildi. Western Blotting sonuçları ise İmaj-j 'de bantların sayısal değerleri belirlendi. Microsoft Excel' de sonuçlar değerlendirildi.



3. BULGULAR



Şekil 3.1: Bulgular 1. Bölümün akış diyagramı.

3.1 Ektopik Olarak SMAD2, SMAD3 ve SMAD4' ün Ekspresyonu

Bu bölümde çalışmalar 2 farklı basamakta yürütülmüştür. Öncelikli olarak ektopik olarak üretilmiş olan SMAD transkripsiyon faktörlerinin mRNA ve protein seviyesinde kontrolü yapılmıştır. Daha sonra SMAD transkripsiyon faktörlerinin ektopik olarak üretiminin ve sitokin muamelesinin model olarak kullanılan hücre hattı olan Hep3B hücrelerine herhangi bir sitotoksik etkisi olup olmadığı MTT testi ile değerlendirilmiştir.

3.1.1 mRNA Seviyesinde SMAD Transkripsiyon Faktörlerinin Ektopik Üretiminin Kontrolü

3.1.1.1 Çalışmada Kullanılacak Primerlerin Optimizasyonu

Çalışmalarımıza başlamadan önce tablo 2-10' da bilgileri verilen SMAD2, SMAD3, SMAD4 ve ADAMTS1 ekspresyon primerlerinin çalıştığından emin olmak ve gerçek zamanlı PZR aşamasına geçilmeden önce sıcaklık koşullarının optimizasyonu için öncelikle bu primerler ile PZR gerçekleştirildi. İnsan- β -2-mikroglobulin primerleri gerçek zamanlı PZR çalışmasında normalizasyon amaçlı olarak kullanılacağı için bu primerlerde çalışmada kullanılmıştır.

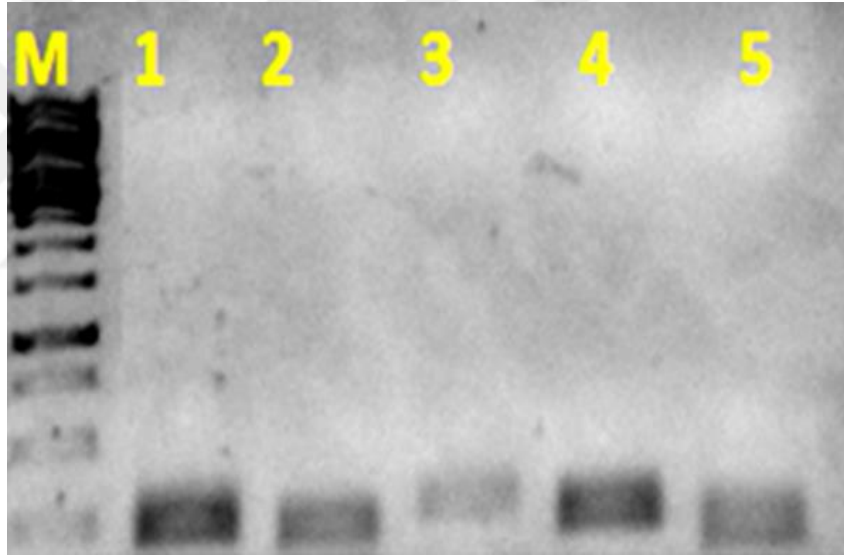
Tablo 3-1' de verilen PZR bileşenleri ve Tablo 3-2' de verilen PZR koşulları sonucunda elde edilen ürünler %0,8 lik agaroz jele yüklenerek 90 voltta 40 dakika yürütme aşamasından sonra UV ile görüntülendi.

Tablo 3.1: PZR da kullanılan malzemeler ve miktarları.

	SMAD2	SMAD3	SMAD4	H β 2	ADAMTS1
cDNA	1 μ l	1 μ l	1 μ l	1 μ l	1 μ l
MgCl ₂	2 μ l	2 μ l	2 μ l	2 μ l	2 μ l
İleri primer	1 μ l	1 μ l	1 μ l	1 μ l	1 μ l
Geri primer	1 μ l	1 μ l	1 μ l	1 μ l	1 μ l
dNTP	1 μ l	1 μ l	1 μ l	1 μ l	1 μ l
Taq Polimeraz	0,5 μ l	0,5 μ l	0,5 μ l	0,5 μ l	0,5 μ l
Buffer	5 μ l	5 μ l	5 μ l	5 μ l	5 μ l
dH ₂ O	38,5 μ l	38,5 μ l	38,5 μ l	38,5 μ l	38,5 μ l
TOPLAM	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l

Tablo 3.2: PZR koşulları

94 ⁰ C	5dk	35 döngü
94 ⁰ C	30sn	
60 ⁰ C	30sn	
72 ⁰ C	30sn	
72 ⁰ C	5dk	



Şekil 3.2: Ekspresyon primerleri ile RT PZR sonuçları.

(M: 1Kb Marker, 1: SMAD2, 2: SMAD3, 3: SMAD4; 4: Hβ2, 5: ADAMTS1.)

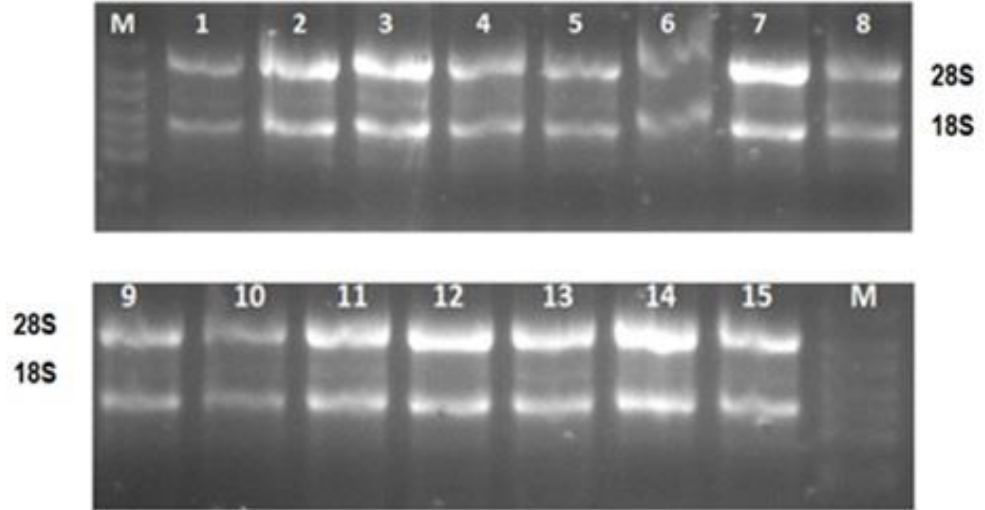
Bu çalışmada hem PZR koşulları optimize edildi, hemde ekspresyon primerlerinin kontrolü yapıldı. Bu işlemler tek bant elde edilene kadar farklı sıcaklıklarda ve koşullarda tekrarlandı. Şekil 3.2' de görüldüğü gibi primerler aynı sıcaklık ve PCR koşullarında tek bant vermiştir. Sonraki çalışmalarda bu şartlar kullanılarak primerler kullanılmıştır.

3.1.1.2 Ekspresyon Vektörlerinin Hazırlanması

SMAD2, SMAD3 ve SMAD4 transkripsiyon faktörlerini taşıyan ekspresyon vektörleri grubumuzca klonlanmış ve dizi analizi ile doğrulanmıştır. İlgili ekspresyon vektörlerinin *E.coli DH5α* soyuna transformasyonları gerçekleştirilmiştir. Büyük miktarda ve transfekte edilebilecek saflıkta plazmit DNA izolasyonu bölüm 2.2.3.1' de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. Miktarlarının belirlenmesi amacıyla bölüm 2.2.3.2' de anlatıldığı şekilde spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Ekspresyon vektörlerinin transfeksiyonu için hücreler -80⁰C alınarak açıldı. Bölüm 2.2.2.1.4' de anlatıldığı gibi büyütüldü ve pasajlandı. Bölüm 2.2.4.1' de anlatıldığı gibi hücreler sayılarak deney düzeni kuruldu. Transfeksiyonlar için kalsiyum fosfat presipitasyon metodu kullanıldı. Hep3B hücre hattında geçici transfeksiyon yöntemi ile vektörlerin hücrelere transferi gerçekleştirildi. Ayrıca kontrol olarak transfeksiyon uygulanmayan hücrelerde çalışmaya dahil edildi. Bu hücre hattını seçmemizdeki amaç, Hep3B hücre hattında ADAMTS1' in ifade edildiği laboratuvarımızda çalışmalarda gösterilmiştir. Bu yöntem bu hücre hattında daha önceki çalışmalarımızda kullanılmış ve başarıyla uygulanmaktadır. Ayrıca bir başka factor olarak TGF-β' nin ekspresyon vektörlerine katkısını incelemek için deney grubu olarak TGF-β sitokinli grup da uygulamaya eklenmiştir. 500 Ü/ml olacak şekilde hücrelere TGF-β sitokini uygulandı. Kontrol ve farklı deney gruplarındaki hücrelerden 24, 48 ve 72 saat sonunda pelletler oluşturularak RNA izolasyonu için hazır hale getirildi.

3.1.1.3 RNA İzolasyonu, cDNA Eldesi ve PZR

SMAD2, SMAD3 ve SMAD4 transkripsiyon faktörleri transfekte edilen Hep3B hücrelerinden alınan pelletlerden ve kontrol grubu olarak kullanılan transfeksiyon işlemi yapılmayan hücre pelletlerinden total RNA izolasyonu gerçekleştirildi ve RNA' lar bölüm 2.2.6.3' de anlatıldığı gibi RNA jel elektroforezinde yürütülmüştür. Sonuçlar UV görüntüleme fotoğraflanmıştır (Şekil 3.3).



Şekil 3.3: Deney ve kontrol gruplarına ait RNA' ların formaldehit agaroz jel görüntüsü.

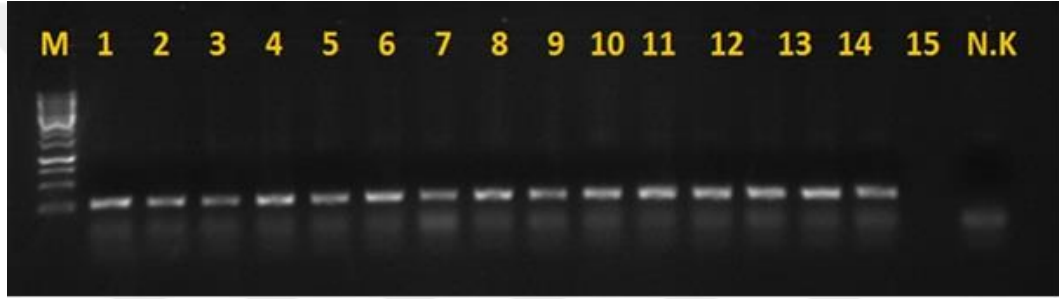
(M: Büyüklük belirteci, 1: SMAD2/4 24 saat, 2: SMAD2/4 TGF 24 saat, 3: SMAD3/4 24 saat, 4: SMAD3/4 TGF 24 saat, 5: Kontrol 24 saat, 6: SMAD2/4 48 saat, 7: SMAD2/4 TGF 48 saat, 8: SMAD3/4 48 saat, 9: SMAD3/4 TGF 48 saat, 10: Kontrol 48 saat, 11: SMAD2/4 72 saat, 12: SMAD2/4 TGF 72 saat, 13: SMAD3/4 72 saat, 14: SMAD3/4 TGF 72, 15: Kontrol 72 saat)

İzole edilen bu RNA' lardan bölüm 2.2.6.2 'de belirtilen şekilde RNA miktarı ve saflığı RNA elektroforezi ve spektroskopik olarak belirlenmiştir. RT reaksiyonlarında 1000 ng (1 µg) RNA bölüm 2.2.6.5' de anlatılan şekilde cDNA sentezlenmiştir. Pozitif kontrol olarak insan-β-2-mikroglobulin primerleri kullanılmıştır. β-2-mikroglobulin geni insan hücrelerinde sürekli olarak ekspre olan bir gendir ve RT-PZR şartlarının normalizasyonu ve pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Elde edilen cDNA' nın kantitatif PZR çalışmalarından önce kullanılabilmesi için sq RT-PZR şartları ile kontrolü yapılmıştır Bu gen aynı zamanda normalizasyon amaçlı kullanılmıştır ve tüm deney ve kontrol gruplarında insan β-2-mikroglobulin PZR reaksiyonları da yapılmıştır. Ürünler agaroz jel elektroforezi ile yürütüldü ve UVP ile görüntülendi.

Bu cDNA' lar kullanılarak SMAD2, SMAD3 ve SMAD4 ve ADAMTS1 ekspresyon primerleri ile bölüm 2.2.6.8' de belirtilen şekilde gerçek zamanlı PZR yapılmıştır. Sonuçların cT değerleri Livak metotuna göre excelde değerlendirilmiştir.

Tablo 3.3: İnsan- β -2 PZR koşulları.

95 ⁰ C	5dk	25 döngü
95 ⁰ C	30sn	
60 ⁰ C	1dk	
72 ⁰ C	2dk	
72 ⁰ C	8dk	



Şekil 3.4: Elde edilen cDNA'ların İnsan-beta-2 Mikroglobulin primerleri kullanılarak RT-PZR sonuçları.

(M: 1KB Marker, 1: Kontrol 24 saat, 2: SMAD2/4 24 saat, 3: SMAD2/4 TGF- β 24 saat, 4: SMAD3/4 24 saat, 5: SMAD3/4 TGF- β 24 saat, 6: Kontrol 48 saat 7: SMAD2/4 48 saat, 8: SMAD2/4 TGF- β 48 saat, 9: SMAD3/4 48 saat, 10: SMAD3/4 TGF- β 48 saat, 11: Kontrol 72 saat, 12: SMAD2/4 72 saat, 13: SMAD2/4 TGF- β 72 saat, 14: SMAD3/4 72 saat, 15: SMAD3/4 TGF- β 72 saat.)

3.1.1.4 Gerçek Zamanlı PZR ile SMAD Transkripsiyon Faktörlerinin Ektopik Ekspresyonunun Doğrulanması

Yapılan transfeksiyonda HEP3B hücre hattına son hacimde 10 μ g DNA yani 5 μ g SMAD2 ile birlikte 5 μ g SMAD4 ve 5 μ g SMAD3 ile birlikte 5 μ g SMAD4 ayrı flasklarda kalsiyum fosfat presipitasyon metoduyla transfeksiyon gerçekleştirildi. Uygulamadan 6 saat sonra besi yeri taze %0,5 FCS içeren medium ile değiştirildi. Transfeksiyon yapılmayan hücreler kontrol olarak kullanıldı. . Transfeksiyondan 1 gün sonra serumsuz medyumla ortam değiştirildi ve bu uygulamadan 1 saat sonra 500Ü/ml sitokin (TGF- β) uygulaması yapıldı. Bunun amacı serum içerisinde bulunan büyüme faktörlerinin net cevabı görmemizi engelleyeceğini düşünmemizdir.

Serumsuz ortama bunun yerine BSA eklenmiştir. Transfeksiyon deneyleri 3 tekrarlı olarak çalışıldı ve birbirinden bağımsız 3 deney yapıldı. Ayrıca aynı deneyde tüm transfekte kuyuların kontrol gruplarının aktiviteleri de çalışıldı. Yani sitokin uygulanmayan deney grupları oluşturuldu. Kontrol grupları ile SMAD transfekte edilen gruplardaki aktiviteler karşılaştırıldı. Elde edilen cT değerleri insan beta-2 ile oranlanarak normalizasyon gerçekleştirildi. SMAD2/4, SMAD3/4 ve TGF- β Sitokininin mRNA seviyesi istatistiksel olarak değerlendirildi.

SMAD2 ve SMAD4 transfekte edilen Hep3B hücre hattında, Şekil 3.5 ve Şekil 3.6 de gösterildiği gibi SMAD2 ve SMAD4' ün özellikle 48 saat sonunda bir artış olduğu ve mRNA seviyesinde kontrol grubuna göre ifadenin arttığı tespit edildi.

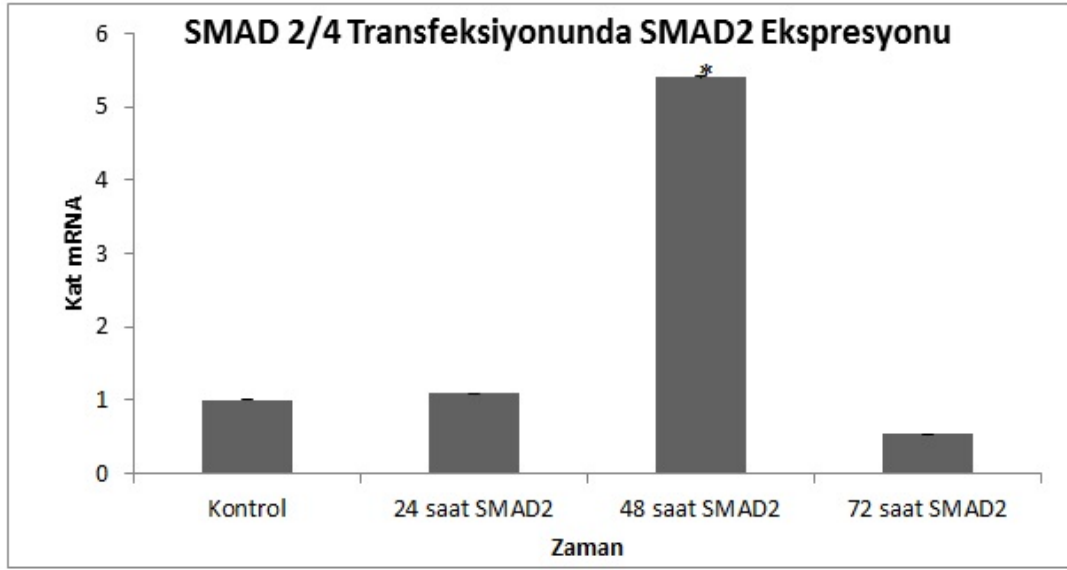
SMAD3 ve SMAD4' ün transfekte edildiği Hep3B hücre hattında SMAD3' ün kontrol grubuna göre 24 saat sonunda mRNA düzeyinde ekspresyonunda artış olduğu (Şekil 3.7), SMAD4 de ise 24 ve 48 saatlerde bu ekspresyona katkı sağladığı gözlemlendi (Şekil 3.8).

Tablo 3.4: Gerçek zamanlı PZR reaksiyonu bileşenleri.

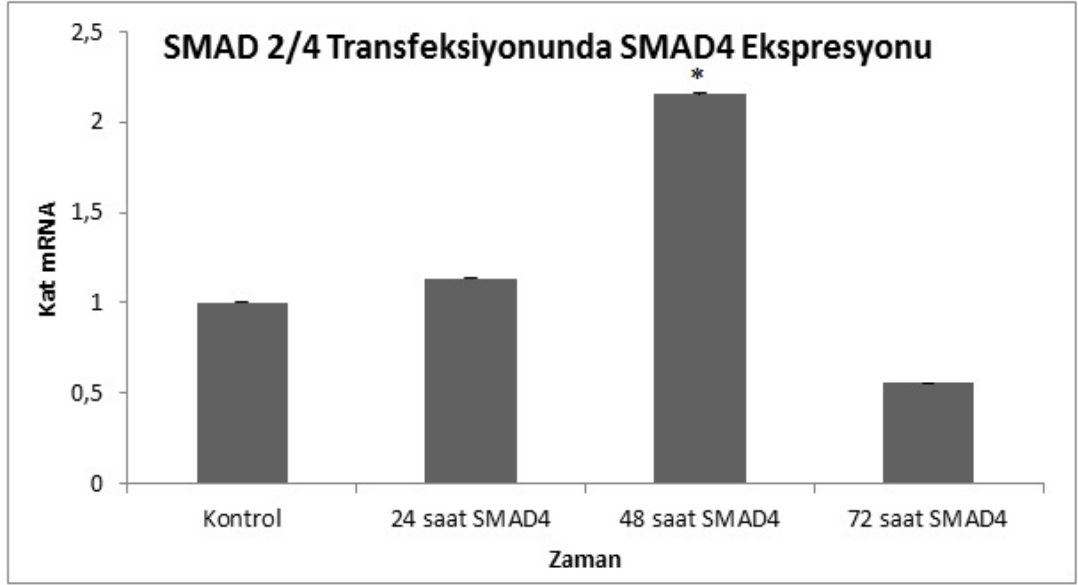
	Örnek	Negatif Kontrol
SYBR Green master mix	5 μ l	5 μ l
dH2O	3 μ l	3 μ l
cDNA	1 μ l	-
İleri primer	0,5 μ l	0,5 μ l
Geri primer	0,5 μ l	0,5 μ l

Tablo 3.5: Gerçek zamanlı PZR koşulları

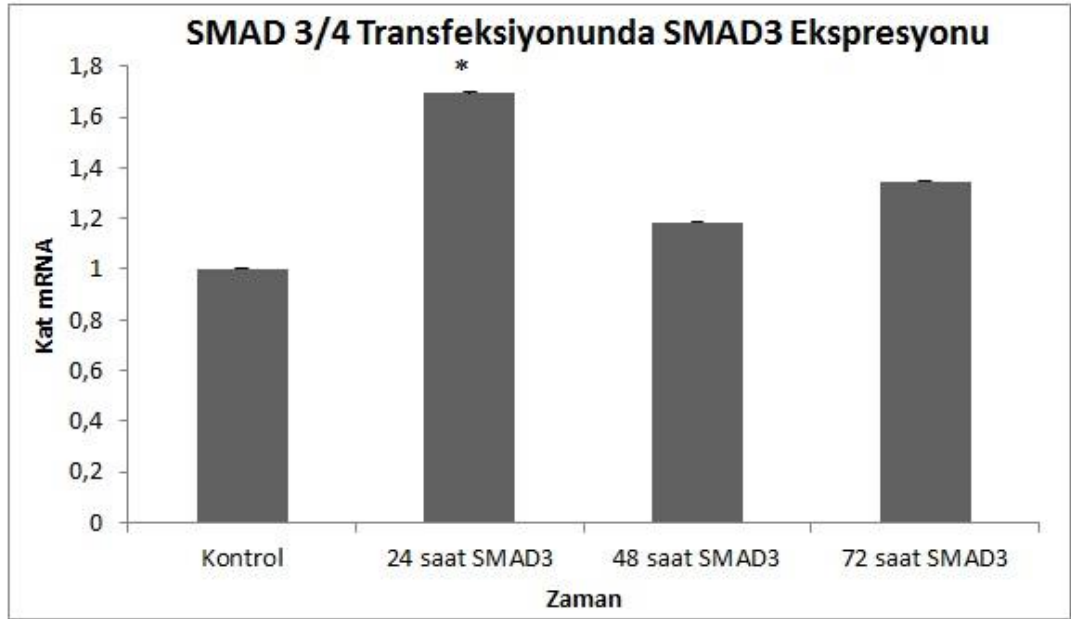
Sıcaklık	Süre	Döngü
95 ⁰ C	10 dk	1
95 ⁰ C	10 dk	35
60 ⁰ C	10 dk	
72 ⁰ C	10 dk	
72 ⁰ C	5 dk	1
Erime Eğrisi Analizi	-	1



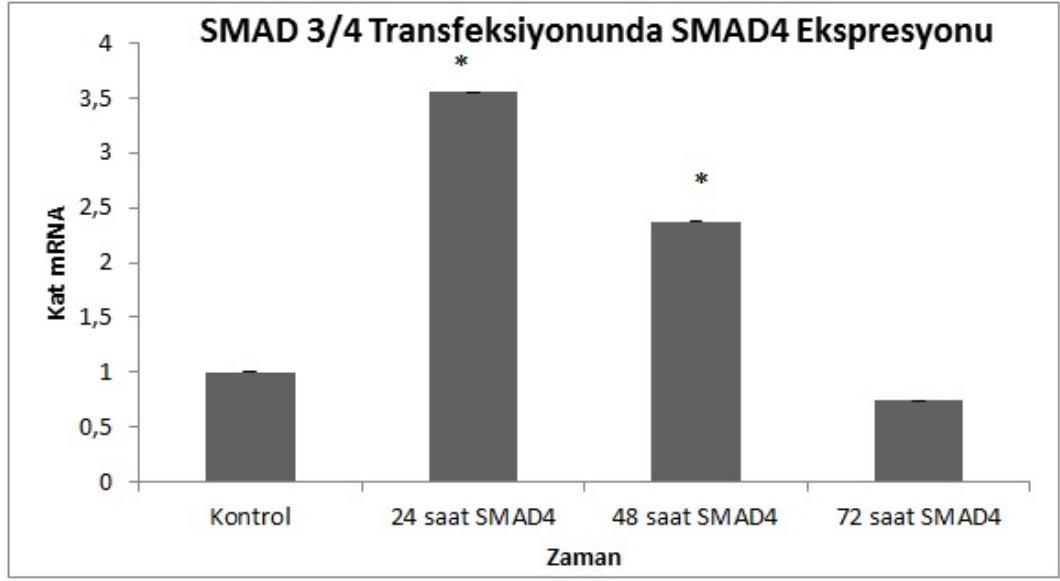
Şekil 3.5: Hep3B hücre hattında SMAD2 mRNA seviyesi.



Şekil 3.6: Hep3B hücre hattında SMAD4 mRNA seviyesi.



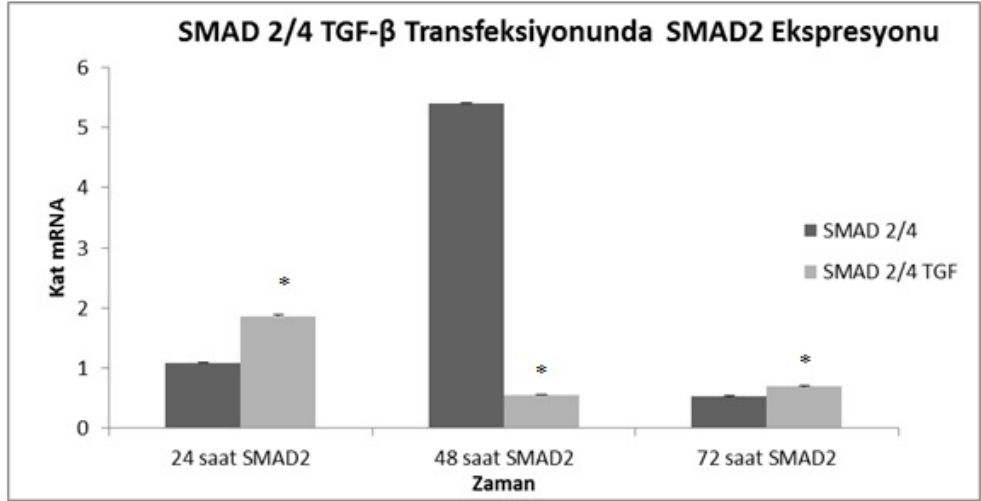
Şekil 3.7: Hep3B hücrelerinde SMAD3 mRNA seviyesi.



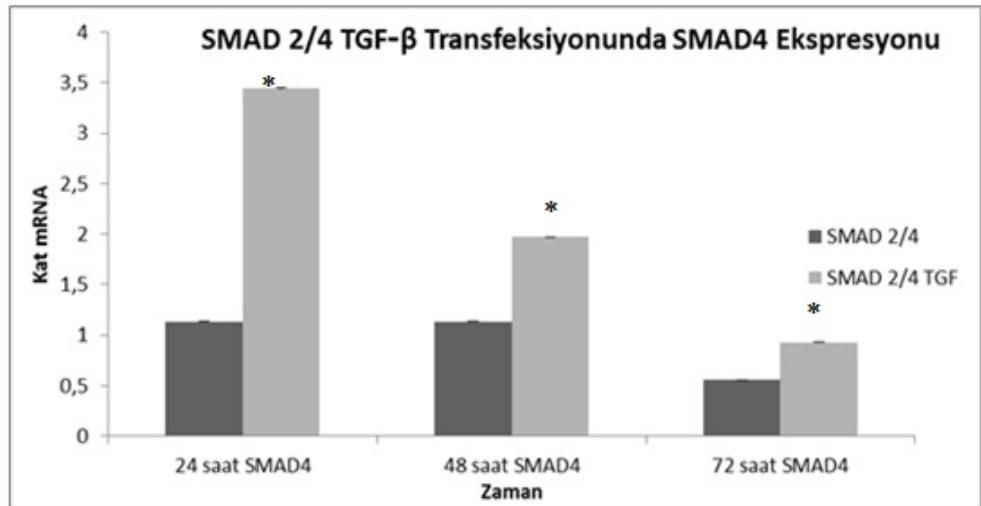
Şekil 3.8: Hep3B hücrelerinde SMAD4 mRNA seviyesi.

Ektopik ekspresyonun mRNA seviyesinde kontrol edilmesinden sonra TGF- β sitokininin ektopik olarak üretilen transkripsiyon faktörleri olan SMAD' lara olan etkisi de ayrıca araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre SMAD2 ve SMAD4' ün ayrıca TGF- β sitokininin uygulandığı koşullarda SMAD2' nin ekspresyonuna TGF- β 'nin 24 saatte katkı sağladığını görmekteyiz (Şekil 3.9). SMAD4'ün ekspresyonuna ise tüm zaman dilimlerinde katkı sağlamıştır (Şekil3.10).

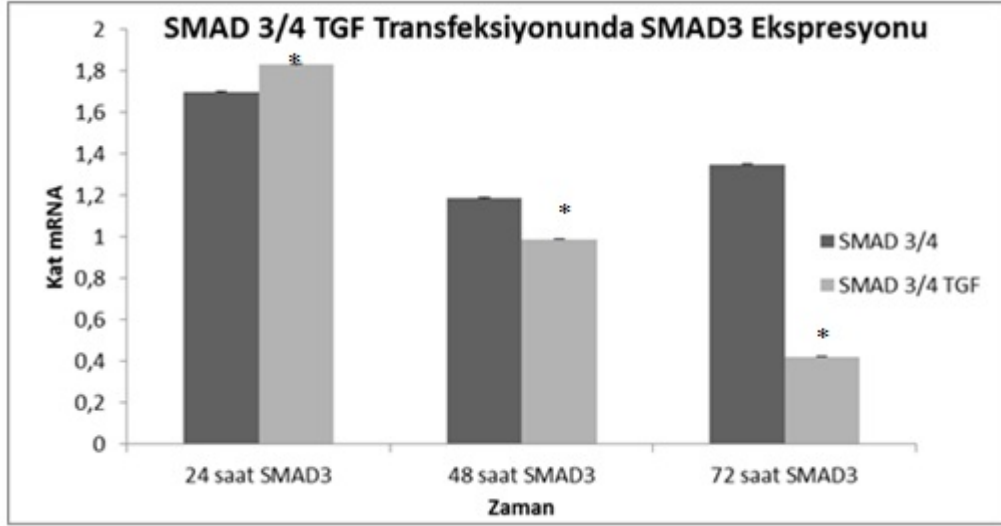
SMAD3 ve SMAD4' ün ayrıca TGF- β sitokininin uygulandığı koşullarda SMAD3' ün ektopik ekspresyonuna TGF- β ' nin etkisine baktığımızda 24 saatte bir artışa sebep olduğunu görmekteyiz (Şekil 3.11). Aynı deney grubunda TGF- β 'nin SMAD4' ün ektopik üretimine katkısı en yüksek olarak 72 saatte gözlenmiştir (Şekil 3.12).



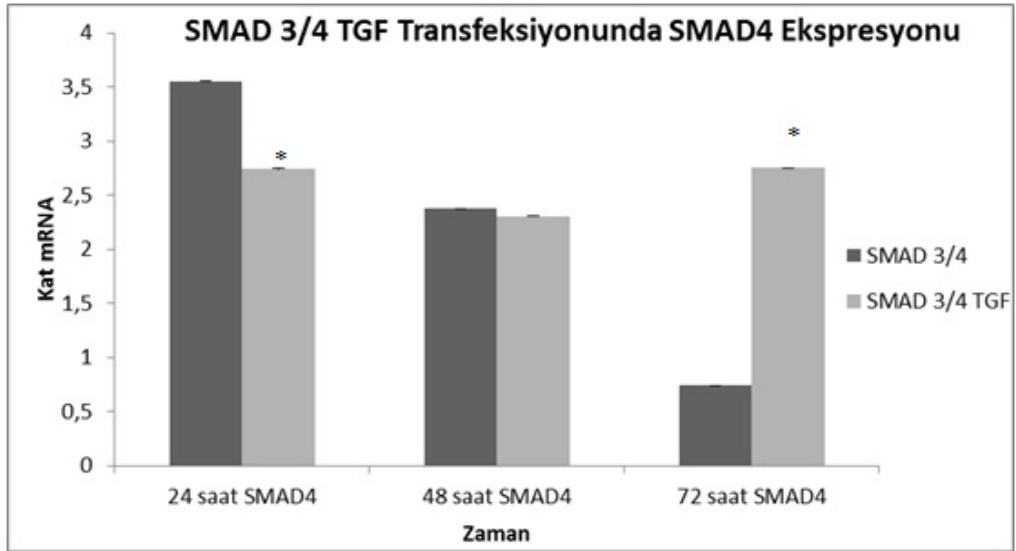
Şekil 3.9: SMAD2/4 transfekte edilen ve TGF- β sitokini uygulan hücrelerde SMAD2 mRNA ekspresyonu.



Şekil 3.10: SMAD2/4 transfekte edilen ve TGF- β sitokini uygulan hücrelerde SMAD4 mRNA ekspresyonu.



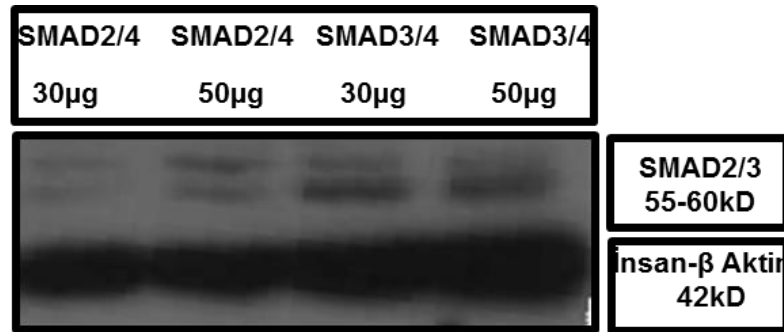
Şekil 3.11: SMAD3/4 transfekte edilen ve TGF- β sitokini uygulan hücrelerde SMAD3 mRNA ekspresyonu.



Şekil 3.12: SMAD3/4 transfekte edilen ve TGF- β sitokini uygulan hücrelerde SMAD4 mRNA ekspresyonu.

3.1.2 Protein Seviyesinde SMAD Transkripsiyon Faktörlerinin Ektopik Üretiminin Kontrolü

Protein düzeyinde çalışmalarımıza başlamadan önce optimizasyon deneyleri yapıldı. Lipofektamin ajanı kullanılarak DNA' lar Hep3B hücrelerinde transfekte edildi. Kitteki protokoller uygulanarak 72 saat sonunda hücreler tripsin-EDTA ile kaldırılarak pellet haline getirildi ve RİPA Buffer tablo 2.11' de gösterilen solüsyonlarla hazırlandı ve pelletlerden protein izolasyonu gerçekleştirildi. İzolasyon sonunda proteinlerin miktarları qubitte ölçülerek alikotları yapıldı. Western blotting çalışması için tablo 2.13' de anlatılan gerekli solüsyonlar hazırlanmıştır. Belirtilen şekilde SDS PAGE jeli hazırlanarak proteinler yüklenmiştir. Bu aşamalardan sonra Western Blot tekniğine geçilerek örnekler 30 µg ve 50 µg olacak şekilde SDS jeline yüklendi ve sonuçlar İnsan-β-Aktin' e göre oranlanarak normalizasyon edildi. Jeller bir gece +4°C' de transfere bırakılmıştır. Bir gece sonrasında transfer işlemi tamamlanmasıyla membrana geçen proteinler ilk olarak SMAD antikoru (1:100) uygulanmış sonrasında bu antikora uygun ikincil antikor (1:5000) uygulanarak proteinler filme aktarılmıştır. Membranlar kontrol amacıyla β-aktin antikoru (1:10.000) uygulanmış sonrasında bu antikora uygun sekonder antikor (1:5000) uygulanarak proteinler filme aktarılmıştır. Normalizasyon işlemleri için insan beta aktin geni kullanılmıştır. Bu analiz sonucuna göre bütün Western Blot çalışmalarımızda örneklerimizi 50 µg olarak yüklemeye karar verdik (Şekil 3.13).

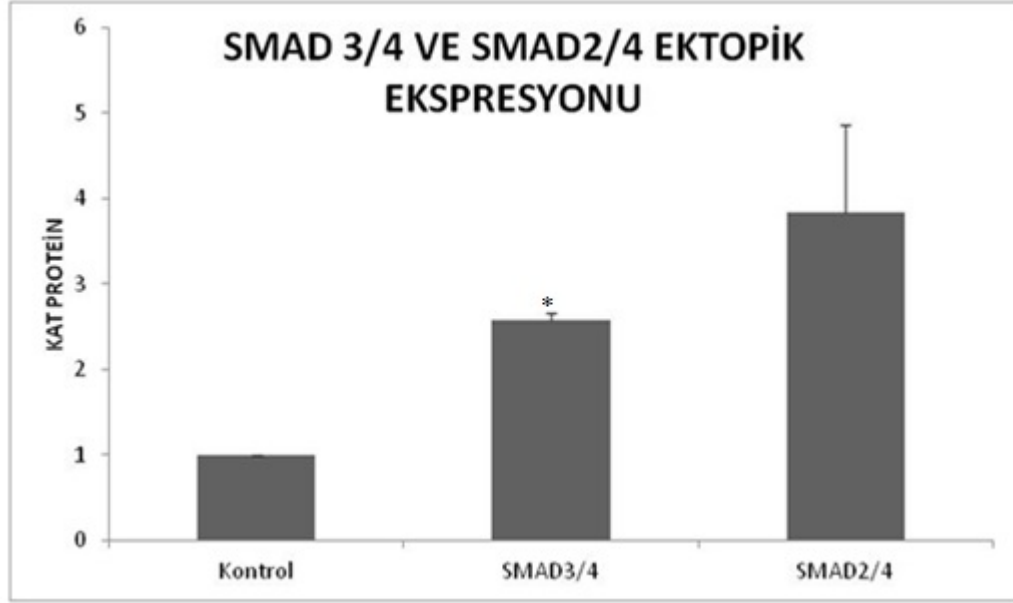


Şekil 3.13: SMAD2/4 ve SMAD3/4 uygulanmış Hep3B hücre hattında SMAD ve İnsan-β-Aktin protein optimizasyonu.

Kullanılacak protein miktarına karar verildikten sonra küçük flasklarda transfeksiyon işlemi yapılmış ve hücre pelletlerinden protein izolasyonu yukarıda anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Optimizasyon sonucu belirlenen miktarda (50 µg) proteinler jele yüklenmiştir. Western blot işlemi sonucu oluşan protein bantlarının büyüklüğü (Şekil 3.14), İmaj-J' de belirlenmiş ardından excel de değerler β-Aktin protein bantlarına oranlanarak normalize edilmiş ve densitometrik analizleri yapılmıştır. Densitometrik olarak analiz edilerek elde edilen değerler excele aktarıldı ve grafikler oluşturuldu. Bu analiz sonucunda SMAD2, SMAD3 ve SMAD4' ün transfekte edildiği deneyde ektopik olarak protein seviyesinde kontrol grubuna göre artış olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 3.15).



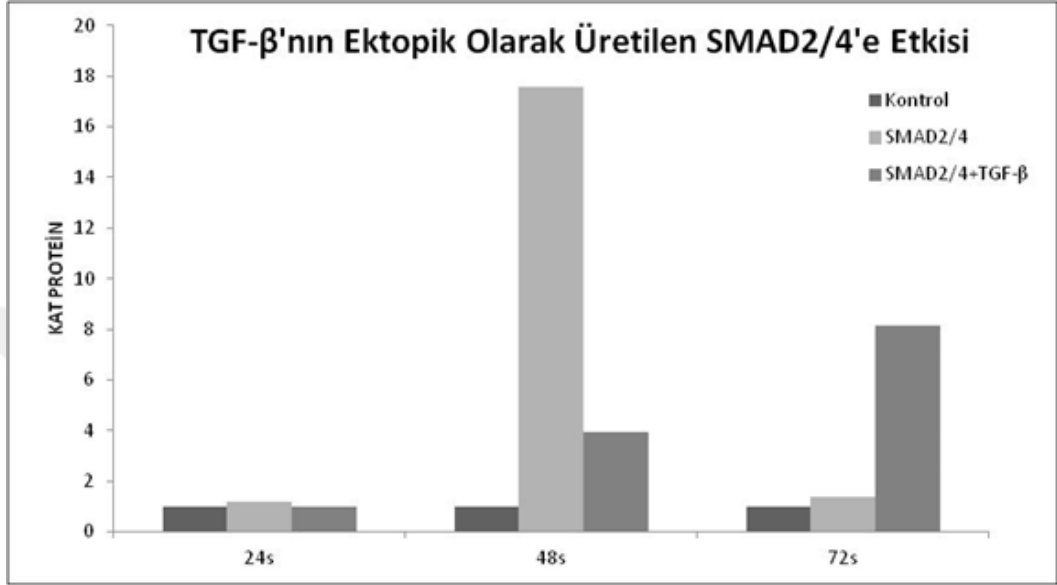
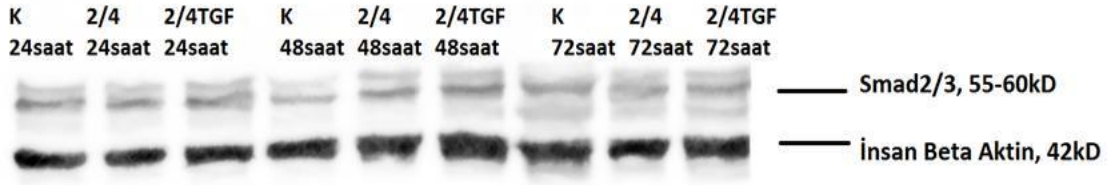
Şekil 3.14: Westernde kullanılacak protein miktarı için optimizasyon deneyi.



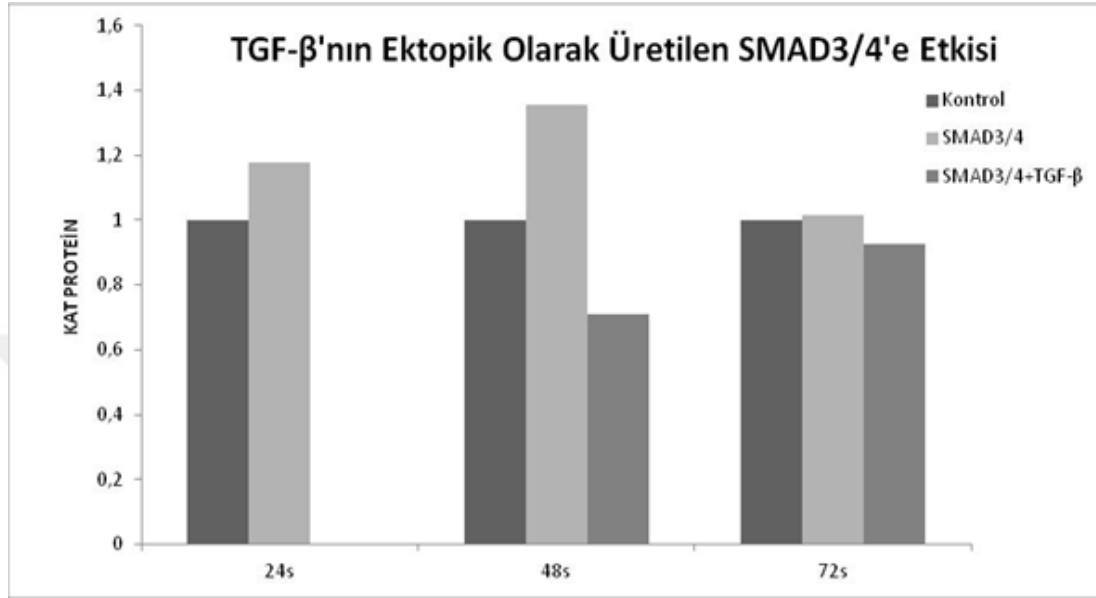
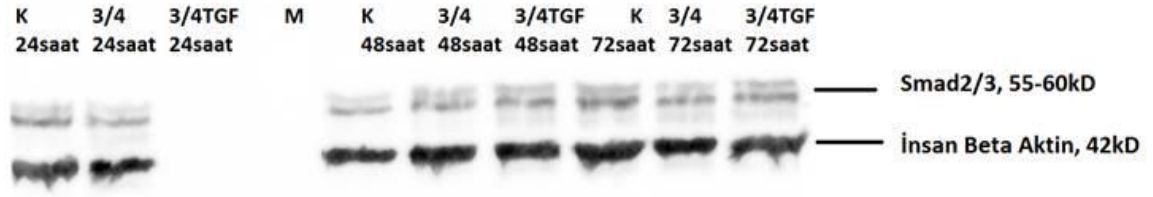
Şekil 3.15: SMAD 2-3-4 transfekte edilmiş HEP3B hücrelerinde SMAD ve β -aktin proteinlerinin densitometrik analizi .

Ektopik ekspresyonun protein seviyesinde de kontrol edilmesinden sonra TGF- β sitokininin ektopik olarak üretilen transkripsiyon faktörleri olan SMAD'lara olan etkisi de ayrıca araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre SMAD2 ve SMAD4' ün ayrıca TGF- β sitokininin uygulandığı koşullarda SMAD2/4' ün protein miktarına TGF- β 'nın özellikle 48 saatte azaltıcı bir etki gösterdiğini görmekteyiz (Şekil 3-16). Bu sonuçlar mRNA seviyesinde gösterdiği sonuçlardaki korelidir.

SMAD3 ve SMAD4' ün ayrıca TGF- β sitokininin uygulandığı koşullarda SMAD3' ün ektopik ekspresyonuna TGF- β 'nın etkisine baktığımızda 48 ve 72 saatlerde bir miktar azalmaya sebep olmuştur (Şekil 3-17). mRNA düzeyinde gösterdiği etki ile uyumludur.



Şekil 3.16: SMAD2/4 transfekte edilen ve TGF-β sitokini uygulan hücrelerde SMAD2/4 ve İnsan Beta Aktinin protein etkisinin jel görüntüsü ve densitometrik analiz sonucu.



Şekil 3.17: SMAD3/4 transfekte edilen ve TGF- β sitokini uygulan hücrelerde SMAD3/4 ve İnsan Beta Aktinin protein etkisinin jel görüntüsü ve densitometrik analiz sonucu.

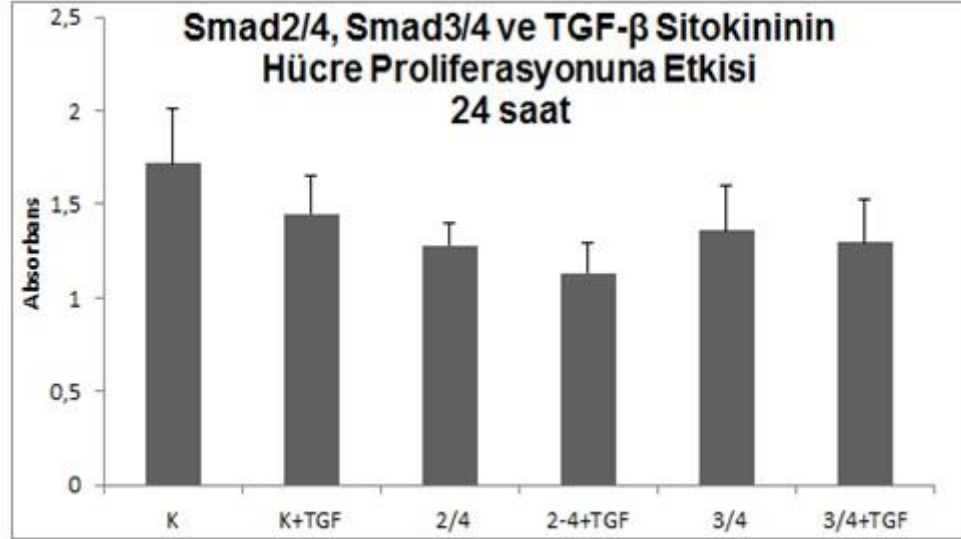
3.2 Ektopik olarak Üretilen SMAD Transkripsiyon Faktörlerinin ve TGF- β Uygulamasının Hep3B Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

Transfekte edilen vektörlerin, hücrede ektopik olarak üretilen proteinlerin hücre proliferasyonuna olan etkisinin araştırılması amacıyla MTT testi uygulandı. MTT yöntemiyle bir hücre topluluğundaki canlı hücrelerin oranı kolorimetrik yöntemle kantitatif olarak saptanabilmektedir.

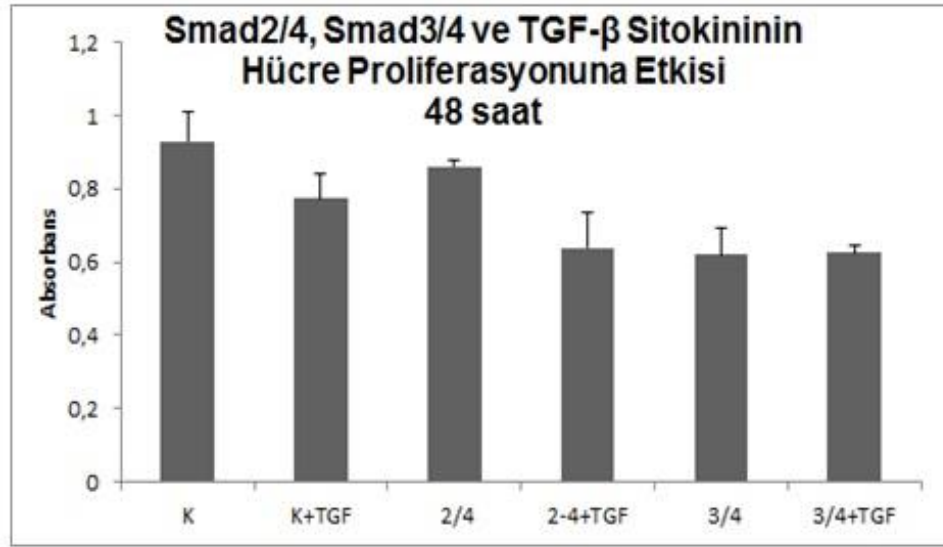
Transfeksiyon için hücreler 1 gün önceden 96 kuyulu plakalara 50.000/kuyu olacak şekilde paylaştırıldı. 45 μ l son hacimde; 2 M CaCl₂ solüsyonu ilave edilerek hücrelere SMAD2 ile SMAD4 ve SMAD3 ile SMAD4 içeren rekombinant plazmitler ile birlikte transfeksiyon etkinliğinin ve başarısının analizi amacıyla 0,5 μ g pMETLuc kontrol vektörü de transfekte edildi. Karışımın üzerine toplam hacim

içerisinde 45µl 2 X HEPES damla damla eklendi ve presipitasyonun oluşması için yarım saat beklendi. Sürenin sonunda presipitasyon oluştuktan sonra karışım her bir kuyuya 9 µl olacak şekilde damla damla eklendi. Hücreler 6 saatlik inkübasyon için CO₂' li inkübatöre kaldırıldı. Sürenin sonunda kuyulardan medyum uzaklaştırılarak tüm kuyulara %0,1' lik BSA içeren medyum konuldu ve 1 saat sonra her kuyuya 500 Ü/ml TGF-β sitokini uygulandı. Sonraki çalışmalarda sitokin de çalışıldığı için bu gruba sitokin deneyi de dahil edilmiştir.

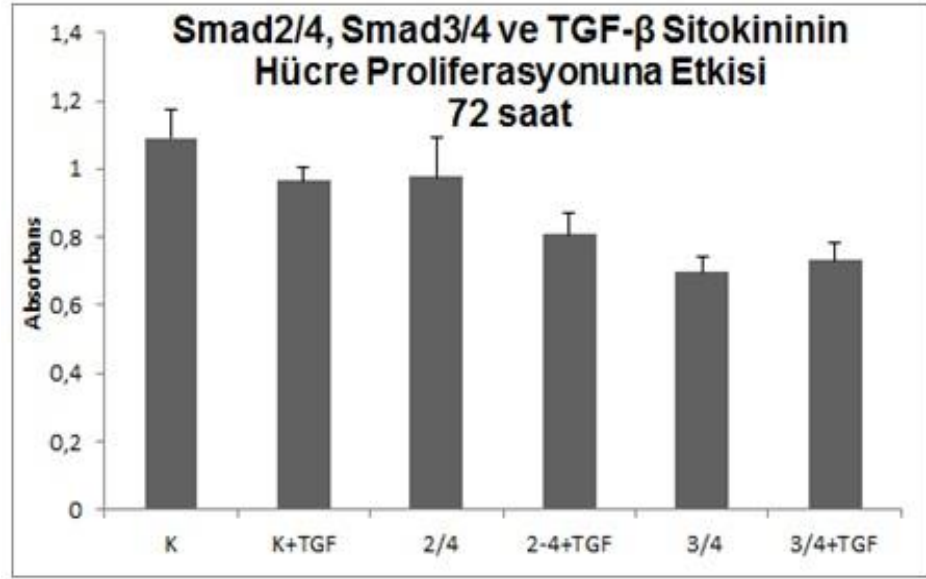
Uygulamadan 24, 48 ve 72 saat sonunda sonuçlar değerlendirilmiştir. Hep3B hücrelerine yapılan transfeksiyonlar ve sitokin uygulamaları kontrol grubuyla karşılaştırıldığında hücreleri etkilememektedir ancak bu istatistiki olarak anlamlı değildir. Şekil 3.18' de 24 saat sonuçları incelendiğinde SMAD 2/4 ve 3/4 transfekte edilen hücrelerde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında azalma gözlenmektedir ancak bu istatistiki olarak anlamlı değildir. Şekil 3.19' da ise 48 saat sonuçları incelendiğinde SMAD2/4 transfekte edilen grupta kontrol grubu ile karşılaştırıldığında etki yokken SMAD3/4 transfekte edilen grupta kontrol grubuna göre azalma vardır. Şekil 3.20' de ise 72 saat MTT sonuçları incelendiğinde yine SMAD2/4 transfekte edilen grupta kontrol grubu ile karşılaştırıldığında etki yokken SMAD3/4 transfekte edilen grupta kontrol grubuna göre azalma vardır.



Şekil 3.18: SMAD2/4 ve SMAD3/4 transfekte edilen ve TGF-B uygulanan hücrelerde bu uygulamaların Hep3B hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin analizi 24 saat.

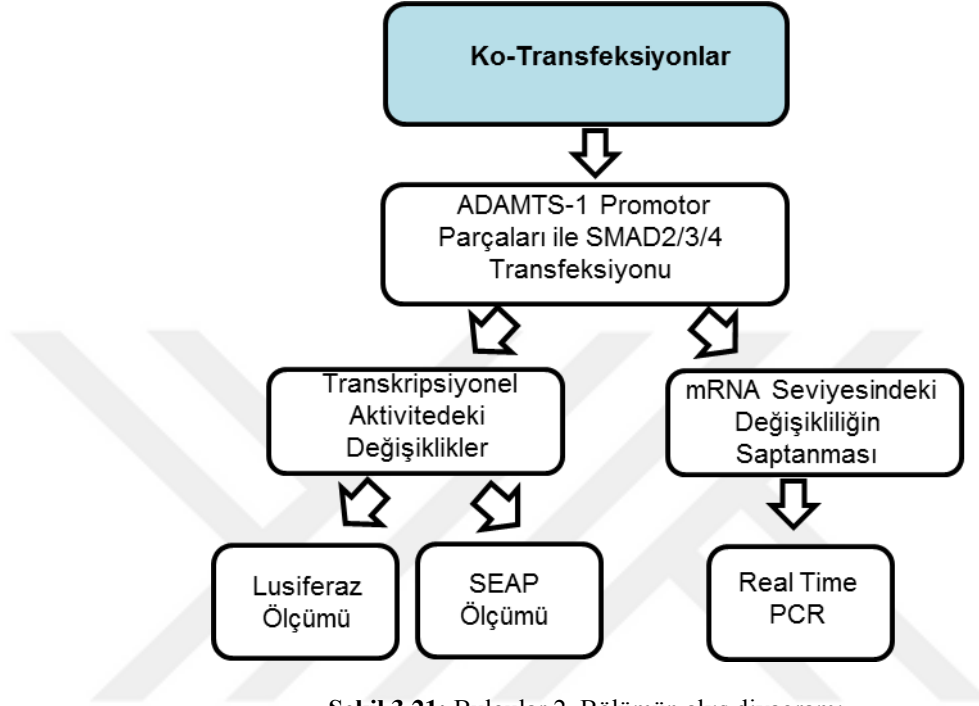


Şekil 3.19: SMAD2/4 ve SMAD3/4 transfekte edilen ve TGF-B uygulanan hücrelerde bu uygulamaların Hep3B hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin analizi 48 saat.



Şekil 3.20: SMAD2/4 ve SMAD3/4 transfekte edilen ve TGF-B uygulanan hücrelerde bu uygulamaların Hep3B hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin analizi 72 saat.

3.3 Ko-Transfeksiyon Deneyleri (ADAMTS1 Promotor Parçasını içeren Vektörler ve SMAD Ekspresyon Vektörlerinin birlikte Transfeksiyonu)

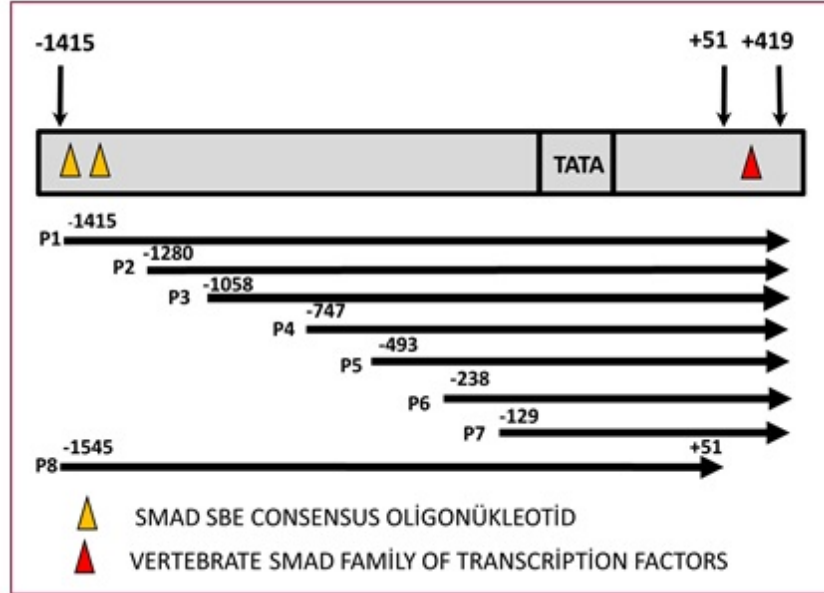


Şekil 3.21: Bulgular 2. Bölümün akış diyagramı.

Transfeksiyon analizlerinde kullanılacak 7 promotor parçaları, Hatipoğlu ve arkadaşlarınca tarafımıza bağışlanmıştır. Bu çerçevede bizim klonladığımız promotor parçasıyla elimizde 8 adet farklı promotor bölgeleri içeren promotor parçaları bulunmaktadır. Bizim klonladığımız bölge Hatipoğlu ve arkadaşlarınca oluşturulmuş parçalardan farklı olarak 5' ucundan ilave 3' ucundan da eksik bölgeler bulunmaktadır. Şekil 3.22' de temsili olarak promotor parçalarının uzunlukları görülmektedir.

ADAMTS1 promotörü üzerinde SMAD bağlanma bölgelerinin ve bazı transkripsiyon faktörlerinin lokalizasyonunu belirlemek amacıyla ADAMTS1 promotor dizisi TF-Binding MATİNSPECTOR veri programında analiz edildi. Bu analiz sonucunda SMAD' ların muhtemel bağlanma bölgeleri tespit edildi. Bu bağlanmaların P1:1834 bç (-1415/+419) ve P7: 548 bç (-129/+419) promotor parçalarında olduğu gözlemlendi (Şekil 3.22). Ko-transfeksiyon deneylerinde bu amaçla

tüm promotor parçaları değil SMAD bağlanma bölgesi taşıyan P1 ve P7 promotor parçaları kullanılmıştır. Ayrıca bu bağlanma bölgelerine spesifik EMSA primerleri dizayn edilmiştir (Tablo 2.14).



Şekil 3.22: Promotor (P) Parçalarının temsili şekli.

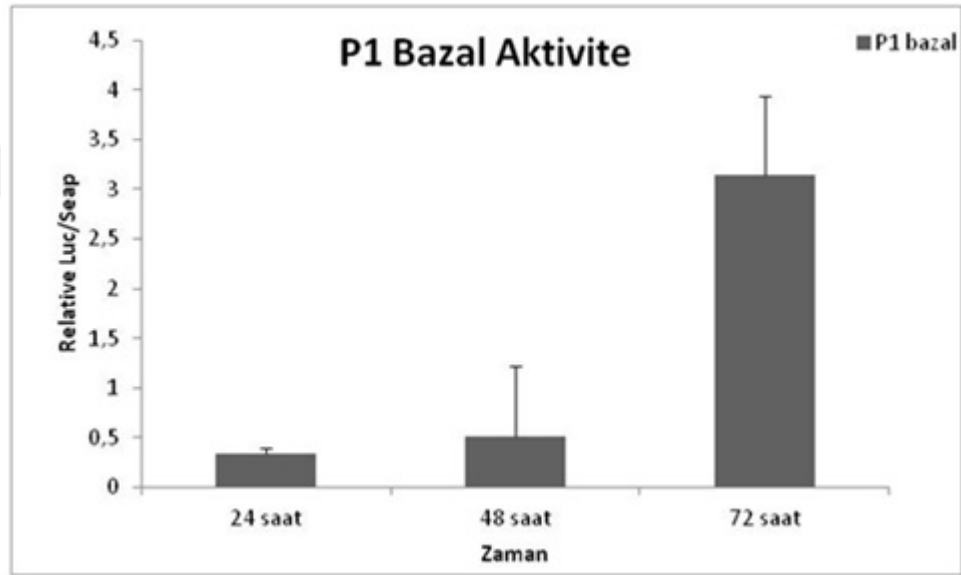
(P1: 1834 bç (-1415/+419), P2: 1699 bç (-1280/+419), P3: 1058 bç (-1271/+419), P4: 1166 bç (-747/+419), P5: 912 bç (-493/+419), P6: 657 bç (-238/+419), P7: 548 bç (-129/+419) ve P8: 1596 bç (-1545/+51))

İnsan ADAMTS1 promotor parçalarının fonksiyonel aktivitelerinin belirlenmesi için hepatoma (Hep3B) hücrelerine kalsiyum fosfat prespitasyon metodu kullanılarak geçici transfeksiyon yapıldı. Promotor aktivitesini belirlemek için raportör gen olarak *Metridia longa* (marin copepod) lusiferaz geni içeren pMetLuc vektör sistemi kullanılmıştır.

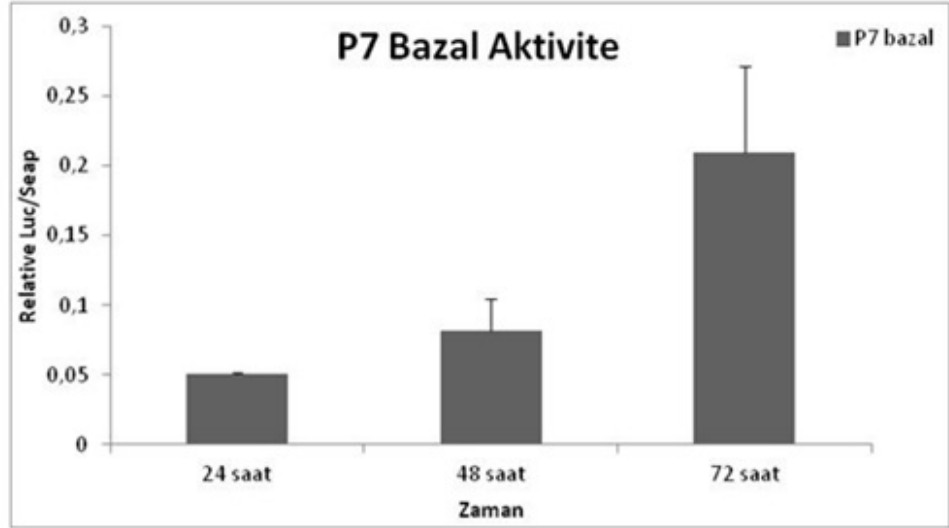
Öncelikli olarak ADAMTS1' in en kısa (P7) ve en uzun (P1) parçası olan promotor bölgelerinin bazal transkripsiyonel aktivitelerine bakılmıştır. Hücrelere 0,5 µg promotor parçaları içeren rekombinant plazmitler, SMAD ekspresyon vektörleri ile birlikte transfeksiyon etkinliğinin analiz edilmesi amacıyla 0,5 µg SEAP vektörü de transfekte edilmiştir. Bu işlemler Ca-P geçici transfeksiyon yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Lusiferaz ölçümlerinin kontrolü ve transfeksiyon etkinliğinin

kontrolü için pMetLuc Kontrol plazmiti ve salınan alkalın fosfataz aktivitesinin kontrolü için de SEAP Kontrol vektörleri pozitif kontrol olarak deneylerde kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak pMetLuc vektörü kullanılmasının nedeni, bu vektörün lusiferaz geninin önünde kontrol promotör taşıdığı için yüksek lusiferaz aktivitesi göstermesidir. Transfeksiyondan 24, 48 ve 72 saat sonra transfekte edilmiş hücrelerden medyum toplanarak bölüm 2.2.5.2 ve 2.2.5.3 belirtildiği şekilde lusiferaz ve alkalın fosfataz aktiviteleri ölçülmüştür. Lusiferaz aktivitesi SEAP aktivitesine oranlanarak sonuçlar normalize edilmiştir

Yapılan analizlere göre ADAMTS1 promotör parçası olan P1 ve P7' nin zamana bağlı olarak bazal aktivitelerinde artış olduğu gözlemlendi (Şekil 3.23 ve Şekil 3.24).



Şekil 3.23: 1834 bç (-1415/+419) Promotör parçasının Hep3B hücrelerinde bazal aktivitesi.



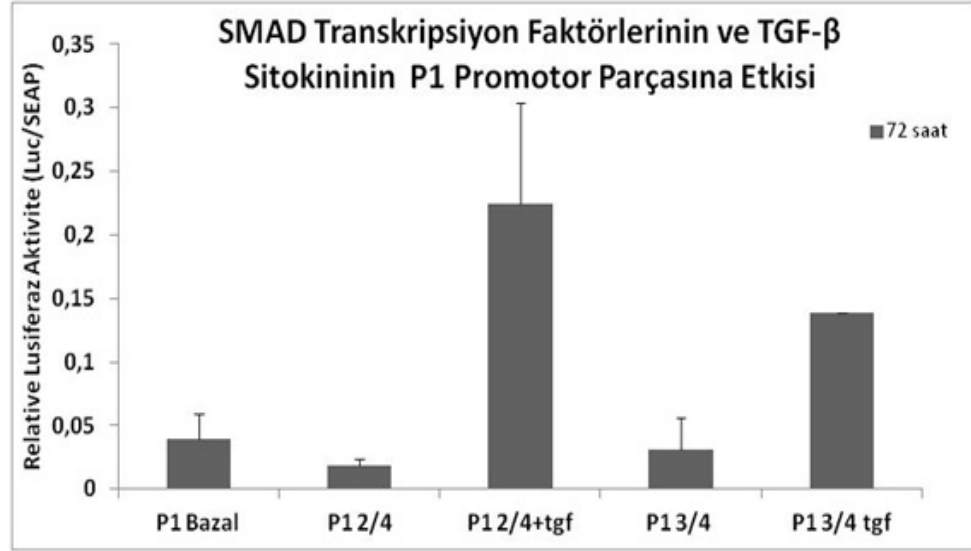
Şekil 3.24: P7: 548 bç (-129/+419) Promotor parçasının Hep3B hücrelerinde bazal aktivitesi.

Bazal aktivitelerdeki zamana bağlı artışın tespitinden sonra ko-transfeksiyon ve sitokin uygulanması deneylerine geçildi. Hücrelere 0,5 µg promotor parçaları içeren rekombinant plazmitler, SMAD ekspresyon vektörleri ile birlikte transfeksiyon etkinliğinin analiz edilmesi amacıyla 0,5 µg SEAP vektörü de transkrite edilmiştir. Ayrıca 500 Ü/ml TGF-β sitokini uygulanmıştır. P1 promotor parçası üzerinde SMAD transkripsiyon faktörleri ve TGF-β uygulaması 72 saat diliminde P1 bazal aktivitesi ile karşılaştırdığımızda transkripsiyonel aktiviteyi düşürmüştür ancak bu istatistik olarak anlamlı değildir (Şekil 3.25). Ayrıca TGF-β ve SMAD transfeksiyon sonuçları incelendiğinde bazal aktivite ile karşılaştırıldığında artış vardır.

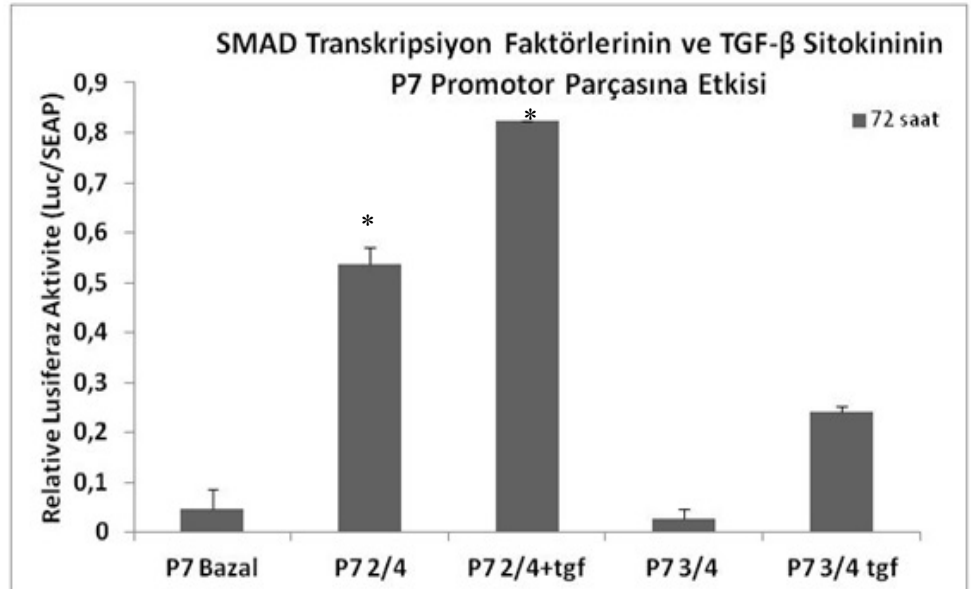
P7 promotor parçası üzerinde SMAD transkripsiyon faktörlerinin etkisini incelediğimizde ise özellikle SMAD2/4 transkripsiyon faktörleri ve TGF-β uygulandığında bazal aktivite ile karşılaştırdığımızda istatistiksel olarak anlamlı transkripsiyonel aktivitede artış görmekteyiz. SMAD3/4 uygulaması P7 promotor parçasının transkripsiyonel aktivitesini arttırmakta ancak TGF-β ile birlikte uygulandığı grupta ise bazal aktiviteye kıyasla arttırmakta fakat TGF-β uygulanmayan grupta karşılaştırdığımızda ise azaltıcı etki göstermektedir (Şekil 3.26).

P1 ve P7 sonuçları birlikte değerlendirildiğinde P7' nin SMAD 2/4' e cevap vermesi ancak büyük promotor arçasında aynı bölgenin bulunmasına rağmen cevap

vermemesi ise büyük promotor parçasında baskılayıcı transkripsiyon faktörlerinden dolayı etkiyi göremediğimiz şeklinde yorumlanmaktadır. P7 daha küçük ve bu bölge çıktığı için net etkiyi görüyor olabiliriz. Ayrıca P7’ de TGF- β ’ ya cevap görmemiz hem SMAD yolunun hemde farklı yolun kullanıldığını farklı mekanizmaların birlikte çalıştığını düşündürmüştür.



Şekil 3.25: SMAD2/4, SMAD3/4 ve TGF- β sitokininin ADAMTS1 P1(1834 bç) promotor parçasına olan etkisi.



Şekil 3.26: SMAD2/4, SMAD3/4 ve TGF- β sitokininin ADAMTS1 P7: 548 bç (-129/+419) promotor parçasına olan etkisi.

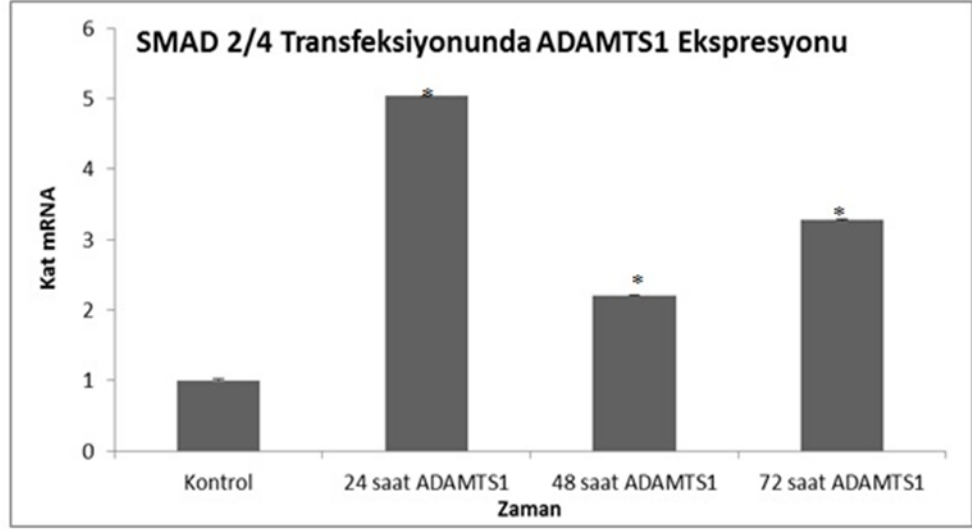
3.3.1 SMAD Vektörlerinin Transfeksiyonu ve ADAMTS1 mRNA Seviyesindeki Değişikliğin Belirlenmesi

SMAD vektörlerinin transfeksiyonu için HEP3B hücre hattına son hacimde 10 µg DNA yani 5 µg SMAD2 ile birlikte 5 µg SMAD4 ve 5 µg SMAD3 ile birlikte 5 µg SMAD4 ayrı flasklarda kalsiyum fosfat presipitasyon metoduyla transfeksiyon gerçekleştirildi. Uygulamadan 6 saat sonra besi yeri taze %0,1 BSA içeren medium ile değiştirildi. Uygulamadan 1 gün sonra TGF-β sitokini uygulandı. Transfeksiyon yapılmayan hücreler kontrol olarak kullanıldı. Transfeksiyon deneyleri 3 tekrarlı olarak çalışıldı ve birbirinden bağımsız 3 deney yapıldı. Kontrol grupları ile SMAD transfekte edilen gruplardaki cT değerleri insan beta-2 ile oranlanarak normalizasyon gerçekleştirildi. SMAD2/4 ve SMAD3/4' ün ADAMTS1 mRNA seviyesine olan etkisi istatistiksel olarak değerlendirildi.

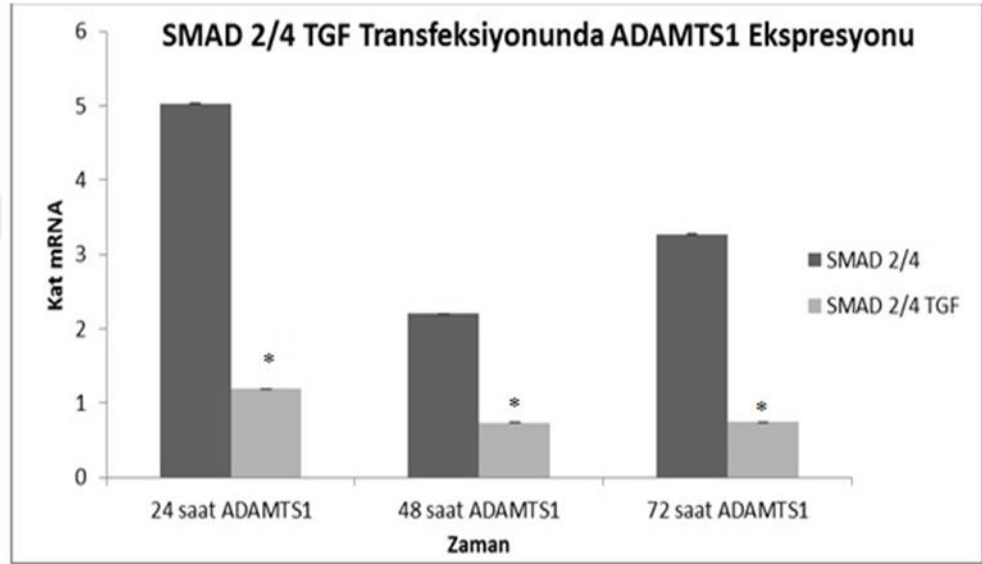
Ayrıca aynı kontrol ve deney grupları (SMAD Transfekte edilenler ve SMAD transfekte edilenler+TGF-β) kullanılarak ADAMTS1' in mRNA seviyesi de incelenmiştir. Öncelikli olarak SMAD transkripsiyon faktörü transfekte edilmeyen gruplar kontrol olarak kullanılmış ve SMAD transfekte edilen gruplardaki ADAMTS1 seviyesi ile karşılaştırılmıştır.

SMAD2 ve SMAD4'ün transfekte edildiği deney grubunda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında ADAMTS1 24, 48 ve 72 saatlerde artış göstermiştir özellikle 24 saatte kontrol grubuna göre 5 kat artmıştır (Şekil 3.27). TGF-β' nın SMAD2/4 transkripsiyon faktörlerinin ADAMTS1 üzerindeki etkisi birlikte incelendiği ise şekil 3.28' de görüldüğü gibi ADAMTS1 ifadesi tüm zaman dilimlerinde düşürülmektedir.

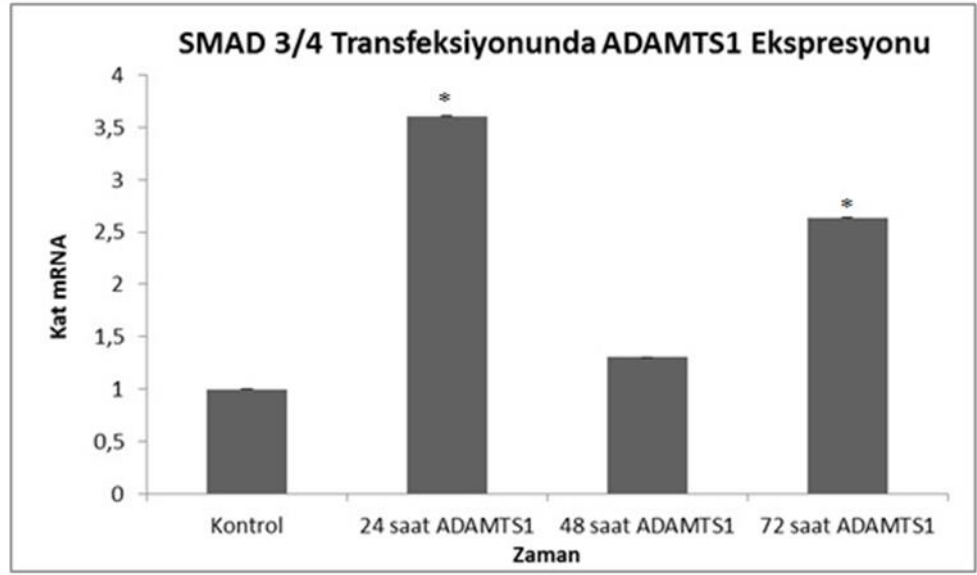
SMAD3 ve SMAD4'ün transfekte edildiği deney grubunda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında ADAMTS1 24, 48 ve 72 saatlerde artış göstermiştir özellikle 24 saatte kontrol grubuna göre 3,5 kat artmıştır (Şekil 3.29). TGF-β' nın SMAD3/4 transkripsiyon faktörlerinin ADAMTS1 üzerindeki etkisi birlikte incelendiği ise şekil 3.30' da görüldüğü gibi ADAMTS1 ifadesi 24 ve 72 saatte azalırken 48 saatte artmaktadır.



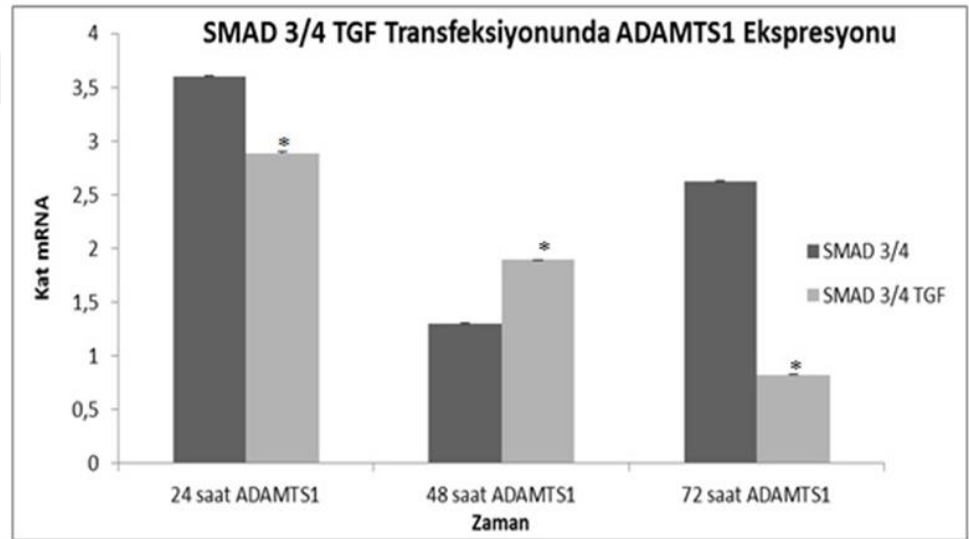
Şekil 3.27: SMAD2/4 transfekte edilen hücrelerde ADAMTS1 mRNA ekspresyonu.



Şekil 3.28: SMAD2/4 transfekte edilen ve TGF- β sitokini uygulan hücrelerde ADAMTS1 mRNA ekspresyonu.

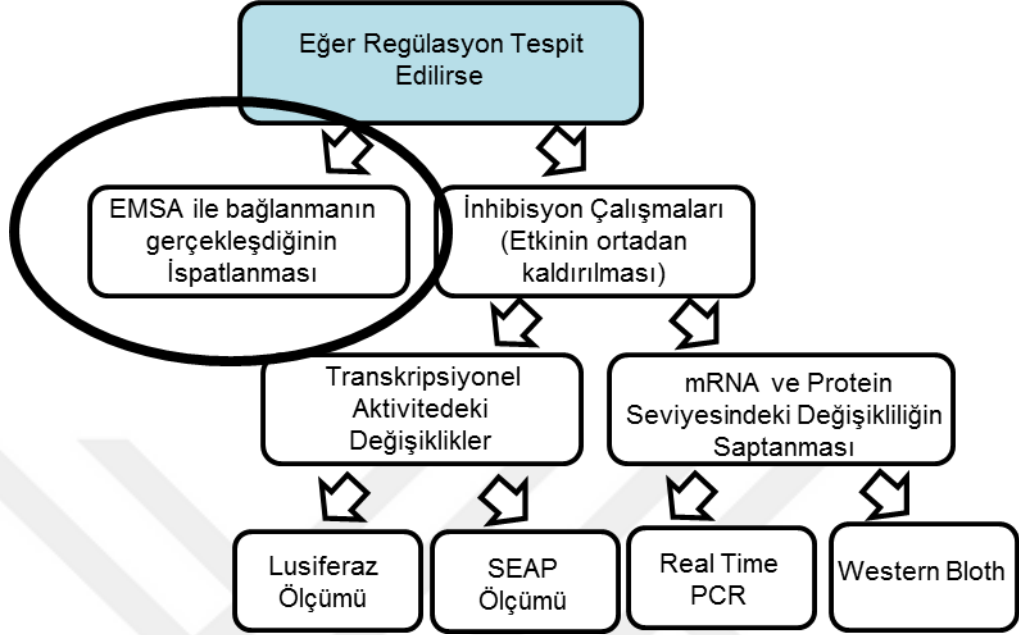


Şekil 3.29: SMAD3/4 transfekte edilen hücrelerde ADAMTS1 mRNA ekspresyonu.



Şekil 3.30: SMAD3/4 transfekte edilen ve TGF- β sitokini uygulan hücrelerde ADAMTS1 mRNA ekspresyonu.

3.4 EMSA



Şekil 3.31: Bulgular 3. Bölümün akış diyagramı.

İnsan ADAMTS1 promotoruna bağlanması muhtemel transkripsiyon faktörleri biyoinformatik analizlerle belirlenmiştir (Şekil 3.32). Bu çalışma kapsamında regülasyonunu aydınlatmaya çalıştığımızda SMAD transkripsiyon faktörlerinin ADAMTS1 promotorunda ilgili bölgeye bağlanıp bağlanmadığının belirlenebilmesi amacıyla EMSA çalışmaları yapıldı. Ayrıca yine ADAMTS1 promotor bölge üzerinde biyoinformatik analizlerle belirlenen transkripsiyon faktörlerinden Sp1, Usf, C/EBP ve Ap1' in işaretli problemleri kullanılarak EMSA yarışma deneylerine dahil edilmişlerdir.

-1415 **GACGTGTGGGAGAACTAGAA**GGGACGCTTCTGGCTGGGGCCAACTGAAGT

-1365 GGGGA**AGATCTG**GGGAGGAGCGAGGAAAGGACCC**AGATCT**ACTTGGAGCCAACCAAGAGA
 SMAD SBE CONSENSUS OLIGONÜKLEOTİD SMAD SBE CONSENSUS OLIGONÜKLEOTİD

-1305 CCGGACGGGAGTGGGGCGGAAAGGC**GGAGACCAGTTCGAGCACTA**ACGCGGGGGCGCGCG
 KLF7 KLF6

-1245 AGTGTGAGGGTTGCGGGTCCGCCCGGGCTAGGGCGGTCGCTCTCGCCATTGTCCCCGCG
 SP1/GC

-1185 GCTTTCGCCTGTGAAAC**ACGTCCCTTCCCTCTGGGTCCTTGAGCCCCCTCCACTTTTTTGA**
 SP1/GC

-1125 GAGAAGAGCCACTCAGTTTTTTTTTCTTAAGGACCTGTTGGTGGACCTCTCCTCGCTTTTCG
 SP1/GC C/EBP

-1065 TAACGCG**GATATAGCCTTTTCCCTTCT**GGTAGGAAGAGGAAGGAGGGGTCCGGGAAGGA
 C/EBP STAT3 SP1/GC

-1005 AGCCGATTTCTTCTTTCCCCCTCTGCACGCTTGCTAGCCCCAGCGATCGCTGCTGGCC

-945 CCGGGTAGGAAAGTGGGGTTCCTGGCCGTTTCTGCGACGCTGGCCTAGGGCTTGCAGCTG
 C/EBP

-885 CTGTTGAGTGAAAGCACGCAGACTGGCGGGAGCCGATCATTTCTCGAATGAAGAAGAAAA

-825 AGCGCAATTCCTCCTTATGCTCTAGGGAATTGAGCCGCTCCAGATCACCCATTCCAG

-765 AAATGTGAAACCGGGCCCTCACAAAGTCGTCTCTGGTGAAGAGGTGGCGTGCGGGGTGGG
 AP1

-705 GGTTGGTGGAGGGTGAAGGCATAAGCAAACATATTTTAAAAATCCAGATCGTAGGAAGTGT
 KLF USF

-645 CACCTGGCCCCCTCACCCAGGCATGCTTTCTGGGGGAAGCGCAGGGCCAAGCTTTCCCTAG
 C/EBP STAT5B SP1/GC

-585 AAAAGCTGGGGCGAAGAGAGAGCAGGCGGGGCTAAGGAGCTCCTGGCAGGCTGGGAAGG

-525 TGGAGAAGTGGGGTGGAGGTATTTTCTAGAAA**GTGTAGCCCTAGCTCATCTC**CTAGATTG

-465 GGGAAAGAGGGAAGTGGAGGGAGGAGGGAAGGAGACCCAGGGCAGCTCCAGGATAGGGAAAT

-405 GTTGAAGAAGGGACTGCGTTCTCCAACCGAACCTCCCTCCTGGGAACCGCAGCCCAGCG
 C/EBP

-345 CGGTAAGTGGATTACCGCAACCGGGCGGTGGGGAGGAAGGGTGGTCCAGGAAACCGGCGA
 C/EBP AP1 KLF15

-285 GGGAGAAAAGCGGTGGAAGGGAGAGTCTTCTCCCTGGAGCGGCCCCA**GCAGTACAAAGTG**

-225 CTGGTCACAGCGCCCTTCCGCCCTAGATTGACGAGCAGTGGCGTGGAGCCAGCGCGGA

SP1/GC

-165 GGCTGCCCCCTCCCCCTCCCGAGCCCGCAGCGCGGA**GCGCGGTTTAGCACCAAC**GGAGCC
KLF6

-105 GGGGGCGGCGTCTTTGGGATGGAAAAGGGCCAAAGGGGAGGAGTGGGGTGGGGGTGGGGG
SP1/GC KLF15

-45 TTTCACTGGTCCAC**TATA**AAAGGACCGCTCGGCTGCCCGTTCTT**G**CACTCGCTGGAAAG
SP1/GC TATA KUTUSU +1

+16 CGGCTCCGAGCCAGGGGCTATTGCAAAGCCAGGGTGCCTACCGGACGGAGAGGGGAGAG
SP1/GC SP1/GC

+76 CCCTGAGCAGAGTGAGCAACATCGCAGCCAAGGCGGAGGCCGAAG**AGGGGCGCCAG**GCAC
SMAD FAMILİY

+136 CAATCTCCGCGTTGCCTCAGCCCCGGAGGCGCCCCAGAGCGCTTCTTGTCCAGCAGAGC
C/EBP

+196 CACTCTGCCTGCGCCTGCCTCTCAGTGTCTCCAACCTTTGCGCTGGAAGAAAACTTCCCG

+256 CGCGCCGGCAGAAGTGCAGCGCCTCCTTTTAGTGACTCCGGGAGCTTCGGCTGTAGCCGG
C/EBP KLF

+316 CTCTGCGCGCCCTTCCAACGAATAATAGAAATTGTTAATTTTAACAATCCAGAGCAGGCC
STAT6 FAST1-SMAD

+376 AACGAGGCTTTGCTCTCCCGACCCG**AACTAAAGGTCCCTCGCTC** +419

Şekil 3.32: -1415/+419 insan ADAMTS-1 promotörü üzerinde yer alan muhtemel transkripsiyon faktörlerinin bağlanma dizileri ve lokalizasyonları.

EMSA çalışmaları için nükleer ekstraktlar Bölüm 2.2.8.2’ de belirtilen şekilde tablo 2.15’ deki bileşenler kullanılarak hazırlandı. ADAMTS1 problemleri bölüm 2.2.8.3’ de anlatıldığı şekilde biyotin ile ileri prob ile geri prob işaretlendi ve bölüm 2.2.8.4’ de belirtildiği şekilde tüplerde çift zincirli hale getirildi. EMSA çalışmalarında kullanılan primerler Tablo 3.6’ da verilmiştir. Bu primerlerden biyotin ile işaretli olanlar yıldız ile belirtilmiştir.

Tablo 3.6: EMSA çalışmalarında kullanılan primer dizileri.

ADAMTS1 (+106+166) F*	GGCGGAGGCCGAAGAGGGGCGCCAGGCACC AATCTCCGCGTTGCCTCAGCCCCGGAGGCG
ADAMTS1 (+106+166) R*	CCGCCTCCGGCTTCTCCCCGCGGTCCGTGGTT AGTGGCGCAACGGAGTCGGGGCCTCCGC
ADAMTS1 (-1365-1305) F*	GGGAAGATCTGGGGAGGAGCGAGGAAAGG ACCCAGATCTACTTGGAGCCAACCAAGAGA
ADAMTS1 (-1365-1305) R*	CCCCTTCTAGACCCCTCCTCGCTCCTTTCCTG GGTCTAGATGAACCACGGTTGGTTCTCT

Bağlanma reaksiyonlarında Hep3B SMAD2/4, SMAD3/4 ve hiçbir şey transfekte edilmeyen kontrol Hep3B hücrelerine ait nükleer ekstrakt kullanıldı. Gerekli diğer bileşenler de bölüm 2.2.8.5' te belirtildiği konsantrasyonlarda reaksiyon tüpüne eklendi. 10 dakika buzda inkübe edildikten sonra oda sıcaklığında 20 dk inkübasyona bırakıldı ve bağlanma reaksiyonları denatüre olmayan jele yüklenerek 90 V, 400 mA akımda yürümesi sağlandı. Daha sonra naylon membrana transfer edildi. Proteinlerin membrana sabitlenmesinden sonra (cross-link) membran bloklanarak HRP bağlı streptavidin ile işaretlendi. Komplekslerin görüntülenmesi amacıyla membran ECL ile muamele edilip, Fusion FX VILBER LOURMAT cihazında kompleksler görüntülendi. Bağlanma reaksiyonlarında Hep3B SMAD2/4, SMAD3/4 ve hiçbir şey transfekte edilmeyen kontrol Hep3B hücrelerine ait nükleer ekstrakt kullanıldı. Buna göre oluşan DNA-protein kompleksleri Şekil 3.33' de görülmektedir (Kompleks 1 (K1), Kompleks 2 (K2)).

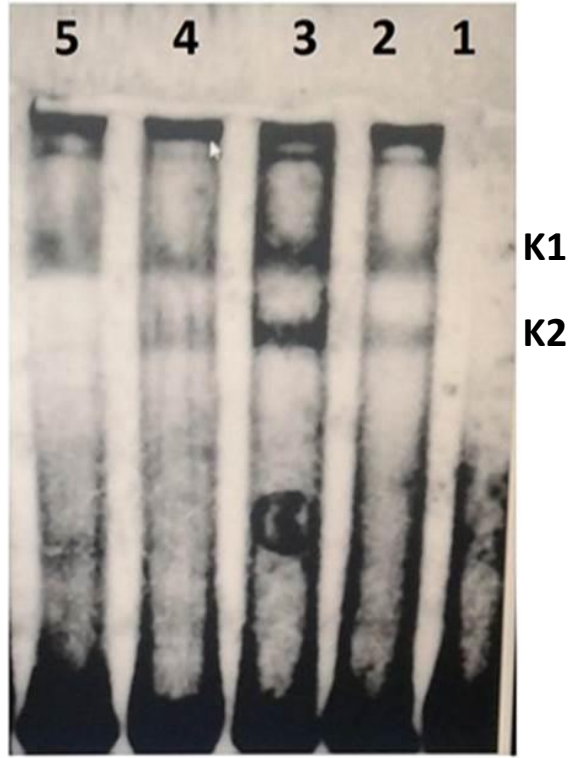
Şekil 3.33' deki sonuçlara göre; SMAD2/4 ve SMAD3/4 transfeksiyonu sonucu edinilen nükleer ekstraktlara ADAMTS1' in +106/+166 bölgesi için hazırlanan prob (muhtemel SMAD bağlanma bölgelerine göre dizayn edilen) ile muamelesi sonucu bu faktörlerin buraya bağlandığı tespit edilmiştir (Şekil 3.25, 2-3 ve 4 numaralı kuyular). Ayrıca kontrol amaçlı kullanılan Hep3B nükleer ekstraktına göre de Sma2/4 transfekte edilerek hazırlanan nükleer ekstrakt bölgeleri karşılaştırıldığında kompleks 1 ve 2 de artış gözlenmiştir (Şekil 3.33, 2 ve 3 kuyular karşılaştırılmalı). Aynı deneyde yarışma deneyleri de yapılmıştır. ADAMTS1'in

+106/+166 probu 1000 kat oranında biyotin işaretsiz olarak kullanılmıştır. Biyotinsiz prob konsantrasyonları biyotinli problara göre 1000 kat fazla olacak şekilde tüplere eklendi. Gerekli diğer bileşenler de bölüm 2.2.8.5’ de belirtildiği konsantrasyonlarda reaksiyon tüpüne eklendi. Şekil 3.33 de 5.kuyu incelendiğinde görülmektedir ki K2 kaybolmuştur. Bu da bize gerçekten bu bölgenin SMAD bağlanma bölgesi olduğunu düşündürmüştür.



<u>5</u>	<u>4</u>	<u>3</u>	<u>2</u>	<u>1</u>	
+	+	+	+	+	ADAMTS1 prob (+106/+166)
-	-	+	-	-	SMAD2/4 Nükleer Ekstrakt
-	+	-	-	-	SMAD3/4 Nükleer Ekstrakt
+	-	-	+	-	Kontrol (Hep3B) Nükleer Ekstrakt
+	-	-	-	-	Biyotinsiz prob (1000 kat)
-	-	-	-	-	ANTİKOR

106



Şekil 3.33: ADAMTS1 SMAD bağlanma bölgesine göre yapılan '+106/+166' ADAMTS1 promotör bölgesinin EMSA sonucu (Yarışma deneyleri).

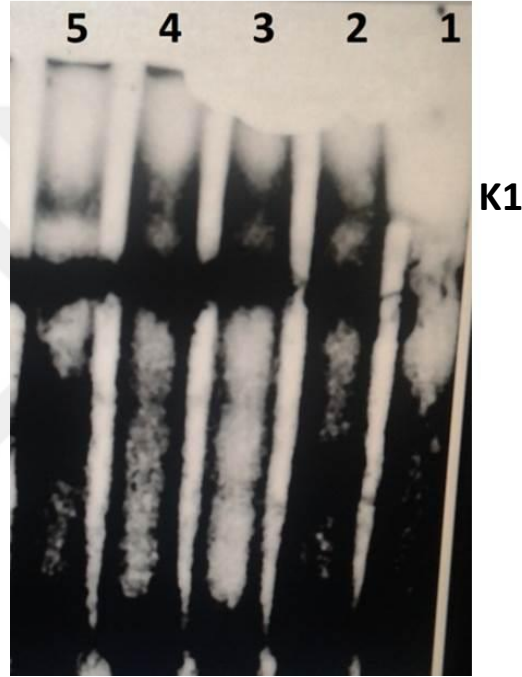
İkinci EMSA deneyinde diğer bağlanma bölgesi için hazırlanan prob ADAMTS1 prob (-1365/-1305) kullanılmıştır. Şekil 3.34' deki sonuçlara göre; SMAD2/4 ve SMAD3/4 transfeksiyonu sonucu edilen nükleer ekstraktlara ADAMTS1' in muhtemel SMAD bağlanma bölgelerine göre dizayn edilen spesifik primerler ile muamelesi sonucu bu faktörlerin buraya bağlandığı gösterilmiştir (Şekil 3.34 K1). SMAD2/4 ve SMAD3/4 transfeksiyonu sonucu edilen nükleer ekstraktlara

ve kontrol nükleer ekstrakta SMAD transkripsiyon faktörlerinin bağlandığı gösterilmiştir. Ayrıca kontrol amaçlı kullanılan Hep3B nükleer ekstrakta göre de SMAD2/4 transfekte edilerek hazırlanan nükleer ekstrakt bölgeleri karşılaştırıldığında kompleks 1 de artış gözlenmiştir (Şekil 3.34, 2 ve 3 kuyular karşılaştırılmalı). Aynı deneyde yarışma deneyleri de yapılmıştır. ADAMTS1' in -1365/-1305 1000 kat oranında biyotin işaretsiz olarak kullanılmıştır. Gerekli diğer bileşenler de bölüm 2.2.8.5' te belirtildiği konsantrasyonlarda reaksiyon tüpüne eklendi. Şekil 3.34' de 5. kuyu incelendiğinde görülmektedirki K1' de azalma meydana gelmiştir. Bu da bize gerçekten bu bölgenin SMAD bağlanma bölgesi olduğunu düşündürmüştür.



<u>5</u>	<u>4</u>	<u>3</u>	<u>2</u>	<u>1</u>	
+	+	+	+	+	ADAMTS1 prob (-1365/-1305)
-	-	+	-	-	SMAD2/4 Nükleer Ekstrakt
-	+	-	-	-	SMAD3/4 Nükleer Ekstrakt
+	-	-	+	-	Kontrol (Hep3B) Nükleer Ekstrakt
+	-	-	-	-	Biyotinsiz prob (1000 kat)
-	-	-	-	-	ANTİKOR

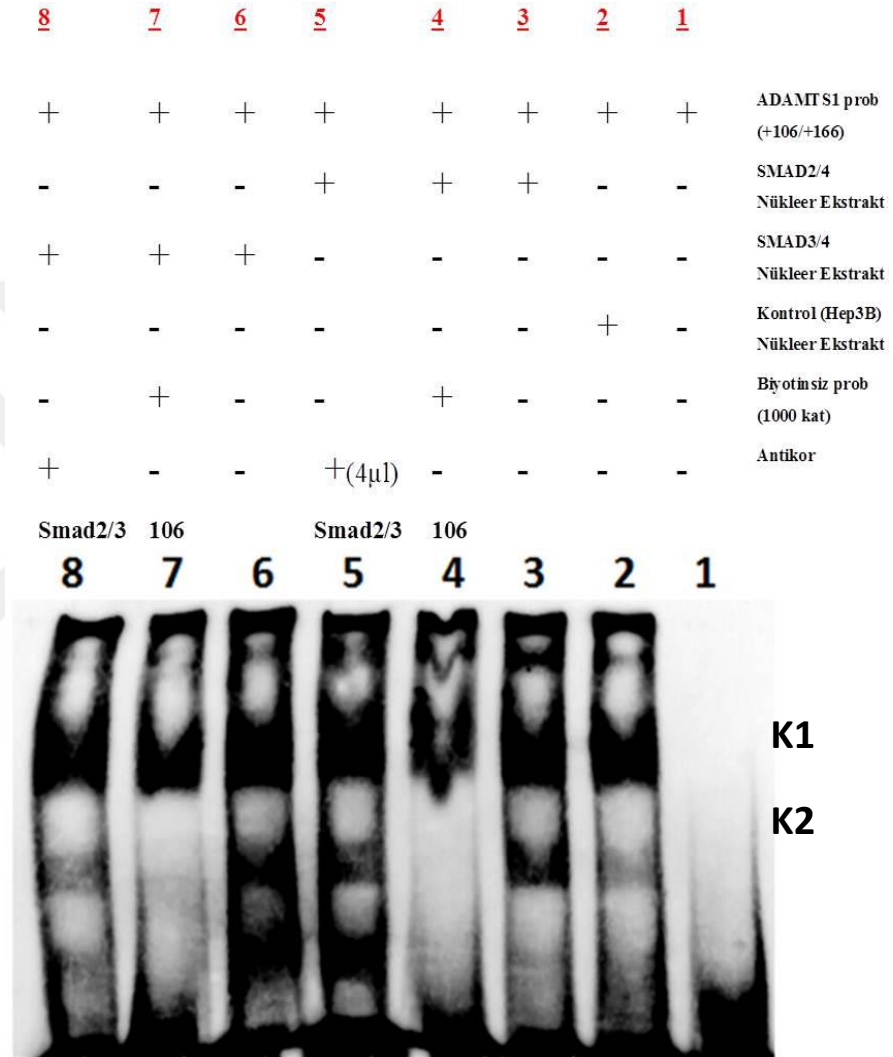
1365



Şekil 3.34: ADAMTS1 SMAD bağlanma bölgesine göre yapılan -1365/-1305 ADAMTS1 promotör bölgesinin EMSA sonucu (Yarışma deneyleri).

Son olarak SMAD transkripsiyon faktörleri için seçilen iki bağlanma bölgelerinin özgün olup olmadığının tespiti için SMAD antikorları ile supershift deneyleri yapılmıştır. Öncelikle ilk bölge (+106/+166 prob) için deneyler yapılmıştır. Şekil 3.35 incelendiğinde kuyu 2, kontrol nükleer ekstrakta göre kuyu 3 ve kuyu 6 karşılaştırıldığında yine görülmektedirki bağlanma kompleksleri güçlenmiştir (K1 ve K2). SMAD2/4 nükleer ekstrakındaki kompleksler ile supersift reaksiyonundaki kompleksler karşılaştırıldığında görülmektedirki K2 azalmıştır ancak daha büyük kompleks (supershift) yapısı ayırt edilememiştir. Çünkü yukarıda güçlü büyük bağlanmaların arasında kalmış olabilir (kuyu 2, 3, 5). SMAD3/4 nükleer

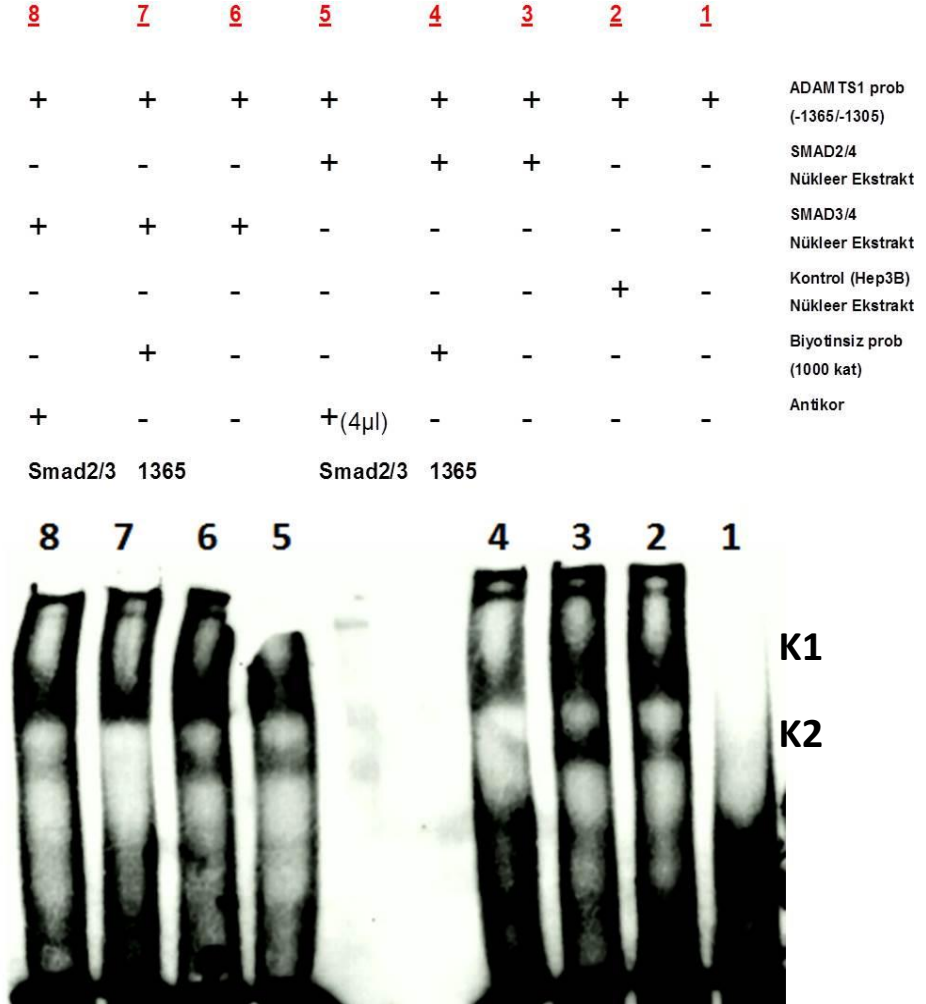
ekstraktındaki kompleksler ile supersift reaksiyonundaki kompleksler karşılaştırıldığında görülmektedirki K2 yine azalmıştır ancak daha büyük kompleks yapısı ayırt edilememiştir (kuyu 6 ve 8). Bunun sebebi oluşan komplekslerin güçlü olmasından dolayı supersift yapısı ayırt edilememektedir.



Şekil 3.35: ADAMTS1 SMAD bağlanma bölgesine göre yapılan '+106/+166' ADAMTS1 promotör bölgesinin supershift EMSA sonucu.

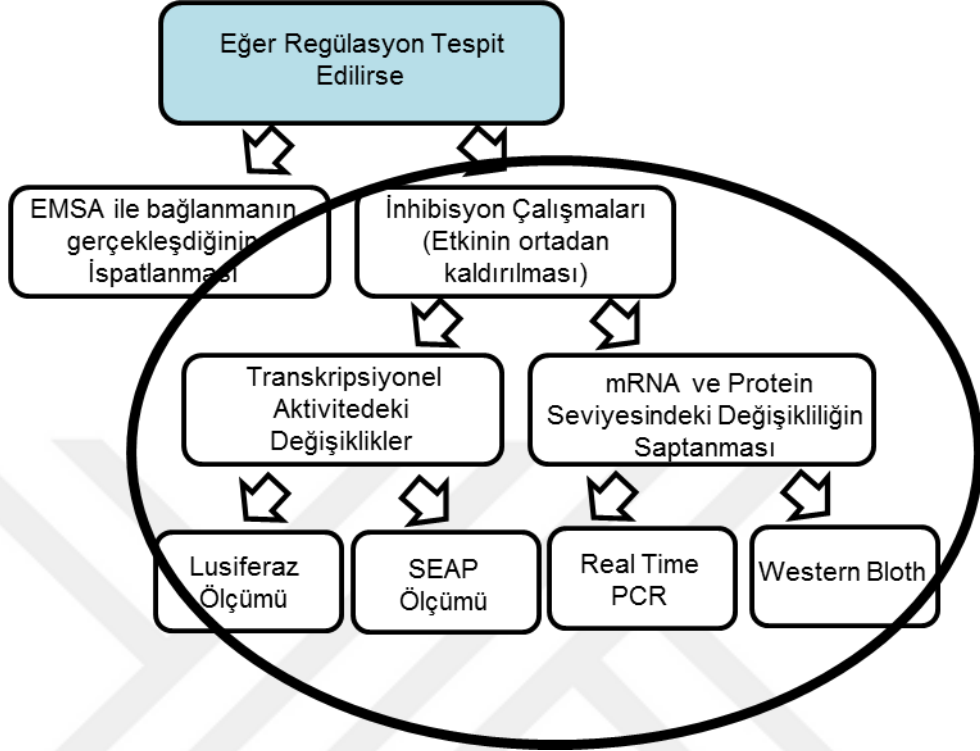
Son olarak yine SMAD transkripsiyon faktörleri için seçilen ikinci bölge (-1365/-1305 prob) için deneyler yapılmıştır. Şekil 3.36 incelendiğinde SMAD2/4 nükleer ekstraktındaki K2 kompleksinin kontrol nükleer ekstraktına göre daha güçlü olduğu gözlenmektedir (Kuyu 2 ve 3). Supersift reaksiyonundaki kompleksler karşılaştırıldığında görülmektedirki K2 azalmıştır ancak daha büyük kompleks yapısı

ayırt edilememiştir (kuyu 3 ve 5; 6 ve 8 karşılaştırılmalı). Bunun sebebi oluşan komplekslerin güçlü olmasından dolayı supershift yapısı ayırt edilememektedir.



Şekil 3.36: ADAMTS1 SMAD bağlanma bölgesine göre yapılan -1365/-1305 ADAMTS1 promotor bölgesinin supershift EMSA sonucu.

3.5 İnhibisyon Çalışmaları



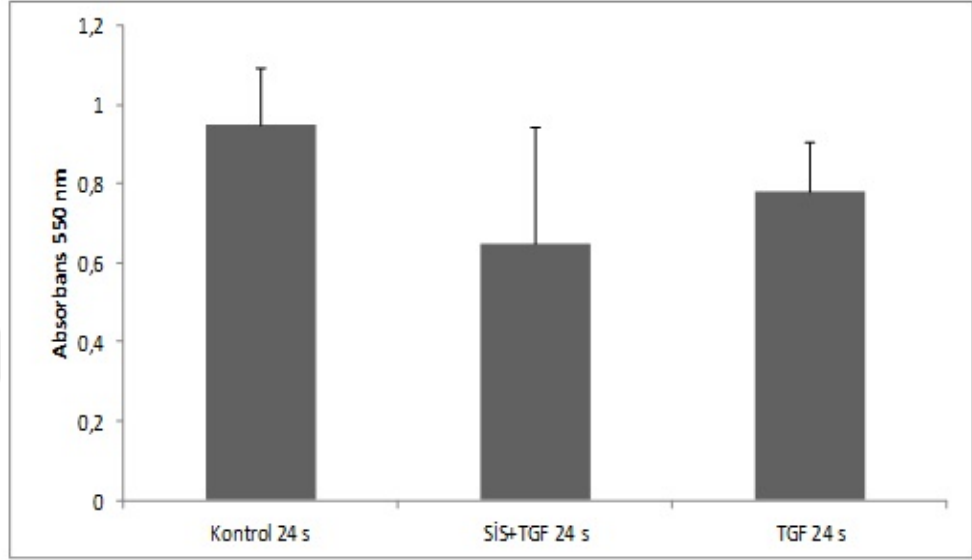
Şekil 3.37: Bulgular 4. Bölümün akış diyagramı.

EMSA çalışmaları ile spesifik olarak ADAMTS1 promotor parçalarına bağlandığı tespit edilen SMAD transkripsiyon faktörlerinin inhibisyon çalışmaları ile bu etkinin ortadan kaldırılmasına yönelik çalışmalar yapılmıştır.

3.5.1 Sis3 (SMAD İnhinbitörü) İnhibitörünün Hücre Proliferasyonuna Etkisi

İnhibisyon çalışmalarında kullanılan Sis3 inhibitörünün hücre proliferasyonuna olan etkisinin araştırılması amacıyla MTT testi uygulandı. Transfeksiyon için hücreler 1 gün önceden 96 kuyulu plakalara 50.000/kuyu olacak şekilde paylaştırıldı. 1 gün sonra hücrelerin tamamı %0,1' lik BSA içeren medyum konuldu ve 1 saat sonra son konsantrasyonda 3 μ M SİS3, 1 saat sonrasında ise 500 Ü/ml TGF- β sitokini uygulandı. 24 saat sonunda bölüm 2.2.4.3 de anlatıldığı gibi

MTT solüsyonu uygulandı ve absorbens değerleri ölçüldü. İnhibitör olarak uygulanan Sis3 inhibitörü Hep3b hücrelerine olan etkisi incelendiğinde Şekil 3.38 incelenebileceği gibi 24 saatte hücre proliferasyonuna istatistiki anlamda bir etkisi tespit edilememiştir.



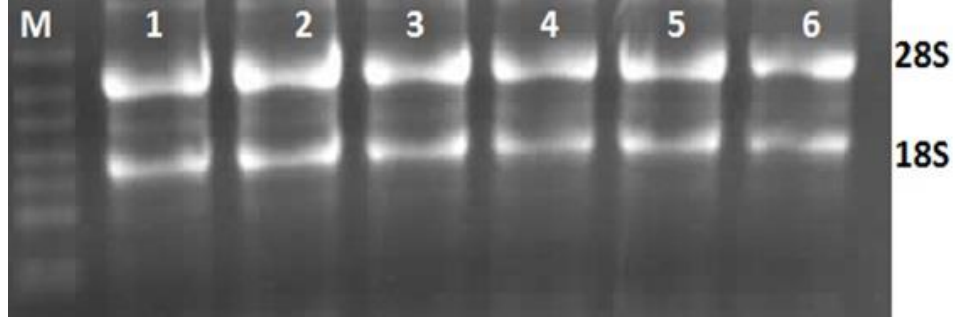
Şekil 3.38: İnhibisyon çalışmalarında kullanılan Sis3 inhibitörünün hücre proliferasyonuna olan etkisinin araştırılması 24 saat.

3.5.2 Sis3 İnhibitörünün SMAD ve ADAMTS1 mRNA Seviyesine Etkisi

İnhibisyon çalışmalarında kullanılan Sis3 inhibitörünün SMAD ve ADAMTS1 mRNA seviyesine olan etkisinin araştırılması için hücreler 25cm² lik flasklara bir gün önceden sayılarak eşit olarak paylaştırıldı. 1 gün sonra hücrelere son konsantrasyonu 3 µM olacak şekilde SİS3 (SMAD inhibitörü) uygulandı. Çalışmamızda TGF-β sitokinini de kullanacağımız için uygulamalara başlamadan önce hücreler %0,1 BSA içeren medyum içerisine alındı. İnhibitör uygulamasından 1 saat sonra TGF-β sitokini hücrelere 500 Ü/ml verildi.

6 saat ve 24 saat sonunda pelletler toplanarak Fermentas RNA izolasyon kiti ile izole edilerek Spektrofotometrede bölüm 2.2.6.2' de bahsedildiği gibi ölçümleri ve saflık analizleri yapıldı. Ardından 1 µg RNA kullanılarak bölüm 2.2.6.5' de anlatıldığı gibi cDNA sentezi gerçekleştirildi. Yapılan cDNA' ların kontrolü için

insan beta-2 primerleri ve koşulları ile PZR gerçekleştirildi. Sonuçlar elektroforez jelde yürütülerek UV ile görüntülendi.



Şekil 3.39: İnhibisyon deneyi RNA formaldehit agaroz jel görüntüsü.

(M: Büyüklük belirteci, 1: Kontrol 6saat, 2: TGF 6saat, 3: SİS+TGF 6saat 4: Kontrol 24saat, 5: TGF 24saat, 6: SİS+TGF 24 saat.)

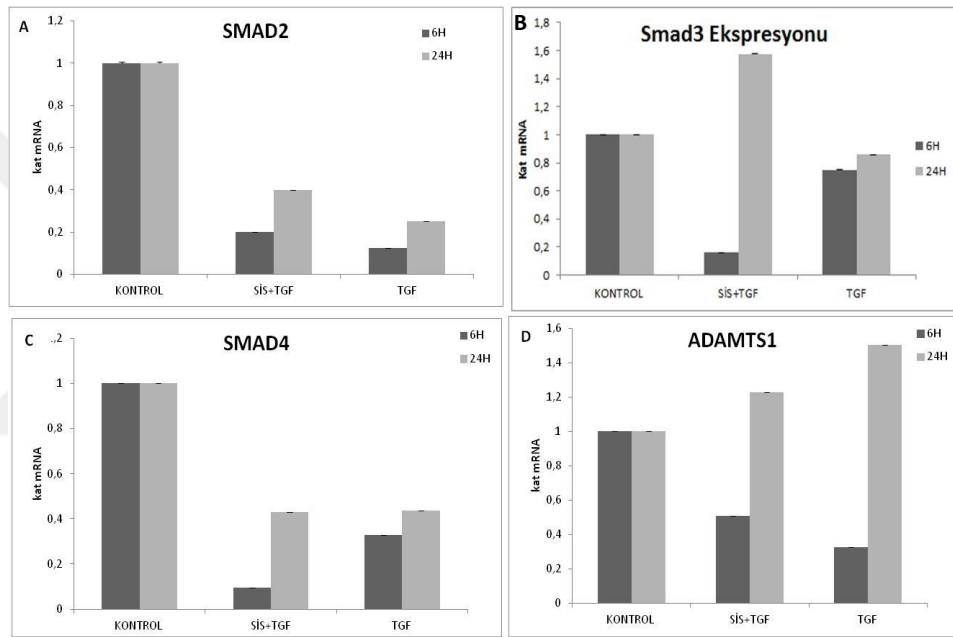


Şekil 3.40: İnhibisyon deneyinde kullanılan cDNA'ların kontrol PZR elektroforez görüntüsü.

(M; 1kb Marker, 1;SİS+TGF 6saat, 2; TGF 6saat, 3; Kontrol 6saat, 4;SİS+TGF 24 saat, 5;TGF 24saat, 6;Kontrol 24saat.)

Her deney seti için 3 tekrarlı olarak bölüm 2.2.6.8' de bahsedildiği şekilde gerçek zamanlı PZR kiti kullanılarak tablo 2.9' da belirtilen koşullarda gerçek zamanlı PZR yapıldı. Çalışmada farklı olarak VEGF (Vasküler endotelial büyüme faktörünün) de ekspresyon primerleri kullanılmıştır. Elde edilen Ct değerleri öncelikli olarak 3 tekrarlı çalışıldığı için her deney grubu için elde edilen değerlerin ortalaması alınmıştır, ardından tek bir kontrol olması hedeflendiği için her zaman

dilimine ait kontrol gruplarının ortalaması alınmıştır. Daha sonra kontrol genimiz olan Human- β -mikroglobulin-2 geninin cT değerleri ile bulunan cT değerleri Livak metoduna göre değerlendirilmiştir. Sonuçlar göstermektedirki sis inhibitörü başarılı bir şekilde SMAD transkripsiyon faktörlerini kontrol grubuna göre inhibe etmiştir (Şekil 3.41’ de A, B, C). ADAMTS1 seviyesine bakıldığında özellikle 6 saatte inhibitör uygulanmasının kontrol grubuna göre ADAMTS1 mRNA seviyesini istatistiksel olarak anlamlı seviyede azaltmıştır (Şekil 3.41D). Bu deneyde özellikle 6 saat göz önüne alınmalıdır çünkü inhibitörün etkisi mRNA seviyesinde erken dönemde görülmektedir.

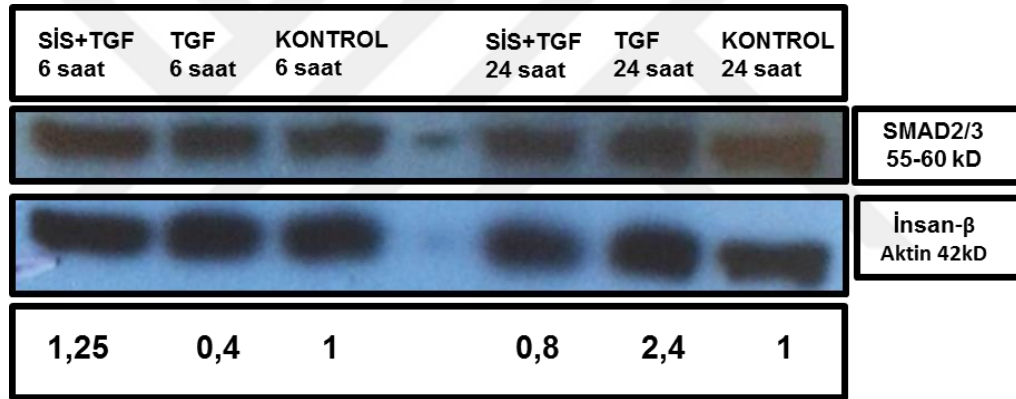


Şekil 3.41: SIS3 ve TGF- β uygulanan Hep3B hücrelerinde (A) SMAD2, (B) SMAD3, (C) SMAD4 ve (D) ADAMTS1 etkisi.

3.5.3 SIS3 (SMAD İnhibitörünün) Western Bloth ile Protein Düzeyine Etkisi

İnhibisyon çalışmalarında kullanılan Sis3 inhibitörünün SMAD protein seviyesine olan etkisinin araştırılması için hücreler büyütüldü ve 1 gün sonra hücrelerin tamamı %0,1’ lik BSA içeren medyum konuldu ve 1 saat sonra son konsantrasyonda 3 μ M SIS3, 1 saat sonrasında ise 500 Ü/ml TGF- β sitokini uygulandı.

Bölüm 2.2.7.3' de anlatıldığı şekilde ve tablo 2.12 ve 2.13' de verilen western solüsyonları hazırlanarak SDS jeli döküldü ve örnekler 50 μ olarak jele yüklendi.yürütülen örnekler 1 gece bölüm 2.2.7.4' de bahsedildiği üzere transfere bırakıldı. Transfer işlemlerinden sonra membran bloklamaya alındı.ardından yıkama işlemleri yapılarak primer SMAD antikoruyla muamele edildi (1:100). Daha sonra sekonder antikor (1:5000) işlemlerinden sonra görüntülemesi yapılarak dansitometrik analizi yapıldı. Şekil 3.42' de analiz sonucunda gösterildiği gibi 6 saat grubunda protein seviyesinde SMAD proteinlerinin SİS uygulaması sonrası azalması tespit edilememiştir. Kontrol grubuyla hemen hemen aynı değerleri vermiştir (1 ve 1.25). 24 saat sonuçları incelendiğinde görülmektedirki sis uygulaması SMAD faktörlerini azaltmıştır (1 ve 0,8).



Şekil 3.42: SİS3 ve TGF- β sitokini uygulanan hücrelerde SMAD2/3 ve İnsan Beta Aktin görüntüsü.

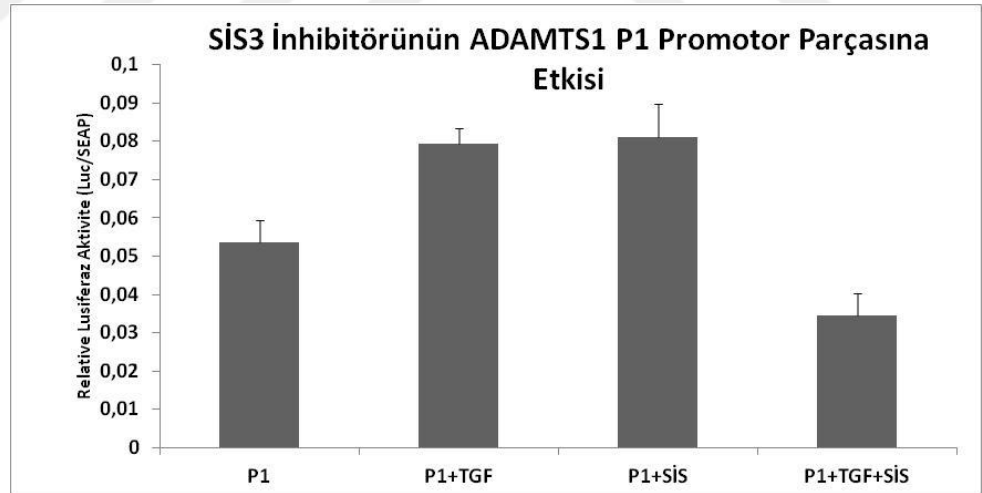
(1: sis+tgf 6saat, 2: TGF 6saat, 3: kOntrol 6saat, 4: sis+tgf 24 saat, 5: tgf 24 saat, 6:kontrol 24 saat.)

3.5.4 SMAD İnhibitörünün ADAMTS1 Promotor Parçalarına Etkisi

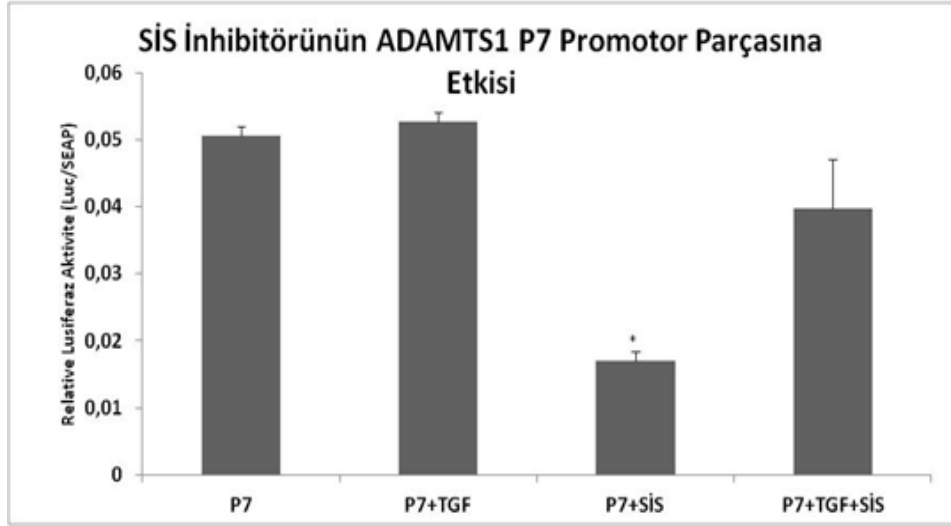
İnhibisyon çalışmalarında kullanılan Sis3 inhibitörünün ADAMTS1 promotor parçalarına olan etkisinin araştırılması için transfeksiyon çalışmaları yürütüldü. Promotorların transfeksiyonları için hücreler 1 gün önceden 12 kuyulu plakalara 250.000/kuyu olacak şekilde paylaştırıldı. 45 μ l son hacimde; 2 M CaCl solüsyonu ilave edilerek Promotor parçaları 0,5 μ g ve SEAP vektörü karıştırıldı. Karışımın üzerine 45 μ l 2 X HEPES damla damla eklendi ve presipitasyonun oluşması için yarım saat beklendi. Sürenin sonunda presipitasyon oluştuğundan sonra karışım her bir

kuyuya 90µl olacak şekilde damla damla eklendi. Hücreler 6 saatlik inkübasyon için CO₂' li inkübatöre kaldırıldı. Sürenin sonunda kuyulardan medyum uzaklaştırılarak tüm kuyulara %0,1' lik BSA içeren medyum konuldu ve 1 saat sonra ilgili kuyulara son konsantrasyonu 3 µM olacak şekilde SİS3 (SMAD inhibitörü) uygulandı. Bu uygulamadan 1 saat sonra ise sadece ilgili kuyulara 500 Ü/ml TGF-β sitokini uygulandı. 48 ve 72 saat inkübasyon sürelerinin sonunda lusiferaz ve salınan alkalın fosfat aktivitesi için medyum örnekleri toplandı ve luminometre ile ölçüldü.

Sonuçlar incelendiğinde Sis3 inhibitörünün ADAMTS1 P1 promotor parçasının aktivitesini 48 saatte TGF-β + Sis3 inhibitörü uygulanan grupta düşürdüğü görülmektedir. (Şekil 3-43). Şekil 3.44 incelendiğinde görülmektedirki Sis3 inhibitörü P7 promotor parçasının transkripsiyonel aktivitesini 48 saatte bazal aktivite ile karşılaştırıldığında azaltmaktadır. TGF-β ve Sis3' ün birlikte uygulanması aktiviteyi yeniden arttırmaktadır. Bu da SMAD' lar durdurulsa bile TGF-β uygulamasının aktiviteyi yeniden arttırdığını göstermektedir. Hem SMAD hem de farklı bir mekanizmanın varlığını işaret etmektedir.



Şekil 3.43: SİS3 inhibitörünün ve TGF-β sitokininin SMAD uygulanmış HEP3B hücre hattında ADAMTS1 promotoru olan P1 (-1415/+419)' e olan etkisi 48 saat.



Şekil 3.44: SİS3 inhibitörünün ve TGF- β sitokininin SMAD uygulanmış HEP3B hücre hattında ADAMTS1 promotoru olan P7 (-129/+419) ' e olan etkisi 48 saat.

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

ADAMTS ailesinin Vazquez ve grubu tarafından 1999 yılında anti-anjiyogenetik etkisi olan proteinlere sahip olduğu bulunmuştur. ADAMTS genleri ve ürünleri olan enzimler hücre dışı matriksin şekillenmesi, artrit, ateroskleroz, fibroz, organogenez, hemostaz ve yara iyileşmesi de dahil olmak üzere, çeşitli patolojik süreçlerde görev aldığı gibi bu ailenin üyelerinden bazıları, kanser ve kardiyovasküler hastalık ile ilişkili iken bazı üyeleri ise kalıtsal genetik bozukluklara yol açmaktadır. Önemli olaylardada rol alan ADAMTS' ler, protein dizisi, domainlerin organizasyonu, gen dizisi korunmuşluğuna ve substrat tercihine göre gruplandırılmıştır [3,4,6,7,12,13].

ADAMTS1 ise bu ailenin ilk üyesidir ve ilk olarak inflamasyon aracısı olarak tanımlanmıştır. Organogeneziste, kan / lenf damarı oluşumu, yumurtalık follikülogenez ve ovulasyon gibi fizyolojik olaylarda rol almaktadır [16]. ADAMTS1' in VEGF ile indüklenen anjiyogenezi inhibe etmektedir. Ayrıca fibroblast büyüme faktörü-2 ile indüklenen damarlanmayı baskılamaktadır [2,18]. Ayrıca ADAMTS1 Majör kıkırdak protein olan agrekanın parçalanmasında agrekanaz aktivitesine sahiptir. Ayrıca, merkezi sinir sisteminde yoğun şekilde ifade olan kan damarlarında ve brevikan da bulunan versikanı da degrede ettiği bulunmuştur. Agrekan, kıkırdağın esas proteoglikanıdır ve dokunun tip II kollajen sarmalına karşı hidrate edilmesi ve şişmesi yoluyla baskıya karşı koymasından sorumludur [2].

ADAMTS1'in kanserdeki rolleri ile yapılan çok sayıda çalışma, prostat, karaciğer ve meme bezi tümörlerinin ilerlemesi sırasında ADAMTS1' in mRNA ve protein düzeylerinde değişiklik olduğunu ortaya çıkarmıştır [16]. Yapılan bu çalışmalarla, ADAMTS1'in anti-anjiyogenetik etkisi ve rolü de gösterilmiştir. Anjiyogenez tümörün ilerlemesinde önemli bir rol oynar. Çeşitli raporlar ADAMTS1' in birden fazla mekanizmasının anjiyogenezi inhibe ettiğini göstermektedir.

İnsan ADAMTS1 geninin regülasyonuna yönelik ilk çalışma ise Hatipoğlu ve arkadaşları tarafından 2009 yılında yayınlanmıştır. Bu çalışmaya göre, endotel hücrelerinde hipoksiya durumunda, ADAMTS1 mRNA ve protein ekspresyon seviyesi hızlı bir şekilde artmaktadır. Araştırmacılar ADAMTS1' in HIF1 α ' nın yeni bir hedef geni olduğunu ileri sürmektedir. Bu çalışmada hipoksik koşullara altında genin regülasyonunu ve HIF1 α ' yı incelemektedir. Ancak bu çalışmada da insan ADAMTS1 geninin normal oksijen koşullarında (normoksiya) nasıl regüle edildiği ve hepatoma hücrelerinde dokuya spesifik regülasyonu ile ilgili bilgilere rastlanmamıştır. Bu amaç doğrultusunda TBAG 110T574 nolu proje ile araştırmalarını Yrd.Doç.Dr. Sümeyye AYDOĞAN TÜRKÖĞLU' nun yaptığı ve Prof. Dr. Feray KÖÇKAR' ın yürütücülüğünü yaptığı proje kapsamında İnsan ADAMTS1 promotorunun normal oksijen varlığında insan hepatoma hücre modeli kullanılarak transkripsiyonel regülasyonu araştırılmıştır. Bu projeden elde edilen verilerle Gene dergisinde 2016 Ocak sayısında basılmıştır [37].

110T961 numaralı 1001 projemizde ise ADAMTS1 geninin TGF- β ve VEGF sitokinleri ile regülasyonu çalışılmıştır. Bu 1001 projesinden elde ettiğimiz verilere göre insan ADAMTS1 geni TGF- β sitokini tarafından upregüle edilmektedir (Şekil 1.8). Ancak bu regülasyonun TGF- β sitokininin etki yollarından biri olan SMAD transkripsiyon faktörleri ile olup olmadığı bilinmemektedir. Projede mRNA, protein düzeyinde ADAMTS1 cevabın tespiti yapılmıştır. Projede bu cevabın hangi transkripsiyon faktörü ile gerçekleştiği gibi bir detaylandırmaya gidilmemiştir. Bu hızlı destek projesi kapsamında elde edilmiş olan sitokin cevabının SMAD transkripsiyon faktörlerince olup olmadığına yönelik olarak yapılmıştır.

Transforme edici büyüme faktörü (Transforming Growth Factor- β , TGF- β) ailesi, gelişimi çok yönlü kontrol eden ekstrasellüler büyüme faktörlerinin büyük bir grubunu oluşturur. Çok sayıda birbirine benzer polipeptit büyüme faktörleri içeren TGF- β üyeleri hücre proliferasyonu, farklılaşması, motilitesi, adezyonu ve ölümü gibi hücresel süreçleri düzenleme yeteneğine sahiptir. TGF- β ve ilgili faktörleri, organizmanın tüm dokularının gelişiminde, homeostazisinde ve onarımında çok önemli rol oynarlar. Bu faktörlerin tümü, hücre içi sinyallerin düzenlenmesinde önemli bir yer tutar [38]. İnsan genomunda 42 üyesi vardır, Drosophila da 7 ve

Caenorhabditis elegans da 4 tanedir. Transforme edici büyüme faktörü- β (TGF- β) ailesi bu molekül sınıfında en önemli temsilcilerden biridir.

Hepatosellüler karsinom (HCC) daki artış, geç tanı ve tedavi seçenekleri kısıtlı olduğu için önemli bir halk sağlığı sorunudur. TGF- β karaciğer hasarı ve yenilenmenin erken evrelerinde sitostatik sinyalleri sağlamak için bilinen, ancak tümör başlaması ve karaciğer kanseri ilerlemesinde etkileri arttıran bir etki gösterir [42]. TGF- β sinyal yolunun biyokimyasal omurgasının sağlam bir şekilde ve hücrelerin bu sinyallere cevaplarının nasıl çevrildiği aydınlatılmıştır. Bu yolun özünde SMAD transkripsiyon faktörleri yer alır [39].

İnsan ve fare genomunda sekiz adet, Drosophila'da dört ve C.elegans' ta üç adet SMAD proteini tanımlanmıştır [39]. Memelilerde sadece 5 tanesi TGF β ailesinin substratıdır. SMAD1, SMAD2, SMAD3, SMAD5 ve SMAD8 TGF- β reseptör ailesinin substratları; yaygın olarak reseptör-regülatör olarak düzenlenmiş SMAD' lar veya RSMAD' lar olarak adlandırılır. Memelilere ait SMAD proteinleri üç sınıfa ayrılır; Reseptör aracılığıyla düzenlenen SMAD' lar (R-SMAD' lar), Ortak mediatör SMAD (Co-SMAD) ve Antagonistik ya da inhibitör SMAD' lardır (I-SMAD' lar).

Çalışmamızın ilk basamağında SMAD2, SMAD3 ve SMAD4 genlerini içeren ökaryotik ekspresyon vektörlerinin Hep3B hücrelerine 10 μ g olacak şekilde Ca-P geçici presipitasyon yöntemi ile transfeksiyonu gerçekleştirildi. Aynı deney setinde TGF- β sitokini uygulan gruplar da eklendi. Transfeksiyondan 24, 48 ve 72 saat sonunda pelletler toplanarak real-time tekniğinde kullanılmak üzere ayrıldı. Bu pelletlerden öncelikle RNA izolasyonu gerçekleştirildi ve spektrofotometre ile ölçümleri yapılarak 1 μ g RNA ile cDNA sentezlendi. Elde edilen cDNA lardan gerçek zamanlı (real-time) PZR ile ektopik ekspresyonun başarısının kontrolü yapıldı. Normalizasyon için insan beta-2 kullanıldı. Elde edilen sonuçlara göre SMAD2/4 transfekte edilen örneklerde SMAD2 ve SMAD4 transfekte edilen Hep3B hücre hattında, Şekil 3.5 ve Şekil 3.6 de gösterildiği gibi SMAD2 ve SMAD4' ün özellikle 48 saat sonunda bir artışın olduğu ve mRNA seviyesinde kontrol grubuna göre ifadenin arttığı tespit edildi. SMAD3 ve SMAD4' ün transfekte edildiği Hep3B hücre hattında SMAD3' ün kontrol grubuna göre 24 saat sonunda mRNA düzeyinde ekspresyonunda artışın olduğu (Şekil 3.7), SMAD4 de ise 24 ve 48 saatlerde bu

ekspresyona katkı sağladığı gözlemlendi (Şekil 3.8). Ektopik ekspresyonun mRNA seviyesinde kontrol edilmesinden sonra TGF- β sitokininin ektopik olarak üretilen transkripsiyon faktörleri olan SMAD' lara olan etkisi de ayrıca araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre SMAD2 ve SMAD4' ün ayrıca TGF- β sitokininin uygulandığı koşullarda SMAD2' nin ekspresyonuna TGF- β 'nin 24 saatte katkı sağladığını görmekteyiz (Şekil 3.9). SMAD4'ün ekspresyonuna ise tüm zaman dilimlerinde katkı sağlamıştır (Şekil3.10). SMAD3 ve SMAD4' ün ayrıca TGF- β sitokininin uygulandığı koşullarda SMAD3' ün ektopik ekspresyonuna TGF- β ' nin etkisine baktığımızda 24 saatte bir artışa sebep olduğunu görmekteyiz (Şekil 3.11). Aynı deney grubunda TGF- β 'nin SMAD4' ün ektopik üretimine katkısı en yüksek olarak 72 saatte gözlenmiştir (Şekil 3.12).

Aynı zamanda protein seviyesinde SMAD transkripsiyon faktörlerinin ektopik üretiminin kontrolü de gerçekleştirildi. Optimizasyon sonucu belirlenen miktarda (50 μ g) proteinler jele yüklenmiştir. Western blot işlemi sonucu oluşan protein bantlarının büyüklüğü İmaj-J' de belirlenmiş ardından excel de değerler β -Aktin protein bantlarına oranlanarak normalize edilmiş ve densitometrik analizleri yapılmıştır. Bu analiz sonucunda SMAD2, SMAD3 ve SMAD4' ün transfekte edildiği deneyde ektopik olarak protein seviyesinde kontrol grubuna göre artış olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 3.14, Şekil 3.15).

Ektopik ekspresyonun protein seviyesinde de kontrol edilmesinden sonra TGF- β sitokininin ektopik olarak üretilen transkripsiyon faktörleri olan SMAD'lara olan etkisi de ayrıca araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre SMAD2 ve SMAD4' ün ayrıca TGF- β sitokininin uygulandığı koşullarda SMAD2/4' ün protein miktarına TGF- β ' nin özellikle 48 saatte azaltıcı bir etki gösterdiğini görmekteyiz (Şekil 3.16). Bu sonuçlar mRNA seviyesinde gösterdiği sonuçlardaki koreledir.

SMAD3 ve SMAD4' ün ayrıca TGF- β sitokininin uygulandığı koşullarda SMAD3' ün ektopik ekspresyonuna TGF- β 'nin etkisine baktığımızda 48 ve 72 saatlerde bir miktar azalmaya sebep olmuştur (Şekil 3.17). mRNA düzeyinde gösterdiği etki ile uyumludur.

Ektopik olarak üretilen SMAD transkripsiyon faktörlerinin Hep3B hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin belirlenmesi amacıyla MTT testi uygulanmıştır.

Western Blot ve Real time da uygulanan deney grupları ile aynı koşulların olması sağlanarak Hep3B hücrelerine SMAD plazmitlerinin Ca-P tekniği ile transfeksiyonu gerçekleştirildi. Uygulamadan 24, 48 ve 72 saat MTT sonuçları elde edildi. Hep3B hücrelerine yapılan transfeksiyonlar ve sitokin uygulamaları kontrol grubuyla karşılaştırıldığında hücreleri etkilemektedir ancak bu istatistiki olarak anlamlı değildir. Şekil 3.18’ de 24 saat sonuçları incelendiğinde SMAD 2/4 ve 3/4 transfekte edilen hücrelerde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında azalma gözlenmektedir ancak bu istatistiki olarak anlamlı değildir. Şekil 3.19’ da ise 48 saat sonuçları incelendiğinde SMAD2/4 transfekte edilen grupta kontrol grubu ile karşılaştırıldığında etki yokken SMAD3/4 transfekte edilen grupta kontrol grubuna göre azalma vardır. Şekil 3.20’ de ise 72 saat MTT sonuçları incelendiğinde yine SMAD2/4 transfekte edilen grupta kontrol grubu ile karşılaştırıldığında etki yokken SMAD3/4 transfekte edilen grupta kontrol grubuna göre azalma vardır.

Bazal transkripsiyonel aktivitenin belirlenmesi için promotor bölgesinin 5’ucu sabit tutularak 3’ ucundan kısaltılarak hazırlanan ADAMTS1 promotor parçalarının Hep3B hücrelerine transfeksiyonunda ve ko-transfeksiyon analizlerinde kalsiyum-fosfat presipitasyon metodu kullanılmıştır. Bazal transkripsiyonel aktivite ve ko-transfeksiyonlardan elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır. SMAD2, SMAD3 ve SMAD4 transkripsiyon faktörlerinin ADAMTS1 promotor dizisinde bağlanma motifleri bulunmaktadır. Bunun için ADAMTS1 promotor bölgesi biyoinformatik olarak analiz edilerek SMAD bağlanma bölgeleri belirlenmiştir (Şekil3.22). Bu ekspresyon plazmitleri ADAMTS1 promotor parçaları ve TGF- β sitokini ile birlikte Hep3B hücrelerine geçici olarak transfekte edilerek, lusiferaz aktivitesi ölçüldü ve ADAMTS1 promotor aktivitesine olan katkısı belirlendi. Yapılan analizlere göre; P1 promotor parçası üzerinde SMAD transkripsiyon faktörleri ve TGF- β uygulaması 72 saat diliminde P1 bazal aktivitesi ile karşılaştırdığımızda transkripsiyonel aktiviteyi düşürmüştür ancak bu istatistiki olarak anlamlı değildir (Şekil 3.25). Ayrıca TGF- β ve SMAD transfeksiyon sonuçları incelendiğinde bazal aktivite ile karşılaştırıldığında artış vardır

P7 promotor parçası üzerinde SMAD transkripsiyon faktörlerinin etkisini incelediğimizde ise özellikle SMAD2/4 transkripsiyon faktörleri ve TGF- β uygulandığında bazal aktivite ile karşılaştırdığımızda istatistiksel olarak anlamlı

transkripsiyonel aktivitede artış görmekteyiz. SMAD3/4 uygulaması P7 promotor parçasının transkripsiyonel aktivitesini arttırmakta ancak TGF- β ile birlikte uygulandığı grupta ise bazal aktiviteye kıyasla arttırmakta fakat TGF- β uygulanmayan grupla karşılaştırdığımızda ise azaltıcı etki göstermektedir (Şekil 3.26).

P1 ve P7 sonuçları birlikte değerlendirildiğinde P7' nin SMAD 2/4' e cevap vermesi ancak büyük promotor arçasında aynı bölgenin bulunmasına rağmen cevap vermemesi ise büyük promotor parçasında baskılayıcı transkripsiyon faktörlerinden dolayı etkiyi göremediğimiz şeklinde yorumlanmaktadır. P7 daha küçük ve bu bölge çıktığı için net etkiyi görüyor olabiliriz. Ayrıca P7' de TGF- β ' ya cevap görmemiz hem SMAD yolunun hemde farklı yolun kullanıldığını farklı mekanizmaların birlikte çalıştığını düşündürmüştür.

SMAD vektörlerinin transfeksiyonu için HEP3B hücre hattına son hacimde 10 μ g DNA yani 5 μ g SMAD2 ile birlikte 5 μ g SMAD4 ve 5 μ g SMAD3 ile birlikte 5 μ g SMAD4 ayrı flasklarda kalsiyum fosfat presipitasyon metoduyla transfeksiyon gerçekleştirildi. Uygulamadan 6 saat sonra besi yeri taze %0,1 BSA içeren medium ile değiştirildi. Uygulamadan 1 gün sonra TGF- β sitokini uygulandı. Transfeksiyon yapılmayan hücreler kontrol olarak kullanıldı. Transfeksiyon deneyleri 3 tekrarlı olarak çalışıldı ve birbirinden bağımsız 3 deney yapıldı. Kontrol grupları ile SMAD transfekte edilen gruplardaki cT değerleri insan beta-2 ile oranlanarak normalizasyon gerçekleştirildi. SMAD2/4 ve SMAD3/4' ün ADAMTS1 mRNA seviyesine olan etkisi istatistiksel olarak değerlendirildi.

Ayrıca aynı kontrol ve deney grupları (SMAD Transfekte edilenler ve SMAD transfekte edilenler+TGF- β) kullanılarak ADAMTS1' in mRNA seviyesi de incelenmiştir. Öncelikli olarak SMAD transkripsiyon faktörü transfekte edilmeyen gruplar kontrol olarak kullanılmış ve SMAD transfekte edilen gruplardaki ADAMTS1 seviyesi ile karşılaştırılmıştır.

SMAD2 ve SMAD4'ün transfekte edildiği deney grubunda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında ADAMTS1 24, 48 ve 72 saatlerde artış göstermiştir özellikle 24 saatte kontrol grubuna göre 5 kat artmıştır (Şekil 3.27). TGF- β ' nın SMAD2/4

transkripsiyon faktörlerinin ADAMTS1 üzerindeki etkisi birlikte incelendiği ise şekil 3.28’ de görüldüğü gibi ADAMTS1 ifadesi tüm zaman dilimlerinde düşürülmektedir.

SMAD3 ve SMAD4’ün transfekte edildiği deney grubunda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında ADAMTS1 24, 48 ve 72 saatlerde artış göstermiştir özellikle 24 saatte kontrol grubuna göre 3,5 kat artmıştır (Şekil 3.29). TGF- β ’ nın SMAD3/4 transkripsiyon faktörlerinin ADAMTS1 üzerindeki etkisi birlikte incelendiği ise şekil 3.30’ da görüldüğü gibi ADAMTS1 ifadesi 24 ve 72 saatte azalırken 48 saatte artmaktadır.

Hem transkripsiyonel aktivite hemde mRNA seviyesinde ADAMTS1 genine olan katkısı tespit edildikten sonra SMAD transkripsiyon faktörlerinin ADAMTS1 promotor bölgesine gerçekten bağlanıp bağlanmadığı EMSA tekniği ile analiz edilmiştir. ADAMTS1 promotor dizisi MATINSPECTOR programında analiz edildiğinde transkripsiyon faktörlerinin muhtemel bağlanma bölgeleri tespit edildi (Şekil 3.32). SMAD bağlanma bölgeleri tespit edilerek bu bölgelere özgü EMSA primerleri tasarlandı (+106/+166, -1365/-1305) ve ardından bu faktörlerin bağlanıp bağlanmadığını anlayabilmemiz amacıyla EMSA tekniği uygulandı. Şekil 3.33’ deki sonuçlara göre; SMAD2/4 ve SMAD3/4 transfeksiyonu sonucu edinilen nükleer ekstraktlara ADAMTS1’ in +106/+166 bölgesi için hazırlanan prob (muhtemel SMAD bağlanma bölgelerine göre dizayn edilen) ile muamelesi sonucu bu faktörlerin buraya bağlandığı tespit edilmiştir (Şekil 3.25, 2-3 ve 4 numaralı kuyular). Ayrıca kontrol amaçlı kullanılan Hep3B nükleer ekstraktına göre de Sma2/4 transfekte edilerek hazırlanan nükleer ekstrakt bölgeleri karşılaştırıldığında kompleks 1 ve 2 de artış gözlenmiştir (Şekil 3.33, 2 ve 3 kuyular karşılaştırılmalı). Aynı deneyde yarışma deneyleri de yapılmıştır. ADAMTS1’in +106/+166 probu 1000 kat oranında biyotin işaretli olarak kullanılmıştır. Biyotinsiz prob konsantrasyonları biyotinli problara göre 1000 kat fazla olacak şekilde tüplere eklendi. Gerekli diğer bileşenler de bölüm 2.2.8.5’ de belirtildiği konsantrasyonlarda reaksiyon tüpüne eklendi. Şekil 3.33 de 5.kuyu incelendiğinde görülmektedir ki K2 kaybolmuştur. Bu da bize gerçekten bu bölgenin SMAD bağlanma bölgesi olduğunu düşündürmüştür.

İkinci EMSA deneyinde diğer bağlanma bölgesi için hazırlanan prob ADAMTS1 prob (-1365/-1305) kullanılmıştır. Şekil 3.34’ deki sonuçlara göre;

SMAD2/4 ve SMAD3/4 transfeksiyonu sonucu edilen nükleer ekstraktlara ADAMTS1' in muhtemel SMAD bağlanma bölgelerine göre dizayn edilen spesifik primerler ile muamelesi sonucu bu faktörlerin buraya bağlandığı gösterilmiştir (Şekil 3.34 K1). SMAD2/4 ve SMAD3/4 transfeksiyonu sonucu edilen nükleer ekstraktlara ve kontrol nükleer ekstrakta SMAD transkripsiyon faktörlerinin bağlandığı gösterilmiştir. Ayrıca kontrol amaçlı kullanılan Hep3B nükleer ekstrakta göre de SMAD2/4 transfekte edilerek hazırlanan nükleer ekstrakt bölgeleri karşılaştırıldığında kompleks 1 de artış gözlenmiştir (Şekil 3.34, 2 ve 3 kuyular karşılaştırılmalı). Aynı deneyde yarışma deneyleri de yapılmıştır. ADAMTS1' in -1365/-1305 1000 kat oranında biyotin işaretsiz olarak kullanılmıştır. Gerekli diğer bileşenler de bölüm 2.2.8.5' te belirtildiği konsantrasyonlarda reaksiyon tüpüne eklendi. Şekil 3.34' de 5. kuyu incelendiğinde görülmektedirki K1' de azalma meydana gelmiştir. Bu da bize gerçekten bu bölgenin SMAD bağlanma bölgesi olduğunu düşündürmüştür.

Son olarak SMAD transkripsiyon faktörleri için seçilen iki bağlanma bölgelerinin özgün olup olmadığının tespiti için SMAD antikoları ile supershift deneyleri yapılmıştır. Öncelikle ilk bölge (+106/+166 prob) için deneyler yapılmıştır. Şekil 3.35 incelendiğinde kuyu 2, kontrol nükleer ekstrakta göre kuyu 3 ve kuyu 6 karşılaştırıldığında yine görülmektedirki bağlanma kompleksleri güçlenmiştir (K1 ve K2). SMAD2/4 nükleer ekstraktdaki kompleksler ile supersift reaksiyonundaki kompleksler karşılaştırıldığında görülmektedirki K2 azalmıştır ancak daha büyük kompleks (supershift) yapısı ayırt edilememiştir. Çünkü yukarıda güçlü büyük bağlanmaların arasında kalmış olabilir (kuyu 2, 3, 5). SMAD3/4 nükleer ekstraktdaki kompleksler ile supersift reaksiyonundaki kompleksler karşılaştırıldığında görülmektedirki K2 yine azalmıştır ancak daha büyük kompleks yapısı ayırt edilememiştir (kuyu 6 ve 8). Bunun sebebi oluşan komplekslerin güçlü olmasından dolayı supershift yapısı ayırt edilememektedir.

Son olarak yine SMAD transkripsiyon faktörleri için seçilen ikinci bölge (-1365/-1305 prob) için deneyler yapılmıştır. Şekil 3.36 incelendiğinde SMAD2/4 nükleer ekstraktdaki K2 kompleksinin kontrol nükleer ekstrakta göre daha güçlü olduğu gözlenmektedir (Kuyu 2 ve 3). Supersift reaksiyonundaki kompleksler karşılaştırıldığında görülmektedirki K2 azalmıştır ancak daha büyük kompleks yapısı

ayırt edilememiştir (kuyu 3 ve 5; 6 ve 8 karşılaştırılmalı). Bunun sebebi oluşan komplekslerin güçlü olmasından dolayı supershift yapısı ayırt edilememektedir.

İnhibisyon çalışmalarında kullanılan Sis3 inhibitörünün hücre proliferasyonuna olan etkisinin araştırılması amacıyla MTT testi uygulandı. Transfeksiyon için hücreler 1 gün önceden 96 kuyulu plakalara 50.000/kuyu olacak şekilde paylaştırıldı. 1 gün sonra hücrelerin tamamı %0,1' lik BSA içeren medyum konuldu ve 1 saat sonra son konsantrasyonda 3 μ M SİS3, 1 saat sonrasında ise 500 Ü/ml TGF- β sitokini uygulandı. 24 saat sonunda bölüm 2.2.4.3 de anlatıldığı gibi MTT solüsyonu uygulandı ve absorbans değerleri ölçüldü. İnhibitör olarak uygulanan Sis3 inhibitörü Hep3b hücrelerine olan etkisi incelendiğinde Şekil 3.38 incelenebileceği gibi 24 saatte hücre proliferasyonuna istatistiki anlamda bir etkisi tespit edilememiştir.

İnhibisyon çalışmalarında kullanılan Sis3 inhibitörünün SMAD ve ADAMTS1 mRNA seviyesine olan etkisinin araştırılması için, elde edilen Ct değerleri öncelikli olarak 3 tekrarlı çalışıldığı için her deney grubu için elde edilen değerlerin ortalaması alınmıştır, ardından tek bir kontrol olması hedeflendiği için her zaman dilimine ait kontrol gruplarının ortalaması alınmıştır. Daha sonra kontrol genimiz olan Human- β -mikroglobülin-2 geninin cT değerleri ile bulunan cT değerleri Livak metoduna göre değerlendirilmiştir. Sonuçlar göstermektedirki sis inhibitörü başarılı bir şekilde SMAD transkripsiyon faktörlerini kontrol grubuna göre inhibe etmiştir (Şekil 3.41' de A, B, C). ADAMTS1 seviyesine bakıldığında özellikle 6 saatte inhibitör uygulanmasının kontrol grubuna göre ADAMTS1 mRNA seviyesini istatistiksel olarak anlamlı seviyede azaltmıştır (Şekil 3.41D). Bu deneyde özellikle 6 saat göz önüne alınmalıdır çünkü inhibitörün etkisi mRNA seviyesinde erken dönemde görülmektedir.

Protein seviyesinde inceleme yapıldığında ise SMAD proteinlerinin SİS uygulaması sonrası western blot ile analizi yapılmıştır. Şekil 3.42' de analiz sonucunda gösterildiği gibi 6 saat grubunda protein seviyesinde SMAD proteinlerinin SİS uygulaması sonrası azalması tespit edilememiştir. Kontrol grubuyla hemen hemen aynı değerleri vermiştir (1 ve 1.25). 24 saat sonuçları incelendiğinde görülmektedirki sis uygulaması SMAD faktörlerini azaltmıştır (1 ve 0,8).

İnhibisyon çalışmalarında kullanılan Sis3 inhibitörünün ADAMTS1 promotor parçalarına olan etkisinin araştırılması için transfeksiyon çalışmaları yürütüldü. Sonuçlar incelendiğinde Sis3 inhibitörünün ADAMTS1 P1 promotor parçasının aktivitesini 48 saatte TGF- β + Sis3 inhibitörü uygulanan grupta düşürdüğü görülmektedir. (Şekil 3.43). Şekil 3.44 incelendiğinde görülmektedirki Sis3 inhibitörü P7 promotor parçasının transkripsiyonel aktivitesini 48 saatte bazal aktivite ile karşılaştırıldığında azaltmaktadır. TGF- β ve Sis3' ün birlikte uygulanması aktiviteyi yeniden arttırmaktadır. Bu da SMAD' lar durdurulsa bile TGF- β uygulamasının aktiviteyi yeniden arttırdığını göstermektedir. Hem SMAD hem de farklı bir mekanizmanın varlığını işaret etmektedir.

Bu çalışma kapsamında ilk kez ADAMTS1 geninin SMAD transkripsiyon faktörlerince regülasyonu çalışılmıştır. Özellikle anti-anjiyogenik özelliğe sahip olan bu genin regülasyonun aydınlatılması açısından literatüre oldukça önemli veriler sunmaktadır. Sonraki çalışmalar için temel teşkil edeceğini düşünmekteyiz.

5. KAYNAKLAR

- [1] Kılıç M.Ö., Aynekin B., Kılıç Y., Demircan K. and Bozer M., ‘‘ADAMTS Proteases in Cancer’’, *New Journal of Medicine*, 32:123-127, (2015).
- [2] Akyol S., Erdemli H.K., Kurşunlu S.F., Aynekin B., Yaral Y., Yiğitoğlu M. R. ve Demircan K., ‘‘Matriselüler Yeniden Modellemede ADAMTS Ailesi: Biyokimyasal Bakış Bir Bakış’’, *Derleme*, (2015).
- [3] Kaushal G.P. and Shah S.V., ‘‘The new kids on the block: ADAMTSs, potentially multifunctional metalloproteinases of the ADAM family’’, *The Journal of Clinical Investigation*, 105, 10, 1335, (2000).
- [4] Tang B.L., ‘‘ADAMTS: a novel family of extracellular matrix proteases’’, *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 33, 33. (2001).
- [5] Kuno K., Kanada N., Nakashima E., Fujiki F., Ichimura F. and 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, 1, 556, (1997).
- [6] Porter S., Clark I.M., Kevorkian L. and Edwards D.R., ‘‘The ADAMTS metalloproteinases’’, *Biochem. J.*, 386, 15, (2005).
- [7] Tang B.L. and Hong W., ‘‘ADAMTS: A novel family of proteases with an ADAM protease domain and thrombospondin 1 repeats’’, *FEBS*, 445, 223-225, 10.1016/S0014-5793(99)00119-2, (1999).

- [8] Rocks N., Paulissen G., El Hour M., Quesada F., Crahay C., Gueders M., Foidart J.M., Noel A. and Cataldo D., “Emerging roles of ADAM and ADAMTS metalloproteinases in cancer”, *Biochimie*, 90, 369, (2008).
- [9] Sunay FB., Turkoglu SA. and Kockar F., “The expressions of ADAMTS-1-2-3 and-8 in Hep3B cells”, *Febs Journal*, 276:122-122, (2009).
- [10] Turkoglu S.A., “İnsan ADAMTS-1 geninin transkripsiyonel regülasyonu”, Doktora Tezi, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, (2012).
- [11] Seals D.F. and Courtneidge S.A. “ The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions” *Genes & Development* 17:7–30, (2003).
- [12] Kelwick, R., Desanlis, I., Wheeler, G.N. and Edwards, D.R., “The ADAMTS (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs) family”, *Genome Biology*, 16:113, (2015).
- [13] Jones G.C. and Riley G.P., “ADAMTS proteinases: a multi-domain, multi-functional family with roles in extracellular matrix turnover and arthritis”, *Arthritis Research & Theraphy*, 7, 4, 160, (2005).
- [14] 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).
- [15] Armutcu F. and Demircan K., “Emerging roles of ADAMTS metalloproteinases in regenerative medicine and restorative biology” *Turkish Journal of Biology*, 39: TÜBİTAK 10.3906/biy-1505-32, (2015).
- [16] Arao Tan I., Ricciardelli C. and Russell D.L., “The metalloproteinase ADAMTS1: A comprehensive review of its role in tumorigenic and

- metastatic pathways”, *International Journal of Cancer*, 133(10):2263-76, (2013).
- [17] Inagaki J., Takahashi K., Ogawa H., Asano K., Hatipoglu Ö.F., Cilek M.Z., Obika M., Ohtsuki T., Hofmann M., Kusachib S., Ninomiya Y. and Hirohata S., “ADAMTS1 inhibits lymphangiogenesis by attenuating phosphorylation of the lymphatic endothelial cell-specific VEGF receptor”, *Exp Cell Res.*, 323(2):263-75, (2014).
- [18] Vazquez F., Hastings G., Ortega M.A., Lane T.F., Oikemus S., Lombardo M. and Iruela-Arispe M.L., “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, 23349, (1999).
- [19] Demirer E., Ayten Ö. and Taş D., “Angiogenesis and Anti-Angiogenic Treatments” , GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi, Göğüs Hastalıkları, *Journal of Clinical and Analytical Medicine*, (2012).
- [20] Hanahan, D. and Weinberg, R.A., “The Hallmarks of Cancer”, *Cell.*, 100, 57, (2000).
- [21] Vankemmelbeke M.N., Jones G.C., Fowles C., Ilic M.Z., Handley C.J., Day A.J., Knight C.G., Mort J.S. and Buttle D.J., “Selective inhibition of ADAMTS-1, -4 and -5 by catechin gallate esters”, *Eur. J. Biochem.*, 270, 2394, (2003).
- [22] Handsley M.M. and Edwards D.R., “Metalloproteinases and their inhibitors in tumor angiogenesis” *International Journal of Cancer*, (2005).
- [23] Obika M., Ogawa H., Takahashi K., Li J., Hatipoglu Ö.F., Cilek M.Z., Miyoshi T., Inagaki J., Ohtsuki T., Kusachi S., Ninomiya Y. and Hirohata S., “Tumor Growth Inhibitory Effect of Adamts1 is Accompanied by the Inhibition of Tumor Angiogenesis”, *Cancer Science*, 103(10):1889-97, (2012).

- [24] Rocks N., Paulissen G., Quesada Calvo F., Polette M., Gueders M., Munaut C., Foidart J-M., Noel A., Birembaut P. and Cataldo D., "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).
- [25] Lee N.V., Sato M., Annis D.S., Loo J.A., Wu L., Mosher D.F. and Iruela-Arispe M.L., "ADAMTS1 mediates the release of antiangiogenic polypeptides from TSP1 and 2", *The European Molecular Biology Organization Journal*, 25, 22, 5270, (2006).
- [26] Canals F., Colomé N., Ferrer C., Plaza-Calogne M.del C. and Rodriguez-Manzeneque J.C., "Identification of substrates of the extracellular protease ADAMTS1 by DIGE proteomic analysis", *Proteomics*, 6, S28, (2006).
- [27] Sunay F.B., Turkoglu S. A., Kockar F. and Okuyan D., "The expressions of ADAMTS1 and VEGF in Du145, PC3, MCF-7 and HT-29 cell lines", *Febs Journal*, 277, 169-169, (2010).
- [28] Gustavsson H., Jennbacken K., Welen K. and Damber J.E., "Altered expression of genes regulating angiogenesis in experimental androgen-independent prostate cancer", *Prostate*, 68, 161, (2008).
- [29] Masui T., Hosotani R., Tsuji S., Miyamoto Y., Yasuda S., Ida J., Nakajima S., Kawaguchi M., Kobayashi H., Koizumi M., Toyoda E., Tulachan S., Aarii S., Doi R. and Imamura M., "Expression of METH-1 and METH-2 in pancreatic cancer", *Clinical Cancer Research*, 7, 3437, (2001).
- [30] Lind G.E., Kleivi K., Meling G.I., Teixeira M.R., Thiis-Evensen E., Rognum T.O. and Lothe R.A., "ADAMTS1, CRABP1, and NR3C1 identified as epigenetically deregulated genes in colorectal tumorigenesis", *Cell Oncol.*, 28, 5-6, 259, (2006).

- [31] Ricciardelli C., Frewin K.M., Arao Tan I., Williams E.D., Opeskin K., Pritchard M.A., Ingman W.V. and Russell D.L., ‘‘The ADAMTS1 Protease Gene Is Required for Mammary Tumor Growth and Metastasis’’, *The American Journal of Pathology*, 179(6):3075-85, (2011).
- [32] Chen J., Zhi Y., Chang XJ., Zhang SL. and Dai DQ., ‘‘Expression of ADAMTS1 and Its Correlation with Angiogenesis in Primary Gastric Cancer and Lymph Node Metastasis’’, *Digestive Diseases and Sciences*, 405-413, (2013).
- [33] Chen J., Zhang CD., Xu XY., Zhu XJ. and Dai DQ., ‘‘Downregulation of A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motif type 1 by DNA hypermethylation in human gastric cancer’’, *Molecular Medicine Reports*, (2):2487-94, (2015).
- [34] Kari M. H. Doyle and Darryl L. Russell, Venkataraman Sriraman, and Joanne S. Richards, ‘‘Coordinate Transcription of the ADAMTS-1 Gene by Luteinizing Hormone and Progesterone Receptor’’, *Molecular Endocrinology*, 18(10):2463–2478, (2004).
- [35] Chia-Wei Chou and Ching-Chow Chen, ‘‘HDAC inhibition upregulates the expression of angiostatic ADAMTS1’’, *FEBS*, 582, 4059–4065, (2008).
- [36] Hatipoglu O F., Hirohat S., Cilek M. Z., Ogawa H., Miyoshi T., Obika M., Demircan K., Shinohata R., Kusachi S. and Ninomiya Y., ‘‘ ADAMTS1 Is a Unique Hypoxic Early Response Gene Expressed by Endothelial Cells’’, *The Journal of Biological Chemistry*, 284,24, 16325–16333, (2009).
- [37] Turkoglu A. S. and K okar F., ‘‘SP1 and USF differentially regulate ADAMTS1 gene expression under normoxic and hypoxic conditions in hepatoma cells’’, *Genes D.*, 575(1):48-57, (2016).

- [38] Massague, J., "TGF β signal transduction". *Annu. Rev. Biochem*, 67: 753–91, (1998).
- [39] Massague J., Seoane J. and Wotton D., "SMAD transcription factors", *Genes Dev*, 19: 2783-2810, (2005).
- [40] Jiang L., Lai Y.K., Zhang J.F., Chan C.Y, Lu G., Lin M.CM., He M.L., Li J.C. and Kung H.F., "Transactivation of the TIEG1 confers growth inhibition of transforming growth factor- β -susceptible hepatocellular carcinoma cells", *World Journal of Gastroenterology*, 18(17): 2035-2042, (2012).
- [41] Erk N., Tarhan A. O. ve Soyağır A., "Pankreas ve Kolon Kanserinde Serum TGF- β , E Cadherin Duzeylerinin Olculmesi", *Ankara Universitesi Eczacılık Fakultesi Analitik Kimya Ana Bilim Dalı*, (2012-2014).
- [42] Dzieran J., Fabian J., Feng T., Coulouarn C., Ilkavets I., Kyselova A., Breuhahn K., Dooley S. and Meindl-Beinker N.M., "Comparative Analysis of TGF- β /SMAD Signaling Dependent Cytostasis in Human Hepatocellular Carcinoma Cell Lines" *Plos One*, (8):e72252, (2013).
- [43] Heldin C-H., Miyazono K. and ten Dijke P., "TGF- β signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins", *Nature*, 390: 465–71, (1997).
- [44] Liu, F., Hata, A., Baker, J.C., Doody, J., Carcamo, J., Harland, R.M., and Massagué, J., "A human Mad protein acting as a BMP-regulated transcriptional activator", *Nature* 381: 620–623, (1996).
- [45] - Shi Y. and Massague J., "Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus", *Cell*, 113:685–700, (2003).
- [46] Itoh S., Itoh F., Goumans MJ. and Ten Dijke P., "Signaling of transforming growth factorbeta family members through SMAD proteins" *Eur J Biochem*, 267(24):6954-67, (2000).

- [47] Bassing CH., Yingling JM. and Howe DJ, "A transforming growth factor β type I receptor that signals to activate gene expression", *Science*, 263:87–89, (1994).
- [48] Nishitoh H, Ichijo H, Kimura M, et al., "Identification of type I and type II serine/threonine kinase receptors for growth/differentiation factor-5", *J Biol Chem*, 271:21345–52, (1996).
- [49] Wrana JL., Attisano L., Wieser R., Ventura F. and Massague J., "Mechanism of activation of the TGF- β receptor", *Nature*, 370:341-7, (1994).
- [50] Liu F., Ventura F., Doody J. and Massague J., "Human type II receptor for bone morphogenic proteins (BMPs): extension of the two-kinase receptor model to the BMPs" *Mol Cell Biol.*, 15:3479–86, (1995).
- [51] Yamashita H., ten Dijke P., Franzen P., Miyazono K. and Heldin CH., "Formation of heterooligomeric complexes of type I and type II receptors for transforming growth factorbeta", *J Biol Chem*, 269(31):20172-8, (1994).
- [52] Miyazawa K., Shinozaki M., Hara T. and Furuya T., "Two major SMAD pathways in TGF-superfamily signalling", *Genes to Cells*, 1191-120, (2002).
- [53] Zhang YE; " Non-SMAD pathways in TGF- β signaling", *Cell Research* 19:128-139, (2009).
- [54] Mu Y., Gudey SK. and Landsrom M., " Non-SMAD signaling pathways", *Cell Tissue Res.* 347(1):11-20, (2012).
- [55] Moustakas A. and Heldin CH., "Non-SMAD TGF- β signals", *Journal of Cell Science* 118, 3573-3584, (2005).
- [56] Alper M., "İnsan ADAMTS2 Geninin Transkripsiyonel Regülasyonu", Doktora Tezi, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, (2013).

- [57] Köçkar, F. T., "Characterisation of the coding and promoter region of the *Xenopus laevis* C/EBP alpha gene", Ph.D, *Cardiff School of Biosciences*, Cardiff, (1999).

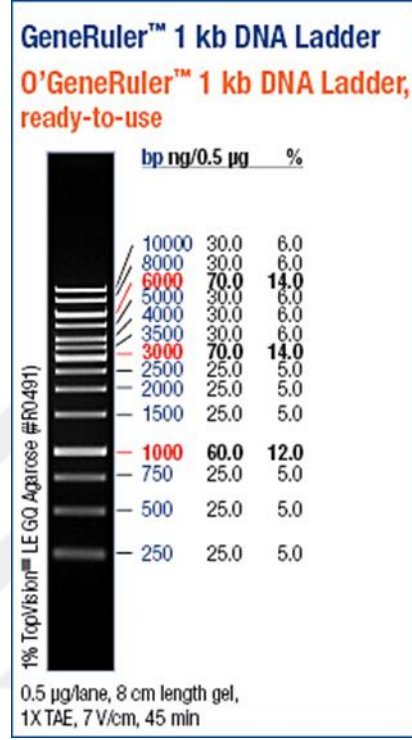




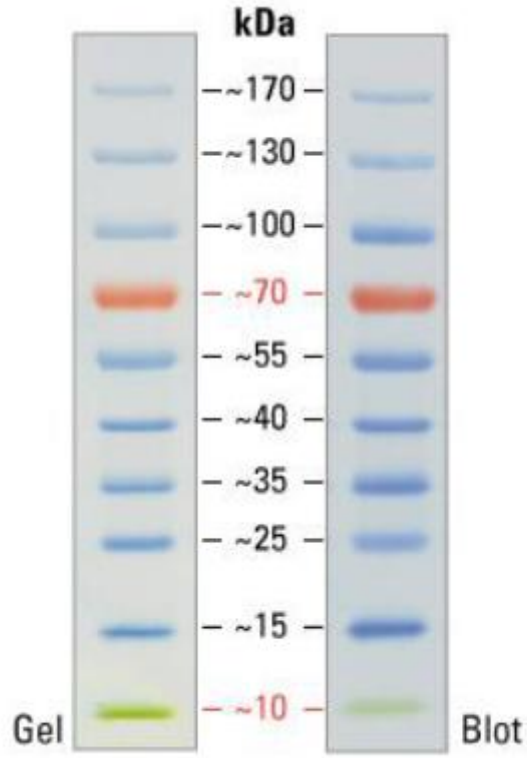
EKLER

6. EKLER

EK A (Kullanılan Büyüklük Belirteçleri)



Şekil A.1: Fermentas 1 kb DNA büyüklük belirteci



Şekil A.2: PageRuler Prestained Protein büyüklük belirteci